

NAUKI PRZYRODNICZE
I MEDYCZNE:



NAJNOWSZE DONIESIENIA
DOTYCZĄCE NAUK
MEDYCZNYCH I
BIOTECHNOLOGICZNYCH



LUBLIN 2018

**Nauki Przyrodnicze i Medyczne:
Najnowsze doniesienia dotyczące nauk
medycznych i biotechnologicznych**



Lublin 2018

Redakcja:

dr. n. med. Jerzy Bednarski – redaktor naczelny

(Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie)

dr Milena Bajda – redaktor naczelna

(Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie)

Marta Pawlicka

mgr Agata Kobyłka

Kamil Bałabuszek

Anna Mroczek

mgr farm. Kamila Kasprzak

dr n. farm. Karolina Wojtunik-Kulesza

dr n. wet. Iwona Łuszczewska-Sierakowska

Korekta, skład i łamanie:

Kamil Bałabuszek, Marta Pawlicka, Agata Kobyłka

Projekt okładki:

Agata Kobyłka

ISBN 978-83-950719-1-1

OBJĘTOŚĆ:

Ponad 8,5 arkuszy wydawniczych

Każdy rozdział zawiera minimum 20 000 znaków (minimum 0,5 arkusza wydawniczego)

WYDAWCA

Instytut Promocji Kultury i Nauki Dr Jerzy Bednarski

ul. Bohdana Dobrzańskiego 3, 20-262 Lublin

kontakt@ipkn.edu.pl

© Copyright by Instytut Promocji Kultury i Nauki Dr Jerzy Bednarski

Autorzy ponoszą odpowiedzialność za treść swoich tekstów.

Wydawca składa serdeczne podziękowania dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.

Recenzenci:

dr hab. Jolanta Król

dr Agata Skorupa

dr Agnieszka Wyszynska

dr Andrzej Górecki

dr inż. Bartosz Grześkowiak

dr n. hum. Elżbieta Chmielnicka – Kuter

dr n. med. Barbara Zapała

dr n. med. Julia Sobol

dr n. med. Wojciech Krawczyk

Wszystkie opublikowane rozdziały uzyskały pozytywne recenzje od niezależnych recenzentów.

Spis treści

WPLYW STOSOWANYCH ANTYDEPRESANTÓW PODCZAS CIĄŻY NA ROZWÓJ PŁODU I NOWORODKA.....	8
INTERNETOWE AKTYWNOŚCI SEKSUALNE A KOMPETENCJE RELACYJNE U MĘŻCZYŹN W OKRESIE WCZESNEJ DOROSŁOŚCI.....	19
MECHANIZM CRISPR-CAS9	38
WPLYW SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH NA LECZENIE HELICOBACTER PYLORI	50
ZNACZENIE ZMIENNOŚCI MIĘDZYOSOBNICZEJ BUDOWY MORFOLOGICZNEJ ZATOKI CZOŁOWEJ W IDENTYFIKACJI POŚMIERTNEJ PRZY UŻYCIU METOD RADIOGRAFII CYFROWEJ.....	69
BADANIA ODONTOLOGICZNE W IDENTYFIKACJI OSOBNICZEJ ZWŁOK I SZCZĄTKÓW LUDZKICH.....	79
OCENA WŁAŚCIWOŚCI BAKTERIOBÓJCZYCH MOCZU LUDZKIEGO WOBEC ZIARNIAKÓW Z RODZAJU STAPHYLOCOCCUS	95
MODULACJA ALLOSTERYCZNA RECEPTORA CB1	106
BIAŁKA SAMOISTNIE NIEUPORZĄDKOWANE	117
BADANIE ZAWARTOŚCI JONÓW FLUORKOWYCH W WYBRANYCH PASTACH DO ZĘBÓW I PŁYNACH DO PŁUKANIA JAMY USTNEJ.....	128
ZACHOROWANIA NA GRUŻLICĘ W POLSCE W 2016 ROKU NA TLE INNYCH KRAJÓW	138
ZAKAŻENIA WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C W POLSCE W 2016 ROKU NA TLE INNYCH KRAJÓW.....	148

WPLYW STOSOWANYCH ANTYDEPRESANTÓW PODCZAS CIĄŻY NA ROZWÓJ PŁODU I NOWORODKA

Zofia Misztal⁽¹⁾, Marta Pawlicka⁽²⁾, Anna Mroczek⁽²⁾, Kamil Bałabuszek⁽²⁾, Kamila Kasprzak⁽³⁾, Małgorzata Koziarska-Rościszewska⁽⁴⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Medycyny Rodzinnej przy Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Medycyny Rodzinnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii oraz Metodologii Badań Klinicznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Klinika Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Medycyny Rodzinnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

zosia.misztal6@gmail.com

Streszczenie

Obecnie depresja staje się coraz większym problem na świecie, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Według Światowej Organizacji Zdrowia ponad 300 milionów ludzi na świecie w różnym wieku cierpi na tą chorobę. Dotyczy ona 2-3 krotnie częściej kobiet niż mężczyzn. Dotyczy również kobiet ciężarnych, dlatego też pojawia się pytanie czy stosowanie antydepresantów w czasie ciąży może mieć wpływ na płód, a także rozwój dziecka po urodzeniu. Celem pracy jest analiza aktualnego stanu wiedzy na temat stosowania leków antydepresyjnych w czasie trwania ciąży. Problem w jednoznacznym określeniu wpływu "antydepresantów" na płód stanowią ograniczenia dotyczące stosowania leków w ciąży i badanie ich wpływu na płód i ciążarną. Większość przeanalizowanych doniesień potwierdza negatywny wpływ tych leków na płód i rozwój dziecka po porodzie. Z drugiej strony nieleczona depresja w czasie ciąży, również może prowadzić do wielu negatywnych skutków zarówno dla matki jak i dziecka. Potrzeba kolejnych, przeprowadzonych na większą skalę badań pozwalających ocenić powyższe zależności. Oprócz analiz przeprowadzanych na modelach zwierzęcych, konieczne jest obserwowanie rozwoju dzieci, których matki w okresie ciąży leczyły się lekami antydepresyjnymi.

Wprowadzenie

W ostatnich latach częstość występowania depresji stale się zwiększa stając się tym samym problemem społecznym zarówno w Polsce jak i na świecie. Według *World Health Organization* (WHO) na świecie depresja dotyczy ponad 350mln ludzi, przy czym w Polsce

jest to 1,5mln osób. Z danych zebranych dla Europy wynika, że u 10,05% kobiet i 6,61% mężczyzn występuje depresja [1]. Z powyższych danych wynika, że znacznie częściej depresja dotyczy kobiet, co może być związane z wpływem hormonów płciowych na mózg. U kobiet obserwuje się bowiem wahania nastroju związane ze zmianami hormonalnymi podczas ciąży, menopauzy lub przed miesiączką [6]. Zaburzenia psychiczne takie jak depresja czy też lęk dosyć często dotyczą kobiet w ciąży. Związane jest to ze sposobem radzenia sobie z nową, trudną sytuacją jaką jest ciąża, poród oraz macierzyństwo. Nawet u 20% ciężarnych kobiet można zaobserwować objawy depresji, a u ok. 7% objawy ciężkiej depresji [2]. Leczenie depresji jest konieczne, pomimo iż nastęca ono wiele trudności i wątpliwości. Wystąpienie depresji w czasie ciąży może niekorzystnie wpływać nie tylko na zdrowie matki ale też dziecka. Według danych amerykańskich w USA aż 8% wydawanych recept na leki przeciwdepresyjne dotyczy kobiet w ciąży. Według danych europejskich w Danii ponad 4% ciężarnym przynajmniej raz przepisano leki o działaniu antydepresyjnym [3]. Wczesne wykrycie depresji w czasie ciąży ma bardzo ważne znaczenie, ponieważ nieleczona może utrzymywać się po porodzie, upośledzając w ten sposób relacje pomiędzy matką a dzieckiem, co z kolei wpływa negatywnie na rozwój emocjonalny, behawioralny i poznawczy dziecka [4]. Badania Moryłowskiej-Topolskiej wskazują, że ryzyko wystąpienia depresji czy też nasilenie obecnych już objawów depresji podczas ciąży może być związane z ciążą nieplanowaną, nieprawidłowym przebiegiem poprzedniej ciąży oraz sytuacją materialną czy też mieszkaniową ciężarnej, występującymi już wcześniej zaburzeniami psychicznymi, korzystaniem z używek, paleniem tytoniu oraz relacjami z rodziną [4, 5].

Leki antydepresyjne krótka charakterystyka

Leki antydepresyjne kwalifikuje się do różnych grup na podstawie ich mechanizmu działania. Do głównych grup należą: trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne- TCA (*tricyclic antidepressants*), selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny-SSRI (*selective serotonin reuptake inhibitor*), inhibitory inhibitory monoaminooksydazy-MAO (*monoamine oxidase inhibitors*), inhibitory zwrotnego wychwyty noradrenaliny i serotoniny-SNRI (*serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*) i inne. Mechanizm działania TCA polega na hamowaniu wychwyty zwrotnego noradrenaliny oraz serotoniny. Przeciwwskazaniem do ich stosowania jest jaskra z zamkniętym kątem przesączania, przerost gruczołu krokowego czy zaburzenia rytmu serca. Przykładem tych leków są: imipramina, klomipramina czy amitryptalina. Objawy uboczne TCA obejmują: występowanie nadmiernej senności, zaburzenia koncentracji, napady drgawkowe, zaburzenia w przewodnictwie śródkomorowym

oraz wystąpienie zespołu cholinergicznego. Zespół cholinergiczny objawia się występowaniem: niepokoju, pobudzenia, zaczerwienienia skóry, zaburzeń widzenia, duszności. Bardzo często obecnie stosowanymi lekami są leki z grupy SSRI. Oprócz ich działania antydepresyjnego trzeba zwrócić uwagę na ich pozytywny wpływ w zaburzeniach lękowych. Przykładem leków z tej grupy są: fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna, sertralina, citalopram czy escitalopram. Ważnym i groźnym skutkiem ubocznym ich stosowania jest tak zwany zespół serotoninowy, na który składają się objawy: ogólne pobudzenie, hipomania, drżenie, hipertermia, pocenie, tachykardia, biegunki, śpiączka.

Tab.1. Charakterystyka grup antydepresantów [24-28]

Grupa leków antydepresyjnych	Substancje czynne	Preparaty	Główne działanie-mechanizm	Objawy uboczne
TCA	doksepina, opipramol, lomipramina, amitryptylina	Doxepin Pramolan, Sympramol, Anafranil, Amitryptylinum	Złożone i wielokierunkowe działanie. Hamowanie m.in. wychwyty noradrenaliny, blokowanie działania receptorów: adrenergicznego, cholinergicznego i histaminowego.	zaburzenia w przewodnictwie sercowym, suchość w jamie ustnej, wzrost masy ciała, zaparcia, senność
SSRI	fluoksetyna, paroksetyna, sertalina, fluwoksamina, norfluoksetyna	ParoGen, Arketis,Paxtin, Xetanor	Hamowanie zwrotnego wychwyty serotoniny i zwiększanie stężenie neuroprzekaźnika w synapsie. Zwiększenie częstości wysyłanych impulsów i czasu pobudzenia komórki akceptorowej.	senność, bezsenność, zawroty głowy, zaparcia, biegunka, wymioty, osłabienia
MAO	moklobemid, selegilina, rasagilina	Aurorix, Mebemid, MoklarSegan, SelgresAzilect, Rasagiline Accord, Rasagiline ratiopharm, Rasagiline Vipharm	Hamowanie zwrotnego wychwyty amin ketocholowych w zakończeniach nerwowych. Hamowanie działania receptorów dopaminowych, zwiększając tym samym stężenie dopaminy w przestrzeni	zawroty głowy, suchość w jamie ustnej, nudności, zaburzenia snu

			synaptycznej, co ma korzystny wpływ na przewodzenie impulsów nerwowych między komórkami.	
SNRI	bupropion, wenlafaksyna	Alventa, Efectin, Faxolet	Hamowanie zwrotnego wychwytu serotoniny i noradrenaliny zwiększając stężenie neuroprzekaźników w synapsie. Powoduje to zwiększenie częstości wysyłanych impulsów i czasu pobudzenia komórki akceptorowej.	nudności, senność, zawroty głowy, suchość w ustach, bezsenna

Legenda: TCA - trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne; SSRI - selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny; MAO - inhibitory inhibitory monoaminooksydazy; SNRI - inhibitory zwrotnego wychwytu noradrenaliny i serotoniny

Przegląd badań

Wiele badań wskazuje na konieczność leczenia depresji u ciężarnych, jednak leczenie farmakologiczne nie pozostaje bez wpływu na płód. Jedno z najnowszych badań (2017) przeprowadzonych w Danii wskazuje, że stosowanie leków antydepresyjnych w ciąży wiązało się ze zwiększonym ryzykiem zaburzeń psychicznych u potomstwa [7]. Do podobnych wniosków doszli również badacze z Norwegii, którzy przebadali dzieci narażone podczas życia płodowego na działanie SSRI w czasie od 1.5 do 5 r.ż. Badanie miało na celu zbadania związku ekspozycji na SSRI *in utero* a występowaniem problemów emocjonalnych oraz zachowań antyspołecznych w przyszłości. Dzieci, które były narażone na działanie SSRI w późnej ciąży były bardziej narażone na wystąpienie zachowań depresyjnych oraz lękowych w porównaniu do dzieci, których matki nie przyjmowały SSRI. Nie zauważono natomiast wzrostu częstości występowania takich zachowań u dzieci narażonych na SSRI we wczesnych etapach ciąży [8]. Związek pomiędzy farmakologicznym leczeniem kobiet w ciąży chorych na depresję a wpływem na stan psychiczny dziecka wciąż zostaje niewyjaśniony. W opisanym powyżej norweskim badaniu wykazano negatywny wpływ na rozwój płodu w późnym etapie ciąży a nie w całym jej przebiegu, dlatego potrzebne są kolejne badania, by wyjaśnić ten związek.

Badania na modelach zwierzęcych

W badaniach laboratoryjnych przeprowadzonych na szczurach wykazano, że antydepresanty przechodzą przez łożysko, a także do mleka matki. Po podaniu ciężarnym

samicom szczurów roztworu zawierającego fluoksetynę i norfluoksetynę - z grupy SSRI, w próbkach mózgow młodych szczurów odnotowano obecność tych związków, co oznacza że są one zdolne pokonać także barierę krew-mózg. W zależności od typu użytego antydepresantu z grupy SSRI, dawki i czasu ekspozycji zaobserwowano, że związki te mogą wpływać na umieralność, wielkość i wagę urodzeniową, a także na czas trwania ciąży. U potomstwa szczurów poddanych działaniu fluoksetyny odnotowano zmniejszony rozmiar i wagę urodzeniową, przy czym długość trwania ciąży była prawidłowa. Z kolei, narażenie na paroksetynę (związek z grupy SSRI) wiązało się ze zmniejszeniem wagi urodzeniowej oraz skróceniem czasu trwania ciąży, nie powodując zmniejszenia parametrów antropometrycznych noworodka. Zwiększoną śmiertelność szczurzycych płodów po ekspozycji na niektóre typy SSRI, próbowano powiązać z często występującymi malformacjami serca. Odnotowano, że większość płodów narażonych na fluoksetynę miała zmniejszony stosunek grubości lewej komory serca do jej do promienia a śmierć była wynikiem kardiomiopatii. W badaniach prowadzonych *in vitro* stwierdzono, że paroksetyna ma niekorzystny wpływ na budowę serca, ponieważ zmniejsza proliferację kardiomiocytów oraz w mniejszym stopniu namnażanie pozostałych komórek. W warunkach *in vivo* po podaniu sertraliny (z grupy SSRI) ciężarnym samicom szczura również odnotowano zmiany w morfologii serca płodów. Ekspozycja na leki z gupy SSRIs prawdopodobnie wpływa również na występowanie u potomstwa nadciśnienia tętniczego oraz zaburzeń w rozwoju mózgu [9].

Badania retrospektywne

W badaniach przeprowadzonych w USA, w których brało udział prawie 1mln ciężarnych kobiet, wykazano, że paroksetyna nie wpływa na zwiększone ryzyko wystąpienia anomalii sercowo-naczyniowych. Odnotowano natomiast, że narażenie podczas trzeciego trymestru ciąży na SSRI lub TCA wiąże się z przedwczesnym rozwiązaniem ciąży, niewydolnością oddechową, zaburzeniami wewnątrzwydzielniczymi, metabolicznymi oraz zaburzeniami w termoregulacji. Ponadto zauważono zależność stosowania SSRI z występowaniem hipoglikemii i drgawek u noworodków [10]. Prowadzone były również badania nad ryzykiem poronień samoistnych (*spontaneous abortion-SA*) w powiązaniu z zażywaniem podczas ciąży antydepresantami [11]. Badanie opierało się na analizie obszernych danych dotyczących ok. 2 tys. kobiet zamieszkałych w Kanadzie. Stwierdzono, że ekspozycja na leki przeciwdepresyjne w pierwszym trymestrze ciąży wiąże się z niewielkim ale statystycznie istotnym podwyższonym ryzykiem poronień i decyzją o zakończeniu ciąży. Dodatkowo podwyższone ryzyko występuje u kobiet z wywiadem przebytego SA [11]. W innym badaniu również przeprowadzonym w Kanadzie, na grupie kobiet ok. 5 tys.

potwierdzono istnienie zależności pomiędzy stosowaniem antydepresantów w czasie ciąży a zwiększonym ryzykiem SA, jednak ze szczególnym zwróceniem uwagi na konkretne klasy antydepresantów są to m.in.: wspomniana wcześniej paroksetyna (grupa SSRI), wenlafaksyna (z grupy SNRI) [12]. W innym badaniu przeanalizowano rejestry pochodzące z 5 źródeł administracyjnych przechowywanych w bazie danych *British Columbia Linked Health Database*. Porównywano 3 grupy noworodków podzielonych ze względu na rozpoznanie depresji i podjęcie leczenia farmakologicznego u ich matek. Dane dotyczyły 119 547 matek i ich dzieci urodzonych w latach 1998-2001 w Kolumbii Brytyjskiej w Kanadzie.

W jego wyniku stwierdzono, że antydepresanty wpływają na wagę urodzeniową, powodując jej zmniejszenie u dzieci, których matki zażywały leki grupy SSRI. Odnotowano także skrócenie czasu trwania ciąży, problemy związane z układem oddechowym, z karmieniem oraz częstsze przypadki wystąpienia żółtaczki [13].

Z kolei według badania *Québec Pregnancy/Children Cohort* prowadzonego w oparciu o dane z rejestru wszystkich ciąż i dzieci w Qubecu w okresie 11 lat (1998-2009) oceniano ryzyko wystąpienia autyzmu u dzieci w powiązaniu z przyjmowaniem antydepresantów przez matki w czasie ciąży, biorąc pod uwagę trymestr i depresję u matki. Potwierdzono, że stosowanie SSRI podczas drugiego i trzeciego trymestru ciąży było istotnie związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia autyzmu u dzieci. Autyzm zdiagnozowano u 0,7% obserwowanych dzieci, przy czym ok. 4-krotnie częściej byli to chłopcy niż dziewczynki [14]. Podobne wyniki otrzymano analizując dane ze Szwecji. Stwierdzono, że zarówno leki z grupy SSRI jak i TCA wpływają na występowanie autyzmu u dzieci w szczególności bez niepełnosprawności intelektualnej [15]. Zaprzeczają temu jednak badania przeprowadzone w Danii, gdzie analizowano dane kobiet stosujących SSRI w czasie ciąży, przed ciążą, ale nie w trakcie jej trwania i kobiet, które nigdy nie przyjmowały tych leków. Badania dotyczyły grupy 626 875 kobiet, które urodziły dziecko w latach 1996-2005. W badaniach nie wykazano istnienia jakiegokolwiek zależności pomiędzy zażywaniem leków przeciwdepresyjnych w czasie ciąży, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia autyzmu u dziecka [16].

W innym badaniu, przeprowadzonym w USA opartym na analizie rejestrów kobiet w ciąży i ich dzieci odnotowano, że narażenie na bupropion (z grupy SNRI) zwłaszcza w drugim trymestrze ciąży ma istotny związek ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zespołu nadpobudliwości z deficytem uwagi (*Attention deficit hyperactivity disorder- ADHD*). Z kolei dla leków z grupy SSRI nie wykazano takiego związku [17]. Powiązania pomiędzy zażywaniem antydepresantów z grupy SSRI a zwiększonym ryzykiem ADHD u potomstwa nie wykazało również badanie przeprowadzone w Danii na grupie ponad 800tys. dzieci urodzonych

w latach 1996-2009. Stwierdzono, że proporcja dzieci ze stwierdzonym ADHD, których matki przyjmowały SSRI do dzieci, których matki nigdy nie zażywały tych leków wynosi 1.1 : 1.4, co potwierdza postawioną tezę. Porównując zaś dzieci ze stwierdzonym ADHD, których matki przed ciążą zażywały leki z grupy SSRI do dzieci, których matki nigdy nie zażywały tych leków wynosi 0.4 do 1.4. W badaniu tym nie potwierdzono korelacji pomiędzy ekspozycją na SSRI, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia ADHD [18].

Z kolei w badaniu Nielsena poszukiwano związku pomiędzy narażeniem na SSRI, a występowaniem choroby Hirschsprunga. Badanie dotyczyło ponad 1mln dzieci urodzonych w Danii w latach 1996-2016. Stwierdzono, że przyjmowanie leków antydepresyjnych z grupy SSRIs w okresie 30 dni przed poczęciem do końca pierwszego trymestru ciąży może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem choroby Hirschsprunga [19]. W Finlandii prowadzono również badanie porównujące jaki wpływ na przebieg ciąży i rozwój płodu i noworodka ma depresja, a jaki stosowane leki przeciwdepresyjne. Amerykańscy naukowcy we współpracy z Finlandzkimi przeanalizowali obszerne dane z rejestrów medycznych dotyczących ok. 850 tys. porodów w latach 1996-2010. U kobiet stosujących SSRI ryzyko przedwczesnego porodu było o 16% mniejsze niż u kobiet ze zdiagnozowaną depresją i bez wdrożonego leczenia farmakologicznego. Autorzy przeprowadzonego badania zwracają szczególną uwagę na to, że przedwczesny poród jest najpoważniejszą pojedynczą przyczyną śmierci noworodków a także związany jest również z długofalowymi problemami neurologicznymi u dzieci [20]. Wzrost ryzyka konieczności urodzenia dziecka poprzez cesarskie cięcie jest znacznie większy u kobiet z depresją niestosujących leczenia antydepresantami w stosunku do kobiet, u których takie leczenie było wdrożone. Zauważono, że kobiety leczone SSRI nieznacznie częściej były narażone na obfitsze krwawienie poporodowe w porównaniu do kobiet bez leczenia farmakologicznego. Zażywanie leków przeciwdepresyjnych wiązało się również ze wzrostem ryzyka wszelkich problemów neonatologicznych m.in.: problemów z oddychaniem oraz uzyskaniem poniżej 7 (na 10 możliwych) punktów w skali Apgar. Skutkowało to dłuższym pobytom w szpitalu i koniecznością dłuższej opieki neonatologicznej [20].

Jeśli kobieta już przed ciążą cierpiała na depresję, istotnym problem staje się zespół objawów odstawienia leków antydepresyjnych, który może być zagrożeniem zarówno dla matki jak i płodu. Powstaje on wskutek przerwania terapii lekami antydepresyjnymi bądź nagłego zmniejszenia stosowanej dotychczas dawki. Objawami typowymi dla tego zespołu są: obniżenie nastroju, napady płaczu, bezsenność, biegunki, wymioty, bóle głowy, drżenie mięśni i inne [21]. Zespół odstawienia może też występować u noworodków, które były poddane ekspozycji *in utero* na środki antydepresyjne w trzecim trymestrze ciąży.

Do zanotowanych objawów u noworodków poddanych działaniu antydepresantów w życiu płodowym należą m.in.: bezsenność, drażliwość, drgawki kloniczne mięśni, problemy z oddychaniem w wieku dorosłym [22].

Podsumowanie

Do określenia skutków jakie mogą wywoływać „antydepresanty” na rozwój płodu i noworodka używa się modeli zwierzęcych lub przeprowadza się badania retrospektywne. Szczególne znaczenie mają tutaj badania przeprowadzone na szczurach. Mają one bowiem bardzo zbliżony rozwój osobniczy do ludzi. Ten model pozwala na zbadanie umiarkowości z powodu ekspozycji na SSRI zarówno w okresie prenatalnym i/lub po urodzeniowym ze względu na czas tej ekspozycji jak również użytą dawkę leku. Dodatkowo możliwe jest zbadanie długoterminowych procesów neurologicznych oraz wpływu stosowanych środków przeciwdepresyjnych na występowanie poszczególnych zaburzeń ze względu na płeć potomstwa. Niestety, większość badań przedklinicznych do tej pory badała wpływ SSRI u zdrowych zwierząt, a te zwierzęta które podane były sytuacji stresowej niekoniecznie mogą oddawać rzeczywisty stan depresyjny występujący u kobiet w ciąży, co może wiązać się z odmiennymi reakcjami stosowanych leków antydepresyjnych na płód [23]. Wielu informacji dostarczają analizy rejestrów ze szpitali, jednak zawierają one niepełne informacje o kobiecie i jej stanie zdrowia oraz o podatności na inne czynniki, mogące mieć podobny wpływ na rozwój płodu i noworodka, jak stosowane leki SSRI podczas ciąży. Podsumowując, dane z badań dotyczących wpływu „antydepresantów” na rozwój płodu i w późniejszym etapie na noworodka, opierające się na modelach zwierzęcych i badaniach retrospektywnych wskazują, że leki antydepresyjne stosowane podczas ciąży mogą mieć niekorzystny wpływ. Konieczne są dalsze badania, w tym uwzględniające wpływ innych czynników, na które narażona jest kobieta podczas ciąży leczona z powodu depresji.

Literatura

- [1] Ayuso-Mateos JL et al. Depressive disorders in Europe: prevalence figures from the ODIN study. *Brit J Psychiatry* 2001; 179: 308-316
- [2] Krzyżanowska-Zbócka J.: Okołoporodowe zaburzenia psychiczne a krzywdzenie dzieci, *Dziecko krzywdzone*, nr3(32), 45

- [3] A.C. Viuff, L.H. Pedersen, K. Kyng, N.H. Staunstrup, A. Borglum, T.B. Henriksen. Antidepressant medication during pregnancy and epigenetic changes in umbilical cord blood: a systematic review *Clin. Epigenet.*, 8, 2016, p. 94.
- [4] Ryan D, Milis L, Misri N. Depression during pregnancy. *Can Fam Physician.* 2005;51:1087–1093.
- [5] Moryłowska-Topolska J, Makara-Studzińska M, Kotarski J. Wpływ wybranych zmiennych socjodemograficznych i medycznych na nasilenie objawów lękowych i depresyjnych w poszczególnych trymestrach ciąży. *Psychiatr. Pol.* 2014; 48(1): 173–186.
- [6] Rymaszewska J, Dolna M, Gryboś M, Kiejna A. Zaburzenia psychiczne okołoporodowe – epidemiologia, etiologia, leczenie. *Ginekol. Pol.* 2005; 76: 322–330.
- [7] Liu X, Agerbo E, Ingstrup KG, et al. Antidepressant use during pregnancy and psychiatric disorders in offspring: Danish nationwide register based cohort study. [published online ahead of print September 2017] *BMJ*. DOI: 10.1136/bmj.j3668.
- [8] Lupattelli A, Wood M, Ystrom E, Skurtveit S, Handal M, Nordeng H. Effect of Time-Dependent Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants During Pregnancy on Behavioral, Emotional, and Social Development in Preschool-Age Children *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* [Available online 28 December 2017], access: <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.12.010>.
- [9] Olivier JD, Akerud H, Kaihola H, Pawluski JL, Skalkidou A, Högberg U, Sundström-Poromaa I: The effects of maternal depression and maternal selective serotonin reuptake inhibitor exposure on offspring. *Front Cell Neurosci.* 2013, 7: 73-10.3389/fncel.2013.00073.
- [10] Davis RL, Rubanowice D, McPhillips H, Raebel MA, Andrade SE, Smith D, Yood MU, Platt R. Risks of congenital malformations and perinatal events among infants exposed to antidepressant medications during pregnancy. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2007, 16, 1086–1094.
- [11] Einarson A, Choi J, Einarson TR, Koren G. Rates of spontaneous and therapeutic abortions following use of antidepressants in pregnancy: results from a large prospective database. *J Obstet Gynaecol Can* 2009 31: 452–456.
- [12] Nakhai-Pour H, Broy P, Bérard A. Use of antidepressants during pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *CMAJ* 2010 182: 1031–1037.
- [13] Oberlander TF, Warburton WM, Misri SA, Ghajanian JH, Hertzman C. Neonatal outcomes after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and maternal

- depression using population-based linked health data. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63 (8) 898- 906.
- [14] Boukhris T, Sheehy O, Mottron L, Bérard A. Antidepressant use during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in children. *JAMA Pediatr.* 2016;170(2):117-124.
- [15] Rai D, Lee BK, Dalman C, Golding J, Lewis G I wsp.: Magnusson C: Parental depression, maternal antidepressant use during pregnancy, and risk of autism spectrum disorders: population based case-control study. *BMJ.* 2013, 346: f2059-.
- [16] Hviid A, Melbye M, Pasternak B. Use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of autism. *N Engl J Med* 2013; 369: 2406–2415.
- [17] Figueroa R: Use of antidepressants during pregnancy and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring. *J Dev Behav Pediatr.* 2010, 31: 641-648.
- [18] Laugesen K, Olsen MS, Telen Andersen AB, Froslev T, Sorensen HT. In utero exposure to antidepressant drugs and risk of attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide Danish cohort study. *BMJ Open* 2013; 3: e003507.
- [19] Nielsen SW, et al. Maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy is associated with Hirschsprung's disease in newborns – a nationwide cohort study. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2017:12-116. doi: 10.1186/s13023-017-0667-4.
- [20] Malm. H, Sourander, A, Gissler, M. Pregnancy complications following prenatal exposure to SSRIs or maternal psychiatric disorders: results from population-based national register data. *Am J Psychiat* 2015, 172: 1224–1232.
- [21] Schelton R. The nature of discontinuation syndrome associated with antidepressant drugs. *J. Clin. Psychiatry* 2006; 67 (supl. 4): 3–7. 5. Lejoyeux M, Ades J. Antidepressant discontinuation: a review of the literature. *J. Clin. Psychiatry* 1997; 58 (supl. 7): 11–15.
- [22] Heitzman J, Solak M, Zespół odstawienia po lekach antydepresyjnych – problem dla lekarza i pacjenta. *Psychiatria Polska* 2007, XLI,5: 601–613.
- [23] Olivier JD, Akerud H, Kaihola H, Pawluski JL, Skalkidou A, Högberg U I wsp.: Sundström-Poromaa I. The effects of maternal depression and maternal selective serotonin reuptake inhibitor exposure on offspring. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2013, 7, 73.
- [24] *Leki psychotropowe w terapii zaburzeń psychicznych – kompendium* Stanisław Pużyński, Warszawa 2002

- [25] J. Szyndler, A. Skórzewska, A. Płaźnik: Leki blokujące receptory serotoninowe oraz hamujące wychwyty zwrotne serotoniny w terapii zaburzeń psychicznych. Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii 3/2003
- [26] Rzewuska M.: Leczenie zaburzeń psychicznych, PZWL 2003.
- [27] Święcicki Ł.: Interakcje trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii, 99, 2, 34-73.
- [28] Roger M. Pinder: Farmakologiczne podstawy stosowania leków przeciwdepresyjnych w praktyce klinicznej, Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii, 2000, 1, 58-73.

INTERNETOWE AKTYWNOŚCI SEKSUALNE A KOMPETENCJE RELACYJNE U MĘŻCZYŹN W OKRESIE WCZESNEJ DOROSŁOŚCI

Sylwia Jankowicz⁽¹⁾, Iwona Ulfik-Jaworska⁽²⁾

⁽¹⁾*Katedra Psychologii Klinicznej, Instytut Psychologii, Wydział Nauk Społecznych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II*

⁽²⁾*Katedra Psychologii Wychowawczej i Rodziny, Instytut Psychologii, Wydział Nauk Społecznych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II*

sylwia_jankowicz@poczta.onet.pl, iwonau@kul.pl

Streszczenie

Cel: Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka zależności między podejmowaniem internetowych aktywności seksualnych (IAS) a poziomem kompetencji relacyjnych wśród mężczyzn w okresie wczesnej dorosłości.

Grupa badawcza: W badaniu wzięło udział 217 heteroseksualnych mężczyzn będących studentami uczelni wyższych. Średnia wieku osób badanych wynosiła 21,83 (SD = 2,003).

Metody: Uczestnicy badania wypełniali Kwestionariusz Internetowych Aktywności Seksualnych (KIAS-15) oraz Kwestionariusz Kompetencji Relacyjnych w Związkach Intymnych (KKRwZI).

Wyniki: Przeprowadzone analizy statystyczne były oparte na współczynnikach korelacji między badanymi zmiennymi. Wykazano, iż zaangażowanie w IAS indywidualne oraz IAS relacyjne ujemnie koreluje z poziomem poszczególnych kompetencji relacyjnych. Nie stwierdzono związku między IAS o charakterze edukacyjnym a poziomem kompetencji relacyjnych u badanych mężczyzn.

Wprowadzenie

Termin „seks” oraz terminy bliskoznaczne to jedne z najczęściej poszukiwanych tematów w sieci. Według Carnes „...słowo „seks” należy do czołówki fraz podawanych w wyszukiwarkach (w statystykach anglojęzycznych jest to trzecie w kolejności słowo po „and” i „the”)” [1]. Powszechne zainteresowanie erotyką i seksualnością podczas korzystania z internetu wynika ze specyfiki tego medium - czyli anonimowości (*anonymity*), łatwej dostępności (*accessibility*) oraz niewielkich kosztów (*affordability*). Cechy te określane są jako „triple A engine” czyli „napęd potrójnego A” [2]. Szczególnie wysokie zaangażowanie

w internetowe aktywności seksualne (IAS) obserwuje się wśród adolescentów i młodych dorosłych, którzy bardzo intensywnie korzystają z sieci oraz jej możliwości, w tym także z erotyki sieciowej [3, 4, 5, 6].

Zjawisko to może budzić niepokój ze względu na fakt, iż okres wchodzenia w dorosłość stanowi istotny etap rozwoju psychospołecznego, w którym szczególne znaczenie ma m.in. kształtowanie własnej tożsamości oraz nawiązywanie bliskich związków i relacji partnerskich, jak również rozwój potrzeb seksualnych [7]. Wymienione zadania rozwojowe łączą się ściśle z rozwojem odpowiednich kompetencji społecznych, w tym kompetencji relacyjnych, umożliwiających nawiązywanie trwałych oraz bliskich relacji z płcią przeciwną [7]. Ponadto zaangażowanie w IAS stwarza ryzyko rozwoju uzależnienia od tego typu aktywności oraz zakłóca nawiązywanie i podtrzymywanie bliskich relacji partnerskich [8, 9]. Według Cooper i współpracowników [2] ryzyko uzależnienia od IAS jest większe u osób niezamężnych, które częściej wykorzystują sieć do poszukiwania seksualnych i/lub romantycznych partnerów.

W literaturze przedmiotu coraz więcej uwagi poświęca się eksploracji zjawiska IAS, występujących różnic płciowych oraz psychospołecznych uwarunkowań tego typu aktywności w sieci [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Niniejszy artykuł wpisuje się w ten nurt badań eksploracyjnych dotyczących IAS. Przedmiotem prezentowanych badań jest analiza związku między zaangażowaniem w IAS a poziomem kompetencji relacyjnych u mężczyzn w okresie wczesnej dorosłości.

Internetowe aktywności seksualne (IAS)

Zgodnie z literaturą przedmiotu [17, 18, 19, 20] internetowe aktywności seksualne (IAS) obejmują bardzo szerokie spektrum zachowań o charakterze seksualnym, realizowanych za pośrednictwem Internetu w celu rozrywkowym, badawczym, komercyjnym, edukacji seksualnej, poszukiwania wsparcia i/lub seksualnych albo romantycznych partnerów i innych. Przykładem takich zachowań może być m.in. poszukiwanie w sieci informacji dotyczących seksualności, oglądanie cyberpornografii, poszukiwanie partnerów seksualnych, rozmowy na czatach erotycznych, seksting, zaangażowanie w sieciowe gry erotyczne i pornograficzne [21, 9].

W literaturze opisywane są różne typologie IAS. Według Shaughnessy oraz współpracowników [14] internetowe aktywności seksualne można podzielić na: indywidualne, relacyjne oraz edukacyjne. Indywidualne IAS są zorientowane na odbiór i konsumpcję materiałów seksualnie stymulujących (np. oglądanie filmów, przeglądanie zdjęć erotycznych i/lub pornograficznych). Relacyjne IAS są ukierunkowane na nawiązywanie relacji

seksualnych z innymi użytkownikami sieci (np. seksting, czaty erotyczne). Ten typ zachowań wykorzystuje komunikacyjne możliwości Internetu, pozwalające na nadawanie i odbiór różnego typu treści (np. bodźców wizualnych, werbalnych) o charakterze erotycznym między co najmniej dwiema osobami. [22]. Edukacyjne IAS zorientowane są na poszukiwanie informacji związanych z życiem seksualnym (np. poszukiwanie artykułów dotyczących seksualności albo poradnictwa w zakresie problemów seksualnych).

Inną propozycję klasyfikacji zachowań seksualnych w sieci zaproponowali Döring i in. [23]. Wyróżnili oni 6 typów IAS: informacje związane z seksualnością, seksualna rozrywka, seksualne kontakty, mniejszości seksualne, gadzety seksualne i płatny seks. Badania pokazują, że najbardziej rozpowszechnioną formą IAS, zwłaszcza wśród mężczyzn, jest korzystanie z erotyki i pornografii sieciowej [24, 13, 14, 25]. Pozostałe typy IAS o wiele rzadziej pojawiają się w deklaracjach respondentów, a niektóre z nich - jak na przykład płatny seks - występują sporadycznie [23]. Z tego względu w badaniach własnych wykorzystano kategoryzację IAS zaproponowaną przez Shaughnessy oraz współpracowników [14].

W literaturze przedmiotu wskazuje się na istotne związki między korzystaniem z seksu internetowego a płcią użytkowników, ich orientacją seksualną oraz innymi cechami psychospołecznymi. W wielu badaniach potwierdzono, że mężczyźni istotnie częściej niż kobiety podejmują IAS poświęcając na to więcej czasu, i jednocześnie ujawniają większe nasilenie symptomów uzależnienia [26, 27, 23, 28, 29, 14].

Wskazuje się również na silniejsze zaangażowanie w IAS wśród osób o orientacji homoseksualnej i biseksualnej, głównie w celu pozyskiwania informacji, kontaktów z partnerami seksualnymi oraz dostępu do bodźców erotycznych i pornograficznych [22].

W badaniach dotyczących psychospołecznych uwarunkowań IAS stwierdzono między innymi istotne zależności pomiędzy korzystaniem z seksu internetowego a poczuciem izolacji i osamotnienia [30, 31] oraz obniżoną samoocena [32]. Natomiast religijność osób badanych była negatywnie skorelowana z częstotliwością oglądania pornografii [33].

Wczesna dorosłość i internetowe aktywności seksualne

Pojęcie wczesnej dorosłości nie jest ściśle sprecyzowane w literaturze przedmiotu i trudno jest określić uniwersalne granice oraz ramy czasowe tego okresu rozwojowego. Przyjmuje się, iż wczesna dorosłość obejmuje okres od 20–23 do 35–40 roku życia [34] i łączy się z podejmowaniem określonych ról społecznych na płaszczyźnie rodzinnej oraz zawodowej. Havighurst [34] wskazuje na specyficzne dla tego okresu zadania rozwojowe, m.in. wybór małżonka, założenie rodziny i wychowanie dzieci, prowadzenie domu, rozpoczęcie pracy

zawodowej, podjęcie obowiązków obywatelskich jak również znalezienie pokrewnej grupy społecznej.

Te tradycyjne zadania rozwojowe obecnie nadal są podejmowane i realizowane przez młodych dorosłych, jednak często są albo odraczane w czasie (jak na przykład decyzja o wstąpieniu w związek małżeński, wydłużenie okresu przygotowania zawodowego) albo realizowane są w odmienny sposób (związek kohabitacyjny zamiast związku małżeńskiego). Biorąc pod uwagę ten wydłużony proces stawania się osobą dorosłą w społeczeństwach wysoko rozwiniętych, badacze wskazują na pojawienie się dodatkowego stadium rozwojowego określanego mianem „emerging adulthood” czyli stającej się dorosłości lub też wkraczania w dorosłość [35, 50]. Okres ten przypada na 18–25. rok życia, obejmując przede wszystkim osoby studiujące. Jest to czas, w którym młodzi ludzie uzyskują swego rodzaju przyzwolenie na eksperymentowanie w zakresie różnych ról, bez konieczności podejmowania ostatecznych zobowiązań.

Zgodnie z koncepcją Eriksona [7, 51] podczas przechodzenia do kolejnych etapów rozwojowych jednostka przeżywa określone kryzysy polegające na reorganizacji potrzeb i posiadanych kompetencji. Przechodząc do wczesnej dorosłości osoba doświadcza kryzysu określanego jako konflikt między izolacją a intymnością. Przewyciężeniem tego konfliktu jest osiągnięcie zdolności do intymności oraz miłości bez utraty poczucia własnej tożsamości. Dzięki temu młody człowiek gotów jest zaangażować się w bliski związek z drugą osobą oraz stworzyć silną więź psychiczną opartą na partnerstwie, wzajemnej otwartości i zaufaniu. Nieprawidłowe rozwiązanie tego kryzysu prowadzi z kolei do izolacji czyli unikania kontaktów, które potencjalnie mogłyby prowadzić do intymności. Niepewność co do własnej tożsamości i lęk przed utratą ego w kontaktach z innymi skłania młodego człowieka do unikania interpersonalnej intymności.

Zdolność inicjowania oraz utrzymywania intymnego związku z osobą płci przeciwnej wymaga wielu nowych umiejętności wykraczających poza te, które jednostka zdobyła w okresie adolescencji. Według Palus [7] ukształtowanie zdolności do nawiązywania oraz utrzymywania heteroseksualnego intymnego związku z drugą osobą można uznać za główne kryterium przystosowania i rozwoju indywidualnego w okresie wczesnej dorosłości.

Badacze zgodnie wskazują, że ryzyko zaangażowania w IAS jest szczególnie wysokie w okresie adolescencji oraz wczesnej dorosłości, zwłaszcza wśród studentów, którzy bardzo intensywnie korzystają z sieci, w tym także z erotyki sieciowej [4, 5, 6]. Badania prowadzone wśród niemieckich adolescentów pokazały, że 93% chłopców i 52% dziewcząt w wieku 16-19

lat oglądało film pornograficzny w czasie 6 miesięcy poprzedzających badanie [36]. Z kolei wśród amerykańskich studentów prawie 90% mężczyzn deklarowało korzystanie z pornografii, przy czym prawie połowa badanych przyznaje się do korzystania z materiałów pornograficznych przynajmniej raz w tygodniu [3].

W literaturze przedmiotu obecne są także doniesienia wskazujące na podwyższone ryzyko uzależnienia od seksu internetowego wśród młodych dorosłych. Między innymi badania prowadzone w Szwecji wśród młodych internautów (N=1913) pokazały, że 5% kobiet i 13% mężczyzn ujawnia problemy związane z nałogowym korzystaniem z IAS, natomiast około 2% kobiet i 5% mężczyzn wskazywało na poważne nasilenie objawów uzależnienia od seksu internetowego [13].

Kompetencje relacyjne

Przyjmuje się, że kompetencje społeczne są określonymi umiejętnościami, dzięki którym ludzie są skuteczni w sytuacjach społecznych, w których realizują cele osobiste i zawodowe [37]. Zgodnie z powyższym, kompetencje relacyjne można rozumieć jako takie wzorce zachowań społecznych, które sprawiają, że człowiek wykazuje się skutecznością w sytuacjach budowania więzi emocjonalnych z innymi ludźmi i realizowania osobistych celów, jakimi są inicjowanie lub utrzymywanie bliskich więzi [38]. Pożądanymi wzorcami zachowań sprzyjających rozwijaniu kompetencji relacyjnych i osiągnięciu związanych z nimi celów, mogą być zachowania wiążące zaproponowane przez Kuczyńską [39]. Zachowania te, poprzez inicjowanie lub utrzymywanie więzi, pełnią rolę sygnału społecznego, który ma na celu wywołanie danej reakcji u odbiorcy. Reakcja ta może objawiać się w różnej formie. Każdą reakcję można umieścić w obrębie odpowiedniej grupy zachowań wiążących, co ilustruje Rysunek 1.



Rysunek 1. Charakterystyka zachowań wiążących

Źródło: opracowanie własne na podstawie [12, 39]

Mając na uwadze funkcje poszczególnych zachowań, można stwierdzić, iż zachowania imponujące służą zwróceniu uwagi odbiorcy na osobę prezentującą zachowanie, poprzez opowiadanie o swoich sukcesach, zdolnościach, czy też manifestowanie swej pozycji społecznej bądź atrakcyjności fizycznej. Zachowania pojednawcze służą inicjowaniu i podtrzymywaniu więzi oraz łagodzeniu agresji wskutek takich zabiegów jak choćby poczęstunki, komplementy, czy zwykłe uśmiechanie się. Wśród zachowań na rzecz partnera i związku, wymienia się dbanie o bezpieczeństwo partnera, troszczenie się o jego zdrowie, wyrażanie gotowości do wspólnej walki z przeciwnościami losu. Zachowania wchodzące w skład bliskości fizycznej ukierunkowane są na utrzymywanie bliskości, poczucia bezpieczeństwa i przyjemności. Zachowania seksualne mają wtórnie wzmacniać więź między partnerami, dostarczać przyjemności seksualnej oraz umożliwiać posiadanie potomstwa [39]. W kontekście powyższej koncepcji, kompetencje relacyjne można rozumieć jako zdolność do podejmowania wymienionych wyżej zachowań wiążących, które wzmacniają skuteczność osoby w zakresie inicjowania oraz utrzymania więzi w relacjach partnerskich. Zatem kompetencje relacyjne można uznać za istotny czynnik pozwalający na budowanie i podtrzymywanie intymnych związków, w tym związków z osobami przeciwnej płci [38].

W badaniach nad tym zjawiskiem wykazano, że młodzi dorośli nieposiadający partnera wykazują niższy poziom kompetencji relacyjnych niż osoby posiadające życiowego partnera [38]. Płeć jest czynnikiem różnicującym poziom kompetencji relacyjnych jedynie w zakresie kompetencji związanych z zachowaniami bliskości fizycznej i psychicznej oraz zachowaniami seksualnymi. W obrębie tych kompetencji to kobiety cechowały się wyższym ich poziomem w porównaniu z mężczyznami. W odniesieniu do pozostałych kompetencji relacyjnych – nie odnotowano różnic płciowych.

Internetowe aktywności seksualne a kompetencje relacyjne

Analiza literatury przedmiotu pokazuje, że podejmowanie różnych zachowań seksualnych w sieci istotnie łączy się z funkcjonowaniem społecznym i seksualnym osób badanych oraz jakością ich relacji partnerskich.

Wykazano między innymi istotny statystycznie związek pomiędzy korzystaniem z pornografii a większą liczbą kontaktów z przypadkowymi partnerami seksualnymi [3] i niższym poczuciem własnej wartości u mężczyzn. Korzystanie z pornografii u kobiet również wiązało się ze znacznie zmniejszonym poczuciem własnej wartości oraz większą ilością objawów depresyjnych niż u mężczyzn [40]. Podobnie Yellowlees i Marks [30] stwierdzili istotny związek pomiędzy uzależnieniem od seksu internetowego a niską samooceną i objawami depresji.

Potwierdzono również istnienie związku między korzystaniem z pornografii a osamotnieniem [31, 30]. Ostatnie badania wskazują ponadto na istnienie cyrkularnej zależności między tymi zmiennymi [41]. Z jednej strony korzystanie z pornografii prowadzi do osamotnienia i pogorszenia funkcjonowania społecznego, a to z kolei stwarza większą podatność osoby na korzystanie z seksu internetowego jako sposobu radzenia sobie z frustracją i trudnościami osobistymi. Powyższe badania wydają się być zgodne z wynikami uzyskanymi przez Ulfik-Jaworską i Wiechetka [25]. Nadmierne korzystanie z IAS relacyjnych w grupie studiujących mężczyzn łączyło się z dłuższym czasem pozostawania bez związku partnerskiego. Można przypuszczać, że poprzez seks internetowy osoby próbują kompensować swoją frustrację związaną z brakiem bliskiego (intymnego) związku poza siecią, co z kolei jeszcze bardziej pogłębia ich osamotnienie i wtórnie zwiększa zaangażowanie w IAS.

Z kolei według Shek i Ma [42], wyższe kompetencje społeczne i moralne oraz wyższy poziom samoskuteczności łączy się z niższą częstotliwością korzystania z pornografii wśród adolescentów. Można przypuszczać, że podobne zależności wystąpią także w grupie młodych dorosłych.

Badania osób pozostających w związkach partnerskich wskazują na istotne powiązania między korzystaniem z seksu internetowego a niską oceną jakości relacji partnerskich oraz jakości współżycia seksualnego [43, 44, 45, 8]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Grov i współpracowników [46] nie są tak jednoznaczne. Z jednej strony korzystanie z IAS powoduje zmniejszenie częstotliwości współżycia seksualnego (w ocenie kobiet) oraz osłabienie pobudzenia seksualnego podczas aktywności seksualnych poza siecią (w ocenie mężczyzn). Z drugiej strony umiarkowane i niskie zaangażowanie obojga partnerów w IAS prowadzi do pogłębienia intymności i lepszej komunikacji między nimi w sprawach seksu.

W innych badaniach prowadzonych wśród kobiet stwierdzono negatywny związek między oceną częstotliwości korzystania z treści pornograficznych przez ich partnerów a oceną jakości związku partnerskiego [47]. Według Bergner i Bridges [48] małżonkowie osób intensywnie korzystających z pornografii mieli odczucia zdrady, osłabionej intymności i aktywności seksualnej oraz mniejsze poczucie zrozumienia przez ich partnerów.

Na podstawie przeglądu dotychczasowych badań można zatem wysunąć tezę o istnieniu zależności między pewnymi deficytami kompetencji relacyjnych czyli umiejętności do nawiązywania i podtrzymywania relacji partnerskich a podejmowaniem różnych form IAS przez młodych mężczyzn. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych, bardziej szczegółowych badań.

Badania własne

Przeprowadzone badania własne miały charakter korelacyjny. Ich celem była charakterystyka związku między kompetencjami relacyjnymi u studentów a podejmowanymi przez nich internetowymi aktywnościami seksualnymi (IAS). W badaniach uwzględniono podział IAS na indywidualne, relacyjne i edukacyjne. Na podstawie literatury przedmiotu postawiono hipotezę, iż poziom kompetencji relacyjnych u mężczyzn koreluje ujemnie z poziomem zaangażowania w IAS indywidualne oraz IAS relacyjne.

Strategia badań

Badaniami zostali objęci mężczyźni studiujący na wybranych uczelniach wyższych w Lublinie. Udział w badaniu był dobrowolny. Badania prowadzone były na terenie uczelni oraz domów studenckich. Dobór grupy miał charakter incydentalny, a badania miały charakter kwestionariuszowy. Każdy zestaw kwestionariuszy został umieszczony w białej kopercie o formacie A4. Instrukcja do badania była przekazywana także ustnie podczas bezpośredniego zapraszania osoby do udziału w badaniach. Osoby, które wyraziły zgodę na udział w badaniach,

otrzymywały zestaw kwestionariuszy umieszczony w kopercie. Wypełnione kwestionariusze były odbierane po upływie 1-2 godzin od momentu ich przekazania respondentom.

Osoby badane

W badaniu wzięło udział 226 mężczyzn będących studentami uczelni wyższych w Lublinie. Ze względu na nierzetelne wypełnienie kwestionariuszy, do dalszych analiz nie włączono zestawów uzyskanych od 3 osób. W celu wzmocnienia homogeniczności grupy, wykluczono także 6 mężczyzn o orientacji homoseksualnej lub biseksualnej. Ostatecznie, w dalszych analizach statystycznych uwzględniono jedynie wyniki uzyskane od 217 mężczyzn o orientacji heteroseksualnej. Średnia wieku badanych mężczyzn wynosiła 21,83 lat ($SD = 2,003$).

Metody

Do pomiaru zaangażowania w internetowe aktywności seksualne wykorzystano Kwestionariusz Internetowych Aktywności Seksualnych (KIAS-15) autorstwa Ulfik-Jaworskiej i Wiechetka [25]. Podczas konstrukcji kwestionariusza przygotowano wstępną pulę 41 itemów opisujących różne zachowania o charakterze seksualnym realizowane za pośrednictwem internetu. Następnie za pomocą pilotażowej wersji kwestionariusza przeprowadzono badania wśród studentów. W wyniku eksploracyjnej analizy czynnikowej wyodrębniono 3 czynniki, wyjaśniające łącznie 76,9 % wariacji. Do każdego czynnika wybrano po 5 itemów, które uzyskały najwyższe ładunki czynnikowe.

Metoda służy do pomiaru zaangażowania w internetowe aktywności seksualne (IAS) w okresie minionych 3 miesięcy. Wersja wykorzystana w badaniach zawiera 15 itemów, dotyczących częstości podejmowania różnych aktywności seksualnych w Internecie ocenianych na 7-punktowej skali typu Likerta (od 1 = nigdy do 7 = codziennie). Umożliwia ocenę trzech typów zachowań: IAS indywidualne – zachowania ukierunkowane na indywidualne korzystanie z materiałów erotycznych i pornograficznych dostępnych w sieci (np. odwiedzanie stron internetowych zawierających treści erotyczne); IAS relacyjne – zachowania ukierunkowane na nawiązywanie erotycznych relacji (interakcji) z innymi osobami za pośrednictwem sieci (np. przesyłanie innym osobom zdjęć charakterze erotycznym); IAS edukacyjne – zachowania ukierunkowane na zdobywanie informacji dotyczących życia seksualnego oraz relacji intymnych (np. szukanie w sieci informacji z zakresu seksuologii). Kwestionariusz posiada wysokie wskaźniki rzetelności dla poszczególnych podskal oraz dla

pełnej skali KIAS-15 (IAS indywidualne $\alpha = 0,933$, IAS relacyjne $\alpha = 0,949$; IAS edukacyjne $\alpha = 0,862$; IAS wynik ogólny $\alpha = 0,897$).

Do pomiaru kompetencji relacyjnych wykorzystano Kwestionariusz Kompetencji Relacyjnych w Związkach Intymnych (KKRwZI) autorstwa Palus [49]. Na potrzeby badań własnych, wykorzystano skróconą wersję kwestionariusza KKRwZI, którą opracowano za zgodą autorki, na podstawie wyników uzyskanych od 526 osób. Kwestionariusz składa się z 6 podskal:

- 1) zachowania dotyczące bliskości fizycznej i psychicznej,
- 2) zachowania imponujące,
- 3) zachowania na rzecz siebie w związku;
- 4) zachowania na rzecz partnera i związku;
- 5) zachowania pojednawcze;
- 6) zachowania seksualne.

W wersji oryginalnej, każda skala składa się z 9 pozycji, natomiast w wersji skróconej, w każdej z nich pozostawiono po 4 itemy – oprócz podskali zachowania seksualne, gdzie pozostawiono 5 pozycji. Przy wyborze pozycji kierowano się tym, aby zachować jak największą spójność wewnętrzną poszczególnych podskal. W wersji oryginalnej, wskaźniki rzetelności alfa Cronbacha dla poszczególnych skal mieszczą się w granicach od 0,80 do 0,84. Po redukcji itemów, współczynniki alfa Cronbacha dla wszystkich podskal zmieniły się jedynie w niewielkim stopniu – w jednej podskali współczynnik zwiększył się, w dwóch podskalach pozostał na tym samym poziomie, a w trzech podskalach zmniejszył się w minimalnym stopniu. Ostatecznie - po redukcji liczby pozycji - uzyskano następujące wskaźniki rzetelności: 1) zachowania bliskości fizycznej i psychicznej (4 itemy), $\alpha = 0,855$; 2) zachowania imponujące (4 itemy), $\alpha = 0,845$; 3) zachowania na rzecz siebie w związku (4 itemy), $\alpha = 0,815$; 4) zachowania na rzecz partnera i związku (4 itemy), $\alpha = 0,819$; 5) zachowania pojednawcze (4 itemy), $\alpha = 0,811$; 6) zachowania seksualne (5 itemów), $\alpha = 0,801$.

Wykorzystany w badaniach własnych kwestionariusz składa się z 25 itemów. Zadaniem osoby badanej była ocena trudności, z jaką podejmuje lub podejmowałaby dane zachowanie. W porównaniu do oryginalnej wersji Kwestionariusza, format odpowiedzi został zredukowany do 7 punktowej skali Literta (1- zdecydowanie trudne do 7 – zdecydowanie łatwe). Wyższy wynik uzyskany w każdej podskali wskazuje na większe kompetencje relacyjne osoby badanej w określonym obszarze. Suma punktów uzyskana we wszystkich 25 itemach wskazuje na ogólny poziom kompetencji relacyjnych w bliskich związkach.

W analizach nie uwzględniono jednak skali kompetencji relacyjnych związanych z zachowaniami na rzecz siebie w związku, gdyż nie posiada ona podstawy teoretycznej pozwalającej na interpretację wyników badań własnych [38]. Przeprowadzono jedynie analizy odnoszące się do kompetencji wyróżnionych przez Kuczyńską [39] pięciu typów zachowań wiążących.

Wyniki badań własnych

Hipoteza dotycząca ujemnej korelacji między poziomem kompetencji relacyjnych u mężczyzn, a ich zaangażowaniem w internetowe aktywności seksualne została potwierdzona (zob. Tabela 1).

Tabela 1. Korelacje między kompetencjami relacyjnymi u mężczyzn a zaangażowaniem w IAS (r Pearsona)

	IAS indywidualne	IAS relacyjne	IAS edukacyjne	IAS wynik ogólny
zachowania bliskości fizycznej i psychicznej	- 0,069	- 0,218 **	0,084	- 0,049
zachowania imponujące	- 0,148 *	- 0,007	0,065	- 0,054
zachowania na rzecz partnera i związku	- 0,170 *	- 0,293 **	- 0,105	- 0,210 **
zachowania pojednawcze	- 0,162 *	- 0,174 *	0,062	- 0,103
zachowania seksualne	- 0,190 **	- 0,016	0,021	- 0,100
kompetencje wynik ogólny	- 0,197 **	- 0,169 *	0,029	- 0,134

Źródło: opracowanie własne (* < 0,05; ** < 0,01)

Wykazano stosunkowo słabe ujemne korelacje między poziomem kompetencji relacyjnych a IAS indywidualnymi i relacyjnymi. Im większe jest zaangażowanie w IAS indywidualne i relacyjne tym niższy poziom poszczególnych kompetencji relacyjnych u badanych mężczyzn. Podejmowanie IAS indywidualnych ujemnie koreluje z takimi kompetencjami jak: zachowania seksualne, zachowania na rzecz partnera i związku,

zachowania pojednawcze i zachowania imponujące. Zaangażowanie w IAS relacyjne koreluje negatywnie z następującymi aspektami kompetencji relacyjnych: zachowania na rzecz partnera i związku, zachowania bliskości fizycznej i psychicznej oraz zachowania pojednawcze. Nie stwierdzono związku między IAS o charakterze edukacyjnym a kompetencjami relacyjnymi młodych mężczyzn.

Dyskusja wyników

Przeprowadzone badania własne wskazują na istotny związek między zaangażowaniem w IAS indywidualne oraz IAS relacyjne a obniżonym poziomem kompetencji relacyjnych. Uzyskane wyniki nie pozwalają na określenie kierunku tych zależności. Prawdopodobnie niskie kompetencje relacyjne, czyli obniżone umiejętności inicjowania i utrzymywania bliskich więzi poza siecią, skłaniają młodych mężczyzn do korzystania z erotyki sieciowej oraz nawiązywania kontaktów o charakterze seksualnym za pośrednictwem Internetu. Możliwości w tym zakresie, jakie oferuje Internet, są ogromne, a ponadto jest to zdecydowanie łatwiejsze i nie wymaga posiadania wysokich kompetencji relacyjnych. Z drugiej strony, nie można wykluczyć, iż coraz większe zaangażowanie w seks internetowy prowadzi do wycofywania i zaniedbywania bliskich relacji z kobietami poza siecią. Badani mężczyźni, nie podejmując określonych zachowań wiążących wobec potencjalnych lub aktualnych partnerek w relacjach pozasieciowych, wtórnie obniżają swoje kompetencje relacyjne i mają większe trudności w budowaniu bliskich więzi emocjonalnych z kobietami. Powoduje to dyskomfort i poczucie niepewności w relacjach pozasieciowych, a to z kolei może jeszcze bardziej nasilać zaangażowanie w IAS. Można zatem postawić hipotezę, że pomiędzy analizowanymi zmiennymi istnieje zależność cyrkularna, przyczyniająca się do rozwoju uzależnienia od seksu internetowego [25]. Zagadnienie to wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Wyniki badań własnych wskazują, że zaangażowanie w IAS indywidualne współwystępuje z niskimi kompetencjami w zakresie zachowań seksualnych, zachowań na rzecz partnera i związku, zachowań pojednawczych oraz zachowań imponujących. Z kolei zaangażowanie w IAS relacyjne koreluje negatywnie z następującymi aspektami kompetencji relacyjnych: zachowania na rzecz partnera i związku, zachowania bliskości fizycznej i psychicznej oraz zachowania pojednawcze.

Istnieje prawdopodobieństwo, że młodzi mężczyźni korzystający z erotyki sieciowej wykazują mniejsze pobudzenie seksualne w relacjach pozasieciowych [46], natomiast więcej gratyfikacji doświadczają korzystając z IAS. Dlatego też chętniej wybierają zachowania seksualne realizowane w sieci niż poza siecią, co wyraża się w ich niższych kompetencjach

relacyjnych związanych z zachowaniami seksualnymi. Podobne zależności pomiędzy zaangażowaniem w IAS a niższą samooceną kompetencji seksualnych wykazali również Ulfik-Jaworska i Wiechetek [25].

Jednocześnie korzystanie z IAS może wzmacniać koncentrację na sobie i zaspokajaniu swoich potrzeb przez młodych mężczyzn, a to z kolei osłabia ich zdolność do wyrażania troski o partnera, podejmowania zachowań na rzecz partnera i związku oraz ujawniania zachowań pojednawczych w sytuacjach konfliktowych. Takie postawy łączą się ściśle z obniżeniem jakości relacji partnerskich, co jest spójne z wcześniejszymi badaniami, wskazującymi na istotne zależności między korzystaniem z seksu internetowego a mniejszym zaangażowaniem w relację partnerską i osłabieniem intymności w związku [43, 48].

Wysoki poziom zaangażowania w IAS indywidualne wiąże się także z niskim poziomem kompetencji w zakresie zachowań imponujących. Być może mężczyźni, którzy koncentrują się na zaspokajaniu swoich potrzeb poprzez konsumpcję materiałów erotycznych w sieci nie odczuwają potrzeby zwracania na siebie uwagi innych kobiet poza siecią czy też manifestowania swej pozycji społecznej. Niewykluczone jest również to, że niskie kompetencje w zakresie zachowań imponujących są związane z podwyższonym lekiem przed odrzuceniem oraz ujawnianiem pozabezpieczanych stylów przywiązania u badanych mężczyzn [49]. Dlatego unikają oni sytuacji prowadzących do rozwoju intymnych relacji poza siecią oraz preferują korzystanie z erotyki sieciowej, dającej im większe poczucie bezpieczeństwa i kontroli sytuacji.

W badaniach wykazano także związek między zaangażowaniem w IAS relacyjne a niskimi kompetencjami w zakresie zachowań związanych z bliskością fizyczną i psychiczną w relacjach pozasieciowych. Można przypuszczać, że mężczyźni, którzy mają trudności w wyrażaniu bliskości oraz dawaniu wsparcia w relacji partnerskiej poza siecią, chętniej nawiązują relacje seksualne w sieci. Dzięki temu w sposób zastępczy kompensują swoje sfrustrowane potrzeby bliskości, afiliacji oraz poczucia bezpieczeństwa. Można również założyć, że kierunek wpływu jest odwrotny, czyli zaangażowanie mężczyzn w interakcje erotyczne za pośrednictwem sieci powoduje obniżenie u nich poziomu kompetencji w zakresie ujawniania bliskości i pogłębiania intymności. Być może mężczyźni, którzy uzyskują zaspokojenie swoich potrzeb seksualnych w sieci w sposób bardzo szybki i bez konieczności rozwijania intymnej relacji partnerskiej, nie są zainteresowani budowaniem bliskości w związkach pozasieciowych, wymagających o wiele więcej czasu oraz wysiłku i niepewności. W kontekście zadań rozwojowych okresu wczesnej dorosłości można przyjąć, że zaangażowanie młodych mężczyzn w IAS indywidualne oraz IAS relacyjne przy współwystępowaniu deficytu kompetencji relacyjnych może być formą dysfunkcyjnego

radzenia sobie z konfliktem między izolacją a zaangażowaniem w intymne relacje partnerskie [51]. Zagadnienie to wymaga jednak przeprowadzenia odpowiednich badań.

Ograniczenia badań własnych

Z uwagi na to, iż w przedstawione badania własne mają charakter korelacyjny, nie można wnioskować o związkach przyczynowo-skutkowych między badanymi zmiennymi. Nie można zatem określić, czy niski poziom kompetencji relacyjnych jest przyczyną podejmowania IAS indywidualnych i relacyjnych w okresie wczesnej dorosłości, czy też jest następstwem nadmiernego zaangażowania w IAS. W celu weryfikacji hipotez dotyczących kierunku zależności należy przeprowadzić dalsze pogłębione badania.

Ograniczeniem badań własnych jest również wąska grupa badawcza. Badania przeprowadzono jedynie wśród heteroseksualnych mężczyzn posiadających status studenta oraz realizujących studia na terenie Lublina.

Dodatkowym ograniczeniem mogła być procedura przeprowadzonych badań. Mimo zapewnionej anonimowości, badani mężczyźni mogli czuć dyskomfort i niepokój w związku z problematyką dotyczącą zachowań bardzo osobistych i intymnych. Być może lepszym rozwiązaniem byłoby przeprowadzenie badań za pośrednictwem Internetu.

Kierunki dalszych badań

Wyniki badań własnych potwierdziły hipotezę badawczą dotyczącą związku między zaangażowaniem młodych mężczyzn w IAS indywidualne i relacyjne a poziomem ich kompetencji relacyjnych. Ze względu na eksploracyjny charakter badań oraz bardzo wąski obszar przeprowadzonych analiz, nadal brakuje odpowiedzi na wiele pytań dotyczących powiązania IAS z kompetencjami relacyjnymi. Dlatego dalsze badania w tym obszarze są niezwykle ważne, nie tylko ze względów poznawczych, ale przede wszystkim ze względu na ich społeczne znaczenie oraz możliwości wykorzystania w praktyce psychologicznej, wychowawczej oraz terapeutycznej. W dalszych badaniach warto byłby uwzględnić następujące aspekty:

- rozszerzyć grupę badawczą i objąć badaniami również kobiety, osoby, które nie posiadają statusu studenta, mieszkańców miast oraz obszarów wiejskich, osoby o orientacji biseksualnej i homoseksualnej,
- uwzględnić w badaniach inne ważne zmienne psychospołeczne, m.in. wiek, inteligencję emocjonalną, religijność, style przywiązania jak również style radzenia sobie ze stresem i in., które mogą być moderatorami badanych zależności,

- w celu zbadania przyczynowo-skutkowych zależności między poziomem kompetencji relacyjnych a zaangażowaniem w IAS warto byłoby przeprowadzić badania podłużne.

Podsumowanie

Reasumując, celem przeprowadzonych badań było określenie związku między kompetencjami relacyjnymi a różnymi typami IAS w grupie studiujących mężczyzn. Dotychczas w Polsce nie prowadzono badań w obszarze powiązań między wymienionymi zmiennymi, dlatego przedstawione badania własne miały charakter eksploracyjny. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że poziom zaangażowania w IAS typu indywidualnego oraz relacyjnego koreluje w sposób ujemny z poziomem poszczególnych kompetencji relacyjnych. Nie wykazano związku między IAS edukacyjnymi a kompetencjami relacyjnymi. Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać wnioski z innych badań prezentowanych w literaturze przedmiotu, oscylujących wokół omawianego obszaru [4,8,9,14,15, 25, 31, 41, 43, 44, 46].

Ze względu na wąską grupę osób badanych oraz inne ograniczenia przeprowadzonych badań własnych wskazane byłoby dalsze eksplorowanie omawianego zjawiska. Ponadto zagadnienia związane z czynnikami, które utrudniają bądź ułatwiają kształtowanie bliskich relacji partnerskich, będących źródłem satysfakcji życiowej, stanowią ważny obszar badań zarówno ze względów teoretycznych jak i społecznych.

Literatura

- [1] Carnes P J, Delmonico D L, Griffin E J, Moriarity J M.: Cyberseks. Skuteczna walka z uzależnieniem. Poznań: Media Rodzina. 2010.
- [2] Cooper A, Delmonico D L, Burg R.: Cybersex users, abusers, and compulsives: New findings and implications. *Sexual Addiction & Compulsivity* 2000; 7(1–2). doi: 10.1080/10720160008400205.
- [3] Carroll J S, Padilla-Walker L M, Nelson L J, Olson C D, McNamara Barry C i wsp.: Generation XXX: Pornography Acceptance and Use Among Emerging Adults. *Journal of Adolescent Research* 2008; 23(1): 6-30. doi: 10.1177/074355840 7306348.
- [4] Lo V, Wei R.: Exposure to Internet Pornography and Taiwanese Adolescents Sexual Attitudes and Behavior. *Journal of Broadcasting & Electronic Media* 2005; 49(2): 221-237. doi: 10.1207/s15506878jobem4902_5.

- [5] Price J, Patterson R, Regnerus M, Walley J.: How Much More XXX is Generation X Consuming? Evidence of Changing Attitudes and Behaviors Related to Pornography Since 1973. *The Journal of Sex Research*. 2016, 53:1, 12-20. doi: 10.1080/00224499.2014.1003773.
- [6] Velezmo R, Negy C, Livia J.: Online Sexual Activity: Cross-National Comparison Between United States and Peruvian College Students. *Archives of Sexual Behavior*. 2012; 41(4): 1015-1025. doi: 10.1007/s10508-011-9862-x.
- [7] Palus K.: Heteroseksualne związki intymne jako zadanie rozwojowe w okresie wczesnej dorosłości. *Psych. Rozw.* 2008, 13(3): 29-37.
- [8] Poulsen F O, Busby D M, Galovan A M.: Pornography Use: Who Uses It and How It Is Associated with Couple Outcomes. *Journal of Sex Research* 2013; 50(1): 72-83. doi: [10.1080/00224499.2011.648027](https://doi.org/10.1080/00224499.2011.648027).
- [9] Wéry A, Billieux J.: Online sexual activities: An exploratory study of problematic and non-problematic usage patterns in a sample of men. *Computers in Human Behavior*. 2016; 56: 257-266. doi: 10.1016/j.chb.2015.11.046.
- [10] Ballester-Arnal R, Giménez-García C, Gil-Llario M D, Castro-Calvo J.: Cybersex in the 'Net generation': Online sexual activities among Spanish adolescents. *Computers in Human Behavior*. 2016, 57, 261–266. doi:10.1016/j.chb.2015.12.036.
- [11] O'Sullivan L F.: Linking Online Sexual Activities to Health Outcomes Among Teens: New Directions for Child and Adolescent Development. 2014(144), 37–51. doi: 10.1002/cad.20059.
- [12] Owens E W, Behun R J, Manning J C, Reid R C.: The impact of Internet pornography on adolescents: A review of the research. *Sexual Addiction & Compulsivity*. 2012, 19(1–2), 99–122.
- [13] Ross M W, Månsson S A, Daneback K.: Prevalence, severity, and correlates of problematic sexual Internet use in Swedish men and women. *Archives of Sexual Behavior*. 2012; 41(2): 459-466. doi: 10.1007/s10508-011-9762-0.
- [14] Shaughnessy K, Byers E S, Walsh L.: Online Sexual Activity Experience of Heterosexual Students: Gender Similarities and Differences. *Archives of Sexual Behavior*. 2011; 40(2): 419-427. doi: 10.1007/s10508-010-9629-9.
- [15] Döring N M.: The Internet's impact on sexuality: A critical review of 15 years of research. *Computers in Human Behavior*. 2009, 25(5), 1089–1101. doi: 10.1016/j.chb.2009.04.003.

- [16] Zheng L, Zheng Y.: Online sexual activity in Mainland China: Relationship to sexual sensation seeking and sociosexuality. *Computers in Human Behavior*. 2014, 36, 323–329. doi: 10.1016/j.chb.2014.03.062.
- [17] Cooper A, Delmonico D L, Griffin-Shelley E, Mathy R M.: Online Sexual Activity: An Examination of Potentially Problematic Behaviors. *Sexual Addiction & Compulsivity*. 2004; 11(3): 129-143. doi: 10.1080/10720160490882642.
- [18] Cooper A, Griffin-Shelley E, Delmonico D L, Mathy R M.: Online sexual problems: Assessment and predictive variables. *Sexual Addiction & Compulsivity: The Journal of Treatment and Prevention*. 2001; 8(3–4): 267-285.
- [19] Cooper A, Månsson S-A, Daneback K, Tikkanen R, Ross M.: Predicting the future of Internet sex: Online sexual activities in Sweden. *Sexual and Relationship Therapy*. 2003; 18(3): 277-291. doi: 10.1080/1468199031000153919.
- [20] Cooper A, Morahan-Martin J, Mathy R M, Maheu M.: Toward an Increased Understanding of User Demographics in Online Sexual Activities. *Journal of Sex & Marital Therapy*. 2002; 28(2): 105-129. doi: 10.1080/00926230252851861.
- [21] Griffiths M.: Internet sex addiction: A review of empirical research. *Addiction Research & Theory* 2012; 20(2): 111-124. doi: 10.3109/16066359.2011.588351.
- [22] Byers E S, Shaughnessy K.: Attitudes toward online sexual activities. *Cyberpsychology: Journal of Psychosocial Research on Cyberspace*. 2014; 8(1) article 10. doi: 10.5817/CP2014-1-10.
- [23] Döring N M, Daneback K, Shaughnessy K, Grov C, Byers E S.: Online sexual activity experiences among college students: A four-country comparison. *Archives of Sexual Behavior*. 2015; 1-12. doi: 10.1007/s10508-015-0656-4.
- [24] Laier C, Pawlikowski M, Pekal J, Schulte F P, Brand M.: Cybersex addiction: Experienced sexual arousal when watching pornography and not real-life sexual contacts makes the difference. *Journal of Behavioral Addictions*. 2013; 2(2): 100-107. doi: 10.1556/JBA.2.2013.002.
- [25] Ulfik-Jaworska I, Wiechetek M.: Psychospołeczne uwarunkowania poziomu uzależnienia od seksu internetowego – moderująca rola płci. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio J – Paedagogia-Psychologia*. 2017; 30(1): 51, 171-185.
- [26] Bryant P, Shim J W.: Gender, sexual affect, and motivations for Internet pornography use. *International Journal of Sexual Health*. 2008; 20(3): 187-199.
- [27] Daneback K, Cooper A, Månsson S A.: An Internet study of cybersex participants. *Archives of Sexual Behavior*. 2005; 34(3): 321-32. doi: 10.1007/s10508-005-3120-z.

- [28] Hald G M.: Gender Differences in Pornography Consumption among Young Heterosexual Danish Adults. *Archives of Sexual Behavior*. 2006; 35(5): 577-585. doi: 10.1007/s10508-006-9064-0.
- [29] Meerkerk G-J, Eijnden R J J M V D, Garretsen H F L.: Predicting Compulsive Internet Use: It's All about Sex! *CyberPsychology & Behavior*. 2006; 9(1): 95-103. doi: 10.1089/cpb.2006.9.95.
- [30] Yellowlees P M, Marks S.: Problematic Internet use or Internet addiction? *Computers in Human Behavior*. 2007; 23(3): 1447-1453. doi: 10.1016/j.chb.2005. 05.004.
- [31] Yoder V C, Virden T B, Amin K.: Internet Pornography and Loneliness: An Association? *Sexual Addiction & Compulsivity*. 2005; 12(1): 19-44. doi: 10.1080/10720160590933653.
- [32] Kim Y H.: Adolescents' health behaviours and its associations with psychological variables. *Central European Journal of Public Health*. 2011, 19(4), 205–209.
- [33] Hardy S A, Steelman M A, Coyne S M, Ridge R D.: Adolescent religiousness as a protective factor against pornography use. *Journal of Applied Developmental Psychology*. 2013, 34(3), 131–139. doi:10.1016/j.appdev.2012.12.002.
- [34] Gurba, E. (2000). Wczesna dorosłość. W: B. Harwas – Napierała, J. Trempała (red.), *Psychologia rozwoju człowieka. Charakterystyka okresów życia człowieka* (t. 2, s. 202–229). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [35] Lipska A, Zagórska W.: Stająca się dorosłość w ujęciu Jeffreya J. Arnetta jako rozbudowana faza liminalna rytuału przejścia. *Psychologia Rozwojowa*. 2011, 16(1): 9-21.
- [36] Weber M, Quiring O, Daschmann G.: Peers, parents, and pornography: Exploring adolescents' exposure to sexually explicit material and its developmental correlates. *Sexuality and Culture*. 2012, 16(4), 408–427. doi:10.1007/s12119-012-9132-7.
- [37] Argyle M.: *Psychologia stosunków międzyludzkich*. Warszawa: PWN. 2002.
- [38] Adamczyk K.: Kompetencje relacyjne młodych dorosłych nieposiadających i posiadających partnera życiowego. *Psychologia Rozwojowa*. 2012; 17(2): 87-100. doi:10.4467/20843879PR.12.014.0463.
- [39] Kuczyńska A.: *Sposób na bliski związek. Zachowania wiążące w procesie kształtowania się i utrzymania więzi w bliskich związkach*. Warszawa: Wydawnictwo Instytutu Psychologii PAN. 1998.
- [40] Willoughby B J, Carroll J S, Nelson L J, Padilla-Walker L M.: Associations between relational sexual behaviour, pornography use, and pornography acceptance among US

- college students. *Culture, Health & Sexuality*. 2014; 16(9): 1052-1069. doi: 10.1080/13691058.2014.927075.
- [41] Butler M H, Pereyra S A, Draper T W, Leonhardt N D, Skinner K B.: Pornography Use and Loneliness: A Bidirectional Recursive Model and Pilot Investigation, *J Sex Marital Ther*. 2017 Apr 27:1-11. doi: 10.1080/0092623X.2017.1321601.
- [42] Shek D T L, Ma C M S.: Consumption of pornographic materials among early adolescents in Hong Kong: Profiles and psychosocial correlates. *International Journal on Disability and Human Development*. 2012, 11(2), 143–150. doi:10.1515/ijdh-2012-0024.
- [43] Bridges A J, Morokoff P J.: Sexual media use and relational satisfaction in heterosexual couples. *Personal Relationships*. 2011, 18, 562–585.
- [44] Lambert N M, Negash S, Stillman T F, Olmstead S B, Fincham F D.: A love that doesn't last: Pornography consumption and weakened commitment to one's romantic partner. *Journal of Social and Clinical Psychology*. 2012, 31, 410–438.
- [45] Maddox A M, Rhoades G K, Markman H J.: Viewing sexually-explicit materials alone or together: Associations with relationship quality. *Archives of Sexual Behavior*. 2009, 40, 441–448.
- [46] Grov C, Gillespie B, Royce T, Lever J.: Perceived consequences of casual online sexual activities on heterosexual relationships: A U. S. online survey. *Archives of Sexual Behavior*. 2011, 40, 429–439.
- [47] Stewart D N, Szymanski D M.: Young Adult Women's Reports of Their Male Romantic Partner's Pornography Use as a Correlate of Their Self-Esteem, Relationship Quality, and Sexual Satisfaction. *Sex Roles*. 2012; 67(5 – 6): 257-271. doi: 10.1007/s11199-012-0164-0.
- [48] Bergner R M, Bridges A J.: The significance of heavy pornography involvement for romantic partners: Research and clinical implications. *Journal of Sex and Marital Therapy*. 2002 28, 193–206. doi: 10.1080/009262302760328235.
- [49] Palus K.: Wybrane psychologiczne uwarunkowania braku partnera życiowego w okresie wczesnej dorosłości. Poznań Wydawnictwo Naukowe WNS UAM. 2010.
- [50] Arnett J.J.: Emerging adulthood: A theory of development from the late teens through the twenties. *American Psychologist*. 2000; 55(5): 469-480. doi: 10.1037/0003066X.55.5.469.
- [51] Erikson E. H.: Tożsamość a cykl życia. Zysk i S-ka. 2004.

MECHANIZM CRISPR-CAS9

Kinga Nakonieczna⁽¹⁾, Anna Radulewicz⁽¹⁾, Patrycja Malec⁽¹⁾

⁽¹⁾*Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski*

⁽²⁾*Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie*

kinga.nakonieczna@onet.pl

Streszczenie

XIX wiek przyniósł wiele odkryć w dziedzinie inżynierii genetycznej. Szczegółowa analiza m.in. genomów organizmów prokariotycznych, przyczyniła się do wykorzystania obecnych w bakteriach mechanizmów genetycznych jako narzędzi inżynierii genetycznej. Jednym z takich mechanizmów jest CRISPR-Cas zidentyfikowany przez japońskich naukowców w 1987 roku w genomie *Escherichia coli*. Na początku sądzono, iż mechanizm CRISPR-Cas odpowiedzialny jest za naprawę lub regulację genów. Z czasem lepiej poznano budowę systemu CRISPR oraz funkcje jego poszczególnych elementów. Udowodniono, iż bakteryjny system CRISPR-Cas zapewnia mikroorganizmom zachowanie oporności na fagi. Mechanizm działania CRISPR-Cas polega na wprowadzeniu do materiału genetycznego bakterii specyficznych sekwencji DNA faga, który zainfekował komórkę bakteryjną. Umożliwia to rozpoznanie obcego/fagowego DNA przez bakterie podczas kolejnego „ataku” i jego pocięcie, a tym samym unieszkodliwienie bakteriofaga.

Naukowcy stworzyli sztuczny mechanizm CRISPR-Cas, który wykorzystuje m.in. matrycę (sgRNA) skierowaną przeciwko wcześniej określonymu i znanemu odcinkowi DNA. Umożliwia to wykorzystanie tego systemu do edycji genomu komórek eukariotycznych, np. poprzez zastąpienie wadliwego genu jego poprawną wersją. Obecnie trwają badania nad leczeniem chorób genetycznych z wykorzystaniem systemu CRISPR poprzez knock-out bądź knock-in genów. Mechanizm CRISPR-Cas w ostatnim czasie stał się bardzo popularny m.in. dzięki temu, iż jest metodą tańszą i bardziej dostępną w przeciwieństwie do wcześniej stosowanych systemów opartych na nukleazach: motywu palca cynkowego (ZFN) i efektorów TALEN. Zdobyta wiedza umożliwiła użycie CRISPR-Cas w komórkach eukariotycznych do edycji genomu. Obecnie trwają prace nad wykorzystaniem systemu CRISPR do terapii genowej, terapii nowotworowej czy też terapii przeciwwirusowej.

Wprowadzenie

Dziedziną, która w ostatnich latach bardzo mocno uległa rozwojowi jest bez wątpienia inżynieria genetyczna. Podstawą tej nauki są zmiany wprowadzane w obrębie materiału genetycznego, które mają na celu pojawienie się mutacji, wyłączenie ekspresji jednego bądź wielu genów, umożliwienie wprowadzenia genu niosącego nową, poprawną sekwencję bądź dodatkowej kopii genu. Dokonanie zmian na poziomie materiału genetycznego pozwala, np. na pozyskiwanie organizmów transgenicznych. Organizmy te po wprowadzeniu zmian w obrębie DNA uzyskują nowe cechy genotypowe, które mogą być zaobserwowane w ich fenotypie [1, 2].

Inżynieria genetyczna znalazła też szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, np. w produkcji ludzkiej insuliny przez bakterie, do których materiału genetycznego wprowadzony został gen [1, 2, 3].

Uzyskana wiedza z obserwacji archeonów oraz bakterii została wykorzystana w tworzeniu systemów, obecnie wykorzystywanych do edycji genomów. Przedmiotem wielu badań jest obserwacja funkcjonowania bakterii, w ich naturalnym środowisku, podczas ataków bakteriofagowych. Bakterie, by móc się obronić przed bakteriofagami wykształciły wiele mechanizmów uniemożliwiających infekcję [1, 3].

Wielokrotne ataki bakteriofagów na bakterie, powszechne w naturalnym ekosystemie prokariotów, przyczyniły się do spadku efektywności strategii obronnych bakterii takich jak zapobieganie adsorpcji faga na powierzchni komórki bakteryjnej bądź wprowadzania obcego DNA do wnętrza komórki gospodarza, ukierunkowana śmierć komórki czy systemy addykcyjne takie jak system toksyna-antytoksyna – TA [4, 5, 6, 7].

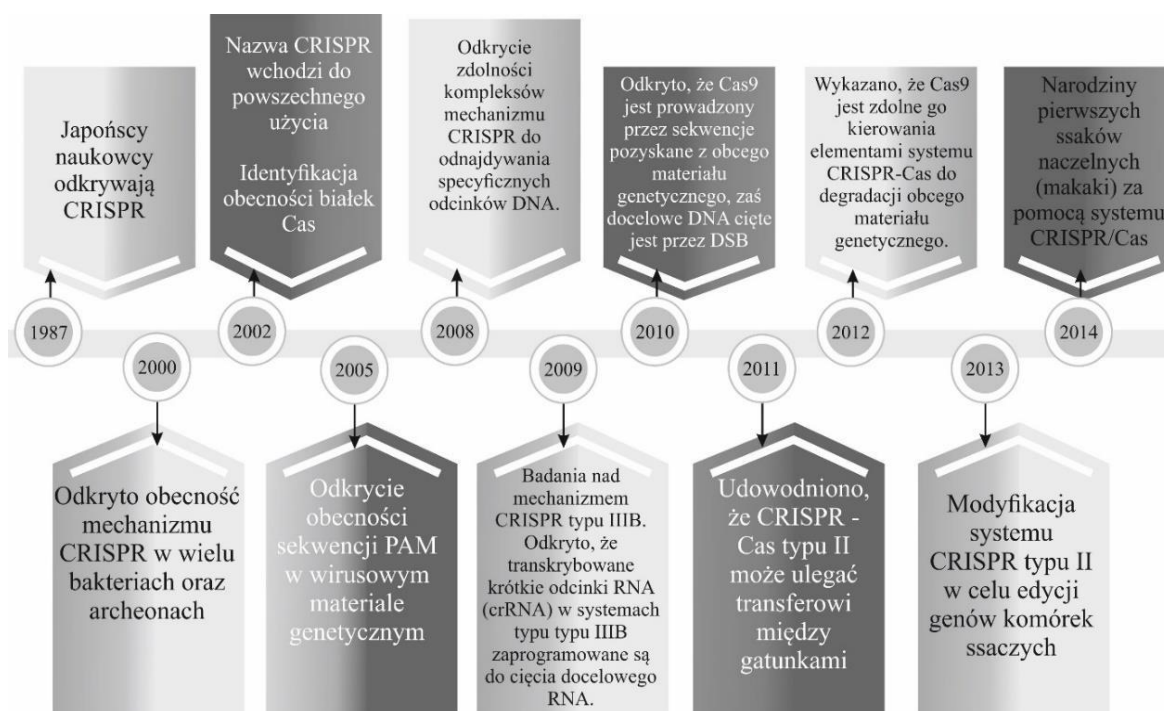
Bakteriofagi jednak mają zdolność do „omijania” bakteryjnych strategii obronnych, dlatego też bakterie chcąc przeżyć muszą aktywnie tworzyć nowe i bardziej wydajne mechanizmy obronne. W ten sposób, najprawdopodobniej, doszło do powstania mechanizmu CRISPR-Cas (ang. clustered regulary interspaced short palindromic repeats – CRISPR – associated proteins) będącego odpowiedzią na adaptacyjne strategie bakteriofagów [4, 8, 9].

Historia mechanizmu CRISPR-Cas

W 1987 roku grupa naukowców zidentyfikowała w genomie *Escherichia coli* loci CRISPR. Wyodrębniona sekwencja składa się z czternastu 29-nukleotydowych odcinków o identycznej sekwencji. Pomędzy nimi znajdowały się odcinki DNA, których sekwencje znacząco różniły się od siebie [10].

Począwszy od 2000 roku rozpoczęto poszukiwania loci CRISPR w DNA innych gatunków bakterii. Okazało się, że geny systemu CRISPR znajdują się w genomach około 40% bakterii i 90% archeonów. Zaobserwowano również, iż niektóre organizmy prokariotyczne charakteryzuje obecność więcej niż jednego loci CRISPR. Struktury kodujące elementy systemu CRISPR umiejscowione są na chromosomie, choć czasami kodowane są na plazmidach [10, 11].

Przez wiele lat naukowcy zastanawiali się nad rolą loci CRISPR. Na początku przypisano temu mechanizmowi naprawę DNA, następnie regulację genów. Dopiero badania przeprowadzone w 2002 roku doprowadziły do zidentyfikowania białek związanych z matrycą CRISPR, które nazwano białkami Cas (ang. CRISPR associated protein). Wykazano również, iż białka Cas wykazują aktywność helikaz i nukleaz. Wówczas pojawiła się koncepcja, według której, system CRISPR jest adaptacyjnym systemem obronnym. W 2005 roku dokonano kluczowego odkrycia – zaobserwowano, że w obrębie matrycy CRISPR znajdują się sekwencje komplementarne do znanych, charakterystycznych sekwencji wirusowego materiału genetycznego [12, 13, 14].



Rysunek 1. Historia mechanizmu CRISPR-Cas

Źródło: opracowanie własne

Badania prowadzone w 2008 roku na organizmie *Staphylococcus epidermidis* potwierdziły, iż kompleksy białek syntetyzowanych na matrycy CRISPR służą

do wyszukiwania w obcym (bakteriofagowym) materiale genetycznym specyficznych odcinków DNA. Kolejne badania, przeprowadzone na organizmie *Escherichia coli*, pozwoliły zidentyfikować poszczególne komponenty tworzące białkowy kompleks CRISPR. Jednym z elementów tego kompleksu okazały się białka Cas, których rolą jest dezaktywacja wirusa poprzez cięcie jego materiału genetycznego, co uniemożliwia proliferację faga [14, 15].

Przeprowadzono szereg testów i eksperymentów mających na celu głębsze poznanie mechanizmu CRISPR. Doświadczenia te przyczyniły się do scharakteryzowania trzech typów matryc CRISPR. Grupa naukowców pod kierownictwem van der Oost'a analizowała locus CRISPR typu II organizmu *Escherichia coli*. Równolegle prowadzono badania nad systemem CRISPR typu IIIA oraz IIIB, które wyodrębniono odpowiednio ze szczepów – *Staphylococcus epidermidis* oraz *Pyrococcus furiosus*. Dzięki tym analizom wyjaśniono różnice w funkcjonowaniu matryc CRISPR poszczególnych typów tego systemu [1, 2, 21].

Następnie – Moineau, scharakteryzował krótkie fragmenty DNA – PAM (ang. Protospacer adjacent motif), które umożliwiają odnalezienie i wprowadzenie dłuższych fragmentów wirusowego materiału genetycznego do DNA baterii [12, 13, 14].

Wielu naukowców rozpoczęło badania mające na celu udowodnienie, iż system CRISPR-Cas może zostać wykorzystany jako narzędzie do edycji genomu. Pierwsze doświadczenia przeprowadzono w oparciu o endonukleazę Cas9 ze szczepu *Streptococcus thermophilus* [12, 13, 14].

W 2011 roku Siksnys i wsp. wykazali, że system CRISPR-Cas9, czyli system CRISPR typu II ma zdolność do transferu pomiędzy gatunkami. Zaledwie rok później wiele laboratoriów wykonywało badania z wykorzystaniem oczyszczonego białka Cas9 jako czynnika degradującego bakteriofagowy materiał genetyczny, zaś w 2013 roku udowodniono, że system CRISPR-Cas9, można stosować, po uprzedniej modyfikacji, do wprowadzania zmian w obrębie genów komórek ssaczy [14].

Obecnie organizowane są spotkania umożliwiające wymianę doświadczeń związanych z systemem CRISPR, a co za tym idzie poszerzanie wiadomości w tym zakresie. Jednym z takich wydarzeń była konferencja Instytutu badawczego w Cambridge „Genome engineering 5.0”, która odbyła się 7 maja 2017 roku [16].

Zasada działania bakteryjnego mechanizmu CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas oznacza zgrupowane, regularnie rozmieszczone, krótkie sekwencje palindromiczne związane z białkiem Cas. Zadaniem tego systemu jest ochrona bakterii przed

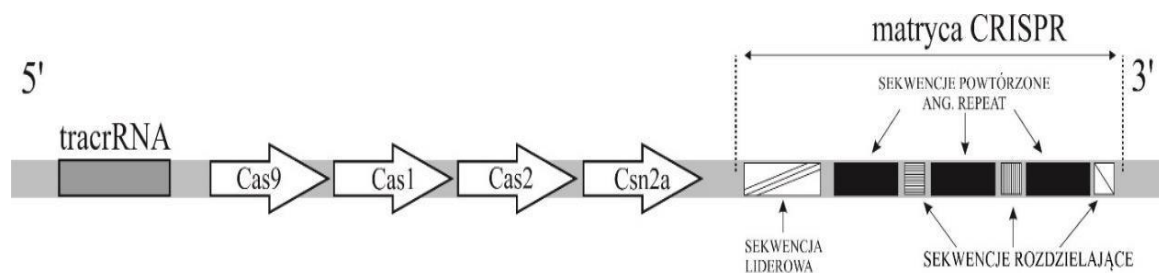
infekcjami fagowymi, co jest możliwe dzięki wprowadzaniu krótkich odcinków fagowego DNA do materiału genetycznego bakterii [10].

Właściwości immunogenne tego systemu uwarunkowane są obecnością kilku elementów strukturalnych kodowanych na wspólnej matrycy – loci CRISPR (Rys.2). Loci CRISPR budują: sekwencje rozdzielające (ang. *spacers*), sekwencje powtórzone - powtórzenie (ang. *repeats*), sekwencja liderowa oraz geny *cas* [4, 12, 13, 17].

Sekwencje rozdzielające stanowią fragmenty DNA pobrane z obszarów zwanych protospacerami, które zlokalizowane są w obrębie bakteriofagowego materiału genetycznego. Zadaniem tych sekwencji jest kodowanie cząsteczek crRNA (ang. *CRISPR RNA*), które tworzą kompleks z białkiem Cas i przeszukują wprowadzony do komórki bakteryjnej obcy materiał genetyczny w celu odnalezienia sekwencji komplementarnych do crRNA [3, 4, 12, 13, 17].

Sekwencje powtórzone stanowią fragmenty bakteryjnego materiału genetycznego o długości od 21 do 48 par zasad. W obrębie pojedynczej matrycy sekwencje powtórzone mają identyczną budowę. Szczegółowe badania pozwoliły na scharakteryzowanie 12 grup sekwencji powtórzonych. Krótkie, palindromiczne sekwencje stanowią większą grupę, a ich cechą charakterystyczną jest zdolność do tworzenia struktury steem-loop zwanej również strukturą spinki do włosów [3, 4, 12, 13, 17].

Geny *cas* stanowią matrycę dla białek związanych z systemem CRISPR-Cas, czyli białek Cas, które mają funkcję nukleaz, helikaz. Geny *cas*, a co za tym idzie również białka Cas, charakteryzują się bardzo dużym zróżnicowaniem, co dostrzec można porównując różne typy mechanizmów CRISPR. Istnieje jednak marker systemu CRISPR, którym jest białko Cas1, obecne w każdym loci CRISPR [4, 12, 13 17].



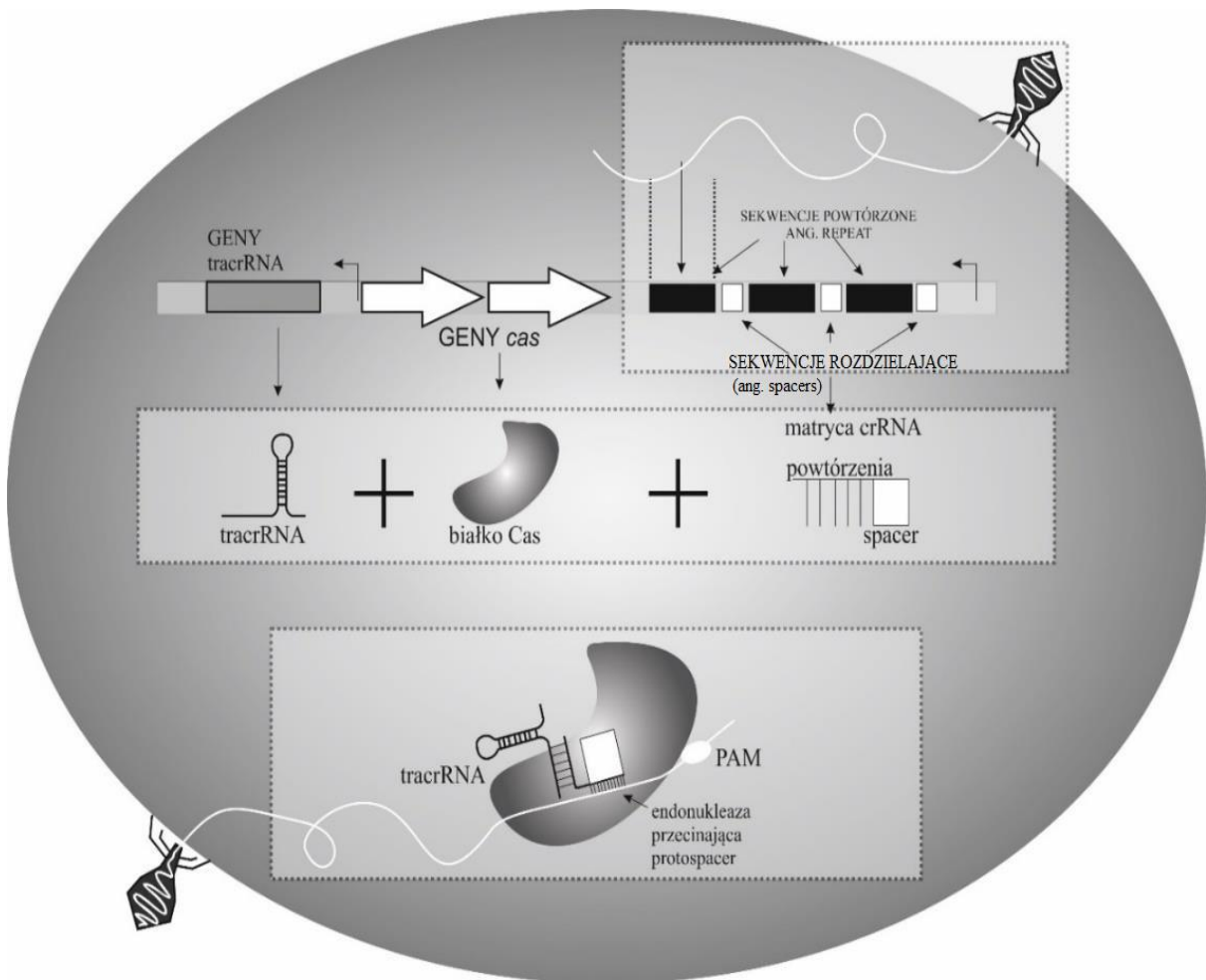
Rysunek 2. Budowa matrycy CRISPR organizmu *Streptococcus aureus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie [19]

Bakteryjny system CRISPR-Cas9 obejmuje trzy podstawowe etapy: adaptację, ekspresję oraz interferencję (Rys. 3). Pierwszy etap, adaptacja, polega na pozyskaniu fragmentu materiału genetycznego faga (protospacer), który po raz pierwszy zainfekował komórkę

bakteryjną oraz wprowadzeniu go do matrycy CRISPR zaraz za pierwszą sekwencją powtórzoną. Proces ten jest zależny od dwóch białek: Cas1 oraz Cas2. Rolę tych białek określono podczas eksperymentu, w którym wyłączono geny *cas1* i *cas2*, czego wynikiem była niezdolność bakterii do wprowadzania protospacerów do loci CRISPR. Następnie dochodzi do duplikacji powtórzenia, co konieczne jest do zachowania struktury matrycy: sekwencja powtórzona – sekwencja rozdzielająca – sekwencja powtórzona [1, 8, 9, 18, 19, 20, 21].

Etap ekspresji rozpoczyna się od transkrypcji długiego odcinka zwanego pre-crRNA. Prawidłowe działanie systemu CRISPR wymaga cięć w obrębie pre-crRNA, katalizowanych przez endonukleazę, w celu uzyskania dojrzałych crRNA, które są komplementarne do sekwencji bakteriofagowego DNA. Jednocześnie syntetyzowane są białka Cas9, a także tracrRNA (ang. *trans-activating crRNA*). Częsteczka tracrRNA jest komplementarna do crRNA i tworzy z nim dupleks [1, 8, 9, 18, 19, 20, 21, 22].



Rysunek 3. Mechanizm działania bakteryjnego systemu CRISPR-Cas9

Źródło: opracowanie własne na podstawie [20]

W ostatnim etapie, interferencji, białko Cas9 tworzy kompleks z tracrRNA oraz crRNA, który to kompleks przeszukuje wprowadzony do bakterii materiał genetyczny w celu odnalezienia sekwencji komplementarnej do crRNA. Jeśli kompleks Cas9-crRNA napotka poszukiwaną sekwencję dochodzi do stworzenia duplesu, zaś nukleaza Cas9 przecina obcy DNA w charakterystycznym miejscu uniemożliwiając tym samym proliferację faga. Odnalezienie miejsc komplementarnych do crRNA możliwe jest dzięki krótkim sekwencjom 2-5 nukleotydowym zwanych PAM (ang. *Protospacer adjacent motif*) znajdującym się w sąsiedztwie protospacera (element materiału genetycznego faga). PAM jest sekwencją charakterystyczną dla każdego szczepu bakterii. Dla białka Cas9, które zostało wyizolowane ze szczepu *Streptococcus pyogenes*, sekwencją PAM jest sekwencja 5'-NGG-3' (gdzie, N to jeden z czterech nukleotydów), wówczas cięcia w obrębie rozpoznawanej sekwencji są najbardziej wydajne [1, 8, 9, 18-22].

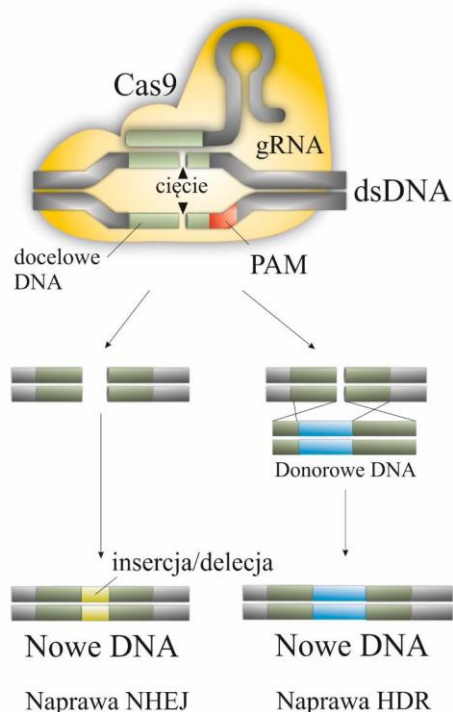
Modyfikacje systemu CRISPR-Cas9

Stosowane w inżynierii genetycznej systemy CRISPR-Cas są modyfikacją bakteryjnego systemu CRISPR typu II (CRISPR-Cas9), który został wyizolowany między innymi z organizmu *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) [23, 24, 25, 26, 27].

Laboratoryjny mechanizm CRISPR-Cas9 opiera się na wyżej opisanych etapach ekspresji i interferencji z pominięciem etapu adaptacji. Do komórki, której DNA chcemy zmodyfikować, wprowadzamy na plazmidzie geny kodujące białko Cas9 oraz odcinek sgRNA (ang. *single guide RNA*). Częsteczka sgRNA stanowi połączenie tracrRNA i crRNA, które są wprowadzane w formie pojedynczego konstruktu, co zwiększa wydajność mechanizmu CRISPR. Zsyntetyzowane białko Cas9 oraz sgRNA łączą się w kompleks, który przybiera funkcję nożyczek molekularnych. Powstały kompleks Cas9-sgRNA przeszukuje nić DNA modyfikowanej komórki i odnajduje sekwencję komplementarną do crRNA. Po odnalezieniu odpowiedniej sekwencji, nukleaza Cas9 dokonuje bardzo precyzyjnego cięcia nici DNA w wyznaczonym miejscu. Odnalezienie miejsca, w którym białko Cas9 robi przerwę uzależnione jest od obecności sekwencji PAM zlokalizowanej tuż za poszukiwanym fragmentem DNA. Powstałe DSB (ang. *Double-strand breaks*) czyli cięcia podwójnej nici naprawiane są przez mechanizmy naprawcze naturalnie występujące w każdej żywej komórce [1, 8, 9, 18, 19, 20, 21, 22].

Mechanizmy naprawiające cięcia podwójnej nici DNA to mechanizm rekombinacji homologicznej (ang. *homology-directed repair*, HDR) oraz mechanizm rekombinacji niehomologicznej (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ). HDR umożliwia zamianę

zmutowanego genu na jego poprawną wersję. By tego dokonać do jądra komórki eukariotycznej wprowadzamy fragment DNA zawierający pożądaną sekwencję, który paruje się z DNA komórki w miejscu DSB, zastępując oryginalną sekwencję, „zdrową” kopią genu. W przypadku naprawy NHEJ powstałe pęknięcie nici niwelowane jest dzięki działalności enzymów o właściwościach ligaz, które bezpośrednio łączą ze sobą końce DSB. Wynikiem takiego połączenia są mutacje: insercja lub delecja, których efektem jest zmiana ramki odczytu, a co za tym idzie wyłączenie genu – *knock-out* genu. Wykorzystanie mechanizmów NHEJ i HDR umożliwia wprowadzenie w obrębie genomu pożądaných oraz trwałych zmian – *knock-out* (wyłączenie genu), *knock-in* (wprowadzenie nowego genu) [19, 28].



Rysunek 4. Mechanizm działania inżynierskiego systemu CRISPR-Cas9

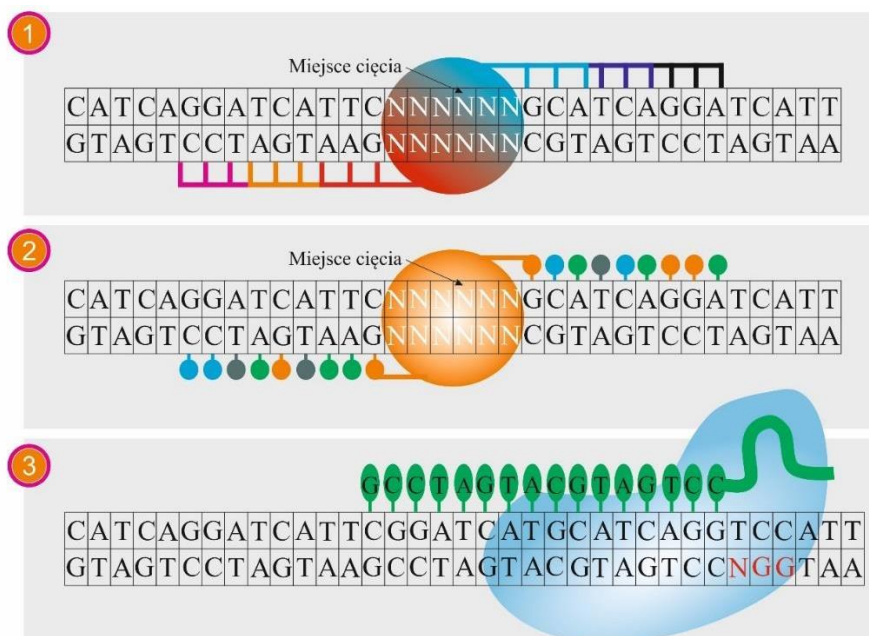
Źródło: opracowanie własne na podstawie [19]

Wprowadzane na plazmidzie geny CRISPR-Cas9 mogą kodować cząsteczki sgRNA skierowane przeciwko różnym sekwencjom. Proces ten nazywa się multipleksowaniem i umożliwia wprowadzanie zmian w obrębie wielu genów co ułatwia oraz przyspiesza edycję genomu [15, 19]. Popularność mechanizmu CRISPR-Cas9 jako narzędzia do modyfikacji genomów komórek eukariotycznych uwarunkowana jest przede wszystkim łatwością jego aplikacji, a także precyzją w wykonywaniu cięć dzięki zastosowaniu komplementarności w tworzeniu hybryd DNA-crRNA. Cechy te umożliwiają wykorzystanie CRISPR

do zwiększenia odporności bakterii hodowlanych na infekcje bakteriofagów (np. przemysł mleczarski), umożliwia poznanie genomów organizmów oraz przyczyn powstawania chorób genetycznych [19, 23, 27, 29].

Odkrycie systemu CRISPR przyćmiło odkrycie dokonane przez zespół Srinivasana Chandrasegarana (1996 rok). Zespół ten opisał laboratoryjnie zaprojektowane enzymy, zdolne do wykonywania cięć w ściśle określonym miejscu. Enzymami tymi była tzw. nukleaza oparta na motywie palca cynkowego – ZFN (ang. Zinc-finger nuclease). W tym samym czasie odkryto tzw. efektorzy TAL (TALE lub TALEN). Są to wykonane z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej białka fuzyjne, które składają się z domeny wiążącej specyficzną sekwencję DNA, a także z domeny niespecyficycznej nukleazy, która pochodzi z enzymu restrykcyjnego FokI [30, 31].

Motyw palca cynkowego ZFN oraz efektorzy TALEN, nie zaspokoili jednak potrzeb naukowców. Wynikało to z faktu, iż domeny ZFN mają zdolność rozpoznawania trójki nukleotydów. W przypadku efektorów TALEN rozpoznawany jest pojedynczy nukleotyd (Rys. 5). Użycie systemu CRISPR-Cas9 pozwoliło naukowcom na zwiększenie specyficzności do poszukiwanej sekwencji oraz precyzji w ich rozpoznawaniu przez elementy tego systemu [19, 32].



Rysunek 5. Porównanie działania motywu palca cynkowego, efektorów TALEN i mechanizmu CRISPR-Cas. (1) Motyw palca cynkowego nukleaz ZFN rozpoznające trójkę nukleotydów.

(2) Efektor TALEN rozpoznające pojedyncze nukleotydy. (3) Kompleks CRISPR-Cas9 rozpoznaje sekwencję komplementarną do odcinka RNA zaprojektowanego laboratoryjnie

Źródło: opracowanie własne na podstawie [31]

Obecne badania nad CRISPR-Cas9 skupiają się na właściwościach terapeutycznych tego systemu m.in. w leczeniu cukrzycy, chorób serca, autyzmu, terapii nowotworowej, a także terapii genowej (wykluczając konieczność modyfikacji komórek płciowych) [19, 23, 27, 29].

Podsumowanie

Obecny w bakteriach i archeonach system CRISPR-Cas9 zapewnia tym mikroorganizmom oporność na atakujące je fagi. Jest to rodzaj oporności adaptacyjnej. Krótkie fragmenty DNA faga (zwane sekwencjami rozdzielającymi) wprowadzane są do matrycy CRISPR komórki bakteryjnej. Ekspresja loci (matryca) CRISPR skutkuje powstaniem krótkich odcinków RNA (komplementarnych do fragmentów fagowego DNA), które tworzą kompleksy z białkiem Cas9. Powstały układ skierowany jest przeciwko materiałowi genetycznemu bakteriofaga. Kiedy kompleks odnajdzie odcinek komplementarny do swojej cząsteczki RNA nukleaza Cas9 tnie obce DNA uniemożliwiając tym samym inwazję wirusa.

Badania i analiza bioinformatyczna umożliwiły naukowcom dokładne poznanie systemu CRISPR-Cas9, dzięki czemu obecnie system ten stosowany jest do wprowadzania zmian w obrębie materiału genetycznego w warunkach laboratoryjnych. Mechanizm ten wyróżnia się łatwością i szybkością użycia, a także umożliwia wykonywanie precyzyjnych zmian w obrębie materiału genetycznego.

Literatura

- [1] Garneau J.E, Dupuis M, Villion M, Romero D.A, Barrangou R, i wsp.: The CRISPR-Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010 vol. 468: 67-71.
- [2] Nowosad K, Stępień P, Musiał P.: CRISPR-Cas9 nowe narzędzie inżynierii genetycznej, Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej oraz inżynierii materiałowej, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL. 2016: 78-89.
- [3] Bolotin A, Quinguis B, Sorokin A, Ehrich S.D.: CRISPRs have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005 vol. 151: 2551-2556.
- [4] Labrie S.J, Samson J.E, Moineau S.: Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews microbiology*. 2010 vol. 8: 317-327.
- [5] Makarova K.S, Haft D.H, Barrangou R, Brouns S.J, Charpentier E, i wsp.: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011 vol. 9: 467-477.

- [6] Reardon S.: CRISPR patent battle goes to court. *Nature*. 2016 vol. 540: 326-327.
- [7] Samson J.E, Magadan A.H, Sabri M, Moineau S.: Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Mikrobiology*. 2013 vol. 11: 675-687.
- [8] Marraffini L.A.: CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 vol. 526: 56-61.
- [9] Marraffini L.A, Sontheime E.J.: CRISPR interference RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetic*. 2010 vol. 11: 181-190.
- [10] Jaworski A, Dobrowolska A.: System interferencyjnego RNA bakterii (CRISPR-Cas). *Postępy mikrobiologii*. 2009 vol. 48: 23-30.
- [11] Burstein D, Harrington L, Strutt S, Probst A, Anantharaman K, i wsp.: New CRISPR–Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*. 2017 vol. 542: 237-253.
- [12] Barrangou R, Horvath P.: The CRISPR System Protects Microbes against phages. *Microbe*. 2009 vol 4 nr 5.
- [13] Barrangou R, Horvath P.: CRISPR New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review Food Science Technology*. 2012 vol. 3: 143-162
- [14] Hsu P.D, Lander E.S, Zhang F.: Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014 vol. 157: 1262-1278.
- [15] Horvath P, Barrangou R.: CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010 vol. 327: 167-170.
- [16] Oficjalna strona internetowa Konferencji Naukowej Genome Engineering 5.0 A practical, peer-to-peer workshop spanning the breadth of CRISPR genome engineering, 7-9 Maj 2017 roku, <https://broadinstitute.swoogo.com/ge5/44066>, dostęp: 5 Maj 2017.
- [17] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P.: CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance. *Nature Reviews Mikrobiology*. 2008 vol. 6: 181-186.
- [18] Chylinski K, Makarova K, Charpentier E, Koonin E.: Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*. 2014 vol. 42: 6091-6105.
- [19] Czarnek M, Bereta J.: System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 2016 vol. 70: 901-916.
- [20] Puschnik A.S, Majzoub K, Ooi Y.S, Carette J.E.: A CRISPR toolbox to study virus–host interactions. *Nature Reviews Mikrobiology*. 2017 vol. 15: 351-364.
- [21] Sternberg S.H, Redding S, Jinek M, Greene E.C, Doudna J.A.: DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 vol. 507: 62-67.
- [22] Burma S, Chen B.P.C, Chen D.J.: Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. 2006: 1042-1048.

- [23] Daneshvar K.: CRISPR-Cas9 in gene therapy: much control on breaking, little control on repairing. *PeerJ PrePrintS*. 2015 vol. 818 (2).
- [24] Doudna J.A.: Genomic Engineering and the Future of Medicine. *Jama*. 2015 vol. 313: 791-792.
- [25] Doudna J.A.: Charpentier E., The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 vol 6213: 1077-1086.
- [26] Doudna J.A, Gersbach C.A.: Genome editing the end of the beginning. *Genome biology* 2016 vol. 16: 292-294.
- [27] Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M.: The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanism and application. *Biochimie*. 2015 vol. 117: 119-128.
- [28] Wright A.V, Nunez J.K, Doudna J.A.: Biology and Applications of CRISPR Systems Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*. 2016 vol. 164: 29-44.
- [29] Cox D.B.T, Platt R.J, Zhang F.: Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine*. 2015 vol. 21: 121-131.
- [30] Koj A.: Wielkie odkrycia w naukach biologicznych i medycznych xx wieku wyróżnione nagrodami nobla. *Kosmos*. 2000 vol. 49: 327-333.
- [31] Marszałek R.: Redagowanie genomu. *Wiedza i Życie*. 2015 vol. 5 (965).
- [32] Cyranoski D.: CRISPR gene editing tested in a person. *Nature*. 2016 vol. 539: 479.

WPŁYW SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH NA LECZENIE HELICOBACTER PYLORI

Patrycja Krynicka⁽¹⁾, Renata Ochmanek⁽¹⁾, Patrycja Strojewska⁽¹⁾, Magdalena Brzeska⁽¹⁾, Anna Frydrych⁽¹⁾

⁽¹⁾Koło Naukowe Dietetyki, Klinika Gastroenterologii i Hepatologii, Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

krynickapatrycja@gmail.com

Streszczenie

Helicobacter pylori (*H. pylori*) jest bakterią, która kolonizuje żołądek ponad 50% osób na świecie. Przewlekła kolonizacja tą bakterią jest związana z szeregiem objawów, które mogą doprowadzić do chłoniaka komórek B związanych z śluzową tkanką limfatyczną (chłoniak MALT) i inwazyjnego gruczolakoraka. W leczeniu *H. pylori* zalecane są różnorodne schematy leków. Badany jest również udział składników pokarmowych we wspomaganie leczenia eradykującego tych bakterii.

Celem tej pracy był przegląd piśmiennictwa dotyczącego wpływu wybranych składników pożywienia na leczenie zakażenia *H. pylori*.

W badaniu przeglądowym prześledzono rozwój badań naukowych w latach 2004-2017 i stan wiedzy na temat wykorzystania składników pokarmowych w leczeniu zakażenia *H. pylori*. Przeszukano polskie i zagraniczne źródła internetowe z zakresu żywienia, które uzupełniono informacjami z baz danych. W tym celu wykorzystano: Polską Bibliografię Lekarską, MEDLINE-Pub-Med, Embase, Cochrane Library i ProQuest.

Z przedstawionej literatury można przypuszczać, że działanie przeciwbakteryjne wobec *H. pylori* wykazują: czarnuszka siewna, polifenole zawarte w skórce jabłka, cytrusy, a także takie składniki jak: kapsaicyna, kurkumina, α -mangostyna. Sulforafan pozyskiwany z nasion brokułów może wykazywać efekt bakteriostatyczny, jednak badania w tej kwestii nie są jednoznaczne. Z kolei allicyna występująca w surowym czosnku wykazuje działanie bakteriobójcze i wspomagające farmakoterapię *H. pylori*. Pietruszka, estragon, gałka muszkatałowa, szałwia oraz cynamon prawdopodobnie wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec *H. pylori*, natomiast: kurkuma, kminek, imbir, chili, ogórecznik, oregano oraz lukrecja bakteriostatyczne. Działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne wykazują karotenoidy- zwłaszcza astraksantyna i β - karoten, które mogą przyczynić się do zahamowania zapalenia

spowodowanego przez *H. pylori*. W profilaktyce i terapii infekcji spowodowanej przez tę bakterię znaczenie może mieć herbata zielona oraz rooibos.

Wprowadzenie

Helicobacter pylori (*H. pylori*) jest bakterią patogenną występującą na całym świecie [1]. Najnowsze badania wykazują, że pojawiła się ona już 58 000 lat temu, mimo że jej odkrycie i udowodnienie roli w chorobotwórczości nastąpiło dopiero około 25 lat temu [2]. Zakażenie *H. pylori* jest jednym z czynników powodujących przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka, chorobę wrzodową żołądka oraz dwunastnicy i chłoniaka typu MALT (tkanki limfoidalnej związanej z błoną śluzową). *H. pylori* została zakwalifikowana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Nowotworami do grupy I karcynogenów, czyli związków przyczyniających się do pojawienia się i rozwoju chorób nowotworowych. Istnieją też przypuszczenia, że zakażenie *H. pylori* koreluje z niedokrwistością spowodowaną niedoborem żelaza [1]. W populacji polskiej leczeniem pierwszego rzutu jest terapia poczwórna z użyciem bizmutu. Składają się na nią: dwa antybiotyki, inhibitor pompy protonowej oraz bizmut [3]. Problemem jest narastająca antybiotykooporność bakterii. Skuteczność terapii drastycznie spada, stąd trwają poszukiwania nowszych, bardziej efektywnych metod leczenia. Coraz więcej doniesień naukowych dowodzi, że substancje powszechnie występujące w środowisku naturalnym mogą stać się środkiem wspomagającym lub nawet alternatywą dla stosowanych środków farmaceutycznych w walce z *H. pylori* [1].

Helicobacter pylori

Bakteria *H. pylori* jest gram-ujemną pałeczką o helikalnym kształcie. Jej długość może wynosić do 5 μm , natomiast szerokość 0,5-1 μm . Biegunowo rozmieszczone rzęski zapewniają bakterii ruchliwość. Warstwa glikokaliksu, znajdująca się na powierzchni komórki, odpowiada za hydrofobowość oraz ujemny ładunek patogenu. Podstawowymi enzymami wydzielanymi przez *H. pylori* są dwa typy ureazy, katalaza i oksydaza. Ponadto bakteria produkuje dysmutazę ponadtlenkową, fosfoamidazę, fosfatazę kwaśną i alkaliczną, esterazy, transpeptytazę glutamylową oraz 20 amidaz arylowych. Wyróżniamy trzy formy morfologiczne *H. pylori*: ziarniakowatą, pałeczkowatą, a także formy ziarniakowate bakterii umierających. W populacji bakterii dominuje zjadliwa i infekcyjna postać pałeczkowata. Natomiast formy ziarniakowate są wytwarzane w warunkach niekorzystnych. Wolne lub zawieszony w śluzie *H. pylori* kolonizują żołądek na zasadzie powierzchniowej adherencji bądź kolonizacji

międzykomórkowej. Bakterie te najczęściej zasiedlają błonę śluzową odźwiernika, jednak ich obecność stwierdza się także w dwunastnicy, przełyku i kale [4].

Do czynników wirulencji *H. pylori* zaliczamy czynniki kolonizacji, umożliwiające przetrwanie oraz determinujące jej toksyczne działanie względem śluzówki żołądka. Czynnikiem kolonizacji określa się zdolność do produkowania ureazy, adhezji do komórek nabłonka, jak również umiejętność poruszania się w śluzie o dużej gęstości. Wśród czynników przetrwania wyróżniamy działanie katalazy, ureazy i dysmutazy ponadtlenkowej [4]. Pod wpływem ureazy z mocznika powstaje amoniak alkalizujący kwas solny, co pozwala *H. pylori* na przeżycie w środowisku żołądka. Czynniki warunkujące toksyczne działanie bakterii na błonę śluzową żołądka to: amoniak, cytotoksyna wakuolizująca (VacA), lipopolisacharyd (LPS). Głównym czynnikiem zjadliwości jest VacA. Prowadzi ona do uszkodzenia tkanek poprzez tworzenie w błonie komórkowej aniono-selektywnych porów, wytwarzanie wakuoli [5].

Wzrost zakażeń *H. pylori* wynika z odpowiedzi układu odpornościowego na drobnoustroje obecne w organizmie. Fragmenty bakteryjne są rozpoznawane przez komórki prezentujące, makrofagi, monocyty oraz komórki dendrytyczne, co prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych tj. TNF- α , IL-1 β i IL-8, pod wpływem których dochodzi do chemotaksji granulocytów i niszczenia lokalnych tkanek. Przewlekły stan zapalny śluzówki żołądka powoduje wzrost stężenia limfocytów CD4+, głównie Th1. Limfocyty te wpływają na wzrost produkcji cytokin TNF- α , IL-18, IL-12, IFN- γ , które są związane z odczynem zapalnym. Skutkiem tego jest uszkodzenie ścisłych połączeń międzykomórkowych nabłonka oraz zwiększenie prezentacji antygenów [6].

Ponad połowa światowej populacji jest zakażona *H. pylori*. Bakteria jest rozpowszechniona głównie w krajach rozwijających się, w mniejszym stopniu w krajach rozwiniętych. Wśród czynników warunkujących częstość oraz występowanie zakażenia należy uwzględnić płeć, wiek, pochodzenie etniczne, predyspozycje genetyczne oraz stopień higieny i edukacji. Do zakażenia drobnoustrojem może dojść na drodze oralno-oralnej, gastryczno-oralnej bądź fekalno-oralnej [4].

Patomechanizm zakażenia *H. pylori*

Bakteria *H. pylori* jest czynnikiem powodującym zakażenie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Kolonizuje przede wszystkim błonę śluzową żołądka oraz zwiększa ryzyko rozwoju raka w jego obrębie. W Polsce infekcja *H. pylori* dotyczy aż 84% populacji dorosłej

i 32% dzieci i młodzieży [4]. Do zakażenia bardzo często dochodzi w dzieciństwie i często utrzymuje się ono przez całe życie. Przebieg zakażenia nie tylko zależy od danego szczepu *H. pylori*, ale także od wieku pacjenta, stanu zdrowia, trybu życia oraz diety [4]. Zajęcie błony śluzowej żołądka początkowo obejmuje część odźwiernikową i szerzy się na całą błonę śluzową żołądka powodując proces zapalny. W odpowiedzi na zapalenie dochodzi do wzmożonego wydzielania kwasu żołądkowego poprzez stymulację komórek G wydzielających gastrynę. W przebiegu przewlekłej infekcji dochodzi do zmian zwyrodnieniowych nabłonka i gruczołów błony śluzowej, co prowadzi do zaniku błony śluzowej i bezkwaśności oraz metaplastyki jelitowej [7]. W patogenezie chorób wywoływanych przez *H. pylori* ważną rolę odgrywa czynnik wirulencji bakterii. Do czynników odpowiedzialnych za kolonizację bakterii należy zdolność do produkcji ureazy, adhezyny oraz poruszania się w gęstym śluzie [4]. Natomiast do czynników umożliwiających przetrwanie w niekorzystnym środowisku dla bakterii oraz oporność na fagocytozę należą ureaza, katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa. Ostatnią grupą są czynniki, które są odpowiedzialne za toksyczne działanie w stosunku do śluzówki żołądka i są nimi: cytotoksyna wakuolizująca, amoniak, wyspa patogenności cag- PAI oraz lipopolisacharyd, które bezpośrednio uszkodzają błonę śluzową żołądka, a także pośrednio pobudzają mediatory odpowiedzi zapalnej [4]. Początek infekcji *H. pylori* zaczyna się od obrzęku i poszerzenia naczyń krwionośnych, dzięki czemu mogą napływać komórki odczynu zapalnego. Wytwarzana przez bakterię ureaza rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla. Powstający z mocznika amoniak neutralizuje kwaśne środowisko żołądka i podwyższa lokalnie pH na powierzchni jego komórek w bezpośrednim otoczeniu bakterii. Umożliwia to przeżycie bakterii w kwaśnym środowisku żołądka. Przebieg samego zakażenia *H. pylori* może być bezobjawowy lub powoduje objawy dyspepsji, wynikające z zapalenia lub choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Alkalizacja pobudza komórki żołądka G do produkcji gastryny w celu zakwaszenia środowiska, natomiast nadmiar gastryny pobudza sekrecję kwasu solnego i pepsyny, co z kolei jest odpowiedzialne za wzrost kwaśności treści przechodzącej do jelita i ma udział w patogenezie choroby wrzodowej dwunastnicy. Podwyższone stężenie gastryny jest skutkiem indukowanego przez bakterię zmniejszenia się liczby komórek produkujących somatostatynę, a w związku z tym znacznego obniżenia się jej stężenia. Ureaza stymuluje również migrację granulocytów i monocytów do miejsca zakażenia. Uwalniane w wyniku procesu zapalnego mediatory reakcji zapalnej oraz jony chlorkowe, które łącząc się z amoniakiem tworzą toksyczną monochloraminę, powodują uszkodzenie komórek nabłonkowych i rozwój zapalenia błony śluzowej żołądka [8]. Wszystkie te czynniki mogą

prowadzić do powstania zarówno wrzodów żołądka jak i dwunastnicy. Brak skutecznej eradykacji i w związku z tym przewlekła obecność zapalenia błony śluzowej żołądka jest skorelowana z występowaniem raka żołądka i chłoniaka błony śluzowej żołądka wywodzącego się z tkanki limfatycznej (MALT) [4]. *H. pylori* produkuje szereg enzymów. Jednym z nich jest ferrytyna wiążąca jony żelaza, co jest związane z niedokrwistością szczególnie u dzieci. Cytotoksyna wakuolizująca A może powodować bezpośrednie uszkodzenie komórek nabłonkowych żołądka, obrzęk komórek i podścieliska jest stymulatorem wydzielania pepsynogenu, co wpływa na zmianę kwasowości i indukuje reakcję zapalną, a także chorobę wrzodową dwunastnicy. Ze względu na obecność lub brak cytotoksyny wakuolizującej rozróżniamy 2 szczepy bakterii: tzw. *H. pylori* VacA (+) i VacA (-). Szczepy VacA (+) odpowiedzialne są za rozwój choroby wrzodowej, a szczepy VacA (-) jedynie za zmiany zapalne błony śluzowej żołądka. Genom *H. pylori* koduje także białka towarzyszące cytotoksynie wakuolizującej VacA tzw. CagA oraz CagE. Również w tym przypadku istnieje możliwość zakażenia zarówno szczepem CagA(+), jak i CagA(-). Zakażenie szczepem *H. pylori* VacA (+) i CagA (+) istotnie częściej prowadzi do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego, który w konsekwencji może przekształcić się w nowotwór żołądka [9]. *H. pylori* w bezpośredni sposób hamuje apoptozę, natomiast mechanizm tego procesu nie jest do końca jasny. Cytotoksyczne szczepy odgrywają istotną rolę w patogenezie choroby wrzodowej i raka żołądka. Wczesne doniesienia z przełomu lat 80-tych i 90-tych wykazały, iż transformacja nowotworowa komórek śluzówki żołądka wymaga wielostopniowej aktywacji, bądź z drugiej strony – nieprawidłowej funkcji szeregu składowych układów regulujących przebieg cyklu komórkowego [9].

Sposoby leczenia *Helicobacter pylori*

W celu wyeliminowania bakterii *H. pylori* z organizmu lub ograniczenia jej wzrostu stosowane są różnokierunkowe metody. Polska jest krajem, w którym jest wysoki odsetek szczepów *H. pylori*, które wykazują oporność na klarytromycynę i z tego powodu zalecanym leczeniem jest terapia poczwórna z użyciem bizmutu stosowana przez dwa tygodnie. Składają się na nią: inhibitor pompy protonowej, bizmut oraz dwa antybiotyki. Inhibitory pompy protonowej najczęściej wykorzystywane w terapii to: esomeprazol, lanzoprazol, rabeprazol, omeprazol oraz pantoprazol. Antybiotykami podawanymi standardowo są metronidazol i tetracyklina. Leczeniem drugiego rzutu jest dwutygodniowa terapia poczwórna bez użycia bizmutu z użyciem inhibitorów pompy protonowej, amoksycyliny, klarytromycyny oraz metronidazolu lub tynidazolu [3]. Dobór odpowiednich leków uzależnia się od występowania

oporności pierwotnej bakterii w danej populacji [1]. Doniesienia wskazują, że w rejonach gdzie nie ma dużej ilości szczepów *Helicobacter* opornych na klarytromycynę, stosuje się ją jako klasyczne leczenie wraz z inhibitorem pompy protonowej oraz dwoma antybiotykami [3]. Jednak często po przyjęciu amoksycyliny i klarytromycyny wraz z inhibitorem pompy protonowej występują objawy niepożądane opisywane jako między innymi: biegunki, wymioty, bóle brzucha i zaburzenia w odczuciu smaku [1]. W razie nieskuteczności leczenia terapią poczwórną z użyciem bizmutu stosuje się lewofloksacynę oraz amoksycylinę i inhibitory pompy protonowej. Zalecane jest przede wszystkim regularne spożywanie pokarmów i wybieranie żywności, która nie powoduje ani nie nasila dolegliwości. Sugeruje się, że należy unikać spożywania wysokoprocentowego alkoholu oraz kawy, choć nie ma dowodów, aby miały one istotny negatywny wpływ na powstawanie i gojenie się owrzodzeń. Podczas eradykacji *H. pylori* nie jest zalecane palenie papierosów, które utrudnia leczenie i regenerację śluzówki. Niewskazane jest także stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Wykazano, że tolerancję kuracji poprawiają probiotyki takie jak *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp* [3]. Oporność bakterii *H. pylori* jednocześnie na metronidazol i klarytromycynę sięga już około 20% patogenów. Na nieskuteczność leczenia wpływa jednak nie tylko oporność pałeczki na leki ale również nieprzestrzeganie zaleconych dawek leków. Skuteczność eradykacji leczeniem spada wraz ze zmniejszającym się odsetkiem pacjentów przyjmujących regularnie określone dawki leków [2]. Alternatywą farmaceutyków u osób z brakiem odpowiedzi na leczenie lub jego nietolerancją mogą być ekstrakty z powszechnie występujących w środowisku roślin. Zawierają one metabolity wtórne, których działanie przeciw *H. pylori* zostało dowiedzione badaniami [1]. Skuteczność terapii powinno się oceniać metodą nieinwazyjną. [2].

Herbata zielona i rooibos

Zielona herbata jest jednym z najczęściej spożywanych napojów na świecie. Wykazano, że powstrzymuje ona rozwój zakażenia *H. pylori* [10]. Katechiny będące związkami aktywnymi zielonej herbaty o silnym działaniu przeciwutleniającym, wykazują aktywność przeciwbakteryjną względem *H. pylori* zarówno in vivo jak również in vitro [10]. Do rodziny katechin zaliczamy: katechinę, galokatechinę, epikatechinę, galusan epigallokatechiny (EGCg) oraz galusan epikatechiny [5]. Najsilniejsze działanie wykazuje galusan epigallokatechiny, przy minimalnym stężeniu hamującym (MIC) wynoszącym 8 µg/mL dla 50% testowanych szczepów bakteryjnych [10]. Wskazuje się także na dużą efektywność EGCg w przypadku

H. pylori odpornej na działanie antybiotyków [11]. Ponadto jednoczesne podawanie antybiotyków i polifenoli obniża wartość MIC antybiotyków [5]. Drugim związkiem pod względem skuteczności jest galusan epikatechiny, co świadczy o istotnym znaczeniu grup galusanowych i pirogalolowych w obronie przed drobnoustrojami. Jednym z postulowanych mechanizmów działania zielonej herbaty we wspomaganiu leczenia zakażenia *H. pylori* jest hamujący wpływ na aktywność ureazy. Kolejnym proponowanym mechanizmem jest blokowanie aktywacji receptora TLR4 przez EGCg [11]. Co więcej polifenole zawarte w zielonej herbacie hamują proces wakuolizacji wywoływany przez toksynę VacA [10]. Ekstrakt zielonej herbaty poprzez działanie antyoksydacyjne, antymutagenne i cytoochronne zapobiega rozwojowi nowotworu żołądka w zakażeniu *H. pylori* [12].

Rooibos jest w Afryce określany jako „herbata długowieczności”. Czerwonokrzew stanowi bogate źródło witamin, składników mineralnych oraz przeciwutleniaczy. W przeciwieństwie do pozostałych rodzajów herbat nie zawiera kofeiny [13]. Wśród licznych właściwości rooibos wykazuje m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe [14]. Roślina ta zawiera polifenole, dihydrochalkony, aspalathin oraz nothofagin. Chrysoeriol posiada działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe. Natomiast pozostałe substancje mogą bezpośrednio odpowiadać za hamowanie rozwoju *H. pylori* [15].

Lukrecja

Lukrecja jest stosowana w leczeniu choroby wrzodowej żołądka w medycynie chińskiej, indyjskiej i Kambo [10]. Lukrecji przypisuje się działanie ochronne na błonę śluzową żołądka, a także właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne [16]. Roślina ta zawiera liczne związki o korzystnym wpływie na przewód pokarmowy człowieka: flawonoidy, monoglukuronid kwasu glicyrytynowego, kwas lukrecjowy, kwas glicyrytynowy i inne [1]. W badaniach z użyciem bogatego we flawonoidy ekstraktu lukrecji potwierdzono jej skuteczność we wspomaganiu eradykacji *H. pylori* wyjaśniono potencjalny mechanizm działania względem tej bakterii. Wykorzystany preparat posiadał wartość MIC na poziomie 32-64 µg/mL, a głównym składnikiem ekstraktu była glabrydyna. Potencjalne mechanizmy działania lukrecji mogą dotyczyć hamowania syntezy białek, gyrazy DNA oraz reduktazy dihydrofolianowej. Nie odnotowano wpływu na zmniejszenie adhezji do linii komórkowej ludzkiego gruczołka żołądka [10]. Wodny ekstrakt z korzenia lukrecji (o stężeniu 1 mg/mL), zawierający zarówno polisacharydy jak i frakcję kwasową, silnie hamuje adhezję *H. pylori* do komórek nabłonkowych ściany żołądka

[17]. W badaniu porównującym skuteczność lukrecji i bizmutu w zwalczaniu zakażenia *H. pylori* dowiedziono, że lukrecja w terapii poczwórnej może być równie skuteczna jak bizmut. W endoskopii nie stwierdzono różnicy między badanymi grupami pod względem występowania wrzodów żołądka, dwunastnicy i zapalenia żołądka. W obydwu grupach odpowiedź na leczenie była podobna. Według autorów, lukrecja może być bezpieczną alternatywą dla pacjentów u których przeciwwskazane jest przyjmowanie bizmutu [16].

Polifenole zawarte w skórce jabłka

Jabłka stanowią bogate źródło polifenoli, wśród których wyróżniamy kwas hydroksycynamonowy, flawonole, dichydrochalkony i flawan-3-ole [18]. Zawartość polifenoli w skórce może być nawet trzy razy wyższa niż w pulpie jabłkowej [11]. Ekstrakt ze skórki jabłka hamuje wzrost i zdolność do adhezji *H. pylori*, jak również wakuolizację indukowaną przez toksyny bakteryjne. Ponadto dzięki zapobieganiu peroksydacji lipidów polifenole jabłkowe chronią komórki nabłonka żołądka przed uszkodzeniami wywołanymi przez oksydazę ksantynową oraz indometacynę [18]. Polifenole o wysokiej masie cząsteczkowej oraz ureaza konwalii mlecznoksztaltnej wykazują większą aktywność w zwalczaniu zakażenia *H. pylori* niż te o niskiej masie cząsteczkowej z wartościami IC₅₀ (stężenia hamującego) wynoszącymi 119 i 800 µg GAE/mL [19].

Imbir

Korzeń imbiru jest wykorzystywany we wspomaganie leczenia dolegliwości żołądkowo-jelitowych, w tym również choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Imbir wykazuje działanie przeciwutleniające, przeciwrzodowe, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe [20]. Wśród związków fenolowych imbiru, które wykazują wpływ na zakażenie *H. pylori* wyróżniamy m.in. 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, kwasy fenolowe i ich pochodne. Wodne i etanolowe ekstrakty z imbiru hamowały in vitro wzrost opornych na antybiotyki szczepów *H. pylori*. Co więcej równoczesne zastosowanie ekstraktu z imbiru i klarytromycyny wzmacniało działanie hamujące rozwój drobnoustroju [11]. Wodny ekstrakt imbiru chroni błonę śluzową żołądka poprzez obniżanie wydzielania soku żołądkowego. Kilka badań przedklinicznych wskazuje, iż imbir poprzez wpływ na karcynogenezę dotyczącą żołądka i jelit, chroni przed zakażeniem *H. pylori* [20]. Frakcje związków fenolowych imbiru wymiatają wolne rodniki, chronią DNA oraz hamują

peroksydację lipidów. Dodatkowo frakcje zawierające gingerole i 6-shogaol wykazują skuteczność w zwalczaniu szczepów CagA+ *H.pylori* [20].

Owoce cytrusowe

Określenie „owoce cytrusowe” odnosi się do rodzaju roślin należących do rodziny Rutowatych. Najbardziej znane odmiany cytrusów, szeroko stosowane w celach kulinarnych, jak również medycznych to pomarańcze, cytryny, grejpfruty i limonki. Przeprowadzone badania sugerują, iż właściwości zdrowotne owoców cytrusowych związane są z dużą zawartością związków bioaktywnych. Soki z cytrusów i obecne w nich flawonoidy mają działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwwentylacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe oraz neurochronne [21]. Jedną z alternatywnych metod wspomagania leczenia zakażenia *H. pylori* może być stosowanie soku z bergamotki, który wykazuje skuteczność zarówno stosowany sam jaki i w połączeniu z antybiotykami [22]. Mechanizm działania soku nie jest w pełni poznany, sugeruje się, że może on mieć wpływ na uszkodzenie błony komórkowej bakterii, co zwiększałoby dostęp antybiotyku do mikroorganizmu. Olejek eteryczny Cytryny zwyczajnej oraz jego związek aktywny limonen wykazują *in vitro* działanie gastroprotecyjne przeciwko *H. pylori* przy MIC wynoszącym odpowiednio 125 µg/mL i 75 µg/mL. Mircen, będący składnikiem Pomarańczy gorzkiej hamuje rozwój wrzodów żołądka i dwunastnicy poprzez zwiększenie czynników obronnych śluzówki żołądka. Irańska Limeta kwaśna oraz Pomarańcza gorzka hamują działanie ureazy przy wartościach IC₅₀ wynoszących 432 µg/mL i 465 µg/mL [21].

Brokuły i sulforafan

Sulforafan to substancja, której największe stężenie możemy znaleźć w brokułach i kiełkach brokułów. Należy on do substancji nazywanych izotiocyjanianami. Prekursorem sulforafanu jest glukozynolan, a dokładniej glukorafanina [23].

Wyniki badań dotyczących wpływu sulforafanu na zakażenie *H. pylori* nie są jednoznaczne. W jednym z badań Sato i wsp. wykazali, że rozpowszechnienie przewlekłego zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka wśród mężczyzn, którzy jedli brokuły w ilości 1 lub więcej tygodniowo było dwukrotnie wyższe niż wśród mężczyzn spożywających znikomą ich ilość. Był to wynik zaskakujący, ponieważ sulforafan powinien hamować infekcję *H. pylori* [24,10].

Yanaka i wsp. z kolei wykazali, że codzienne spożycie brokułów bogatych w sulforafan przez 2 miesiące zmniejsza kolonizację *H. pylori* u myszy i poprawia następstwa infekcji u zakażonych myszy i ludzi. Wydaje się więc, że to leczenie wzmacnia chemoprotekcję błony śluzowej żołądka przeciw stresowi oksydacyjnemu indukowanemu przez tę bakterię [25, 10, 11]. W dodatku w badaniu przeprowadzonym przez Mirmiran i wsp. wykazano, że oprócz korzystnego działania na eradykację *H. pylori*, kiełki brokułów w proszku dzięki zawartości sulforafanu wykazują także działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne, co poprawia funkcje śródbłonna naczyń i korzystnie działa na ciśnienie krwi obniżając przez to czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego [26].

Celem kolejnego z badań była analiza czy wyciąg z kiełków brokułów zawierający sulforafan hamuje gęstość infekcji *H. pylori* i wywiera działanie antyoksydacyjne na uszkodzenie błony śluzowej żołądka. Woon Chang i wsp. wysunęli wnioski, że wyciąg z kiełków brokułów nie hamował gęstości zakażenia *H. pylori*, jednak zapobiegał peroksydacji lipidów w błonie śluzowej żołądka i może odgrywać rolę cytoochronną w zapaleniu żołądka wywołanym przez tę bakterię [27].

W badaniach wykazano także, że naturalne izotiocyjaniiny blisko spokrewnione z sulforafanem, uprzednio wykazane jako bakteriobójcze (m.in. berteroina, izotiocyjaniin fenetylu), nie dezaktywowały aktywności ureazy. Ponadto sulforafan ma działanie bakteriobójcze zarówno przeciwko ureazowym, jak i negatywnym szczepom *H. pylori*. Niektóre izotiocyjaniiny są bardzo silnymi inaktywatorami ureazy, ale nie są bakteriobójcze. Działanie bakteriobójcze sulforafanu jak i innych izotiocyjaniinów przeciwko tej bakterii nie jest zatem obligatoryjnie związane z inaktywacją ureazy, ale może zmniejszyć zapalny komponent infekcji *H. pylori* [28].

Nie są do końca poznane mechanizmy, które wyjaśniałyby, dlaczego kontakt z sulforafanem jest bakteriobójczy dla pozakomórkowych i wewnątrzkomórkowych form *H. pylori* [1]. Jak wynika jednak z powyżej zacytowanych badań, wyniki dotyczące sulforafanu na zakażenie *H. pylori* nie są jednoznaczne.

Czarnuszka siewna (czarny kminek, *Nigella sativa*)

Nasiona *Nigella sativa* to powszechnie używane zioło, które posiada in vitro aktywność przeciw *H. pylori*. *Nigella sativa* (*N. sativa*) to inaczej czarnuszka siewna, czarny kminek lub czarnuszka ogrodowa [29,30,31]. Rośnie ona powszechnie na Bliskim Wschodzie, w Europie Wschodniej, Środkowej Azji oraz Północnej Afryce [29, 30, 32]. Jest ona doskonałym

dotądkiem do wyrobów spożywczych takich jak na przykład pieczywo, a jej olej jest używany jako dodatek do żywności, a także naturalny środek na wiele dolegliwości w tym jako środek antyseptyczny i znieczulający [31, 29, 30, 32]. Z czarnuszki wyizolowano wiele aktywnych składników, w tym: tymochinon, tymohydrochinon, dithymochinon, tymol, carvacrol, nigellicynę i alfa-hedrynę. Ponadto zidentyfikowano wiele farmakologicznych skutków *N. sativa* i jej aktywnych składników, takich jak stymulacja immunologiczna, działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwgrzybicze, przeciwdrgawkowe, przeciwutleniające i przeciwbakteryjne [29,30]. Wyciąg z czarnuszki jest również inhibitorem ureazy produkowanej przez *H. pylori* [31]. W badaniu, w którym podjęto ocenę skuteczności *N. sativa* w zwalczaniu zakażenia *H. pylori* u pacjentów dyspeptycznych, którzy nie mają wrzodów wywnioskowano, że nasiona *N. sativa* posiadają klinicznie przydatną aktywność anty- *H. pylori*, porównywalną z potrójną terapią. Sugerowane są dalsze badania kliniczne łączące *N. sativa* z antybiotykami [29].

Szacowana była także skuteczność kombinacji czarnuszki siewnej i miodu (Dosin) w zwalczaniu infekcji żołądka *H. pylori*. Przebadano pacjentów, którzy mieli pozytywny wynik na infekcję *H. pylori* potwierdzoną ureazowym testem oddechowym. Otrzymywali oni jedną łyżeczkę mieszaniny Dosin (6g/ dzień *N. sativa* jako nasiona mielone i 12g/ dzień miodu) 3 razy dziennie po posiłkach przez 2 tygodnie. Dosin został uznany przez autorów za środek o działaniu przeciwko *H. pylori* i przeciwadhezyjnym [33].

Czosnek (*Allium sativum*)

Uważa się, że allicyna związana z *Allium sativum* (*A. sativum*) odpowiada za bakteriostatyczne właściwości czosnku. Brak lub istnienie allicyny ma kluczowe znaczenie w hamowaniu wzrostu *in vitro* *H. pylori* [20, 11].

Stali mieszkańcy zachodnich Chin zostali poddani ¹⁴C- mocznikowemu testowi oddechowemu. Osoby spożywające surowy czosnek miały istotnie niższy poziom zakażenia *H. pylori* niż osoby, które nie spożywały surowego czosnku. W tym regionie surowy czosnek zdaje się więc zmniejszać zakażenie tą bakterią [34].

W badaniach oceniano wpływ doustnego podawania czosnku na aktywność ureazy bakteryjnej w żołądku i jej wpływ na leczenie zakażenia *H. pylori*. Wyniki jakie wysunięto to: średnia ureazowego testu oddechowego (UBT) zasadniczo różniła się przed i po leczeniu ząbkami czosnku, będąc znacząco niższa po spożyciu czosnku. Autorzy wywnioskowali, że surowy czosnek ma działanie antybakteryjne przeciwko *H. pylori* przebywającemu

w żołądku oraz może on być przepisywany wraz z rutynowymi lekami w leczeniu *H. pylori* [35].

W badaniu O'Mahony i wsp. badano bakteriobójcze i antyadhezyjne właściwości 25 roślin przeciwko *H. pylori*. Aktywność bakteriobójczą wodnego ekstraktu oceniano za pomocą standardowej krzywej zabijania dla siedmiu szczepów *H. pylori*. Właściwość adhezyjną natomiast oceniano przez hamowanie wiązania czterech szczepów *H. pylori* znakowanych FITC (izotiocyanian fluoresceiny) do odcinków żołądka. Wynik wykazał, że 8 z testowanych roślin, w tym czosnek, nie miało bakteriobójczego efektu na żadne z izolatów. Prawdopodobnie z powodu gotowania ekstrakcji efekt ten nie został zaobserwowany w badaniu, ponieważ wykazano, że gotowanie zmniejsza hamującą aktywność czosnku w stosunku do *H. pylori* [36]. Wodny ekstrakt czosnkowy w badaniu Ayala i wsp., standaryzowany pod względem stężenia tiosiarczanu, miał minimalne stężenie hamujące (MIC) 40 µg/ml, a w przypadku innych związków czosnku (allicyny, ajony, winyloditiiny, sulfonianów) wartości MIC wyniosły około 10 do 25 µg/ml [10]. Wykazano, że selektywna eliminacja tiosiarczanów lub unikanie ich powstawania przez blokowanie allinazy niszczy aktywność bakteriobójczą czosnku [20].

Czystek wawrzynolistny (*Cistus laurifolius*) i izoramnetyna

Izoramnetynie, czyli związkowi powszechnie występującemu w roślinach, przypisuje się właściwości antynowotworowe i przeciwwirusowe. Związek ten ma również wpływ na prawidłową pracę serca i zdolność redukcji objawów cukrzycy. Porównując ją do cymetydyny, wykazuje ona silniejsze działanie przeciwwrzdowe. [1]. Czystek wawrzynolistny zawierający ten związek był używany do leczenia bólów brzucha i wrzodu żołądka w ludowej medycynie już od 2000 lat [37].

W badaniach testowano 6 związków wyizolowanych z liści czystka wawrzynolistnego w celu wykrycia aktywności anti- *H. pylori*. Każdą z tych sześciu aktywności anti- *H. pylori* badano in vitro. Autorzy uważają, że efekt terapeutyczny *Cistus laurifolius* w owrzodzeniu jest przynajmniej częściowo związany z jego wpływem na *H. pylori*. Można przypuszczać, że w przyszłości wyizolowany flawonoid o aktywności anti- *H. pylori* ostatecznie może być wykorzystany jako alternatywny lub dodatkowy środek do obecnej terapii [37].

Probiotyki i synbiotyki

W badaniach na zwierzętach wykazano, że stosowanie probiotyków wiązało się z zahamowaniem procesów zapalnych indukowanych przez Gram ujemną, spiralną bakterię

H. pylori. Wyniki badań in vivo prowadzonych na organizmach ludzkich w celu potwierdzenia skuteczności stosowania probiotyków wspomagających eradykację *H. pylori* są obiecujące. Nie wysnuto jednak żadnych jednoznacznych wniosków, gdyż w tym aspekcie widnieje konieczność kontynuacji badań. Autorzy badań są zgodni, iż stosowanie konkretnych wyselekcjonowanych szczepów bakterii może stanowić ważny element wspomagający leczenie zakażenia *H. pylori*, zakłócać jej kolonizację, redukować działania niepożądane stosowanych leków, jednakże na chwilę obecną nie może on zastąpić koniecznej antybiotykoterapii [1, 38]. Korzystny wpływ przywracający prawidłową mikroflorę jelitową, a także minimalizację wystąpienia skutków ubocznych w związku ze stosowanymi antybiotykami według aktualnych wytycznych uzyskano w przypadku szczepów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. W przypadku stosowania LA1 wykazano działanie bakteriobójcze wobec *H. pylori* [1]. Z kolei *Lb. casei* Shirota *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 i *Lactobacillus acidophilus* La5 okazały się być skuteczne, gdyż znacząco zwiększały eradykację *H. pylori* [38].

W badaniu Ustundaga i innych suplementacja synbiotykami *B. lactis* B94 wraz z inuliną w zwiększonej dawce nie okazała się być bardziej skuteczna w eradykacji *H. pylori* w odniesieniu do suplementacji standardowej [39].

Inne potencjalnie przydatne składniki w eradykacji *Helicobacter pylori*

Kurkuma jest przyprawą o szerokim zakresie zastosowania. Właściwy związek zawarty w kurkumie, czyli kurkumina ma dobroczynny wpływ na organizm człowieka. Neutralizuje wolne rodniki, a także działa bakteriobójczo oraz bakteriostatycznie poprzez inhibicję biosyntezy kwasu szikimowego [5]. W badaniu na myszach wykazano, że kurkumina eradykowała *H. pylori* oraz poprawiała stan komórek żołądka. W randomizowanych badaniach klinicznych udokumentowano eradykację *H. pylori* oraz zmniejszenie objawów dyspeptycznych ze strony przewodu pokarmowego w odniesieniu do grupy kontrolnej [40,18]. Kurkumina w badaniach wykazywała również przeciwingienny, przeciwproliferacyjny i proapoptotyczny wpływ w badaniach, które analizowały leczenie raka żołądka [41]. Badacze przewidują, że kurkumina może zostać wykorzystywana do opracowania nowych leków przeciwko infekcji *H. pylori* [42].

Winogrono charakteryzuje się istotnym działaniem antyutleniającym, które wykazuje cały wyciąg z winogron, zarówno skórka jak i nasiona. Natomiast działanie przeciwbakteryjne zawartych w owocach polifenoli wynika z hamowania cytokin prozapalnych IL-1 β , TNF- α ,

IFN- γ promowanych przez *H. pylori*. Z kolei działanie żurawiny polega na hamowaniu adhezji *H. pylori* do komórek śluzowych żołądka [1, 18, 43].

Ekstrakt ze skórki owoców granata wykazuje silne działanie bakteriostatyczne oraz bakteriobójcze, a badania *in vivo* potwierdziły jego skuteczność, w których znacząco hamował wzrost *H. pylori* [18].

Resweratrol jest polifenolem, występującym m.in. w skórkach czarnych odmian winogron. Resweratrol przejawia działanie obniżające aktywność ureazy, a ponadto hamujące wirulencję *H. pylori*. Resweratrol ze względu na swoje bardzo silne właściwości antyoksydacyjne hamuje powstawanie wolnych rodników, redukując stan zapalny indukowany przez *H. pylori*, a w szczególności IL-8 przyczyniającej się do uszkodzenia ścian żołądka [18, 44].

Mangostan właściwy to owoc tropikalny, który jest źródłem wielu związków czynnych biologicznie wykazujących działanie plejotropowe na organizm człowieka. Przypisuje się mu właściwości przeciwutleniające ze względu na dużą zawartość witamin antyoksydacyjnych, a także przeciwzapalne, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne ze względu na obecność stilbenin i katechin. Ksantony są aktywnymi biologicznymi komponentami całej rośliny, zawierającymi głównie α - i γ -mangostyny. Skuteczność tej ostatniej została potwierdzona w badaniu, w którym wykazano działanie bakteriobójcze wobec *H. pylori* [45].

We wcześniej przytoczonym badaniu O'Mahony i wsp., w którym sprawdzano właściwości 25 roślin przeciwko *H. pylori*, wykazano, że zarówno oregano jak i ogórecznik miały wpływ na eliminację szczepów *Helicobacter*. Wykazano także aktywność w zwalczaniu bakterii *H. pylori* przez cynamon, szałwię, gałkę muskatołową, estragon oraz pietruszkę. Również ekstrakty z pietruszki i ogórecznika wykazywały działanie antyadhezyjne bakterii do śluzówki żołądka [36].

Karotenoidy, do których należą β - karoten oraz astraksantyna ze względu na działanie antyoksydacyjne, działają przeciwzapalnie w infekcji *H. pylori*, w której w wyniku stanu zapalnego wytwarzane są reaktywne formy tlenu [46].

Kapsaicyna jest alkaloidem występującym w roślinach z rodzaju *Capsicum* oraz głównym składnikiem wykazującym aktywność biologiczną. W organizmie człowieka może spełniać rozmaite funkcje uzależnione od dawki, a także drogi podaży. Wobec pałeczki *H. pylori* wykazuje pożądane działanie antyoksydacyjne oraz bakteriostatyczne [47]. Ponadto udowodniono, że kapsaicyna i piperyna hamują *in vitro* proliferację *H. pylori*, demonstrują

działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwzapalne, a wyizolowana kapsaicyna zmniejszała liczbę neutrofilów w antrum i trzonie żołądka, a także nacieki komórek jednojądrzastych [48].

Składniki mineralne

W badaniach dowiedziono, że wysokie spożycie soli sprzyja kolonizacji *H. pylori*, wykazuje działanie negatywne na organizm gospodarza zaostrzając zapalenie indukowane tą bakterią. Z kolei u osób chorych na raka żołądka wraz z istniejącym zakażeniem *H. pylori* nadmierna podaż soli stymuluje karcynogenezę poprzez zaburzenia integralności i lepkości błony śluzowej żołądka, a także zachodzące niekorzystne mutacje w DNA [49].

Regulacja ekspresji genów zachodzi niezależnie od poziomu żelaza. Dzieje się tak za sprawą *H. pylori*, która powoduje zwiększoną transkrypcję transporterów żelaza tj, *fecA1*, *fecA2*, *frpB1*, *feoB*. Wykazano w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, że dieta uboga w żelazo zwiększała stan zapalny powodowany przez *H. pylori*. Podobnie badania prowadzone wśród ludzi wykazały, że niski poziom ferrytyny korelował dodatnio z wystąpieniem poważniejszych skutków zakażenia *H. pylori* [49].

W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem cynku dowiedziono, że odgrywa on znaczącą rolę w przypadku zakażenia *H. pylori* jako czynnik kofaktorowy enzymów niezbędnych do przetrwania bakterii. Zaobserwowano również zjawisko, w którym niski poziom cynku najprawdopodobniej mógł nasilać stan zapalny powodowany przez *H. pylori*, aczkolwiek badania nad suplementacją cynkiem a eradykacją *H. pylori* wymagają kontynuacji, gdyż wyniki w tym zakresie nie były jednoznaczne [49].

Podsumowanie

Poszukiwanie nowych, a zarazem skutecznych i naturalnych metod leczenia *H. pylori* jest kierunkiem aktualnych badań w celu uzyskania bezpiecznej i ogólnodostępnej terapii organizmu zakażonego. Obiecującymi okazują się substancje aktywne zawarte w roślinach, na które bakteria nie zyskała oporności. Pacjenci darzą dużym zaufaniem terapię środkami naturalnymi, co mogłoby uwarunkować jej efektywność. Pomimo wielu badań prowadzonych na całym świecie, substancje naturalne stosowane w walce z *H. pylori* są wciąż słabo poznane i rzadko wykorzystywane w terapii wspomagającej leczenie pacjentów [1]. Istnieje potrzeba przeprowadzenia wciąż nowych badań, aby uzyskane wskazówki do leczenia wykorzystywać w praktyce klinicznej.

Literatura:

- [1] Tomas M, Pietrzak W, Nowak R.: Substancje pochodzenia naturalnego w walce z zakażeniami *Helicobacter pylori*. *Post Fitoter.*, 1, 22-27, 2012.
- [2] Iwańczak BM, Buchner AM, Iwańczak F.: Clinical differences of *Helicobacter pylori* infection in children. *Adv Clin Exp Med.*, 26(7), 1131 – 1136, 2017.
- [3] Lipińska A. Bakteria warta Nagrody Nobla.: *Świat Farm.*, 2, 34-35, 2008.
- [4] Bińkowska A, Biernat M, Duś I.: The role of biofilm formation in pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections. *Prz Gastroenterol.*, 8, 27-30, 2013.
- [5] Krzyżek P.: Polifenole w terapii chorób wywołanych przez *Helicobacter pylori*. *Post Fitoter.*, 1, 24-30, 2017.
- [6] Portal-Celhay C, Perez GI.: Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci.*, 110, 305-14, 2006.
- [7] Bartnik W. Kliniczne aspekty zakażenia *Helicobacter pylori*. *Pol Arch Med Wewn.*, 118 (7-8), 426-430, 2008.
- [8] Stenström B, Mendis A, Marshall B.: *Helicobacter pylori* – the latest in diagnosis and treatment. *Aust. Fam. Physician.*, 37 (8), 608-612, 2008.
- [9] Lahner E, Annibale B, Delle Fave G.: Systematic review: *Helicobacter pylori* infection and impaired drug absorption. *Aliment Pharmacol Ther.*, 29, 379-386, 2009.
- [10] Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, de la Cruz-Herrera CF, Romero I.: Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.*, 20(6), 1450-1469, 2014.
- [11] Takeuchi H, Trang V T, Morimoto N, Nishida Y I wsp.: Natural products and food components with anti- *Helicobacter pylori* activities. *World J Gastroenterol.*, 20(27), 8971-8978, 2014.
- [12] Jeong M, Park JM, Han YM, Park KY, Lee DH i wsp.: Dietary Intervention of Artemisia and Green Tea Extracts to Rejuvenate *Helicobacter pylori*-Associated Chronic Atrophic Gastritis and to Prevent Tumorigenesis. *John Wiley & Sons Ltd.*, 21, 40–59, 2015.
- [13] Gruenwald J.: Novel botanical ingredients for beverages. *Clin Dermatol.*, 27(2), 210-6, 2009.
- [14] Udekwu KI, Alarcon EI.: Anti-peroxyl radical quality and antibacterial properties of rooibos infusions and their pure glycosylated polyphenolic constituents. *Molecules.*, 18, 11264–11280, 2013.

- [15] Boyanova L. Comparative evaluation of the activity of plant infusions against *Helicobacter pylori* strains by three methods. *World J Microbiol Biotechnol.*, 30, 1633–1637, 2014.
- [16] Ali M, Ghorbanali R, Abass K, Masoud A, Kheiri S.: Effect of licorice versus bismuth on eradication of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease., 6(4), 341-344, 2014.
- [17] Wittschier N, Faller G, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Ethnopharmacol.*, 125(2), 218-23, 2009.
- [18] Farzaei MH, Abdollahi A, Rahimi R.: Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World J Gastroenterol.*, 21(21), 6427-6768, 2015.
- [19] Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alacón J, Speisky H.: Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of *Helicobacter pylori* Urease. *J Agric Food Chem.*, 57, 416–424, 2009.
- [20] Shmueli H, Domniz N, Yahav J.: Non-pharmacological treatment of *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.*, 7(2), 171-178, 2016.
- [21] Mandalari G, Bisignano C, Cirmi S, Navarra M.: Effectiveness of Citrus Fruits on *Helicobacter pylori*. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 1-8, 2017.
- [22] Filocamo A, Bisignano C, Ferlazzo N, Cirmi S, Mandalari G i wsp.: In vitro effect of bergamot (*Citrus bergamia*) juice against cagA-positive and-negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *BMC Complement Altern Med.*, 15, 256, 2015.
- [23] Zalega J, Szostak-Węgierek D.: Żywnienie w profilaktyce nowotworów. Część I. Polifenole roślinne, karotenoidy, błonnik pokarmowy. *Probl Hig Epidemiol.*, 94(1), 41-49, 2013
- [24] Sato K, Kawakami N, Ohtsu T, Tsutsumi A, Miyazaki S i wsp.: Broccoli Consumption and Chronic Atrophic Gastritis among Japanese Males: An Epidemiological Investigation. *Acta Med. Okayama.*, 58(3), 127-133, 2004.
- [25] Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S i wsp.: Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in *Helicobacter pylori*-Infected Mice and Humans. *Cancer Prev Res.*, 2(4), 353-360, 2009.
- [26] Mirmiran P, Bahadoran Z, Golzarand M, Zojaji H, Azizi F.: A comparative study of broccoli sprouts powder and standard triple therapy on cardiovascular risk factors following *H.pylori* eradication: a randomized clinical trial in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord.*, 13, 64, 2014.

- [27] Chang YW, Jang JY, Kim YH, Kim JW, Shim JJ.: The Effects of Broccoli Sprout Extract Containing Sulforaphane on Lipid Peroxidation and Helicobacter pylori Infection in the Gastric Mucosa. *Gut Liver.*, 9 (4), 486-493, 2015.
- [28] Fahey JW, Stephenson KK, Wade KL, Talalay P. Urease from Helicobacter pylori is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochem Biophys Res Commun.*, 24, 435(1), 1–7, 2013.
- [29] Eyad MS, Talay Y, Abdullah OB, Abdulaziz AQ, Mohamed IY.: Comparative Study of Nigella sativa and Triple Therapy in Eradication of Helicobacter pylori in Patients with Non-Ulcer Dyspepsia. *Saudi J Gastroenterol.*, 16(3), 207-214, 2010.
- [30] Bakal SN, Bereswill B, Heimesaat MM.: Finding novel antibiotic substances from medical plants – antimicrobial properties of Nigella sativa directed against multidrug-resistant bacteria. *Eur J of Microbiol Immunol.*, 7 (1), 92–98, 2017.
- [31] Bulczak E.: Czarnuszka w leczeniu Helicobacter pylori. *Współczesna dietetyka.*, 8, 51-53, 2016.
- [32] Borusiewicz M, Janeczko Z.: Nigella sativa L. – roślinny surowiec o właściwościach plejotropowych. *Post Fitoter.*, 4, 223-236, 2015.
- [33] Hashem-Dabaghian F, Agah S, Taghavi-Shirazi M, Ghobadi A.: Combination of Nigella sativa and Honey in Eradication of Gastric Helicobacter pylori Infection. *Iran Red Crescent Med J.*, 18 (11), 23771, 2016.
- [34] Tang HR, Fan YJ, Liu S. Helicobacter pylori infection and associated risk factors in Chengdu. *Sichuan Daxue Xuebao.*, 45, 823-826, 2014.
- [35] Mahmoud Z, Kokab N, Jamil EK, Sarira SH.: Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with Helicobacter pylori using urease breath test. *Avicenna J Phytomed.*, 6(5), 495-501, 2016
- [36] O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D i wsp.: Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol.*, 11(47), 7499-7507, 2015.
- [37] Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E.: Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves. *J Ethnopharmacol.*, 108, 457-461, 2006.
- [38] Nowak A, Śliżewska K, Libudzisz Z.: Probiotyki – efekty zdrowotne. *Żywn Nauk Technolog Ja.*, 4 (71), 20–36, 2010.
- [39] Ustundag GH, Altuntas H, Soysa YD, Kokturk F.: The Effects of Synbiotic (Bifidobacterium lactis B94 plus Inulin) Addition on Standard Triple Therapy

- of *Helicobacter pylori* Eradication in Children, Hindawi. *Can J Gastroenterol Hepatol.*, 1-6, 2017.
- [40] Kaładkiewicz E, Lange E.: Znaczenie wybranych związków pochodzenia roślinnego w diecie zapobiegającej chorobom nowotworowym. *Post Fitoter.*, 1, 42-47, 2013.
- [41] Haghi A, Azimi H, Rahimi R.: A Comprehensive Review on Pharmacotherapeutics of Three Phytochemicals, Curcumin, Quercetin, and Allicin, in the Treatment of Gastric Cancer. *J Gastrointest Canc.*, 120017-029, 2017.
- [42] Sarkar A, Mukhopadhyay De R.: Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. *World J Gastroenterol.*, 22 (9), 2736-2748, 2016.
- [43] Chua CS, Yang KC, Chen JH, Liu YH, Hsu YH i wsp.: The efficacy of blueberry and grape seed extract combination on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised controlled trial. *Int J Food Sci Nut.*, 67 (2), 177-183, 2016.
- [44] Zhang X, Jiang A, Qi B, Ma Z, Xiong Y i wsp.: Resveratrol Protects against *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis by Combating Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.*, 16. 27757–27769, 2015.
- [45] Cieślik I, Cieślik E, Mentel I, Bartyzel K.: Działanie lecznicze owoców mangostanu właściwego (*Garcinia mangostana* L.). *Post Fitoter.*, 1, 66-70, 2017.
- [46] Kang H, Kim H.: Astaxanthin and β -carotene in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Inflammation: A Mini-review on Action Mechanisms. *J Cancer Prev.*, 22 (2), 57-61, 2017.
- [47] Pieńko T. Kapsaicyna- właściwości, zastosowania i perspektywy. *Biul Wydz Farm WUM.*, 2, 11-17, 2013.
- [48] Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriya Y i wsp.: Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter.*, 21 (2), 131-42, 2016.
- [49] Haley KP, Gaddy JA.: Nutrition and *Helicobacter pylori*: Host Diet and Nutritional Immunity Influence Bacterial Virulence and Disease Outcome. *Gastroenterol Res Pract.*, 1-10, 2016.

ZNACZENIE ZMIENNOŚCI MIĘDZYOSOBNICZEJ BUDOWY MORFOLOGICZNEJ ZATOKI CZOŁOWEJ W IDENTYFIKACJI POŚMIETNEJ PRZY UŻYCIU METOD RADIOGRAFII CYFROWEJ

Dorota Lorkiewicz-Muszyńska⁽¹⁾, Adrian Rajczyk⁽¹⁾, Agnieszka Cugier⁽²⁾, Marzena Łabęcka⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

⁽²⁾Centrala Narodowego Funduszu Zdrowia, Departament ds. Służb Mundurowych, Warszawa

dlorkiew@ump.edu.pl

Streszczenie

Identyfikacja pośmiertna zwłok i szczątków ludzkich stanowi w medycynie sądowej i kryminalistyce zagadnienie problematyczne i często wymaga współpracy specjalistów z różnych dziedzin nauki.

Współczesne, precyzyjne metody badawcze oparte na analizie DNA, odcisków palców, czy cech uzębienia są często stosowane w identyfikacji, lecz nie zawsze są możliwe do wykorzystania. W przypadku szczątków w stanie znacznego rozkładu, znacznego stopnia degradacji DNA, trudności uzyskania materiału genetycznego z uwagi na brak biologicznych członków rodziny badania na podstawie DNA mogą być utrudnione a wręcz niemożliwe do przeprowadzenia. Stan zwłok, spalone czy w znacznym stopniu przeobrażone w wyniku zmian gnilnych, często uniemożliwiają pobranie odcisków linii papilarnych. Dlatego wciąż poszukuje się i wdraża w proces identyfikacji alternatywne metody badawcze.

Elementy szkieletu takie jak czaszka, czy elementy szkieletu pozaczaszkowego mogą wykazać znaczną przydatność w badaniach identyfikacyjnych. Kości długie, kręgi, kompletna czaszka, czy też zachowane jej części obejmujące istotne struktury wykazujące dużą zmienność międzyosobniczą, np. wyrostek sutkowaty kości skroniowej, zatoki przynosowe, szczękowe czy wreszcie zatoka czołowa mogą wykazać znaczną przydatność w procesie identyfikacji osobniczej.

Prowadzone w szerokim zakresie badania populacyjne pozwalają poznać różnice międzyosobnicze, międzypłciowe, międzypopulacyjne, a obserwowana zmienność wskazuje na unikalność budowy morfologicznej zatoki czołowej.

Zatoka czołowa to należąca do zatok przynosowych powietrzna przestrzeń, która znajduje się w łusce i częściach oczodołowych kości czołowej ku tyłowi od łuków brwiowych.

Zatoka czołowa zazwyczaj jest parzysta i składa się z dwóch osobnych, niesymetrycznych, pneumatycznych jam przedzielonych przegrodą i charakteryzujących się zmienną osobniczo morfologią. Często jest znacznie bardziej rozbudowana i wielokomorowa. Na rentgenogramie widoczne są najwcześniej 5 roku życia. Rozwój zatok czołowych rozpoczyna się ok. 1-2 roku życia, a kończy się z uzyskaniem wieku 20 lat. Objętość wynosi od około 5 do około 20 cm³.

Cechy zatoki czołowej takie jak kształt, wielkość oraz objętość wykazują zespół cech indywidualnych dla danego osobnika i dlatego też stanowiły przedmiot analiz i badań wielu badaczy. W niniejszej pracy poddano analizie i dokonano przeglądu literatury podejmującej problematykę oceny zmienności międzyosobniczej i międzypłciowej cech zatoki czołowej. Wyniki analiz wskazują na dużą zmienność w budowie morfologicznej, wymiarach i objętości zatoki czołowej i jej wysoką przydatność w badaniach identyfikacyjnych nieznanymi zwłok i szczątków ludzkich w praktyce medyczno-sądowej.

Wprowadzenie

Rozwój i budowa zatoki czołowej

Anatomia zatoki czołowej związana jest z jej przynależnością do zatok przynosowych. Stanowią zazwyczaj asymetryczne, pneumatyczne jamy, ukształtowane obustronnie, przedzielone pośrodkowo przegrodą. Występują jako bardzo rozległe powietrzne przestrzenie, o zróżnicowanej budowie, których rozwój jest determinowany przez czynniki genetyczne i środowiskowe [1]. Jest to powietrzna przestrzeń, która znajduje się w łusce i częściach oczodołowych kości czołowej ku tyłowi od łuków brwiowych. Kość czołowa rozwija się na podłożu łącznotkankowym i powstaje z dwóch głównych punktów kostnienia, prawego i lewego. Każdy z nich pojawia się około 9 tygodnia życia płodowego w okolicy późniejszych guzów czołowych [2]. U noworodków kość czołowa składa się z dwóch części, rozdzielonych szwem czołowym, które zlewając się ze sobą, tworzą jedną całość. Ma to swój początek około 6 miesiąca życia pozapłodowego. Około 1-2 roku życia wraz z zanikiem szwu czołowego (*sutura frontalis*, *sutura metopica*) obie płodowe kości czołowe zrastają się w obrębie łuski, począwszy od okolicy nosowej ku szczytowi czaszki [2]. Z głównych punktów kostnienia oraz mniejszych zawiązków dodatkowych powstaje między innymi łuska i części oczodołowe kości czołowej, w których to umiejscowiona jest zatoka czołowa [2].

W przeciwieństwie do innych zatok, których rozwój rozpoczyna się w życiu płodowym, zatoka czołowa w chwili narodzin nie jest obecna, a jej rozwój rozpoczyna się w okresie postnatalnym [3-5]. Rozwój zatoki czołowej rozpoczyna się około 2 roku życia, a kończy się z uzyskaniem około 20 roku życia [3, 5, 6]. Na rentgenogramie widoczna jest najwcześniej

około 5 roku życia [6, 7]. Niektórzy autorzy wskazują, iż zatoka czołowa rozwija się równomiernie u chłopców i dziewcząt do 5 roku życia, natomiast pomiędzy 8-12 rokiem życia rozwój zatoki czołowej postępuje wolniej u chłopców, ze względu na spowolniony wzrost w porównaniu do dziewcząt [8]. Następnie, po tym okresie następuje znaczne przyspieszenie wzrostu zatoki czołowej u chłopców i około 14-15 roku życia rozmiary zatoki czołowej u chłopców są większe w porównaniu do dziewcząt [8]. Po osiągnięciu docelowych rozmiarów i kształtu około 20 roku życia, zatoka czołowa zazwyczaj jest parzysta i składa się z dwóch osobnych, niesymetrycznych, pneumatycznych jam przedzielonych pośrodkowo przegrodą. Często budowa zatoki czołowej jest znacznie bardziej rozbudowana i obserwuje się układ wielu komór rozdzielonych przegrodami dodatkowymi.

Zmienność budowy zatok czołowych

Zatoka czołowa charakteryzuje się wielką różnorodnością budowy i jest strukturą, która po uzyskaniu ostatecznego kształtu, około 20 roku życia osobnika, zazwyczaj pozostaje w niezmienionej już formie [9-15]. Niemniej jednak niektóre czynniki, takie jak: złamania, zmiany nowotworowe czy procesy starzenia, mogą modyfikować pierwotną anatomię niniejszej struktury [15]. W wyniku niektórych chorób, jak na przykład akromegalii, obserwuje się duży rozrost zatok [14]. Podobna zależność rozrostu zatoki występuje u sportowców, gdzie zwiększona wentylacja podczas ćwiczenia sprzyja potęgowaniu nacisku na wewnętrzne ściany komór. W konsekwencji prowadzi to do ukształtowania bardziej rozbudowanych zatok czołowych u sportowców [15, 16].

Zatoka czołowa charakteryzuje się bardzo zmienną osobniczo morfologią, nawet w przypadku bliźniąt monozygotycznych obserwuje się występowanie różnic [17]. Objętość i wymiary zatok czołowych są jednymi z najważniejszych wskaźników w ich ocenie. U dorosłego osobnika objętość zatok czołowych wynosi najczęściej 5-7 ml, posiadają średnio około 28-30 mm wysokości, 24-28 mm szerokości i 20 mm głębokości [18, 19]. Szacuje się, iż zatoki czołowe występują jednostronnie u 10% populacji, u 5% mają szczątkowy charakter, natomiast u pewnej grupy osób zatoki nie występują w ogóle [20, 21], a odsetek ten wynosi około 4% [20]. Prowadzone badania przez wielu autorów, porównujących wymiary lewej i prawej zatoki, wykazały tendencję występowania większych wymiarów lewej zatoki czołowej [21, 22]. Biorąc pod uwagę korelację zmienności morfologii zatok czołowych z płcią, wykazano, iż mniejsze rozmiary zatok czołowych obserwuje się u kobiet, niż u mężczyzn [1, 16, 22]. Yoshino i in. [10], podczas prowadzonych badań nie dowiedli występowania istotnych różnic w obrębie morfologii zatok czołowych obu płci. Inni autorzy wykazali słabo wyrażony

dymorfizm płciowy i jedynie wskazanie płci na podstawie zatok czołowych ocenili się jako możliwy dodatkowy atut w dziedzinie antropologii sądowej [23]. Autorzy zwrócili także uwagę, iż słabo wyrażony dymorfizm płciowy może wynikać z obserwowanej wysokiej zmienności międzysobniczej w budowie zatok czołowych. Badania i opracowania dotyczące dymorfizmu płciowego zatoki czołowej, jak również możliwości oceny płci na jej podstawie nie należą do najczęstszych.

Metody obrazowania w badaniach zatoki czołowej

Odkrycie promieniowania X przez Wilhelma Roentgena spowodowało rewolucję w sposobie medycznego spojrzenia na ciało człowieka [24]. Od przełomowej daty 8 listopada 1895 roku kiedy to Wilhelm Konrad Roentgen wykonał pierwsze zdjęcie radiologiczne, do powstania metod radiografii cyfrowej na przełomie lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku minęło niespełna sto lat. W Polsce pierwsze zdjęcie rentgenowskie ze wskazań klinicznych wykonał profesor chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie Karol Olszewski, co miało miejsce w lutym 1896 roku. Z biegiem lat aparaty wytwarzające promienie X były sukcesywnie udoskonalane. Na początku XX wieku udoskonalono aparaturę wprowadzając film rentgenowski. W latach 50-tych do badań nad promieniami X dołączyła medycyna nuklearna, ale szczególny przełom w technice obrazowania rentgenowskiego to lata 70-te, gdy do praktyki weszły tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny. Tomografia komputerowa stanowiła przełom w badaniach zamkniętych struktur anatomicznych, umożliwiła zajrzeć do wnętrza czaszki bez konieczności chirurgicznego usuwania kości [24].

We współczesnych metodach radiografii cyfrowej, filmy rentgenowskie zostały zastąpione płytami obrazowymi fosforowymi pełniącymi funkcje detektorów promieniowania. Dzięki ucyfrowieniu możliwa stała się nie tylko cyfrowa rejestracja obrazu rentgenowskiego w wysokiej rozdzielczości, ale także złożona analiza obrazu przy użyciu odpowiedniego dedykowanego oprogramowania (dokonanie pomiarów, wyszczególnienie badanych struktur, możliwość obróbki i kalibracji obrazu), skrócenie czasu między wykonaniem zdjęcia, a otrzymaniem obrazu, elektroniczna archiwizacja danych oraz zmniejszenie dawki promieniowania.

W przypadku tomografii komputerowej możliwość uzyskania obrazów przy grubości przykładowo warstwy 0,6 mm zapewnia dobrą jakość obrazowania tkanek miękkich (choć tu jednak prym wiodzie rezonans magnetyczny MR) i doskonałą tkanki kostnej. Badanie z wykorzystaniem tomografii komputerowej znakomicie uwidacznia struktury czaszki, szczególnie te zamknięte, których analiza z wykorzystaniem metod makroskopowych nie jest

możliwa. Pozwala na ich precyzyjną ocenę, pomiary liniowe i pomiary objętości, obserwacje zmian związanych z procesami rozwojowymi [25], ocenę zmienności osobniczej czy populacyjnej, a także umożliwia wykonanie doskonałych diagnostycznie rekonstrukcji trójwymiarowych [24].

Klasyczne i współczesne metody obrazowania przy użyciu promieni rentgenowskich znajdują szerokie zastosowanie w badaniach nad rozwojem czy zmiennością osobniczą budowy morfologicznej zatoki czołowej, jak również w identyfikacji pośmiertnej [7, 5, 10, 14, 26-28].

Identyfikacja na podstawie zatoki czołowej

Układ kostny człowieka w zakresie budowy wykazuje dużą zmienność osobniczą, która jest niezwykle istotna z punktu widzenia identyfikacji. Ponadto kości są stosunkowo odporne są na procesy rozkładu pośmiertnego i wpływ zmiennych warunków zewnętrznych, co sprawia, że stanowią one w procesie identyfikacji materiał niezwykle wartościowy. Identyfikacja osób na podstawie zwłok i szczątków kostnych jest procesem złożonym, wieloetapowym, wymagającym często wykorzystania najnowszych osiągnięć wielu dziedzin nauki i techniki. Dlatego od lat w procesie ustalania tożsamości zwłok i szczątków ludzkich wykorzystuje się klasyczne i te nowoczesne, cyfrowe metody obrazowania. Badania prowadzone z wykorzystaniem metod radiologicznych pozwalają na zdiagnozowanie zmian chorobowych, anomalii rozwojowych, często niewidocznych w badaniach makroskopowych. W diagnostyce obrazowej znaczenie ma nie tylko ujawnienie i rozpoznanie zmian patologicznych czy pourazowych, lecz także ocena struktur pod kątem indywidualnych cech wykazujących zmienność osobniczą. Skoordynowane i prowadzone w zespołach interdyscyplinarnych badania oparte na ocenie makroskopowej, mikroskopowej i radiologicznej układu kostnego i zębowego, pozwalają na szerszą i dokładniejszą charakterystykę szczątków kostnych czy zwłok przeobrażonych pośmiertnie, szczególnie w zakresie analiz tych struktur kostnych, które wykazują duże zróżnicowanie osobnicze.

Zatoki czołowe to struktury kostne, które charakteryzują się zmienną osobniczo morfologią, a z uwagi na swoją unikalność, w zakresie przydatności do identyfikacji porównywane są do linii papilarnych [14, 16, 29]. Podczas przeprowadzonych badań oraz licznych obserwacji zdjęć rentgenowskich nie znaleziono dwóch identycznych zatok, co niewątpliwie potwierdza już znaną tezę o unikalności zatok i występowaniu dużych różnic osobniczych [30]. Polimorficzny charakter zatok czołowych wskazuje na bardzo małe

prawdopodobieństwo ich powtarzalności w obrębie populacji ludzkiej, predysponując tym samym metodę identyfikacji na podstawie zatok czołowych jako bardzo wiarygodną [15].

Wyjątkowość budowy zatoki czołowej została początkowo zaobserwowana w 1895 roku przez Zuckerkandla, który zwrócił uwagę na jej asymetryczność w budowie morfologicznej [31]. Zmienność osobnicza zatoki czołowej wzbudziła zainteresowanie także innych badaczy. W 1943 roku Schuller wykazał w swych badaniach zmienność budowy morfologicznej tej struktury, jej niepowtarzalność, w tym różnice obserwowane nawet u bliźniąt monozygotycznych, proponując wykorzystanie zatoki czołowej do identyfikacji, poprzez porównanie zdjęć rentgenowskich zażyciowych i pośmiertnych [32]. Pierwszy przypadek identyfikacji zwłok ludzkich na podstawie budowy zatoki czołowej, który został zaakceptowany jako przypadek sądowy w USA, opisali w 1927 roku Culbert i Law [33].

Na przestrzeni lat opisano szereg przypadków badań identyfikacyjnych zwłok i szczątków ludzkich na podstawie cech budowy morfologicznej zatok czołowych, zarówno z wykorzystaniem zdjęć rentgenowskich [12, 13, 16, 27, 29, 30, 34-37], jak i skanowania z wykorzystaniem tomografii komputerowej [5, 38-41]. Celem przedstawienia obiektywnych metod badawczych w identyfikacji osób na podstawie zatoki czołowej, niektórzy autorzy przedstawili techniczne wytyczne do ich analizy i pomiarów [9, 10, 42].

Współczesne cyfrowe metody obrazowania odgrywają w badaniach poznawczych jak i identyfikacyjnych bardzo ważną rolę. Pozwalają na znaczne skrócenie czasu między wykonaniem zdjęcia, a otrzymaniem obrazu, możliwe jest wyszczególnienie na obrazach analizowanych struktur, ich opis, dokonanie pomiarów oraz elektroniczna archiwizacja danych. Szczególnie przydatne w badaniach układu kostnego jest tomografia komputerowa, która pozwala na szczegółowe i szerokie analizy opisowe i pomiarowe zamkniętych struktur anatomicznych [24, 25]. Dzisiejsze tomografy komputerowe bardzo dobrze, bardzo szybko i dokładnie pokazują struktury kostne i tkanki miękkie. Z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania można wykonać diagnostycznie rekonstrukcje dwu- i trójwymiarowe struktur kostnych nie tracąc jakości i dokładności obrazowania [43].

Podsumowanie

W praktyce medyczno-sądowej analizy DNA i daktyloskopia są powszechnie, a wręcz rutynowo wykorzystywane w identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich. Nie zawsze jednak, z uwagi na stan zachowania zwłok lub szczątków ludzkich, możliwe jest pobranie odcisków palców, czy wyizolowanie materiałów do badań genetycznych, czy też pozyskanie materiałów porównawczych do badań DNA. Dlatego wykorzystanie metod antropologicznych

i stomatologicznych w identyfikacji człowieka jest nadal powszechne i pozwala na uzyskanie precyzyjnych i wiarygodnych wyników. Ponadto najtrudniejsze przypadki identyfikacji powinny być analizowane z wykorzystaniem wielu metod badawczych, przy współpracy specjalistów reprezentujących różne dziedziny wiedzy. Wykorzystanie w tych badaniach współczesnych, cyfrowych metod obrazowania w medycynie, w znacznym stopniu poszerza możliwości badawcze i pozwala na uzyskanie bardziej precyzyjnych wyników. Szczególnie kiedy metody obrazowania wykorzystuje się w badaniach struktur kostnych wykazujących dużą zmienność międzyosobniczą, jak na przykład w badaniach zatoki czołowej.

Literatura

- [1] Marques JAM, Musse JO, Gois BC, Galvão LCC, Paranhos LR.: Cone-beam computed tomography analysis of the frontal sinus in forensic investigation. *Int. J. Morphol.* 2014; 32(2): 660-66. doi.org/10.4067/S0717-95022014000200046.
- [2] Radiologia Stomatologiczna, T. Katarzyna Różyło; Ingrid Różyło-Kalinowska, PZWL Warszawa 2015, Wydanie I.
- [3] Towbin T, Scott Dunbar J.: The paranasal sinuses in childhood. *RadioGraphics.* 1982; 2(2): 253-279. org/doi/pdf/10.1148/radiographics.2.2.253.
- [4] Kaitlin M, Ross A.: Frontal sinus developmnet and juvenile age estimation. *Anat Rec.* 2017; 300(9): 1609-1617. doi: 10.1002/ar.23614.
- [5] Tatlisumak E, Yilmaz OG, Aslan A, Asirdizer M, Zeyfeoglu Yi współ., Tarhan S.: Identification of unknown bodies by using CT images of frontal sinus. *Forensic Sci Int.* 2007; 166(1): 42-48. doi: 10.1002/ar.23614.
- [6] Goya M, Acharya AB, Sattur AP, Naikmasur VG.: Are frontal sinuses useful indicators of sex? *J Forensic Leg Med.* 2013; 20(2): 91-94. doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.028
- [7] Silva RF, Prado FB, Caputo IG, Devito KL, Botelho Tde L, Daruge Júnior E. The forensic importance of frontal sinus radiographs. *J Forensic Leg Med.* 2009; 16(1):18-23. doi: 10.1016/j.jflm.2008.05.016.
- [8] Szilvássy J.: Development of the frontal sinuses. *Anthropol Anz.* 1981; 39(2):138-149.
- [9] Ribeiro FA.: Standardized measurements of radiographic films of the frontal sinuses: an aid to identifying unknown persons. *Ear Nose Throat J.* 2000; 79(1): 26-28.
- [10] Yoshino M, Miyasaka S, Sato S., Seta S.: Classification system of frontal sinus patterns by radiography. Its application to identification of unknown skeletal remains. *Forensic Sci. Int.* 1987; 34(4): 289–299.

- [12] Marek Z, Kusmiderski J, Lisowski Z.: Radiogramme der Stirnholen als Grundlage für die Identifizierung von Katastrophenopfern und von unbekanntem Skeletten. Arch für Kriminal. 1983; 34: 289-299.
- [13] Montovani JC, Nogueira EA, Ferreira FD, Lima Neto AC, Nakajima V. Surgery of frontal sinus fractures: epidemiologic study and evaluation of techniques. 2006; 72(2):204–9. doi.org/10.1590/S0034-72992006000200009
- [14] Camerieri R, Ferrante L, Mirtella D, Rollo FU, Cingolani M.: Frontal sinuses for identification: quality of classifications, possible error and potential corrections. J. Forensic. Sci. 2005; 50 (4):770-773. doi: 10.1520/jfs2004343
- [15] Patil N, Karjodkar FR, Sontakke S, Sansare K, Salvi R.: Uniqueness of radiographic patterns of the frontal sinus for personal identification. Imaging Sci Dent. 2012; 42(4):213-217. doi: 10.5624/isd.2012.42.4.213.
- [16] Marques JAM, Musse JO, Gois BC, Galvão LCC, Paranhos LR.: Cone-beam computed tomography analysis of the frontal sinus in forensic investigation. Int. J. Morphol. 2014; 32(2): 660-665. doi.org/10.4067/S0717-95022014000200046.
- [17] Camargo JR, Daruge E, Prado FB, Caria PH, Alves MC i wsp.: The frontal sinus morphology in radiographs of Brazilian subjects: its forensic importance. Braz J. Morphol. Sci. 2007; 24(4): 239-243.
- [18] Tang JP1, Hu DY, Jiang FH, Yu XJ.: Assessing forensic applications of the frontal sinus in a Chinese Han population. Forensic Sci Int. 2009; 183(1-3):104.e1-3. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.10.017.
- [19] McGraw-Wall B.: Frontal sinus fractures. Facial Plastic Surgery. 1998; 14(1): 59-66.
- [20] Pajic SS, Antic S, Vukicevic AM, Djordjevic N, Jovicic G i wsp.: Trauma of the Frontal Region Is Influenced by the Volume of Frontal Sinuses. A Finite Element Study. Front Physiol. 2017; 8:493. doi: 10.3389/fphys.2017.00493.
- [21] Schaefer JP.: The nose, paranasal sinuses, nasolacrimal passageways, and olfactory organs in man. Philadelphia, Blakiston's Son&Co. 1920.
- [22] Nateghian Z, Abedi I, Dashti GH, Faraji B.: Frontal Sinus Pattern and Evaluation of Right and Left Frontal Sinus Volume According to Gender, Using Multi Detector CT Scan. Journal of Forensic Science & Criminology. 2016; 4(4): 1-4. doi: 10.15744/2348-9804.4.402.
- [23] Rubira-Bullen IR, Rubira CM, Sarmiento VA, Azevedo RA.: Frontal sinus size on facial plain radiographs. J. Morphol. Sci. 2010; 27(2): 77-81.

- [24] Goyal M, Acharya AB, Sattur AP, Naikmasur VG.: Are frontal sinuses useful indicators of sex? *J Forensic Leg Med.* 2013; 20(2): 91-94. doi: 10.1016/j.jflm.2012.04.028.
- [25] Kociemba W.: Techniki obrazowania w radiologii, rola tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego w archeologii. *Wojownik i księżniczka. Archeologia - medycyna sądowa - sztuka.* Red. Anna Hyrczała, Bartłomiej Bartecki. Hrubieszów, Muzeum im. ks. St. Staszica. 2015; 124-129.
- [26] Lorkiewicz-Muszyńska D, Kociemba W, Rewekant A, Sroka A, Jończyk-Potoczna K i wspólnie, Patelska-Banaszewska M, Przysańska A. Development of the maxillary sinus from birth to age 18. Postnatal growth pattern. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* 2015; 79(9): 1393-400. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.05.032.
- [27] Cameriere R, Ferrante L, Molleson T, Brown B.: Frontal Sinus Accuracy in Identification as Measured by False Positives in Kin Groups. *J Forensic Sci,* 2008; 53(6): 1280-2. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00851.x.
- [28] Quatrehomme G, Fronty P, Sapanet M, Grévin G, Bailet P, Ollier A. Identification by frontal sinus pattern in forensic anthropology. *Forensic Sci Int.* 1996; 83(2):147-53.
- [29] Kullman L, Eklund B, Grundin R. Value of the frontal sinus in identification of unknown persons. *J Forensic Odontostomatol.* 1990; 8: 3–10.
- [30] Nambiar P, Naidu MD, Subramaniam K.: Anatomical variability of the frontal sinuses and their application in forensic identification. *Clin Anat.* 1999; 12(1): 16-19. doi: 10.1002/(SICI)1098-2353(1999)12:1<16::AID-CA3>3.0.CO;2-D.
- [31] Christensen AM.: Assessing the variation in individual frontal sinus outlines. *Am J Phys Anthropol.* 2005; 127(3): 291-295.
- [32] Zuckerkandl E.: Anatomie des sinus frontaux. In *Anatomie normale et pathologique des fosses nasales et de leurs annexes pneumatiques.* Paris: G. Masson. 1895: 349–361.
- [33] Schuller A.: Das Roentgenogramm der Stirnhöhle. Ein Hilfsmittel für die Identitätsbestimmung von Schädlen, *Monatsschrift für Ohrenheilkunde und Laryngo-Rhinologie,* 1921; 55: 1617-1620.
- [34] Culbert WL, Law FM.: Identification baycomparison of roentgenograms of nasal accessory sinuses and mastoid processes. *JAMA* 1927. 88: 1634–1636.
- [35] Angyal M, Derczy K.: Personal identification on the basis of antemortem and postmortem radiographs. *J Forensic Sci.* 1998; 43(5): 1089–1093.
- [36] Owsley DW.: Identification of the fragmentary, burned remains of two US journalists seven years after their disappearance in Guatemala. *J Forensic Sci.* 1993; 38(6): 1372–1382.

- [37] Kirk NJ, Wood RE, Goldstein M.: Skeletal identification using the frontal sinus region: a retrospective study of 39 cases. *J Forensic Sci.* 2002; 47(2): 318–323.
- [38] Marlin D, Clark MA, Standish M.: Identification of human remains bcomparison of frontal sinus radiographs: a series of four cases. *JForensic Sci.* 1991; 36(6): 1765–72.
- [39] Haglund WD, Fligner CL.: Confirmation of human identification using computerized tomography (CT). *J Forensic Sci.* 1993; 38(3): 708–712.
- [40] Reichs KJ. Quantified comparison of frontal sinus patterns by means of computed tomography. *Forensic Sci Int* 1993; 61(2–3):141–168.
- [41] Pfaeffli M, Vock P, Dirnhofer R, Braun M, Bolliger SA i wsp.: Post-mortem radiological CT identification based on classical ante-mortem X-ray examinations. *J Forensic Sci.* 2007; 171(2–3): 111–117.
- [42] Tatlisumak E, Yilmaz Ovali G, Aslan A, Asirdizer M, Zeyfeoglu Z i wsp.: Identification of unknown bodies by using CT images of frontal sinus. *Forensic Sci Int.* 2007; 166(1): 42–48. doi:10.1016/j.forsciint.2006.03.023.
- [43] Christensen AM.: Testing the reliability of frontal sinuses in positive identification. *J Forensic Sci.* 2005; 50(1): 18–22.
- [44] Lorkiewicz-Muszyńska D, Kociemba W, Rychlik M.: Badania identyfikacyjne szczątków. Horodysko. Od epoki kamienia do wczesnego średniowiecza. *Badania 2004-2005.* red.: Tomasza Dzieńkowskiego. Lublin: Instytut Archeologii UMCS w Lublinie. 2016: 309-322.

BADANIA ODONTOLOGICZNE W IDENTYFIKACJI OSOBNICZEJ ZWŁOK I SZCZĄTKÓW LUDZKICH

**Dorota Lorkiewicz-Muszyńska⁽¹⁾, Magdalena Ciomek^(1,2), Mariusz Glapiński⁽¹⁾,
Małgorzata Gołabek⁽³⁾, Anna Lehmann-Kalata⁽³⁾, Agnieszka Cugier⁽⁴⁾**

⁽¹⁾Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁽²⁾Wojskowa Specjalistyczna Przychodnia Lekarska SPZOZ, ul. Solna 21, Poznań

⁽³⁾Klinika Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁽⁴⁾Centrala Narodowego Funduszu Zdrowia, Departament ds. Służb Mundurowych, Warszawa

dlorkiew@ump.edu.pl

Streszczenie

Wstęp: Indywidualność cech morfologicznych uzębienia, jak również jego niepowtarzalność oraz duża trwałość i odporność na oddziaływanie czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, powoduje, że zęby stanowią niezwykle przydatny materiał do badań identyfikacyjnych. Nabyte za życia zmiany w uzębieniu, ślady po przebytych stanach patologicznych, a także ślady leczenia są bardzo charakterystyczne i mogą być wykorzystane w analizach porównawczych po upływie wielu lat od zaistnienia zmiany. Proces identyfikacji w oparciu o cechy uzębienia i dane odontologiczne przeprowadza się szczególnie w tych sytuacjach, w których doszło do uszkodzenia mechanicznego i deformacji zwłok, w przypadku zaawansowanych zmian pośmiertnych, zwęglenia zwłok czy badan szczątków w stanie zeszkieleowania. Proces identyfikacji polega na gromadzeniu danych pośmiertnych i porównywaniu wyników badania pośmiertnego, z dostępnymi dowodami życzymi w postaci dokumentacji medycznej (z leczenia stomatologicznego). Ze względu na powszechność leczenia i łatwość dostępu do dokumentacji medycznej, w niektórych krajach, głównie skandynawskich, metody odontologiczne stanowią ważną i często stosowaną metodę identyfikacji szczątków ludzkich.

Cel pracy: Celem prowadzonych badań było wskazanie dużego znaczenia indywidualnych cech uzębienia i badan odontologicznych w identyfikacji osobniczej.

Materiał i metody: W pracy przedstawiono wyniki badań identyfikacyjnych zwłok i szczątków ludzkich na podstawie przypadków analizowanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Przedstawione przypadki dotyczą badań odontologicznych i identyfikacyjnych zwłok i szczątków ludzkich, w tym szczątków ekshumowanych z grobu masowego.

Wyniki: Indywidualność cech uzębienia pozwala na wykorzystanie układu zębowego w procesie identyfikacji. Prawdopodobieństwo ustalenia tożsamości zależy w znacznym stopniu od dostępnego uzębienia i ilości danych pośmiertnych, a z drugiej strony od rzetelnej i aktualnej dokumentacji stomatologicznej wraz ze zdjęciami rentgenowskimi w postaci danych zażyciowych. Należy podkreślić, iż proces identyfikacji osobniczej na podstawie danych odontologicznych, nawet z wykorzystaniem zdjęć pantomograficznych, nie jest zadaniem łatwym, wymaga dużej skrupulatności i uwagi, a przede wszystkim, jest skuteczny tylko wówczas, gdy dysponuje się zażyciowym materiałem porównawczym. Co więcej, znaczenia ma prawidłowo prowadzona dokumentacja medyczna.

Wprowadzenie

Badania odontologiczne, obok daktyloskopii i badań DNA, są powszechnie uznana metodą identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich, polegającą na ocenie morfologicznych cech jamy ustnej, uzębienia i kości szczękowych w porównaniu z dostępnymi danymi zażyciowymi, zapisanymi w kartach przebiegu leczenia stomatologicznego osoby identyfikowanej [1, 2]. Badania te, wyróżniając się szybkością i ekonomicznością, zostały wpisane w międzynarodowe standardy postępowania. Uzębienie, często ze względu na stan zwłok lub szczątków – ich zwęglenie, rozfragmentowanie, czy późne zmiany pośmiertne, jest najbardziej dostępnym i bogatym źródłem wiedzy. Zęby charakteryzują się unikalną i niepowtarzalną morfologią u każdego człowieka, a dzięki ich trwałości i odporności na czynniki zewnętrzne (biologiczne, chemiczne, fizyczne), umożliwiają badania nawet po upływie wielu lat od zgonu osoby [3, 4]. Nabyte podczas życia zmiany w wyniku toczących się procesów patologicznych, nieprawidłowości zębowe jak i ślady leczenia, a w szczególności wypełnienia i uzupełnienia protetyczne, zwiększają tę unikalność.

Pośmiertne badanie odontologiczne ma na celu zebranie jak najwięcej informacji na temat anatomii, morfologii, chorób toczących się w jamie ustnej za życia oraz śladów leczenia zachowawczego, chirurgicznego, protetycznego i ortodontycznego. Ocenę należy rozpocząć od szczegółowej analizy rodzaju i liczby zachowanych zębów. Obserwacja budowy zewnętrznej i badania mikrostruktury zębów dostarcza wielu ważnych informacji o fizjologii uzębienia (morfologia, kształt, wielkość, rozmieszczenie i ustawienie w łuku zębowym, warunki zgryzowe). Szczególną uwagę należy zwrócić na wszelkie stany chorobowe (miejscowe i uogólnione), określenie rodzaju odbudowy zęba czy odbudowy protetycznej,

nieprawidłowości budowy anatomicznej kości czaszki twarzowej i uzębienia, wady zgryzu oraz inne zaburzenia w układzie stomatognatycznym, tj. obecność zębów dodatkowych, zębów zatrzymanych, ubytków pooperacyjnych kości i przebytych złamań. Istotne znaczenie dla potrzeb identyfikacji mają uzupełnienia protetyczne, tj. korony protetyczne, mosty oraz częściowe lub całkowite protezy zębowe. W ostatnich latach ogromną popularność zyskują implanty zębowe, które charakteryzują się licznymi cechami, dobieranymi indywidualnie do stanu klinicznego jamy ustnej pacjenta. Co istotne – towarzyszy im zwykle bogata dokumentacja radiologiczna [5]. Dla potrzeb identyfikacji ważne jest nie tylko określenie rodzaju odbudowy zęba czy odbudowy protetycznej, lecz także szczegółowy opis materiału i metody wykonania. Dane te mogą wykazać dużą przydatność podczas identyfikacji, jak również podczas datowania czasu zgonu osób z grobów pojedynczych, czy też grobów masowych.

Układ zębowy, z uwagi na specyfikę zmian zachodzących w okresie rozwojowym życia człowieka oraz zmian związanych z procesami starzenia się, zużycie zębów w trakcie życia, umożliwia szacowanie wieku zębowego, co obok wykorzystania innych kryteriów (wiek kostny, wiek morfologiczny) istotnie wpływa na wyniki szacowania wieku biologicznego badanej osoby [6]. Istnieje kilka dostępnych metod oceny wieku zębowego u dorosłych [7–11], jak i u osobników wieku rozwojowym [12–14]. Część metod wymaga oceny makroskopowej zębów i wykonania szlifów zębów, co czyni te metody czasochłonnymi. Część metod oparta jest na wykorzystaniu nowoczesnych metod obrazowania [9, 12–14].

Uwzględnienie wszystkich istotnych danych dotyczących cech uzębienia umożliwia w badaniu pośmiertnym oszacowanie wieku biologicznego oraz stworzenie indywidualnego diagramu. Powstaje w ten sposób zapisany w postaci formularza, udokumentowany zdjęciami rentgenowskimi, indywidualny profil odontologiczny zmarłej osoby, który może być następnie porównywany z dostępnymi danymi zażyciowymi z dokumentacji medycznej osób zaginionych. Identyfikacja w przypadku badań odontologicznych opiera się bowiem na analizie porównawczej danych z badania pośmiertnego cech uzębienia i danych zażyciowych, z dokumentacji medycznej (stomatologicznej) typowanej jednej osoby lub grupy osób.

Dokumentacja medyczna jest nieodłączną częścią pracy lekarskiej, stanowi opis wiedzy uzyskanej z przeprowadzonego z pacjentem wywiadu, wniosków z badania oraz sprawozdanie z podjętych przez lekarza czynności [15]. Dokumentacja stomatologiczna ma ogromne znaczenie, zarówno podczas diagnostyki i terapii pacjenta, jak również coraz częściej stanowi ważny element materiału dowodowego w postępowaniu sądowym oraz identyfikacyjnym [16]. Dlatego dokumentację należy prowadzić zachowując szczególną staranność, pamiętając,

że zewnętrzną ocenę zapisów lekarza leczącego prowadzi się na podstawie jego zapisów w dokumentacji [15]. Bardzo często niestarannie prowadzone, nieczytelne i niezrozumiałe zapisy w karcie pacjenta utrudniają, a wręcz mogą uniemożliwić identyfikację.

Metodyka badań

Materiał badawczy stanowiły przypadki badań odontologicznych i identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Jeden z przedstawionych przypadków dotyczył badań identyfikacyjnych zwłok w stanie zaawansowanych zmian pośmiertnych, w drugim przypadku przedstawiono przykłady badań odontologicznych szczątków ludzkich ekshumowanych z grobu masowego.

Czaszki poddano klasycznym badaniom antropologicznym w celu określenia płci i wieku biologicznego. W tym celu zastosowano klasyczne metody stosowane w antropologii [17-20]. W procesie ustalania tożsamości osób zmarłych zastosowano interdyscyplinarne metody identyfikacji człowieka, w tym z badania metodą superprojekcji [21, 22] oraz wykorzystaniem metod stomatologicznych.

Podczas analizy cech uzębienia zęby luźne dopasowano do odpowiednich zębodołów. Zęby poddano ocenie makroskopowej. Określono ogólny stan uzębienia, ustawienie zębów w łuku, warunki zgryzowe oraz stany patologiczne. Wyniki zapisano w postaci indywidualnego diagramu zębowego. Dokonano szacowania wieku zębowego [9,14, 23]. W badaniach uzębienia przyjęto numerację zębów według obowiązującego w Polsce Systemu Międzynarodowego FDI, w którym każdemu zębowi przyporządkowane jest odpowiednie dwucyfrowe oznaczenie. Pierwsza cyfra oznacza odpowiedni kwadrant (zęby stałe: 1-góra prawa, 2- góra lewa, 3-dół lewy, 4-dół prawy; zęby mleczne: 5-góra prawa, 6- góra lewa, 7-dół lewy, 8-dół prawy), druga-odpowiednio kolejność zęba w kwadrancie (zęby stałe: 1- siekacz centralny, 2- siekacz boczny, 3- kieł, 4- pierwszy ząb przedtrzonowy, 5- drugi ząb przedtrzonowy, 6,7,8- kolejno pierwszy, drugi i trzeci ząb trzonowy; zęby mleczne: 1- siekacz centralny, 2- siekacz boczny, 3- kieł, 4- pierwszy ząb trzonowy, 5- drugi ząb trzonowy).

W badaniach wykonano zdjęcia rentgenowskie. Zdjęcia rentgenowskie wykonano z wykorzystaniem mobilnego aparatu rentgenowskiego marki Agfa model DX-D-100. Analizę zdjęć rentgenowskich w wersji cyfrowej przeprowadzono z wykorzystaniem programu SE Media Viewer wersja 4.0.2.0.

Wyniki i dyskusja

Przypadek 1

Do badań przekazano czaszkę pobraną ze zwłok o nieznanym tożsamości ujawnionych w pustostanie oraz materiały porównawcze w postaci ośmiu zdjęć fotograficznych i dwóch książeczek zdrowia z aresztów śledczych (z 2005 i 2011 roku) typowanego do badań R.J. Wizualna identyfikacja nie była możliwa do przeprowadzenia z uwagi na deformację tkanek miękkich w następstwie zaawansowanych zmian pośmiertnych. W zakresie tkanek miękkich obserwowano cechy gnicia i wysychania. Czaszka została poddana maceracji, celem usunięcia pozostałości gnilnie zmienionych tkanek miękkich. Następnie czaszkę poddano badaniom antropologicznym i odontologicznym. Oszacowany wiek zębowy (ok. 37 ± 2 lata) wykazał korelację z wynikami otrzymanymi w wyniku szacowania wieku kostnego (35–40 lat). Ustalony zakres wieku biologicznego na podstawie kryterium wieku zębowego i kostnego wykazywał korelację z wiekiem metrykalnym osoby typowanej z ustalonym na podstawie przekazanych danych dotyczących daty urodzenia i daty zgonu osoby. Cechy dymorficzne jednoznacznie wskazywały na płeć męską osoby. Poddane analizie zdjęcie rentgenowskie AP czaszki wykazało dobrze ukształtowaną obustronnie wielokomorową zatokę czołową, wykazującą zespół cech indywidualnych (ryc. 1.).

Czaszkę poddano interdyscyplinarnym porównawczym badaniom identyfikacyjnym z wykorzystaniem metody superprojekcji oraz badań odontologicznych. W celu przeprowadzenia badań metodą superprojekcji wykorzystano trzy zdjęcia spośród ośmiu przekazanych do badań zdjęć fotograficznych osoby uznanej za zaginioną. We wszystkich fotomontażach par warstw (obrazów) stwierdzono, iż czaszka układa się prawidłowo w całościowym ujęciu w obrębie głowy osoby z każdego z analizowanych zdjęć. Stwierdzono występowanie korelacji w zakresie parametrów szerokościowo-wysokościowych czaszki i głowy osoby z wykorzystanych do badań zdjęć (w całościowym ujęciu) oraz we wszystkich analizowanych parach elementów morfologicznych czaszki i twarzy (ryc. 2.).

W badaniu pośmiertnym, w zakresie uzębienia szczęki i żuchwy badanej czaszki stwierdzono braki zażyciowe i pośmiertne, jak również ślady ingerencji stomatologicznej. Opracowano diagram z badania pośmiertnego uzębienia. W podstawie analizy wypełnionych diagramów zębowych z książeczek zdrowia osadzonego opracowano diagram osoby uznanej za zaginioną. Wyniki analizy danych pośmiertnych i zażyciowych zawarto w tabeli nr 1. Zapisy w diagramach w książeczkach zdrowia R.J. zawierały oznaczenia bez zachowania stosowania skrótów uniwersalnych i jednocześnie nie znaleziono wyjaśnień niektórych spośród zastosowanych, przez lekarza leczącego, skrótów.



Rysunek 1. Zdjęcie rentgenowskie czaszki AP

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Rysunek 2. Wyniki badań metodą superprojekcji na podstawie czaszki i dwóch wybranych zdjęć twarzy osoby typowanej

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Rysunek 3. Zdjęcia łuku zębowego szczęki i żuchwy badanej czaszki

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Tabela 1. Dane pośmiertne (czaszka) i dane zażyciowe (na podstawie książeczek zdrowia osoby typowanej) uzębienia

	Badanie z dnia 21.04.2005	Badanie z dnia 12.01.2011	Czaszka	Zgodność
Ząb 18	Wypełnienie	Wypełnienie	Brak pośmiertny	Nie do oceny
Ząb 17	Zdrowy	Zdrowy	Próchnica	Tak
Ząb 16	Próchnica	Wypełnienie	Brak pośmiertny	Nie do oceny
Ząb 15	Brak	Niezrozumiałe oznaczenie (zakreślony w kółku)	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 14	Wypełnienie	Wymiana wypełnienia	Wypełnienie	Tak
Ząb 13	Próchnica	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 12	Brak	Brak	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 11	Brak	Brak	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 21	Wypełnienie	Do leczenia	Próchnica	Tak
Ząb 22	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 23	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 24	Brak	Brak	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 25	Brak	Brak	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 26	Wypełnienie	Wypełnienie	Brak zażyciowy	Nie
Ząb 27	Zdrowy	Zdrowy	Próchnica/uraz	Tak
Ząb 28	Brak	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 38	Brak	Zdrowy	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 37	Wypełnienie	Wymiana wypełnienia	Wypełnienie	Tak
Ząb 36	Brak	Brak	Brak zażyciowy	Tak
Ząb 35	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 34	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 33	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 32	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 31	Zdrowy	Zdrowy	Brak pośmiertny	Nie do oceny
Ząb 41	Zdrowy	Zdrowy	Brak pośmiertny	Nie do oceny
Ząb 42	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 43	Zdrowy	Zdrowy	Zdrowy	Tak
Ząb 44	Wypełnienie	Wymiana wypełnienia	Brak zażyciowy	Nie
Ząb 45	Brak	Brak	Wypełnienie próchnica	Nie
Ząb 46	Wypełnienie	Wypełnienie	Korzeń	Tak
Ząb 47	Wypełnienie	Do leczenia	Wypełnienie/próchnica	Tak
Ząb 48	Zdrowy	Do leczenia	Brak pośmiertny	Nie do oceny

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Na podstawie badań porównawczych otrzymanej czaszki i diagramów zębowych zawartych w książeczkach zdrowia osoby typowanej, zaobserwowano bardzo wysoką korelację w opisach stanu uzębienia.

Wyjaśnienie nieścisłości

Ząb 28: w badaniu pośmiertnym stwierdzono brak zęba 26, a zęby 27 i 28 były przesunięte doprzednio zamykając przestrzeń po brakującym trzonowcu 26. W badaniu

klinicznym mogło dojść do omyłkowego oznaczenia zęba 27 jako 26 a zęba 28 jako 27 stąd rozbieżności w diagramach i badaniu pośmiertnym

Zęby 44 i 45: W badaniu pośmiertnym stwierdzono brak zęba 44 i przemieszczony doprzednio ząb 45 zamykający przestrzeń (dotykający zęba 43). W diagramach z badań klinicznych oznaczano ząb 45 jako brakujący a 44 jako obecny w jamie ustnej; przyjmując, że w obu diagramach brakuje jednego przedtrzonowca po stronie prawej w żuchwie i traktując opis dotyczący zęba 44 jako 45, nieścisłości znikają.

Przeprowadzone kompleksowo identyfikacyjne badania antropologiczne i odontologiczne wykazały zgodność cech charakterystycznych czaszki i twarzy oraz cech uzębienia, co pozwoliło na przyjęcie, że badana czaszka, a tym samym zwłoki, należały do typowanego R. J. Ważna była w przypadku prowadzonych badań identyfikacyjnych współpraca interdyscyplinarnego zespołu specjalistów z różnych dziedzin nauki, antropologii i odontologii. Pozwoliło to na wymianę spostrzeżeń i uwag podczas prowadzonych badań. Jednocześnie końcowe wyniki badań stanowiły podsumowanie wniosków z badań antropologicznych i odontologicznych.

Przypadek 2.

Badaniom odontologicznym poddano szczątki ludzkie ekshumowane z grobu masowego w Poznaniu. Badania uzębienia były jedną ze składowych kompleksowych i interdyscyplinarnych badań wyeksplorowanych szczątków ludzkich. Z uwagi na ułożenie szkieletów i ich stan zachowania nie było możliwe wyeksplorowanie oddzielnie wszystkich szkieletów z mogiły masowej. Dokonano ekshumacji 7 pojedynczych szkieletów, oraz w ekshumacji zbiorowej wyeksplorowano szczątki około 23 osób. Nie wszystkie szkielety były kompletne. Wśród szczątków ujawniono przedmioty osobiste, nieśmiertelniki, elementy obuwia, guziki, hełm, insygnia oficerskie z munduru, które pozwoliły na datowanie mogiły zbiorowej na okres II Wojny Światowej.

W badaniach odontologicznych przebadano łącznie 24 czaszki z ujawnionym uzębieniem. Niektóre czaszki z uwagi stan zachowania i uszkodzenia wykazywały ubytki kości szczękowych i żuchw. Wśród materiałów występowały także oddzielone kości szczękowe i żuchwy. Część czaszek zachowanych było bez kości szczękowych i bez żuchw. Wśród ekshumowanych szczątków znajdowały się wyłącznie szkielety osób płci męskiej. Oszacowany wiek zębowy wykazywał korelację z wynikami otrzymanymi w wyniku szacowania wieku kostnego. Szczątki pochodziły wyłącznie od osób dorosłych, w tym największą grupę stanowiły

osoby w mieszczące się w zakresie wieku około 35- 50 lat. Mniejszą grupę stanowiły osoby w wieku około 20-23 lata oraz osoby w wieku powyżej 50 lat.



Rysunek 4. Zdjęcie ujawnionych szczątków ludzkich w mogile zbiorowej

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

W zakresie cech uzębienia badanych czaszek obserwowano różne typy uzupełnień protetycznych: protezy pełne i częściowe akrylowe i kauczukowe, mosty i korony metalowe oraz ceramiczne. Znaczna część obserwowanych uzupełnień protetycznych w postaci koron to kosztowne rozwiązania bazujące na złocie czy srebrze. Uzupełnienia protetyczne stwierdzono w przypadku siedmiu osób, w tym część stanowiły uzupełnienia rozległych ubytków uzębienia. Uzupełnienia protetyczne obserwowano w przypadku czaszek osobników, których wiek biologiczny oszacowano na co najmniej 40 lat i powyżej.

Wśród szczątków ujawniono przedmioty osobiste, elementy obuwia, guziki, nieśmiertelniki, jak również insygnia oficerskie, wskazujące, iż w grobie masowym pochowani zostali żołnierze niemieccy.

W przypadku analizowanych zębów stwierdzono także liczne wypełnienia, głównie ciemnej barwy wypełnienia amalgamatowe (ryc. 8), część wypełnień było mleczno-żółtej barwy o cechach cementu. Nielezione zmiany próchnicowe były nieliczne. Stwierdzono je w dwóch zębach, u dwóch osobników. W jednym przypadku dodatkowo obserwowano zmiany w kości części zębodołowej żuchwy wskazujące na toczący się za życia stan zapalny zęba (ryc. 9). Na zębach trzech czaszek obserwowano obecny kamień nazębny. Cechy uzębienia, wypełnienia i uzupełnienia protetyczne oraz nieliczne zmiany nielezione, wskazywały na zadbane stan uzębienia badanej grupy osób.



Rysunek 5. Proteza pełna szczęki – powierzchnia dolna i górna

Rysunek 6. Zdjęcie żuchwy z widocznymi koronami metalowymi na bazie złota

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Rysunek 7. Szczęki z widocznymi uzupełnieniami w postaci częściowej protezy oraz koron metalowych i porcelanowych

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Rysunek 8. Zdjęcie żuchwy z widocznymi wypełnieniami amalgamatowymi

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Rysunek 9. Zdjęcie żuchwy z widocznym rozległym nieleczonym ubytkiem próchnicowego pochodzenia w pierwszym prawym zębie trzonowym /46/. Widoczne są w kości części zębodołowej żuchwy zmiany wskazujące na toczący się stan zapalny zęba

Źródło: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Podsumowanie

Proces identyfikacji zwłok i szczątków ludzkich jest zagadnieniem szerokim i wymagającym często wykorzystania wiedzy z wielu dziedzin nauki i techniki. Interdyscyplinarny charakter badań, polegający na współpracy specjalistów z różnych dziedzin nauki, prowadzi do wykorzystania szeregu metod badawczych i diagnostycznych znacznie poszerzających standardowe badania pośmiertne i wpływających na poszerzenie uzyskanych informacji o osobie zmarłej.

W identyfikacji zwłok i szczątków kostnych przydatne wyniki dają badania odontologiczne [24, 25]. Proces identyfikacji jest możliwy do przeprowadzenia przy spełnieniu dwóch warunków: po pierwsze – identyfikacja polega na analizie i porównaniu danych zażyciowych i pośmiertnych, co oznacza, że będzie on możliwy wyłącznie przy dostępie do jednych jak i do drugich danych. Po drugie: zapisy dentystyczne muszą wiarygodne i odzwierciedlać rzeczywisty stan uzębienia. Dokumentacja stomatologiczna ma ogromne znaczenie, zarówno podczas diagnostyki i terapii pacjenta, jak również coraz częściej stanowi ważny element materiału dowodowego w postępowaniu sądowym oraz identyfikacyjnym [16]. Niestarannie prowadzone, nieczytelne i niezrozumiałe zapisy w dokumentacji medycznej utrudniają, a wręcz uniemożliwiają wykorzystanie jej w identyfikacji. Należy ponadto zwrócić tu uwagę, że wyniki analizy zależą zarówno od jakości materiału dowodowego i porównawczego, jak i od wiedzy i doświadczenia odontologa sądowego [26, 27 28, 29] na którym spoczywa cała odpowiedzialność za wnioski.

Analiza odontologiczna polega na ustaleniu podobieństw i różnic między cechami uzębienia zmarłego a cechami uzębienia osoby typowanej, ustalonymi na podstawie dokumentacji medycznej. Istnieją dwa rodzaje rozbieżności: wytłumaczalne i niewytłumaczalne. Rozbieżności, których nie da się wyjaśnić, wykluczają identyfikację. Prezentowany przez nas przypadek (*Przypadek 1*) udowodnił, że należy być ostrożnym i przy wyciąganiu wniosków, ponieważ w dokumentacji mogą zdarzyć się nieprecyzyjne zapisy, błędy, trudne (nieuniwersalne) do interpretacji skróty. W sytuacjach niejednoznacznych należy szukać dodatkowych informacji i pomocy innych specjalistów [30]. Trudne i złożone przypadki identyfikacji powinny być analizowane z wykorzystaniem wielu metod z udziałem specjalistów reprezentujących różne dziedziny wiedzy, co pozwoli na opracowanie zagadnień identyfikacyjnych w szerokim zakresie, pozwoli na szerszą interpretację wyników i pozwoli na uniknięcie błędnych wniosków [31, 32].

Jak wynika z dostępnej literatury, w okresie II Wojny Światowej funkcjonowały mobilne jednostki dentystyczne, które podążały za wojskami i czuwały nad zdrowiem żołnierzy

w terenie [33]. Możliwość podążania za oddziałami wojskowymi mobilnych oddziałów dentystycznych może tłumaczyć dobry stan uzębienia badanych osobników, których szczątki wyeksplorowano z mogiły masowej. W przypadku analizowanych uzupełnień obserwuje się niektóre rozwiązania, które nie są stosowane we współczesnych uzupełnieniach.

W badaniach odontologicznych ważne są nie tylko opisy dotyczące jakich zębów uzupełnienia i odbudowa dotyczą, ale także istotne jest uwzględnienie materiału i metody wykonania. Typ odbudowy protetycznej, wykorzystany materiał, mogą wykazać dużą przydatność podczas identyfikacji, jak również podczas datowania grobów pojedynczych, czy też grobów masowych, obok innych przedmiotów ujawnionych przy szczątkach. Ponadto zęby, obok elementów kostnych stanowią ważne narzędzie wykorzystywane w rekonstrukcji warunków życia populacji pradziejowych [34], ale także historycznych i współczesnych.

Literatura

- [1] Biedowa J: Rola lekarza dentysty przy ustalaniu tożsamości nieznanymi zwłok i osób. *Prob. Krym.* 1963; 46:747-765.
- [2] Berketa JW, James H, Lake AWL.: Forensic odontology involvement in disaster victim identification. *Forensic Sci Med Pathol.* 2012 Jun; 8(2):148-56.
- [3] Franco A, Willems G, Souza PHC, Tanaka OM, Coucke W, Thevissen P.: Three-dimensional analysis of the uniqueness of the anterior dentition in orthodontically treated patients and twins. *Forensic Sci Int.* 2017 Apr; 273:80-87.
- [4] Krishan K, Kanchan T, Garg AK.: Dental Evidence in Forensic Identification - An Overview, Methodology and Present Status. *Open Dent J.* 2015 Jul; 31(9):250-6.
- [5] Lewandowski B, Brodowski R: Wykorzystanie badania stomatologicznego do identyfikacji szczątków ludzkich. *Przeł Med UR i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie.* 2011; 3: 380–383.
- [6] Lorkiewicz-Muszyńska D, Przysańska A, Kulczyk T, Hyrchała A, Bartecki B, Kociemba W, Glapiński M, Łabęcka M, Świdorski P.: Wykorzystanie zdjęć rentgenowskich do oceny wieku zębów dla celów medyczno-sądowych. *Arch Med Sąd Kryminol.* 2015; 65 (1):1–16. doi: <https://doi.org/10.5114/amsik.2015.51602>.
- [7] Gustafson G.: Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc.* 1950; 41: 45-54.
- [8] Johanson G.: Age determination from human teeth. *Odontol Rev Suppl.* 1971; 21: 1-126.
- [9] Kvaal SI, Kolltveit KM, Thomsen IO, Solheim T.: Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Sci Int.* 1995; 74: 175-185.

- [10] Lamendin H, Bacciono E, Humbert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerielli A.: A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental method. *J Forensic Sci.* 1992; 37: 1373-1379.
- [11] Solheim T.: A new method for dental age estimation in adults. *Forensic Sci Int* 1993; 59: 137-147.
- [12] Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM.: A new system of dental age assessment. *Human Biology.* 1973; 45: 211-227.
- [13] Häävikkö K.: Tooth formation age estimated on a few selected teeth. A simple method for clinical use. *Proc Finn Dent Soc.* 1974; 70: 15-19.
- [14] Liversidge HM.: Timing of human mandibular third molar formation. *Ann Hum Biol* 2008; 35: 294-321.
- [15] Porębska H.: Dokumentacja medyczna w gabinecie stomatologicznym. *Gazeta Lekarska.* 2009; 6-7: 18-22.
- [16] Marcinkowski J, Kaczmarek T, Herfort A, Szozda R, Żaba C.: Rola i znaczenie dokumentacji medycznej w orzecznictwie ubezpieczeniowym oraz postępowaniu sądowym. *Orzecznictwo Lekarskie.* 2011; 8 (2): 73-78.
- [17] Krogman WM, İşcan MY.: *The Human Skeleton in Forensic Medicine.* 2nd ed. C.C. Thomas, Springfield 1986.
- [18] White TD, Black MT, Folkens PA. *Human Osteology.* Elsevier, New York 2011.
- [19] Meindl RS, Lovejoy CO. Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *Am J Phys Anthropol.* 1985; 68: 57-66.
- [20] Garvin HM, Passalacqua NV, Uhl NM, Gipson DR, Overbury RS, Cabo LL.: Developments in Forensic Anthropology: age at death estimation. In: *Developments in Forensic Anthropology.* Dirkmaat DC (ed.). Blackwell Publishing. 2012; 202-223.
- [21] Austin-Smith D, Maples WR.: The reliability of skull/photograph superimposition in individual identification. *J Forensic Sci.* 1994 Mar;39(2):446-55.
- [22] Yoshino M, Imaizumi K, Miyasaka S, Seta S.: Evaluation of anatomical consistency in craniofacial superimposition images. *Forensic Sci Int.* 1995 Jun 30;74(1-2):125-34.
- [23] Brothwell D. R. 1981 *Digging Up Bones.* Ithaca: Cornell University Press, 72.
- [24] Avon SL.: Forensic Odontology: The roles and responsibilities of the dentist. *J Canad Dent Assoc.* 2004; 70: 453-458.

- [25] Tinoco RLR, Martins EC, Daruge EJr, Daruge E, Prado FB i wsp.: Dental anomalies and their value in human identification: a case report. *J Forensic Odontostom.* 2010; 28: 39-43.
- [26] Borrmann H, Gröndahl HG.: Accuracy in establishing identity by means of intraoral radiographs. *J Forensic Odontostomatol.* 1990; 8: 31-36.
- [27] Ekstrom G, Johnsson T, Borrmann H.: Accuracy among dentists experienced in forensic odontology in establishing identity. *J Forensic Odontostomatol.* 1993; 11: 45-52.
- [28] Jain AK, Chen H.: Matching of dental X ray images for human identification. *Pattern Recognition.* 2004; 37: 1519 – 1532.
- [29] Sand LP, Rasmusson LG, Borrmann H.: Accuracy of dental registrations in forensic odontology among dentists and dental students. *J Forensic Odontostomatol.* 1994; 12: 12-14.
- [30] Dawidson I.: Case reports and background: difficulties with identification-Sweden. *J Forensic Odontostomatol.* 2011; 29: 1-6.
- [31] Lorkiewicz-Muszyńska D, Przysańska A, Kociemba W, Glapiński M, Świdorski P, Łabęcka M, Abreu-Głowacka M, Żaba Cz.: Postępy w identyfikacji - rola zespołu interdyscyplinarnego. *Krajowy System Ratowniczo-Gaśniczy w latach 1995-2015. Postępy w ratownictwie medycznym, epidemiologii i medycynie sądowej.* Red. nauk.: Jerzy Konieczny, Maciej Schroeder Poznań. Garamond Oficyna Wydaw., 2015; 386-399.
- [32] Dorota Lorkiewicz-Muszyńska, Mariusz Glapiński, Agnieszka Przysańska.: Zadania lekarza dentystry w identyfikacji ofiar katastrof – wytyczne i formularze Interpolu. *Dental Forum.* 2013; 2(XLI): 83 – 88.
- [33] Dentistry in the field--a mobile dental laboratory during World War I. *Br Dent J.* 2007 Jan. 202(2): 105-109. DOI:10.1038/bdj.2007.44 (brak autorów).
- [34] Przysańska A, Kulczyk T, Glapiński M, Lorkiewicz-Muszyńska D.: Badania odontologiczne szczątków. *Horodysko Od epoki kamienia do wczesnego średniowiecza Badania 2004–2005.* Red. Tomasz Dzieńkowski. Instytut Archeologii UMCS w Lublinie: 323-335.

OCENA WŁAŚCIWOŚCI BAKTERIOBÓJCZYCH MOCZU LUDZKIEGO WOBEC ZIARNIAKÓW Z RODZAJU STAPHYLOCOCCUS

Mateusz Ossowski⁽¹⁾, Martyna Kasela⁽²⁾, Łukasz Wlazło⁽¹⁾, Bożena Nowakowicz-Dębek⁽¹⁾

⁽¹⁾*Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾*Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie*

Mateusz.Ossowski@student.up.edu.pl

Streszczenie

Mocz jako wydalina organizmu stosowana jest często jako materiał diagnostyczny. W jego skład wchodzi różne substancje, które stanowią o jego właściwościach chemicznych, a ich obecność uwarunkowana jest wieloma czynnikami osobniczymi. Niektóre ze związków obecnych w moczu decydują, iż może on zostać z powodzeniem zastosowany jako środek naturalnego pochodzenia hamujący wzrost drobnoustrojów patogennych. W wielu badaniach wykazano, że na właściwości antibakteryjne moczu wpływają czynniki tj. osmolalność, stężenie mocznika oraz wartość pH. Do składników moczu mających wpływ na jego aktywność wobec mikroorganizmów zaliczyć można m.in. białka, specyficzne glikoproteiny oraz wyspecjalizowane peptydy cechujące się właściwościami ograniczającymi wzrost bakterii. Współcześnie obserwuje się stale wzrastającą oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe, odgrywające istotną rolę w zwalczaniu zakażeń. Zjawisko szerzenia się oporności na antybiotyki przypisuje się przede wszystkim ich nadmiernemu i nieuzasadnionemu stosowaniu. Z tychże powodów mocz ludzki wydaje się być ciekawym, alternatywnym środkiem o działaniu bakteriobójczym.

Przeprowadzona została wstępna ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych moczu ludzkiego wobec bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, wyizolowanych ze skóry człowieka. Wyizolowane bakterie podzielono na gronkowce koagulazo-ujemne oraz koagulazo-dodatnie (*Staphylococcus aureus*). Badania przeprowadzono przy użyciu metody dyfuzyjno-studzienkowej, po czym określono wielkość stref zahamowania wzrostu. Wykazano aktywność biobójczą wszystkich analizowanych próbek moczu wobec testowanego izolatu gronkowca złocistego. Wobec gronkowców koagulazo-ujemnych nie zaobserwowano zahamowania ich wzrostu.

Wprowadzenie

Mocz zaliczany jest do wydaliny organizmu. Jego skład zależy od wielu czynników, m.in. od metabolicznych przemian wewnątrzustrojowych, pracy nerek oraz od stopnia jego rozcieńczenia. Podczas jego wydalania, z organizmu ludzkiego usuwane są zbędne produkty powstałe podczas przemiany materii, a także nadmiar wody oraz elektrolity. Mocz ostateczny powstaje w trakcie trzech fizycznych procesów wymiany, które zachodzą pomiędzy kanalikami nerkowymi, a naczyniami krwionośnymi w procesie filtracji, resorpcji oraz sekrecji [1]. Jest to bardzo często wykorzystywany materiał biologiczny w badaniach diagnostycznych z racji swoich zalet tj. możliwość otrzymania dużych objętości w nieinwazyjny sposób oraz łatwość pobrania próbek [2]. Parametrami branyymi pod uwagę podczas badań są: kolor, konsystencja, zapach, sterylność, pH, ciężar właściwy, obecność glukozy, ciał ketonowych oraz krwi [3]. Za najlepszy moment w kontekście diagnostycznym do poboru próbki jest jego pierwsza ranna porcja, pochodząca ze środkowego strumienia podczas pierwszego porannego oddawania. Próbkę pobieraną w godzinach wieczornych posiadają większą gęstość oraz mniejsze różnice składników rozpuszczonych [4].

W moczu ostatecznym zdrowego człowieka nie powinno się znajdować białko, jednakże czasem jego ilość może fizjologicznie wynieść do 100 mg/dzień. Wykrycie takich ilości białka w moczu może być spowodowane złuszczeniem się nabłonka kanalikowego [5]. Wśród tych białek znaleźć można specyficzną glikoproteinę Tamma-Horsfalla, jej wydzielanie w ciągu doby dochodzi do poziomu ok. 50 mg [6]. Substancja ta posiada właściwości ograniczające wzrost mikroorganizmów powodujących stany chorobowe związane z układem moczowym. Jej działanie opiera się na wiązaniu z innymi białkami, w tym bakteriami i wirusami. Uważa się, iż najprawdopodobniej dochodzi wtedy do dezaktywacji enzymów drobnoustrojów patogennych, a dokładniej dochodzi do reakcji z kofaktorami jonowymi, mającymi charakter metali dwuwartościowych [7]. Udowodniono, że pewne peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych występujące w ślinie, znajdują się także w ludzkim moczu [8]. Peptydy te określa się jako cząsteczki kationowe, które chronią ludzki organizm przed bakteriami Gram-dodatnimi, Gram-ujemnymi, a także wirusami czy nawet grzybami. Działanie tych peptydów wiąże się z bezpośrednim wywoływaniem uszkodzeń struktury patogenów oraz upośledzeniem ich funkcji metabolicznych. Ich skuteczność opiera się głównie na zdolności do szybkiego identyfikowania, a po tym do eliminacji patogenów chorobotwórczych [9]. Kolejną cechą moczu wpływającą na jego właściwości biobójcze jest wysoka lub niska molalność moczu, która w obu przypadkach zapobiega rozwojowi drobnoustrojów. Samo pH moczu o wartościach referencyjnych 4,8 do 8,0 wpływa hamująco na rozwój

drobnoustrojów [10]. Mocz tworzy niesprzyjające warunki do bytowania mikroorganizmów. Związkami chemicznymi zawartymi w moczu, które spełniają funkcję przeciwdrobnoustrojową są kwasy organiczne oraz związki azotowe, wśród których wymienić można tlenek azotu oraz mocznik [11].

Termin „mikrobiota układu moczowego” jest definiowany jako mikroorganizmy, które żyją w pęcherzu, natomiast „mikrobiom układu moczowego” jest traktowany jako cała pula ich genomów [12]. Naturalna mikrobiota ma krytyczny wpływ na zachowanie zdrowia i możliwości rozwoju choroby. Bazując na zależnościach między mikroorganizmami zasiedlającymi różne części naszego ciała, a naszym organizmem badacze zakładają, że również mikrobiota dróg moczowych niesie ze sobą korzyści dla gospodarza. Zakłada się, że te drobnoustroje mogą stanowić specyficzną, aktywną barierę, zapobiegającą przed namnażaniem się bakterii patogennych w drogach moczowych [13]. Równie ważną niewiadomą pozostaje kwestia wpływu leków przeciwdrobnoustrojowych przyjmowanych podczas zakażeń dróg moczowych, i ich wpływu na naturalnie występującą mikrobiotę [14]. Do niedawna układ moczowy nie był rozpatrywany pod względem zasiedlającej go mikroorganizmów, podobnie jak sam mocz uważany był za sterylny u zdrowych ludzi. W ostatnich latach zaawansowane metody hodowlane połączone z technikami biologii molekularnej pozwoliły na zrewidowanie tej hipotezy i określenie mikrobioty zasiedlającej tą część naszego ciała. Najlepiej poznanymi przedstawicielami bakterii, zamieszkującymi drogi moczowe, w tym pęcherz są *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Gardnerella spp.* [15]. Jednakże w niektórych badaniach podaje się, że do najczęściej izolowanych należą rodzaje *Lactobacillus* i *Streptococcus* [16]. Ustalono, że mikrobiota przewodu moczowego różni się w zależności od płci, co jest związane z samą budową strukturalną przewodów moczowych, produkcją odmiennych hormonów, jak i składem moczu. U kobiet w moczu obserwuje się wyższe ilości cytrynianów, a niższe wapnia, szczawianów i kreatyniny [15]. Obecnie w celu zachowania prawidłowego stanu układu moczowego, a także profilaktyki i leczenia schorzeń układu moczowego stosowane są różne metody i suplementy. Wśród najefektywniejszych znajdują się terapie z wykorzystaniem suplementacji szczepami *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. casei*), *Oxalabacter formigenes*, oraz dodatek do żywności związków tj. D-mannoza, substancje probiotyczne, wapń i eliminacja z diety nadmiernych ilości sodu i białek zwierzęcych. Warto zaznaczyć, szczepy *Lactobacillus* posiadają udowodnione wcześniej właściwości antibakteryjne zawdzięczone tworzeniu niskiego pH w swoim środowisku i produkcji metabolitów tj. nadtlenu wodoru, czy bakteriocyny [16].

Dostępne dane literaturowe wskazują, iż mocz posiada znaczące właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec patogenów, które często odpowiadają za powstanie stanów chorobowych u ludzi. Wśród głównych czynników etiologicznych należy wymienić m.in. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Aktualne zainteresowanie tematyką urynoterapii w badaniach naukowych wynika z potrzeb weryfikacji praktyk medycyny ludowej. Istnieje szereg badań dotyczących oceny właściwości przeciwbakteryjnych moczu zwierząt tj.: wielbłądy czy krowy. Medyczne właściwości moczu wielbłądów arabskich są dobrze poznane przez tamtejszych lekarzy. Stosowanie wielbłądziego moczu w różnego rodzaju terapiach nie było i nadal nie jest rzadkością na Bliskim Wschodzie. Należy jednak zaznaczyć, że mocz zwierząt wykorzystywany w celach terapeutycznych był odpowiednio przygotowywany, np. zagotowywany. Badacze wymieniają tutaj przede wszystkim wielbłądy pustynne, które mają bardzo specyficzną dietę ze względu na swoje miejsce występowania. Wielbłądy te żywią się roślinami takimi jak piołun (*Artemisia absinthium*) i bylica boże drzewko (*Artemisia abrotanum*). W odniesieniu do składu chemicznego moczu dromaderów (*Camelus dromedarius*) stwierdzono, że do najważniejszych cech chemicznych należą: wysoka osmolalność w porównaniu z moczem owczym, krowim oraz ludzkim, czy wysoki poziom potasu i białek. Te cechy zapewniają moczowi skuteczne właściwości przeciwdrobnoustrojowe [17]. Większość analiz laboratoryjnych i badań, które są szeroko prowadzone w tej dziedzinie wykazały, iż mocz wielbłądzi zawiera wysokie koncentracje potasu, mocznika i białek, a także niskie stężenia kwasu moczowego, kreatyny i sodu [18]. W skład krowiego moczu wchodzi pewne lotne i nielotne składniki, które mogą mieć wysoką aktywność antybakteryjną. Po przejściu procesu fotoaktywacji i oczyszczeniu moczu okazał się on skuteczną bronią w zwalczaniu niektórych lekoopornych szczepów bakteryjnych [19, 20].

Odkrywanie i opracowywanie nowych leków przeciwdrobnoustrojowych należy do najważniejszych zadań współczesnej medycyny, ponieważ środki te odgrywają kluczową rolę w zwalczaniu chorób zakaźnych. Wzrost zużycia antybiotyków spowodowany jest w dużej mierze ich bezpodstawnemu stosowaniu, bądź prewencyjnej antybiotykoterapii podczas stosowania kaniuli czy przeszczepów narządów i obecności zakażeń wirusem HIV. Stosowanie antybiotyków od zawsze wiązało się ze znacznym obciążeniem finansowym oraz występowaniem skutków ubocznych [20]. Z tego względu przeprowadzono wstępną ocenę właściwości bakteriobójczych moczu człowieka wobec bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, wyizolowanych ze skóry człowieka.

Metodyka badań

W badaniach wzięło udział 5 osób w wieku od 20 do 30 lat. Materiał do badań stanowiły wymazy pobrane ze skóry płatków nosa oraz poranny mocz osób objętych badaniami. Mocz pobrano zgodnie z zaleceniami poboru próbek moczu do badań mikrobiologicznych do sterylnych pojemników, tzw. „moczówek”. Wymazy ze skóry nosa pobierano przy użyciu jałowych wymazówek mikrobiologicznych, a następnie posiewano na stałe podłoża mikrobiologiczne. Wykorzystano do tego celu podłoże: agarowe z 5% dodatkiem krwi baraniej, podłoże Chapmana z mannitolem oraz agar tryptozowo-sojowy (TSA). Kolejnym etapem procedury mikrobiologicznej była inkubacja. Podłoża poddano inkubacji przez 24h w temperaturze 37°C w termostacie. W celu otrzymania czystych kultur bakteryjnych, mikroorganizmy zidentyfikowane jako gronkowce przesiano redukcyjnie. Podstawą do identyfikacji wyrosłych kolonii bakteryjnych była ocena makroskopowa, czyli obserwacja cech morfologicznych kolonii na podłożach oraz ocena mikroskopowa (barwienie metodą Grama). Dodatkowo, badanie miało na celu wyizolowanie bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Identyfikacji dokonano z wykorzystaniem próby na obecność katalazy oraz clumping factor, czyli próby na obecność czynnika zlepnego, metodą aglutynacji szkiełkowej (test gronkowcowy BIOMED, Lublin). Proces ten polega na aglutynacji krwinek opłaszczonych fibrynogenem, do której dochodzi podczas kontaktu z czynnikiem zlepnym obecnym w ścianie komórkowej bakterii *Staphylococcus aureus*.

Mocz pobrany do sterylnych pojemników niezwłocznie przetransportowano w odpowiednich warunkach chłodniczych do laboratorium i poddano analizie. W tym celu, z uzyskanych we wcześniejszym etapie badania mikroorganizmów sporządzono inokulum bakteryjne o gęstości optycznej 0,5 w skali MacFarland'a i wysiano je na podłoże agarowe Mullera-Hinton II. Następnie w podłożu wycięto studzienki o średnicy 0,5 cm z wykorzystaniem sterylnego szablonu. Do wyciętych studzienek aplikowano po 100 µl analizowanego moczu. Podłoża poddawano inkubacji w termostacie zgodnie z zaleceniami, przez okres 24 h w temperaturze 37°C. W trakcie inkubacji dochodziło do dyfuzji aktywnych składników moczu ze studzienek do podłoża. Po okresie inkubacji obserwowano obecność lub brak obecności okrągłych stref zahamowania wzrostu wysianych wcześniej bakterii. Wyniki odczytywano poprzez pomiar średnicy powstałej strefy zahamowania.

Podczas badań poddano analizie oddziaływania bakteriobójczego moczu ludzkiego 5 izolatów bakterii należących do rodzaju *Staphylococcus*. Każdy z testowanych izolatów poddany był działaniu moczu pochodzącego od osoby, od której wyizolowano testowany mikroorganizm, jak i czterech pozostałych uczestników doświadczenia. Sprawdzenie takich

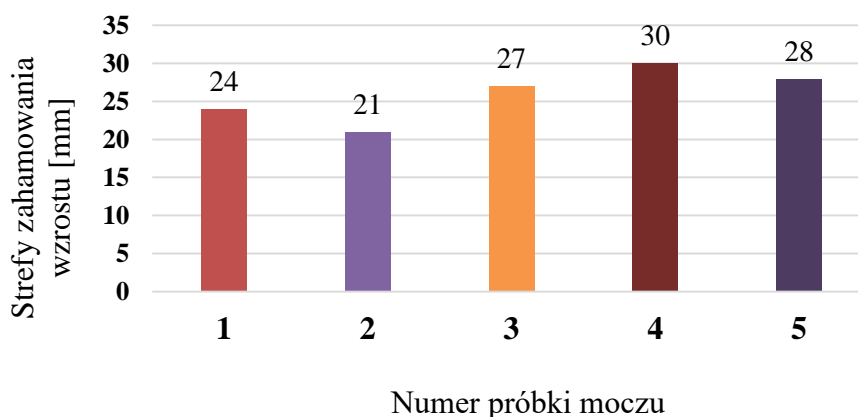
właśnie zależności w doświadczeniu pozwoli na ocenę właściwości biobójczych moczu ludzkiego, zarówno wobec bakterii tworzących własną mikrobiotę, jak i mikroorganizmów pochodzących od innych osób.

Wyniki i dyskusja

Dla wszystkich testowanych izolatów zaobserwowano wynik pozytywny na obecność katalazy, co w połączeniu z obrazem mikroskopowym i cechami morfologicznymi kolonii na podłożach wzrostowych pozwoliło zaklasyfikować je do ziarniaków. Przeprowadzone badania pozwoliły przyporządkować izolaty 1, 2, 4, 5 do gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS - z ang. coagulase-negative staphylococci). U jednego z badanych izolatów (nr 3) stwierdzono produkcję koagulazy związanej, czyli czynnika zlepnego, dlatego został on uznany za przedstawiciela gatunku *Staphylococcus aureus*.

Analizowane próbki moczu wykazały działanie przeciwbakteryjne jedynie wobec izolatu nr 3, czyli gronkowca złocistego. Nie zaobserwowano aktywności bakteriobójczej wobec izolatów 1, 2, 4 i 5, czyli gronkowców koagulazo-ujemnych w każdym z oznaczeń.

Właściwości przeciwbakteryjne wobec izolatu *Staphylococcus aureus* zaobserwowano dla każdej z próbek moczu objętych badaniami. Strefy zahamowania wzrostu mieściły się w granicach od 21 do 30 mm. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze, a tym samym największą strefę zahamowania wzrostu zaobserwowano dla próbki moczu nr 4, która nie pochodziła o tej samej osoby, od której wyizolowano testowany mikroorganizm. W tym przypadku wielkość strefy zahamowania wzrostu wyniosła 30 mm. Wyniki tego etapu badań przedstawiono na **Rysunku 1**.



Rysunek 1. Strefy zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus* po zastosowaniu moczu różnych osób [mm].

Źródło: opracowanie własne

Wobec gronkowców koagulazo-ujemnych, wyizolowanych i użytych podczas doświadczenia nie zaobserwowano właściwości przeciwdrobnoustrojowych wszystkich próbek analizowanego moczu.

W badaniach własnych udowodniono, że mocz ludzki posiada właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepów wyizolowanych ze skóry człowieka należących do gatunku *Staphylococcus aureus*. Zbliżone wyniki uzyskali Kanbara i wsp. [2012] oraz wykazali, iż wzrost bakterii *S. aureus* hamowany był przez mocz po upływie 6 godzin. Stwierdzili także, że wraz ze wzrostem stopnia rozcieńczenia moczu oraz wzrostem pH spadała jego aktywność biobójcza. Dodatkowymi parametrami wziętymi pod uwagę podczas doświadczenia były również: pH, obecność białek oraz mocznika. Przy pH równym 5,0 obserwowano znaczne zahamowanie namnażania się gronkowca złocistego, a także, gdy pH mieściło się w granicach 5,5 – 6,0 w moczu stężonym. Wspomniane wcześniej białka również działały antybakteryjnie w moczu, który zawierał jego dozwolone ilości. Wyniki badań Sarsar'a i wsp. [2013] wyraźnie wskazują, że mocz krwi wykazuje wysoki potencjał hamujący namnażanie patogennych szczepów bateryjnych. Aktywność biobójczą moczu, podobnie jak w badaniach własnych wykazano wobec patogenu: *Staphylococcus aureus*, a także wobec *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, oraz *Micrococcus luteus*. Sumia i wsp. [2016] również dowiedli, że mocz posiada właściwości biobójcze. Obiektem ich badań był mocz wielbłądzi, dla którego uzyskano strefy zahamowania wzrostu wobec bakterii *S. aureus* o średnicach zbliżonych do uzyskanych w pracy własnej. Właściwości moczu zbadano również wobec takich izolatów jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella sp.* oraz *Escherichia coli*. Eksperyment Kanbara i wsp. [2012] dowiódł także, że obecność mocznika w moczu istotnie wpływa na jego działanie biobójcze. Istnieją liczne badania, które skupiają się na zbadaniu wpływu mocznika na aktywność przeciwbakteryjną moczu ludzkiego. Ramesh i wsp. [2010] zbadali wpływ dodatku różnych ilości mocznika do moczu. Zwiększenie stężenia mocznika w zakresie od 3,1 do 6,3 g/100 ml zwiększało zarazem aktywność przeciwbakteryjną. Inni naukowcy próbowali uzyskać ten sam rezultat używając znacznie mniejszych ilości tej substancji jako dodatku do moczu. Yang i Bankir [2005] dowiedli, że dodatek 0,5 g mocznika do 100 ml moczu nie wpływa hamująco na rozmnażanie się drobnoustrojów. Ewadh i wsp. [2013] w swoich badaniach dowodzą, iż dieta ketogeniczna może wpływać korzystnie na aktywność biobójczą moczu ludzkiego, a jest to spowodowane obecnością znacznych ilości kwasów organicznych w moczu. W trakcie analizy właściwości antybakteryjnych moczu ludzkiego przeprowadzonej przez Wu i wsp. [2008] wzięto pod uwagę również jego pH, wykazano, że substancje aktywne wchodzące

w skład mocz u zdrowego człowieka charakteryzują się działaniem bakteriostatycznym przy pH równym 5,0, co również potwierdzają badania Yang'a i Bankir'a [2005]. Żylicz i Krajnik [2002] przebadali wpływ moczu ludzkiego na drobnoustroje wprowadzając uprzednio do diety pacjentów duże ilości soku żurawinowego. Dodatek dużej ilości tego płynu spowodował zwiększenie wydzielania kwasu hipurowego. Kwas hipurowy jest to kwas organiczny, który wykazuje działanie hamujące wzrost bakterii nawet przy niskim pH. W badaniach Lee i wsp. [2010] również oceniono działanie przeciwdrobnoustrojowe próbek moczu pobranych od ochotników po spożyciu dostępnego komercyjnie produktu żurawinowego. Stwierdzono, że 35% badanych próbek posiadało właściwości antibakteryjne wobec *Escherichia coli*, 65% wobec *Klebsiella pneumoniae* oraz 45% wobec drożdżaka *Candida albicans* w próbkach pobranych od 2 do 6 godzin po okresie przyjmowania produktu żurawinowego, który wynosił jeden dzień. Podobne badania Wing i wsp. [2010] sugerują, że aktywność przeciwbakteryjna próbek moczu wobec *E. coli* nie różniła się istotnie, uwzględniając ilość przyjętych dawek soku z żurawiny w ciągu dnia. Autorzy zaobserwowali zgodność swoich wyników z wynikami innych autorów. Innym czynnikiem mającym wpływ na aktywność bójęczą moczu jest jego pH. Erdogan-Yildirim i wsp. [2011] stwierdzili, że działanie hamujące wzrost drobnoustrojów było najbardziej zauważalne przy określonych parametrach – pH wynoszącym 5,0 i osmolalności równej 600 mOsm/kg wody. Zbliżone wyniki uzyskali również w swoich badaniach Lowe i Fagelman [2001]. Zauważyli także, że efekt ten wynikał z podwyższenia stężenia niezdysoncjowanych kwasów organicznych zawartych w moczu, które miały postać skoncentrowaną. Stwierdzono równocześnie, że pH skoncentrowanego moczu nie miało wpływu na obserwowane podczas badań zahamowanie wzrostu drobnoustrojów, a było to najprawdopodobniej spowodowane obecnością mocznika. Podczas badań Ahuja i wsp. [2012] również potwierdzono właściwości przeciwbakteryjne moczu. Badacze doszli także do wniosku, że mocz pochodzący od różnych krów posiada różny poziom właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Stopień aktywności antibakteryjnej moczu krowiego może być spowodowany różnicami w jego składzie chemicznym. W badaniach wykazano, że świeży mocz krowi był skuteczniejszym środkiem przeciwbakteryjnym niż mocz fotoaktywowany, z racji różnic w ich kwasowości.

Podsumowanie

W niniejszych badaniach wykazano, iż mocz ludzki może znaleźć zastosowanie jako potencjalny środek do zwalczania zakażeń wywoływanych przez bakterie, a w szczególności przez bakterie *Staphylococcus aureus*. Jest to szczególnie istotne, ponieważ współczesne,

nadmierne stosowanie antybiotyków i występowanie adaptacyjnej plastyczności drobnoustrojów przyczynia się do stale wzrastającej oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe wykorzystywane w terapii zakażeń.

Literatura

- [1] Konturek J S: Fizjologia człowieka. Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner Wyd. II, Wrocław, 390-391, 2013.
- [2] Rutkiewicz I, Namieśnik J: Skład moczu jako źródło informacji o narażeniu zawodowym na związki organiczne. *ECE S*, 15: 4: 561-585, 2008.
- [3] Baig A: Biochemical composition of normal urine. Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Sultan Zainal Abidin, 2011.
- [4] Koolman J, Klaus-Heinrich R: Biochemia-ilustrowany przewodnik. Wyd. Lekarskie PZWL Wyd. I, Warszawa, 324-330, 2005.
- [5] Konturek S: Fizjologia człowieka, Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego Wyd. IV poszerzone, Kraków, 261-281, 2001.
- [6] Weichhart T, Haidinger M, Hörl W H, Säemann M D: Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest*, 2: 29-38, 2008.
- [7] Shihabi Z K, Hinsdalea M E, Bleyer A J: Analysis of Tamm–Horsfall protein by high-performance liquid chromatography with native fluorescence. *J Chromatogr A*, 1027: 161-166, 2004.
- [8] Dale B A, Tao R, Kimball J R, Jurevic R J: Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*, 6: S13, 2006.
- [9] Zasloff M: Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol*, 18: 2810-2816, 2007.
- [10] Hryniewicz W, Grzesiowski P, Mészáros J, Radzikowski A, Ozorowski T: Zakażenia układu moczowego. Etiologia, rozpoznawanie, leczenie. Wyd. II, Fundacja Centrum Mikrobiologii Klinicznej, Warszawa, 2001.
- [11] Carlsson S, Wiklund N P, Engstrand L, Weitzberg E, Lundberg J O: Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine. *Nitric Oxide*, 580-586, 2001.
- [12] Wolfe A J, Brubaker L: “Sterile urine” and the presence of bacteria. *Eur Urol*, 68(2), 173, 2015.

- [13] Whiteside S A, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton J P: The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nat Rev Urol*, 12(2), 81-90, 2015.
- [14] Finucane T E: 'Urinary tract infection' and the microbiome. *Am J Med*, 130(3), 97 - 98, 2017.
- [15] Tang J: Microbiome in the urinary system—a review. *AIMS Microbiol*, 3(2), 143-154, 2017.
- [16] Aragón I M, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño M I, Castillo E, Del Moral J S G: The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus*, 232(11), 2016.
- [17] Al-Bashan M M: In vitro assessment of the antimicrobial activity and biochemical properties of camel's urine against some human pathogenic microbes. *MEJSR*, 7, 947-958, 2011.
- [18] Ba'Smaeel S: Camel's milk and urine between folklore and science. King Abdulaziz City for science and Technology, Kingdom of Saudi Arabia. *J Sci and Technol*, 70, 17-23, 2004.
- [19] Ahuja A, Kumar P, Verma A, Tanwar R S: Antimicrobial activities of cow urine against various bacterial strains. *IntJ Recent Adv Pharm Res*, 2(2), 84-87, 2012.
- [20] Sarsar V, Selwal K K, Selwal M K, Pannu R, Tyagi P K: Evaluation of antibacterial activity of photoactivated cow urine against human pathogenic strains. *Environ Exp Biol*, 11, 201-3, 2013.
- [21] Kanbara A, Miura Y, Hyogo H, Chayama K, Seyama I: Effect of urine pH changed by dietary intervention on uric acid clearance mechanism of pH-dependent excretion of urinary uric acid. *Nutr J*. 7: 11: 39-47, 2012.
- [22] Sumia A D, Ali A M, Muna E A: Antimicrobial activity of Camels (*Camelus dromedarius*) and Sheep urine on some pathogenic bacteria. *IOSR-JAVS*, 9(10), 65-71, 2016.
- [23] Ramesh H A, Azmathulla M, Baidya M, Asad M: Wound healing activity of human urine in rats. *RJPBCS.*, 1: 3: 750-758, 2010.
- [24] Yang B, Bankir L: Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol*. 288: 5: F881-F896, 2005.
- [25] Ewadh M, Hasan H, Bnyan I, Mousa F, Sultan J i wsp.: Antibacterial Activity of 2- (2-Hydroxy phenylimino) Acetic Acid. *Adv L Sci Tech*, 7: 15-20, 2013.
- [26] Wu H C V, Qiu X, Bushway A, Harper L: Antibacterial effects of American cranberry concentrate on foodborne pathogens. *LWT*. 41(1834–1841), 2008.

- [27] Żylicz Z, Krajnik M: Sok z żurawin w zapobieganiu i leczeniu zakażeń dróg moczowych u chorych terminalnych. Czy mamy wystarczające dowody, aby wierzyć w jego skuteczność? *Pol Med Paliatywna*, 1: 2: 85–88, 2002.
- [28] Lee Y L, Najm W I, Owens J, Thrupp L, Baron S i wsp.: Anti-microbial activity of urine after ingestion of cranberry: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med*, 7(2), 227-232, 2010.
- [29] Wing D A, Shell A, Lee Y L, Barro S, Leu S Y i wsp.: Antimicrobial Activity of Urine after Ingestion of Differing Daily Doses of Cranberry Juice Cocktail in Pregnancy: A Pilot Study. *Open Complement Med J*, 2, 15-19, 2010.
- [30] Erdogan-Yildirim Z, Burian A, Manafi M, Zeitlinger M: Impact of pH on bacterial growth and activity of recent fluoroquinolones in pooled urine. *Res Microbiol.*, 162: 3: 249-252, 2011.
- [31] Lowe C F, Fagelman E: Cranberry juice and urinary tract infections: what is the evidence? *Urol.* 57: 407–413, 2001.

MODULACJA ALLOSTERYCZNA RECEPTORA CB1

Klaudia Staszak^(1,2), Angelika Andrzejewska^(1,2), Marta Kaczmarek-Ryś⁽²⁾, Ryszard Słomski^(1,2), Szymon Hryhorowicz⁽²⁾

⁽¹⁾ *Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań, Polska*

⁽²⁾ *Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, Polska*

klaudia.staszak888@gmail.com

Streszczenie

Receptory sprzężone z białkiem G (GPCR, ang. *G protein-coupled receptors*) to duża rodzina białek, której charakterystyczną cechą jest siedmiotransbłonowy, spiralny motyw strukturalny. Receptory GPCR pośredniczą w odpowiedzi na interakcję ze specyficznymi ligandami poprzez wiązanie i aktywację wewnątrzkomórkowych, heterotrimerycznych białek G. Ponadto receptory te mają istotne znaczenie dla aktywacji, proliferacji i ukierunkowanej migracji komórek m.in. w przebiegu odpowiedzi immunologicznej i reakcjach zapalnych. Współczesna farmakologia wykorzystuje tę wiedzę w projektowaniu nowych leków, wchodzących w interakcje z tymi receptorami. Do grupy punktów docelowych należą enzymy, kanały jonowe, receptory – w tym głównie GPCR, dla których opracowano szereg agonistów, antagonistów i odwrotnych antagonistów. Większość dostępnych leków, skierowanych na receptory sprzężone z białkiem G, oddziałuje tylko na jeden cel – miejsce ortosteryczne receptora, z którym wiąże się endogenny ligand. Jednakże ze względu na pojawiające się często skutki uboczne podczas stosowania ortosterycznych ligandów, w dalszym ciągu poszukuje się dla nich lepszej i bardziej precyzyjnej alternatywy. Możliwe efekty niepożądane, związane z działaniem standardowych ligandów, przyczyniły się do rozpoczęcia badań nad wykorzystaniem potencjału małych cząsteczek lekopodobnych, modulujących sygnalizację zależną od GPCR, tj. modulatorów allosterycznych [1].

Celem niniejszej pracy było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat modulacji allosterycznej receptora kannabinoidowego typu 1 (CB1), w oparciu o literaturę dostępną w bazie PubMed oraz narzędzia bioinformatyczne (<http://gpcrdb.org/>, M7 Alignment Explorer oraz BLAST).

Wprowadzenie

Modulacja allosteryczna

Allosteryczne miejsce wiązania jest domeną odrębną od miejsca ortosterycznego. Miejsce allosteryczne może wiązać małe cząsteczki lub białka, co skutkuje modulowaniem aktywności receptora. Modulatory allosteryczne w sposób niekonkurencyjny regulują siłę działania związków ortosterycznych [2].

Model struktury i funkcji receptorów GPCR zakłada, że modulacja związana jest ze zmianą powinowactwa receptora do ortosterycznego ligandu poprzez inicjację przejść konformacyjnych w białku. Modulator allosteryczny stabilizuje strukturę receptora w przypadku konformacji trudnych do osiągnięcia za pomocą ortosterycznych ligandów. Doniesienia literaturowe opisują allosteryczne ligandy receptora CB1 (lipoksyna A4, PSNCBAM-1, RTI-371 Org27569, Org27759, Org29647, GAT211 I GAT229) jako związki kompleksowe wiążące się z receptorem w miejscach zróżnicowanych topologicznie od miejsc ortosterycznych (3-7). Wpływają one tym samym na aktywność receptora CB1, powodując zmianę powinowactwa lub efektywności oddziaływania ortosterycznego ligandu. Wyróżniono tu pozytywne modulatory allosteryczne (PAM, ang. *positiveallosteric modulator*) – wzmacniające oddziaływanie i negatywne modulatory allosteryczne (NAM, ang. *negativeallosteric modulator*), które osłabiają oddziaływanie. W ten sposób możliwe jest dopasowanie aktywności receptora w wyniku uzyskania unikalnych, korzystnych pod względem terapeutycznym wzorców drogi przekazywania sygnału [3].

Modulatory allosteryczne wykazują szereg cech, które czynią je potencjalnie bardziej skutecznymi niż ligandy ortosteryczne, jak: wysoka swoistość, selektywność docelowego działania i nasycalność. Najważniejszą z nich jest zwiększona swoistość ze względu na wyższy poziom rozbieżności sekwencji w allosterycznych miejscach wiązania, w porównaniu do konserwatywnych domen ortosterycznych. Daje to możliwość specyficznego działania na dane podtypy receptora. Drugą istotną cechą jest selektywność docelowego działania. Endogenne ligandy ortosteryczne wpływają na szlaki sygnałowe danego receptora we wszystkich miejscach jego występowania. Z kolei modulacja allosteryczna pozwala na regulację odpowiedzi receptorów tylko w tkankach, które zawierają w danej chwili endogenne ligandy ortosteryczne. Zważając na „wyrzutową” produkcję endogennych ligandów w organizmie, specyficzne tkankowo działanie ligandów allosterycznych wydaje się być istotne w potencjalnej terapii [2]. Kolejną z zalet modulatorów allosterycznych jest ich nasycalność – po przekroczeniu pewnego stężenia, działanie pozostaje na stałym poziomie, co uniemożliwia

przedawkowanie. Modulatory allosteryczne mogą oferować alternatywną strategię modulowania farmakologicznego receptorów GPCR, w tym również receptora CB1 [4].

Modulacja allosteryczna receptora CB1

Receptor kannabinoidowy typu 1 (CB1, ang. *cannabinoid receptor type 1*) jest najczęściej występującym w ośrodkowym układzie nerwowym, receptorem klasy A z grupy receptorów GPCR. Sekwencja aminokwasowa receptora CB1 człowieka obejmuje 472 aminokwasy, łącznie o masie cząsteczkowej około 53 kDa. Białko CB1 składa się z siedmiu α -helis transbłonowych (TMH1-7, ang. *transmembranehelix 1-7*), amfipatycznej helisy 8, trzech pętli zewnątrzkomórkowych (ECL1-3, ang. *extracellularloop 1-3*) i trzech wewnątrzkomórkowych (ICL1-3, ang. *intracellularloop 1-3*). Aktywacja receptora CB1 odbywa się głównie poprzez aktywację białek Gi, które zmniejszają stężenie wewnątrzkomórkowego cyklicznego AMP (cAMP) hamując cyklazę adenylnową i zwiększając stężenie kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK). CB1 może być aktywowany przez endogenne ligandy jak anandamid (AEA) i 2-arachidonyloglicerol (2-AG), syntetyczne ligandy (np. CP55940) czy egzogenne ligandy, jak Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC) – fitokannabinoid, odpowiedzialny za psychoaktywne działanie marihuany [3, 5].

Cały układ endokannabinoidowy, w tym również receptor CB1, odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego oraz autonomicznego układu nerwowego. Odpowiada on za modelowanie połączeń między neuronami, a także bierze udział w komunikacji synaptycznej. Układ endokannabinoidowy uczestniczy w regulacji gospodarki energetycznej organizmu oraz w funkcjonowaniu układu endokrynnego. Może wpływać na regulację stanów emocjonalnych, motorykę ruchu, czynności układu dokrewnego i odpornościowego, czy układu pokarmowego [6]. Receptor CB1 pośredniczy w reakcjach organizmu, takich jak łaknienie, utrata pamięci, ruchliwość żołądkowo-jelitowa, katalepsja, aktywność ambulatoryjna, lęk, depresja, czy też przewlekły ból [3].

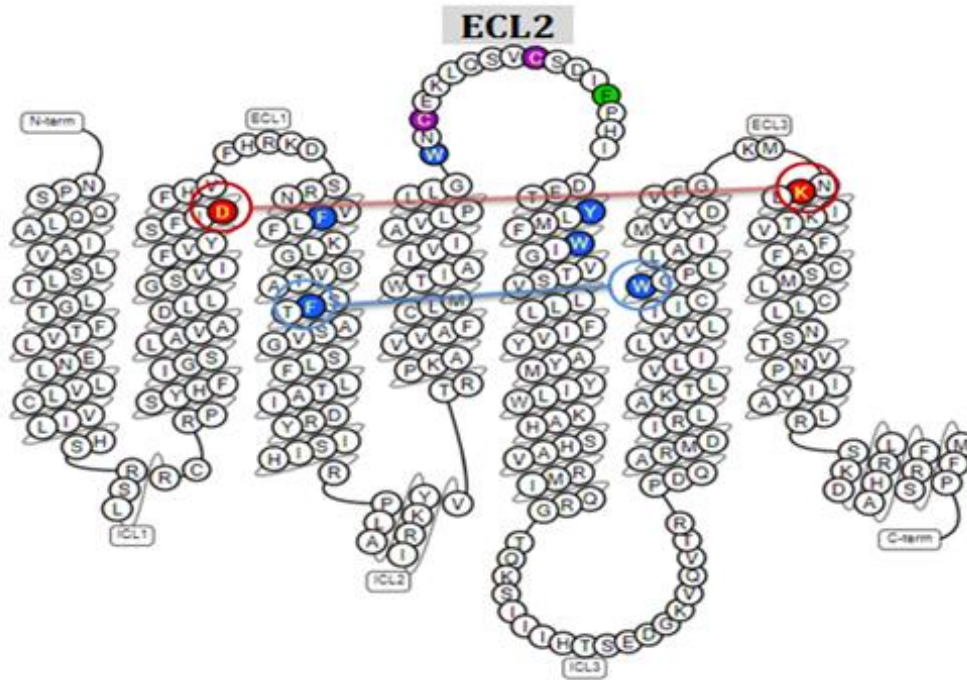
Ortosteryczne ligandy receptorów CB1 rozważano, jako potencjalne farmakoterapeutyki w leczeniu wspomnianych zaburzeń, jednak ich działania niepożądane, a w szczególności psychoaktywne efekty uboczne niektórych z nich, powstające w rezultacie aktywacji receptorów kannabinoidowych, uniemożliwiają zastosowanie ich jako terapeutyków w praktyce klinicznej [7]. Jednymi z modulatorów ortosterycznych w terapii nudności po leczeniu chemioterapeutykami są Marinol® i Cesamet®. Jednakże, ze względu na występujące efekty niepożądane, są dopuszczone przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *US Food and Drug Administration*) tylko w ograniczonym zakresie. Kolejnym przykładem

ograniczonego potencjału terapeutycznego modulatorów ortosterycznych receptora CB1 mogą być rimonabant i taranabant. Związki te, rekomendowane niegdyś jako leki przeciw otyłości, wywoływały efekty niepożądane, w tym depresje i stany lękowe [2].

Jedną z możliwości pokonania ograniczeń stosowanych związków kannabinoidowych oddziałujących z miejscami ortosterycznymi może być zastosowanie allosterycznych ligandów kannabinoidowych. Skuteczne i precyzyjne modulatory allosteryczne receptora CB1, stanowią więc obiecującą alternatywę i dlatego dokładniejsze poznanie regionów i pozycji, oraz charakterystyka oddziaływań ligand-receptor są niezwykle istotne.

Znaczący region receptora CB1- druga pętla zewnątrzkomórkowa ECL2

Zewnątrzkomórkowe pętle receptorów sprzężonych z białkiem G mogą wiązać bezpośrednio ortosteryczne lub allosteryczne ligandy. Badania wskazują drugą pętlę zewnątrzkomórkową 2 (ECL2, ang. *extracellularloop 2*) jako kluczowy region receptora CB1, biorący udział w interakcji z ligandami. Region ECL2 odpowiedzialny jest za łączenie domen transbłonowych TMH4 i TMH5 w receptorze CB1. Obejmuje sekwencję aminokwasową od tryptofanu w pozycji 255 (W255) do izoleucyny w pozycji 271 (I271). Spośród wszystkich pętli składowych, ECL2 jest największym i najbardziej strukturalnie zróżnicowanym regionem w obrębie różnych podrodzin receptorów GPCR, co może odzwierciedlać jego znaczenie funkcjonalne [8]. Ponadto niektóre aminokwasy w obrębie ECL2 warunkują allosteryczne wzmocnienie sygnalizacji agonistycznej. Niski poziom zmienności międzygatunkowej może także wskazywać ten obszar jako istotny funkcjonalnie. Ponadto, porównanie sekwencji genu *CNRI* człowieka z odległymi filogenetycznie *Xenopustropicalisi Danio rerio*, mimo niskiego pokrycia całego genu, wykazuje nadal wysoką konserwatywność regionu ECL2 (Tabela1.). Porównanie sekwencji aminokwasowych w ECL2 wykazało również znaczącą konserwatywność tego regionu wśród różnych organizmów (Rys.2., Tabela1.). Wykazano, że dwa pierwsze aminokwasy domeny ECL2 (W255 i N256) mogą mieć kluczowy wpływ na transport białka CB1 z retikulum endoplazmatycznego, jego umiejscowienie w błonie i prawidłową aktywność (Rys. 2.). Dwie cząsteczki cysteiny (C257 i C264) tworzą wiązanie dwusiarczkowe w obrębie domeny ECL2 i są istotne dla wysokiego poziomu ekspresji i interakcji z ligandami (Rys. 1. i 2.) [9, 10].



Rysunek 1. Schemat budowy ludzkiego receptora CB1 z uwzględnieniem pozycji biorących udział w oddziaływaniach ligand-receptor

Źródło: opracowanie własne z użyciem gpcrdb.org

ECL2		
[Human] CB ₁ receptor	W N C E K L Q S V C S D I F P H I	
[Mouse] CB ₁ receptor	W N C K K L Q S V C S D I F P L I	
[Chimpanzee] CB ₁ receptor	W N C E K L Q S V C S D I F P H I	
[Rat] CB ₁ receptor	W N C K K L Q S V C S D I F P L I	
[Dog] CB ₁ receptor	W N C K K L Q S V C S D I F P L I	
[Pig] CB ₁ receptor	W N C K K L Q S V C S D I F P L I	
[Western clawed frog] CB ₁ receptor	W N C K K L R S V C S D I F P L I	
[Zebrafish] CB ₁ receptor	W N C K R L N S V C S D I F P L I	
		GPCRdb (Class A) ↑↑↑ ↑ ↑
CONSENSUS	W N C K K L Q S V C S D I F P L I	

Rysunek 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych w regionie pętli zewnątrzkomórkowej ECL2 dla 8 różnych organizmów

Źródło: opracowanie własne z użyciem gpcrdb.org

Tabela 1. Porównanie sekwencji genu *CNR1* i pętli zewnątrzkomórkowej 2 (ECL2)

<i>Homo sapiens</i> (NC_000006.12) vs	Gen <i>CNR1</i>		Region ECL2
	Pokrycie	Identyczność	Identyczność
<i>Pan troglodytes</i> (NC_006473.4)	99 %	99 %	99 %
<i>Sus scrofa</i> (NC_010443.5)	56 %	84 %	88 %
<i>Mus musculus</i> (NC_000070.6)	29 %	83 %	92 %
<i>Rattus norvegicus</i> (NC_005104.4)	28 %	83 %	92 %
<i>Canis lupus familiaris</i> (NC_006594.3)	50 %	84 %	92 %
<i>Xenopus tropicalis</i> (NC_030681.1)	4 %	76 %	78 %
<i>Danio rerio</i> (NC_007131.7)	3 %	76 %	72 %

Źródło: opracowanie własne z użyciem Blast oraz M7 Alignment explorer.

Badania krystalograficzne potwierdziły znaczenie regionu pętli zewnątrzkomórkowej 2 w procesie wiązania ligandu, a w konsekwencji aktywacji receptora CB1. Zauważono też wspólne cechy strukturalne pomiędzy klasami receptorów GPCR. Strukturalne podobieństwa definiują wspólne mechanizmy wiązania ligandów, natomiast zmiany w sekwencji zapewniają swoistość tych wiązań. Analizy tego obszaru sugerują, że ECL2 może ułatwić przejście ligandu do rdzenia TMH lub działać bezpośrednio jako powierzchnia kieszeni wiążącej ligand [8, 11].

N-koniec receptora CB1, biorący udział w biosyntezie i ukierunkowaniu receptora, posiada w swojej strukturze wysoce konserwatywny proksymalny region błony komórkowej (MPR, ang. *membrane proximal region*), który wpływa na zdolność receptorów do wiązania ligandów poprzez dwie reszty cysteinowe, tworzące w tym obszarze dwusiarczek (cysteiny w pozycji C98 i C107). Zasugerowano, że domena ECL2 i N-końcowy region MPR działają razem, wpływając na miejsce wiązania ortosterycznego ligandu. Wysunięto także przypuszczenia, że N-końcowy region MPR może być obszarem, poprzez który mogą działać również modulatory allosteryczne [12].

Org27569, jako proponowany modulator allosteryczny CB1

Ze względu na cechy strukturalne, dotychczas opisane modulatory allosteryczne receptora CB1 można sklasyfikować jako: pochodne indolu (Org27569; Org29647; Org27759), pochodne mocznika (PSNCBAM-1), związki działające jako endogenne ligandy (lipoksyna

A4, pregnenolon) i inne związki, takie jak syntetyczne kannabinoidy: JHW007, syntetyczny kannabidiol czy też RTI-371 (pochodna fenylotopanu) [7].

Pierwsze doniesienie na temat zidentyfikowania miejsca allosterycznego receptora CB1 pojawiło się w 2005 roku. Na podstawie badań przeprowadzonych przez firmę *Organon Research* określono trzy modulatory allosteryczne receptora CB1 (Org27569; Org29647; Org27759) będące pochodnymi indolu (heterocyklicznego związku chemicznego), z których Org27569 został poznany najlepiej. Początkowo uważano, że Indol Org27569 wykazuje cechy pozytywnego modulatora allosterycznego (PAM), wzmacniając wiązanie agonisty, jednak kolejne badania wykazały, że Org27569 funkcjonuje jako negatywny modulator allosteryczny (NAM) osłabiający wiązanie agonisty. Tak kontrowersyjne doniesienia doprowadziły do badań farmakologicznych pokazujących, że jego allosteryczne działanie w stosunku do receptora CB1 jest zależne od czasu i szlaków sygnałowych komórki, co sugeruje bardziej złożony proces niż początkowo przypuszczano. Org27569 pozostaje do tej pory najlepiej scharakteryzowanym modulatorem allosterycznym receptora CB1.

Badania zależności „struktura-aktywność” modulatora Org27569 zostały przeprowadzone przez różne grupy badawcze na całym świecie. Ahn i wsp. wykazali, że interakcje allosterycznego ligandu Org27569 z regionem ECL2, a dokładniej fenyloalaniną w pozycji 268 (F268) (Rys.1) osłabiają działanie syntetycznych kannabinoidów [13]. Z kolei grupa Marcu pokazała, iż interakcja pomiędzy domenami TMH3 i TMH6 w mikrodomenie TMH3-4-5-6 mysiego receptora CB1 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu jego stanu nieaktywnego (Rys.1.). Zerwanie interakcji TMH3-6 powoduje swoiste „włączenie” białka receptorowego, a następnie transdukcję sygnału (Rys. 1.). Związanie modulatora Org27569 powoduje zahamowanie tego zjawiska, uniemożliwiając tym samym przekazywanie sygnału [10].

Scott i współpracownicy pokazali, że istotna jest także interakcja elektrostatyczna pomiędzy pierścieniowym azotem piperydyny i lizyną w pozycji 192 (K192). W tym miejscu allosterycznym Org27569, jako odwrotny agonista, promuje pośrednią konformację receptora CB1, wykazując swoją zdolność do zwiększania równowagi wiązania ligandu ortosterycznego CP55,940 (syntetycznego kannabinoidu o działaniu zbliżonym do tetrahydrokannabinolu). Org27569 zwiększa powinowactwo CP55,940 przy jednoczesnym zmniejszeniu jego skuteczności [11]. Może również regulować aktywność CP55,940 poprzez blokowanie ruchu pętli ECL2 i hamowanie ruchu domeny TMH6, które są istotne dla aktywacji receptora. Org27569 może ponadto blokować kluczowe oddziaływanie elektrostatyczne między resztą kwasu asparaginowego – D176 i resztą lizyny – K373, co wzmacnia przekazywanie sygnału

za pośrednictwem białka G. Blokując to oddziaływanie, Org27569 wpływa na obniżoną transdukcję sygnału (Rys. 1.) [1].

Inne znane modulatory allosteryczne CB1

W 2007 roku pojawiły się pierwsze doniesienia dotyczące związku chemicznego, będącego pochodną mocznika (PSNCBAM-1), jako potencjalnego modulatora allosterycznego receptora CB1. Wykazano, że związek ten posiada bardzo podobny profil farmakologiczny do Org27569. Zarówno PSNCBAM-1 jak i Org27569 zwiększają wiązanie agonistów receptora CB1, przy jednoczesnym hamowaniu ich odpowiedzi funkcjonalnej. W badaniu *in vivo* wykazano, że PSNCBAM-1 zmniejsza spożycie pokarmu i wagę ciała u szczurów, co sugeruje udział tego allosterycznego ligandu w kontroli aktywności receptora CB1. Jest to pierwszy raport dotyczący farmakologicznie czynnego modulatora allosterycznego CB1, dzięki któremu, w przyszłości możliwa wydaje się farmakoterapia otyłości [14]. Ostatnie lata pokazują duże zainteresowanie PSNCBAM-1 oraz jego analogami. Badania zależności „struktura-aktywność” dowodzą, że odpowiednie podstawienia w strukturze związku mogą decydować o aktywności i wydajności modulatora względem receptora CB1 [4, 15, 16].

W polu badań pojawiły się także cząsteczki występujące endogennie, które wykazują allosteryczne właściwości względem receptora CB1. Jednym z endogennych związków o takim działaniu może być lipoksyna A4 – utleniona pochodna kwasu arachidonowego. Substancja ta działa jako mediator przeciwzapalny i bierze udział w regulacji układu odpornościowego, jednak jej aktywność związana z OUN nie została dotąd precyzyjnie poznana. Uważa się, że lipoksyna działa jako pozytywny modulator allosteryczny (PAM) CB1, wzmacniając wiązanie oraz aktywność anandamidu i [3H]-CP-55940 (syntetyczny kanabinoid). Potwierdzono również terapeutyczne zastosowanie lipoksyny A4 jako allosterycznego wzmacniacza aktywności receptora CB1 w modelu *in vivo* zaburzeń pamięci przestrzennej indukowanych przez β -amyloid. Z kolei inne grupy badawcze przedstawiły wyniki aktywności lipoksyny A4 jako negatywnego modulatora allosterycznego (NAM) [7, 17].

Innymi związkami, które mogą być zastosowane w modulacji allosterycznej są między innymi: kannabidiol, JHW007 czy RTI-371. Badania pokazują, że kannabidiol (CBD), w obecności Δ^9 -THC- i 2-AG, zachowuje się jak niekompetycyjny negatywny modulator allosteryczny receptorów CB1. Określenie kannabidiolu jako negatywnego modulatora allosterycznego receptora CB1 może posłużyć w opracowaniu selektywnych substancji modulujących wobec receptora CB1 lub kombinacji leków [7, 18]. Navarro i wsp. w swoich badaniach udowodnili, że RTI-371 i inhibitor aktywnego transportera dopaminy (DAT, ang.

dopamine active transporter), wykazujące podobny profil farmakologiczny w badaniach *in vitro* i *in vivo*, są dodatnimi allosterycznymi modulatorami receptora CB1 człowieka. Wykazano również, że ligandy RTI-370, RTI-371 i JHW007 były związkami, które wykazywały szczególnie pozytywne efekty allosteryczne w obecności ligandu ortosterycznego CP55,940 dla receptora CB1 [19, 20]. Jednym z bardziej obiecujących modulatorów allosterycznych CB1 jest niedawno opracowany GAT100 – należący do grupy negatywnych modulatorów allosterycznych, działający w obecności CP55,940. Badania sugerują silniejsze i skuteczniejsze działanie GAT100 w porównaniu z Org27569 i PSNCBAM-1. Aminokwasy zaangażowane w wiązanie modulatora allosterycznego GAT100 to F268, P269, a kluczowa jest cysteina w pozycji C382 [3].

Podsumowanie

Efekty uboczne generowane przez aktywację receptorów CB1 w mózgu ograniczyły zastosowanie ortosterycznych ligandów CB1 jako leków. Jednak, ze względu na fakt pełnienia istotnej funkcji receptora CB1 w różnych procesach fizjologicznych organizmu, jak metabolizm, funkcje poznawcze czy odczuwanie bólu, znalezienie alternatywnych ligandów, możliwość ich modulacji a także określenie nowych miejsc ich wiązania wydają się niezwykle istotne. Ligandy allosteryczne umożliwiają potencjalnie precyzyjną i bezpieczną modulację receptora, tak by w efekcie otrzymać oczekiwany efekt terapeutyczny. Ze względu na korzystną specyfikę działania ligandów allosterycznych jak większa swoistość wiązania, nasycalność i selektywność tkankowa, mogą stanowić one alternatywę dla ortosterycznych ligandów [2]. Modulacja allosteryczna receptora kannabinoidowego CB1 oferuje nowe możliwości zastosowań terapeutycznych. Chociaż pierwszy allosteryczny ligand receptora CB1 – Org27569, został zidentyfikowany już w 2005 roku znaczące zainteresowanie środowiska naukowego wzrosło dopiero kilka lat temu. W ciągu ostatnich czterech lat nastąpił gwałtowny wzrost badań, ukierunkowanych na poznanie mechanizmów allosterycznych receptora CB1. Badania sugerują, iż regulacja funkcji CB1 za pomocą modulatorów allosterycznych, może dawać szansę na opracowanie skutecznej terapii w leczeniu między innymi zaburzeń zachowania, depresji, zapalenia nerwów oraz przewlekłego bólu [2]. Dalsze zrozumienie interakcji wiązania ligand-receptor, istotnej dla zjawiska modulacji allosterycznej, może w przyszłości, umożliwić precyzyjną regulację szlaków sygnałowych receptora CB1 [7]. Opracowanie alternatywnych mechanizmów regulujących odpowiedź receptora na wiązanie konkretnych ligandów wydaje się być obiecującym przedmiotem badań.

Literatura

- [1] Shore D, Baillie G, Hurst D, Navas F, Seltzman H i wsp.: Allosteric modulation of a cannabinoid G protein-coupled receptor: Binding site elucidation and relationship to G protein signaling. *J Biol Chem*. 2014; 289(8): 5828-5854. doi: 10.1074/jbc.M113.478495
- [2] Scott C, Kendall D.: Assessing allosteric modulation of CB 1 at the receptor and cellular Levels. *Methods Enzymol*. 2017; 593: 317-342. doi: 10.1016/bs.mie.2017.05.002
- [3] Laprairie R, Kulkarni A, Kulkarni P, Hurst D, Lynch D i wsp.: Mapping cannabinoid 1 receptor allosteric site(s): critical molecular determinant and signaling profile of GAT100, a novel, potent, and irreversibly binding probe. *ACS Chem Neurosci*. 2016; 7(6): 776–798. doi: 10.1021/acscchemneuro.6b00041
- [4] Bertini S, Chicca A, Gado F, Arena C, Nieri D i wsp.: Novel analogs of PSNCBAM-1 as allosteric modulators of cannabinoid CB1 receptor. *Bioorg Med Chem*. 2017; 25(24): 6427-6434.
- [5] Scott C, Kendall D.: Assessing allosteric modulation of CB 1 at the receptor and cellular levels. *Methods Enzymol*. 2017; 593: 317-342. doi: 10.1016/bs.mie.2017.05.002
- [6] Komorowski J, Stępień H.: Rola układu endokannabinoidowego w regulacji czynności dokrewnej i kontroli równowagi energetycznej człowieka. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007; 61: 99–105.
- [7] Morales P, Goya P, Jagerovic N, Hernandez-Folgado L.: Allosteric modulators of the CB 1 cannabinoid receptor: a structural update review. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016; 1(1): 22–30. doi: 10.1089/can.2015.0005
- [8] Woolley M, Conner A.: Understanding the common themes and diverse roles of the second extracellular loop (ECL2) of the GPCR super-family. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 449: 3–11. doi: 10.1016/j.mce.2016
- [9] Fay J, Dunham T, Farrens D.: Cysteine residues in the human cannabinoid receptor: only C257 and C264 are required for a functional receptor, and steric bulk at C386 impairs antagonist SR141716A binding. *Biochemistry*. 2005; 44(24): 8757–8769.
- [10] McAllister S, Hurst D, Barnett-Norris J, Lynch D, Reggio P i wsp.: Structural mimicry in class A G protein-coupled receptor rotamer toggle switches: the importance of the F3.36(201)/W6.48(357) interaction in cannabinoid CB1 receptor activation. *J Biol Chem*. 2004; 279(46): 48024–48037.
- [11] Marcu J, Shore D, Kapur A, Trznadel M, Makriyannis A i wsp.: Novel insights into CB1 cannabinoid receptor signaling: a key interaction identified between the extracellular-3 loop and transmembrane helix 2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013; 345(2): 189–197. doi:

10.1124/jpet.112.201046

- [12] Fay J, Farrens D.: The membrane proximal region of the cannabinoid receptor CB1 N-terminus can allosterically modulate ligand affinity. *Biochemistry*. 2013; 52(46): 8286–8294. doi: 10.1021/bi400842k
- [13] Ahn K, Bertalovitz A, Mierke D, Kendall D.: Dual role of the second extracellular loop of the cannabinoid receptor 1: ligand binding and receptor localization. *Mol Pharmacol*. 2009; 76(4): 833–842. doi: 10.1124/mol.109.057356
- [14] Horswill J, Bali U, Shaaban S, Keily J, Jeevaratnam P i wsp.: PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(5): 805–814.
- [15] German N, Decker A, Gilmour B, Gay E, Wiley J i wsp.: Diarylureas as allosteric modulators of the cannabinoid CB1 receptor: structure-activity relationship studies on 1-(4-chlorophenyl)-3-{3-[6-(pyrrolidin-1-yl)pyridin-2-yl]phenyl}urea (PSNCBAM-1). *J Med Chem*. 2014; 57(18): 7758–7769. doi: 10.1021/jm501042u.
- [16] Kulkarni P, Kulkarni A, Korde A, Tichkule R, Laprairie R i wsp.: Novel electrophilic and photoaffinity covalent probes for mapping the cannabinoid 1 receptor allosteric site(s). *J Med Chem*. 2016; 59(1): 44–60. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01303.
- [17] Straiker A, Mitjavila J, Yin D, Gibson A, Mackie K.: Aiming for allosterism: Evaluation of allosteric modulators of CB1 in a neuronal model. *Pharmacol Res*. 2015; 99: 370–376. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.017.
- [18] Laprairie R, Bagher A, Kelly M, Denovan-Wright E.: Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(20): 4790–4805. doi: 10.1111/bph.13250
- [19] Fernández-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S, Ramos J. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; 66(2-3): 257–267.
- [20] Navarro H, Howard J, Pollard G, Carroll F.: Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB) receptor by RTI-371, a selective inhibitor of the dopamine transporter. *Br J Pharmacol*. 2009; 156(7): 1178–1184. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00124.x

BIAŁKA SAMOISTNIE NIEUPORZĄDKOWANE

Kinga Stopa⁽¹⁾

⁽¹⁾Zakład Biochemii Ogólnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

kinga.stopa@student.uj.edu.pl

Streszczenie

Białka samoistnie nieuporządkowane (ang. intrinsically disordered proteins – IDPs) stanowią grupę białek, które zostały stosunkowo niedawno odkryte. Białka te podważają słuszność paradygmatu, iż stabilna struktura trzeciorzędowa białka określa jego biologiczną funkcję. Wyjątkowość IDPs polega na tym, że w warunkach uznawanych za natywne, nie posiadają stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, co jednak nie jest równoznaczne z brakiem biologicznie istotnych funkcji pełnionych przez te białka. Z badań bioinformatycznych wynika, że aż 25-30% białek eukariotycznych może być uznane za nieuporządkowane, a ponad 50% białek posiada długie nieuporządkowane rejony, przykładem jest tak zwany „strażnik genomu” – białko supresorowe p53, α -synukleina oraz ludzkie białko supresorowe BRCA1. IDPs sprawnie odbierają i przekazują sygnał, ponieważ dzięki swojej plastyczności i możliwości licznych modyfikacji potranslacyjnych, oddziałują z wieloma partnerami z wysoką specyficznością. Nie jest więc zaskoczeniem, że uczestniczą w wielorakich ścieżkach przekazu sygnału oraz mechanizmach regulacyjnych. Obecnie naukowcy z całego świata dążą do identyfikacji kolejnych białek z grupy IDPs w celu lepszego poznania ich natury oraz zbadania ich związku z różnymi chorobami, co może w przyszłości skutkować produkcją nowych leków.

Wprowadzenie

Białka, biopolimery zbudowane z reszt aminokwasowych, są podstawową grupą molekuł budujących wszystkie poznane dotychczas organizmy. Przez lata naukowcy skupiali się na poznaniu natury oddziaływań białek z ich substratami. Świat nauki został na długi czas zdominowany przez założenie, iż stabilna struktura trzeciorzędowa białka określa jego biologiczną funkcję. Pod koniec lat 90, cztery grupy badawcze wykazały odstępstwa od przyjmowanego dotychczas paradygmatu strukturalno-funkcjonalnego, wyodrębniając nową grupę białek, które w warunkach uznawanych za natywne nie przyjmują stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej i pomimo to pełnią istotne biologicznie funkcje [1]. Białka

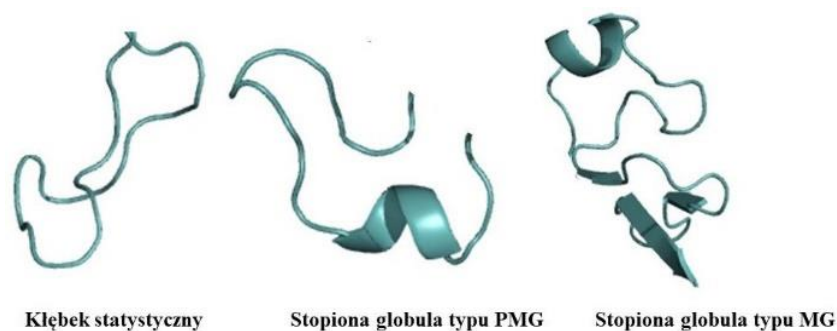
te nazwano samoistnie nieuporządkowanymi (ang. intrinsically disordered proteins, IDPs).

W nieuporządkowaniu białek upatruje się korzyści, ponieważ po pierwsze wiążą one swoje ligandy z wysoką specyficznością, ale niskim powinowactwem, a po drugie ich dynamika konformacyjna umożliwia oddziaływanie z szeregiem różnych molekuł (RNA, DNA, białka). Wyżej wspomniane cechy determinują rolę jaką IDPs odgrywają w kluczowych procesach takich jak: sygnalizacja komórkowa, kontrola cyklu komórkowego, regulacja i molekularne rozpoznanie [2, 3]. Do grupy IDPs zalicza się białka, takie jak: p53, BRCA1, białko tau [4].

Oczywiście lista na wspomnianych powyżej białkach się nie kończy, ponieważ stan nieuporządkowania nie jest zjawiskiem rzadkim, z analiz bioinformatycznych wynika, iż nawet 30% białek eukariotycznych jest nieuporządkowana, a ponad 70% białek zaangażowanych w sygnalizację posiada długie nieuporządkowane regiony (intrinsically disordered regions, IDRs) [5]. Analiza 31 genomów wykazała, iż nieuporządkowanie jest częstsze w eukariotycznych białkach niż tych pochodzących od Prokariota czy Archea, co sugeruje, iż ilość IDPs wzrasta wraz ze złożonością organizmów [6].

Charakterystyka białek samoistnie nieuporządkowanych

Właściwości białek należących do grupy IDPs znacznie różnią się od cech, które wykazują ustrukturyzowane białka globularne. Przede wszystkim, charakteryzują się większą dynamiką konformacyjną, co jest efektem zwiększonej swobody rotacyjnej cząsteczki oraz występowaniem fluktuacji atomów łańcucha polipeptydowego. W wyniku tych zjawisk, białko w warunkach uznawanych za natywne znajduje się w postaci dynamicznej grupy konformerów, które w sposób niekooperatywny zmieniają swoje konformacje [7]. Interesujące jest to, iż IDPs pełnią swoje biologiczne funkcje w stanach, w których białka globularne uznawane są za niefunkcjonalne. Wyróżniono trzy takie klasy stanów konformacyjnej organizacji struktury przestrzennej możliwe do przyjęcia przez IDPs, są nimi: kłębek statystyczny, stopiona globula typu PMG (ang. pre-molten globule) oraz stopiona globula typu MG (ang. molten globule) [6]. Pierwszy z nich jest podobny do stanu zdenaturowanego białka globularnego, nie zawiera struktur drugorzędowych i charakteryzuje się luźnym upakowaniem łańcucha polipeptydowego. Kolejny termin – stan stopionej globuli został wprowadzony przez Ptitsyn'a w celu zaznaczenia „płynności” częściowo sfałdowanych struktur białek nieuporządkowanych [6]. Białka przyjmujące konformację stopionej globuli typu PMG posiadają małą ilość struktur drugorzędowych, są bardziej upakowane niż kłębki statystyczne, jednak wciąż mniej niż obserwowane jest to w konformacji stopionej globuli typu MG [7].

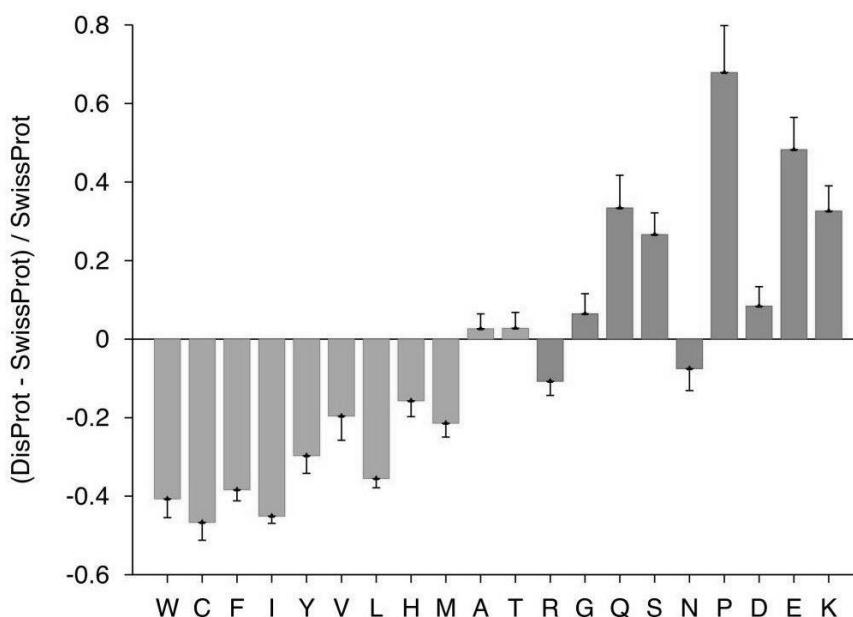


Rysunek 1. Klasy stanów konformacyjnej organizacji struktury przestrzennej białek IDPs

Źródło: opracowanie własne wykonane w programie PYMOL

Cechy wyróżniające strukturę pierwszorzędową IDPs

Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych z bazy danych DisProt (baza białek nieuporządkowanych) z bazą SwissProt wykazała znaczące różnice pomiędzy sekwencjami pierwszorzędowymi białek nieuporządkowanych i uporządkowanych. Naukowcy opierając się na wiedzy, iż struktura pierwszorzędowa białek niesie informacje o ich strukturze trzeciorzędowej wykazali, że białka samoistnie nieuporządkowane bogate są w rejony zbudowane z reszt aminokwasowych promujących nieuporządkowanie, takich jak: A, T, G, Q, S, P, D, E, K. Są to w większości polarne, kwaśne i zasadowe reszty, które wprowadzają do białka nieskompensowane ładunki, promując rozluźnienie ich struktury. Nie jest zadziwiającym również fakt, iż wśród tych aminokwasów znajduje się prolina, tak zwany „łamacz helisy”, a mało jest reszt hydrofobowych oraz aromatycznych, które w białkach globularnych są istotne w procesie fałdowania.



Rysunek 2. Porównanie składu aminokwasowego pomiędzy uporządkowanymi białkami (baza SwissProt), a nieuporządkowanymi (baza DisProt). Ujemne wartości świadczą, iż białka nieuporządkowane posiadają mniej danych reszt aminokwasowych niż uporządkowane; dodatnie wartości, iż więcej niż w przypadku białek uporządkowanych

Źródło: Analiza wykonana przez program Composition Profiler (<http://www.cprofiler.org>). Zaczepnięto i zmodyfikowano [8]

Metody badania IDPs

Pod koniec lat 90. cztery grupy badawcze niezależnie doszły do jednakowego wniosku o istnieniu dużej grupy białek, które podważają słusność paradygmatu strukturalno-funkcjonalnego [1, 6, 9, 10]. Co ciekawe, ten jeden wniosek został wysunięty na podstawie użycia różnych metod badawczych, do których zaliczyć można zarówno podejście bioinformatyczne jak i eksperymentalne.

- **Metody bioinformatyczne**

Różnice pomiędzy sekwencją reszt aminokwasowych białek globularnych i IDPs pozwoliły na rozwój wielu metod, których funkcją jest przewidywanie nieuporządkowania w białkach. Służyć może temu tworzenie wykresów CH (ang. charge-hydrophathy plot), które oparte są na dwóch zasadach, a mianowicie, że jednoimienne ładunki prowadzą do odpychania, a zwiększona hydrofobowość do fałdowania. Aby odróżnić białka globularne od IDPs konstruuje się wykresy zależności wypadkowego ładunku białka od jego hydrofobowości [11], w tym celu powstało ponad 50 różnych programów komputerowych. Pierwszym takim programem, który opracowany został w 1997 roku, był program PONDR® (ang. predictor of naturally disordered regions) [12]. Przez lata analiz, poznano wiele białek należących do grupy IDPs, stało się więc koniecznością uporządkowanie informacji o nich, w tym celu powstała baza danych DisProt.

- **Metody doświadczalne**

Analiza białek samoistnie nieuporządkowanych nie ogranicza się jedynie do analiz bioinformatycznych, ponieważ IDPs mogą być badane szeregiem różnych fizykochemicznych metod, które pozwalają charakteryzować samoorganizację białek. Obecnie stosowanymi metodami są: analiza rentgenograficzna białek w kryształach (IDRs posiadają mniejszą gęstość optyczną, niemożliwa więc jest ich krystalizacja, co uważa się za dowód nieuporządkowania) [6], wielowymiarowa spektroskopia rezonansu magnetycznego (NMR, umożliwia bezpośredni pomiar dynamiki nieustrukturyzowanych rejonów) [13], dichroizm kołowy bliskiego i dalekiego ultrafioletu (CD, pozwala na scharakteryzowanie typu konformacji IDPs) [6] spektroskopia Ramana (bada zawartość struktur drugorzędowych) [14], techniki

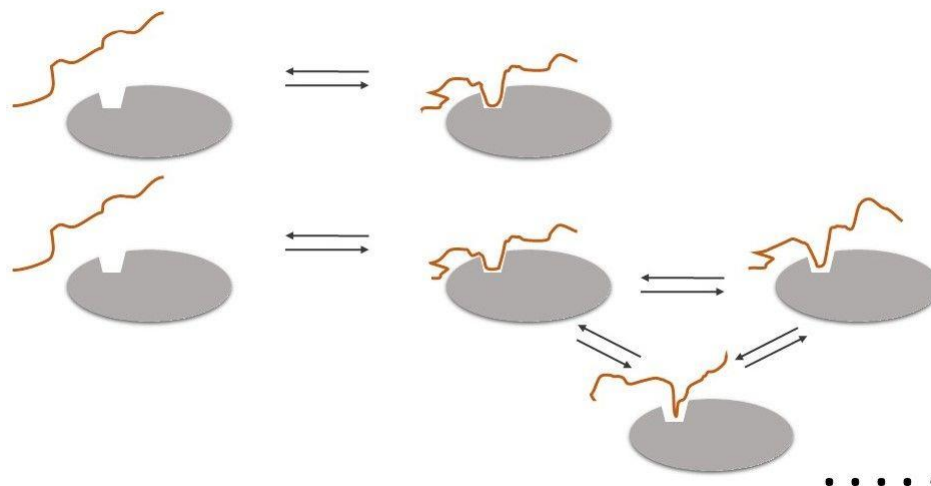
fluorescencyjne [15] i wiele innych.

Dodatkowo, skład reszt aminokwasowych wpływa na odmienne zachowanie IDPs w warunkach denaturujących w porównaniu do białek globularnych. Wiążą one mniej SDS, dlatego podczas elektroforezy SDS-PAGE zachowują się jak białka o większej masie molekularnej (w żelu będą poruszały się wolniej) w stosunku do mas oznaczonych używając spektrometrii mas [15]. Co więcej, białka te nie będą wrażliwe na wysokie temperatury, kwasy (kwas trichlorooctowy), denaturanty (mocznik, chlorowodorek guanidyny). Wykazują natomiast większą podatność na trawienie proteolityczne, czego powodem jest ich rozluźniona struktura, która umożliwia łatwiejszy dostęp proteazom do łańcucha polipeptydowego.

Oddziaływania

Zanim odkryto nieuporządkowanie w białkach, modelem oddziaływania, który dominował był model „zamka i klucza” odnoszący się do wiązania liganda do enzymu zaproponowany w 1894 przez Emila Fischer’a [16]. Obecnie wiadomo, iż IDPs z powodu wysokiej swobody rotacyjnej i dynamiczności swej struktury, oddziałują z innymi białkami bardzo specyficznym, ale z niskim powinowactwem, co umożliwia szybkie i odwracalne interakcje z wieloma molekułami, a to niewątpliwie zalicza się do zalet IDPs [15]. Interesujące jest zachowanie miejsca wiązania nieuporządkowanego liganda podczas oddziaływania (tworzenie kompleksu), otóż możliwe są dwie przeciwstawne opcje:

1. Pod wpływem oddziaływania z receptorem, nieuporządkowane miejsce wiązania porządkuje się, jest to tak zwane indukowane dopasowanie. Przykładem może być model dwóch klas miejsc wiążących (ang. simple two-state binding), gdzie zarówno ligand jak i receptor posiadają jedno miejsce wiązania, a ligand może występować jedynie w formie związanej lub wolnej. Podczas takiego oddziaływania dochodzi do strukturyzacji fragmentu/fragmentów łańcucha polipeptydowego, które są nazywane elementami molekularnego rozpoznawania (ang. Molecular recognition features, MoRFs) [17, 18].
2. Nieuporządkowane miejsce wraz z makromolekularnym receptorem tworzą kompleks rozmyty (ang. fuzzy binding), w którym to niemożliwe jest wyróżnienie stanu liganda wolnego bądź związanego, ponieważ tworzony kompleks jest dynamiczny, a ligand ulega ciągłym zmianom konformacyjnym [19].



Rysunek 1. Możliwe mechanizmy wiązania nieuporządkowanego liganda (pomarańczowa krzywa) z makromolekularnym receptorem (szary owal). Pierwszy schemat odpowiada modelowi dwóch klas wiążących, ligand może być związany lub wolny, nie występują stany przejściowe, drugi schemat przedstawia tworzenie kompleksu rozmytego, obie molekuly mają szereg różnych miejsc wiązania, więc gdy dojdzie do przerwania jednej interakcji, zajdzie kolejna, ponieważ lokalne stężenia miejsc wiązania liganda i receptora są wysokie

Źródło: opracowanie własne na podstawie [19]

Funkcje IDPs w kontekście sygnalizacji komórkowej

Wysoce specyficzne i o niskim powinowactwie interakcje IDPs z innymi molekułami oraz dynamika konformacyjna tych białek, rozszerza grono potencjalnych ligandów, z którymi IDPs mogą oddziaływać, co daje im niejako przewagę nad białkami globularnymi w kontekście liczby pełnionych funkcji w komórkach. Białka te mogą pełnić funkcję tak zwanych białek węzłowych (ang. hub proteins), uczestniczących w oddziaływaniach wewnątrz ścieżek przekazu sygnału. Pionierzy w badaniach nad białkami samoistnie nieuporządkowanymi, to jest: Uversky oraz Dunkier zbadali białka węzłowe o znanej strukturze, a następnie pogrupowali je na grupy trzy białek: całkowicie nieuporządkowane, zawierające rejony zarówno nieuporządkowane jak uporządkowane oraz białka wysoce uporządkowane, których przykładem jest jedynie 14-3-3 oraz kalmodulina [20, 21]. Miejsce wiązania liganda tych białek najczęściej mieściło się w rejonie nieuporządkowanym, miało to miejsce nawet w przypadku 14-3-3 oraz kalmoduliny.

Podrodziną białek węzłowych, która zasługuje na szczególne zainteresowanie, są białka rusztowania (ang. scaffold proteins), które mają skromniejszą grupę molekuł, z którymi oddziałują, jednak mogą prowadzić z nimi interakcje w tym samym czasie. Ich funkcją jest specyficzne kompleksowanie odpowiednich białek i promowanie lub modulowanie

konkretnych interakcji pomiędzy nimi, przykładem może być regulacja czasowa i przestrzenna aktywności enzymatycznej kinaz i fosfataz [7].

Chaos będący pod kontrolą

Badaczy zdumiewa uniwersalność białek samoistnie nieuporządkowanych, ale również zastanawia w jaki sposób tak wiele funkcji IDPs może być wydajnie regulowanych na poziomie komórkowym.

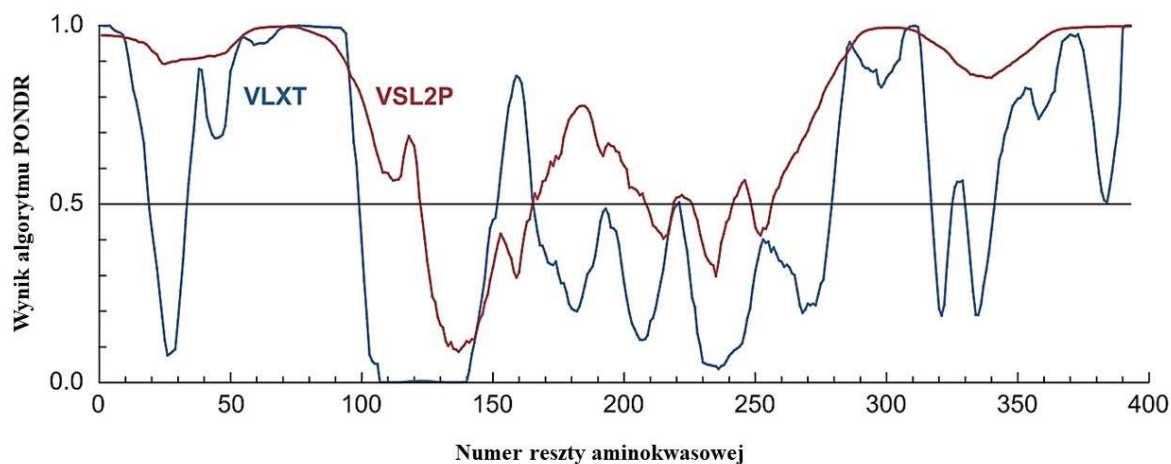
Przede wszystkim IDPs mogą być regulowane na drodze modyfikacji potranslacyjnych (ang. post-translational modifications, PTM), ponieważ ze względu na swoją rozluźnioną strukturę, enzymy wprowadzające modyfikacje mają lepszy dostęp do łańcucha polipeptydowego niż w przypadku białek globularnych [22]. PTM regulują właściwości chemiczne reszt aminokwasowych, co prowadzi do zmian strukturalnych tych białek, a to z kolei może zmieniać stabilność IDPs (czas półtrwania) bądź wpływać na ich interakcje z innymi molekułami (regulacja funkcji) [23]. Przykładem takiej modyfikacji może być ubikwitynacja, która przeznaczona białka niepoprawnie sfałdowane do degradacji w proteasomie lub degradacja zależna od obecności sekwencji bogatych w PEST (regiony o wysokiej zawartości proliny – P, kwasu glutaminowego – E, seryny – S, treoniny – T) [24].

Dodatkowo łańcuchy polipeptydowe IDPs są wolniej syntetyzowane, a ich transkrypty szybciej degradowane [7], czego skutkiem jest mniejsza ilość białek samoistnie nieuporządkowanych w stosunku do białek globularnych.

Przykłady białek IDPs

Przykładem białka nieuporządkowanego jest białko p53, tak zwany „strażnik genomu” będący białkiem supresorowym, czynnikiem transkrypcyjnym który uczestniczy w regulacji progresji cyklu komórkowego, indukcji apoptozy, naprawy DNA oraz odpowiedzi na stres komórkowy [4]. Wykazano, iż w wielu nowotworach, takich jak: nowotwór jelita, mózgu, piersi, wątroby czy też płuc obserwuje się zmutowaną postać tego białka [4].

P53 zbudowane jest z domeny transaktywacyjnej (N-koniec), domeny regulatorowej (C-koniec) oraz domeny wiążącej DNA. Z analizy przewidującej nieuporządkowanie w programie PONDR, wynika, iż C i N- koniec są nieuporządkowane, a domena wiążąca DNA charakteryzuje się uporządkowaniem. To właśnie w nieuporządkowanym rejonie C i N-końcowym dochodzi do największej ilości oddziaływań (ok. 70 %), te rejony są też najczęściej modyfikowane potranslacyjnie (głównie jest to acetylacja oraz fosforylacja), co moduluje funkcje omawianego białka [4, 19].



Rysunek 4. Wykres ilustrujący przewidywanie stopnia nieuporządkowania białka p53 (użyte algorytmy PONDR: VLXT, VSL2P). Wartości powyżej 0,5 świadczą o nieuporządkowaniu, natomiast mniejsze niż 0,5 o uporządkowaniu.

Źródło: Zaczerpnięto i zmodyfikowano (Uversky i in., 2008) [4].

Kolejnym przykładem jest białko BRCA-1, które tak jak wspomniany powyżej p53 jest superesorem, zbudowanym zarówno z regionów uporządkowanych (w tym przypadku jest to domena N i C-końcowa) oraz nieuporządkowanych (we wnętrzu łańcucha polipeptydowego) [4]. BRCA-1 uczestniczy w przekazie sygnału, to jest: w naprawie DNA, transkrypcji i regulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego, supresji nowotworowej, odpowiedzi na stres oraz w apoptozie [26].

Wspomniane powyżej białka potwierdzają, iż IDPs pełnią szereg ważnych funkcji w komórkach poprzez interakcje z wieloma partnerami, w które najczęściej zaangażowane są rejony nieuporządkowane.

IDPs potencjalnym celem dla leków

Wyróżnia się wiele stanów patologicznych, które dotyczą nieprawidłowego zwijania się białek bądź rejonów należących do nieuporządkowanych. Wyróżnić tu można chorobę Parkinsona (niepoprawne fałdowanie α -synukleiny), Alzheimerera (białko Tau), Płasawicę Huntingtona (huntingtyna) czy też procesy nowotworowe (p53, BRCA-1). Obecnie uważa się, iż wspomniane białka są potencjalnymi celami dla leków, które mogą modulować oddziaływanie białko-białko lub zapewniać prawidłowy przekaz sygnału przez IDPs [4]. Niestety projektowanie leków, których celem mają być białka samoistnie nieuporządkowane

nie jest zadaniem łatwym i wymaga modyfikacji istniejących technik projektowania leków z powodu unikalnych właściwości IDPs [4].

Podsumowanie

Białka samoistnie nieuporządkowane stanowią ważną i liczną grupę białek, których prawdziwy potencjał nie został jeszcze w pełni doceniony [5]. IDPs są zaangażowane w rozpoznanie, regulację oraz sygnalizację komórkową [2, 3]. Są wyjątkowo czułe na wszelkie zmiany w ich mikrośrodowisku, a ich mutacje mogą zaburzać ich naturalne funkcje, co prowadzi do błędnego przekazu sygnału bądź zmian w ich strukturze. Wykazano związek pomiędzy IDPs, a wieloma chorobami neurodegeneracyjnymi oraz nowotworowymi i uważa się, że białka te mogą stanowić nowy cel dla leków, co obecnie jest badane [4].

Literatura

- [1] Wright P. E., Dyson H. J.: Intrinsically Unstructured Proteins : Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm, *J Mol Biol.* 1999 Oct 22. doi: 10.1006/jmbi.1999.3110.
- [2] Dunker A. K., Brown C. J., Lawson J. D., Iakoucheva L. M., Obradovic Z.: Intrinsic Disorder and Protein Function, *Biochemistry.* 2002 May 28, doi: 10.1021/bi012159.
- [3] Radivojac P., Iakoucheva L. M., Oldfield C. J., Obradovic Z., Uversky V. N., i wsp.: Intrinsic Disorder and Functional Proteomics, *Biophys. J.* 2007 March 1. doi: 10.1529/biophysj.106.094045.
- [4] Uversky V. N., Oldfield C. J., i Dunker A. K.: Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D² Concept, *Annu Rev Biophys.* 2008 June 9. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924.
- [5] Iakoucheva L. M., Brown C. J., Lawson J. D., i Dunker A. K.: Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins, *J Mol Biol.* 2002 Oct 25. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00969-5.
- [6] Dunker A. K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams E.M., Romero P. i wsp.: Intrinsically disordered protein, *J Mol Graph Model.* 2001 Feb. doi: 10.1016/S1093-3263(00)00138-8.
- [7] Uversky V.N., Dunker A.K.: Understanding protein non-folding, *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb 1. doi 10.1016/j.bbapap.2010.01.017.
- [8] Vacic V., Uversky V. N., Dunker A. K., i Lonardi S.: Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences, *BMC Bioinformatics.*

- 2007 Jun 19. doi: 10.1186/1471-2105-8-211.
- [9] Tompa P.: Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion, *BioEssays*. 2003 Sep. doi: 10.1002/bies.10324.
- [10] Uversky V. N., Gillespie J. R., i Fink A. L.: Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?, *Proteins Struct. Funct. Genet*. 2000 Sep 27. doi: 10.1002/1097-0134(20001115)41:33.3.CO;2-Z.
- [11] Huang F., Oldfield C.J., Xue B., Hsu W.L., Meng J. i wsp.: Improving protein order-disorder classification using charge-hydrophathy plots, *BMC Bioinformatics*. 2014 Dec 16. doi: 10.1186/1471-2105-15-S17-S4.
- [12] Romero P., Obradovic Z., Kissinger C., Villafranca J. E., i Dunker A. K.: Identifying Disordered Regions in Proteins from Amino Acid Sequence, *Neural Networks* 1. 1997. doi: 10.1109/ICNN.1997.611643.
- [13] Daughdrill G. W., Pielak G. J., Uversky V. N., Cortese M. S., i Dunker A. K.: Natively Disordered Proteins, 2008 Jan 31. doi: 10.1002/9783527619498.ch41.
- [14] Smyth E., Syme C.D., Blanch E.W., Hecht L., Vasak M. i wsp.: Solution structure of native proteins with irregular folds from Raman optical activity, *Biopolymers*. 2000 Nov 9. doi: 10.1002/1097-0282(200102)58:2.
- [15] Receveur-Bréhot V., Bourhis J. M., Uversky V. N., Canard B., i Longhi S.: Assessing protein disorder and induced folding, *Proteins Struct. Funct. Genet*. 2006 Jan 1. doi: 10.1002/prot.20750 .
- [16] Fischer E.: Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1894 Dec. doi: 10.1002/cber.18940270364.
- [17] Uversky V. N.: Multitude of binding modes attainable by intrinsically disordered proteins: a portrait gallery of disorder-based complexes, *Chem. Soc. Rev*. 2011 Mar. doi: 10.1039/c0cs00057d.
- [18] Vacic V., Oldfield C.J., Mohan A., Radiovojac P., Cortese M.S. i wsp.: Characterization of Molecular Recognition Features, MoRFs, and Their Binding Partners research articles, *J. Proteome Res*. 2007 Jun. doi: 10.1021/pr0701411.
- [19] Olsen J. G., Teilum K., Kragelund B. B.: Behaviour of intrinsically disordered proteins in protein – protein complexes with an emphasis on fuzziness, *Cell. Mol. Life Sci*. 2017 Sep. doi: 10.1007/s00018-017-2560-7.
- [20] Radiovojac P., Vucetic S., O'Connor T.R., Uversky V.N., Obradovic Z. i wsp.: Calmodulin signaling: Analysis and prediction of a disorder-dependent molecular recognition, *Proteins Struct. Funct. Genet*. 2006 May. doi: 10.1002/prot.20873.

- [21] Bustos D. M. i Iglesias A. A.: Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2006 Apr 1. doi: 10.1002/prot.20888.
- [22] Grimm M., Wang Y., Mund T., Cilensek Z., Keidel E.M. i wsp.: Cdk-Inhibitory Activity and Stability of p27Kip1 Are Directly Regulated by Oncogenic Tyrosine Kinases, *Cell.* 2007 Jan 26. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.047.
- [23] Bah A. i Forman-Kay J. D.: Modulation of intrinsically disordered protein function by post-translational modifications, *J. Biol. Chem.* 2016 Mar 25. doi: 10.1074/jbc.R115.695056.
- [24] Rogers S., Wells R., i Rechsteiner M.: Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science.* 1986 Oct 17. doi: 10.1126/science.2876518.
- [25] Deng C. X.: BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution, *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar 6. doi: 10.1093/nar/gkl010.

BADANIE ZAWARTOŚCI JONÓW FLUORKOWYCH W WYBRANYCH PASTACH DO ZĘBÓW I PŁYNACH DO PŁUKANIA JAMY USTNEJ

Daria Ślefarska⁽¹⁾

⁽¹⁾SKN „Kalcyt”, Instytut Chemii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

daria367@op.pl

Wprowadzenie

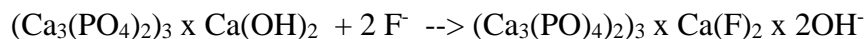
Fluor (F) jako pierwiastek ze względu na swoją znaczną aktywność chemiczną, nie występuje w przyrodzie w stanie wolnym, jednakże tworzy wiele związków chemicznych. Związki fluoru znajdują się w: złożach fosforytów, węgla i ropy naftowej, a także w glebach powulkanicznych. Jak się okazuje znaczne ilości fluoru dostają się do organizmu człowieka wraz z dietą. Spożywamy fluor m.in. z: produktami zbożowymi, orzechami, rybami, ziemniakami, warzywami liściastymi (kapustą), cebulą czy fasolą, a także wraz z herbatą, w której to liściach znajdują się znaczne jego ilości. Zapotrzebowanie na ten pierwiastek jest różne i zależy od wieku, masy ciała oraz płci. W ludzkim organizmie znajduje się ok. 3 mg kg⁻¹ masy ciała fluoru. Największe zapotrzebowanie na fluor mają mężczyźni o masie około 76 kg tj. 3,8 mg, zaś najmniejsze dzieci od 1 do 3 roku życia (masa ciała 13 kg – 0,7 mg). Kobieta o masie ciała 61 kg potrzeba 3,1 mg tego pierwiastka na dobę [1].

Fluor w młodych organizmach jest głównie wbudowywany w strukturę kości (potrzebny jest do ich przebudowy) i zębów. U dzieci aż 80% wprowadzonego do organizmu fluoru zostaje wbudowane w strukturę kości i zębów, wśród młodzieży i dorosłych to około 50%. W 2003 roku Komisja Europejska określiła dopuszczalne ilości fluoru zarówno w wodzie i ekstraktach z liści herbaty. W wodzie jest to 1,5 mg L⁻¹ (woda do spożycia lub gospodarcza), a w napojach herbacianych 1,39 mg L⁻¹. Po dokonaniu analizy diety populacji polskiej okazało się, że spożycie niektórych produktów wraz z zawierającymi je fluorkami może przekraczać bezpieczną dawkę [1, 2].

Aspekt medyczny dotyczący fluoru

Fluor ma szerokie zastosowanie głównie w stomatologii ze względu na doniesienia naukowe o jego przeciwpróchnicznym działaniu. Okazało się, że hydroksyapatyt (kryształ),

będący kluczowym składnikiem zębiny i szkliwa zębów posiada zdolność wymiany grupy OH⁻ na F⁻ (fluoroapatyt – związek słabiej rozpuszczalny w kwasach), przez co wbudowuje się w strukturę szkliwa zębowego według reakcji [5]:



To powoduje zatrzymanie demineralizacji i podwyższenie mineralizacji tkanki zębowej. Fluor ponadto ogranicza wzrost bakterii próchnicotwórczych i ich metabolizm, przez co ryzyko próchnicy znacznie się zmniejsza. Prewencja (zapobieganie) próchnicy wynosi 1 mg F/L [1]. Aby zatem efektywnie zapobiegać próchnicy na początku postanowiono przeprowadzić fluoryzację wody w Europie (około 1950 r.) jednak prostszym sposobem okazała się inna metoda, a mianowicie metoda kontaktowa (wprowadzona na początku lat 50 XX w.), jaką jest mycie zębów pastą wzbogaconą w aktywne związki fluoru. Zaprzeszono fluoryzację wody pitnej, ponieważ zbyt wysoka ilość jonów fluorkowych kumulowałyby się w ludzkim organizmie wraz z piciem takiej wody, głównie w kościach (u dzieci około 50%, a u dorosłych 10%). Unia Europejska (UE) wydała uchwałę zgodnie, z którą woda fluorkowa należy do produktów leczniczych i nie ma zezwolenia na wzbogacanie tej wody powyższymi jonami.

Najczęściej w pastach znajdują się takie związki jak: fluorek sodu – NaF, monofluorofosforan sodu – Na₂PFO₃ (SMFP), fluorek cyny – SnF₂ oraz aminofluorek - AmF. Producenci korzystają też z łączenia dwóch substancji aktywnych np. NaF z SMFP czy AmF z SnF₂. Jak widać mogą to być zarówno nieorganiczne jak i organiczne związki fluoru, występujące pojedynczo lub w połączeniu. Biodostępność (określa jak część składnika aktywnego znajdującego się w substancji leczniczej dostanie się do krążenia ogólnego oraz definiuje szybkość wchłaniania danej substancji) fluoru zależy zarówno od składu pasty jak i od interakcji jego związków z ludzką śliną. Największą biodostępnością w interakcji ze śliną wykazują pasty z fluorkiem sodu. Jeszcze lepiej wchłaniającym się zestawieniem okazało się połączenie NaF z SMFP. Ważnym kryterium przyswajania fluoru w organizmie jest też czas jego retencji. Długie i dokładne przepłukiwanie jamy ustnej wodą po zastosowaniu pasty czy innych preparatów z F⁻ osłabia ich oddziaływanie ze szkliwem, ponieważ pozostawione w jamie ustnej jony nie są wchłaniane lecz usuwane. Nie są to jednak jedyne związki jakie mogą być dodawane do produktów jamy ustnej. Innymi znanymi substancjami są triklosan (bifenol, związek niejonowy, rozpuszczalny w tłuszczach, o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbakteryjnym) oraz chlorheksydyna (organiczny związek o wzorze: C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀,

trudno rozpuszczający się w wodzie, działa na bakterie gram dodatnie jak i gram ujemne, a także na niektóre wirusy i grzyby), a również nierzadko zioła (preparaty zawierające ekstrakty roślinne stosowane w leczeniu chorób przyzębia np. jeżówka, rumianek, szalwia, ratania, rozmaryn i mirra) [5].

Obecnie korzystamy nie tylko z takich past, ale również z płynów do płukania jamy ustnej, żeli, lakierów, nici dentystycznych, a nawet wykałaczek oraz materiałów do wypełnień, które pobudzają wydzielanie jonów fluorkowych. Fluor, jako pierwiastek jest również niezbędny w prawidłowym procesie budowania tkanki kostnej (indukuje przyrost masy kostnej poprzez podwyższanie proliferacji osteoblastów, a obniżając aktywność osteoklastów), w leczeniu osteoporozy (jony fluorkowe znacznie poprawiają bilans wapniowy). Może być również zaskakujące, że leczenie niewielkimi dawkami F^- zmniejsza ryzyko złamań trzonów kręgow. Przeciwdziała zmianom miażdżycowym w aorcie i naczyniach tętniczych. Stosuje się go również w leczeniu nowotworów (fluorouracyl) i zakażeń układu moczowego (fluorochinoliny) [1-6].

Toksyczność fluoru

Dawka toksyczna wynosi > 20 mg F/dobę [1]. Zapotrzebowanie na jony fluorkowe u osób dorosłych wynosi 2 – 3 mg, a dzieci 1 – 2 mg dziennie. Większe dawki nie są akceptowane i po ich przekroczeniu jony są kumulowane w organizmie [2].

Różnica między dawką fluoru, która korzystnie wpływa na metabolizm i tą, która powoduje jego zaburzenia jest bardzo niewielka. Światowa Organizacja Zdrowia zaleca, aby nie przekraczać 3,5 mg fluoru dziennie [4]. Jony F^- łatwo przenikają przez błony komórkowe, penetrując tkanki miękkie narządów i tkanki twarde, a w konsekwencji kumuluje się w organizmie. Dzieje się tak poprzez biochemiczno – fizyczne właściwości tych jonów. Toksyczność fluoru zależy od dawki i czasu w jakim jesteśmy narażeni na jego wpływ. Zbyt dużo fluoru w diecie lub w środowisku (zanieczyszczenia związkami fluoru), może powodować: fluorozę zębów (zęby ciemnieją, pojawiają się na nich białe plamki, a w konsekwencji pękają) oraz szkieletu (w tym nieprawidłowa mineralizacja tkanki kostnej – ten aspekt został omówiony w podrozdziale, o aspektach medycznych dotyczących jonów fluorkowych), kruchość kości, a także brak elastyczności więzadeł. Badania potwierdzają, że na fluorozę cierpi aż 32% amerykańskich dzieci. Toksyczność fluoru objawia się także zaburzeniem w funkcjonowaniu wątroby (stany zapalne, zmiany martwicze, hamowanie syntezy białek) i nerek (zanik i przerost miąższu, niewydolność), są to dwa narządy najbardziej narażone na szkodliwe działanie fluoru ze względu na wykonywane przez nie funkcje [1].

Ponadto fluor jest neurotoksyczny, powoduje zmiany w mózdzku i korze mózgu, zmniejsza ilości receptorów w mózgu, upośledza zdolność uczenia się i zapamiętywania. Znane są również hipotezy, że nadmiar fluoru w organizmie, może prowadzić zwłaszcza u dzieci do obniżenia poziomu inteligencji [1]. Fluor uszkadza narządy rozrodcze, powoduje wzrost liczby poronień, jest toksyczny dla rozwoju płodu i może nawet doprowadzić do bezpłodności. Niewiele osób wie, że wprowadzenie do organizmu nadmiernej ilości jonów fluorkowych może doprowadzić do hiperglikemii fluorkowej, co objawia się zaburzeniem wydzielania hormonów tarczycy i zahamowaniem wydzielania insuliny przez komórki β trzustki [1]. Kolejnym istotnym faktem dotyczącym toksyczności jonów fluorkowych jest fakt, że jego nadmierna ilość w organizmie może powodować stres oksydacyjny poprzez generowanie wolnych rodników, a także obniżanie wydajności enzymatycznej całego układu antyoksydacyjnego. Fluor powodując podwyższenie zachodzących procesów wolnorodnikowych jako prooksydant może prowadzić do uszkodzeń lipidów, białek i DNA zarówno w wątrobie, nerkach, krwi, a nawet mózgu. Zaburza działanie NHE, czyli wymiennicza sodowo – protonowego, będącego białkiem transbłonowym odpowiedzialnym za transport jonów oraz niektórych metabolitów przez błony komórkowe organizmu. Bardzo niekorzystne jest łączenie kofeiny z fluorem zawartym m.in. w napojach energetycznych, bo prowadzi to do kumulacji fluoru w kościach, a zmniejszenia jego zawartości w zębach. Osoba narażona na toksyczne działanie jonów F^- , która w konsekwencji została narażona na ostre i przewlekłe zakażenie tymi jonami ma zaburzoną gospodarkę metaboliczną wapnia (Ca), fosforu (P) i magnezu (Mg). Może być zaskakującym także fakt, że zbyt duża zawartość fluoru w organizmie może doprowadzić do trądziku fluorowego. Jest on wyjątkowo oporny na leczenie i pojawia się najczęściej wokół ust, nosa, brody oraz czoła. Fluor dodawany jest do leków psychotropowych, a jego zadaniem jest „otumanienie” czy potocznie mówiąc „ogłupienie” pacjenta. [1, 3, 7].

Związki fluoru (najczęściej w postaci soli NaF) są powszechnie dodawane do środków higieny jamy ustnej. Kupienie pasty nie zawierającej związków fluoru na polskim rynku stanowi utrudnienie i to jeśli chodzi o sam fakt znalezienia danego produktu w sklepie, a także jeśli chodzi o cenę produktu. Pasty nie zawierające powyższych związków są dość rzadko spotykane, występuje ograniczony wybór, a ceny są przeważnie wygórowane i znacznie odbiegające od cen past standardowych. Więc wybór past przez konsumentów ma też podłoże ekonomiczne.

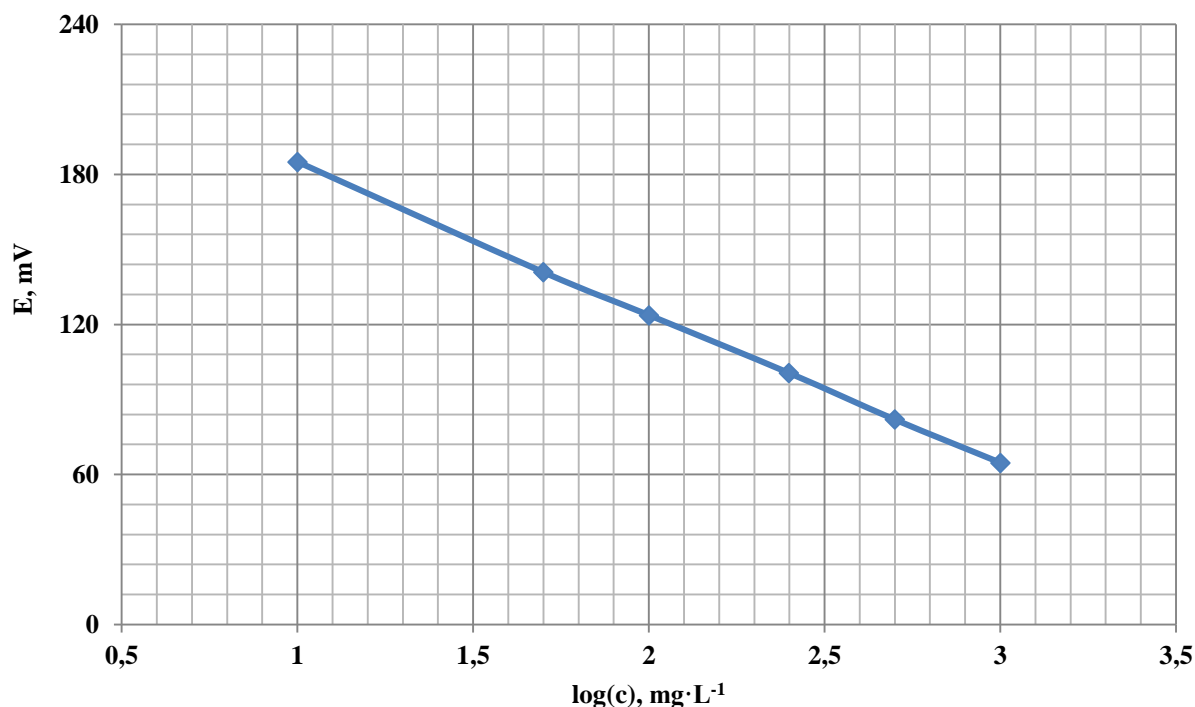
Celem niniejszej pracy było sprawdzenie zawartości NaF w różnych produktach, zwłaszcza tych codziennego użytku, jak pasty do zębów czy płyny do płukania jamy ustnej dostępnych w sprzedaży na polskim rynku, a następnie porównanie otrzymanych wartości

z wartościami podanymi na etykietach przez Producentów. Przed przedstawieniem wyników badań warto zaznaczyć, że w wielu krajach świata, także w Polsce istnieje zalecenie określające, że zawartość jonów fluorkowych w pastach do zębów dla dorosłych nie powinna przekraczać 1500 ppm, a w produktach dla dzieci 600 ppm. Obniżenie dopuszczalnej zawartości fluorków w pastach do zębów dla dzieci wynika z faktu, że dzieci w wieku od 2 do 3 lat, nie opanowały jeszcze prawidłowego postępowania w szczotkowaniu zębów i płukania jamy ustnej i połykają od 59 do 65% używanej przez nich ilości pasty. Przez to wprowadzają do swojego organizmu większą ilość tych jonów, a jednocześnie ich masa ciała jest znacznie niższa niż u dorosłego człowieka. Dlatego też obniżona zawartość tych jonów ochrania je przed niekorzystnym wpływem powyższych jonów na ich organizm [4]. Logicznym jest, iż działanie tych jonów może ulec nasileniu wraz ze wzrostem stężenia w przedziale od 1000 do 2500 ppm w danym produkcie. Jest to jak najbardziej korzystny aspekt ponieważ na każde 500 ppm niebezpieczeństwo nabycia próchnicy spada o 6% [5]. Podstawową drogą wydalania fluorków z organizmu jest wydalanie ich wraz z moczem, kałem lub potem. Z moczem 50%, z kałem od 6 do 10%, zaś z potem od 13 do 23%, reszta to zawartość fluorków skumulowana w tkance kostnej. Cały proces wydalania tych jonów jest procesem wielofazowym. Szczytowym momentem pozbycia się ich z organizmu występuje pod koniec narażenia na ich działanie lub niedługo po jego zakończeniu [2].

Metodyka badań

Przygotowanie roztworów

- 1) Przygotowanie roztworu buforowego (pH 6,0 – w celu stabilizacji siły jonowej roztworów) składającego się z bezwodnego octanu amonu ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), chlorku sodu (NaCl), cytrynianu sodu ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).
- 2) Przygotowanie roztworu podstawowego fluorku sodu o stężeniu 1000 mg L^{-1} . Tak, aby w 1 mL przygotowanego roztworu znajdował się 1 mg jonów fluorkowych.
- 3) Sporządzenie z roztworu podstawowego 6 roztworów wzorcowych o stężeniach odpowiednio 10, 50, 100, 250, 500 i $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ F}^-$ i wykreślenie krzywej zależności potencjału jonów fluorkowych od logarytmu ze stężenia roztworów wzorcowych (Rys. 1).



Rysunek 1. Krzywa wzorcowa zależności $E = f(\log(c))$ otrzymana dla serii roztworów wzorcowych

Źródło: opracowanie własne

- 1) Oznaczanie zawartości jonów fluorkowych w próbkach pięciu płynów do płukania jamy ustnej i pięciu pastach do mycia zębów:
 - a) W przypadku płynów odmierzano 25 mL płynu, a następnie dodano 10 mL roztworu buforowego. W tak przygotowanych roztworach zmierzono zawartość jonów fluorkowych.
 - b) W przypadku past odważano od 0,3 do 0,5 g pasty, które następnie rozpuszczono w 50 mL wody. Do każdej z próbek, analogicznie jak w przypadku płynów, bezpośrednio przed pomiarem dodano po 10 mL buforu.
- 2) Każdy z pomiarów wykonano trzykrotnie, w Tabelach przedstawiono wartości średnie.

Wykorzystywany sprzęt i elektrody

Zawartość jonów fluorkowych oznaczano metodą potencjometryczną, z wykorzystaniem jonoselektywnej elektrody fluorkowej. Badania te miały charakter wstępny. Aby potwierdzić wiarygodność uzyskanych wyników pomiarów analitycznych, należy je w następnej kolejności zweryfikować z wykorzystaniem odpowiedniego materiału odniesienia, bądź z zastosowaniem metody odniesienia.

Do badań wykorzystano Urządzenie Wielofunkcyjne ELMETRON CX – 742. Elektroda odniesienia była elektroda chlorosrebrowa – Ag/AgCl/4M KCl – firmy HYDROMET (Zakład Produkcji Elementów Aparatury Fizykochemicznej). Elektroda wskaźnikową była jonoselektywna elektroda fluorkowa firmy DETEKTOR (**Rys. 2**), która przed pomiarem była kondycjonowana przez 24 h w wodzie destylowanej.

Tabela 1. Charakterystyka elektrody fluorkowej

Parametr	Wartość
Zakres działania	st. od 10^{-1} do 10^{-6} M
pH	5,5 – 6,5
Zakłócenia	jony OH^-
Membrana	monokryształ LaF_3 , roztwór wewnętrzny 0,1M NaF i 0,1M NaCl

Źródło: Opracowanie własne



Rys. 2. Urządzenie wielofunkcyjne CX-742 i zlewka z zestawem elektrod*

*w zlewce: po lewej znajduje elektroda wskaźnikowa, a po prawej elektroda odniesienia

Źródło: opracowanie własne

Wyniki

Dysponując informacjami o zawartości jonów fluorkowych podanymi na etykietach past i płynów oraz wynikami z przeprowadzonego doświadczenia dokonano zestawienia

i porównania tych wartości. W przypadku past do zębów uzyskane wyniki przeliczono na mg na kg, uwzględniając masę odważonej próbki. Wszystkie płyny i cztery z past zawierały w swoim składzie fluorek sodu – NaF, tylko jedna pasta zawierała monofluorofosforan sodu - Na₃PFO₃ (*Producent 3*).

Tabela 2. Otrzymane wyniki dla płynów

Firma	Stężenie podane na etykiecie [mg L⁻¹]	Stężenie zmierzone [mg L⁻¹]	Błąd względny [%]
<i>Producent 1</i>	220	223	1,4%
<i>Producent 2</i>	98	104	6,1%
<i>Producent 3</i>	250	211	- 15,6%
<i>Producent 4</i>	225	234	4,0%
<i>Producent 5</i>	250	257	2,8%

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 3. Otrzymane wyniki dla past

Firma	Zawartość na etykietach [mg kg⁻¹]	Zawartość otrzymana z pomiarów [mg kg⁻¹]	Błąd względny [%]
<i>Producent 1</i>	1440 (0,31% w/w)	1514	5,1%
<i>Producent 2</i>	1450 (0,32% w/w)	1470	1,4%
<i>Producent 3</i>	657 (0,145% w/w)	236	- 64,0%
<i>Producent 4</i>	1450 (0,3152% w/w)	1518	4,7%
<i>Producent 5</i>	1450 (1,1% w/w)*	1588	9,5%

* procent wagowy

Źródło: opracowanie własne

Różnice w wynikach przedstawiono poprzez obliczenie błędu względnego w procentach według poniższego wzoru:

$$\delta = \frac{\Delta x}{x} = \frac{(x_o - x)}{x} * 100\%$$

gdzie:

x – wartość podana na etykiecie

x_o – wartość otrzymana podczas badań

Zawartość jonów fluorków w płynach praktycznie pokrywa się z tymi podanymi na etykietach. Otrzymane wyniki (*Producent 1,2,4,5*) są nieznacznie zawyżone (od 1,4% do 6,1%), w stosunku do tych podanych przez producentów. Tylko w przypadku płynu *Producenta 3* otrzymane stężenie jonów fluorkowych było niższe niż stężenie podawane na etykiecie (błąd względny: - 15,6%), na co mógł mieć wpływ sam etap przygotowania próbek.

W przypadku wyników uzyskanych dla past różnice te są znacznie większe. Najwyższą różnicę otrzymano w przypadku pasty *Producenta 3*, która była aż o 64,0% niższa o tej podanej na etykiecie. Mógł na co mieć wpływ sam etap przygotowania próbek, a również to, że w tym przypadku w paście znajdował się monofluorofosforan sodu, a nie fluorek sodu. Zastosowana przeze mnie metoda pomiarowa dobrze sprawdziła się przy oznaczaniu zawartości NaF w badanych próbkach, jednakże w przypadku monofluorofosforanu sodu, stężenie wolnych jonów F^- jest dużo mniejsze. Wiąże się to w konsekwencji z dużym błędem względnym. Mniejsza różnica, występuje u *Producenta 5* i wynosi 9,5%. Porównywalne wartości otrzymano dla past *Producentów 1 i 4*, gdzie błąd wyniósł 5,1% i 4,7%. Najmniejszy błąd względny otrzymano w przypadku pasty *Producenta 2*, wyniósł on jedyne 1,4%.

W większości przypadków otrzymane wyniki nie odbiegają w sposób znaczący od tych podanych na etykietach. Tylko w niektórych (*Producent 3 i 5 - pasty*) uzyskane wyniki znacznie różnią się od tych podanych na etykietach, ale może mieć na to wpływ sam etap przygotowania próbek do oznaczeń. Jak widać otrzymano wyniki zarówno zaniżone jak i zawyżone, dlatego w kolejnych badaniach należałoby dopracować ten etap, a otrzymane wyniki zweryfikować.

Podsumowanie

Na podstawie niniejszych badań można stwierdzić, że zawartości jonów fluorkowych w wybranych produktach do higieny jamy ustnej nie odbiegają w sposób znaczący od tych podanych na etykietach przez Producentów. Należy ponadto wziąć pod uwagę, że pasty do zębów dostępne na rynku oprócz związków fluoru zawierają przede wszystkim jeszcze substancje ściernie, które stanowią od 25 do 50% składu, substancje pieniące, polerujące, smakowe oraz zagęstniki, środki konserwujące i bakteriostatyczne, a także biologicznie czynne [5]. Składników past jest wiele, a ponadto stanowiły one matrycę w badanych przeze mnie produktach i mogły mieć dość znaczący wpływ na otrzymane wyniki analizy. Innym aspektem

mogącym mieć wpływ na otrzymane przeze mnie wyniki mogło mieć przeznaczenie pasty, inaczej rodzaj pasty (pasta klasyczna, pasta lecząca nadwrażliwość, pasta zapobiegająca krwawieniu dziąseł czy pasta wybielająca). W mojej pracy wykorzystywałam pasty klasyczne.

Jedyna znacząca różnica w wynikach występuje w przypadku pasty, w której znajdował się monofluorofosforan sodu. Należy dodać, że stosowanie tych preparatów nie wywołuje żadnych negatywnych skutków dla naszego zdrowia, jednakże biorąc pod uwagę fakt, że fluor dostaje się do organizmu również z innych źródeł, a jego nadmiar może oddziaływać na niego niekorzystnie, powinno się mieć na uwadze to, że są to produkty stosowane bardzo często. Zbyt duża zawartość jonów fluorkowych zaburza bowiem pracę wielu narządów i układów w naszym organizmie m.in. wątroby i nerek, ale co ważniejsze nie tylko nie „pomaga” naszym zębom i kościom, ale im szkodzi. Należy pamiętać, że znajomość składników past i ich działania wpłynie korzystnie nie tylko na nasze samopoczucie, ale także na ogólny stan naszego zdrowia. Okazuje się, że dobór pasty do zębów ma znaczenie i należy dbać o nieprzekraczanie maksymalnej dziennej dawki tych jonów. Wszystko co wprowadzamy do naszych organizmów jest bezpieczne w odpowiednich ilościach.

Literatura

- [1] Błaszczak I., Ratajczak – Kubiak E., Birkner E., Korzystne i szkodliwe działanie fluoru, *Farm Pol*, 65(9), 2009.
- [2] Jakubowski M., Fluorki - w przeliczeniu na F, *PIMOŚP*, 3(57), 2008.
- [3] Walsh T., Worthington H.V., Glenney A. M., Appelbe P., Marinho V. C. C., Shi X., *Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents*, Wiley, 2010.
- [4] Pieróg B., Socha M., Pozytywne i negatywne oddziaływanie fluoru na organizm człowieka. Źródła fluoru w środowisku, *Med. Pr*, 51(1),2000.
- [5] Kasiak M., Kasiak M., Pasty do zębów – skład i działanie, *Farm Pol*, 65(9), 2009.
- [6] Cross D., The status of fluorinated water in European Community legislation, *Fluoride*, 2005.
- [7] Shanthakumari D., Srinivasalu S., Subramanian S., Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats, *Toxicology*, 2004.

ZACHOROWANIA NA GRUŻLICĘ W POLSCE W 2016 ROKU NA TLE INNYCH KRAJÓW

**Kinga Bandola⁽¹⁾, Mariola Janiszewska⁽²⁾, Klaudia Bandola⁽¹⁾, Magdalena Grzechnik⁽¹⁾,
Patrycja Ozdoba⁽¹⁾**

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Informatyki i Statystyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

kinga_955@o2.pl

Streszczenie

Na gruźlicę najczęściej chorują mieszkańcy krajów o niskim i średnim dochodzie. Mimo iż w krajach o wysokim wskaźniku PKB zachorowania pojawiają się rzadko, nie można mówić o całkowitej eradykacji choroby na ich obszarach.

Celem pracy była analiza występowania gruźlicy w Polsce w 2016 roku. Materiałem była analiza literatury naukowej, w tym danych epidemiologicznych dotyczących występowania gruźlicy w Polsce i na świecie, publikowanych w formie raportów przez Główny Urząd Statystyczny w Warszawie i przez Światową Organizację Zdrowia.

W 2016 roku na świecie na gruźlicę zachorowało 10,4 miliona osób, 1,7 miliona zmarło. Zapadalność na gruźlicę wynosiła około 120/100 000 mieszkańców. W krajach UE i EOG zachorowało około 60 000 osób. W Europie zapadalność wynosiła około 40, zaś wśród krajów UE i EOG około 11,5, najniższą odnotowano w Islandii – około 2, najwyższą w Rumunii – około 75. W Szwecji, Norwegii i Islandii migranci stanowili ponad 85% zachorowań. W Polsce w 2016 roku na gruźlicę zachorowało 6 444 osób.

Zapadalność na gruźlicę w Polsce jest wyższa w porównaniu z krajami Europy Zachodniej. Wyższa zapadalność na gruźlicę w Polsce wynika ze złych warunków mieszkaniowych, socjalnych i ze złego stylu życia. Chorzy zbyt późno zgłasza się na leczenie lub za wcześnie je przerywają. W najbliższych latach może dojść do wzrostu zachorowań na gruźlicę w krajach UE, przez pojawienie się ruchu antyszczepionkowego i ruchów migracyjnych ludności z innych kontynentów.

Wprowadzenie

Na początku XX wieku gruźlica była jedną z najczęściej występujących chorób na świecie. Śmiertelność na tę chorobę utrzymywała się na wysokim poziomie, stąd gruźlica

stanowiła jedną z głównych przyczyn zgonów w Europie. W Polsce po II wojnie światowej gruźlica była jedną z głównych przyczyn śmierci, przyczyniając się do 11% zgonów, co oznaczało, że sytuacja epidemiologiczna w Polsce była najgorsza w całej Europie. Narodowy program walki z gruźlicą, stworzony w 1959 roku znacznie poprawił sytuację w kraju, zmniejszając zapadalność i śmiertelność na tę chorobę. Dzięki jego wdrożeniu sytuacja epidemiologiczna z roku na rok ulegała poprawie [1].

W dzisiejszych czasach gruźlica, obok HIV i malarii, jest najczęstszą przyczyną zgonów wywołaną pojedynczym czynnikiem zakaźnym [2]. Najczęściej chorują na nią mieszkańcy krajów o niskim i średnim rozwoju gospodarczym. Mimo iż w krajach o wysokim wskaźniku PKB zachorowania pojawiają się znacznie rzadziej, nie można mówić o całkowitej eradykacji choroby na ich obszarach [3].

Gruźlica jest chorobą zakaźną, którą wywołują prątki gruźlicy – *Mycobacterium tuberculosis*. Jedną z hipotez mówi o tym, że powstały one w epoce jury, czyli około 150 milionów lat temu [4]. Ludzie prawdopodobnie zaczęli zakażać się nimi około 3 miliony lat temu [5]. Udomowienie bydła, które nastąpiło około 10 000 lat temu, wpłynęło na przełamanie bariery zakażenia zwierzę-człowiek i przyczyniło się do powstania nowego rodzaju prątków [6]. *Mycobacterium tuberculosis* to jeden z największych genomów zaobserwowany wśród bakterii i tworzy go około 4 000 genów. Funkcje około 40% genów nie zostały dotąd wyjaśnione. Ich określenie może okazać się kluczowe w poznaniu interakcji między patogenem chorobotwórczym a człowiekiem [7].

Gruźlica najczęściej umiejscawia się w płucach, ale może znajdować się także w innych narządach i organach, takich jak: ośrodkowy układ nerwowy, nerki, osierdzie, wątroba, kości. Większość z wymienionych typów gruźlicy pozapłucnej ma bezobjawowy przebieg. Choroba zazwyczaj ujawnia się co najmniej po dwóch latach od zakażenia. Często pojawia się pod wpływem współistnienia różnych stanów, takich jak niedożywienie, starość, leczenie immunosupresyjne lub pod wpływem chorób – niewydolność nerek, cukrzyca, AIDS czy nowotwory [8].

Na zakażenie najbardziej są narażone osoby chore na AIDS oraz na choroby przewlekłe (cukrzyca, nowotwory złośliwe, niewydolność serca, przewlekła niewydolność nerek i wątroby), a także osoby stosujące leki obniżające odporność [9]. Zachorowaniu na gruźlicę sprzyja zła sytuacja materialna, z którą często współistnieją złe warunki mieszkaniowe i sanitarno – epidemiologiczne. Niewietrzzone, wilgotne pomieszczenia sprzyjają gromadzeniu się patogenów chorobotwórczych wywołujących gruźlicę. Ponadto osoby ubogie często

są niedożywione, co obniża odporność organizmu i tym samym zwiększa ryzyko zakażenia [10].

W związku ze złą sytuacją materialną osoby ubogie są podatne na stres, przez co odporność organizmu obniża się. Przewlekłe odczuwanie napięć nerwowych sprzyja powstawaniu uzależnień i sięganiu po używki – papierosy, alkohol, narkotyki – które osłabiają układ immunologiczny [11]. W wielu przypadkach osoby ubogie posiadają niskie wykształcenie, a co za tym idzie, niską świadomość zdrowotną [12].

Kolejny czynnik ryzyka stanowi długotrwałe przebywanie w towarzystwie prątkującej osoby. Ważne jest zatem szybkie diagnozowanie osób chorych, aby wcześniej zacząć leczenie [13]. Po około miesiącu leczenia pacjent przestaje zarażać inne osoby. Jednakże po tak krótkim czasie nie można zakończyć terapii, ponieważ, aby całkowicie wyzdrowieć przyjmuje się leki od sześciu miesięcy do nawet roku. Wcześniejsze przerwanie leczenia może skutkować uodpornieniem się patogenów chorobotwórczych i wystąpieniu gruźlicy wielolekoopornej [14].

Gruźlica wielolekooporna pojawiła się w roku 1948, czyli rok po wynalezieniu lekarstwa na gruźlicę – streptomycyny. W kolejnych latach terapia tym antybiotykiem coraz częściej nie przynosiła rezultatów z powodu uodpornienia się bakterii na ten lek [15]. Problem wielolekooporności uległ zmniejszeniu pod wpływem wprowadzenia leczenia skojarzeniowego. Badania prowadzone w latach pięćdziesiątych pokazały, że stosowanie jednocześnie streptomycyny i kwasu para-aminosalicylowego przyczynia się do wzrostu liczby wyzdrowień oraz nie powoduje lekooporności [16]. W latach dziewięćdziesiątych doszło do wzrostu liczby zachorowań na ten typ gruźlicy. Pojawiała się ona głównie w środowiskach szpitalnych oraz u osób zakażonych wirusem HIV i charakteryzowała się wysoką śmiertelnością – do 90% - oraz łatwością transmisji zakażeń.

Naturalna oporność prątków gruźlicy na niektóre antybiotyki utrudnia leczenie. Lekooporność wynika z tego, iż ściana komórkowa prątków jest hydrofobowa, a więc tworzy ona barierę, która jest nieprzepuszczalna dla leków. Ponadto na lekooporność wpływają także znajdujące się w komórkach geny lekooporności [17]. Zjawisko lekooporności powstaje również z powodu mutacji w obrębie genomu, które jest konsekwencją zbyt krótkiego lub przerwane leczenia [18]. Pomimo tego, iż wielolekooporna gruźlica dotyczy niektórych społeczności – bezdomnych, emigrantów, chorych na HIV oraz narkomanów, wpłynęła ona na kształtowanie się wskaźników epidemiologicznych dotyczących gruźlicy w poszczególnych krajach [19]. Najwięcej przypadków gruźlicy wielolekoopornej odnotowuje się w Chinach. Szacuje się, że występuje tam 25% wszystkich zachorowań [20].

Wystąpienie gruźlicy u osób zakażonych prątkami wynosi około 10%. Ryzyko wystąpienia choroby wzrasta o 21-34 razy w przypadku współistnienia zakażenia wirusem HIV [21]. Wynika to z obniżeniem odporności u osób zakażonych. Przebieg gruźlicy jest uzależniony od ilości limfocytów CD4 w krwi obwodowej. Jeśli ich liczba jest nieznacznie obniżona, gruźlica przebiega w podobny sposób jak u osób nie zakażonych wirusem HIV. Rozwijająca się gruźlica przyspiesza przebieg zakażenia HIV [22]. Około 20% osób zakażonych wirusem HIV umiera z powodu gruźlicy [23].

Szacuje się, że u około 2 miliardów ludzi występuje utajone zakażenie prątkami gruźlicy. Osoby te stanowią rezerwuuar patogenów wywołujących chorobę, które prowadzą do powstania aktywnej formy gruźlicy, stwarzając zagrożenie dla osób zdrowych [24]. U osób chorych na gruźlicę można zauważyć objawy, takie jak: ostry kaszel, trwający ponad 3 tygodnie, krwioplucie i wykrztuszanie płwociny, osłabienie, utrata masy ciała, bóle w klatce piersiowej, nocne poty, gorączka i utrata apetytu. Wykonanie zdjęć RTG, mimo widocznych zmian w obrębie płuc, nie musi świadczyć o wystąpieniu choroby. Aby zdiagnozować chorobę należy wykonać próby tuberkulinowe oraz diagnostykę mikrobiologiczną, np. płwociny chorego. Jeżeli choroba w początkowym stadium rozwija się bezobjawowo, jej wykrycie możliwe jest tylko przy pomocy badania radiologicznego [25].

Leczenie gruźlicy trwa co najmniej sześć miesięcy. Zwykle pacjent przyjmuje leki przeciwgruźlicze i przeciwzapalne. Zakażeniom prątkami można zapobiegać. Skutecznym sposobem profilaktyki są szczepienia ochronne. Ponadto ważne jest, aby w przypadku zachorowania na gruźlicę szybko odizolować chorego od zdrowych osób, aby nie dopuścić do nowych zakażeń [26].

Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie problemu dotyczącego występowania gruźlicy w Polsce w 2016 roku i porównanie sytuacji Polski do sytuacji w wybranych krajach.

Material i metoda

Materiałem analizowanym w pracy była liczba przypadków gruźlicy oraz zapadalność na 100 000 mieszkańców. Zastosowaną metodą badawczą była analiza literatury naukowej dotycząca występowania gruźlicy w Polsce i w wybranych krajach w 2016 roku.

Zachorowania i zapadalność na gruźlicę na świecie

W 2016 roku na świecie na gruźlicę zachorowało 10,4 miliona osób, z czego 1,7 miliona zmarło, co oznacza, że gruźlica była jedną z dziesięciu głównych przyczyn zgonów [27]. Co roku odnotowuje się około 480 000 nowych zachorowań [28]. Natomiast liczba zachorowań na gruźlicę wielolekooporną waha się od 520 000 do 640 000 zachorowań w ciągu roku. Ten rodzaj gruźlicy powoduje około 250 000 zgonów każdego roku [29]. Najgorsza sytuacja epidemiologiczna, dotycząca gruźlicy, występuje w Afryce. Co roku na tym kontynencie umiera około 750 000 osób. Oznacza to, że około 19% osób chorych na gruźlicę każdego roku umiera. Zapadalność na gruźlicę jest szacowana na 200-300/100 000 mieszkańców [30]. Najniższa zapadalność w krajach spoza Europy, wynosząca poniżej 10/100 000 mieszkańców została odnotowana w: Kanadzie, Izraelu, Stanach Zjednoczonych, Portoryko, Zjednoczonych Emiratach Arabskich, Australii, Jordanii, Nowej Zelandii, Omanie oraz na Jamajce i Kubie [31].

W 2016 roku mieszkańcy Europy stanowili 3% wszystkich zachorowań na gruźlicę i 25% wszystkich zachorowań na gruźlicę wielolekooporną na świecie. Najwięcej przypadków gruźlicy lekoopornej w Europie odnotowano na obszarach byłego Związku Radzieckiego. Ponad ¼ zachorowań w krajach Unii Europejskiej i Europejskiej Wspólnoty Gospodarczej została odnotowana wśród osób urodzonych za granicą. Liczba ta w ostatnich kilku latach uległa zwiększeniu ze względu na pojawienie się na kontynencie uchodźców z krajów afrykańskich i z bliskiego wschodu [32].

Zapadalność na gruźlicę w 2016 roku w krajach Unii Europejskiej i Europejskiej Wspólnoty Gospodarczej wynosiła około 11,5/100 000 mieszkańców [33]. Najwięcej przypadków zachorowań odnotowano w Rumunii – 13 617. W tym kraju odnotowano także najwyższą zapadalność – około 80/100 000 mieszkańców [34]. Najmniejsze współczynniki zapadalności odnotowuje się w Islandii – około 2/100 000 [35]. Innymi europejskimi krajami, w których zapadalność jest niska i wynosi poniżej 5/100 000 mieszkańców są: Holandia, Finlandia, Czechy i Grecja. Do krajów, w których zapadalność jest większa niż 5/100 000, ale mniejsza niż 10/100 000 należą: Luksemburg, Cypr, Norwegia, Dania, Słowacja, Włochy, Słowenia, Irlandia, Austria, Francja, Niemcy, Malta, Szwecja, Belgia i Węgry [31].

Jeszcze kilka lat temu w gronie krajów, w których zapadalność nie przekraczała 10/100 000 były Włochy. Współczynnik w tym kraju wynosił około 7/100 000 mieszkańców. Ilość zachorowań na gruźlicę wśród rdzennych mieszkańców malała, natomiast wśród imigrantów liczba ta rosła i spowodowała, że Włochy nie są obecnie krajem o stabilnej sytuacji epidemiologicznej. Ponadto w najbliższych latach może dojść do wzrostu liczby zachorowań

ze względu na pojawianie się coraz większej liczby uchodźców, głównie z krajów afrykańskich, w których zapadalność jest bardzo wysoka i często przekracza 200/100 000 mieszkańców [36].

Zachorowania i zapadalność na gruźlicę w Polsce

W Polsce z roku na rok maleje liczba zachorowań na gruźlicę, a co za tym idzie, spada także zapadalność na tę chorobę. W 1957 roku, a więc przed powstaniem narodowego programu walki z gruźlicą, chorobę zdiagnozowano u 82 201 osób, a zapadalność wynosiła 290/100 000. W 1965 roku, czyli sześć lat po rozpoczęciu programu, dotyczącego zwalczania gruźlicy, chorowało 57 511 osób, a zapadalność wynosiła 182/100 000. W 2004 roku po raz pierwszy zarejestrowano mniej niż 10 000 przypadków gruźlicy w ciągu roku. Natomiast w 2012 roku zapadalność spadła poniżej 20/100 000 [34]. W 2016 roku na gruźlicę zachorowało około 6 500 osób. Polska była drugim krajem z najwyższą liczbą zakażeń prątkami gruźlicy wśród krajów Unii Europejskiej i Europejskiej Wspólnoty Gospodarczej. Więcej zachorowań zanotowano tylko w Rumunii. Zapadalność natomiast wynosiła około 16,7/100 000 mieszkańców. Zapadalność przekraczająca 20/100 000 mieszkańców została zanotowana w województwach: mazowieckim, świętokrzyskim, śląskim, łódzkim i lubelskim. Najwięcej zakażeń zanotowano w grupie wiekowej 45-64 lat [37].

Podsumowanie

Zapadalność na gruźlicę w Polsce jest wyższa od średniej dla krajów Unii Europejskiej i Europejskiej Wspólnoty Gospodarczej. Spośród tych krajów tylko w Rumunii odnotowuje się więcej przypadków zachorowań na gruźlicę niż w Polsce. Najwyższy wskaźnik zapadalności w Polsce odnotowano w województwie mazowieckim, świętokrzyskim, śląskim, łódzkim i lubelskim. Najwięcej zakażeń odnotowano w przedziale wiekowym 45-64.

Niniejsza praca porusza bardzo istotny temat, gdyż zapadalność na gruźlicę w Polsce jest wyższa w porównaniu do krajów Europy Zachodniej. Wynika to przede wszystkim ze złych warunków mieszkaniowych, socjalnych i ze złego stylu życia, głównie niedożywienia i stosowania używek, co przyczynia się do osłabienia układu odpornościowego. Większość osób chorych zbyt późno zgłasza się na leczenie lub za wcześnie je przerywa, stwarzając zagrożenie dla innych osób.

Aby zmniejszyć występowanie gruźlicy w Polsce należy wprowadzić działania w zakresie ograniczenia rozprzestrzeniania się choroby. Wczesne wykrycie i natychmiastowo wdrożone prawidłowe leczenie chorego sprawia, że pacjent po miesiącu przestaje być zaraźliwy dla otoczenia. Ponadto należy zwiększyć świadomość społeczeństwa na temat choroby

i czynników, które ją wywołują, ponieważ ograniczenie ich znacznie obniży wskaźniki zapadalności.

Gruźlica wciąż jest groźną chorobą dla człowieka ze względu na to, iż coraz częściej patogeny ją wywołujące uodporniają się na działanie antybiotyków. Stąd też coraz częściej diagnozowana jest gruźlica wielolekooporna. Od lat dziewięćdziesiątych ponownie zaczęła stanowić zagrożenie dla ludzi. Ponadto jej leczenie jest trudne i skomplikowane. Niepokoić może także systematyczny wzrost zachorowań na ten rodzaj gruźlicy przy jednocześnie wysokiej śmiertelności.

Leczenie gruźlicy może okazać się bardziej skuteczne, jeżeli osoby chore dodatkowo będą wykonywały test na obecność wirusa HIV w organizmie. Często te choroby współistnieją u pacjentów. Wykrycie obydwu schorzeń umożliwi zastosowanie odpowiedniej terapii, a tym samym obniży ilość zgonów z powodu gruźlicę.

W najbliższych latach istnieje prawdopodobieństwo wzrostu liczby zachorowań na gruźlicę w krajach Unii Europejskiej. Wynika to z pojawienia się ruchu antyszczepionkowego. Kolejne źródło zagrożenie stanowią uchodźcy, wśród których odnotowuje się przypadki choroby. Wielu z nich jest nosicielami prątków gruźlicy. Stąd też od kilku lat w krajach Europy Zachodniej wzrasta liczba zachorowań na gruźlicę wśród imigrantów. Często stanowią oni ponad połowę wszystkich zachorowań. Może to prowadzić, tak jak w przypadku Włoch, do znacznego pogorszenia sytuacji epidemiologicznej. Ponadto w krajach, w których przebywają uchodźcy z bliskiego wschodu i Afryki, w zamieszkałych przez nich obozach mogą powstawać epidemie gruźlicy i innych chorób zakaźnych, które, ze względu na duże zagęszczenie ludności na małym obszarze, mogą być trudne do opanowania. Stwarza to zagrożenie dla ludności rdzennej tych państw, ponieważ część osób nie jest odporna na patogeny wywołujące gruźlicę.

Literatura

- [1] Zielonka TM.: Epidemiologia gruźlicy w Polsce – implikacje w praktyce lekarza rodzinnego. *Forum Med Rodz.* 2016;10(1):25-33.
- [2] Salat D, Beno P.: Tuberculosis as a public health problem In the World and in Slovakia, *J of Ecol Health.* 2012;16(1):21-27.
- [3] Dye C, Maher D.: Weil D., Espinal M., Raviglione M.: Targets for global tuberculosis control, *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 Apr;10(4):460-462.

- [4] Daniel TM.: The history of tuberculosis, *Respir Med.* 2006 Sep 1. doi. 10.1016/j.rmed.2006.08.006
- [5] Gutierrez MC., Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B i wsp.: Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005 Aug 19. doi:10.1371/journal.ppat.0010005
- [6] Neill SD, Skuce RA, Pollock JM.: Tuberculosis – new light from an old window. *J Appl Microbiol.* 2005 doi :10.1111/j.1365-2672.2005.02599.x
- [7] Smith I.: *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul;16(3):463-496.
- [8] Kołaczowska M.: Is extrapulmonary tuberculosis a real problem in Poland?, *Przew Lek.* 2007;1:83-88.
- [9] Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z.: Gruźlica lekooporna w Polsce. *Nowa Med.* 2009;1:50-55.
- [10] Jagielski T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z.: Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski. *Wiad Lek.* 2010;63(3):230-246.
- [11] [11] Dooley KE, Chaisson RE.: Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis.* 2009 Dec 9. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70282-8.
- [12] Bock N, McGowan JE Jr, Blumberg HM.: Few opportunities found for tuberculosis prevention among the urban poor. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998 Feb;2(2):124-129.
- [13] Kunnath-Velayudhan S, Gennaro ML.: Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker Discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Oct. doi: 10.1128/CMR.00014-11.
- [14] Kruczak K, Niżankowska-Mogilnicka E.: Multidrug resistance tuberculosis - current problems. *Pneumonol Alergol Pol.* 2009;77(3):276-283.
- [15] Lotte A, Poussier J.: Treatment of 414 cases of pulmonary tuberculosis with isoniazid. *Rev Tuberc.* 1953;17(1-2):1-29.
- [16] [16] Mitchison DA.: Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *Int Tuberc Lung Dis.* 2000 Sep;4(9):796-806.
- [17] Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS Jr.: Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology.* 2005 Feb. doi: 10.1099/mic.0.27629-0.
- [18] Gengenbacher M, Kaufmann SH.: *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 May. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x. [Epub ahead of print]

- [19] Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM i wsp.: The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med*. 1993 Jul 8. doi: 10.1056/NEJM199302253280801.
- [20] Huang Y, Wu Q, Xu S, Zhong J, Chen S i wsp.: Laboratory-Based Surveillance of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Eastern China. *Microb Drug Resist*. 2017 Mar. doi: 10.1089/mdr.2016.0075. [Epub ahead of print]
- [21] Gray JM., Cohn DL.: Tuberculosis and HIV coinfection. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013 Feb. doi: 10.1055/s-0032-1333469.
- [22] Olczak A, Grąbczewska E, Koziulewicz D, Gorzelak B.: Gruźlica w grupie pacjentów zakażonych HIV. *Przegl Epidemiol*. 2008;62(1):63-69.
- [23] Harris TG, Li J, Hanna DB, Munsiff S.: Changing sociodemographic and clinical characteristics of tuberculosis among HIV-infected patients, New York City 1992–2005. *Clin Infect Dis*. 2010 Jun 1. doi: 10.1086/652654.
- [24] Druszczyńska M, Strapagiel D, Rudnicka W.: Molekularne i komórkowe parametry w gruźlicy. *Nowa Med*. 2009;1:43-47.
- [25] Fąfrowicz B.: Gruźlica. *Nowa Med*. 1999;2:17-22.
- [26] Ziołkowski J, Jaworska J, Bielecka T, Zawadzka-Krajewska A.: Gruźlica dziecięca. *Med Rodz*. 2009;2:44-46.
- [27] Campos-Outcalt D.: Screening for tuberculosis: Updated recommendations. *J Fam Pract*. 2017 Dec;66(12):755-757.
- [28] KhinMar K-W, Sng L-H, Jureen R, Cutter J, Wang Y-T i wsp.: The shorter multidrug-resistant tuberculosis treatment regimen in Singapore: are patients from South-East Asia eligible?. *Eur Respir J*. 2017 Aug 10. doi: 10.1183/13993003.00753-2017.
- [29] Falzon D, Schünemann HJ, Harausz E, González-Angulo L, Lienhardt C i wsp.: World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur Respir J*. 2017 Mar 22. doi: 10.1183/13993003.02308-2016.
- [30] Piatek A.: Tuberculosis diagnostic networks: Moving Beyond the laboratory to end tuberculosis in Africa. *Afr J Lab Med*. 2017 Mar 29. doi: 10.4102/ajlm.v6i2.608.
- [31] de Vries G, van Hest R, Bakker M, Erkens C, van der Hof S i wsp.: Policy and practice of programmatic management of latent tuberculosis infection in The Netherlands. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2017;7:40-48.
- [32] D'Ambrosio L, Centis R, Masoud D, Solvic I, Sulis G i wsp.: European policies in the management of tuberculosis among migrants. *Int J Infect Dis*. 2017 Mar. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.002. [Epub ahead of print]

- [33] Jackson C, Abubakar I.: Ending tuberculosis in risk groups in Europe: challenges from travel and population movement. *Euro Surveill.* 2017 Mar 23. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.12.30489.
- [34] Nitu FM, Olteanu M, Streba CT, Jimborean G, Postolache P i wsp.: Tuberculosis and its particularities in Romania and worldwide. *Rom J Morpho Embryol.* 2017;58(2):385-392.
- [35] Korzeniewska-Koseła M.: Tuberculosis In Poland 2014. *Przeegl Epidemiol.* 2016;70(2):261-272.
- [36] Blasi F, Matteelli A, Sotgiu G, Cirillo DM, Palmieri F i wsp.: Moving towards tuberculosis elimination: a call for action from Italy and a possible model for other low tuberculosis incidence countries. *Eur Respir J.* 2017 Feb 2. doi: 10.1183/13993003.02242-2016.
- [37] Włodarczyk M, Rudnicka W, Druszczyńska M.: Gruźlica – zapomniana choroba, o której warto pamiętać. *Kosmos.* 2017;315(2):313-325.

ZAKAŻENIA WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C W POLSCE W 2016 ROKU NA TLE INNYCH KRAJÓW

**Kinga Bandola⁽¹⁾, Mariola Janiszewska⁽²⁾, Klaudia Bandola⁽¹⁾, Patrycja Ozdoba⁽¹⁾,
Katarzyna Socha⁽¹⁾**

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Informatyki i Statystyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

kinga_955@o2.pl

Streszczenie

Zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C w Polsce stanowią jeden z największych problemów epidemiologicznych spośród chorób zakaźnych. Wynika to z braku skutecznej szczepionki. Około 80% zarażonych nie jest świadomych zakażenia.

Celem pracy była analiza występowania zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C w Polsce w 2016 roku. Materiałem była analiza literatury naukowej, w tym danych epidemiologicznych dotyczących zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C w Polsce i na świecie, publikowanych w formie raportów przez Główny Urząd Statystyczny w Warszawie i przez Światową Organizację Zdrowia.

Wyniki. Około 71 milionów osób na świecie choruje na przewlekłe zapalenie wątroby typu C, co roku umiera około 400 000 osób. Najwięcej zakażeń występuje w Egipcie. W Europie najmniejszy odsetek zakażeń odnotowano w Europie Północnej – do 1%, największy w Europie Wschodniej – do 6%. Największy odsetek występuje w Rumunii – 6%. Szacuje się, że w Polsce zakażonych jest 230 000 osób. W Polsce co roku wzrasta liczba zakażeń. W 2016 roku zarejestrowano 4 273 przypadki, najwięcej w województwie śląskim – 587.

Co roku wzrasta liczba zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C w Polsce. Nielezione WZW C prowadzi do raka lub marskości wątroby. W 2016 roku najwięcej zakażeń odnotowano w województwie śląskim. Najwyższy odsetek zakażeń występował w województwie kujawsko-pomorskim. Liczba zakażonych w Polsce jest wyższa niż wskazują dane. Wynika to z niskiej wykrywalności. Działania zapobiegawcze ograniczają się do profilaktyki nieswoistej, gdyż nie ma skutecznej szczepionki. Zmniejszenie liczby zachorowań będzie możliwe w przypadku szybkiego diagnozowania zakażeń, ponieważ w 95% przypadków wystarczy wczesne zastosowanie leków przeciwwirusowych.

Wprowadzenie

Zakażenia wirusem zapalenie wątroby typu C w Polsce stanowią jeden z największych problemów epidemiologicznych spośród chorób zakaźnych. Wynika to z tego, iż przeciw wirusowi nie wynaleziono szczepionki. Zakażenie przebiega zazwyczaj bezobjawowo, stąd trudno je rozpoznać na podstawie obrazu klinicznego. Ponadto wirusowe zapalenie wątroby typu C jest groźniejszą chorobą niż wirusowe zapalenie wątroby typu B [1].

Zapalenie wątroby typu C wywołuje wirus hepatitis C virus. Zaobserwowali go amerykańscy naukowcy w latach siedemdziesiątych. Wirus został zaklasyfikowany jako niezidentyfikowany wirus hepatotropowy, który posiadał cechy zakażenia parenteralnego i był inny od znanych wówczas wirusów typu A i B [2]. W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych rozpowszechnienie zapalenia wątroby nie-A i nie-B (tak wówczas był określany) wśród osób po zabiegu transfuzji krwi wynosiło 21% [3]. W 1989 roku naukowcy używając technik biologii molekularnej sklonowali genom wirusa, któremu nadano nazwę: wirus zapalenia wątroby typu C [4]. Na infekcje tym wirusem podatni są tylko ludzie i szympansy [5].

Wyróżnia się 6 typów i około 100 podtypów wirusa zapalenia wątroby typu C. Ustalenie genotypu jest ważne w doborze odpowiedniego leczenia przeciwwirusowego. Naukowcy sądzą, że powikłania po infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C są uwarunkowane odpowiedzią układu immunologicznego, a nie właściwościami cytotatycznymi wirusa [6]. Ponadto łatwo ulega on mutacjom, co w konsekwencji prowadzi do powstawania form rzekomych wirusa [7].

Szacuje się, że na świecie zakażone jest około 2,2% populacji. Polska należy do krajów o średnim poziomie rozprzestrzenienia zakażeń. Najwięcej przypadków wirusowego zapalenia wątroby typu C diagnozowanych jest w Afryce oraz w centralnej i wschodniej Azji [8].

Do zakażenia wirusem najczęściej dochodzi poprzez transfuzję krwi oraz produktów krwiopochodnych – 30% [9]. Rzadziej do zakażeń dochodzi w wyniku przerwania bariery tkankowej na drodze kontaktów seksualnych oraz iniekcji igłami [10]. Za pośrednictwem drogi wertykalnej – z matki na płód – dochodzi do około 4%-7% zakażeń [11]. Ryzyko przeniesienia wirusa podczas porodu wynosi ponad 90% [12]. Ryzyko zakażenia pacjenta przez chirurga, który jest nosicielem, wynosi 0,04%-0,36% przy zabiegach torakochirurgicznych, ginekologicznych i chirurgii ogólnej [13]. Czynnikiem ryzyka wirusowego zapalenia wątroby typu C są: transfuzje, zabiegi medyczne i niemedyczne związane naruszeniem ciągłości tkanek – iniekcje dożylnie leków, hemodializy, zabiegi stomatologiczne, transplantacje i tatuowanie.

Wirusa nie można przekazać przez pożywienie, mleko matki, kontakt taki jak przytulanie, całowanie i dzielenie się jedzeniem czy napojami [14].

W związku z tym, że do zakażeń najczęściej dochodzi podczas transfuzji krwi, przed każdym oddaniem krwi u dawcy wykonuje się badanie na obecność przeciwciał anti-HCV. W przypadku pozytywnego wyniku testu nie można oddać krwi do transfuzji. U dawców wykonuje się badania testami biologii molekularnej, które wykrywają obecność wirusa, przed pojawieniem się przeciwciał w organizmie [15]. W Polsce wśród dawców 1 na 119 235 osób jest zakażona wirusem zapalenia wątroby typu C [16].

Po kontakcie z wirusem nie musi dojść do zakażenia. 20%-40% zakażeń samoistnie ustępuje. Wirus może powodować ostre lub przewlekłe zapalenie wątroby. W przebiegu klinicznym ostrego zapalenia zakażenia bezobjawowe zdarzają się znacznie częściej niż skąpo objawowe i bezobjawowe. U 70%-80% zakażonych w wyniku transfuzji krwi nie występują objawy kliniczne [17]. Szacuje się, że mniej niż 30% zakażonych wie o infekcji, a około 10% jest obecnie leczonych [18,19].

Przewlekłe zapalenie wątroby występuje u 80% pacjentów zakażonych wirusem. Dochodzi do niego znacznie częściej niż do ostrego zapalenia, ponieważ wirus potrafi uniknąć odpowiedzi immunologicznej człowieka. U około 10%-20% przewlekłe chorych wystąpi zwłóknienie wątroby, a następnie po około 20 latach rozwinię się marskość wątroby. Ponadto ta grupa chorych jest bardziej narażona na wystąpienia raka tego narządu. W przewlekłym zakażeniu objawy występują rzadko. Zwyródnienie wątroby zazwyczaj występuje po kilkunastu latach od zakażenia [20].

U około 36%-54% pacjentów dochodzi do precypitacji krioglobulin w różnych tkankach. Może to prowadzić do uszkodzenia skóry, zapalenia naczyń, miopatii, neuropatii obwodowej oraz autoimmunologicznego zapalenia wątroby. Objawy te występują u około 20% pacjentów, u których zaobserwowano krioglobuliny związane z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C. Ponadto charakterystyczne jest pojawienie się triady: zmiany skórne, osłabienie i bóle stawowe [21].

Na skutek zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C może dojść do dysfunkcji obejmujących ośrodkowy układ nerwowy. Od 50%-67% pacjentów przewlekłe chorych cierpi z powodu zespołu przewlekłego zmęczenia [22]. Zespół depresyjny jest diagnozowany częściej, niż u osób niezakażonych [23]. W schyłkowej fazie niewydolności wątroby często obserwowane są zaburzenia funkcji poznawczych [24]. Dochodzi wówczas do zwolnienia procesu przetwarzania informacji, pogorszenia umiejętności zapamiętywania i spowolnienia psychomotorycznego [25].

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C często współistnieje z zakażeniem wirusem HIV. Szacuje się, że około 30% osób z HIV jest również zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. Lokalnie występowanie obydwu zakażeń uzależnione jest od liczby osób z grupy ryzyka, do której należą osoby przyjmujące narkotyki dożylnie [26].

Leczenie wirusowego zapalenia wątroby typu C trwa 48 tygodni w przypadku genotypu 1, 4, 5, 6, zaś w przypadku genotypu 2 i 3 trwa zazwyczaj 24 tygodnie. Po 12 tygodniach terapii sprawdza się tzw. wczesną odpowiedź wirusową. Po jej ocenie podejmuje się decyzję o kontynuacji lub zaprzestaniu leczenia [27]. Farmakoterapia jest dostosowana do genotypu wirusa. Stąd też przyjmowane przez pacjentów leki różnią się. Najczęściej stosuje się peginterferon- α -2b oraz rybawirynę [28]. Podstawą skutecznej terapii jest utrzymanie optymalnych dawek leku [29]. Ponadto ważne jest wczesne zdiagnozowanie i rozpoczęcie leczenia, ponieważ w ponad 90% przypadków wystarczy wczesne podanie leków przeciwwirusowych [30]. U niektórych pacjentów może dojść do samoistnej eradykacji wirusa [31].

Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie problemu dotyczącego występowania wirusowego zapalenia wątroby typu C w Polsce w 2016 roku i porównanie sytuacji Polski do sytuacji w wybranych krajach

Material i metoda.

Materiałem analizowanym w pracy była liczba przypadków wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz odsetek zakażeń wirusem. Zastosowaną metodą badawczą była analiza literatury naukowej dotycząca występowania wirusowego zapalenia wątroby typu C w Polsce i w wybranych krajach w 2016 roku.

Zakażenia WZW C w Polsce i innych krajach

Szacuje się, że na przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia typu C choruje 170 milionów ludzi na świecie. Choroba ta jest główną przyczyną marskości wątroby w krajach Ameryki Północnej [28]. Co roku odnotowuje się 3-4 miliony nowych zachorowań. Około 350 000 osób co roku umiera z powodu zapalenia wątroby wywołanego wirusem C [32].

Największe rozpowszechnienie wirusa występuje w Afryce oraz w centralnej i wschodniej Azji [33]. Największy odsetek zakażeń występuje w Egipcie. W 2016 roku wynosił on około 10% w grupie wiekowej 1-59 lat, około 0,4% w grupie wiekowej poniżej 14.

roku życia oraz około 6% w grupie wiekowej powyżej 60. roku życia [34]. W Delcie Nilu i w Górnym Egipcie odsetki zakażeń wynoszą odpowiednio 26% i 28% [35].

Wysokie rozpowszechnienie zakażeń wirusem zapalenia wątroby było rezultatem parenteralnej terapii schistosomatozy, którą zaczęto stosować w latach dwudziestych. W latach pięćdziesiątych egipskie Ministerstwo Zdrowia oraz Światowa Organizacja Zdrowia zaleciły ogólnokrajową masową terapię [36]. Co roku podawano ponad 2 miliony zastrzyków średnio 250 000 pacjentów. Przez 18 lat wykonano 36 milionów iniekcji 6 milionom osób za pomocą igieł i strzykawek, które nie były wysterylizowane. Te praktyki uznawane są za największe w historii jatrogenne rozprzestrzenienie się zakażeń krwiopochodnych [37].

W 2016 roku wśród krajów europejskich najwyższy odsetek zakażeń zanotowano w Gruzji – 6,7%. Wśród krajów Unii Europejskiej najwyższy odsetek zakażeń – około 6% – zarejestrowano we Włoszech i Rumunii. Najniższe zaś występowały w: Chorwacji, Czechach, Danii, Francji, Niemczech, Holandii, Portugalii, Słowenii, Hiszpanii, Szwecji, Wielkiej Brytanii, Luksemburgu oraz na Węgrzech – mniej niż 1%. Najwięcej osób zakażonych wirusem zakażenia wątroby typu C zamieszkuje Włochy, Rumunię oraz Niemcy [38].

We Włoszech ponad milion osób jest zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. Najwięcej osób zakażonych urodziło się przed 1950 rokiem. Sytuacja epidemiologiczna w tym kraju jest zła ze względu na wystąpienie w ostatnim stuleciu dwóch wielkich fal zachorowań. Pierwsza z nich osiągnęła szczyt prawdopodobnie w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych. Dotyczyła osób urodzonych głównie w latach 1920-1930 i wynikała z stosowania drobnych procedur inwazyjnych, wykonywanych niewysterylizowanymi, jednorazowymi narzędziami. Druga fala miała miejsce w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych, i dotknęła głównie młodych dorosłych, którzy stosowali niewysterylizowane igły [39].

Ponad 200 000 osób w Polsce jest zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C [40]. W 2016 roku w na wirusowe zapalenie wątroby typu C zachorowało 4 273 osoby, czyli o 12 osób mniej niż rok wcześniej. W Polsce ilość zachorowań z roku na rok wzrasta, wyjątkiem jest 2016 rok, gdzie odnotowano nieznaczny spadek. Od roku 2005 zarejestrowano wzrost zachorowań o 40%. Najwięcej zakażeń odnotowano w województwie śląskim i mazowieckim [41].

Podsumowanie

Wirusowe zapalenie wątroby typu C to choroba trudniejsza do wyleczenia niż wirusowe zapalenie wątroby typu B. Nieleczona prowadzi do raka lub marskości wątroby. Do zakażenia

najczęściej dochodzi podczas transfuzji zakażonej krwi, zabiegów związanych z naruszeniem ciągłości tkanek oraz podczas iniekcji niewysterylizowanymi igłami.

Zakażenie ma przebieg ostry lub przewlekły. Zazwyczaj jest bezobjawowe. Jeżeli pojawiają się objawy, są one niecharakterystyczne. U części osób występują: uszkodzenia skóry, zapalenia naczyń, miopatia, neuropatia obwodowa oraz autoimmunologiczne zapalenie wątroby. Ponadto u chorego może dojść do uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, co spowoduje powstanie: zespołu przewlekłego zmęczenia, depresji oraz zaburzeń funkcji poznawczych.

Czas leczenia jest uzależniony od genotypu wirusa i trwa 24 lub 48 tygodni. Można je przerwać po 12 tygodniach po sprawdzeniu tzw. wczesnej odpowiedzi wirusowej. Leki przyjmowane podczas terapii również są dostosowywane do genotypu wirusa.

Do 2015 roku rosła liczba zakażeń wirusowym zapaleniem wątroby typu C w Polsce. W 2016 roku zanotowano nieznaczny spadek w porównaniu z rokiem poprzednim. Najwięcej zakażeń zarejestrowano w województwie śląskim i mazowieckim. Na świecie najwięcej nowych zakażeń odnotowuje się w Afryce oraz w centralnej i wschodniej Azji. Największy odsetek zakażeń występuje w Egipcie i we Włoszech. Najmniejszy odsetek zachorowań odnotowywany jest w krajach Europy Zachodniej.

Liczba zakażonych w Polsce jest wyższa niż wskazują na to dane. Wynika to z niskiej wykrywalności, ponieważ często objawy pojawiają się nawet po kilkunastu latach i zazwyczaj są niecharakterystyczne. Działania zapobiegawcze ograniczają się do profilaktyki nieswoistej, gdyż nie ma skutecznej szczepionki przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C.

Aby zmniejszyć ilość zakażeń należy zwiększyć świadomość społeczeństwa dotyczącą choroby i sposobów zapobiegania zakażeniom. Ważne jest, aby krew, która zostanie użyta do transfuzji była odpowiednio przebadana na obecność wirusa. Ponadto należy szybko diagnozować osoby zakażone i możliwie jak najszybciej wdrażać leczenie, ponieważ w większości przypadków wystarczy wczesne zastosowanie leków przeciwwirusowych.

W najbliższych latach może dojść do wzrostu zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C. Wynika to z rozwoju cywilizacyjnego, dzięki któremu ludzie mogą szybko i tanio podróżować do innych krajów. Ze względu na to, iż Włochy i Egipt, w których odsetek zakażonych wirusem jest wysoki, są państwami często odwiedzanymi może dojść do nowych zakażeń wśród osób z innych krajów.

Literatura

- [1] Flisiak R, Halota W, Horban A, Juszczak J, Pawlowska M i wsp.: Analysis of risk factors related to HCV infection in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(12):1213-1217.
- [2] Juszczak J.: Piętnaście lat badań nad wirusem C zapalenia wątroby w Polsce. *Przeegl Epidemiol*. 2005;59(2):373-384.
- [3] Gocke DJ.: A prospective study of posttransfusion hepatitis. The role of Australia antigen. *JAMA*. 1972 Feb;219(9):1165-1170.
- [4] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW i wsp.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1982 Apr 21;44(4902):359-362.
- [5] Pfaender S, Walter S, Grabski E, Todt D, Bruening J i wsp.: Immune protection against reinfection with nonprimate hepacivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 21. doi: 10.1073/pnas.1619380114. [Epub ahead of print]
- [6] Younossi Z, Kallman J, Kincaid J.: The effects of HCV infection and management on health-related quality of life. *Hepatology*. 2007 Mar. doi: 10.1002/hep.21565.
- [7] Nitkiewicz J.: Epidemiologia molekularna wirusa przewlekłego zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przeegl Epidemiol*. 2004;58:413-421.
- [8] Darwish MA, Raouf TA, Rushdy P, Constantine NT, Rao MR i wsp.: Risk factors associated with a high seroprevalence of hepatitis C virus infection in Egyptian blood donors. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Oct;49(4):440-447.
- [9] Chung H, Kudo M, Kumada T, Katsushima S, Okano A i wsp.: Risk of HCV transmission after needlestick injury, and the efficiency of short-duration interferon administration to prevent HCV transmission to medical personnel. *J Gastroenterol*. 2003;38(9):877-879.
- [10] Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K i wsp.: Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1994 Mar 17. doi: 10.1056/NEJM199403173301103
- [11] Jain S, Goharkhay N, Saade G, Hankins GD, Anderson GD.: Hepatitis C in pregnancy. *Am J Perinatol*. 2007 Apr. doi: 10.1055/s-2007-970181
- [12] Gniadek A, Biegańska O, Cisek M.: Możliwość przeniesienia wirusa HCV i HBV z zakażonej matki na noworodka w okresie ciąży i karmienia - postępowanie pielęgniarskie. *Probl Pielęg*, 2008;15(1-2):118-122.

- [13] Ross RS, Viazov S, Thormahlen M, Bartz L, Tamm J i wsp.: Risk of hepatitis C virus transmission from an infected gynecologist to patients: results of a 7-years retrospective investigation. *Arch Intern Med.* 2002;162(7):805–810.
- [14] Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M i wsp.: Detection of antibody to HCV in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Eng J Med.* 1989 Nov 30. doi: 10.1056/NEJM198911303212202.
- [15] Brojer E.: Badania serologicznych i molekularnych markerów HCV u dawców krwi w Polsce. *Przeegl Epidemiol.* 2005;59:511-517.
- [16] Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, Kubicka-Russel D, Mikulska M i wsp.: Badania wirusów przenoszonych przez krew u dawców krwi w Polsce. *Przeegl Epidemiol.* 2015;69:591-595.
- [17] Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller HR, Shih JW i wsp.: A long-term study of HCV replication in non-A, non-B hepatitis. *N Eng J Med.* 1991 Jul 11. doi: 10.1056/NEJM199107113250205.
- [18] Rusmann S, Dowlatshahi EA, Printzen G, Habicht S, Reichen J i wsp.: Prevalence and associated factors of viral hepatitis and transferrin elevations in 5036 patients admitted to the emergency room of a Swiss university hospital: cross-sectional study. *BMC Gastroenterol.* 2007 Feb 5. doi:10.1186/1471-230X-7-5.
- [19] Morrill JA, Shrestha M, Grant RW.: Barriers to the treatment of hepatitis C. Patient, provider, and system factors. *J Gen Intern Med.* 2008 Aug. doi: 10.1111/j.1525-1497.2005.0161.x.
- [20] Zignego AL, De Carli M, Monti M, Careccia G, La Villa G i wsp.: HCV infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *J Med Virol.* 1995 Sep;47(1):58-64.
- [21] Sansonno D, Iacobelli AR, Cornachiulo V, Iodice G, Dammacco F.: Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 1996 Mar;103(3):414-421.
- [22] Barkhuizen A, Rosen HR, Wolf S, Flora K, Benner K i wsp.: Musculoskeletal pain and fatigue are associated with chronic hepatitis C: a report of 239 hepatology clinic patients. *Am J Gastroenterol.* 1999 May;94(5):1355-1360.
- [23] Johnson ME, Fisher DG, Fenaughty A, Theno SA.: Hepatitis C virus and depression in drug users. *Am J Gastroenterol.* 1998 May. doi: 10.1111/j.1572-0241.1998.225_a.x.

- [24] McCrea M, Cordoba J, Vessey G, Blei AT, Randolph C.: Neuropsychological characterization and detection of subclinical hepatic encephalopathy, *Arch Neurol*. 1996 Aug;53(8):758-763.
- [25] Weigand K, Stremmel W, Encke J.: Treatment of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007 Apr 7;13(13):1897–1905.
- [26] Strasfeld L, Lo Y, Netski D, Thomas DL, Klein RS: The association of hepatitis C prevalence, activity, and geno– type with HIV infection in a cohort of New York City drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Jul 1;33(3);356–364.
- [27] Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI.: Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002 Feb;35(2):440-446.
- [28] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV i wsp.: Genetic variation in I28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009 Sep 17. doi: 10.1038/nature08309. [Epub ahead of print]
- [29] McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL i wsp.: Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1061–1069.
- [30] Szatko F, Olszok I, Garus-Pakowska A.: Non-medical barriers in diagnosis and therapy of hepatitis C. *Probl Hig Epidemiol*. 2009;90(1):55-61.
- [31] Muratori L, Bogdanos DP, Muratori P, Lenzi M, Granito A i wsp.: Susceptibility to thyroid disorders in hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jun;3(6):595-603.
- [32] Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD.: Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013 Apr. doi: 10.1002/hep.26141. [Epub ahead of print]
- [33] Mahmud S, Al-Kanaani Z, Chemaitelly H, Chaabna K, Kouyoumjian SP i wsp.: Hepatitis C virus genotypes in the Middle East and North Africa: Distribution, diversity, and patterns. *J Med Virol*. 2018 Jan. doi: 10.1002/jmv.24921. [Epub ahead of print]
- [34] Kandeel A, Genedy M, El-Refai S, Funk A, Fontanet A i wsp.: The prevalence of HCV infection in Egypt 2015: implications for future policy on prevention and treatment. *Liver Int*. 2017 Jan. doi: 10.1111/liv.13186. [Epub ahead of print]
- [35] Elgharably A, Gomaa AI, Crossey MM, Norsworthy PJ, Waked I i wsp.: Hepatitis C in Egypt – past, present, and future. *Int J Gen Med*. 2016 Dec 20. doi: 10.2147/IJGM.S119301.
- [36] Strickland G.: Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*. 2006 May. doi: 10.1002/hep.21173

- [37] [37] Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR i wsp.: The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000 Mar 11;355(9207):887-891.
- [38] Leblebicioglu H, Arends JE, Ozaras R, Corti G, Santos L i wsp.: Availability of hepatitis C diagnostics and therapeutics in European and Eurasia countries. *Antiviral Res*. 2018 Feb. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.001. [Epub ahead of print]
- [39] Puoti M, Girardi E.: Chronic hepatitis C in Italy: the vanishing of the first and most consistent epidemic wave. *Dig Liver Dis*. 2013 May. doi: 10.1016/j.dld.2013.02.012. [Epub ahead of print]
- [40] Godzik P, Kołakowska A, Madaliński K, Stepień M, Zieliński A i wsp.: Prevalence of anti-HCV antibodies among adults in Poland - results of crosssectional study in general population *Przegl Epidemiol*. 2012;66(4):575-580.
- [41] Zieliński A, Rosińska M.: The problem of elimination of HCV infections in Poland. *Przegl Epidemiol*. 2017;71(1):3-14.



INSTYTUT PROMOCJI
KULTURY I NAUKI

Instytut zaprasza do współpracy przy:

- przygotowaniu i publikacji monografii
- organizacji i obsłudze konferencji, warsztatów
oraz szkoleń
- wykonywaniu tłumaczeń i korekt tekstów

www.ipkn.edu.pl



INSTYTUT PROMOCJI KULTURY I NAUKI DR JERZY BEDNARSKI

ul. Bohdana Dobrzańskiego 3, 20-262 Lublin

kontakt@ipkn.edu.pl