

Biomedycyna
badania, diagnostyka, leczenie

Biomedicine
research, diagnostic, treatment

2



Redakcja
Monika Olszówka
Kamil Maciąg
Mirosław Szala

Politechnika Lubelska
Lublin 2014

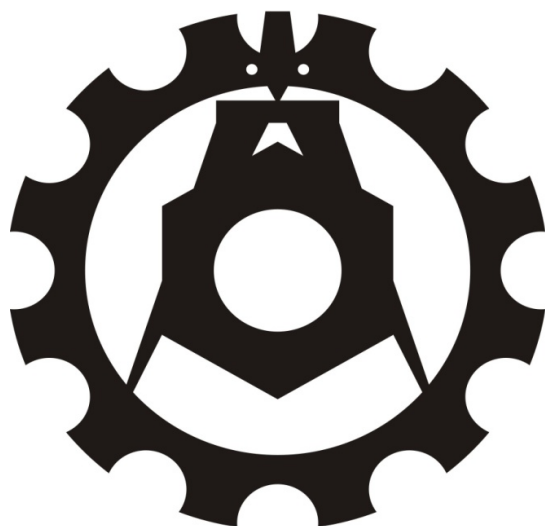
Biomedycyna **badania, diagnostyka, leczenie**

Biomedicine
research, diagnostic, treatment

2

Politechnika Lubelska

Wydział Mechaniczny



Biomedycyna **badania, diagnostyka, leczenie**

Biomedicine
research, diagnostic, treatment

2

redakcja
Monika Olszówka
Kamil Maciąg
Mirosław Szala



Politechnika Lubelska
Lublin 2014

Recenzenci:

prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

dr hab. n. med. Halina Antosz

dr hab. n. med. Piotr Kopiński

dr hab. n. med. Maciej Szajner

dr hab. Roman Paduch

dr hab.n.med. Rafał Tarkowski

dr hab. Roman Paduch

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2014

ISBN 978-83-7947-044-0

Wydawca: Politechnika Lubelska

ul. Nadbystrzycka 38D, 20-618 Lublin

Realizacja: Biblioteka Politechniki Lubelskiej

Ośrodek ds. Wydawnictw i Biblioteki Cyfrowej

ul. Nadbystrzycka 36A, 20-618 Lublin

tel. (81) 538-46-59, email: wydawca@pollub.pl

www.biblioteka.pollub.pl

Druk: TOP Agencja Reklamowa Agnieszka Łuczak

www.agencjatorp.pl

Elektroniczna wersja książki dostępna w Bibliotece Cyfrowej PL www.bc.pollub.pl

Nakład: 50 egz.

SPIS TREŚCI

Czy uzależnienie od alkoholu może być zapisane w genach?.....7

Magdalena Osiak, Natalia Pająk, Dorota Choroszyńska

Komórki dendrytyczne z allogenicznym RNA jako potencjalne narzędzie terapeutyczne w terapii genowej raka płuca 19

Joanna Wielikdzień, Karina Szablowska, Tomasz Wandtke, Maciej Gawroński

Manifestacje kardiologiczne tocznia noworodkowego – patogenezą, matczyne i płodowe czynniki ryzyka złego rokowania, zapobieganie oraz leczenie31

*Paulina Mulawka, Dominika Mulawka, Katarzyna Schab,
Magdalena Amarowicz, Marcin Urbańczuk, Lidia Kotuła*

Paszport biologiczny jako narzędzie diagnostyki antydopingowej39

*Arkadiusz Macheta, Agnieszka Szymczyk, Dorota Choroszyńska,
Justyna Markowicz, Tomasz Roman*

Problemy diagnostyczne u pacjentów po tępych urazach serca49

*Adam Iwaniuk, Paulina Pawlik, Anna Szajerska, Paweł Binko, Milena Karpiarz,
Joanna Horbaczewska, Elżbieta Mazur-Stążka*

Prokalcytonina, a rokowania w sepsie – opis przypadku.....61

Katarzyna Gałasziewicz, Agata Zwierz, Aleksandra Woś

Tkanka kostna – budowa, funkcje i metabolizm73

Aleksandra Żurek, Maciej Frant, Arkadiusz Czerwonka, Barbara Zdzińska

Żyłki powrózka nasiennego - diagnostyka oraz przegląd współczesnych metod leczenia, ze szczególnym uwzględnieniem zabiegów wewnątrznaczyniowych89

Tomasz Roman, Justyna Markowicz, Agnieszka Szymczyk, Arkadiusz Macheta

CZY UZALEŻNIENIE OD ALKOHOLU MOŻE BYĆ ZAPISANE W GENACH?

1. Wprowadzenie

Etanol, będący produktem beztlenowej fermentacji cukrów przez drożdże, jest znanym i szeroko stosowanym składnikiem wielu napojów [1, 2]. Jest małą cząsteczką, która jest szybko absorbowana w jelitach i jest rozprowadzana w każdą część ciała [2]. Poważnym problemem współczesnych społeczeństw jest rozpowszechnienie zwyczaju picia alkoholu, nawet w umiarkowanych ilościach, oraz uzależnienie od alkoholu z utratą kontroli picia [1]. Następstwa zdrowotne, które wynikają z alkoholizmu są bardzo różnorodne. Toksyczne działanie alkoholu może mieć wpływ na większość narządów w organizmie [2]. Zmiany wynikające z nadużywania tej substancji stwierdza się praktycznie we wszystkich układach. Powszechnie znane są przede wszystkim zmiany w OUN, oraz zapalenie i marskość wątroby w wyniku nadużywania alkoholu [1].

Alkohol etylowy (podobnie jak barbiturany, czy opioidy) wywołuje silną zależność fizyczną i psychiczną. Zależność fizyczna jest związana ze złożonymi zmianami neuroadaptacyjnymi. Przyczyniają się one do rozwoju procesów, które prowadzą do przewagi mechanizmów pobudzających (aktywacja psychoruchowa i emocjonalna, obniżenie progu drgawkowego). Charakterystyczne jest tutaj pojawienie się zespołu abstynencyjnego, w okresie odstawienia alkoholu. Wynika on z rozwoju zmian neuroadaptacyjnych, które polegają na zaburzeniu równowagi pomiędzy różnymi układami neuroprzebieżnikowymi. Prowadzi to do osłabienia oddziaływań systemów hamujących np.: układu GABA-ergicznego i zwiększenia wpływu oddziaływań aminokwasów aktywujących (kwasu glutaminowego poprzez receptor typu NMDA) [3]. Z kolei uzależnienie psychiczne polega na utracie kontroli nad nałogiem i przymusie przyjęcia środka uzależniającego. Związane jest to z zaburzeniem funkcji tzw. układu nagrody (*reward system*), czyli systemu neuronów odpowiedzialnych za odczucia subiektywne indukowane bodźcami mającymi znaczenie

¹ magdalenaosia@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, <http://www.am.lublin.pl/uczelnia/dzialalnosc-uslugowa-jednostek-uczelni/zaklad-genetyki-klinicznej-katedry-genetyki-medycznej/>;

² natalia.pajak@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, <http://www.am.lublin.pl/uczelnia/dzialalnosc-uslugowa-jednostek-uczelni/zaklad-genetyki-klinicznej-katedry-genetyki-medycznej/>;

³ dorota.ch.um@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, <http://www.am.lublin.pl/uczelnia/dzialalnosc-uslugowa-jednostek-uczelni/zaklad-genetyki-klinicznej-katedry-genetyki-medycznej/>;

"pozytywnie wzmacniające" (nagradzające). Szczególną rolę odgrywają tutaj neurony dopaminergiczne układu limbicznego, odpowiedzialne za regulację procesów motywacji i emocji [3, 4, 5].

2. Etanol a neurotransmitery

Powszechnie badane są właściwości etanolu, powodujące wytworzenie uzależnienia. Etanol ma wpływ na szereg neurotransmiterów w mózgu, co prowadzi do rozwoju uzależnienia. Spożycie alkoholu prowadzi do spotęgowania hamującego przekąźnictwa w kanałach wykorzystywanych przez GABA (kwas gamma-aminomasłowy), wzmożonej czynności serotoniny (5HT-3), uwalniania dopaminy i transmisji w receptorach opioidowych. Powoduje także ograniczenie pobudzającego przekąźnictwa w receptorach glutaminowych typu NMDA. Jednym z najsilniejszych skutków działania alkoholu jest zmniejszenie ogólnego poziomu aktywności mózgu. Zjawisko to zachodzi w wyniku łącznego wpływu alkoholu na dwa kluczowe neuroprzekąźniki: GABA i glutaminian. Alkohol wzmacnia aktywność GABA, który jest głównym neuroprzekąźnikiem hamującym w mózgu, a jednocześnie redukuje pobudzający wpływ kwasu glutaminowego. Głównie te oddziaływania powodują, że alkohol jest często uznawany za depresant. Działanie alkoholu na GABA jest podobne do działania leków uspokajających takich jak benzodiazepiny i ma właściwości uspokajające i anksjolityczne (przeciwlękowe) [6, 7].

Po przyjęciu jednorazowej dawki alkoholu, uwalniane zostają β -endorfiny i enkefaliny, pobudzając tym samym receptory opioidowe. Wskutek tego pojawia się euforia, dobre samopoczucie i zmniejszenie lęku. Niestety w przypadku przewlekłego spożywania alkoholu i jego odstawienia lęk narasta [7].

3. Objawy pojawiające się po spożyciu alkoholu

Wpływ alkoholu na centralny układ nerwowy, powoduje zaburzenia w zachowaniu osoby go spożywającej. Dochodzi do osłabienia sprawności coraz to niższych struktur OUN (kora, ośrodki podkorowe), co przejawia się różnymi symptomami. Objawy te zależą między innymi od ilości i mocy wypitego trunku, od ilości i rodzaju jedzenia spożytego podczas picia alkoholu, od szybkości i częstości spożywania alkoholu, a także od czasu jaki upłynął od zakończenia spożycia [8,9]. Objawy kliniczne zatrucia etanolem zależą od jego stężenia we krwi, na którego podstawie wyróżnia się kilka faz:

- Faza trzeźwości (0,1-0,2‰) charakteryzuje się brakiem widocznych objawów, ale osoba może wykazywać nadmiernie dobre samopoczucie, mieć rozproszona uwagę i dłuższe spostrzeganie;
- W fazie euforycznej (0,2-1,0‰) występują drobne zaburzenia równowagi i koordynacji, gorsze spostrzeganie kształtu przedmiotów w oddali, nadmierna pewność siebie. Spowolnienie refleksu, zmniejszenie ostroż-

ności i zdolności rozpoznawania sytuacji, niestabilność emocjonalna, upośledzenie uwagi i koordynacji wzrokowo-ruchowej, pogorszenie ostrości widzenia, opóźnienie czasu reakcji na nowe bodźce wzrokowe, znaczne obniżenie samokontroli i koncentracji, zmniejszenie zdolności przyswajania oraz zapamiętywania szczegółów. Ponadto zostaje utracona zdolność dokładnej analizy. Pojawiają się zaburzenia czynności centralnego układu nerwowego;

- Przy stężeniu alkoholu we krwi w granicach 1,0-2,0‰ wyróżnia się fazę pobudzenia. Charakterystyczne tu jest zaburzenie koordynacji mięśniowej i równowagi, upośledzające koordynację ruchów. Zawroty głowy, ograniczenie funkcji wzroku, słuchu. Wzrost ospałości, osłabienie sprawności intelektualnej i pamięci, chaos myślowy, brawura, euforia, agresja. Zaburzenie sfery uczuć, wrażliwości na ból, a także zdolności poruszania się;
- W fazie dezorientacji (2,0-3,0‰) charakterystyczna jest niewyraźna i bełkotliwa mowa. Powyżej 3,0‰ dochodzi do zaniku orientacji w zachodzących wydarzeniach. Spada ciśnienie krwi, temperatura ciała ulega obniżeniu, możliwy jest powolny zanik funkcji oddechowych, apatia, bezwładność, wymioty;
- W fazie porażennej (4‰ i powyżej) pojawia się sen narkotyczny, zniesienie czucia, drgawki, szczękocisk, błądzenie, zanik odruchów prostych, porażenie ośrodków oddychania i krążenia, skutkujące śmiercią.

4. Metabolizm alkoholu

Wyróżnia się trzy fazy działania alkoholu: fazę resorpcyjną (wchłaniania), fazę wyrównywania stężenia oraz fazę spalania i eliminacji alkoholu w organizmie [8]. W fazie pierwszej ma miejsce najsilniejsze działanie alkoholu. Średni czas do osiągnięcia szczytu stężenia alkoholu we krwi jest bardzo różny, przyjmuje się że jest osiągany po 30 a nawet 60 minutach od spożycia (u kobiet wynosi on średnio 42 minuty, natomiast u mężczyzn 57 minut) [8]. Faza wchłaniania następuje około 30 minut po zakończeniu picia, przyjmując, że żołądek nie jest wypełniony pokarmem. W sytuacji wypełnienia żołądka pokarmem, faza ta znacznie się wydłuża (90-120 minut). Związane jest to ze zwolnionym transportem alkoholu w przewodzie pokarmowym. Na stopień wchłaniania wpływ ma nie tylko obecność bądź brak pokarmu w żołądku, ale także wielkość pierwszej dawki i stężenie konsumowanego alkoholu. Okazuje się, że najszybciej wchłaniane są alkohole 15-30%, a zarówno te słabsze, jak i mocniejsze są znacznie wolniej absorbowane. W przypadku niższych stężeń, najprawdopodobniej jest to związane ze spowolnieniem procesów dyfuzyjnych roztworów bardziej rozcieńczonych. Z kolei przy roztworach alkoholowych o wyższym stężeniu, dochodzi do zmian właściwości śluzówki przewodu pokarmowego, tym samym zwolniona zostaje perystaltyka, co skutkuje wolniejszym transportem alkoholu do kolejnych odcinków przewodu

pokarmowego. Okazuje się, że opóźniająco na szybkość wchłaniania etanolu wpływają sole mineralne, węglowodany i alkaloidy, zawarte w różnych napojach alkoholowych [8]. Etanol jest bardzo łatwo rozpuszczalny w wodzie [8, 9]. Po spożyciu, szybko wchłania się przez śluzówkę żołądka i jelit, po czym przechodzi do krwiobiegu. Narządy, które są najsilniej ukrwione, ulegają najszybszemu wysyceniu alkoholem. Alkohol etylowy przemieszczając się z krwią, jest rozmieszczany praktycznie do każdej części ciała i wysyca tkanki, w sposób proporcjonalny do stopnia ich uwodnienia [8]. Bardzo łatwo przenika przez barierę krew – mózg, a także wnika do innych narządów. Głównie dochodzi do uszkodzenia nerek i mózgu [6].

W końcowym okresie wchłaniania stężenie alkoholu w tkankach osiąga stan równowagi, przy czym we krwi jego stężenie przestaje wzrastać. Po osiągnięciu maksymalnego stężenia alkoholu we krwi, jego zawartość zaczyna powoli spadać. Faza wyrównywania stężeń zwykle trwa od 5 do 20 minut. Jest momentem przejściowym pomiędzy fazą wchłaniania a fazą eliminacji. Może on przebiegać łagodnie, z utrzymującym się przez jakiś czas, stałym stężeniem alkoholu, bądź może być to bardzo krótki czas [8].

Główną metodą eliminacji alkoholu etylowego z ciała (około 90-95%), jest szlak metabolizmu etanolu w cytozolu hepatocytów. Przebiega on z udziałem enzymów dehydrogenazy alkoholowej (ADH), a następnie dehydrogenazy aldehydowej. Pośrednimi produktami przemian są aldehyd octowy i kwas octowy, natomiast końcowymi – dwutlenek węgla i woda [1, 6, 9].



Rys. 1. Uproszczony schemat metabolizmu etanolu

Enzymy te występują także w komórkach błony śluzowej żołądka, a zachodzący tu metabolizm alkoholu ma zarówno działanie ochronne (zmniejszające dostępność biologiczną związku), jak i przyczynia się do uszkodzenia błony śluzowej żołądka (przede wszystkim przy nadużywaniu alkoholu i pojawieniu się dużej ilości pośredniego, toksycznego metabolitu – aldehydu octowego) [1]. Drugim szlakiem metabolicznym jest mikrosomalny system utleniania alkoholu (MEOS – *microsomal ethanol oxidizing system*). Zlokalizowany jest w siateczce endoplazmatycznej hepatocytów, a jego najważniejszym enzymem jest cytochrom P-450 (CYP2E1). Aktywność tego szlaku znacznie zwiększa się pod wpływem przewlekłego spożywania alkoholu. Trzecim szlakiem metabolizmu etanolu jest układ katalazy, który umiejscowiony jest w peroksosomach. Katalaza rozkłada etanol do aldehydu octowego przy udziale nadtlenku wodoru (H₂O₂). W mniejszym stopniu metabolizm alkoholu zachodzi także drogą nieenzymatycznej oksydacji, zależnej od żelaza i rodników

hydroksylowych, oraz szlakami nieoksydacyjnymi, poprzez estryfikację wolnych kwasów tłuszczowych, sprzęganie z kwasem siarkowym i glukuronowym [1]. W niezmienionej postaci, usuwane z ustroju jest tylko ok. 5% etanolu. Usuwany jest on przez nerki z moczem, układ oddechowy z wydychanym powietrzem i poprzez skórę z potem [1, 6, 9].

5. Kierunki rozwoju badań nad alkoholizmem

Od lat trwają badania nad określeniem czynników wywołujących uzależnienie od alkoholu. Z otrzymanych danych wiadomo, że alkoholizm jest nie tylko skutkiem wpływu środowiska, ale po części ma charakter genetyczny [10]. Gdy poznamy czynnik, który podlega dziedziczeniu oraz oddziaływanie pomiędzy tym co genetyczne i tym, co nabyte, będzie można wyodrębnić grupę ryzyka podatną na alkoholizm. Stanowi to początek do skutecznych strategii zapobiegania problemom alkoholowym zarówno na płaszczyźnie farmakologicznej jak i behawioralnej.

Podłoże uzależnień, w tym uzależnienie od alkoholu, mieści się w mózgu. Fizyczne efekty działania alkoholu są spowodowane jego wpływem na komunikację międzyneuralną. Najważniejszą rolę odgrywają tutaj neuroprzekaźniki oraz ich receptory. Uwolnienie neurotransmitera do przestrzeni synaptycznej powoduje aktywację specyficznego receptora w obrębie błony postsynaptycznej, a tym samym przekaz sygnału pomiędzy neuronami. Długotrwałe przyjmowanie alkoholu wywołuje zmiany w obrębie tych struktur, a przez to u osób podatnych, skutkuje rozwojem alkoholizmu. Uzależnienie to zakłócenie równowagi pomiędzy dwoma głównymi układami neurotransmiterów w mózgu: układu dopaminergicznego (nagrody) oraz układu serotonergicznego (kary). Osoby uzależnione od alkoholu posiadają zaburzoną aktywność tych dwóch układów na korzyść układu nagrody, rola układu kary u tych osób jest marginalna [11]. Dlatego głównym przedmiotem badań nad alkoholizmem stały się geny dla neurotransmiterów oraz ich receptory [11].

Określono, że 50-60 % ryzyka popadnięcia w alkoholizm jest zdeterminowana genetycznie [12, 13]. W celu poszukiwania genów odpowiedzialnych za rozwój uzależnienia, badaniom podawano początkowo gryzonie, u których inaktywowano lub całkowicie eliminowano wybrany gen [14]. Porównując reakcje na alkohol zwierząt transgenicznych i zwierząt niezmienionych genetycznie, określono rolę poszczególnych genów jako czynników wpływających na specyficzne zachowania wywołane przez alkohol [15, 16]. Na podstawie takich badań wyodrębniono u myszy dwa geny, które wiążą się z podwyższoną preferencją alkoholu. Pierwszym z nich jest neuropeptyd Y (NPY), który wpływa na wiele procesów zależnych od OUN min. za spożycie etanolu oraz zachowania lękowe [17]. Gen dla tego neurotransmitera jest zlokalizowany w chromosomie 7 (7p15.1). U szczurów, którym wyciszono gen dla NPY, zaobserwowano zwiększoną preferencję

alkoholu, w porównaniu do typu dzikiego. Natomiast w populacji szczurów zezwieszoną ekspresją NPY odnotowano spadek ilości spożytego alkoholu, porównując z typem dzikim. NPY wydaje się znaczącym czynnikiem, który należy brać pod uwagę badając podłoże uzależnienia [18]. Kolejnym istotnym genem jest gen kodujący receptor μ -opiodowy (6q25.2). Receptor μ -opiodowy występuje powszechnie w OUN zarówno na błonach *pre-* jak i *post-*synaptycznych. Pełni on rolę w regulacji odczuwania bólu i adaptacji do zmian środowiska. Na podstawie badań neurofarmakologicznych wykazano, że antagoniści receptora opiodowego przyczyniają się do zmniejszenia spożywanej ilości alkoholu wśród badanych gryzoni [19]. Te badania pokrywają się z wcześniejszymi spostrzeżeniami Schuckita [20], który stwierdził, że niska wrażliwość na spożywany alkohol jest oznaką przyszłego rozwoju uzależnienia.

5.1. Geny odpowiedzialne za alkoholizm u ludzi

Opierając się na wielu badaniach, wywnioskowano, że geny warunkujące aktywność neurotransmiterów takich jak kwas gamma-aminomasłowy (GABA) i serotonina prawdopodobnie są po części odpowiedzialne, za ryzyko występowania uzależnienia od alkoholu u ludzi. W związku z tym poddano badaniom grupę mężczyzn, u których analizowano kilka genów związanych z tymi neurotransmiterami. Wykrycie specyficznych wariantów genów receptorów dla serotoniny (5-HT2A, 5-HT2C) oraz receptora GABA α 6 u grupy mężczyzn wiązało się z ich podwyższoną tolerancją na alkohol (już w wieku 20 lat) co spełniało kryteria uzależnienia [21]. Kolejne badanie na grupie studentów posiadających wariant genu kodującego krótszą formę transportera serotoniny (5HTTLRR), wykazało, że osoby te jednorazowo spożywały więcej alkoholu. Dodatkowo u tej grupy studentów obserwowano częste zjawisko upijania się z premedytacją, częstsze popadanie w tzw. „ciągi” w porównaniu do studentów z innym wariantem tego genu [22]. W innym badaniu badającym polimorfizm w obrębie katecholo-O-metylotransferazy (odpowiadającej za degradację dopaminy i noradrenaliny) odnotowano zwiększoną podatność na lęk oraz alkoholizm u kobiet [23].

Podobnie jak na modelu zwierzęcym [19] u ludzi godnym uwagi są receptory opiodowe (szczególnie μ -opiodowy) oraz ich antagonistą naltrekson. Podawanie naltreksonu pomaga niektórym uzależnionym pacjentom ograniczyć spożywanie alkoholu. To, że nie wszyscy pacjenci reagowali na pozytywny wpływ naltreksonu, było związane z występowaniem licznych polimorfizmów w obrębie genów dla receptorów μ -opiodowych [24]. Wzajemne relacje pomiędzy genami neuroprzekazników a uzależnieniem od alkoholu są skomplikowane i nie wszystkie badania wykazują związek pomiędzy tymi genami, a ryzykiem alkoholizmu. Dlatego potrzebne są dalsze badania w tym temacie, gdyż mogą one wnieść ogromną wiedzę w profilaktykę uzależnień.

Tolerancja i wrażliwość na alkohol jest również zależna od zmian związanych z enzymami wątrobowymi odpowiedzialnymi za metabolizm etanolu. Mutacje u obrębie genów dla dehydrogenazy alkoholowej i aldehydowej powodują wzrost stężenia toksycznych metabolitów, w szczególności aldehydu octowego, który powoduje zaczerwienienie skóry, mdłości oraz przyspieszone tętno. Takie mutacje występują częściej u Azjatów w porównaniu z innymi populacjami, a przez to wskaźniki spożywania oraz uzależnienia od alkoholu są odpowiednio niższe w tej grupie etnicznej [25, 26].

5.2. Psychiczne podłoże uzależnień

Amerykański uczony Robert Cloninger dokonał istotnej analizy porównując alkoholizm uwarunkowany środowiskowo i uwarunkowany rodzinie, a także powiązał cechy osobowości uzależnionego z aktywnością układów neuroprzekątnikowych. Alkoholizm został podzielony przez tego uczonego na dwa typy: typ I – charakterystyczny głównie dla kobiet ok. 25 roku życia, nie mający podłoża genetycznego i typ II – występujący szczególnie u mężczyzn, związany z czynnikami genetycznymi. W obu typach zaznaczają się również cechy osobowości występujące przed uzależnieniem. Osoby uzależnione typu I, są introwertyczne, podatne na stany lękowe, depresje, a także uzależniają się od wzorców społecznych. Takie kobiety najczęściej wychowywane były w dużej dyscyplinie i późno zaczęły spożywać alkohol. Alkoholicy typu II to z kolei ekstrawertycy z tendencją do antyspołecznych zachowań [27]. Prace amerykańskiego naukowca okazały się bardzo pomocne w badaniach nad uzależnieniem, teorie te łącząc z czynnikami genetycznymi jeszcze dokładniej charakteryzują podłoże alkoholizmu.

5.3. Markery przewlekłego spożywania alkoholu

Uzyskanie od osoby uzależnionej informacji na temat ilości spożywanego alkoholu jest bardzo trudne, gdyż nie podają one faktycznych ilości, dlatego istotne jest wykorzystanie markerów biochemicznych w celu uzyskania obiektywnych dowodów na długotrwałe picie. Markery takie pojawiają się we krwi uzależnionego od kilku tygodni do nawet kilku miesięcy (w zależności od przyjmowanej dawki alkoholu). Ich poziom możemy oznaczyć za pomocą prostych testów biochemicznych [28].

Najbardziej powszechnym markerem jest enzym gamma-glutamyl transferaza (GGT), która odpowiada za przenoszenie na akceptory peptydowe reszt γ -glutamylowych glutationu. GGT to enzym błon komórkowych wielu tkanek. Największe stężenie tego enzymu występuje w hepatocytach oraz w komórkach nabłonka przewodów żółciowych. To właśnie stąd jest uwalniana w wyniku szkodliwego działania alkoholu. U osób nieuzależnionych/zdrowych GGT we krwi oznaczany jest w śladowych ilościach. W przypadku długotrwałej konsumpcji (ok 5 tygodniowej) w ilości 50-60g dziennie aktywność GGT wzrasta

10 krotnie i utrzymuje się we krwi ok 4-5 tygodni. Nie jest to jednak swoisty marker, poziom GGT może również wzrastać pod wpływem leków, złej diety, chorób dróg żółciowych, palenia papierosów i innych czynników uszkadzających wątrobę [29].

Aminotransferaza asparaginainowa (AST) i alaninowa (ALT) są kolejnymi enzymami wątrobowymi pomocnymi w diagnozowaniu uszkodzenia wątroby na skutek nadużywania alkoholu. ALT jest zlokalizowana w cytoplazmie hepatocytów, natomiast AST występuje głównie w mitochondriach (80%). Poza wątrobą aktywność AST możemy stwierdzić w sercu, nerkach, mięśniach szkieletowych oraz mózgu. Koenzymem tych enzymów jest pochodna witaminy B6 (fosforan pirydoksalu). Na skutek nadmiernego spożywania alkoholu występują niedobory fosforanu pirydoksalu prowadząc do zmniejszenia aktywności ALT w stosunku do AST. Zjawisko to zostało wykorzystane do określenia tzw. wskaźnika de Rittisa (AST/ALT), którego wartość powyżej 1,5 świadczy o uszkodzeniu wątroby, a powyżej 2 jest niemal pewnym potwierdzeniem uszkodzenia wątroby na skutek nadużywania alkoholu. Oznaczając AST i ALT należy również pamiętać o wielu innych czynnikach wpływających na wzrost ich aktywności. Bardziej specyficznym markerem dla poalkoholowego uszkodzenia wątroby jest oznaczenie mAST czyli frakcji AST znajdującej się w mitochondriach. Podwyższona aktywność mAST w odniesieniu do całkowitej ilości AST pozwala z większą pewnością postawić diagnozę, że uszkodzenie wątroby powstało na skutek przyjmowania dużych dawek alkoholu [30].

Innym markerem jest wzrost średniej objętości krwinek czerwonych (MCV). Zjawisko to określane mianem anemii makrocytarnej jest charakterystyczne dla 4 % populacji, z czego 65 % przypadków jest związana z nadużywaniem alkoholu. Hemetotoksyczne działanie na krwinki czerwone okazuje się mieć nie tylko alkohol etylowy, ale również jego metabolity. Zwiększają one przepuszczalność błony komórkowej erytrocytu, zaburzają metabolizm prowadząc do zwiększonej podatności na hemolizę. MCV może być również podwyższone na skutek niedoboru kwasu foliowego, który jest częsty u alkoholików. Do wzrostu MCV dochodzi dość późno, bo po ok. miesiącu wzmożonego spożywania alkoholu (ponad 60g/dzień). Jest to dość specyficzny marker, który może wskazać stan przewlekłego spożywania alkoholu nawet po kilku miesiącach od zaprzestania jego konsumpcji [28].

Ubogowęglowodanowe izoformy transferyny (tzw. transferyna desialowana) – CDT są stosunkowo nowym markerem charakteryzującym się większą czułością i specyficznością od pozostałych. W normie odsetek CDT jest bardzo niski, w przypadku nadużywania alkoholu następuje zwiększenie ilości tego markera we krwi. Zarówno sam etanol jak i jego metabolity powodują przyłączanie się mniejszej ilości cząsteczek kwasu sialowego do transferyny, poprzez modyfikację enzymów katalizujących ten proces. Zaburzona zostaje również funkcja receptorów eliminujących cząsteczki transferyny desialowanej.

Wzrost CDT następuje po przynajmniej tygodniowym przyjmowaniu dużych dawek (50-80g) alkoholu dziennie. Wynik powraca do normy po kilkutygodniowym odstawieniu spożywania [29].

Uwagę poświęcić należy także fosfatydyloetanolowi (PEth). Jest to związek powstający w wyniku połączenia etanolu z fosfolipidami błony komórkowej. Pojawienie się tego markera we krwi następuje po co najmniej trzytygodniowym spożywaniu alkoholu w dawkach powyżej 40g /dobę. Utrzymuje się do 2 tygodni od zaprzestania picia. Należy jednak pamiętać o niedoskonałości tego markera, który może być syntetyzowany *in vitro* w próbce krwi zawierającej etanol [30].

Żaden z wymienionych czynników nie pozwala postawić 100% diagnozy przewlekłego nadużywania alkoholu. Stosowanie kombinacji tych parametrów oraz dokładny wywiad, może dużo wnieść do diagnostyki uzależnienia.

6. Podsumowanie

Nadmierne spożywanie alkoholu wywiera negatywny wpływ na cały organizm, w szczególności na OUN, prowadząc często do nieodwracalnych zmian na płaszczyźnie fizycznej i psychicznej. Określa się, że u 50-60% osób uzależnienie od alkoholu ma podłoże genetyczne. Najważniejszą rolę okazują się mieć tutaj geny dla receptorów serotoniny, GABA oraz receptorów μ -opiodowych. W rozwoju uzależnienia czynniki genetyczne odgrywają większą rolę u mężczyzn, natomiast u kobiet przeważają czynniki psychologiczne. Obiektywną informacją na temat ilości spożywanego alkoholu jest poziom markerów biochemicznych, między innymi GGT, AST, ALT, MCV czy CDT. Kombinacja tych markerów jest pomocna w diagnostyce nadużywania alkoholu oraz monitorowaniu abstynencji.

Alkoholizm jest problemem bardzo złożonym i wymaga analizy na wielu płaszczyznach. Wyodrębnienie grup ryzyka na podstawie markerów genetycznych, biochemicznych i psychologicznych jest pierwszym i podstawowym krokiem do walki z tym zjawiskiem.

Literatura

1. Kłopotcka M., Budzyński J. i Świątkowski M. *Wpływ przewlekłego nadużywania alkoholu na morfologiczne i czynnościowe zmiany w przewodzie pokarmowym*, Wiadomości Lekarskie, 2004 vol. 11-12, s. 672-678;
2. *Alcohol dependence and harmful alcohol use*. 2011, Dostępny w World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0042155/>;
3. Kostowski W. *Postępy farmakoterapii uzależnienia od alkoholu etylowego*, Alkoholizm i Narkomania, 1997 vol. 4, s. 549-564;
4. Koob G.F., *Neurobiological sites or drug dependence*. Excerpta Medica, 1991 vol. 2, s. 36-40;
5. Little H.J., *Mechanisms that may underlie the behaviorol effects of ethanol*, Progres in Neurobiology, 1991 vol. 36, s.171-194;

6. *Alcohol-use disorders. Diagnosis, assessment and management of harmful drinking and alcohol dependence*, Red. Hunt S.L., Great Britain, The British Psychological Society & The Royal College of Psychiatrists, 2011;
7. Artykuł [online] Dostępny w World Wide Web:
<http://home.elka.pw.edu.pl/~iwindyga/referaty/alkoholizm%20praca.pdf>;
8. Ostaszewska I., *Wpływ alkoholu na sprawność psychomotoryczną człowieka – cz. I*, Laboratorium, 2013, vol.7-8, s.34-36;
9. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W., *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Wydanie III poprawione i uzupełnione, Wrocław, Elsevier Urban & Partner, 2010;
10. Heath A.C., Bucholz K.K., Madden P. *Genetic and environmental contributions to alcohol dependence risk in a national twin sample: Consistency of findings in women and men*, Psychological Medicine, 1997 vol. 27, s.1381–1396;
Od genów do geografii: wyznaczanie kierunków rozwoju badań nad alkoholizmem,
11. Alkohol i Nauka 2001. Dostępny w World Wide Web:
<http://www.psychologia.edu.pl/czytelnia/51-alkohol-i-nauka/248-od-genow-do-geografii-wyznaczanie-kierunkow-rozwoju-badan-nad-alkoholizmem.html>;
12. Heath, A.C.; Bucholz, K.K.; Madden, P.A.F. Dinwiddie S.H., Slutske W.S., Bierut L.J., Statham D.J., Dunne M.P., Whitfield J.B., Martin N.G., *Genetic and environmental contributions to alcohol dependence risk in a national twin sample: Consistency of findings in women and men*, Psychological Medicine, 1997 vol. 27, s.1381-1396;
13. Heath A.C., Martin N.G., *Genetic influences on alcohol consumption patterns and problem drinking: Results from the Australian NH&MRC twin panel follow-up survey*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1994 vol. 708, s.72-85;
14. Wehner J.M., Bowers B.J., *Use of transgenics, null mutants, and antisense approaches to study ethanol's actions*, Alcohol Clin Exp Res, 1995 vol.19, s.811-820;
15. Crabbe J.C., *Genetic modification as a tool for the study of behavioral consequences of signaling processes*, MD NIAAA, 2000 s. 137-144;
16. Anders D.L., Blevins T., Smothers C.T., Woodward J.J., *Reduced ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by deletion of the NR1 C0 domain or overexpression of alpha-actinin-2 proteins*, The Journal of Biological Chemistry, 2000 vol. 275, s. 15019-15024;
17. Bobińska K., Szemraj J., Pietras T., Zboralski K., Gałęcki P., *Neuropeptyd Y – budowa, receptory, działanie i miejsce w psychiatrii*, Psychiatria Polska, 2008 vol. 6, s. 889–901;
18. Hwang B.H., Zhang J.K., Ehlers C.L., Lumeng L., Li T.K., *Innate differences of neuropeptide Y (NPY) in hypothalamic nuclei and central nucleus of the amygdala between selective lybred rats with high and low alcohol preference*, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1999 vol. 23, s.1023-1030;
19. Roberts, A.J.; McDonald, J.S.; Heyser, C.J., Kieffer B.L., Matthes H.W., Koob G.F., Gold L.H., *mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000 vol. 293, s.1002-1008;
20. Schuckit M.A., *Biological, psychological and environmental predictors of the alcoholism risk: A longitudinal study*, Journal of Studies on Alcohol, 1998 s. 59485-494;
21. Schuckit M.A., Mazzanti C., Smith, T.L., Ahmed U., Radel M., Iwata N., Goldman D., *Selective genotyping for the role of 5-HT2A, 5-HT2C, and GABA α 6 receptors*

- and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: A pilot study, *Biological Psychiatry*, 1999 vol.45, s. 647-651;
22. Herman A.I., Philbeck J.W., Vasilopoulos N.L., Depetrillo P.B., *Serotonin transporter promoter polymorphism and differences in alcohol consumption behaviour in a college student population*, *Alcohol and Alcoholism*, 2003 vol. 38, s. 446-449;
 23. Enoch M.A., Xu K., Ferro, E., Harris C.R., Goldman D., *Genetic origins of anxiety in women: A role for a functional catechol-O-methyl transferase polymorphism*, *Psychiatric Genetics*, 2003 vol. 13, s. 33-41;
 24. Oslin D.W., Berrettini W., Kranzler H.R., *A functional polymorphism of the μ -opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients*, *Neuropsychopharmacology*, 2003 vol. 28, s. 1546-1552;
 25. Li T.K., *Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking*, *Journal of Studies on Alcohol*, 2000 vol. 61, s. 5-12;
 26. Makimoto K., *Drinking patterns and drinking problems among Asian-Americans and Pacific Islanders*, *Alcohol Health & Research World*, 1998 vol. 22, s. 270-275;
 27. Cloninger R., *A systematic method for clinical description and classification of personality variants*, *Archives General Psychiatry*, 1987 vol. 44, s. 573-588;
 28. Geppert B., Teżyk A., Żaba C., *Markery biochemiczne stosowane w ocenie ostrej i przewlekłej konsumpcji alkoholu etylowego*. *Przegląd Lekarski*, 2012 vol. 69, s. 1163-1167;
 29. Waszkiewicz N., Konarzewska B., Waszkiewicz M., Popławska R., Szajda S., Zalewska A., Markowski T., Szulc A., *Biomarkery nadużywania alkoholu. Część I. Biomarkery tradycyjne i ich interpretacja*, *Psychiatria Polska*, 2010 vol. 44, s. 127-136
 30. Waszkiewicz N., Popławska R., Konarzewska B., Szajda S., Galińska B., Rutkowski P., Leśniak R., Szulc A., *Biomarkery nadużywania alkoholu. Część II. Nowe Biomarkery oraz ich interpretacja*, *Psychiatria Polska*, 2010 vol. 44, s. 137-146

Czy uzależnienie od alkoholu może być zapisane w genach?

Streszczenie

Alkohol etylowy, ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, łatwo przenika przez błony biologiczne. Jego biologiczne działanie jest wypadkową wielu czynników, takich jak dawka, droga wprowadzenia do organizmu, genetycznie uwarunkowana aktywność enzymów metabolizujących etanol, a także interakcje z różnymi związkami chemicznymi. Etanol wykazuje silne działanie fizjologiczne i farmakologiczne na organizm człowieka w szczególności na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Jest on szczególnie wrażliwy na toksyczne działanie etanolu i jego metabolitów. Alkohol narusza strukturę i czynność neuronów, łatwo przenika do komórek nerwowych OUN, prowadząc do ich niedotlenienia, skutkującego zaburzeniami czynnościowymi. Działa podobnie do leków uspokajająco-nasennych i środków ogólnie znieczulających. Niestety alkohol powoduje uzależnienie i proces tolerancji (z czasem ta sama dawka alkoholu nie przynosi oczekiwanego efektu). Rodzinne przekazanie uzależnienia od alkoholu ma częściowo charakter genetyczny, nie jest tylko wynikiem wpływu otoczenia. Obecnie prowadzone są badania, co dokładnie podlega dziedziczeniu, co zwiększa podatność na uzależnienie oraz w jaki sposób oddziałują one z czynnikami środowiskowymi.

Słowa kluczowe: alkoholizm, etanol, geny alkoholizmu

Can addiction to alcohol be written in the genes?

Abstract

Ethanol, because of its good solubility in water, easily penetrates through biofilms. Its biological effects is the result of many factors such as dosage, incorporation pathway, genetically determined ethanol metabolizing enzymes, and the interaction of various chemical compounds. Ethanol has a strong physiological and pharmacological effect on the human body, in particular on the central nervous system (CNS). It is particularly sensitive to the toxic effects of ethanol and its metabolites. Alcohol disrupts the structure and function of neurons, readily penetrates the CNS cells, leading to their hypoxia, resulting in functional disorders. It works similarly to the sedative-hypnotic drugs and general anesthetic agents. Unfortunately, alcohol is addictive and causes process tolerance (in time the same dose of alcohol does not produce the expected effect). Familial transmission of alcohol addiction to some extent has a genetic nature, it is not only the result of the influence of environment. Currently there is some research conducted into what exactly can be inherited, what increases susceptibility to addiction and how they interact with environmental factors.

Keywords: alcoholism, ethanol, alcoholism genes

KOMÓRKI DENDRYTYCZNE Z ALLOGENICZNYM RNA JAKO POTENCJALNE NARZĘDZIE TERAPEUTYCZNE W TERAPII GENOWEJ RAKA PŁUCA

1. Wstęp

1.1. Rozwój i funkcje komórek dendrytycznych

Komórki dendrytyczne (*ang. dendritic cells*, DC) wraz z makrofagami i limfocytami B należą do powszechnie znanych, wyspecjalizowanych komórek, prezentujących antygeny (*ang. Antigen Presenting Cells*, APC) dziewiczym limfocytom T. DC posiadają największe umiejętności prezentacji antygenów, a także jako jedyne indukują pierwotną odpowiedź immunologiczną.

Komórki dendrytyczne powstają w szpiku kostnym, a następnie migrują do tkanek, gdzie nabierają zdolności pochłaniania antygenów (niedojrzałe komórki dendrytyczne) [1].

Proces przetwarzania antygenów poprzez DC odbywa się dzięki wiązaniu cząsteczek MHC klasy I (CD8+) i II (CD4+). Wówczas to komórka dendrytyczna przekształca się do postaci dojrzałej, przyjmując charakterystyczny kształt z licznymi długimi wypustkami i rozgałęzieniami w formie dendrytów [2].

W dalszym etapie komórki dendrytyczne migrują z tkanek obwodowych do węzłów chłonnych w celu prezentacji antygenów swoistym limfocytom T. Podczas tego procesu diametralnie wzrasta ekspresja cząsteczek kostymulujących CD80 oraz CD86, które łączą się z odpowiednimi ligandami, np. CD40L, na powierzchni limfocytów T [3].

1.2. Subpopulacje komórek dendrytycznych

Komórki dendrytyczne wywodzą się z hematopoetycznych komórek macierzystych. Stanowią heterogenną populację leukocytów, zróżnicowaną ze względu na pełnione funkcje, miejsce występowania oraz wydzielane cytokiny. Subpopulacje wywodzą się z linii mieloidalnej (*ang. myeloid dendritic cells*, mDCs) (DC1), o polaryzacji w kierunku Th1, bądź limfoidalnej (DC2), tzw. komórki plazmacytoidalne (*ang. plasmacytoid dendritic cells*, pDCs) o polaryzacji w kierunku Th2. Osobną grupę stanowią komórki dendrytyczne grudek, tzw. komórki folikularne (*ang. follicular dendritic cells*, FDCs) [4].

¹ wielikdzien.j@gmail.com, Uniwersytet Mikołaja Kopernika Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Genoterapii;

Komórki pochodzenia mieloidalnego można uzyskać z monocytów krwi obwodowej poprzez suplementację dwoma cytokinami: IL-4 (Interleukina 4) oraz GM-CSF (ang. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów). Charakteryzują się one wysoką ekspresją HLA-DR, a także CD11c+ oraz CD123dim [5]. Komórki dendrytyczne wykazują również ekspresję BDCA (ang. *blood dendritic cell antigens*; antygeny komórek dendrytycznych krwi). Linia mieloidalna charakteryzuje się obecnością BDCA-1 (CD1c+) oraz BDCA-3 (CD141+) [6].

Komórki pochodzenia mieloidalnego różnicują się na:

- komórki Langerhansa (w naskórku, nabłonku i skórze właściwej);
- śródmiażdżowe DC (w tkance łącznej, zwłaszcza narządów takich jak: serce, płuca, wątroba, jelita, nerki);
- komórki welonowate (w naczyniach chłonnych);
- komórki splatające się (w węzłach chłonnych i śledzionie).

Główną funkcją komórek mieloidalnych jest rozpoznawanie, przetwarzanie oraz prezentacja obcych antygenów. Dlatego też wyposażone są w liczne receptory, takie jak TLR (ang. *Toll-like-receptors*, receptory Toll-podobne). Wykazano, że posiadają one co najmniej cztery takie receptory. Są to odpowiednio: TLR 3, TLR 7, TLR 8 oraz TLR 9 [7].

Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne charakteryzuje obecność cząsteczki CD123. pDCs posiadają fenotyp CD11c-, BDCA-2+ (CD303+) oraz BDCA-4+ (CD304+). Pomimo braku możliwości prezentacji antygeny, pełnią funkcje przeciwwirusową, gdyż są głównymi producentami interferonu α (IFN α). W wyniku kontaktu z wirusem, gwałtownie wzrasta jego ekspresja do poziomu 100-krotnie większego, niż w pozostałych komórkach [8]. Podobnie jak komórki linii mieloidalnej posiadają TLR, jednak dla pDC charakterystyczne są TLR7 oraz TLR9. Po kontakcie z antygenami wirusowymi mają swój udział w indukcji nabytej odpowiedzi immunologicznej [9].

FDCs nie posiadają zdolności migracji. Osiedlają się one w węzłach chłonnych oraz w śledzionie. Wiążą się z antygenami poprzez receptory dla dopełniacza, odpowiednio CD21 i CD35. Nie posiadają umiejętności przetwarzania antygenów, a ich główna funkcja opiera się na zapobieganiu apoptozie limfocytów B, indukcji interakcji międzykomórkowych oraz ich proliferacji [10].

1.3. Zastosowanie komórek dendrytycznych w immunoterapii nowotworów

Immunoterapia należy do stosunkowo nowych, a także eksperymentalnych metod leczenia. Postanowiono podjąć próby zastosowania jej w celu rozwiązania jednego z największych problemów współczesnej medycyny – chorób nowotworowych. W ubiegłym roku odnotowano 12,7 miliona nowych przypadków chorób z tej grupy oraz 7,6 miliona zgonów z ich powodu [11].

Mimo gwałtownego postępu zarówno w dziedzinach diagnostyki, jak i leczenia, radio- i chemioterapii, potencjał terapeutyczny aktualnie stosowanych rozwiązań jest wciąż niewielki. Przyczyną komplikacji leczenia jest m.in. „ucieczka” nowotworów spod nadzoru immunologicznego, spowodowana niewydajną prezentacją antygenów.

Immunoterapię nowotworów można podzielić na bierną oraz czynną. Pierwsza z nich dotyczy zastosowania swoistych przeciwciał, interferonu oraz profilu interleukin, natomiast druga, tzw. immunoterapia komórkowa, odnosi się do użycia komórek dendrytycznych. Celem tej ostatniej jest wykorzystanie swoiście stymulowanych komórek układu odpornościowego gospodarza poprzez podanie ich w formie szczepionki, w celu wywołania odpowiedzi limfocytów T na antygeny nowotworowe. Ten rodzaj leczenia należy do terapii spersonalizowanych [12].

Komórki dendrytyczne posiadają najsilniejsze właściwości prezentacji antygenów, również związanych z nowotworami (ang. *tumor associated antigens*, TAA). DC prezentują limfocytom T kompleksy złożone z cząsteczek MHC oraz peptydów, które powstały przez przetworzenie TAA. W wyniku tego powstają limfocyty T cytotoksyczne (ang. *cytotoxic T lymphocytes*, CTL), które stopniowo niszczą komórki nowotworu [13].

Ze względu na niewielką ilość DC w krwi obwodowej, otrzymuje się je najczęściej w warunkach hodowli *in vitro* z komórkami nowotworowymi pacjenta. Celem jest aktywacja komórek dendrytycznych do postaci dojrzałej, posiadających zdolności wydajnej prezentacji nowotworowo swoistych antygenów. Ostatnim etapem jest podanie pacjentowi komórek dendrytycznych w postaci szczepionki, co powinno sprowokować odpowiedź immunologiczną organizmu [1, 12].

1.4. Pozyskiwanie komórek dendrytycznych w warunkach *in vitro*

Komórki dendrytyczne do celów immunoterapeutycznych otrzymywane są na trzy różne sposoby.

Pierwszy z nich dotyczy wykorzystania komórek macierzystych CD34+ z krwi pępowinowej, krwi obwodowej, bądź szpiku kostnego. Badania dowodzą, że hodowla w warunkach *in vitro* wymaga dostarczenia dwóch cytokin: GM-CSF oraz TNF (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu). Taka suplementacja przyspiesza dojrzewanie DC o fenotypie CD1a+ CD83+ HLADR+. W ciągu dwóch tygodni hodowla przekształca się w heterogenną populację, składającą się głównie z komórek Langerhansa oraz śródmiaższowych DC [1, 14].

Kolejne źródło komórek dendrytycznych to bezpośrednia ich izolacja z krwi obwodowej, poprzez poprzednie usunięcie innych populacji komórek, takich jak limfocyty B, NK (ang. *natural killers*) oraz monocyty przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał, kulek immunomagnetycznych, a także wirowaniu w gradiencie gęstości [15].

Komórki dendrytyczne można też uzyskiwać z prekursorowych komórek krwi obwodowej. Najczęściej pozyskuje się monocyty na drodze separacji komórek jednojądrzastych (leukaferazy). Ta metoda umożliwia otrzymanie populacji komórek, składającej się w 90% z niedojrzałych DC. Hodowlę *in vitro* suplementuje się dwoma cytokinami: GM-CSF i IL-4.

1.5. Próby kliniczne zastosowania komórek dendrytycznych w postaci szczepionek przeciwnowotworowych

Pierwsze wzmianki o użyciu DC dotyczą leczenia grupy czterech chorych z chłoniakiem. U wszystkich uzyskano odpowiedź immunologiczną, ale tylko u dwóch chorych odnotowano odpowiedź kliniczną w postaci jednej całkowitej, a w drugim przypadku częściowej remisji [16].

Od tamtego czasu przeprowadzono wiele prób zastosowania szczepionek z komórkami dendrytycznymi w różnych typach nowotworów u pacjentów chorych na raka szyjki macicy [17], raka piersi [18], raka płuca [19], raka nerki [20] oraz szpiczaka mnogim [21].

Oceniając wyniki kliniczne należy podkreślić, iż chorzy znajdowali się w zaawansowanych stadiach choroby. Pacjenci niejednokrotnie byli poprzednio po leczeniu radio- i chemioterapią, a ich organizm był wyniszczonej cytostatykami oraz promieniowaniem. Miało to znaczący wpływ na zmniejszenie skuteczności działania szczepionek nowotworowych. Efekt kliniczny zależy w dużej mierze od subpopulacji aplikowanych komórek dendrytycznych, a także od drogi podania. Możliwe jest podanie śródskórne, podskórne, dożylnie, a także bezpośrednio do węzłów chłonnych lub guza nowotworowego [22, 23, 24].

Niemniej istotny wydaje się również efekt immunosupresyjny komórek guza, a więc wydzielanie cytokin, takich jak TGF- β (ang. *Transforming Growth Factor*; transformujący czynnik wzrostu), VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej), IL-10, czy IL-23. Postuluje się, iż terapię komórkami dendrytycznymi powinno się prowadzić wraz z jednoczesną aplikacją hamującą rozwój limfocytów T regulatorowych (Treg) poprzez podanie cytokin o działaniu hamującym immunosupresję, np. IFN- α , TNF- α , IL-2, IL-15 [25].

2. Cel pracy

Niniejsza praca stanowi próbę otrzymania komórek dendrytycznych z krwi obwodowej zdrowych dawców oraz ich następczego różnicowania w kierunku subpopulacji mieloidalnej przy pomocy odpowiednich warunków hodowli i suplementacji.

Dodatkowo, sprawdzono możliwości otrzymania swoistych szczepionek z komórek dendrytycznych transfekowanych allogenicznym RNA linii komórkowych niedrobnego- i drobnokomórkowego raka płuca w celu uzyskania narzędzia do immunoterapii komórkowej.

3. Materiały i metody

Do przeprowadzenia doświadczeń wykorzystano dwie ludzkie linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuca (A549) oraz drobnokomórkowego (H82) raka tego samego narządu.

Linia komórkowa A549 należy do linii adherentnych, natomiast H82 charakteryzuje się wzrostem w zawieszynie. Obie linie komórkowe były hodowane w warunkach standardowych: w temperaturze 37°C z dopływem 5% CO₂.

W przypadku linii raka niedrobnokomórkowego użyto medium DMEM (Gibco BRL, nr kat. 31966-021), zaś komórki raka drobnokomórkowego hodowano w medium RPMI 1640 (Biochrome AG, nr kat. F1295). Obie hodowle komórkowe zawierały 10% dodatek FBS (ang. *fetal bovine serum*, płodowa surowica bydlęca) (Gibco BRL, nr kat. 0596) i 1% antybiotyków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych (ATB, Gibco BRL, nr kat. 0967). W przypadku linii A549 dodano również 1% mieszaniny insuliny, transferynianu i selenianu (Insulin-Transferrin-Selenium-X, Gibco, nr kat. 51500-056).

W celu odklejenia komórek adherentnych (A549) od podłoża hodowlanego, stosowano 0,25% roztwór trypsyny. Pasażowanie wykonywano, gdy hodowla osiągnęła 90% konfluencji (48-72h).

Komórkowy nowotworowy RNA izolowano przy użyciu zestawu High Pure RNA isolation Kit (Roche, sygn. nr 11828665001).

Krew obwodową, pobraną od 6 zdrowych dawców, wirowano w gradiencie gęstości przy pomocy odczynnika Lymphoprep (Axix-Shield PoC AS, nr kat.1114545). W ten sposób otrzymano populację monocytarno-makrofagową, którą następnie hodowano w odpowiedniej objętości medium Aim-V (Gibco, sygn. Nr 12055083) z dodatkiem dwóch cytokin: GM-CSF (RD Systems, nr kat. 215-GM/CF) oraz IL-4 (500U/ml, RD Systems, nr kat. 204 -IL).

Po uzyskaniu populacji niedojrzałych komórek dendrytycznych wykonywano proces transfekcji nowotworowym RNA z linii komórkowych przy użyciu odczynnika lipidowego TransFectinTM Lipid Reagent (BIO-RAD, nr kat. 170-3351) zgodnie z protokołem producenta.

Następnym etapem było wykonanie immunofenotypowania z wykorzystaniem znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi przeciwciał monoklonalnych, w celu oceny ekspresji cząsteczek CD HLA-DR (Anti-Human CD HLA-DR, BD Immunocytometry Systems, nr kat. 347367), CD80 (Anti-Human CD80, BD Pharmigen, nr kat. 555683), CD83 (Anti-Human CD83, BD Pharmigen, nr kat. 551058), CD86 (Anti-Human CD86, BD Pharmigen, nr kat. 555657). Zawieszone w roztworze PBS z dodatkiem 2% formaldehydu komórki wraz z odpowiednimi przeciwciałami analizowano przy pomocy cytometru przepływowego.

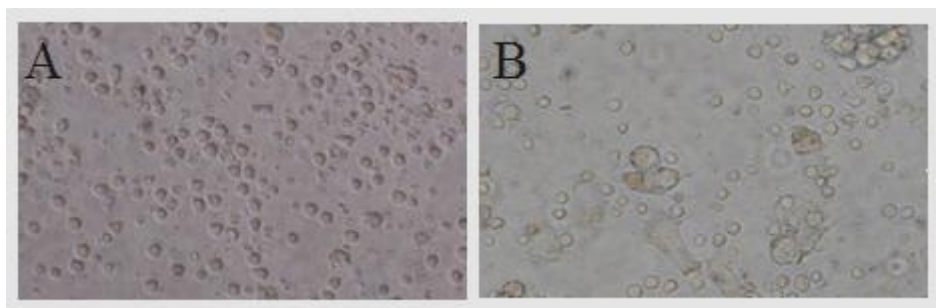
Do analizy statystycznej wykorzystano test Wilcoxona. Za znamienne statystycznie uznano wyniki spełniające regułę $p < 0.05$.

4. Analiza wyników badań

4.1. Obserwacje mikroskopowe

Przy użyciu mikroskopu stwierdzono, że komórki dendrytyczne bezpośrednio po ich wyizolowaniu posiadały kształt okrągły (Rys. 1A).

Po wykonaniu transfekcji z użyciem RNA z linii nowotworowych raka płuca zauważono zmiany w morfologii DC – zmiana kształtu (nieregularny z długimi wypustkami) (Rys. 1B).



Rys. 1. zmiany w morfologii DC po transfekcji RNA, pochodzącym z linii komórkowych (B) w porównaniu z hodowlą nietransfekowaną (A) [opracowanie własne]

4.2. Immunofenotypowanie

Analizy immunofluorescencyjne pozwoliły uwidocznic zmiany w ekspresji molekuł powierzchniowych.

Nietransfekowane komórki dendrytyczne wykazały stosunkowo wysoką ekspresję molekuł CD86 oraz CD83. Jednakże po wykonaniu transfekcji nowotworowym RNA zauważono wyraźny wzrost odsetka komórek dendrytycznych o ekspresji powyższych molekuł. Należy zaznaczyć, że proces transfekcji spowodował zwiększoną ekspresję cząsteczki CD86 zarówno w przypadku linii A549, jak i H82.

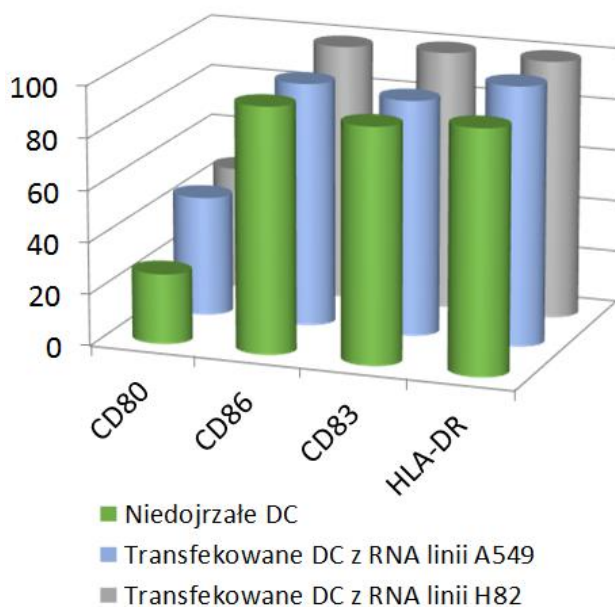
Ponadto, w przypadku obu linii komórkowych zwraca uwagę zwiększona ekspresja molekuły kostymulującej CD80.

Dotatkowo, cytometria przepływowa wykonana dla komórek po transfekcji wykazała również znaczny wzrost ekspresji molekuły CD83 – markera dojrzałych komórek dendrytycznych – w obu hodowlach transfekowanych. Warto zauważyć, iż znacznie wyższe wyniki otrzymano w przypadku linii raka drobnokomórkowego (Tabela 1, Wykres 1).

Tabela 1. Wynik immunofenotypowania komórek dendrytycznych

	Niedojrzałe DC [%]	Transfekowane DC A549[%]	Transfekowane DC H82[%]
HLA-DR	94	100	100
CD80	27	46	46,5
CD83	91,5	91	100
CD86	94,5	94	99

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 1. Zmiany w fenotypie komórek dendrytycznych po transfekcji nowotworowym RNA [opracowanie własne]

Dojrzałe komórki dendrytyczne wykazują wysoką ekspresję molekuł CD80, CD83 i CD86. W niniejszej pracy uzyskano wyniki analogiczne, do prezentowanych w piśmiennictwie. Cząsteczka CD83 uważana jest za główną molekułę, charakteryzującą dojrzałość komórek dendrytycznych, gdyż właśnie dzięki niej możliwa jest profesjonalna prezentacja antygenów, w tym także nowotworowych.

5. Wnioski i podsumowanie

Oceniając przebieg doświadczeń można z całą pewnością stwierdzić, iż skutecznie wygenerowano niedojrzałe komórki dendrytyczne.

Obserwacje mikroskopowe, jak i analiza cytometryczna potwierdziła przekształcenie DC do postaci dojrzałych po dokonaniu procesu transfekcji RNA pochodzącym z ustalonych nowotworowych linii komórkowych raka płuca. Zmiany zarówno w ich morfologii, jak i fenotypie były bardziej widoczne przy wykorzystaniu RNA wyizolowanego z linii raka drobnokomórkowego.

Zastosowanie immunoterapii komórkowej w postaci szczepionki przeciwnowotworowej składającej się z komórek dendrytycznych obciążonych allogenicznym RNA dają wyraźne nadzieje na skuteczniejsze leczenie nowotworów. Genetyczna aktywacja DC umożliwia im przeprowadzenie procesu wydajnej prezentacji antygenów, skutkującej indukcją odpowiedzi immunologicznej pacjenta [27]. Możliwe więc, iż w niedalekiej przyszłości dojdzie do powszechnego stosowania terapii spersonalizowanej, mogącej indukować swoistą odpowiedź organizmu, powodującą zatrzymanie progresji nowotworu, a nawet jego regresję.

Literatura

1. Tarte K., Klein B., *Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy*, Leukemia, 1999 vol. 13, s. 653-63;
2. Aarntzen E. H. J. G, Figdor C. G, Adema G. J, Punt C. J. A, de Vries I. J. M., *Dendritic cell vaccination and immune monitoring*, Cancer Immunol Immunother 2008 vol. 57 s. 1559–1568;
3. Muth S., Schütze K., Hain T., Yagita H., Schild H., Probst H.C., *A CD40/CD40L feedback loop drives the breakdown of CD8+ T-cell tolerance following depletion of suppressive CD4+ T cells*, Eur J Immunol 2014, doi: 10.1002/eji.201343738;
4. Wu L., Liu Y.J., *Development of Dendritic-Cell Lineages*, Immunity, 2007, vol. 6, s. 741-750;
5. Dacki A., Wu L., *Hemopoietic precursor and development of dendritic cell populations*, Leuk Lymphoma, 2003, vol. 44 s. 1469-1475;
6. Dzionek A., Sohma Y., Nagafune J., Cella M., Colonna M., Facchetti F., Gunther G., Johnston I., Lanzavecchia A., Nagasaka T., Okada T., Vermi W., Winkels G., Yamamoto T., Zysk M., Yamaguchi Y., Schmitz J., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*, J Exp Med, 2001, vol. 194, s. 1823-1834;
7. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R., Kastelein R., Bazan F., Liu Yj., *Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens*, J Exp Med, 2001, vol. 194, s. 863-869;
8. Salio M., Cella M., Vermi W., Facchetti F., Palmowski M.J., Smith C.L., Shepherd D., Colonna M., Cerundolo V., *Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions*, Eur J Immunol, 2003, vol. 33, s. 1052-1062;
9. Haeryfar S.M., *The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation?*, Trends Immunol, 2005, vol. 26, s. 311-317;

10. Park C.S., Choi Y.S., *How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in germinal centre?*, Immunology, 2005, vol. 114, s. 2-10;
11. Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W., Comber H., Forman D., Bray F., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012*, European Journal of Cancer, 2013, vol. 49, s. 1374-1403;
12. Waller E.K., *Cellular immunotherapy and cancer*, Semin Oncol, 2004, vol. 31, s. 87-90;
13. Chen J., Guo X.Z., Li H.Y., Liu X., Ren L.N., Wang D., Zhao J.J., *Generation of CTL responses against pancreatic cancer in vitro using dendritic cells co-transfected with MUC4 and survivin RNA*, Vaccine, 2013, vol. 32, s. 4585-4590;
14. Banchereau J., Palucka A.K., Dhodapkar M., Burkeholder S., Taquet N., Rolland A., Taquet S., Coquery S., Wittkowski K.M., Bhardwaj N., Pineiro L., Steinman R., Fay J., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine*, Cancer Res, 2001, vol. 61, s. 6451-6458;
15. Campbell J.D., Piechaczek C., Winkels G., Schwamborn E., Micheli D., Hennemann S., Schmitz J., *Isolation and generation of clinic-grade dendritic cells using the ClinMACS system*, Methods Mol Med, 2005, vol. 109, s. 55-70;
16. Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R. *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigenpulsed dendritic cells*, Nat Med, 1996, vol. 2 s. 52-58;
17. Bellone S., Pecorelli S., Cannon M.J., Santin A.D., *Advances in dendritic-cell-based therapeutic vaccines for cervical cancer*, Expert Rev Anticancer Ther, 2007 vol. 7, s. 1473-1486;
18. Pinzon-Charry A, Ho C.S., Maxwell T., McGuckin M.A. Schmidt C., Furnival C., Pyke C.M. López J.A., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*, Br J Cancer, 2007, vol. 97, s. 1251-1259;
19. Chen X., Liu Z., Huang Y., Li R., Zhang H., Dong S., Ge C., Zhang Z., Wang Y., Wang Y., Xue Y., Li Z., Song X., *Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine Lewis lung carcinoma*, Autoimmunity, 2014, vol. 47, s. 46-56;
20. Oosterwijk-Wakka J.C., Tiemessen D.M., Bleumer I., de Vries I.J. Jongmans W., Adema G.J., Debruyne F.M., de Mulder P.H., Oosterwijk E., Mulders PF., *Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study*, J Immunother, 2002, vol. 25, s. 500-508;
21. Reichardt VL, Brossart P: *Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma*, Methods Mol Med, 2005, vol. 109, s. 127-136;
22. Kyte J.A., Mu L., Aamdal S., Kvalheim G., Dueland S., Hauser M., Gullestad H.P., Ryder T., Lislerud K., Hammerstad H., Gaudernack G., *Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor m-RNA*, Cancer Gene Ther, 2006, vol. 13, s. 905-918;
23. Bedrosian I., Mick R., Xu S., Nisenbaum H., Faries M., Zhang P., Cohen P.A., Koski G., Czerniecki B.J., *Intranodal administration of prptide-pulsed mature dendritic cells vaccine results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients*, J.Clin Oncol, 2003, vol. 21, s. 3826-3835;

24. Fong L., Brockstedt D., Benike C., Wu L., Engleman E.G., *Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients*, J Immunol, 2001, vol. 166, s. 4254-4259;
25. Kalinski P, Mailliard R.B., Giermasz A., Zeh H.J., Basse P., Bartlett D.L., Kirkwood J.M., Lotze M.T., Herberman R.B., *Natural killer- dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy*, Expert Opin Biol Ther, 2005, vol. 5, s. 1303-1315;
26. Kuwano Y., Prazma C.M., Yazawa N., Watanabe R., Ishiura N., Kumanogoh A., Okochi H., Tamaki K., Fujimoto M., Tedder T.F. *CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells*, Int Immunol, 2007, vol. 19, s. 977-992;
27. Pecher G., Haring A., Kaiser L., Thiel E., *Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial*, Cancer Immunol. Immunother, 2002, vol. 51, s. 669–673.

Komórki dendrytyczne z allogenicznym RNA jako potencjalne narzędzie terapeutyczne w terapii genowej raka płuca

Streszczenie

Komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells, DC) należą do populacji komórek prezentujących antygeny (ang. antigen presenting cells, APCs). Podstawową funkcją komórek dendrytycznych jest przetwarzanie i prezentacja antygenu limfocytom T. Praca przedstawia możliwości terapeutyczne DC w immunoterapii nowotworów. Szczególną uwagę poświęcono transfekcji DC nowotworowym RNA z ludzkich linii drobno- (H82) i niedrobnokomórkowego (A549) raka płuca. DC linii mieloidalnej izolowano z komórek jednojądrzastych, pobranych z krwi obwodowej 6 zdrowych dawców. Do komórek adherentnych dodawano medium Aim V oraz suplementowano dwiema cytokinami: IL-4 i GM-CSF, aby otrzymać z nich komórki dendrytyczne. Po izolacji całkowitego RNA komórkowego linii nowotworowych przeprowadzono transfekcję DC za pomocą odczynnika lipidowego TransFectin (BIO-RAD). Następnie przeprowadzono immunofenotypowanie w celu określenia poziomu ekspresji molekuł powierzchniowych CD80, CD83, CD86 oraz HLA-DR. Po przeprowadzeniu doświadczeń stwierdzono niewątpliwą obecność niedojrzałych komórek dendrytycznych. Po transfekcji DC, RNA pochodzącym z obu linii nowotworowych zauważono zmiany zarówno w ich fenotypie, jak i morfologii. Niemal 100% DC wykazywało ekspresję HLA-DR z wysokim poziomem CD80 i CD86. Zauważono również zwiększoną ekspresję molekuły CD83, a więc markera dojrzałych komórek dendrytycznych. Wykazano, że dojrzewanie transfekowanych DC było bardziej widoczne, gdy RNA pochodził z linii raka drobnotkomórkowego. Na podstawie przeglądu literatury oraz przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że zastosowanie dendrytycznych komórek z allogenicznym RNA może być obiecującą metodą w immunologicznym leczeniu raka płuca

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, rak płuca, immunoterapia

Dendritic cells with allogeneic RNA as a potential immunotherapeutic tool in lung cancer

Abstract

Dendritic cells (DC) belong to professional antigen-presenting cells (APCs). One of the most important role of these cells is inducing adoptive T cell immunity. In case of its properties, DC are thought to be a potential therapeutic tool directed against tumors. The aim of this study was the transfection of monocyte-derived dendritic cells loaded with tumor total RNA, obtained from human small (NCI-H82) and non-small cell lung cancer (A549) as an immune therapy for lung cancer patients. DC were isolated from healthy donors as mononuclear cells. Adherent cells were

cultured in AIM V medium with supplementation of IL4 and GM-CSF to receive dendritic cells. After achieving total tumor cell RNA from both lines, dendritic cells were transfected with lipid reagent – TransFectin (BIO-RAD). The last step was exploitation of direct immunofluorescence to determine the expression of surface molecules, such as CD80, CD83, CD86 and HLA-DR. Immature dendritic cells were successfully generated. DC-derived RNA resulted in increase in CD80 and CD86. All RNA-transfected DC have changed in morphology and also in its phenotype. Almost 100% of MoDC were HLA-DR+. Furthermore, higher expression of CD83 molecule was observed – the marker of mature dendritic cells. This study showed, that immature dendritic cells transfection with lung cancer cell-derived RNA caused morphologic and phenotype changes, relevant to DC activation and maturation. Changes were more pronounced, when RNA originating from lung cancer lines was used. Taken together, application of RNA-loaded allogeneic DC seems to be a promising opportunity in lung cancer immune therapy.

Keywords: dendritic cells, lung cancer, immunotherapy

Paulina Mulawka¹, Dominika Mulawka, Katarzyna Schab, Magdalena Amarowicz, Marcin Urbańczuk, Lidia Kotuła

MANIFESTACJE KARDIOLOGICZNE TOCZNIA NOWORODKOWEGO – PATOGENEZA, MATCZYNE I PŁODOWE CZYNNIKI RYZYKA ZŁEGO ROKOWANIA, ZAPOBIEGANIE ORAZ LECZENIE

1. Wstęp

Toczeń noworodkowy jest modelowym przykładem biernie nabytej autoimmunizacji, gdzie uszkodzenie tkanek płodu wynika z przezłożyskowego transportu matczynych przeciwciał IgG anti-SSA/Ro (przeciwciała przeciw antygenowi Rose) i anti-SSB/La (przeciwciała przeciw antygenowi Lane). Matki chorują na toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjögrena lub nie mają objawów chorób autoimmunologicznych (około 1/3 matek) [1].

Matczyne przeciwciała przechodzą przez łożysko już od 11 tygodnia ciąży, warunkując rozwój manifestacji kardiologicznych, wysypki lub nieprawidłowości dotyczących wątroby i komórek krwi u noworodka. Zmiany dotyczące skóry, wątroby i komórek krwi ustępują wraz z zaniknięciem autoprzeciwciał od 6 do 8 tygodnia życia, gdyż dotyczą tkanek ulegających regeneracji [1].

Najpoważniejszym skutkiem autoimmunizacji u płodu są manifestacje ze strony układu krwionośnego – rozsiana choroba serca z/ bez zaburzeń przewodzenia, proste defekty strukturalne (PDA – przetrwały przewód tętniczy Botalla, *Patent Ductus Arteriosus*, ASD – ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, *Atrial Septal Defect*, VSD – ubytek w przegrodzie międzykomorowej, *Ventricular Septal Defect*, wady zastawek półksiężycowatych i przedsionkowo-komorowych), inne elektrofizjologiczne anomalie (przejściowa lub stała dysfunkcja węzła zatokowo-przedsionkowego, wydłużenie odstępu QT, częstoskurcz węzłowy, tachykardia komorowa, trzepotanie przedsionków). Mięsień sercowy nie ulega regeneracji, wrodzony blok serca – AV (przedsionkowo-komorowy) III stopnia jest nieodwracalny [1].

Manifestacje kardiologiczne stanowią wyzwanie dla naukowców i lekarzy, którzy analizują złożoną patogenezę tej rzadkiej choroby, poszukują czynników ryzyka złego rokowania, a także metod zapobiegania i skutecznego leczenia.

¹ paulinamulawka@gmail.com; Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl;

2. Patogeneza

Blisko 2% dzieci anty-SSA/Ro serologicznie dodatnich matek, będących w pierwszej ciąży lub mających już zdrowe dzieci, urodzi się z toczniem noworodkowym [2]. Ryzyko nawrotu w kolejnej ciąży wynosi 17-18% [1]. Rzadkość choroby wskazuje na jej złożoną patogenezę, nie można powiedzieć, że wynika ona jedynie z biernej autoimmunizacji [2].

Mazel i jego współpracownicy po podaniu szczurom IgG anty-SSA/Ro-SSB/La od matek dzieci z manifestacjami kardiologicznymi tocznia noworodkowego zaobserwowali w EKG gryzoni blok AV I stopnia i zatokową bradykardię [3]. Wystąpienie u płodu bloku AV I stopnia nie oznacza, że nastąpi progresja tego bloku [4]. Ambrosi i współpracownicy dowiedli istotną rolę przełożyskowego transportu przeciwciał reaktywnych wobec regionu p200 białka Ro52, które inicjują wczesne, być może odwracalne uszkodzenie mięśnia sercowego [5].

Istnieją dwie hipotezy tłumaczące wrodzony blok serca (*congenital heart block* - CHB). Pierwsza zakłada molekularną mimikrę, autoprzeciwciała mogą reagować krzyżowo z kanałami wapniowymi typu L, co powoduje zachwianie homeostazy wapniowej [6]. Druga hipoteza CHB tłumaczy translokacją wewnątrzkomórkowych antygenów na powierzchnię kardiomiocytów w trakcie apoptozy towarzyszącej fizjologicznemu remodelingowi, infekcji wirusowej lub ekspozycji na promieniowanie UV. Stają się one wtedy dostępne dla autoprzeciwciał [7].

Apoptotyczna teoria manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego tłumaczy odpowiedź zapalną i włóknienie powstawaniem kompleksów immunologicznych złożonych z przeciwciał i komórek apoptotycznych [2]. Potwierdzają to badania histopatologiczne serc płodów i noworodków z manifestacjami kardiologicznymi tocznia noworodkowego, które wskazują na włóknienie węzła AV (przedsionkowo- komorowego) lub części dystalnej układu bodźcotwórczo-przewodzącego jako na najbardziej charakterystyczne zmiany. Włóknienie węzła SA i pęczka Hisa, fibroelastoza wsierdzia oraz wady zastawkowe też występują w uszkodzeniach spowodowanych przeciwciałami anty-Ro [8].

Reed i współpracownicy dowiedli, że β 2-glikoproteina I (β 2GPI) przeciwdziała opsonizacji apoptotycznych kardiomiocytów przez matczyne anty-Ro 60 IgG. Mediowany plazminą rozpad β 2GPI znosi wiązanie anty-Ro 60. U noworodków z kardiologicznymi manifestacjami tocznia noworodkowego poziom β 2GPI we krwi pępowinowej był znacznie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może β 2GPI zostanie uznana w krążeniu płodowym za nowy czynnik kardioprotekcyjny [9].

Powstawanie kompleksów immunologicznych zaburza zastępowanie apoptotycznych kardiomiocytów zdrowymi i podnosi poziom aktywności

plazminy zależny od uPA/uPAR (urokinazowy układ aktywacji plazminogenu) [10]. Kompleksy immunologiczne są czynnikiem spustowym aktywacji TGF- β (czynnik wzrostu nowotworów), która jest wtórnym efektem wzrostu uPAR-zależnej aktywności uPA. Aktywacja TGF- β może być wzmacniaczem w kaskadzie promującej różnicowanie miofibroblastów i powstawanie blizny [11].

Ostatnie badania wskazują, że czynnikiem odpowiadającym za włóknienie może być endotelina I (ET I), wytwarzana przez pobudzone makrofagi. Zaobserwowano indukowane przez makrofagi wytwarzanie TGF- β przez fibroblasty. Wydzielanie TGF- β zostało zmniejszone po zastosowaniu antagonistów receptora ET I oraz przeciwciał anti-ET I [12].

Strandber i współpracownicy na modelu zwierzęcym dowiedli, że matczyne MHC reguluje wytwarzanie przeciwciał anti-Ro52, a płodowe MHC determinuje podatność na rozwój wydłużenia odstępu PR [13]. Ostatnie doniesienia sugerują, że matki akumulują genetyczne wyznaczniki specyficzne dla tocznia noworodkowego, które nie są obecne u dziadków. Wskazuje to na uprzywilejowaną transmisję alleli, predysponujących do rozwoju manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego [14].

3. Matczyne i płodowe czynniki ryzyka złego rokowania

Dane z RRNL (*Research Registry for Neonatal Lupus*), wielorasowego i wieloetnicznego rejestru płodów z toczniem noworodkowym narażonych na działanie przeciwciał anti-SSA/Ro, prowadzonego w Stanach Zjednoczonych pokazują, że 17,5% płodów zmarło z powodu manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego, w tym 30% wewnątrzłonowo. Płodowe echokardiograficzne czynniki ryzyka związane z wzrostem śmiertelności to: obrzęk płodu, fibroelastoza wsierdzia, wczesna diagnoza manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego, niska akcja komór. Obecność fibroelastozy wsierdzia i kardiomiopatii rozstrzeniowej wiążą się ze wzrostem odsetka zgonów do 51,9% i 53,3% w porównaniu do płodów z izolowanym blokiem serca (7,8%). Mniejszości miały wyższy odsetek zgonów. Założenie stymulatora było konieczne w 70%, 4 dzieci wymagało transplantacji serca [15].

W wieloośrodkowym badaniu obejmującym 175 pacjentów z zaawansowanym blokiem serca z Europy i Brazylii, z których 75% było narażonych na działanie przeciwciał anti-SSA/Ro-SSB/La, 91% urodziło się żywych, a z tego 93% przeżyło okres noworodkowy. Jak ustalono czynnikami ryzyka związanymi z śmiertelnością były: diagnoza postawiona przed 20 tygodniem życia płodowego, akcja komór poniżej 50 uderzeń na min., obrzęk płodowy, upośledzona funkcja lewej komory w momencie diagnozy [16].

Inne publikacje wymieniały również jako czynniki ryzyka złego rokowania: przedwczesny poród, małą masę urodzeniową, znaczącą strukturalną chorobę serca, wodobrzusze, anasarcę, implantację stymulatora [17, 18, 19].

4. Prewencja i leczenie

W RRNL badaniu fluorowane sterydy były związane ze wzrostem śmiertelności wewnątrzmacicznej, co przypisano cięższemu przebiegowi choroby [15]. W europejsko-brazylijskim badaniu fluorowane sterydy nie miały znaczącego efektu na urodzenie żywego dziecka albo przeżycie okresu noworodkowego niezależnie od ekspozycji na przeciwciała anty-SSA/Ro [16].

Dowodzono jednak korzyści stosowania sterydów w celu uzyskania regresji niecałkowitego bloku serca. 35% płodów przyjmujących fluorowane sterydy z blokiem AV II stopnia, uzyskało regresję do rytmu zatokowego lub bloku AV I stopnia w porównaniu do 6,25% bez sterydów. Być może sterydy będą stosowane w leczeniu niecałkowitego bloku serca, konieczne są dalsze badania [15, 16].

Próbowano stosować IVIG (*intravenous immunoglobulin*) w prewencji nawrotu manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego. Było 18% nawrotów. Prewencję uznano za nieskuteczną [20, 21].

W innym badaniu, w którym zastosowano kombinowane leczenie sterydami i IVIG w przypadkach z kardiomiopatią i fibroelastozą wśierdzia, wyniki były zachęcające. 80% pacjentów przeżyło [22].

Hydroksychlorochina jako inhibitor TLR (*Toll-like receptor*) ligacji została uznana za potencjalny lek, mogący redukować ryzyko manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego. Badanie sugeruje, że przyjmowanie hydroksychlorochiny podczas ciąży przez kobiety chorujące na toczень rumieniowaty układowy, mające przeciwciała anty-SSA/Ro-SSB/La, może obniżać ryzyko rozwoju manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego [23]. Konieczne są dalsze badania.

Michaelsson i współpracownicy uważają, że wszyscy pacjenci z CHB powyżej 15 r.ż. powinni mieć zaimplantowany stymulator serca, niezależnie od go czy mają objawy, czy są bezobjawowi [24]. Inni zalecają rutynową implantację nasierdżiowych elektrod i podobojczykowych stymulatorów w ciągu pierwszego miesiąca życia u wszystkich noworodków z CHB [25, 26].

Konwencjonalny stymulator umieszczony w prawej komorze u osób z CHB powoduje desynchronizację aktywności elektrycznej komór, szkodliwy remodeling lewej komory, dylatację lewej komory i jej asymetryczny przerost [27, 28]. Dzieci z CHB i konwencjonalny stymulatorem w prawej komorze rozwijały gwałtowną kardiomiopatię i ostrą niewydolność serca [29, 30].

Efekt dylatacyjny można ominąć stosując stymulację dwukomorową albo implantując stymulator w lewej komorze [31]. Powyższe doniesienia wskazują, że u osób z CHB stymulacja powinna być dwukomorowa lub zaimplantowana w lewej komorze.

5. Podsumowanie

Ostatnie badania patogenezy wrodzonego bloku serca w toczniu noworodkowym dowodzą istotnej roli reaktywności wobec regionu p200 białka Ro52 oraz autoprzeciwciał reagujących krzyżowo z kanałami wapniowymi typu L. Podkreśla się również ochronną rolę β 2-glikoproteiny I, znaczenie urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w apoptozie kardiomiocytów oraz znaczenie sekrecji endoteliny I przez makrofagi w procesie włóknienia. Zainteresowanie budzą również płodowe MHC (Główny układ zgodności tkankowej, Major histocompatibility complex) w rozwoju wrodzonego bloku serca.

Wśród płodowych echokardiograficznych czynników ryzyka związanych ze wzrostem śmiertelności wymienia się: obrzęk płodu, fibroelastozę wsierdza, wczesną diagnozę manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego, niską akcję komórek.

Prowadzone są badania nad zastosowaniem w prewencji wrodzonego bloku serca fluorowanych sterydów, immunoglobulin, hydroksychlorochiny. Wątpliwości budzi postępowanie u osób z wrodzonym blokiem serca. Dowiedziono, że stymulacja powinna być dwukomorowa lub zaimplantowana w lewej komorze. Konwencjonalny stymulator umieszczony w prawej komorze u osób z wrodzonym blokiem serca powoduje desynchronizację aktywności elektrycznej komórek, szkodliwy remodeling lewej komory, dylatację lewej komory i jej asymetryczny przerost.

Konieczne jest dalsze poszukiwanie czynników ryzyka złego rokowania, stworzenie standardów postępowania w celu prewencji oraz leczenia dorosłych zwrodzonym blokiem serca.

Literatura

1. Capone C., Buyon J.P., Friedman D.M., Frishman W.H. *Cardiac Manifestations of Neonatal Lupus: A Review of Autoantibody Associated Congenital Heart Block and its Impact in an Adult Population*, *Cardiol Rev.* 2012 vol. 20(2), str. 72-6;
2. Izmirly P.M., Buyon J.P., Saxena A. *Neonatal Lupus: Advances in Understanding Pathogenesis and Identifying Treatments of Cardiac Disease*, *Curr Opin Rheumatol.* 2012 vol. 24(5), str. 466-472;
3. Mazel J.A., El-Sherif N., Buyon J., Boutjdir M. *Electrocardiographic abnormalities in a murine model injected with IgG from mothers of children with congenital heart block*, *Circulation.* 1999 vol. 99(14), str. 1914-8;
4. Jaeggi E.T., Silverman E.D., Laskin C., et al. *Prolongation of the atrioventricular conduction in fetuses exposed to maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies did not predict progressive heart block. A prospective observational study on the effects of maternal antibodies on 165 fetuses*, *J Am Coll Cardiol.* 2011 vol. 57(13), str. 1487-92;
5. Ambrosi A., Dzikaite V., Park J., et al. *Anti-Ro52 monoclonal antibodies specific for amino acid 200–239, but not other Ro52 epitopes, induce congenital heart block in a rat model*, *Ann Rheum Dis.* 2012 vol. 71(3), str. 448-454;

6. Karnabi E., Boutjdir M. *Role of calcium channels in congenital heart block*, Scand J Immunol. 2010 vol. 72(3), str. 226-34;
7. Clancy R.M., Alvarez D., Komissarova E., et al. *Ro60-associated single-stranded RNA links inflammation with fetal cardiac fibrosis via ligation of TLRs: a novel pathway to autoimmune-associated heart block*, J Immunol. 2010 vol. 184(4), str. 2148-55;
8. Llanos C., Friedman D.M., Saxena A., Izmirly P.M., Tseng C.E., Dische R., Abellar R.G., Halushka M., Clancy R.M., Buyon J.P. *Anatomical and pathological findings in hearts from fetuses and infants with cardiac manifestations of neonatal lupus*, Rheumatology. 2012 vol. 51(6), str.1086-92;
9. Reed J.H., Clancy R.M., Purcell A.W., et al. *β 2-glycoprotein I and protection from anti-SSA/Ro60-associated cardiac manifestations of neonatal lupus*, J Immunol. 2011 vol. 187(1), str. 520-6;
10. Briassouli P., Komissarova E.V., Clancy R.M., Buyon J.P. *Role of the urokinase plasminogen activator receptor in mediating impaired efferocytosis of anti-SSA/Ro-bound apoptotic cardiocytes: Implications in the pathogenesis of congenital heart block*, Circ Res. 2010 vol. 107(3), str. 374-87;
11. Briassouli P., Rifkin D., Clancy R.M., Buyon J.P. *Binding of anti-SSA antibodies to apoptotic fetal cardiocytes stimulates urokinase plasminogen activator (uPA)/uPA receptor-dependent activation of TGF- β and potentiates fibrosis*, J Immunol. 2011 vol. 187(10), str. 5392-401;
12. Alvarez D., Briassouli P., Clancy R.M., et al. *A novel role of endothelin-1 in linking Toll-like receptor 7-mediated inflammation to fibrosis in congenital heart block*, J Biol Chem. 2011 vol. 286, str. 3044-54;
13. Strandberg L.S., Ambrosi A., Jagodic M., et al. *Maternal MHC regulates generation of pathogenic antibodies and fetal MHC-encoded genes determine susceptibility in congenital heart block*, J Immunol. 2010 vol. 185(6), str. 3574-82;
14. Saxena A., McDonnell E., Ramos P.S., et al. *Preferential transmission of genetic risk variants of candidate loci at 6p21 from asymptomatic grandparents to mothers of children with neonatal lupus*, Arthritis Rheum. 2012 vol. 64(3), str. 931-9;
15. Izmirly P.M., Saxena A., Kim M.Y., Wang, et al. *Maternal and fetal factors associated with mortality and morbidity in a multi-racial/ethnic registry of anti-SSA/Ro associated cardiac neonatal lupus*, Circulation. 2011 vol. 124, str. 1927-35;
16. Eliasson H., Sonesson S.E., Sharland G., et al. *Fetal Working Group of the European Association of Pediatric Cardiology. Isolated atrioventricular block in the fetus: a retrospective, multinational, multicenter study of 175 patients*, Circulation. 2011 vol. 124, str. 1919-26;
17. Buyon J.P., Hiebert R., Copel J., Craft J., Friedman D., Katholi M., et al. *Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry*, J Am Coll Cardiol. 1998 vol. 31(7), str. 1658-66;
18. Groves A.M., Allan L.D., Rosenthal E. *Outcome of isolated congenital complete heart block diagnosed in utero*, Heart. 1996 vol. 75(2), str. 190-4;
19. Tunaoglu F.S., Yildirim A., Vurali D. *Isolated congenital heart block*, Tex Heart Inst J. 2010 vol. 37(5), str. 579-83;

20. Friedman D.M., Llanos C., Izmirly P.M., et al. *Evaluation of Fetuses in the Preventive IVIG Therapy for Congenital Heart Block (PITCH) study*; Arthritis Rheum. 2010 vol. 62, str. 1138-46;
21. Pisoni C.N., Brucato A., Ruffatti A., et al. *Failure of intravenous immunoglobulin to prevent congenital heart block: Findings of a multicenter, prospective, observational study*, Arthritis Rheum. 2010 vol. 62, str. 1147-52;
22. Trucco S.M., Jaeggi E., Cuneo B., et al. *Use of intravenous gamma globulin and corticosteroids in the treatment of maternal autoantibody-mediated cardiomyopathy*, J Am Coll Cardiol. 2011 vol. 57, str. 715-23;
23. Izmirly P.M., Kim M.Y., Llanos C., et al. *Evaluation of the Risk of Anti-SSA/Ro-SSB/La Antibody Associated Cardiac Manifestations of Neonatal Lupus in Fetuses of SLE Mothers Exposed to Hydroxychloroquine*, Ann Rheum Dis. 2010 vol. 69, str. 1827-30;
24. Michaelsson M., Jonzon A., Riesenfeld T. *Isolated congenital complete heart block in adult life: a prospective study*, Circulation. 1995 vol. 92, str. 442-449.
25. Friedman R.A. *Congenital AV block. Pace me now or pace me later (?)*, Circulation. 1995 vol. 92, str. 203-205;
26. Jonzon A. *Congenital complete atrioventricular block. A pace in time saves lives(?)*, Europace. 2002 vol. 4, str. 343-344;
27. Thambo J.B., Bordachar P., Garrigue S., et al. *Detrimental ventricular remodelling in patients with congenital complete heart block and chronic right ventricular apical pacing*, Circulation. 2004 vol. 110, str. 3766-3772;
28. Tops L.F., Suffoletto M.S., Bleeker G.B., et al. *Speckle-tracking radial strain reveals left ventricular dyssynchrony in patients with permanent right ventricular pacing*, J Am Coll Cardiol. 2007 vol. 50, str. 1180-1188;
29. Yasuda K., Hayahi G., Ohuchi H., et al. *Dilated cardiomyopathy after pacemaker implantation in complete heart block*, Pediatr Int. 2005 vol. 47, str. 121-125;
30. Moak J.P., Barron K.S., Hougén T.J., et al. *Congenital heart block: development of late-onset cardiomyopathy, a previously underappreciated sequel*, J Am Coll Cardiol. 2001 vol. 37, str. 238-42;
31. Takasugi H., Watanabe K., Ono Y., Echigo S. *Improvement of left ventricular function after changing the pacing site in a child with isolated congenital complete atrioventricular block and dilated cardiomyopathy*, Pediatr Cardiol. 2005 vol. 26, str. 87-89.

Manifestacje kardiologiczne tocznia noworodkowego – patogeneza, matczyne i płodowe czynniki ryzyka złego rokowania, zapobieganie oraz leczenie

Streszczenie

Toczeń noworodkowy jest modelowym przykładem biernie nabytej autoimmunizacji, gdzie uszkodzenie tkanek płodu wynika z przezłożyskowego transportu matczynych przeciwciał IgG anty-SSA/Ro (przeciwciała przeciw antygenowi Rose) i anty-SSB/La (przeciwciała przeciw antygenowi Lane). Najpoważniejszym skutkiem autoimmunizacji u płodu są manifestacje ze strony układu krwionośnego. Manifestacje kardiologiczne stanowią wyzwanie dla naukowców i lekarzy, którzy analizują złożoną patogenzę tej rzadkiej choroby, poszukują czynników ryzyka złego rokowania, a także metod zapobiegania i skutecznego leczenia. Ostatnie badania patogeny wrodzonego bloku serca w toczniu noworodkowym dowodzą istotnej roli reaktywności wobec regionu p200 białka Ro52 oraz autoprzeciwciał reagujących krzyżowo z kanałami wapniowymi typu L. Podkreśla się również ochronną rolę β 2-glikoproteiny I, znaczenie urokinazowego układu

aktywacji plazminogenu w apoptozie kardiomiocytów oraz znaczenie sekrecji endoteliny I przez makrofagi w procesie włóknienia. Zainteresowanie budzą również płodowe MHC (Główny układ zgodności tkankowej, Major histocompatibility complex) w rozwoju wrodzonego bloku serca. Wśród płodowych echokardiograficznych czynników ryzyka związanych ze wzrostem śmiertelności wymienia się: obrzęk płodu, fibroelastozę wsierdza, wczesną diagnozę manifestacji kardiologicznych tocznia noworodkowego, niską akcję komór. Prowadzone są badania nad zastosowaniem w prewencji wrodzonego bloku serca fluorowanych sterydów, immunoglobulin, hydroksychlorochiny. Wątpliwości budzi postępowanie u osób z wrodzonym blokiem serca. Dowiedzono, że stymulacja powinna być dwukomorowa lub zaimplantowana w lewej komorze. Konieczne jest dalsze poszukiwanie czynników ryzyka złego rokowania, stworzenie standardów postępowania w celu prewencji oraz leczenia dorosłych z wrodzonym blokiem serca.

Słowa kluczowe: wrodzony blok serca, tocznia noworodkowy, SSA/Ro

Cardiac manifestations of neonatal lupus- pathogenesis, maternal and fetal factors contributing to mortality, prevention and treatment

Abstract

Neonatal lupus is a model of passively-acquired auto-immunity, in which tissue injury in the fetus is the result of transplacental passage of maternal IgG autoantibodies to SSA/Ro (antigen Rose) and SSB/La (antigen Lane). The most serious result of fetal auto-immunity are cardiac manifestations. They are challenge for scientists and doctors, who evaluate the pathogenesis, maternal and fetal factors contributing to mortality, prevention and efficient treatment of this rare disease. Recent findings suggests that reactivity to the p200 region of the Ro52 protein, as well as antibody targeting of L-Type calcium channels may be important in the development of cardiac-neonatal lupus. Protective role of beta-2 glycoprotein 1, pathologic role of urokinase plasminogen activator system in apoptosis of cardiocytes and role of endothelin-I secretion by macrophages in fibrosis are also stressed. Studies highlight the fetal MHC (Major histocompatibility complex) in the development of congenital heart block (CHB). Fetal echocardiographic risk factors associated with increased mortality included hydrops, endocardialfibroelastosis, earlier diagnosis of cardiac-neonatal lupus and lower ventricular rate. Fluorinated steroids, Intravenous Immunoglobulin and hydroxychloroquine are examined in prevention of disease. Therapeutic approaches in the adult patient with congenital heart block are different. Left Ventricle (LV) pacing or bi-ventricular pacing is a good strategy in adult patients with CHB. It is needed to search other maternal and fetal factors contributing to mortality and to form preventive and therapeutic protocols targeted at adult patients with congenitally-diseased hearts.

Keywords: congenital heart block, neonatal lupus, SSA/Ro

Arkadiusz Macheta¹, Agnieszka Szymczyk², Dorota Choroszyńska³, Justyna Markowicz⁴, Tomasz Roman⁵

PASZPORT BIOLOGICZNY JAKO NARZĘDZIE DIAGNOSTYKI ANTYDOPINGOWEJ

1. Wstęp

Doping sportowy nie jest terminem współczesnym – jego korzenie sięgają czasów prehistorycznych. Już w czasach starożytnych igrzysk greckich, w celu polepszenia wydolności fizycznej zawodników biorących udział w rywalizacji, stosowano różne środki odżywcze podnoszące formę sportową olimpijczyków. Istnieją zapiski zawierające treści o fałszerstwach i korupcji, stwierdzające, iż ówcześni atleci spożywali tuż przed zawodami różne rodzaje mięsa lub krew, wzmacniali się przed zawodami winem i specjalnymi rodzajami grzybów. Notuje się także zażywanie strychniny mieszanej z alkoholem celem wywołania pobudzenia organizmu. Istnieją również zapisy o tym, że wykwalifikowani medycy wspomagali sportowców w przygotowaniach do rywalizacji substancjami o odpowiednim działaniu farmakologicznym, a kucharze przygotowywali im pieczywo o właściwościach analgetycznych, czyli przeciw-bólowych. Niestety nie przetrwało zbyt wiele zapisków z tych czasów, głównie ze względu na to, że wiedza dopingowa było pieczołowicie ukrywana przez kapłanów. Stosowanie środków wspomagających odnotowano także w historii Rzymu. Podczas wyścigów rydwanów dokarmiano konie specjalnymi miksturami, dzięki czemu osiągały lepsze wyniki w biegach. Gladiatorzy również zażywali substancje, które dzisiaj uznane są za dopingujące, jak chociażby dostępne wtedy stymulanty łączone z alkoholem.

Należy jednak wspomnieć i pamiętać o istotnym fakcie, iż starożytność jest również kolebką walki z dopingiem – pierwsza „kontrola antydopingowa” odbyła się podczas igrzysk w Tebach w VI wieku p.n.e., gdzie zawodnikom wzbroniono picia wina w dniu rywalizacji, a rolę kontrolera sprawował wyznaczony kapłan, poprzez sprawdzenie czy oddech sportowca nie pachnie alkoholem [1, 2, 3].

¹ arek.macheta@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

² agusia_szymczyk@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

³ dorota.ch.um@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej

⁴ markowicz_j@tlen.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej

⁵ tomek.gov@gmail.com, Zakład Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym

Niestety, doping to nie tylko historia, a XXI wiek wyjątkowo obficie owocuje odkrywaniem nowych substancji i metod dopingujących w sporcie, zwłaszcza w dyscyplinach wytrzymałościowych. Skutkuje to dynamicznym rozwojem technik diagnostycznych skierowanych na ujawnienie różnorodnych form niedozwolonego wspomagania organizmu, z czego najnowszym i obiecującym osiągnięciem metodycznym, jest monitoringowy program paszportu biologicznego. Polega on na cyklicznych i wielokrotnych pomiarach parametrów laboratoryjnych, kontrolujących fizjologiczne możliwości kompensacji organizmu zawodnika.

2. Definicja i historia dopingu

Na przestrzeni historii pojęcie dopingu miało wiele definicji i interpretacji. Pierwsza oficjalna definicja dopingu pochodzi z angielskiego słownika z roku 1889 - mianem tym określano stosowanie środków narkotycznych u koni wyścigowych. Od tego momentu definicja ta wielokrotnie się zmieniała. W roku 1952 Niemiecka Federacja Medycyny Sportowej dopingiem określiła każdy środek farmakologiczny podany przed zawodami celem zwiększenia osiągnięć sportowych, bez uwzględnienia faktu stwierdzającego skuteczność czy też jego brak. Rada Europy w 1963 roku ustaliła własną definicję doping, określono również listę substancji zabronionych. Zgodnie z tymi ustaleniami dopingiem mianowano: „podanie zawodnikowi obcej dla organizmu substancji bądź też użycie przez osobę zdrową substancji fizjologicznej, w celu podniesienia sprawności fizycznej”. Natomiast Międzynarodowa Federacja Medycyny, która zwalczaniem doping sportowego zajmuje się od roku 1928, podała definicję doping jako rozmyślne lub nieumyślne stosowanie przez sportowca środków lub metod zabronionych przez Międzynarodowy Komitet Olimpijski (Tab.1.) [1, 2, 3, 4, 5].

Obecna oficjalna definicja dopingu pochodzi ze Światowego Kodeksu Antydopingowego, opublikowanego przez Światową Agencję Antydopingową (WADA, ang. *World Anti-Doping Agency*) i posiada ostatecznie brzmienie: “Doping określa się jako pogwałcenie jednego lub więcej z przepisów antydopingowych, określonych w Artykułach 2.1 – 2.8” [6], co oznacza:

- obecność substancji zakazanej lub jej metabolitów lub markerów w próbce fizjologicznej sportowca;
- użycie lub próba użycia substancji zakazanej lub metody zakazanej;
- niewyrażenie zgody lub bez ważnego uzasadnienia niezgłoszenie się na pobranie próbki po powiadomieniu zgodnie z przepisami antydopingowymi lub w inny sposób unikanie pobrania próbki;
- naruszenie odpowiednich wymogów określających dostępność sportowca do kontroli poza zawodami, w tym nieprzedstawienie wymaganych informacji na temat miejsca pobytu zgodnie z Artykułem 5.5 (wymóg informowania przez zawodnika o miejscu jego pobytu);

- manipulowanie lub próba manipulowania jakąkolwiek częścią kontroli antydopingowej;
- posiadanie substancji lub metod zakazanych;
- handel dowolną substancją zakazaną lub metodą zakazaną;
- podanie lub próba podania zawodnikowi substancji zakazanej lub metody zakazanej lub pomaganie, zachęcanie, ułatwianie, podżeganie, ukrywanie lub każdy inny rodzaj współdziałania wiążący się z naruszeniem przepisów antydopingowych lub próbą ich naruszenia [6]. substancje uznane za niedozwolone reguluje Lista Substancji i Metod Zabronionych (Tab.2.) [6, 7].

Wypracowane przez Światową Agencję Antydopingową standardy i wzorce postępowania są przekazywane do wprowadzania krajowym agencjom antydopingowym, które na terenie danego państwa realizują program zwalczania doping w sporcie.

Tabela 1. Historia zwalczania doping w sporcie [8]

Data	Wydarzenie antydopingowe
1928	IAAF ¹ , zostaje pierwszą federacją zabraniającą doping
1966	IAAF, UCI ² i FIFA ³ wprowadzają testy moczu w trakcie swoich mistrzostw
1967	MKOL ⁴ tworzy komisję medyczną i pierwszą listę zabronionych substancji
1968	Testy antydopingowe zostają wprowadzone na Igrzyskach
1970	Zwiększa się liczba dyskwalifikacji spowodowanych dopingiem po dodaniu przez MKOL sterydów anabolicznych do listy zabronionych substancji
1980	Pierwsze testy poza zawodami
1986	Wprowadzony zostaje zakaz transfuzji krwi
1990	Wprowadzone zostają testy krwi
1990	rEPO (rekombinowana erytropoetyna) zostaje wprowadzone na listę
1999	Powstaje WADA ⁵ (międzynarodowa organizacja do walki z dopingiem)
2004	Kodeks antydopingowy zostaje zaakceptowany na całym świecie
2005	Narody Zjednoczone, UNESCO ⁶ przyjmują Międzynarodową Konwencję przeciwko dopingowi
2008	UCI zostaje pierwszą organizacją wprowadzającą Paszport Biologiczny (ABP, ang. <i>Athletes Biological Passport</i>)

¹IAAF – ang. *International Association of Athletics Federations*, Międzynarodowe Stowarzyszenie Federacji Lekkoatletycznych

²UCI - franc. *Union Cycliste Internationale*, Międzynarodowa Unia Kolarska

³FIFA - fr. *Fédération Internationale de Football Association*, Międzynarodowa Federacja Piłki Nożnej

⁴MKOL - Międzynarodowy Komitet Olimpijski

⁵WADA - ang. *The World Anti-Doping Agency*, Światowa Agencja Antydopingowa

⁶UNESCO – ang. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*; Organizacja Narodów Zjednoczonych do Spraw Oświaty, Nauki i Kultury

Tabela 2. Lista Substancji i Metod Zabronionych na rok 2014 [6]

Substancje zabronione na i poza zawodami we wszystkich dyscyplinach sportu	• Substancje niezatwierdzone • Środki anaboliczne • Hormony i substancje pokrewne • Beta-2-agoniści • Antagoniści i modulatory hormonów • Diuretyki i środki maskujące
Substancje zabronione tylko na zawodach	• Stymulanty • Narkotyki • Kanabinoidy THC (marihuana i haszysz) • Glikokortykosteroidy
Metody zabronione w sporcie na i poza zawodami	• Metody zwiększające transfer tlenu • Manipulacje fizyczne lub chemiczne • Doping genetyczny
Substancje zabronione w określonych dyscyplinach sportowych	• Alkohol • Beta-Blokery

3. Procedura kontroli antydopingowej

Procedura przeprowadzania kontroli antydopingowej (pobierania próbek do badań) jest regulowana przez Międzynarodowy Standard Badań Światowego Kodeksu Antydopingowego i może odbywać się w jednej z dwóch możliwych sytuacji: jako test po uprzedniej zapowiedzi lub test niezapowiedziany. Jeśli test jest zapowiedziany – zawodnik powinien stawić się na miejsce kontroli nie później niż do 6 godzin od powiadomienia. W przypadku testu bez zapowiedzi, kontrola powinna odbyć się przed upływem jednej godziny, w czasie której sportowiec powinien znajdować się pod stałą obserwacją. Ważne jest także miejsce i czas testu – badania mogą być wykonywane podczas zawodów, ale również poza ich obrębem, np. podczas zgrupowań czy też w domu [6, 9].

Zastosowane metody testów antydopingowych muszą się charakteryzować zgodnością z tymi samymi procedurami pozyskiwania próbek, przeprowadzane z wykorzystaniem tych samych urządzeń do pobierania próbek oraz z zachowaniem tych samych standardów, przedstawionych w Światowym Kodeksie Antydopingowym. W dokumencie tym zawarte są normy i regulacje prawne określające planowanie testów, powiadamianie zawodników, pobieranie

materiału do badań oraz postępowanie diagnostyczno-laboratoryjne [6]. Postęp techniczny i diagnostyczny, poparty osiągnięciami naukowymi m.in. z zakresu farmakologii, fizjologii i patologii w powiązaniu do dyscyplin klinicznych, umożliwia coraz szybsze i skuteczniejsze wykrywanie i identyfikację substancji i metod dopingu w sporcie (Tab.3.) [10].

Tabela 3. Metody analityczne stosowane do wykrywania dopingu [6,9]

Metoda	Zastosowanie
Chromatografia gazowa (GC) ze spektrometrią mas (MS) i tandemową spektrometrią mas (MS/MS)	Detekcja używek, substancji narkotycznych, diuretyków, steroidów, beta-blokerów, itp.
Chromatografia cieczowa (LC) z detekcją UV/VIS – lub spektrometrią mas (MS) i tandemową spektrometrią mas (MS/MS)	Detekcja glikokortykosteroidów, używek, substancji narkotycznych, diuretyków, itp.
Chromatografia gazowa z izotopową spektrometrią mas (GC/C/IRMS)	Rozróżnienie endo- i egzogennych steroidów
Ogniskowanie izoelektryczne, immunobloting i detekcja chemiluminescencyjna	Analiza erytropoetyny
Analizator hematologiczny i cytometria przepływowa (FC)	Określanie parametrów morfologicznych krwi i detekcja transfuzji krwi
Immunoluminometria (ILMA)	Rozróżnianie przysadkowego i rekombinowanego hormonu wzrostu
Fluorymetria	Detekcja hormonów peptydowych

4. Wyłączenia dla celów terapeutycznych

Zakaz stosowania zabronionego środka nie jest bezwzględny, czego wyrazem jest pojęcie wyłączenia dla celów terapeutycznych (TUE – *Therapeutic Use Exemption*). TUE jest to zezwolenie do zastosowania przez zawodnika substancji lub metody zabronionej, umieszczonych na Liście substancji i metod zabronionych, w ściśle określonych warunkach. Dla sportowców klasy międzynarodowej organem przyznającym TUE jest odpowiednia federacja zawodowa, natomiast dla zawodników klasy krajowej, prawo takie ustala narodowa organizacja antydopingowa, w Polsce – Komisja do Zwalczania Dopingu w Sporcie [2, 6, 11].

Należy spełnić wiele kryteriów, aby sportowiec uzyskał prawo do TUE, m.in. uzyskania potwierdzenia faktu, że zdrowie zawodnika uległoby istotnemu pogorszeniu przy niezastosowaniu substancji lub metody zabronionej, co wiąże się również z tym, iż nie istnieje rozsądna alternatywa lecznicza wobec zakazanej substancji/metody. Istotnym wymogiem jest także brak przyczynienia się użytego środka do poprawy wyników innych niż poprawa stanu zdrowia sportowca, a konieczność stosowania go nie może wynikać absolutnie

z uprzedniego użycia substancji z *Listy zabronionej* w celach innych niż terapeutyczne. Użycie jakiejkolwiek substancji/metody zabronionej celem zwiększenia fizjologicznie niskich poziomów danego endogennego hormonu nie może być argumentem do dopuszczenia interwencji terapeutycznej (Artykuł 4.3. TUE). Poprzez pojęcie „poprawy wyników” rozumie się powrót zawodnika do jego indywidualnego poziomu wyników fizjologicznych. Podsumowując – spodziewanym wynikiem terapii jest poprawa wyników, ale ich wartości nie mogą być wyższe od poziomu w stanie zdrowia danego sportowca [6, 12].

5. Paszport biologiczny sportowca

Jednym ze sztandarowych przedsięwzięć zwiększającym skuteczność wykrywania dopingu jest paszport biologiczny sportowca (ABP, ang. *Athlete Biological Passport*). Termin ten pojawił się w 2000 roku, w 2002 WADA wszczęła prace nad opracowaniem programu paszportu biologicznego, a w 2009 wydała referencyjny dokument dotyczący całej procedury (*Athlete Biological Passport Operating Guidelines*) [6, 13, 14]. Wytyczne te mogą być wykorzystane jako punkt odniesienia dla wszelkich organizacji antydopingowych, zaangażowanych w rozwijanie programu monitorowania zmiennych biologicznych. Paszport biologiczny w swoich założeniach składa się z trzech składowych, dotyczących parametrów: hematologicznych, steroidowych i endokrynologicznych. Jest to swoisty profil sportowca, powstały nie na podstawie pojedynczych badań laboratoryjnych, a w oparciu o serię testów krwi i moczu, które umożliwiają obserwację ewentualnych zmian biochemicznych i morfologicznych w organizmie. Dzięki analizie porównawczej każde znaczące anomalie między wynikami badań a danymi w paszporcie, mogą stać się powodem podejrzenia o stosowanie niedozwolonego wspomaganie wydolności zawodnika, nawet w sytuacji, gdy testy nie wykryją obecności konkretnego niedozwolonego środka dopingującego [8, 15]. Istotne różnice między wartościami wyników badań z przeszłości sportowca a wartościami uzyskanych w ostatnim teście sugerują, że albo zastosowano jakąś formę dopingu, lub że stan zdrowia sportowca wymaga głębszej analizy w celu wyjaśnienia przyczyn zmian mierzonych parametrów. Przewiduje się tendencję, że zawodnicy którzy zademonstrują nienaturalne odchylenia fizjologiczne w przeprowadzonych testach antydopingowych, będą tymczasowo wykluczeni z zawodów, wstępnie do czasu powrotu do poziomu prawidłowego. Wszczęta wówczas kontrola medyczna wyjaśniająca przyczyny nieprawidłowości, będzie prowadzić do poważnych i długotrwałych sankcji organizacji antydopingowej, jeśli to wzbronione prawem wspomaganie organizmu, a nie choroba okaże się przyczyną takiego stanu rzeczy [14, 15].

Zadaniem ustalenia hematologicznego profilu sportowca jest gromadzenie informacji na temat markerów dopingu krwi. Ma to na celu identyfikację

zwiększenia transportu tlenu, w tym stosowania czynników stymulujących erytropoezę i każdej postaci transfuzji krwi lub manipulacji jej składnikami. W 2008 roku Międzynarodowa Unia Kolarska jako pierwsza organizacja sportowa zdecydowała się wdrożyć go w życie, aby wykrywać doping krwią u kolarzy, dyskwalifikując kilku zawodników na podstawie nieprawidłowego profilu hematologicznego. Obecnie, na kontroli bazującej na badaniach 8 parametrów krwi, opiera się kilka organizacji antydopingowych i dotyczy co najmniej kilku tysięcy sportowców z całego świata [6,16,17,18].

Markery hematologiczne ABP:

- hemoglobina (HGB);
- hematokryt (HCT);
- liczba erytrocytów (RBC);
- liczba retikulocytów (RET);
- średnia objętość krwinki czerwonej (MCV);
- średnia masa hemoglobiny w erytrocycie (MCH);
- średnie stężenie hemoglobiny w erytrocycie (MCHC);
- wskaźnik zmienności objętości erytrocyta (RDW-SD).

Moduł steroidowy gromadzi informacje na temat markerów sterydowych doping. Jego celem jest wykrywanie bezpośredniego lub pośredniego zastosowania endogennych steroidów anaboliczno-androgennych oraz innych środków anabolicznych, jak np. selektywnych modulatorów receptora androgenowego. Standaryzacja paszport steroidowy jest obecnie w stadium finalnym i zostanie wkrótce wdrożony w praktyce antydopingowej [5, 6, 19].

Markery steroidowe ABP:

- testosteron;
- epitestosteron;
- stosunek testosteron/epitestosteron;
- androsteron;
- etiocholanolon;
- 5-alfa-androstan-3-alfa-17-beta-diol;
- 5-beta-androstan-3-alfa-17-beta-diol.

Moduł endokrynologiczny natomiast, ma na celu wykrywanie doping hormonalnego, np. stosowania hormonu wzrostu czy insulinopodobnego czynnika wzrostu I. Procedura detekcji w tym zakresie wymaga jeszcze badań i dopracowania, aby zapewnić dostatecznie wysoką jakość standardów laboratoryjnych [6, 19].

Poza danymi dotyczącymi poziomu opisywanych markerów, w paszporcie biologicznym zawarte powinny być również informacje, tj.: płeć, wiek, wyniki badań genotypu, rejestr przebywania na większych wysokościach czy też sposobu pobrania, transportu, badania i przechowywania próbki, gdyż każda z danych może być kluczowa dla wyniku testów antydopingowych. Analiza

danych przebiega na zasadzie wnioskowania bayesowskiego. Sieć bayesowska pozwala na określenie prawdopodobieństwa zajścia powiązanych ze sobą zdarzeń poddanych testowi. Zaobserwowanie jednej lub nawet kilku zmian parametrów krwi nie oznacza automatycznie stosowania dopingu. Jednak zmiany takie wpływają na zmianę prawdopodobieństwa kolejnego zdarzenia w sieci powiązań. Poszczególne informacje przemawiające za stosowaniem dopingu mogą być włączone do innego elementu i/lub potwierdzone przez dodatkowe dowody, co potwierdza zasadność gromadzenia tego typu dodatkowych informacji, które mogą mieć udział w całokształcie procesu decyzyjnego. Wnioskowanie bayesowskie jest zatem uważane za narzędzie użyteczne do badania prawdopodobieństw całych gałęzi zdarzeń, szczególnie w sytuacjach kiedy zmiany zachodzące w poszczególnych węzłach gałęzi są stosunkowo niewielkie i pozornie mało istotne [20, 21, 22, 23].

6. Wnioski

Działania mające na celu wspomaganie wydolności organizmu towarzyszą dziejom ludzkości od jej narodzin, a historia sztucznego zwiększania sprawności fizycznej jest tak wiekowa i bogata, jak historia samego sportu. Od początku istnienia ludzkości rywalizacja sportowa przebiegała w towarzystwie walki za wszelką cenę, z dala od obowiązujących wówczas zasad etycznych czy prozdrowotnych. Korzenie dopingu, sięgające starożytności, również współcześnie są jednym z zagrożeń uczciwego ducha sportu, a zwalczanie dopingu w sporcie zawodowym pod wieloma względami przypomina walkę z wiatrakami. Podczas gdy jedni naukowcy swój wysiłek wkładają w opracowanie coraz to nowszych rodzajów dopingu, inni pracują nad sposobami ich skutecznej identyfikacji. Historia pozwala jednak przypuszczać, że kolejne sukcesy diagnostyczne nie rozwiążą jednoznacznie problemu zwalczania globalnego problemu dopingu. Dzieje się bowiem zwykle tak, że nawet jeśli uda się opracować skuteczną metodę wykrywania wspomagania organizmu, jedynie kwestią czasu jest znalezienie przez sportowców i ich sztaby szkoleniowe nowych metod dopingowych. Zawsze bowiem wśród najlepszych znajdzie się ktoś bardziej przebiegły. Należy jednak liczyć, że większą przebiegłością na linii uczciwy sport – doping, wykaże się obiektywna technika wykrywania znamion łamania zasad *fair play* w sporcie. Nowe nadzieje na to, że swojego rodzaju gra w kotka i myszkę zakończy się powodzeniem, daje wprowadzenie paszportu biologicznego sportowca.

Literatura

1. *Przeciwdziałanie dopingowi w sporcie: wybrane problemy i metody*, red. J. Rychta, Warszawa, Resortowe Centrum Metodyczno – Szkoleniowe Kultury Fizycznej i Sportu, 1995;
2. *Doping zabija sport*, red. W. Granowska, Warszawa, Towarzystwo Lekarskie Warszawskie, 2006;
3. *Doping*, red. W. Rewerski, K. Nazar, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1995;
4. Rohatgi V., Reddy N., *Doping in sports – past, present and future*, *International Journal of Current Research and Review*, 2012, 04, 133-139;
5. Hailey N., *A false start in the race against doping in sport: concerns with cycling's biological passport*, *Duke Law Journal*, 2011, 61, 393-432;
6. *Światowy Kodeks Antydopingowy (online)*, Montreal, World Anti-Doping Agency, 2009 [dostęp 10 lutego 2014]: Dostęp w World Wide Web: www.anti-doping.pl/plik/2009/File/2009/01/kodeks_wada_2009.pdf;
7. Lippi G., Plebani M., *Athlete's biological passport: to test or not to test?*, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, 49, 1393-1395;
8. Sottas P.E., Robinson N., Rabin O., Saugy M., *The athlete biological passport*, *Clinical Chemistry*, 2011, 57, 969-976;
9. *Antydoping w sporcie*, red. A. Pokrywka, Warszawa, Instytut Sportu, 2009;
10. Chrostowski K., *Postępy diagnostyki antydopingowej*, *Sport Wyczynowy*, 2002, 1, 445-446;
11. Deklaracja Kopenhaska w sprawie zwalczania doping w sporcie. Dokument Grupy Monitorującej Rady Europy T-DO, 2003, Inf 4 Final;
12. Wach A., Światowy Kodeks Antydopingowy – aspekty prawne, *Sport Wyczynowy*, 2003, 7-8, 463-464;
13. Cazzola M.A., *Global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs*, *Haematologica*, 2000, 85, 561-563;
14. Ashenden M.A., *Strategy to deter blood doping in sport*, *Haematologica*, 2002, 87, 225-232;
15. Robinson N., Saugy M., Vernec A., Sottas P.E., *The Athlete Biological Passport: An effective tool in the fight against doping*, *Clinical Chemistry*, 2011, 57, 830-832;
16. Swiss Laboratory for Doping Analyses. Athlete's Hematological Passport interpretation technical document. Aigle (Switzerland), Union Cycliste Internationale (UCI), 2008;
17. Schumacher Y.O., d'Onofrio G., *Scientific Expertise and the Athlete Biological Passport: 3 Years of Experience*, *Clinical Chemistry*, 2012, 58, 979-985;
18. Pottgiesser T., Ehteler T., Sottas P.E., Umhau M., Schumacher Y.O., *Hemoglobin Mass and Biological Passport for the Detection of Autologous Blood Doping*, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2011, 44, 835-843;
19. Patrick K. *Passport to clean competition*. BMJ Publishing Group, 2012;
20. Taroni F., Aitken C., Garbolino P., Biedermann A., *Bayesian networks and probabilistic Inference in Forensic Science*, *Statistics in practice*. John Wiley and Sons; 2006;
21. Sottas P.E., Robinson N., Niggli O., Saugy M., *A forensic approach to the interpretation of blood doping markers*, *Law, Probability & Risk*, 2008, 7, 191-210;

22. Sottas P.E., Robinson N., Giraud S., Taroni F., Kamber M., Mangin P., Saugy M., *Statistical classification of abnormal blood profiles in athletes*, *The International Journal of Biostatistics*, 2006, 2, 3;
23. Robinson N., Sottas P.E., Mangin P., Saugy M., *Bayesian detection of abnormal hematological values to introduce a no-start rule for heterogeneous populations of athletes*, *Haematologica*, 2007, 92, 1143-1144;

Paszport biologiczny jako narzędzie diagnostyki antydopingowej

Streszczenie

Doping definiuje się jako korzystanie z zabronionych substancji lub metod, mających na celu zwiększenie wydolności fizycznej lub psychicznej sportowca lub zamaskowania użycia takich substancji lub metod, podczas przygotowań do udziału w zawodach sportowych. Doping jest tak stary, jak sport, przy czym obecna oficjalna definicja dopingu jest określona na podstawie Światowego Kodeksu Antydopingowego (WADA). Na początku XX wieku WADA oraz Międzynarodowa Unia Kolarska (UCI) zgodziły się na wprowadzenie nowego, radykalnego programu antydopingowego znanego jako Paszport Biologiczny. Podstawową zasadą paszportu biologicznego jest monitorowanie wybranych parametrów biologicznych i pośrednie ujawnienie skutków stosowanego przez sportowca dopingu, z wyłączeniem starania wykrycia substancji dopingujących czy określenia samej metody. Zakaz stosowania zabronionego środka nie jest jednak absolutny, co znajduje odzwierciedlenie w koncepcji Wyłączenia dla Celów Terapeutycznych (TUE). Jest to pewnego rodzaju pozwolenie do użycia przez zawodnika substancji lub metody zabronionej, umieszczonych na Liście substancji i metod zabronionych, ale w ściśle określonych przepisami warunkach.

Słowa kluczowe: paszport biologiczny, doping, diagnostyka antydopingowa

Biological passport as an implement of anti-doping diagnostic procedures

Abstract

Doping is defined as the using of banned substances or methods designed to enhance an athlete's physical or mental abilities or to mask the use of such substances or methods during preparation for or participation in a sports contest. Doping is as old as the sport, then the current official *definition of doping* is given based on the World Anti-Doping Code (WADA). In the beginning of the twentieth century the WADA and the International Cycling Union (UCI) and agreed to implement a relentless new antidoping program known as the Athlete Biological Passport (ABP). The fundamental principle of the biological passport is to control selected biological parameters over time that indirectly reveal the effects of doping rather than attempting to detect the doping substance or method itself. Prohibition on the use of a forbidden measure isn't absolute, which is reflected in the concept of Therapeutic Use Exemption (TUE). TUE is approved for use by a competitor of the substance or banned method placed on the List of Prohibited Substances and Methods, under specific conditions.

Key words: biological passport, ABP, doping, anti-doping diagnostic methods

Adam Iwaniuk¹, Paulina Pawlik², Anna Szajerska³, Paweł Binko⁴, Milena Karpiarz⁵, Joanna Horbaczewska⁶, Elżbieta Mazur-Stążka⁷

PROBLEMY DIAGNOSTYCZNE U PACJENTÓW PO TĘPYM URAZIE SERCA

1. Wprowadzenie

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) urazy są trzecią, zaraz po chorobach układu krążenia oraz nowotworach, przyczyną umieralności na świecie. Są zarazem pierwszą pod względem częstości przyczyną zgonów w grupie wiekowej 5-44 lat w Europie [1]. Urazy możemy podzielić na zamierzone, np. samobójstwa oraz niezamierzone, a wśród nich wiodącą rolę odgrywają wypadki komunikacyjne, stanowiąc 16% ogółu urazów [1]. Dane z 2011 roku umiejscawiają wypadki na dziewiątym miejscu pod względem przyczyn globalnej umieralności na świecie [2], jednak zgodnie z prognozami WHO w roku 2030 znajdą się na miejscu siódmym [3].

Jednym z najczęściej występujących obrażeń jest uraz klatki piersiowej, będący w USA czynnikiem sprawczym 25% przypadków śmiertelnych [4]. Wykazano, że urazom wielonarządowym w 45-60% towarzyszy uraz klatki piersiowej i wtedy śmiertelność osiąga 60% [5]. Jako, że klatka piersiowa jest tworem elastycznym, wszelkie działające na nią siły są przekazywane do jej wnętrza i mogą uszkadzać ochraniane narządy. W badaniach autopsyjnych u pacjentów po tępych urazach klatki piersiowej zadanych z dużą siłą w 16% stwierdzono stłuczenie serca [6], natomiast po tępych urazach serca (BCI – *blunt*

¹ iwaniuk.adam@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

² paulina_pawlik@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii,
www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/anestezjologia-i-intensywna-terapia;

³ anna.szajerska@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii,
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

⁴ pawele90@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii,
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

⁵ milenakarpiarz@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii,
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

⁶ joanna.horbaczewska@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Kardiologii,
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

⁷ estazka@o2.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Klinika Kardiologii,
<http://www.spsk4.lublin.pl/index.php/struktura/kliniki/kardiologia>;

cardiac injury) ogniska stłuczenia widoczne były w 60-100% [7]. Objawy prezentowane przez pacjentów po BCI są niespecyficzne i wciąż przysparzają trudności diagnostycznych klinicystom.

Tępy uraz serca ogólnie rzecz ujmując jest konsekwencją zadziałania niepenetrującej siły. Jest charakteryzowany przez nieregularne obszary martwicy kardiomiocytów, wylewy krwawe, pęknięcia drobnych naczyń, krwawienie śródmiąższowe oraz wokół włókien mięśniowych [8, 9, 10, 11]. Rozpoznanie BCI na podstawie wyżej wymienionych zmian może być z łatwością postawione w trakcie operacji lub w badaniu pośmiertnym, lecz nie za pomocą konwencjonalnych metod obrazowania [11]. W literaturze BCI został opisany jako powszechna, aczkolwiek rzadko podejrzewana przyczyna śmierci u ofiar wypadków [11]. Spektrum następstw tępego urazu serca jest bardzo szerokie: uraz może nie dawać żadnych dolegliwości lub spowodować pęknięcie mięśnia sercowego z natychmiastowym zgonem [11]. Niektóre objawy sugerujące wystąpienie BCI mogą być konsekwencją istniejącej wcześniej choroby serca, np. arytmie, lub wynikać z urazu nie związanego z klatką piersiową. Różnorodność następstw BCI, objawów klinicznych oraz nieobecność tzw. złotego standardu diagnostycznego utrudnia postawienie rozpoznania tępego urazu serca.

2. Cel pracy

Celem pracy była analiza piśmiennictwa dotycząca tępych urazów serca, ze szczególnym zwróceniem uwagi na problemy diagnostyczne stanów chorobowych będących skutkiem tych urazów.

3. Urazy serca

Urazy serca podobnie jak urazy klatki piersiowej możemy podzielić na tępe oraz penetrujące. Penetrujące są spowodowane zwykle działaniem narzędzia ostrokończystego np. noża lub postrzałów z broni palnej. Rokowanie w tych przypadkach dla pacjentów jest niekorzystne, do 90% ginie przed dotarciem do oddziału ratunkowego [12]. W sytuacji urazów tępych mamy do czynienia głównie z urazami komunikacyjnymi, zwłaszcza kolizjami pojazdów mechanicznych, ale również sportowymi (karate, hokej), upadkami z dużej wysokości lub pobiciami. Tępe urazy są znacznie częściej spotykane niż penetrujące [4]. Częstość występowania tępych urazów serca nie jest stała. Różni autorzy przedstawiają ją w bardzo szerokich granicach od 20% [13] do 76% w przypadku ciężkiego urazu klatki piersiowej lub urazu wielonarządowego [7].

3.1. Urazy towarzyszące

W obrazie klinicznym pacjenta po urazie komunikacyjnym bardzo rzadko spotyka się izolowany uraz klatki piersiowej lub serca, częściej są to urazy wielonarządowe. Schultz i Trunkey w swoich badaniach nad BCI odnotowali najczęściej towarzyszące mu obrażenia. Częstość ich występowania jest niezwykle zróżnicowana i przedstawia się następująco: złamania żeber (18-69%), stłuczenie płuc (6-58%), wiotka klatka piersiowa (4-38%), złamanie mostka (0-60%), urazy głowy (20-73%), uraz aorty lub dużych naczyń (20-40%), krwiak opłucnej (7-64%), odma opłucnowa (7-40%), urazy kończyn (20-66%), urazy kręgosłupa (10-20%) oraz urazy narządów jamy brzusznej (5-43%) [7].

3.2. Mechanizmy urazu

Obrażenia powstałe w przypadku zaistnienia tępego urazu serca są możliwe na drodze następujących mechanizmów [7,14]:

- kompresja serca pomiędzy mostkiem a kręgosłupem;
- nagłe wahania ciśnienia panującego w klatce piersiowej lub jamie brzusznej;
- nagłe wyhamowanie dużej prędkości (urazy deceleracyjne) lub skręcenie, powodujące rozdarcie serca w punkcie przytwierdzenia, np. w miejscu połączenia prawego przedsionka i żyły głównej, lewego przedsionka i żył płucnych, jak też początkowego odcinka aorty lub jej cieśni;
- złamania mostka lub żeber i wtórne uszkodzenia serca;
- tępy uraz.

Wielkość obrażeń narządów klatki piersiowej w przypadku zmniejszania jej wymiarów zależy od szybkości narastania kompresji. Cooper i Maynard w pracy poświęconej kinetycznym aspektom urazów wykazali, że wymiar klatki piersiowej może się zmniejszyć do 50% bez większego uszkodzenia narządów wewnętrznych. Dzieje się tak, jeśli tempo zniekształcenia jest małe (szczytowe zniekształcenie w czasie większym niż 20-50 ms). Jeśli do takiego zniekształcenia dochodzi w czasie mniejszym niż 5 ms, może ono powodować poważne uszkodzenia narządów nawet przy zmianie wymiaru o 3-4 cm [15].

Nagła zmiana ciśnienia w jamie brzusznej lub klatce piersiowej będąca skutkiem urazu może doprowadzić do pęknięcia serca. Jest to spowodowane gwałtownym wzrostem ciśnienia żylnego, które w konsekwencji oddziałuje na prawy przedsionek lub prawą komorę [7].

Czasami bywa tak, że tępy uraz wywołuje penetrujące obrażenia serca. Dochodzi do tego, gdy siła działająca na ścianę klatki piersiowej powoduje złamania jej kostnych elementów. Ostre odłamy mostka mogą uszkadzać prawą komorę, natomiast żeber - doprowadzić do perforacji prawej lub lewej komory [16,17].

W tępych urazach częściej dochodzi do uszkodzenia struktur prawego niż lewego serca [18]. Wynika to z przedniego ułożenia prawego przedsionka i prawej komory w śródpiersiu, blisko tylnej powierzchni przedniej ściany klatki piersiowej, gdzie zwykle działają siły np. w wypadkach komunikacyjnych.

3.3. Postacie tępego urazu serca

3.3.1. Stłuczenie mięśnia sercowego

Jest najpowszechniejszą formą tępego urazu serca. Częstość występowania podawana w literaturze waha się w szerokich granicach 5-71% [19, 20]. Histologiczne zmiany wykrywane w stłuczeniu są podobne do tych znajdujących w zawale mięśnia sercowego [21]. Stłuczenie serca jest często związane z uszkodzeniem naczyń wieńcowych charakteryzującym się rozerwaniem, skurczem lub zakrzepicą, co prowadzi do zawału mięśnia sercowego [22]. Ta postać BCI może nie wykazywać żadnych objawów lub przebiegać pod postacią przedsionkowych lub komorowych arytmii, zaburzeń przewodnictwa obejmujących blok odnóg pęczka Hisa lub zmian elektrokardiograficznych przypominających zawał mięśnia sercowego lub zapalenie osierdzia. Za powstanie arytmii pourazowej odpowiedzialne mogą być zaburzenia elektrolitowe, hipoksja, towarzyszące urazowi podwyższenie poziomu amin katecholowych jak też oddziaływanie alkoholu, leków lub narkotyków [23].

3.3.2. *Commotio cordis* – wstrząśnienie serca

Termin ten nawiązuje do rzadkiego typu tępego urazu serca, który skutkuje nagłym zgonem sercowym. Związany jest z niskoenergetycznym urazem klatki piersiowej zwykle podczas uprawiania sportu np. poprzez uderzenie krążkiem hokejowym w okolicę przedsercową lub zderzenie się z nadbiegającym z przeciwka zawodnikiem. Do wystąpienia wstrząśnienia dochodzi w mechanizmie arytmii, która zawiązuje się, jeśli uraz ma miejsce w okresie podatności elektrycznej serca (faza ranliwa), około 10-30 ms przed szczytem załamka T w EKG [24].

3.3.3. Pęknięcie mięśnia sercowego

Jest najgorzej rokującym stanem po BCI. Śmiertelność pacjentów po pęknięciu mięśnia sercowego oscyluje w przedziale od 81,5-85 do 100% [25, 26, 27, 4]. W pośmiertnym badaniu 546 pacjentów po BCI u 64% wykazano pęknięcie przynajmniej jednej, a u 20% minimum dwóch jam serca [13]. Napętniona krwią komora we wczesnej fazie skurczu jest bardziej podatna na pęknięcie, jeżeli dozna urazu wzdłuż swojej drogi odpływu [28]. Innym mechanizmem jest rozdarcie serca w miejscu połączenia przedsionków z żyłą główną lub żyłami płucnymi we wspomnianym wcześniej mechanizmie

deceleracyjnym [29]. Wreszcie możliwy jest scenariusz pęknięcia serca na skutek ściśnięcia między mostek i kręgosłup [30]. Częstotliwość pęknięcia poszczególnych struktur serca jest w literaturze raportowana w bardzo szerokich granicach. Według dwóch dużych badań pośmiertnych podział ten przedstawia się następująco: pęknięcie prawego przedsionka 5% i 40,6%, prawej komory 15% i 31,3%, lewego przedsionka 10% i 25% oraz lewej komory 10% i 12,5% [31, 32].

3.3.4. Pęknięcie aorty

Jest drugą w kolejności przyczyną śmierci u pacjentów po tępych urazach [33]. W większości poszkodowani giną na miejscu a tylko od 13 do 15% dociera do szpitala [33, 34]. Powinno się je podejrzewać w szczególności w przypadku, gdy mamy do czynienia z deceleracyjnym lub akceleracyjnym mechanizmem urazu. Najczęściej zdarza się w urazach komunikacyjnych, potrąceniach pieszych oraz upadkach z dużej wysokości [35].

3.3.5. Uszkodzenie zastawek

W zasadzie każda z zastawek serca może ulec uszkodzeniu w następstwie BCI. Ismailov i współpracownicy w swoim badaniu wykazali, że tępy uraz serca wiąże się z 12-krotnym wzrostem ryzyka uszkodzenia aparatu zastawki trójdzielnej [36]. Stan ten był związany z gwałtownym wzrostem ciśnienia panującego w prawej komorze w następstwie urazu [37]. Najczęściej dochodzi do rozerwania struny ścięgnowej, kolejno pęknięcie przedniego mięśnia brodawkowatego oraz rozdarcie przedniego płata zastawki [37]. BCI wiązał się też z 3-4 razy częstszym uszkodzeniem aparatu zastawki aortalnej [36]. Niekiedy BCI nie powoduje natychmiastowej niewydolności zastawkowej, która jednak może pojawić się po pewnym czasie. Bywa tak szczególnie w przypadku zastawki trójdzielnej i mitralnej, gdy dochodzi do stłuczenia mięśni brodawkowatych z krwawieniem, zapaleniem i późno pojawiającą się martwicą [38].

3.3.6. Ostry zespół wieńcowy

Stan ten może wystąpić w rezultacie rozwarstwienia naczynia wieńcowego, jego skurczu lub indukowanej stresem zakrzepicy [39]. Udowodniono, że tępy uraz serca wiąże się z 2,6-krotnym zwiększeniem ryzyka zawału serca u osób ≥ 46 lat [40]. Wydaje się, że najczęściej uszkodzeniu ulega gałąź międzykomorowa przednia lewej tętnicy wieńcowej [41].

4. Problemy diagnostyczne urazów serca

Tępy uraz serca jest często związany z urazem klatki piersiowej, dlatego powinien być brany pod uwagę u każdego pacjenta z urazem wielonarządowym. Mnogość niespecyficznych objawów zgłaszanych przez pacjenta, jak również różnorodność postaci BCI, które mogą wystąpić w konkretnym przypadku utrudnia postawienie właściwego rozpoznania. Ponadto ciężkość doznanego urazu nie zawsze odpowiada ciężkości uszkodzeń serca. Na chwilę obecną brak jest również czułego i swoistego w stosunku do BCI testu diagnostycznego, który spełniałby rolę tzw. złotego standardu. Agarwal i Chandra [22] w swojej pracy wymieniają 4 główne zagadnienia utrudniające postawienie właściwej diagnozy (tabela 1).

Tabela 2. Co utrudnia postawienie diagnozy BCI

Co utrudnia rozpoznanie BCI?	Przykłady
Towarzyszące urazy, odwracające uwagę od BCI	Niediagnozowanie ostrego zespołu wieńcowego z powodu innych stanów zacierających objawy – złamane żeber, stłuczenie płuc, krwawienie do opłucnej, odma opłucnowa mogą powodować ból lub wstrząs maskując objawy zawału [42,43]
Niedostatek objawów przedmiotowych	Nieobecność poszerzonych żył szyjnych (występujących normalnie w tamponadzie) osierdza na skutek hipowolemii
Brak specyficznych i nieinwazyjnych badań dostępnych w oddziałach ratunkowych	Niespecyficzność zmian w RTG, elektrokardiogramach oraz badaniu echokardiograficznym
Opóźnione wystąpienie objawów klinicznych	Widoczne np. w przewlekłym zapaleniu osierdza. Doniesiono, że czas od urazu do diagnozy krwaka osierdza dającego objawy przewlekłego zapalenia osierdza waha się od 3 do 20 lat [44]

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu [22]

Najczęstszym objawem towarzyszącym tępemu urazowi serca jest ból odczuwany w klatce piersiowej [45], aczkolwiek jak wcześniej wspomniano jest to objaw bardzo niespecyficzny, mogący wynikać z innych obrażeń. Ponieważ BCI jest zwykle spowodowany działaniem dużych sił, obecność towarzyszących

urazów (wymienionych w odpowiednim paragrafie) może nasuwać jego podejrzenie. Obecność objawów osłuchowych, takich jak szmery, tarcie czy drżenia mogłoby sugerować BCI, ale zwykle się ich nie znajduje [46]. Najczęściej znajdowanymi wykładnikami urazu serca są arytmie, niedokrwienie serca, mały rzut serca oraz hipotensja [7].

W obecnej chwili diagnostyka tępego urazu serca opiera się na badaniu elektrokardiograficznym (EKG), echokardiograficznym (TTE lub TEE), badaniu sercowej troponiny I oraz badaniu tomograficznym (CT). Stosowane metody powinny identyfikować tych pacjentów, którzy są w grupie ryzyka rozwinięcia powikłań po BCI [7] lub którzy już je rozwinęli. Powinny też mieć możliwość definitywnego wykluczenia istnienia BCI w sytuacji, gdy pacjent pierwotnie jest przyjmowany na oddział ratunkowy z powodu towarzyszących obrażeń, jest wstępnie hemodynamicznie stabilny i wydaje się, że nie wymaga intensywnej opieki medycznej [47]. Aby móc bezpiecznie wypisać go ze szpitala, kluczowe jest wyeliminowanie podejrzenia BCI.

Wschodnie Towarzystwo Chirurgii Urazowej (*An Eastern Association for the Surgery of Trauma – EAST*) w 2012 roku przedstawiło wytyczne dotyczące badań przesiewowych w kierunku tępego urazu serca [47]. Zgodnie z nimi, samo badanie elektrokardiograficzne i jego prawidłowy wynik są niewystarczające do wykluczenia BCI. Natomiast dołączenie do niego analizy poziomu sercowej troponiny I i prawidłowy wynik obu badań ma 100% negatywną wartość predykcyjną w stosunku do BCI. Badanie EKG powinno być wykonane przy przyjęciu u każdego pacjenta z podejrzeniem tępego urazu serca (poziom I rekomendacji) [47].

5. Podsumowanie

Diagnostyka tępych urazów serca jest rzeczą trudną. Różnorodność objawów prezentowanych przez pacjenta (lub ich brak), mnogość konsekwencji BCI jak również nakładanie się towarzyszących obrażeń utrudnia postawienie odpowiedniego rozpoznania klinicyście. Podejrzenie BCI powinno być zawsze brane pod uwagę przy wypadkach komunikacyjnych, upadkach z dużej wysokości oraz urazach wielonarządowych. Najnowsze wytyczne budzą nadzieje na rozjaśnienie nieco ścieżki prowadzącej do prawidłowej diagnozy, będąc jednocześnie pomocnymi w jednoznacznym wykluczeniu tępego urazu serca.

Literatura

1. *Injuries in Europe: a call for public health action An update from 2008 WHO Global Burden of Disease* [online] s. 1 [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/171973/Injuries-in-Europe-a-call-for-public-health-action-An-update-from-2008-WHO-Global-Burden-of-Disease.pdf;
2. *The top 10 causes of death* [online] [dostęp 10 lutego 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>;
3. *World health organization, Global health estimates summary tables: Projection of deaths by cause, age and sex, by world bank income group and who region* [online] 2013 [dostęp 10 lutego 2014] Dostępny w World Wide Web: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/;
4. Shorr R, Crittenden M, Indeck M, Hartunian S, Rodriguez A: *Blunt thoracic trauma: analysis of 515 patients*, *Ann Surg* 1987, 206(2):200-5;
5. Shirley P: *Trauma and critical care III: chest trauma*, *Trauma* 2005, 7(3):133-142;
6. DeMuth WE Jr, Baue AE, Odom JA Jr. *Contusions of the heart*, *J Trauma*. 1967 May; 7(3):443-55;
7. Schultz JM, Trunkey DD. *Blunt cardiac injury*, *Crit Care Clin* 2004; 20:57-70;
8. Christensen MA, Sutton K.R. *Myocardial contusion: new concepts in diagnosis and management*, *Am J Crit Care* 2(1):28-34;
9. Liedtke AJ, DeMuth WE. *Nonpenetrating cardiac injuries: a collective review*, *Am Heart J* 86(5):687-97;
10. Pooler C, Barkman A. *Myocardial injury: contrasting infarction and contusion*, *Critical Care Nurse* 22(1);
11. Pretre R, Chilcott M. *Blunt trauma to the heart and great vessels*, *N Engl J Med*. 1997; 336(9):626-32;
12. Kang N, Hsee L, Rizoli S, Alison P. *Penetrating cardiac injury: Overcoming the limits set by Nature*, *Injury* 2009; 40:919-27;
13. Parmley LF, Manion WC, Mattingly TW. *Nonpenetrating traumatic injury of the heart*, *Circulation*. 1958; 18:371e396;
14. Ayman El-Menyar, Hassan Al Thani, Ahmad Zarour, Rifat Latifi *Understanding traumatic blunt cardiac injury*, *Ann Card Anaesth*. 2012 Oct-Dec; 15(4):287-95;
15. Cooper GJ, Maynard RL. *An experimental investigation of the biokinetic principles governing nonpenetrating impact to the chest and the influence of the rate of body wall distortion upon the severity of lung injury*, *ProG IRCOB Conference on the Biokinetics of Impacts, Zurich*, 1986; 331-342;
16. Fulda G, Brathwaite CE, Rodriguez A, Turney SZ, Dunham CM, Cowley RA. *Blunt traumatic rupture of the heart and pericardium: a ten-year experience (1979 – 1989)* [discussion], *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 1991; 31(2):167-73;
17. Patetsios P, Priovolos S, Slesinger TL, Sclafani SJ, O'Neill PA. *Lacerations of the left ventricle from rib fractures after blunt trauma*, *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 2000; 49(4):771-3;
18. Sutherland GR, Driedger AA, Holliday RL, Cheung HW, Sibbald WJ. *Frequency of myocardial injury after blunt chest trauma as evaluated by radionuclide angiography*, *Am J Cardiol* 1983; 52(8):1099-103;

19. Holanda MS, Domínguez MJ, López-Espadas F, López M, Díaz-Regaón J, Rodríguez-Borregán JC (2006) *Cardiac contusion following blunt chest trauma*, Eur J Emerg Med. 13(6):373-376;
20. Frazee RC, Mucha P, Farnell MB, et al. (1986) *Objective evaluation of blunt cardiac trauma*, J Trauma 26:510-520;
21. Tenzer ML (1985) *The spectrum of myocardial contusion: a review*, J Trauma 25:620-627;
22. Dipti Agarwal . Subhash Chandra *Challenges in the diagnosis of blunt cardiac injuries*, Indian J Surg (September-October 2009) 71:245-253;
23. McLean RF, Devitt JH, McLellan BA, Dubbin J, Ehrlich LE, Dirkson D. *Significance of myocardial contusion following blunt chest trauma*, J Trauma. 1992 Aug;33(2):240-3;
24. Marshall DT. *The spectrum of findings in cases of sudden death due to blunt cardiac trauma- 'commotio cordis*, Am J Forensic Med Pathol 2008;29:1-4;
25. Ebert L, Schön C, Ruder T, Thali M, Hatch G: *Fatal left ventricular rupture and pericardial tamponade following a horse kick to the chest*, American Journal of Forensic Medicine & Pathology 2011;
26. Martin LF, Mavroudis C, Dyess DL, Gray LA Jr, Richardson JD: *The first 70 years experience managing cardiac disruption due to penetrating and blunt injuries at the University of Louisville*, Am Surg 1986, 52(1):14-19;
27. Mattox KL, Koch LV, Beal AC Jr, DeBakey ME. *Logistic and technical considerations in the treatment of the wounded heart*, Circulation. 1975;52(2 Suppl):I210eI214;
28. Pollock Be, Markelz RA, Shuey HE. *Isolated traumatic rupture of the interventricular septum due to blunt force*, Am Heart J 1952;43:273-85;
29. Nan YY, Lu MS, Liu KS, Huang YK, Tsai FC, Chu JJ, et al. *Blunt traumatic cardiac rupture: Therapeutic options and outcomes*, Injury 2009;40:938-45;
30. Turkmen M, Sadik Bilgen M, Eren B, Fedakar R, Senel B: *Cardiac rupture due to fall: a case study*, Ann Acad Med Singapore 2009, 38:156-157;
31. Fedakar R, Turkmen N, Durak D, Gundogmus U: *Fatal traumatic heart wounds: review of 160 autopsy cases*, IMAJ 2005, 7:498-501;
32. Braithwaite C, Rodriguez A, Turney S, Dunham C, Blunt Cowley R: *Traumatic cardiac rupture: a 5-year experience*, Ann Surg 1990, 212(6):701-704;
33. Fabian TC, Richardson JD, Croce MA, Smith JS Jr, Rodman G Jr, Kearney PA, et al. *Prospective study of blunt aortic injury: Multicenter Trial of the American Association for the Surgery of Trauma*, J Trauma 1997;42:374-80;
34. Cameron PA, Dziukas L, Hadj A, Hooper S, Tatoulis J. *Aortic Transection*, Aust NZ J Surg 1998;68:264-7;
35. Nagy K, Fabian T, Rodman G, Fulda G, Rodriguez A, Mirvis S. *Guidelines for the diagnosis and management of blunt aortic injury: An EAST Practice Management Guidelines Work Group*, J Trauma 2000;48:1128-43;
36. Ismailov RM, Weiss HB, Ness RB, Lawrence BA, Miller TR. *Blunt cardiac injury associated with cardiac valve insufficiency: Trauma links to chronic disease?* Injury, Int. J. Care Injured (2005) 36, 1022-1028;
37. Perlroth MG, Hazan E, Lecompte Y, Gougne G. *Chronic tricuspid regurgitation and bifascicular block due to blunt chest trauma*, Am J Med Sci 1986;291(2):119-25;

38. Khurana S, Puri R, Wong D, Dundon BK, Brown MA, Worthley MI, et al. *Latent tricuspid valve rupture after motor vehicle accident and routine echocardiography in all chest-wall traumas*, Tex Heart Inst J 2009;36:615-7;
39. Harada H, Honma Y, Hachiro Y, Mawatari T, Abe T. *Traumatic coronary artery dissection*, Ann Thorac Surg 2002;74(1):236-7;
40. Ismailov RM, Ness RB, Weiss HB, Lawrence BA, Miller TR. *Trauma associated with acute myocardial infarction in a multi-state hospitalized population*, Int J Cardiol 2005;105:141;
41. Patel R, Samaha FF. *Right coronary artery occlusion caused by blunt trauma*, J Invasive Cardiol 2000; 12:376;
42. Dalvi AN, Gondhalekar RA, Shirhatti RG, Joshi SV, Sukthankar RU, Mathur SK (1987) *Atrial rupture following blunt chest trauma (a case report)*, J Postgrad Med 33:15;
43. Silver GM, Spampinato N, Favaloro RG, Groves LK (1973) *Ventricular aneurysms and blunt chest trauma*, Chest 63(4): 628-631;
44. Brown DL, Ivey TD (1996) *Giant organized pericardial hematoma producing constrictive pericarditis: a case report and review of the literature*, J Trauma 41(3):558-560;
45. Snow N, Richardson JD, Flint Jr LM. *Myocardial contusion: implications for patients with multiple traumatic injuries*, Surgery 1982;92(4):744-50;
46. Feghali NT, Prisant LM. *Blunt myocardial injury* [comment], Chest 1995;108(6):1673-7;
47. Clancy K, Velopulos C, Bilaniuk JW, Collier B, Crowley W, Kurek S, Lui F, Nayduch D, Sangosanya A, Tucker B, Haut ER; *Eastern Association for the Surgery of Trauma. Screening for blunt cardiac injury: an Eastern Association for the Surgery of Trauma practice management guideline*, J Trauma Acute Care Surg. 2012 Nov;73(5 Suppl 4):S301-6.

Problemy diagnostyczne u pacjentów po tępych urazach serca

Streszczenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia urazy są trzecią pod względem częstości przyczyną umieralności na świecie. Ważną rolę odgrywają przy tym tępe urazy serca, będące konsekwencją wypadków komunikacyjnych, pobić, czy też upadków z dużej wysokości. Częstość występowania tępych urazów serca nie jest stała. Różni autorzy przedstawiają ją w bardzo szerokich granicach od 20% do 76% w przypadku ciężkiego urazu klatki piersiowej. Tępy uraz serca jest często związany z urazem klatki piersiowej, dlatego powinien być brany pod uwagę u każdego pacjenta z urazem wielonarządowym. Niezwykle ważna przy tym jest szybka i skuteczna diagnostyka, aby wyodrębnić pacjentów z grupy ryzyka zagrożonych rozwojem powikłań tępego urazu serca. Niestety różnorodność niespecyficznych objawów klinicznych, jak również postaci tępego urazu serca oraz brak testu diagnostycznego będącego złotym standardem sprawia, że postawienie właściwego rozpoznania często nastręcza trudności. Ponadto często towarzyszące obrażenia mogą maskować objawy urazu serca. Celem niniejszej pracy była analiza piśmiennictwa dotycząca tępych urazów serca, ze szczególnym zwróceniem uwagi na problemy diagnostyczne stanów chorobowych będących skutkiem tych urazów.

Słowa kluczowe: tępe urazy, urazy serca, wypadki

Diagnostic problems in blunt cardiac injury patients

Abstract

According to the World Health Organization's report, injuries are the third leading cause in mortality all over the world. Blunt cardiac injuries (BCI) greatly contribute to this data. BCI's are consequence of blunt trauma to the heart, frequently resulting from motor vehicle collisions, assaults as well as falls. Incidence of this phenomenon has been widely reported by different authors and ranges from 20 to 76% in the case of severe chest injury. Blunt cardiac injury is often associated with thorax injury, thus should always be taken into consideration in multiorgan trauma patients. Fast and effective diagnostics plays a crucial role and aims to sort out these patients who are at risk of developing life-threatening BCI's complications. Unfortunately, though, variety of non-specific clinical symptoms presented by patients as well as plurality of BCI's forms and lack of gold standard screening test, makes the diagnostics hard. Furthermore concurrent injuries may hide BCI's symptoms. This overview aims to analyse the literature on blunt cardiac injuries with pointing up the diagnostic problems.

Keywords: blunt injuries, cardiac injuries, accidents

PROKALCYTONINA, A ROKOWANIA W SEPSIE – OPIS PRZYPADKU

1. Wstęp

1.1. Sepsa, ciężka sepsa, wstrząs septyczny – definicje

Ciężka sepsa i wstrząs septyczny to w dzisiejszych czasach jedne z głównych problemów służby zdrowia, dotykające miliony ludzi na całym świecie każdego roku i zabijające jedną z czterech chorych osób[1-5].

Obecnie możemy spotkać się z wieloma definicjami sepsy. Jedna z powszechnie używanych mówi, że jest to ogólnoustrojowa, szkodliwa odpowiedź gospodarza na zakażenie. W konsekwencji prowadzi ona do ciężkiej sepsy, definiowanej z kolei jako ostre wtórne zaburzenie czynności narządów (z udokumentowaną lub podejrzaną infekcją) bądź hipoperfuzją tkanek. Kolejnym stadium jest wstrząs septyczny, będący określeniem dla ciężkiej sepsy z współistniejącym niedociśnieniem tętniczym, nieodwracalnym pomimo uzupełniania płynów (Tabela 1. i 2.) [1-5].

Niedociśnienie spowodowane sepsą jest stwierdzane przy skurczowym ciśnieniu krwi (SBP) w wysokości 90mmHg lub jako średnim ciśnieniu tętniczym (MAP) wynoszącym 70 mmHg. Innym kryterium jest spadek SBP o 40 mm Hg lub mniej niż dwa odchylenia standardowe poniżej normy dla danego wieku przy wykluczeniu innych przyczyn niedociśnienia [6].

¹ k.galaszkiewicz@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, lekarski I, Koło Anestezjologiczne przy II Katedrze Anestezjologii i Intensywnej Terapii SPSK1

Tabela 3. Kryteria diagnostyczne sepsy

Zakażenie, udokumentowane lub podejrzewane, i niektóre z następujących:
Zmiennych ogólnych
Gorączka ($>38.3^{\circ}\text{C}$) Hipotermia (temperatura ciała $<36^{\circ}\text{C}$) Częstość akcji serca $>90\text{ min}^{-1}$ lub więcej niż 2 odchylenia standardowe powyżej normy dla danego wieku Tachypnoe – zwiększona częstość oddechów Zmienne stany psychiczne Znaczne obrzęki lub dodatni bilans wodny organizmu ($>20\text{ mL/kg}$ przez 24 godziny) Hiperglikemia (stężenie glukozy w osoczu $>140\text{ mg/dL}$ lub 7.7 mmol/L) przy braku cukrzycy
Zmiennych zapalnych
Leukocytoza ($\text{WBC} >12\,000\ \mu\text{L}^{-1}$) Leukopenia ($\text{WBC} <4\,000\ \mu\text{L}^{-1}$) Prawidłowa wartość WBC zawierająca więcej niż 10% niedojrzałych form krwinek Stężenie białka CRP w osoczu większe niż dwa odchylenia standardowe powyżej wartości prawidłowej Stężenie prokalcytoniny w osoczu większe niż dwa odchylenia standardowe powyżej wartości prawidłowej
Zmiennych hemodynamicznych
Niedociśnienie tętnicze ($\text{SBP} <90\text{ mmHg}$, $\text{MAP} <70\text{ mmHg}$ lub spadek SBP o $>40\text{ mmHg}$ u dorosłych bądź mniej niż dwa odchylenia standardowe poniżej normy dla danego wieku)
Zmiennych zaburzenia czynności narządów
Hipoksemia krwi tętniczej ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$) Ostra oliguria (produkcja moczu $<0.5\text{ mL kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$ co najmniej 2h pomimo odpowiedniego uzupełniania płynów) Wzrost kreatyniny $>0.5\text{ mg/dL}$ lub $44.2\ \mu\text{mol/L}$ Zaburzenia krzepnięcia ($\text{INR} >1.5$ lub $\text{aPTT} >60\text{ s}$) Niedrożność (brak szmerów jelitowych) Trombocytopenia (liczba płytek krwi $<100\,000\ \mu\text{L}^{-1}$) Hiperbilirubinemia (stężenie bilirubiny całkowitej w osoczu $>4\text{ mg/dL}$ lub $70\ \mu\text{mol/L}$)
Zmienne perfuzji tkanek
Hipermleczanemia ($>1\text{ mmol/L}$) Zmniejszone wypełnienie kapilar

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów Internetu [7]

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne ciężkiej sepsy

CIĘŻKA SEPSA to hipoperfuzja tkanek wywołana sepsą lub zaburzenie czynności narządów (każdy z poniżej podanych przykładów spowodowanych zakażeniem)
Niedociśnienie wywołane sepsą Mleczany powyżej górnej granicy normy laboratoryjnej Produkcja moczu $<0,5 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ przez dłużej niż 2h pomimo odpowiedniego uzupełniania płynów Ostre uszkodzenie płuc z $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$ przy braku zapalenia płuc jako źródła infekcji Ostre uszkodzenie płuc z $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ przy obecności zapalenia płuc jako źródła infekcji Kreatynina $>2,0 \text{ mg/dL}$ ($176,8 \text{ }\mu\text{mol/L}$) Bilirubina $>2 \text{ mg/dL}$ ($34,2 \text{ }\mu\text{mol/L}$) Liczba płytek krwi $<100\ 000 /\mu\text{L}$ Koagulopatia (INR $>1,5$)

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów z Internetu [7]

1.2. Sepsa, a prokalcytonina

Podczas sepsy wiele systemów humoralnych i komórkowych jest aktywowanych pod wpływem uwalniania różnych cząsteczek, które pośredniczą w odpowiedzi gospodarza na zakażenie [34]. Wiele potencjalnych biomarkerów krwioobiegu rozpatrywano pod kątem diagnozowania sepsy, oszacowania jej nasilenia i zapewnienia rokowań. W końcu 116-aminokwasowego polipeptyd prokalcytonina został okrzyknięty "jedynym dotychczas mistrzem" w identyfikacji infekcji bakteryjnych [8].

1.3. Prokalcytonina (PCT)

PCT jest prekursorem hormonu kalcytoniny i jest syntetyzowana fizjologicznie przez komórki C tarczycy. W warunkach fizjologicznych PCT poziomy w surowicy są niskie ($0,1 \text{ ng/ml}$). Jednak w zakażeniach bakteryjnych PCT jest syntetyzowana w różnych pozatarczycową tkankach neuron-dokrynnych. Ogólnoustrojowe wydzielanie PCT jest składnikiem odpowiedzi zapalnej, która wydaje się być stosunkowo specyficzna w ogólnoustrojowych zakażeniach bakteryjnych. Odnotowano, że bakterie i zakażenia grzybicze i pasożytnicze powodują największe jej wzrosty. Natomiast niższy lub nieistotny wzrost pojawia się w przypadku infekcji miejscowych, wirusowych lub wywołanych bakteriami wewnątrzkomórkowymi (np. *Mycoplasma pneumoniae*) [10,11].

Podczas sepsy jest wydzielana w odpowiedzi na obecność endotoksyn lub mediatorów uwalnianych w reakcji organizmu na zakażenie drobnoustrojami (tj. interleukiny (IL) – 1β , czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) i IL -6). Ponad

to PCT silnie koreluje z bakteryjnym obciążeniem i nasileniem zakażeń [12]. Ponieważ regulacja PCT jest tłumiona przez interferon (INF)-yi cytokiny uwalniane w reakcji na zakażenie wirusowe, PCT jest bardziej specyficzna dla infekcji bakteryjnych i może pomóc w odróżnieniu ich od chorób wirusowych [13-16] . Istnieją dowody, że Gram-ujemne bakterie powodują wyższe wzrosty PCT niż Gram-dodatnie [17].

Warte uwagi jest to, że wskaźnik ten koreluje z bakteryjnym obciążeniem [18-20] i nasileniem zakażeń [21-24] . PCT więc ma implikacje prognostyczne i poziom PCT pozwala przewidzieć zgon u pacjentów z pozaszpitalnego zapalenie płuc (CAP) [24-27] i krytycznym pacjentów z sepsą [28].

Tabela 3. Referencyjne wartości dla PCT

Wartość referencyjna (ng/mL)	Interpretacja
<0.05	Norma
<0.50	Możliwe miejscowe zakażenie. Ponowny test po 6-24 godzinach.
≥ 0.50 -<2	Możliwe ogólnoustrojowe zakażenie bakteryjne. Ponowny test po 6-24 godzinach.
≥ 2 -<10	Prawdopodobnie ogólnoustrojowe zakażenie bakteryjne. Duże ryzyko ciężkiej sepsy.
≥ 10	Ciężka bakteryjna sepsa, wstrząs septyczny

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów Internetu [29]

Tabela 4. Poziom prokalcytoniny, a stan dysfunkcji narządów

Stan zaburzenia czynności narządów	PCT (średnia wartość $\pm$ SE (błąd standardowy; ng/mL)
Pacjenci z brakiem postępujących zaburzeń w kierunku MODS	4.47 $\pm$ 1.22
ARDS	10.48 $\pm$ 4.77
ARDS plus ARF	8.08 $\pm$ 2.25
ARDS plus ARF plus DIC	32.72 $\pm$ 13.41
ARDS plus ARF plus DIC plus HF	43.35 $\pm$ 20.98
MODS – multiple organ dysfunction syndrome (niewydolność wielonarządowa), ARDS – acute respiratory distress syndrome (zespół ostrej niewydolności oddechowej), ARF – acute renal failure (ostra niewydolność nerek), DIC – disseminated intravascular coagulation (zespół rozlanego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego), HF – hepatic failure (niewydolność wątrobową)	

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów Internetu [30]

Zainteresowanie prokalcytoniną jako markerem zapalenia, zakażenia, sepsy i wstrząsu septycznego znacząco wzrosło w ciągu ostatniej dekady. Świadczy o tym bardzo duża liczba publikacji, opisujących przede wszystkim coraz liczniej prowadzone badania wielośrodkowe, a także nie mniej liczne metaanalizy [31-33]. Według nich prokalcytonina jest markerem o udowodnionej czułości i swoistości, które odpowiednio wynoszą 0,77 i 0,79 [34].

1.4. PCT i szerokospektralna antybiotykoterapia

Wysoka śmiertelność w ciężkich zakażeniach bardzo często związana jest z opóźnieniem interwencji terapeutycznej. Niezależnie od rodzaju interwencji, czas od chwili rozpoznania zakażenia do włączenia leczenia ma kluczowe znaczenie w dalszej skutecznej terapii. Znalezienie wskaźnika, który byłby odpowiedzią organizmu na wczesną fazę zakażenia, dałoby możliwość włączenia skutecznego leczenia w już początkowej fazie. Wczesne podjęcie interwencji skutkowałoby także prawdopodobnie zmniejszeniem śmiertelności [7].

Według obowiązujących rekomendacji rozpoznanie sepsy jest wskazaniem do szybkiego włączenia empirycznej szerokospektralnej antybiotykoterapii [7], natomiast opóźnienie antybiotykoterapii w rozpoznanym wstrząsie septycznym wiąże się z liniowym spadkiem przeżywalności z każdą godziną braku adekwatnej antybiotykoterapii.

Wiele badań dowodzi że prokalcytonina ma duże znaczenie w przebiegu antybiotykoterapii. Spadek poziomu PCT o więcej niż 30% po pierwszych 24 godzinach od rozpoczęcia leczenia potwierdza dobór właściwego antybiotyku i kontroli infekcji [34].

2. Opis przypadku

Mężczyzna lat 31, bez chorób dodatkowych, został przyjęty do Kliniki Chorób Zakaźnych z kilkudniowym wywiadem wysokiej gorączki, biegunki, bezmocz, obrzęku i zaczerwienienia lewego podudzia. Przy przyjęciu stan pacjenta był średnio – ciężki. Stwierdzono u niego hipotonie i anurie. Saturacja wynosiła 92%. Ponad to z badań laboratoryjnych wynikało znaczne podwyższenie wskaźników stanu zapalnego – w morfologii krwi leukocytoza 20,65 K/ μ l, CRP 616.6 mg/l, prokalcytonina 543,0 ng/ml. Od chorego pobrano krew, mocz oraz kał na posiew. Włączono Ceftriaxonum (Tartrixon 1 g) w ramach antybiotykoterapii, 1 dawkę anatoksyny przeciwżółciowej z powodu zgłoszonego w wywiadzie uraz obu podudzi. Zastosowano u pacjenta leczenie objawowe w postaci Ketoprofenum (Ketonal 1 amp) i paracetamol 1 tabl. doraźnie, PWE (płyn wieloelektrolitowy), Sol 0.9% NaCl, Enoxaparinum natricum (Clexane 60 mg), okłady z Rivanolu. Z odchyień od stanu prawidłowego w USG jamy brzusznej opisano powiększenie wątroby (20 cm w linii środkowo-obojęczykowej) o silnych cechach stłuszczenia. Stan pacjenta ulegał pogorszeniu. Utrzymywał się u niego bezmocz, występowała wysoka

gorączka osiągająca wartości od 39°C do 40,6°C oraz pojawiły się zaburzenia żołądkowo-jelitowe (wymioty, biegunka). W drugiej dobie pobytu na Oddziale Chorób Zakaźnych po konsultacji anestezjologicznej pacjenta przeniesiono na Oddział Intensywnej Terapii w celu dalszej diagnostyki i leczenia. Pacjent został przyjęty do OIT z powodu wstrząsu septycznego wklajającego ciężkie zakażenie skóry i tkanki podskórnej obydwu podudzi oraz ostrej niewydolności nerek. W OIT układ oddechowy wspomagano wentylacją w trybie nieinwazyjnym, układ krążenia wlewem amin katecholowych oraz uzupełniono niedobory krwi krążącej. Z powodu niewydolności układu wydalniczego od pierwszego dnia pobytu w OIT rozpoczęto ciągłą terapię nerkozastępczą typu ciągłej hemofiltracji żylna-żylna (CVVH, od 29.01.2014 do 30.01.2014) oraz typu ciągłej hemodializy żylna-żylna z cytrynianem wapnia (CVVHD Ci-Ca, od 30.01.2014 do 02.02.2014). W drugiej dobie pobytu, w związku z nasilonymi objawami nieżytu żołądkowo - jelitowego, włączono do leczenia Rifaximinum (Xifaxan) uzyskując dobry efekt terapeutyczny. Ponadto pacjentowi wdrożono płynoterapię z zaleceniem stosowania koloidów, krystaloidów oraz żywienia dojelitowego, terapię przeciwzakrzepową, monitorowanie hemodynamiczne, szerokospektralną antybiotykoterapię oraz tlenoterapię bierną. Z leków pacjent otrzymywał w ramach antybiotykoterapii Tigecyclinum (Tygacil 0,1) i wspomniany wyżej Rifaximinum (Xifaxan 0,2). W ramach terapii przeciwzakrzepowej Heparyna, Nadroparinum calcicum (Fraxiparyna Multi). Ponadto choremu podawano Norepinephrine (Levonor), Omeprazolum (Helcid), Paracetamol (Perfagan), Ketoprofenum (Ketonal), Drotaverini hydrochloridum (No-Spa), Fentanyl, Lactobacillus rhamnosus (Lakcid). W związku z uzyskaniem pełnej stabilizacji układu krążenia w czwartej dobie pobytu zakończono wlew amin katecholowych. Tego samego dnia pobytu na oddziale odnotowano u chorego spontaniczną diurezę. Przez cały okres pobytu na OIT pacjent był przytomny oraz zorientowany co do miejsca i czasu. W pierwszej dobie pobytu wyniki badań gazometrycznego kształtowały się na następujących poziomach (pH 7,41; PaO₂ 82,5 mmHg; PaCO₂ 25,1 mmHg; HCO₃ 15,8 mmol l⁻¹; BE-7,9 mmol l⁻¹). Saturacja wynosiła 96,3 %. Jednocześnie stwierdzono zwiększenie stężenia mleczanów (2,7 mmol/L) z jednoczesnym zwiększeniem aktywności ASPAT (64,2 j.m./l) i ALAT (76,3 j.m./l), GGTP (80 j.m./l), oraz hipokaliemię (3,1 mmol l⁻¹). D-dimery osiągnęły wartość 6657(ngFEU/ml), a INR wynosił 1.2. Czas protrombinowy był w normie. Poziomy czynników zapalnych podano poniżej (Tabela 5.). Po wdrożeniu zabiegów leczniczych stan pacjenta poprawił się. 03.02.2014 pacjent został wypisany z OIT w stanie ogólnym dobrym, wydolny oddechowo i krążeniowo, z zachowaną diurezą spontaniczną i został przeniesiony do Kliniki Chorób Zakaźnych w celu kontynuacji leczenia specjalistycznego.

Tabela 5. Wskaźnik zapalne pacjenta w poszczególnych dniach hospitalizacji na OIT

	29.01	30.01	31.01	01.02	02.02	03.02
PCT[ng/ml]	543	379	122	35,9	14,26	6,8
CRP [mg/l]	616	607	483	413,2	-	114,7
WBC [K/ μ l]	18,34	20,14	20,5	19,5	17,91	24,8

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu historii choroby pacjenta

Tabela 6. Wyniki pomiarów wybranych parametrów hemodynamicznych u pacjenta

DATA	GODZINA	HR	MAP	CVP
29.01.14	21:00	90	80	8
30.01.14	7:00	95	85	10
30.01.14	18:00	93	80	7
31.01.14	6:00	118	65	6
31.01.14	14:00	114	63	7
31.01.14	22:00	116	69	8
01.02.14	10:00	98	90	8
01.02.14	15:00	106	96	9
01.02.14	19:00	111	91	8
02.02.14	7:00	96	95	7
02.02.14	14:00	85	101	11
02.02.14	20:00	83	106	11

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu historii choroby pacjenta

3. Dyskusja

Opis przypadku przedstawiony w naszej pracy kwestionuje korelację między PCT a rokowaniem dla pacjenta w sepsie. Zmusza do zastanowienia, czy prokalcytonina jest rzeczywiście miarodajnym wskaźnikiem stanu zdrowia pacjenta dotkniętego sepsą.

Należy zauważyć, że poziom prokalcytoniny równy 543,0 ng/ml zgodnie z danymi zawartymi w wielu publikacjach (tabela 4) powinien być wyrazem niewydolności wielonarządowej, która występuje już przy stężeniu tego prohormonu wynoszącym $43,35 \pm 20,98$ ng/ml. Składowymi jej byłyby przede wszystkim ARDS-ostry zespół niewydolności oddechowej, ostra niewydolność nerek, zespół DIC- zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego oraz niewydolność wątroby. Z kolei u opisywanego pacjenta pojawiła się tylko niewydolność nerek. Funkcja układu oddechowego była zaburzona, lecz wymagał on jedynie wentylacji nieinwazyjnej. Intubacja nie była konieczna. W badaniach laboratoryjnych stwierdzono podwyższony, ale nieznacznie

poziom markerów wątrobowych. Skazy krwotocznej nie stwierdzono. Wskaźniki hemodynamiczne takie jak częstość akcji serca oraz MAP wahały się na granicy normy lub nieznacznie od niej odbiegały. Co więcej stan pacjenta był średnio-ciężki. Chory był przytomny i zachowywał kontakt logiczny z otoczeniem. Okres hospitalizacji na OIT chorego był krótki. Trwał 5 dni. Z pobranych na posiew próbek krwi, kału i moczu nie udało się ustalić etiologii zakażenia. Jednak szerokospektralna antybiotykoterapia okazała się wystarczająco skuteczna.

Należy jednak pamiętać, że badania bakteriologiczne obarczone są częstymi błędami zarówno technicznymi jak i laboratoryjnymi czy interpretacyjnymi. Nawet w najbardziej wartościowym badaniu, jakim jest posiew krwi, dodatnie wyniki otrzymywane są tylko w około 30 do 50% i tylko w takim odsetku można poznać początkową etiologię zakażenia [33]. Wzrost stężenia prokalcytoniny może być w takich przypadkach istotnym wskaźnikiem toczącego się procesu chorobowego, ale czy to samo można powiedzieć o objawach klinicznych? Przykładowo w ostrym bakteryjnym zapaleniu stawów obserwować można wzrost stężenia PCT przy braku ogólnych objawów klinicznych i ujemnych posiewach krwi [32]. Niektóre doniesienia naukowe zaznaczają, że ProCT jest mniej niż idealnym markerem zakażenia i przestrzegają przed niekontrolowanym stosowaniem prokalcytoniny jako substytutu do dokładnej oceny klinicznej [13]. Co ważne, poziom krążącej ProCT może być zwiększony w warunkach niezakaźnych oraz może pozostać stosunkowo niski, nawet w posocznicy wywołanej infekcjami bakteryjnymi [35-37]. Konkretnie patogeny mogą wywołać odrębną odpowiedź np. w pozaszpitalnym zapaleniu płuc spowodowanym pneumokokami jej poziom znacznie wzrasta, z kolei jeśli przyczyną są atypowe organizmy, takie jak mykoplazmy nie obserwuje się podobnej sytuacji. [19,38]. Znane są też sytuacje, w których chorzy mają podwyższone stężenie PCT, ale nie dochodzi u nich do powstania procesu zapalnego i nie obserwuje się też klinicznych objawów zakażenia. Przykładowo ma to miejsce w raku tarczycy, guzach neuroendokrynnych, zawale krezki, zawale mięśnia serca, po urazach mechanicznych, w oparzeniach, a także po zabiegach operacyjnych.

4. Podsumowanie

Znalezienie idealnego wskaźnika sepsy i wstrząsu septycznego jest bardzo trudne. Pojawiają się atrakcyjne propozycje zasługujące na badania. Zwracają uwagę na to, żeby w przyszłości, w celu poprawy dokładności diagnozowania i prognozowania sepsy, zastosować połączenie panelu nowych biomarkerów i tradycyjnych markerów sepsy, co odzwierciedlałoby różne aspekty reakcji organizmu człowieka na zakażenia [30]. Prokalcytonina jest pomocnym wskaźnikiem wczesnego wykrywania sepsy u pacjentów krytycznie chorych. Niemniej, wyniki badań muszą być dokładnie interpretowane w kontekście

historii choroby, badania fizykalnego i oceny mikrobiologicznej [34]. Mimo dużej predykcji dodatkowo, wartość prokalcytoniny nie zawsze koreluje z wielkością zakażenia i stanem ogólnym pacjenta.

Podziękowania:

Serdeczne podziękowania za pomoc w napisaniu pracy kierujemy do lekarza Michała Borysa i Pawła Piwowarczyka. Za recenzję naszej pracy dziękujemy dr hab. n.med. Rafałowi Tarkowskiemu.

Literatura

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al (2001) *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med 29:1303-1310
2. Dellinger RP (2003) *Cardiovascular management of septic shock*. Crit Care Med 31:946-955
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S et al (2003) *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med 348:1546-1554
4. Linde-Zwirble WT, Angus DC (2004) *Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society*. Crit Care 8:222-226
5. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J et al (2007) *Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003*. Crit Care Med 35:1414-1415
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al (2003) *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference*. Crit Care Med 31:1250-1256
7. Dellinger, R. Phillip, et al. *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012*, Intensive care medicine 39.2 (2013): 165-228.
8. Moyer MW. *New biomarkers sought for improving sepsis management and care*. Nat Med 2012; 18: 999.
9. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. *Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects*. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79: 1605-08
10. Dahaba AA, Metzler H. *Procalcitonin's role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator?* Minerva Anesthesiologica 2009; 75: 447-52.
11. Shehabi Y, Seppelt I. *Pro/con debate: is procalcitonin useful for guiding antibiotic decision making in critically ill patients?* Crit Care 2008; 12: 211-6.
12. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A: *Pro- versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options*. J Infect Dis 2000; 181:176-180.
13. Christ-Crain M, Muller B: *Procalcitonin in bacterial infections—hype, hope, more or less?* Swiss Med Wkly 2005; 135:451-460.
14. Christ-Crain M, Muller B: *Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators*. Eur Respir J 2007; 30:556-573.

15. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, Keller U, Muller B: *Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue*. *Endocrinology* 2005, 146:2699-2708.
16. Schuetz P, Christ-Crain M, Muller B: *Procalcitonin and other biomarkers to improve assessment and antibiotic stewardship in infections—hope for hype?* *Swiss Med Wkly* 2009, 139:318-326.
17. Charles PE, Ladoire S, Aho S et al. *Serum procalcitonin elevation in critically ill patients at the onset of bacteremia caused by either Gram-negative or Gram-positive bacteria*. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 38
18. Schuetz P, Mueller B, Trampuz A: *Serum procalcitonin for discrimination of blood contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci*. *Infection* 2007, 35:352-355.
19. Muller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, Krause M, Zimmerli W, Mueller B, Schuetz P: *Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial*. *Chest* 2010, 138:121-129.
20. van Nieuwkoop C, Bonten TN, van't Wout JW, Kuijper EJ, Groeneveld GH, Becker MJ, Koster T, Wattel-Louis GH, Delfos NM, Ablij HC, Leyten EM, van Dissel JT: *Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome: a prospective observational study*. *Crit Care* 2010, 14:R206.
21. Muller B, Harbarth S, Stolz D, Bingisser R, Mueller C, Leuppi J, Nussbaumer C, Tamm M, Christ-Crain M: *Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community-acquired pneumonia*. *BMC Infect Dis* 2007, 7:10.
22. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, Muller C, Miedinger D, Huber PR, Zimmerli W, Harbarth S, Tamm M, Muller B: *Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174:84-93.
23. Schuetz P, Christ-Crain M, Albrich W, Zimmerli W, Mueller B: *Guidance of antibiotic therapy with procalcitonin in lower respiratory tract infections: insights into the ProHOSP study*. *Virulence* 2010, 1:88-92.
24. Schuetz P, Suter-Widmer I, Chaudri A, Christ-Crain M, Zimmerli W, Mueller B: *Prognostic value of procalcitonin in community-acquired pneumonia*. *Eur Resp J* 2011, 37:384-392.
25. Kruger S, Ewig S, Marre R, Papassotiriou J, Richter K, von Baum H, Suttrop N, Welte T: *Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes*. *Eur Respir J* 2008, 31:349-355.
26. Huang D, Weissfeld L, Kellum J, Yealy D, Kong L, Martino M, Angus D: *Risk Prediction With Procalcitonin and Clinical Rules in Community-Acquired Pneumonia*. *Ann Emerg Med* 2008, 52:48-58.e2.
27. Haeuptle J, Zaborsky R, Fiumefreddo R, Trampuz A, Steffen I, Frei R, Christ-Crain M, Muller B, Schuetz P: *Prognostic value of procalcitonin in Legionella pneumonia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009, 28:55-60.
28. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH, Espersen K, Steffensen P, Tvede M: *Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality*. *Crit Care Med* 2006, 34:2596-2602
29. Chaudhury, Abhijit, et al. *Procalcitonin in sepsis and bacterial infections*. *J Clin Sci Res* 2 (2013): 216-24.

30. Kibe, Savitri, Kate Adams, and Gavin Barlow. *Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care*. Journal of antimicrobial chemotherapy 66.suppl 2 (2011): ii33-ii40.
31. Nobre V et al.: *Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients*. Am J Respir Crit Care Med 2008; 177: 498-505
32. Becker KL, Snider R, Nylen ES: *Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations*. Crit Care Med 2008; 36, 3: 941-952
33. Uzzan B et al.: *Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis*. Crit Care Med 2006; 34, 7: 1996-2003.]
34. Wacker, Christina, et al. *Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet infectious diseases 13.5 (2013): 426-435
35. Nylen ES., Muller B., Becker KL., Snyder RH., *The future diagnostic role of procalcitonin levels: the need for improved sensitivity*, Clin Infect Dis 2003, 36:823-4
36. Muller B., Becker KL., *Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis*. Swiss Med Wkly 2001, 131:595–602
37. Villanueva JL., Cervin RJ., *Serum procalcitonin levels and empirical antibiotic treatment of patients with communityacquired febrile syndromes*, Clin Infect Dis, 2003, 36:822; authorreply 826–7
38. Kruger S., Ewig S., Papassotiriou J., Kunde J., Marre R., von Baum H., Suttor N., Welte T., *Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP: results from the German competence network CAPNETZ*, Respir Res, 2009, 10-65

Prokalcytonina, a rokowania w sepsie - opis przypadku

Streszczenie

Wiele badań próbuje ocenić znaczenie parametrów laboratoryjnych we wczesnym wykrywaniu sepsy. Liczne badania wykazały wysoką czułość i swoistość prokalcytoniny. Pokazuje to bardzo dobrą wartość predykcyjną dodatnią tego prohormonu jako wskaźnika w zakażeniach bakteryjnych, grzybiczych i pasożytniczych. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami, rozpoznanie sepsy jest wskazaniem do bezzwłocznego włączenia szerokospektralnej antybiotykoterapii. W przypadku rozpoznanego wstrząsu septycznego każde opóźnienie w zastosowaniu odpowiedniej terapii antybiotykowej jest związana z liniowym spadkiem stopnia przeżywalności. W tej pracy na podstawie opisu przypadku zostanie omówiona przydatność prokalcytoniny jako markera diagnostycznego w rozpoznawaniu wstrząsu septycznego. Pacjent lat 31 został przyjęty na Oddział Intensywnej Terapii z powodu wstrząsu septycznego wikłającego ciężkie zakażenie skóry i tkanki podskórnej obu kończyn dolnych. Poziom prokalcytoniny u pacjenta oceniony przy przyjęciu osiągnął bardzo wysoką wartość 543,0 ng/ml. Należy wspomnieć, że graniczna wartość prokalcytoniny ustalona jest na poziomie 2,0 ng/ml. Pacjent nie wymagał inwazyjnej wentylacji mechanicznej. Był przytomny przez cały okres pobytu na Oddziale Intensywnej Terapii, jednak wymagane było farmakologiczne wspomaganie krążenia i terapia nerkozastępcza. Na podstawie tego opisu przypadku, wartość predykcyjna dodatnia prokalcytoniny jest kwestionowana.

Słowa kluczowe: sepsa, wstrząs septyczny, prokalcytonina

Procalcitonin and prognosis in sepsis- case report

Abstract

Many studies tried to assess the relevance of laboratory parameters in early detection of sepsis. Numerous studies confirmed high sensitivity and specificity of procalcitonin. It displays a very good positive predictive value in bacterial, fungal, and parasitic infections. According to current recommendations, diagnosis of sepsis urges a rapid administration of a broad-spectrum antibiotic therapy. Any delay in the proper antibiotic treatment of a diagnosed septic shock is associated with a linear decrease in survival rate. In this report, the relevance of procalcitonin as a diagnostic tool in septic shock is discussed. The patient aged 31 was admitted to the Intensive Care Unit because of a septic shock caused by a severe infection of the skin and subcutaneous tissue of both lower limbs. The patient's procalcitonin level assessed at admission reached an extremely high value of 543,0 ng/ml. It is worth mentioning that the cut-off value of procalcitonin is established at 2,0 ng/ml. The patient did not require invasive mechanical ventilation. He was conscious during the entire period of stay in the Intensive Care Unit, however circulatory support and renal replacement therapy were required. According to this case report, positive predictive value of procalcitonin is questioned.

Keywords: sepsis, septic shock, procalcitonin

TKANKA KOSTNA – BUDOWA, FUNKCJE I METABOLIZM

1. Wprowadzenie

Kości – twory stanowiące rusztowanie dla organizmu oraz wchodzące w skład układu ruchu, ze względu na swoją strukturę charakteryzującą się niezwykłą twardością, trwałością i wytrzymałością mogą sprawiać wrażenie narządów stałych i nieaktywnych metabolicznie. W rzeczywistości jednak tkanka kostna jest systemem bardzo dynamicznym, podlegającym ciągłym zmianom mającym na celu dopasowanie się zarówno do czynników wewnętrznych, jak i zewnętrznych. Cykliczna przebudowa tkanki kostnej opiera się na dwóch procesach: kościotworzeniu i resorpcji kości. W procesach tych główną rolę pełnią dwa typy komórek kostnych: komórki kościotwórcze – osteoblasty oraz osteoklasty, zwane komórkami kościogubnymi [1, 2].

W okresie wzrostu i rozwoju organizmu trwają intensywne procesy produkcji i modelacji masy kostnej, zachodzi wzmożony wzrost kości na długość i grubość, a także nabywanie przez nie odpowiedniej masy i wytrzymałości. W wieku około 30 lat człowiek osiąga tak zwany punkt szczytowej masy kostnej i od tego momentu metabolizm kostny jest nastawiony przede wszystkim na remodelację, pozwalającą na utrzymanie odpowiedniej masy i struktury szkieletu. Wraz z wiekiem procesy kościogubne zaczynają przeważać nad kościotworzeniem, na co wpływ mają m.in. niedobory hormonów i zmniejszenie stężenia niektórych pierwiastków w surowicy, skutkujące obniżeniem aktywności osteoblastów i zwiększeniem aktywności osteoklastów. Postępująca z wiekiem utrata masy kostnej jest zjawiskiem fizjologicznym, dotyczącym każdego człowieka, które w zaawansowanym wieku może prowadzić np. do rozwoju osteoporozy czy groźnych złamań [1, 3, 4].

Homeostaza metaboliczna mikrośrodowiska kości jest niezwykle ważna, a jej zachwianie występuje w przebiegu różnych chorób, którym towarzyszy wzmożona utrata masy kostnej, takich jak: osteoporoza, nowotwory kości, choroby przyzębia, choroba Pageta, szpiczak mnogi, osteomalacja i wiele innych. Dlatego też zachowanie równowagi między procesami resorpcji kości i osteogenezy pełni istotną rolę w utrzymaniu zdrowia całego organizmu [3, 5].

¹ zurekaleksandra@wp.pl;

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, <http://www.biolbiot.umcs.lublin.pl/>;

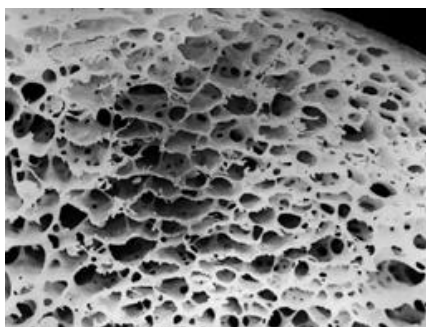
2. Budowa i funkcje tkanki kostnej

Tkanka kostna buduje szkielet stanowiący rusztowanie dla organów, który w połączeniu z układem mięśniowym odpowiada za zdolności lokomocyjno-ruchowe. Kości chronią również narządy wewnętrzne oraz szpik kostny przed uszkodzeniami. Kolejna ważna funkcja tkanki kostnej jest związana z jej aktywnością metaboliczną. Jest ona rezerwuarem wielu ważnych pierwiastków, tj.: magnezu, fosforu i wapnia (w tkance kostnej gromadzi się 99% wapnia, 88% fosforu i około 50% magnezu), reguluje również ich stężenie, co jest niezbędne do utrzymania homeostazy jonowej organizmu [3].

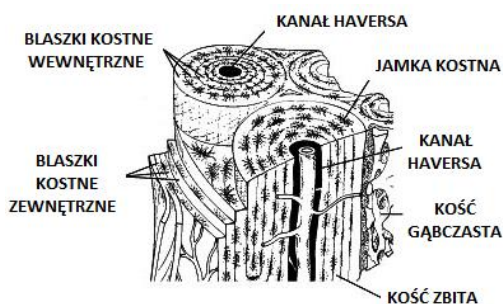
Tkanka kostna, ze względu na budowę histologiczną, dzieli się na dwa rodzaje: grubowłóknistą i drobnowłóknistą. Postać grubowłóknista (splotowata), w której przeważa substancja nieorganiczna, zaś komórek kostnych i macierzy organicznej (osteoidu) jest niewiele, pojawia się już w życiu płodowym i jest stopniowo zastępowana przez tkankę drobnowłóknistą (blaszkowatą), zachowując się u dorosłych, np. w szwach kości czaszki, wyrostkach zębodołowych, czy miejscach przyczepu ścięgien do kości. Włókna kolagenowe są w niej ułożone w grube, nieregularne pęczki. Tkanka kostna drobnowłóknista, określana mianem kości wtórnej, u dorosłego człowieka buduje zdecydowaną większość szkieletu (wchodzi w skład kości płaskich i długich). Składa się z blaszek kostnych o grubości 3-7 μm zbudowanych z włókien kolagenowych, osteoidu i substancji mineralnej [6, 7]. Włókna kolagenowe zbudowane z kolagenu typu I tworzą tu regularną strukturę i są ułożone pojedynczo. Pod względem morfologicznym można wyróżnić dwa typy tej tkanki: zbitą i gąbczastą [3, 8].

Kość gąbczasta, zwana inaczej beleczkową (Rys. 1.) charakteryzuje się porowatą strukturą (przypominającą gąbkę), zbudowaną z beleczek kostnych tworzących trójwymiarową sieć. W oczkach tej sieci znajduje się szpik kostny. Stanowi ona około 20% kości i znajduje się w nasadach kości długich, trzonach kręgów i wewnątrz kości płaskich. Kość zbita (korowa) jest to ciasno upakowana, zmineralizowana tkanka tworząca tzw. systemy Haversa (osteony) – cylindryczne struktury zbudowane z ciasno ułożonych blaszek kostnych, otaczających centralny kanał, w którym przebiegają naczynia włosowate oraz nerwy (Rys. 2.). W obrębie blaszek kostnych, bądź też pomiędzy sąsiadującymi blaszkami, znajdują się jamki kostne, w których ułożone są komórki kostne – osteocyty, kontaktujące się między sobą za pomocą wypustek cytoplazmatycznych. Cały osteon jest zaopatrywany w substancje odżywcze poprzez drobne odgałęzienia naczyń krwionośnych biegnących wzdłuż kanału Haversa, tzw. kanały Volkmanna, które zapewniają również połączenie między poszczególnymi osteonami [8, 9, 10, 11]. Tkanka kostna zbita stanowi 80% kości i tworzy trzony kości długich oraz zewnętrzną warstwę nasad i pozostałych kości, decydując o ich wytrzymałości mechanicznej [3].

Powierzchnia kości, zarówno z zewnątrz, jak i od wewnątrz pokryta jest warstwą tkanki łącznej włóknistej, nazywanej okostną (warstwa zewnętrzna) i śródkostną (warstwa wewnętrzna). Okostna pokrywa zewnętrzną część kości z wyjątkiem powierzchni stawowych. Jej górna warstwa bogata jest we włókna kolagenowe, zaś część przylegająca bezpośrednio do kości zawiera komórki osteogenne (mogące różnicować się w osteoblasty). W okostnej znajdują się nerwy i drobne naczynia krwionośne, które wnikają do wnętrza kości przez kanały Volkmanna. Śródkostna pokrywa natomiast wewnętrzną część kości, znajduje się też wewnątrz jam szpikowych oraz wyściela kanały Haversa i Volkmanna. Zbudowana jest z nieaktywnych komórek osteogennych, które mogą różnicować się w osteoblasty np. podczas gojenia się złamań [3, 6, 12].



Rys. 1. Tkanka kostna gąbczasta [13]



Rys. 2. Schemat budowy osteonu [14]

2.1. Komórki kostne

Komórki tkanki kostnej wywodzą się z linii mezenchymalnej. Ich prekursorzy, pluripotencjalne komórki osteogenne, pod wpływem czynników transkrypcyjnych oraz hormonów wzrostu mogą różnicować się w dojrzałe komórki kostne. Wyróżnia się dwa typy komórek osteogennych (prekursorów komórek kostnych): preosteoklasty – dające początek linii komórek kościogubnych i preosteoblasty, z których wywodzą się komórki kościotwórcze. Komórki te znajdują się zarówno w rozwijającej się tkance kostnej, jak i w jej dojrzałej formie. Komórki osteogenne występują licznie w okostnej, a także w śródkostnej wyścielającej jamy zatok szpikowych, kanały osteonów i pokrywające beleczy kości gąbczastej. Występują również w zrębie szpiku kostnego [3, 12].

2.2. Osteoblasty

Osteoblasty (Rys. 3.) to jedne z najważniejszych komórek kostnych, ponieważ odpowiadają za tworzenie kości oraz utrzymują w stanie równowagi procesy resorpcji i remodelacji kostnej. Wytwarzają także białka tworzące istotę międzykomórkową kości (kolagen typu I, osteokalcynę, osteonektynę, proteoglikany) oraz szereg cząstek regulatorowych, które odpowiadają za mineralizację kości, a także regulują dojrzewanie i aktywność osteoklastów [15, 16].

Różnicowanie komórek pluripotencjalnych i dojrzewanie prekursorów osteoblastów jest regulowane na poziomie molekularnym przez wiele czynników. Najważniejszymi z nich są: RUNX2, Osterix, Cbfa1, białka z rodziny Wnt i białka morfogenetyczne kości (BMPs). Czynniki te działają na różnych etapach różnicowania i bez ich udziału osteoblasty nie mogłyby prawidłowo funkcjonować. RUNX2 jest nadrzędnym regulatorem dojrzewania osteoblastów. Reguluje on ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek macierzy zewnątrzkomórkowej kości, takich jak: kolagen typu I (który stanowi 90% istoty międzykomórkowej kości), osteopontyna, siałoproteina i osteokalcyna [17,18]. Z kolei czynnik Osterix znany jest jako regulator swoisty tylko dla osteoblastów i nieobecny w żadnych innych komórkach. Mechanizm jego działania nie jest jeszcze do końca poznany. Wiadomo jednak, że ma on wpływ na ekspresję późnych genów związanych z różnicowaniem osteoblastów (np. z wytwarzaniem osteokalcyny) [17,19,20].

Aktywne osteoblasty mają morfologię nabłonkową, charakteryzują się wysoką aktywnością alkalicznej fosfatazy i aktywnie syntetyzują białka macierzy kostnej, a także czynniki odpowiedzialne za proces jej mineralizacji. Regulują również aktywność osteoklastów poprzez wytwarzanie czynników: RANKL (ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B) i OPG (osteoprotegeryna). RANKL (występujący na powierzchni osteoblastów lub wydzielany przez nie w formie rozpuszczalnej sRANKL) jest ligandem łączącym się z receptorem RANK, obecnym na nieodróżnionych osteoklastach i aktywującym je do dojrzewania i prawidłowego przeprowadzania resorpcji kości. Z kolei OPG, uwalniana na zewnątrz komórki, blokuje działanie RANKL, a tym samym uniemożliwia dojrzewanie osteoklastów. Prawidłowe działanie tego systemu jest bardzo ważne, ponieważ warunkuje homeostazę kości [21]. Dojrzałe osteoblasty mogą się różnicować w osteocyty – spoczynkowe komórki kostne, które wraz z macierzą zewnątrzkomórkową tworzą właściwą kość.

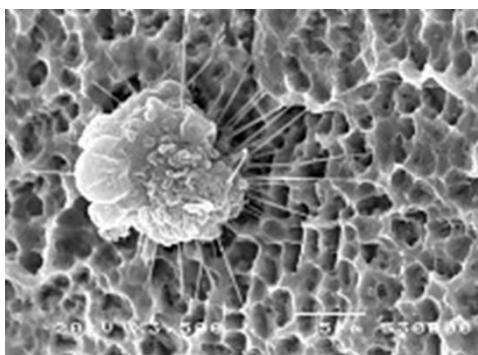
2.3. Osteoklasty

Kolejnym, ważnym składnikiem tkanki kostnej są osteoklasty (Rys. 4.). Są to duże komórki (osiągające wielkość do 100 μ m) z licznymi jądrami, licznymi mitochondriami oraz rybosomami. Osteoklasty charakteryzują się wysoką aktywnością winianowoopornej kwaśnej fosfatazy (TRAP), katepsyny K,

anhydrazy węglanowej oraz metaloproteinazy MMP-9. Do ich powstania dochodzi na drodze fuzji ich jednojądrzastych prekursorów. Aktywne, resorbujące kość osteoklasty znajdują się w jamkach na powierzchni kości. W dużej liczbie obecne są też w miejscach, gdzie zachodzi intensywna przebudowa kości [7, 22].

Podczas resorpcji osteoklasty przylegają do kości pofałdowaną powierzchnią, tzw. rąbkem szczoteczkowym, pokrytym mikrokosmkami, które biorą udział w transporcie substancji przez błonę komórkową. Poprzez kosmki osteoklasty wydzielają na drodze egzocytozy pęcherzyki lizosomalne zawierające enzymy hydrolityczne, protony, jony wodoru i chloru, które rozkładają organiczne i nieorganiczne składniki macierzy kostnej, w efekcie czego dochodzi do demineralizacji i degradacji tkanki kostnej. O prawidłowej aktywności osteoklastów świadczy powstawanie tzw. zatok resorpcyjnych, czyli ubytków macierzy kostnej w miejscu, do którego przylega rąbek szczoteczkowy komórki kościogubnej [3, 16].

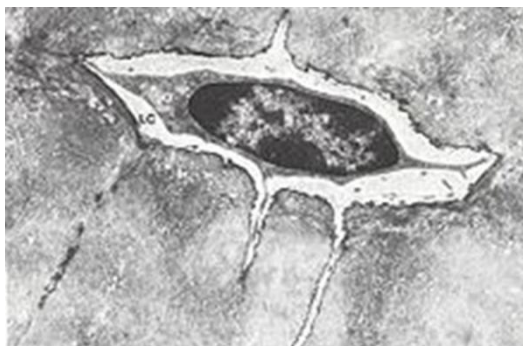
Osteoklasty do różnicowania potrzebują specyficznych sygnałów, tj.: RANKL oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF).



Rys. 3. Dojrzały osteoblast – zdjęcie z mikroskopu elektronowego [23]



Rys. 4. Osteoklast resorbujący kość [24]



Rys. 5. Dojrzały osteocyt otoczony macierzą kostną [25]

2.4. Osteocyty

Komórkami najliczniej występującymi w tkance kostnej są osteocyty (Rys. 5). Stanowią one do 95% wszystkich komórek kości. Są to podstawowe komórki dojrzałej i ukształtowanej kości. Powstają one z osteoblastów, które przestały wytwarzać macierz organiczną i otoczyły się zmineralizowaną istotą między-komórkową kości. Dojrzałe osteocyty zasiedlają jamki kostne i kontaktują się ze sobą oraz innymi komórkami tkanki kostnej i naczyniami włosowatymi za pomocą wypustek cytoplazmatycznych, przebiegających przez kanaliki kostne, tworząc sieć. Wypustki cytoplazmatyczne umożliwiają wymianę substancji odżywczych, związków niskocząsteczkowych i metabolitów między komórkami a naczyniami krwionośnymi, zapewniając odżywianie nawet komórkom nie leżącym w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń. Dzięki połączeniom z innymi komórkami kostnymi osteocyty mogą regulować procesy resorpcji i kościotworzenia. W odpowiedzi na bodźce mechaniczne, czy zmiany stężeń hormonów (np. estrogenów i glikokortykoidów) w okolicy zasiedlanej przez osteocyty, komórki te pobudzają lub hamują działanie osteoblastów i osteoklastów wysyłając sygnały uruchamiające resorpcję lub formowanie kości [3, 12, 26].

Pod względem morfologicznym wyróżnia się dwa rodzaje osteocytów. Komórki o kształcie wydłużonym znajdują się głównie w kości blaszkowatej, natomiast osteocyty owalne budują kość gąbczastą. We wczesnej fazie rozwoju osteocyty przypominają budową osteoblasty, jednak w trakcie procesu różnicowania następuje w nich szereg przemian strukturalnych i funkcjonalnych. Ostateczna rola osteocytów sprowadza się głównie do utrzymywania integralności istoty międzykomórkowej kości i jej ochrony przed resorpcją [6, 27, 28].

2.5. Komórki powierzchni kości

Komórki powierzchni kości, zwane także komórkami wyścielającymi kość wywodzą się z osteoblastów. Nie mają one zdolności syntezy macierzy pozakomórkowej. Mają kształt płaski i wydłużony, leżą na zewnętrznej powierzchni istoty pozakomórkowej kości, czyli jej nieczynnej, niezmineralizowanej warstwy, która nie podlega procesowi remodelacji. Ich główną rolą jest utrzymywanie mineralnej homeostazy między środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym kości, gdyż pełnią funkcję bariery jonowej oddzielającej płyn tkankowy od substancji, które przenikają przez osteocyty. Osteoklasty nie mają zdolności przylegania do niezmineralizowanej, zewnętrznej powierzchni kości, dlatego też komórki wyścielające kość pełnią również ważną rolę w procesie resorpcji. Po odebraniu sygnału od osteocytów powierzchniowych kości, komórki wyścielające usuwają macierz pozakomórkową pokrywającą kość i tym samym umożliwiają osteoklastom dostęp i adhezję do jej powierzchni. Dzięki temu proces resorpcji może zachodzić efektywnie [3, 28].

2.6. Macierz międzykomórkowa tkanki kostnej

Substancja międzykomórkowa kości stanowi większość, bo aż 95% całkowitej masy kostnej. Możemy wyróżnić w niej część nieorganiczną, składającą się z substancji mineralnych, stanowiących około 75% macierzy, oraz część organiczną – tzw. osteoid. W skład części nieorganicznej macierzy wchodzi krysztaly hydroksyapatytu odkładające się w miarę procesu mineralizacji w oczkach sieci, jaką tworzy kolagen należący do osteoidu kości. Grupy hydroksylowe soli wapniowo-fosforanowych tworzących hydroksyapatyt, mogą być częściowo zastępowane przez grupy węglanowe, cytrynianowe, a także chlor, sód, potas, magnez i fluor. W budowie kryształów hydroksyapatytu wyróżnić można zewnętrzną, uwodnioną powłokę, biorącą udział w wymianie jonów między kryształem a macierzą kostną. Pod powłoką znajduje się strefa zewnętrzna kryształu, a następnie jego centrum. Interakcje hydroksyapatytu z białkami niekolagenowymi macierzy warunkują sztywność, twardość i wytrzymałość kości [3, 6, 26].

Część organiczna macierzy kostnej jest w większości zbudowana z kolagenu typu I, którego włókna zgrupowane są w tropokolagen wykazujący charakterystyczne poprzeczne prążkowanie. Tworzą one trójwymiarową sieć otaczającą kryształy hydroksyapatytu. Kolagen jest powiązany z białkami niekolagenowymi macierzy, takimi jak: siałoproteina, osteokalcyna, osteonektyna, proteoglikany czy glikoproteiny. W skład osteoidu wchodzi również lipidy, stanowiące około 2-4% jego zawartości. Organiczne składniki macierzy kostnej są aktywnie syntetyzowane i wydzielane przez osteoblasty [7, 29].

3. Metabolizm tkanki kostnej

Tkanka kostna jest strukturą niezwykle dynamiczną, w której cały czas zachodzą zmiany strukturalne i metaboliczne. Komórki kostne kontaktują się ze sobą i wydzielają szereg czynników regulujących ich metabolizm. Prawidłowy i zrównoważony metabolizm tkanki kostnej warunkuje poprawne funkcjonowanie układu szkieletowego, ma wpływ na odpowiednią masę, rozmiary i wytrzymałość kości, wpływa również na utrzymanie homeostazy gospodarki wapniowo-fosforanowej organizmu [1, 6].

W metabolizmie tkanki kostnej możemy wyróżnić dwa główne procesy: modelowanie strukturalne oraz remodelację kości. Wzmocniona modelacja ma miejsce w okresie dzieciństwa i dojrzewania, kiedy to szkielet rośnie, a kości osiągają odpowiednie rozmiary i masę. Tkanka kostna nabywa wtedy dostatecznej wytrzymałości. Osteogeneza zachodzi w tym czasie od powierzchni podokostnowej, natomiast resorpcja rozpoczyna się od strony jam szpikowych. U dzieci procesy te przebiegają tak intensywnie, że w ciągu roku może dochodzić u nich nawet do 50% wymiany kośćca. U osób dorosłych tempo przebudowy kośćca znacznie spada, a metabolizm kostny jest nastawiony głównie na remodelację, czyli wewnętrzną przebudowę kości. Ma to na celu utrzymanie odpowiedniej masy i struktury szkieletu, a także adaptację kości do zmieniających się warunków [1,3].

3.1. Czynniki wpływające na metabolizm kostny

Metabolizm tkanki kostnej obejmuje szereg skomplikowanych procesów, regulowanych przez wiele substancji wytwarzanych zarówno przez komórki kostne, jak i inne tkanki.

3.2. Czynniki regulujące proces osteoblastogenezy

Ważną grupą czynników wpływających na proces osteoblastogenezy są białka morfogenetyczne kości (BMPs). Są to polipeptydowe czynniki wzrostu należące do nadrodziny TGF- β , które regulują wzrost i różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki osteogenne oraz stymulują dojrzewanie osteoblastów. Białka te łączą się z odpowiednimi receptorami błonowymi na prekursorach osteoblastów i aktywują je. Z kolei aktywne kinazy fosforylują wewnątrzkomórkowe białka SMAD, które indukują ekspresję genów docelowych. Skutkuje to różnicowaniem komórek w kierunku osteoblastów [28, 30].

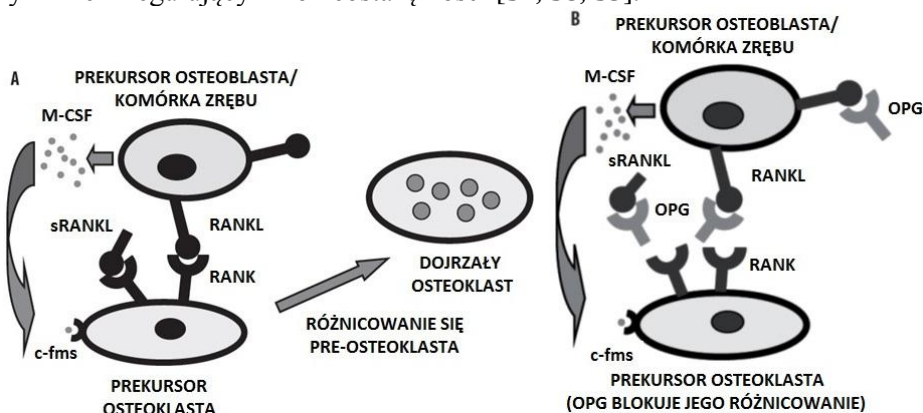
W procesie osteoblastogenezy ważną rolę odgrywa również grupa czynników transkrypcyjnych, głównie opisanych wcześniej RUNX2 i Osterix, które pełnią kluczową rolę w procesie dojrzewania komórek kościotwórczych. Obok nich istotne są również glikoproteiny Wnt, biorące udział w regulacji proliferacji i różnicowania prekursorów osteoblastów poprzez łączenie się ze swoistymi receptorami (białko FZD i receptor LDL) i przekazanie do komórki sygnału inicjującego różnicowanie. Szlak Wnt jest aktywny we wszystkich komórkach linii osteoblastycznej (zarówno w prekursorach osteoblastów, właściwych osteoblastach, jak i osteocytach, a także w komórkach wyściełających kość). Pobudza on preosteoblasty do różnicowania, proliferacji oraz stymuluje przeżywalność komórek kościotwórczych [31, 32, 33].

3.3. Czynniki regulujące proces osteoklastogenezy

Osteoklastogeneza również jest skomplikowanym procesem, wymagającym skoordynowanej aktywności wielu czynników. Pierwszym z nich jest czynnik transkrypcyjny PU1 inicjujący tworzenie osteoklastów. Indukuje on powstanie późnych komórek monocytarnych oraz nieswoiste różnicowanie wczesnych komórek monocytarnych. PU1 oddziałuje z czynnikiem MITF regulując ekspresję genów charakterystycznych dla osteoklastów: katepsyny K, kwaśnej fosfatazy 5 oraz receptora związanego z osteoklastem w trakcie jego różnicowania (OSCAR). Aktywuje on również kolejny czynnik – M-CSF, który indukuje proliferację wczesnych prekursorów osteoklastów oraz zapobiega ich apoptozie. M-CSF jest produkowany przez osteoblasty i limfocyty T w odpowiedzi na zwiększone stężenie PTH (parathormonu) i działanie czynników prozapalnych, tj: TNF- α i IL-1. M-CSF łączy się z receptorem c-fms

obecnym w błonie prekursorów osteoklastów już na wczesnych etapach ich różnicowania [34, 35, 36].

Późniejsze etapy różnicowania i dojrzewania osteoklastów regulowane są przez wspomniany wcześniej system RANK/RANKL/OPG (Rys. 6.). Wytwarzany przez osteoblasty RANKL jest ligandem dla receptora RANK, obecnego w błonie prekursorów osteoklastów, który aktywuje kaskadę sygnałów stymulującą powstawanie dojrzałych, zdolnych do resorpcji komórek kościogubnych. Podczas tych przemian dochodzi między innymi do aktywacji i uwolnienia czynnika NF- κ B, który jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie stymuluje ekspresję genów kontrolujących cykl komórkowy oraz genów warunkujących osteoklastogenezę (różnicowanie, aktywację i ochronę osteoklastów przed apoptozą). Osteoprotegryna (OPG) produkowana i uwalniana przez osteoblasty jest rozpuszczalnym receptorem kompetycyjnym dla RANKL. Współzawodniczy ona z RANK przylączając jego ligand i tym samym hamując dojrzewanie pre-osteoklastów. OPG jest więc bardzo ważnym czynnikiem regulującym homeostazę kości [37, 38, 39].



Rys. 6. Schemat działania systemu RANK/RANKL/OPG [7]

3.4. Inne czynniki regulujące metabolizm kostny

Poza opisanymi wyżej, głównymi czynnikami regulującymi procesy osteoblasto- i osteoklastogenezy istnieje szereg innych substancji mających wpływ na te procesy.

Cytokiny są grupą związków, które regulują niemal każdy proces metaboliczny w organizmie. Nie dziwi więc fakt, że wiele z nich ma wpływ na funkcjonowanie komórek tkanki kostnej. W proces osteoklastogenezy zaangażowane są następujące interleukiny: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, a także onkostatyna M (OSM), czynnik hamujący białaczkę (LIF), czynnik martwicy nowotworów (TNF), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Z kolei cytokiny, takie jak: IL-4, IL-10, IL-18 oraz IFN- γ hamują rozwój komórek kościogubnych [2, 28].

Czynniki wzrostu oraz ich antagoniści stanowią dużą grupę związków zaangażowanych w regulację metabolizmu kostnego. Oprócz białek BMP, których rola w procesie dojrzewania osteoblastów jest kluczowa, ważne są również: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFs) oraz białka należące do grupy czynników wzrostu fibroblastów (FGFs). Czynniki te stymulują proliferację preosteoblastów i ich różnicowanie w dojrzałe komórki kościotwórcze [28].

Hormony, głównie te związane z gospodarką wapniową organizmu, również wpływają na metabolizm osteoblastów i osteoklastów. Stymulatorami osteoklastogenezy są na przykład: parathormon i 1,25 dihydroksywitamina D₃ (aktywna forma witaminy D₃). Ich wpływ na osteoklasty wiąże się ze zdolnością indukowania syntezy IL-11 i IL-6 przez komórki zrębu. Hormony te regulują również wchłanianie i wydalanie wapnia w nerkach i jelitach. Kalcitonina z kolei jest hormonem hamującym aktywność osteoklastów, ponieważ ma zdolność kierowania ich na drogę apoptozy. Inne hormony, takie jak estrogeny, glikokortykosteroidy, czy androgeny również mogą regulować metabolizm komórek kostnych poprzez stymulację syntezy odpowiednich cytokin [6, 28].

Prawidłowe funkcjonowanie osteoblastów i osteoklastów zależy również od oddziaływań między komórkami oraz interakcji typu komórka-macierz międzykomórkowa. W oddziaływaniach tych uczestniczą swoiste białka powierzchniowe, umożliwiające przyleganie komórek do siebie i do macierzy zewnątrzkomórkowej. Dzięki temu komórki mogą wymieniać substancje odżywcze między sobą i otoczeniem. Białka te nazywamy cząsteczkami adhezyjnymi. Zaliczamy do nich, m.in.: integryny, selektyny i kadheryny. Cząsteczki adhezyjne są również zaangażowane w migrację preosteoklastów i osteoblastów ze szpiku kostnego do miejsc przebudowy kości, uczestniczą w stymulacji i hamowaniu procesu resorpcji, a także kontrolują procesy życiowe komórek kostnych uczestnicząc w procesie apoptozy [5, 28].

3.5. Resorpcja kości

Resorpcja jest bardzo ważnym procesem zachodzącym w tkance kostnej. W warunkach fizjologicznych ma ona na celu usunięcie fragmentu kości, w której z jakiegoś powodu (zwykle w wyniku starzenia się, czy wystąpienia urazu) doszło do utraty jej właściwości mechanicznych lub upośledzenia pełnionych przez nią funkcji (takich jak wymiana jonowa, która jest niezbędna do utrzymywania homeostazy wapniowo-fosforanowej), lub w której procesy regeneracji zachodzą nieefektywnie [3, 5].

W resorpcji udział biorą osteoklasty, które dzięki obecności integryn mogą przylączyć się do powierzchni kości. W procesie adhezji osteoklastów do macierzy zewnątrzkomórkowej kości uczestniczy głównie integryna $\alpha_v\beta_3$

obecna w ich błonie, która łączy się ze specyficzną sekwencją aminokwasów RGD (arginina-glicyna-asparaginian) obecną w glikoproteinach powierzchniowych macierzy. Po przyłączeniu do powierzchni kości, komórki kościogubne ulegają polaryzacji i można wtedy wyróżnić w nich charakterystyczne strefy: błonę bazolateralną, która nie ma kontaktu z powierzchnią kości, strefę przylegania, w której licznie występują integryny oraz rąbek szczoteczkowy – strefę bogatą w wypustki zwiększające powierzchnię osteoklastu, mającą kontakt z macierzą pozakomórkową kości. Aktywny, resorbujący osteoklast wytwarza szereg enzymów powodujących rozpuszczanie macierzy mineralnej kości oraz jej białkowych składników. Należą do nich: anhidraza węglanowa typu II, katepsyny K, B i L oraz metaloproteinazy. Przez kosmki rąbka szczoteczkowego wydzielane są również aktywnie protony, co powoduje zakwaszenie środowiska i powstanie tzw. zatoki resorpcyjnej, w obrębie której stale utrzymywane jest niskie pH (w granicach 3-4). Po strawieniu przez enzymy, składniki macierzy kostnej są pochłaniane przez kosmki rąbka szczoteczkowego na drodze endocytozy, a następnie wydalone z przeciwległego bieguna osteoklastu. Cały proces resorpcji kości trwa około trzech tygodni. Jest on więc znacznie krótszy od procesu tworzenia kości, który może trwać nawet do kilku miesięcy [1, 28, 40].

Procesy resorpcji i kościotworzenia są ze sobą ściśle powiązane, ponieważ już w trakcie trawienia kości przez osteoklasty, z macierzy kostnej uwalniane są czynniki, takie jak: TGF- β , PDGF, FGF, BMP, IGF, mające na celu przyciągnięcie w to miejsce preosteoblastów i ich stymulację do różnicowania w dojrzałe komórki kościotwórcze [5, 41].

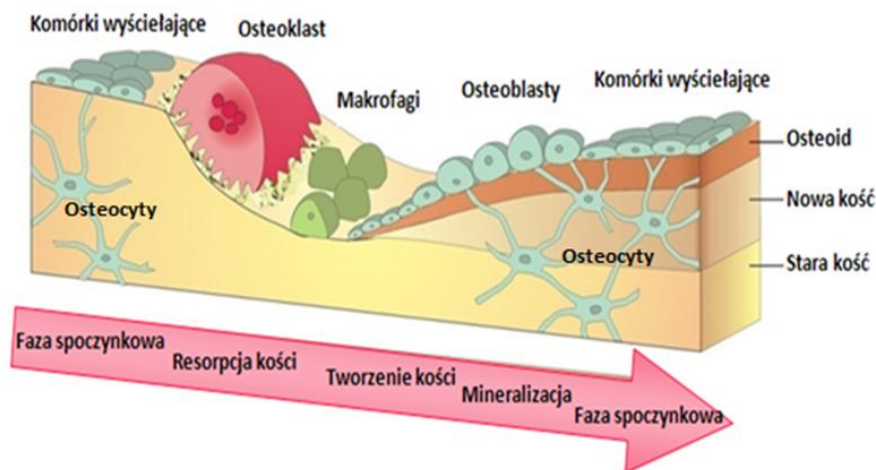
3.6. Remodelacja kostna

Proces wewnętrznej przebudowy kości, zwany inaczej remodelacją, pozwala na utrzymanie odpowiedniej masy, struktury i wytrzymałości szkieletu, a także utrzymanie gospodarki wapniowo-fosforanowej organizmu na odpowiednim poziomie. Remodelacja kostna zachodzi nieustannie, zarówno w kości korowej jak i beleczkowej, stara tkanka kostna jest więc stale wymieniana na nową, dzięki czemu kości mogą prawidłowo funkcjonować przez wiele lat.

Proces remodelacji (Rys. 7.) zachodzi w tak zwanych jednostkach przebudowy kości (*basic multicellular units* – BMUs), w skład których wchodzi osteoblasty, osteoklasty i osteocyty. Przebudowę kości można podzielić na cztery fazy: spoczynkową, aktywacji osteoklastów, resorpcji i kościotworzenia. Na uwagę zasługuje fakt, że w trakcie remodelacji, w odróżnieniu od modelacji, fazy resorpcji i kościotworzenia nie są od siebie oddzielone przestrzennie – zachodzą w tym samym miejscu, od strony podokostnowej (w procesie modelacji kostnej fazy te zachodzą na odrębnych powierzchniach kości) [5, 28, 42].

W pierwszej fazie remodelacji dochodzi do wycofania się komórek wyścielających z powierzchni kości. Ma to miejsce pod wpływem sygnału

dochodzącego z wnętrza kości, na przykład w wyniku mikrouszkodzeń, które aktywują komórki wyścielające do wydzielania czynników stymulujących przyciąganie w to miejsce osteoklastów i ich różnicowanie. Po odsłonięciu powierzchni kości (która ma zostać usunięta) i aktywacji osteoklastów na drodze szlaku RANKL/RANK/OPG, dochodzi do przyłączenia się komórek kościogubnych do kości i następuje faza resorpcji. Faza ta trwa około 3 tygodni i kończy się apoptozą osteoklastów. Po jej zakończeniu następuje kolejny etap, czyli faza kościotworzenia, w której osteoblasty zasiedlają utworzoną wcześniej zatokę resorpcyjną i zaczynają produkować osteoid i białka powodujące jego mineralizację. Po zakończeniu procesu mineralizacji macierzy kostnej, który trwa kilka miesięcy, osteoblasty uwięzione w oczkach jej sieci przekształcają się w osteocyty, a w obrębie danej jednostki przebudowy znajduje się dojrzała kość [42, 43].



Rys. 7. Schemat przebiegu procesu remodelacji kostnej [44]

4. Podsumowanie

Procesy opisane powyżej ukazują niezwykle złożoność i dynamikę metabolizmu tkanki kostnej. Fakt, że jest ona najtwardszą tkanką w naszym organizmie, nie oznacza wcale, że jest tworem stałym i niepodlegającym zmianom. Komórki tkanki kostnej nieustannie współpracują ze sobą, wydzielając czynniki działające jako aktywatory bądź inhibitory procesów metabolicznych w niej zachodzących. Zachowanie równowagi między tymi procesami jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania nie tylko układu szkieletowego, ale także całego organizmu.

Literatura

1. Stawińska N., Ziętek M., Kochanowska I. (2005) *Molecular aspects of bone resorption and their therapeutical capability in the periodontal and osteoporotic therapy*, Dent. Med. Probl., 42, 627-635;
2. Ostrowska Z., Wołkowska-Pokrywa K., Kos-Kudła B., Świętochowska E., Marek B., Kajdaniuk D. (2006) *Melatonina a stan kości*, Pol. Merk. Lek., 21, 389-393;
3. Niedźwiedzki T., Kuryszko J.J. (2007) *Biologia kości*, PWN SA Warszawa, wyd I;
4. Khosla S., Westendorf J.J., Oursler J.M. (2008) *Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures*, J. Clin. Invest., 118, 421-428;
5. Kryśkiewicz E., Lorenc R.S. (2009) *Mechanisms of action of anticatabolic drugs used in osteoporosis therapy*, Endokrynol Pol., 60, 134-144;
6. Sawicki W. (2008): *Histologia*, PZWL Warszawa, wyd. V;
7. Stanisławowski M., Kmiec Z. (2009): *Udział RANK, RANKL i OPG w osteozie towarzyszącej nowotworom*, Postepy Hig Med Dosw., 63, 234-241;
8. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (2002) *Principles of bone biology*, Academic Press Elsevier, USA, 2nd edition;
9. Kuryłow E., Kamiński G. (2008) *Place of biochemical marker of bone turnover in guidelines for diagnosis and treatment of osteoporosis*, 25, 386-389;
10. Bochenek A., Reicher M. (2010) *Anatomia człowieka*, tom I. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, wydanie XIII;
11. Ruimerman R. (2005) *Modeling and remodeling in bone tissue*, Technische Universiteit, Eindhoven;
12. Kierszenbaum A. L. (2002) *Histology and cell biology. An introduction to pathology*, Elsevier Health Science, USA, 1st edition;
13. http://www.uci.agh.edu.pl/bip/63/26_63.htm
14. http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/muscles.html
15. Neve A., Corrado A., Cantatore F. P. (2011) *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*, Cell Tissue Res., 343: 289-302;
16. Włodarski K. (2009) *Histogeneza tkanki kostnej*, Czas. Stomatol., 62, 4: 282-292;
17. Witkowska-Zimny M., Wróbel E., Przybylski J. (2009) *Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy*, Post Biol Komórki., 36, 4: 695-705;
18. Hughes F. J., Turner W., Belibasakis G., Martuscelli G. (2006) *Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation*, Periodontol., 41: 48-72;
19. Hatta M., Yoshimura Y., Deyama Y., Fukamizu A., Suzuki K. (2006) *Molecular characterization of the zinc finger transcription factor Osterix*, Int J Mol Med., 17: 425-430;
20. Baek W., Lee M., Jung J., Kim S., Akiyama H., De Crombrughe B., Kim J. (2009) *Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix*, J Bone Miner Res., 24: 1055-1065;
21. Hadjidakis D. J., Androulakis I. I. (2006) *Bone Remodeling*, Ann NY Acad Sci., 1092: 385-396;
22. Lutter A.H., Hempel U., Wolf-Brandstetter C., Garbe A.I., Goettsch C., Hofbauer L.C., Jessberger R., Dieter P. (2010) *A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix*, J CellBiochem., 5, 1025-32;
23. http://dentals.pl/data/foto_14.jpg
24. <http://www.abdn.ac.uk/news/3332/>

25. http://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Osteocyte_2.jpg
26. Ostrowski K. (1995) *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa;
27. Caetano-Lopes J., Canhão H., Fonseca J.E. (2007) *Osteoblasts and bone formation*, Acta Reum Port., 32, 234-241;
28. Manolagas C. (2000) *Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*, Endocrine Reviews, 21, 115-137;
29. Clarke B. (2008) *Normal Bone Anatomy and Physiology*, CJASN, 3, 131-139
30. Khosla S., Westendorf J.J., Oursler M.J. (2008): Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. J. Clin Invest., 118: 421-428;
31. Lian J. B., Stein G. S., Javed A. (2006) *Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis* Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 7, 1-16;
32. Jensen E.D., Gopalakrishnan R., Westendorf J.J. (2010) *Regulation of gene expression in osteoblasts*, Biofactors, 36, 25-32;
33. Liu F., Kohlmeier S., Wang C.Y. (2007) *Wnt signaling and skeletal development*, Cell Signal., 20, 999-1009;
34. Yavropolou M.P., Yovos G.P. (2008) *Osteoclastogenesis – current knowledge and future perspectives*, J. Musculoskelet. Neuronal. Interact., 8, 204-16;
35. Luchin A., Suchtin S., Merson T., Rosol T.J., Hume D.A., Cassady A., Ostrowski M.C. (2001) *Genetic and Physical Interactions between Mictophthalmia Transcription Factor and PU.1 Are Necessary for Osteoclast Gene Expression and Differentiation*, J. Biol. Chem., 276, 36703-36710;
36. Ross F.E., Ann N.Y. (2006) *M-CSF, c-Fms, and Signaling in Osteoclasts and their Precursors*, N.Y. Acad. Sci., 1068, 110-116;
37. Ashcroft J. A., Davies E. F., Morgan J. G. (2003) *Aetiology of bone disease and the role of bisphosphonates in multiple myeloma*, Lancet Oncol., 4, 284-292;
38. Lu S., Li M., Ling Lin Y. (2010) *Mitf Induction by RANKL Is Critical for Osteoclastogenesis*, MBoC., 21, 1763-1771;
39. Takayanagi H. (2005) *Inflammatory bone destruction and osteoimmunology*. J. Periodont., 40, 287-293;
40. Martin J.T., Sims A.N. (2005) *Osteoclast- derived activity in the coupling of bone formation to resorption*, Trends Mol. Med., 11, 76-81;
41. Matsuo K., Naoko I. (2008) *Osteoclast-osteoblast communication*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 473, 201-209;
42. Sims N. A., Gooi J. H (2008) *Bone Remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*, Seminars in Cell and Developmental Biology, 19, 444-451;
43. Groblewska M., Mroczko M., Czygier M. (2008) *Cytokiny jako markery osteolizy w diagnostyce pacjentów z przerzutami nowotworowymi do kości*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, 62, 668-75;
44. <http://www.precisionnutrition.com/all-about-bone-health>

Tkanka kostna – budowa, funkcje i metabolizm

Streszczenie

Tkanka kostna - najtwardsza tkanka łączna, która buduje nasz szkielet, oprócz funkcji strukturalnej pełni również ważną rolę metaboliczną. Struktura tkanki kostnej obejmuje elementy zarówno organiczne, jak i mineralne. Macierz międzykomórkowa kości, wytwarzana przez komórki kościotwórcze składa się w znacznej części z kolagenu typu I i dzięki procesowi mineralizacji decyduje o takich właściwościach tkanki kostnej jak twardość i wytrzymałość oraz odporność na bodźce mechaniczne. Komórki kostne - osteoblasty, osteocyty i osteoklasty wykształciły system wzajemnych zależności, dzięki któremu współpracują w budowaniu kości, a także usuwaniu jej uszkodzonych fragmentów. Procesy modelacji, remodelacji i resorpcji kostnej warunkują zachowanie przez szkielet odpowiedniej masy, wymiarów i wytrzymałości, a także utrzymanie gospodarki wapniowo-fosforanowej na odpowiednim poziomie. Zachowanie równowagi między tymi procesami jest niezwykle ważne dla stanu zdrowia całego organizmu.

Słowa kluczowe: tkanka kostna, osteoblasty, osteoklasty, remodelacja kości

Bone tissue - structure, function and metabolism

Abstract

Bone tissue - the hardest connective tissue, which builds our skeleton, in addition to its structural function, plays also an important metabolic role. Bone structure includes both organic and mineral components. Bone extracellular matrix, produced by osteoblastic cells, consists largely of type I collagen and due to the process of mineralization it determines such bone tissue properties as hardness, strength and resistance to mechanical stimuli. Bone cells - osteoblasts, osteocytes and osteoclasts have developed the system of mutual dependencies through which they cooperate in bone building and removing its damaged fragments. The processes of modeling, remodeling and bone resorption are requisite for proper skeletal mass, bone dimensions and strength, as well as for the maintenance of calcium and phosphate at the appropriate levels. The balance between these processes is extremely important for the health of the whole body.

Keywords: bone tissue, osteoblasts, osteoclasts, bone remodeling

Tomasz Roman¹, Justyna Markowicz², Agnieszka Szymczyk³,
Arkadiusz Macheta⁴

ŻYLAKI POWRÓZKA NASIENNEGO - DIAGNOSTYKA ORAZ PRZEGLĄD WSPÓŁCZESNYCH METOD LECZENIA, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ZABIEGÓW WEWNĄTRZACZYNIOWYCH

1. Wstęp

Częstość występowania schorzenia szacuje się na 10% (5-17%), zaś w grupie mężczyzn cierpiących na niepłodność odsetek ten wzrasta do 30%. U 15% chorych jest to dolegliwość wrodzona. Występuje częściej lewostronnie – w stosunku 10:1, obustronnie u ok 10% pacjentów, wyłącznie prawostronnie – u 1-2%. Najczęściej problem ten dotyczy mężczyzn w wieku 15-35 lat [1].

Prawa żyła jądrowa uchodzi pod kątem ostrym do żyły głównej dolnej na jej powierzchni przednio-bocznej, na wysokości trzonu kręgu L2. W 8% przypadków uchodzi ona do żyły nerkowej prawej. Lewa żyła jądrowa przylega do łuku Trietza, utworzonego przez tętnicę okrężniczą górną i małą żyłę kręgową. Oddala się ona od tętnicy jądrowej na wysokości dolnego bieguna nerki lewej i biegnie pionowo w górę, uchodząc do żyły nerkowej lewej pod szerokim kątem zwróconym w prawo. Występowanie podwójnego ujścia żyły jądrowej lewej stwierdza się w 19%, potrójnego w 1% przypadków [2]. Obecność połączeń żylnych pomiędzy obiema żyłami jądrowymi stwierdza się w około 55% przypadków. Gałęzie boczne żył jądrowych łączą się z systemem żyły wrotnej, stanowiąc odpływ dla niewielkich żył jelita grubego (w 76% przypadków) [3].

Dodatkowo, krew żylna z jąder i okolicy krocza może odpływać trzema innymi drogami: żyłą sromową zewnętrzną, żyłą przewodu odprowadzającego, żyłą dżwigacza jądra [4].

Nie ustalono dotychczas jednoznacznej etiologii żylaków powrózka nasiennego. W literaturze istnieje podział etiopatogenezy na czynniki pierwotne i wtórne [5]. W większości przypadków, gdy żylaki powrózka nasiennego

¹ mailto:tomek.gov@gmail.com; Zakład Radiologii Zabiegowej i Neuroradiologii, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <http://www.umlub.pl/>;

² mailto:markowicz_j@o2.pl; Katedra i Zakład immunologii Klinicznej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angiologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <http://www.umlub.pl/>;

³ mailto:agusia_szymczyk@wp.pl; Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <http://www.umlub.pl/>;

⁴ arek.macheta@facebook.com; Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, <http://www.umlub.pl/>;

są związane z utratą płodności, mają one charakter pierwotny. Przypuszczalna etiologia niepłodności na tle żylaków powrózka nasiennego jest rozpatrywana w kontekście parametrów hemodynamicznych upośledzonego drenażu żylnego [6, 7], zmiany miejscowych stosunków anatomicznych [8], patologii tkanek miękkich okolicy krocza, zaburzeń hormonalnych – miejscowych, jak i osiowych. Mechanizm hipoksji jest również brany pod uwagę [9]. Gdy żylaki powrózka nasiennego są związane z utratą płodności, w większości przypadków mają one charakter pierwotny [10].

2. Diagnostyka

Choroba przebiega bezobjawowo w większości przypadków. Pacjenci wyczuwają niekiedy powiększenie wymiarów jądra, zgłaszają uczucie dyskomfortu i tępy ból w tej okolicy.

Za złoty standard w rozpoznawaniu tej dolegliwości uważa się badanie wenograficzne. Diagnostyka żylaków powrózka nasiennego opiera się również na badaniu fizykalnym, USG z opcją doppler. W ocenie stanu pacjenta warto również uwzględnić wpływ żylaków powrózka nasiennego na płodność. Wiadomo, że ten sam stopień rozwoju żylaków może mieć różny wpływ na funkcję jąder [11]. Diagnostycznie istotne są tu: ilość plemników, poziom hormonów płciowych (testosteron, estradiol, FSH, LH), badanie histopatologiczne tkanki jąder. Istnieją jednak doniesienia o braku wpływu poprawy tychże parametrów na płodność [12]. Wsteczny odpływ krwi w naczyniach żylnych splotu wiciowatego oraz w żyłę jądrowej stanowi objaw bezwzględnie patognomoniczny dla żylaków powrózka nasiennego. Żylaki powrózka należy różnicować z wodniakiem jądra lub powrózka nasiennego, przepukliną mosznową, torbielą nasieniową, zapaleniem najądrza, guzem jądra [13].

Badanie ultrasonograficzne jest czułą metodą obrazowania struktur worka mosznowego. Należy je przeprowadzać jednocześnie z badaniem fizykalnym. Pacjent powinien być badany w pozycji stojącej, a następnie leżącej – podczas próby Valsalvy i przy normalnym oddychaniu. Badanie umożliwia pomiar średnicy żył splotu wiciowatego, pozwalając wykryć żylaki powrózka o średnicy powyżej 2-3 mm [14]. Zastosowanie opcji doppler umożliwia dokładne odróżnienie tętnic i żył oraz rozpoznanie odwrócenia kierunku przepływu krwi – bez względu na szerokość żyły jądrowej.

3. Leczenie

Celem leczenia jest zlikwidowanie wstecznego przepływu krwi w żyłę jądrowej, wyłączenie z obiegu krwi poszerzonych żył splotu wiciowatego oraz krążenia obocznego od poziomu stawu krzyżowo – biodrowego lub powyżej spojenia łonowego. Prowadzi to do zmniejszenia obrzęku i poprawy

jakości nasienia – obniżonej liczby plemników, zmniejszonej ich ruchliwości oraz nieprawidłowej morfologii [15].

Wskazania do leczenia obejmują: duże, dokuczliwe żylaki, zwiększenie ilości form niedojrzałych w nasieniu, obniżoną ilość plemników < 20 mln/ml, zmniejszenie ruchliwości plemników do 30-50% normy. Wyraźne zmniejszenie wymiarów jądra wraz ze współistnieniem jednej lub wielu ww. zmian również powinno skłonić do podjęcia leczenia [16]

Przeciwwskazania do zabiegu operacyjnego są podobne jak dla ogółu procedur chirurgicznych. Przeciwwskazania do zabiegu embolizacji są przede wszystkim skutkiem niekorzystnych uwarunkowań anatomicznych. Jest to równoznaczne z brakiem możliwości wprowadzenia cewnika selektywnie do żyły jądrowej. Niebezpieczeństwo przedostania się środka sklerotyzującego do sąsiednich obszarów odpływu żylnego również jest wskazaniem do odstąpienia od wykonania zabiegu. Uczulenie na środki cieniujące również uniemożliwia jego przeprowadzenie. Wybór konkretnej metody jest uzależniony każdorazowo od warunków anatomicznych [17].

3.1. Metody chirurgiczne

Chirurgiczne podwiązanie chorobowo zmienionych naczyń żylnych pozostaje najczęściej stosowaną metodą leczenia żylaków powrózka nasiennego. Zabiegi chirurgiczne możemy podzielić na otwarte zabiegi podwiązania żylaków (zamknięcie wysokie, pachwinowe, podpachwinowe), zabieg laparoskopowy i mikrochirurgiczny.

Wysokie podwiązanie żyłki jest wykonywane przez podłużne nacięcie. Rozpoczyna się ono 5 cm przyśrodkowo i poniżej kolca biodrowego przedniego górnego, około 5 cm powyżej pierścienia pachwinowego głębokiego, ciągnie się przyśrodkowo. Należy odróżnić tętnicę i żyłę jądrową. Naczynie tętnicze jest stosunkowo małe i odróżnienie to może sprawiać trudności. Należy odszukać wszystkie odgałęzienia żyły jądrowej i je podwiązać. Zasadniczym powikłaniem zabiegu jest obrzęk jądra, trwający do 18 miesięcy, opisywany u 7% operowanych [18].

W dostępie pachwinowym nacięcie jest wykonywane w pachwinie. Rozpoczyna się powyżej i bocznie do guzka łonowego, ciągnie się bocznie wzdłuż linii skórnych ściany dolnej brzucha. Nasieniowód wraz z tętnicą, żyłą i naczyniami limfatycznymi powinny zostać odróżnione i zachowane. Pozostałe struktury żyłne powinny zostać zidentyfikowane i wypreparowane do zamknięcia. Wszystkie te naczynia żyłne mogą stanowić składowe żylaków powrózka nasiennego. Wszystkie pozostałe tętnice i naczynia limfatyczne powinny zostać jasno zidentyfikowane i zachowane w celu uniknięcia powikłań. Nacięcie w otwartym dostępie podpachwinowym jest wykonywane na poziomie pierścienia pachwinowego zewnętrznego. Uwidocznienie powrózka nasiennego jest możliwe dzięki temu bez przecinania lub rozwarstwiania żadnego mięśnia

czy ścięga. Dostęp ten cechuje się mniejszą inwazyjnością i mniejszymi powikłaniami bólowymi w porównaniu z obiema powyższymi metodami operacyjnymi. Istotną niedogodnością jest fakt, że na poziomie tego dojścia w zasadzie wszystkie naczynia żyłne posiadają odgałęzienia. Wiąże się to z koniecznością wypreparowania większej ilości naczyń żylnych o mniejszej średnicy. Powiększenie optyczne jest zalecane do przeprowadzania zabiegu tą metodą.

Otwarte chirurgiczne zamknięcie żyłaków powrózka nasiennego może skutkować różnorakimi wynikami klinicznymi. Możliwe powikłania, o częstości 5-30%, to: wodniak jądra, niezamierzone zamknięcie naczynia tętniczego, atrofia jądra, uszkodzenie nasieniowodu, zapalenie najądrza, krwiak i zakażenie rany pooperacyjnej. Częstotliwość nawrotów/przetrwania żyłaków w tym sposobie leczenia to 10-45%.

Laparoskopowe zamknięcie żyłaków powrózka rozpoczyna się od wytworzenia odmy otrzewnowej i umieszczenia troakarów. Tylną blaszkę otrzewnej nacina się bocznie od naczyń jądrowych i około 2 cm powyżej pierścienia pachwinowego głębokiego. W tym miejscu nie ma niebezpieczeństwa uszkodzenia naczyń biodrowych zewnętrznych. Naczynia jądrowe należy wypreparować. Po wypreparowaniu naczyń jądrowych i uniesieniu ich ku górze zakłada się 4 klipsy oraz przecina naczynia między klipsem 2 a 3. W razie trudności z identyfikacją tętnicy można ostrzyknąć pęczek naczyniowy roztworem papaweryny lub 2% lidokainy – przeciwdziała skurczowi naczyń tętnicznych. Obustronne żyłaki można jednocześnie zaopatrzyć tą metodą. Czas zabiegu rzadko przekracza 30 minut. Jest to procedura jednodniowa w wielu ośrodkach [19].

Laparoskopowe zamknięcie żyłaków powrózka nasiennego posiada istotną zaletę w postaci możliwości dokonania podwiązania w części bliższej, w pobliżu ujścia do żyły nerkowej. Na tym poziomie tylko jedna lub dwie duże żyły są obecne, co wymaga zamknięcia mniejszej ilości naczyń. Tętnica jądrowa na tym poziomie nie oddaje jeszcze odgałęzień i często wyraźnie odróżnia się od naczyń żylnych powrózka nasiennego.

Niepowodzenie leczenia laparoskopowego mieści się w przedziale 6-15% przypadków [20]. Jest ono związane głównie z zachowaniem okołotętniczego zwoju żył towarzyszących (*venae comitantes*). Podwiązanie *venae comitantes* jest z kolei równoznaczne z zamknięciem danej tętnicy. Pozostawienie drożnej tętnicy jądrowej zostało zestawione w kilku badaniach z częstością nawrotów bądź niepowodzeń leczenia. Opisano nieznaczne pogorszenie wyników leczenia jako skutek pozostawienia tętnicy (3,5-20%) [21]. Kolejną ważną przyczyną niepowodzenia leczenia laparoskopowego jest obecność równoległych żył obocznych, które wychodząc z jądra, uchodzą do żyły jądrowej wewnętrznej w jej części bliższej od wykonanego zamknięcia.

Zabieg mikrochirurgiczny z dojścia pod pachwinowego wydaje się być najbardziej zaawansowaną chirurgiczną metodą leczenia dolegliwości. Stosuje

się mikroskop operacyjny, uzyskując powiększenie rzędu 10-25x. Ma to pozytywny wpływ na wyniki leczenia, na tle zabiegów operacyjnych z użyciem lupy [22]. Naczynia tętnicze są identyfikowane, analogicznie do pozostałych metod chirurgicznych. Powiększenie optyczne ułatwia tę czynność, zwłaszcza w przypadkach obkurczenia tętnic po manipulacji i występowania licznych drobnych odgałęzień tętniczych. Metoda ta znacząco obniżyła częstotliwość nawrotów/niepowodzeń leczenia, wynosząc tu 0-2%. Częstość powikłań jest również niewielka – 1-5%. Są one takie same jak w pozostałych metodach chirurgicznych [23]. Czas zabiegu to około 30 do 60 minut.

3.2. Metody wewnątrznacyniowe

Współcześnie nie ma metody endowaskularnego leczenia żyłaków powróżka uważanej za jednoznacznie najlepszą. Sposób przeprowadzania zabiegu, jak i materiały embolizacyjne, były przez lata stopniowo udoskonalane. Wybór konkretnego materiału embolizacyjnego może zależeć od jego ceny, dostępności na rynku, bezpieczeństwa zastosowania, preferencji operatora, uwarunkowań anatomicznych żyły jądrowej wewnętrznej (ISV). Materiały płynne bądź sklerotyzujące można rozprowadzić skuteczniej, niż materiały stałe (np. spirale). Daje to szansę skuteczniejszego wyłączenia z krążenia rozgałęzień czy naczyń obocznych ISV. Równocześnie można zastosować obydwa w/w rodzaje materiałów. Techniczna skuteczność zabiegu wynosi 95-100%, pomimo stosowania różnorodnych materiałów. Niższy odsetek skuteczności był zazwyczaj związany z niemożnością skutecznego cewnikowania ISV. Dla populacji pediatrycznej zaproponowano metodę umożliwiającą zachowanie bliższych części ISV, w okresie jej wzrostu. Takie założenie może okazać się w przyszłości ważne w leczeniu przypadków nawrotów żyłaków w wieku późniejszym [24].

Stosuje się znieczulenie miejscowe oraz w razie potrzeby preparat sedatywny. W czasie trwania zabiegu pacjent znajduje się na stole angiograficznym, leżąc na plecach. Przebieg zabiegu monitorowany jest techniką fluoroskopową. Pacjent otrzymuje ochronę przed promieniowaniem X na krocze. Jest także pouczany co do sposobu wykonania manewru Valsalvy, jeśli technika zabiegu tego wymaga. Można posiłkować się uprzednio wykonanym wenogramem.

Skleroterapia ma zastosowanie, gdy nie występuje masywne cofanie się krwi do żyły nerkowej lub do żyły głównej dolnej w czasie wykonywania próby Valsalvy. Gdy żyła jądrowa jest szeroka, do podania preparatu używany jest cewnik z balonem, który ma na celu uszczelnienie ujścia żyły jądrowej. Zapobiega to przedostaniu się środka sklerotyzującego do obwodowego systemu żylnego, co może prowadzić do groźnych powikłań w postaci np. zatorów płucnych. Skleroterapia wsteczna (*retrograde sclerotherapy*) jest szeroko

opisana w literaturze. Klinicznie cechuje się dobrymi wynikami leczenia oraz wysokim odsetkiem pomyślnie przeprowadzonych zabiegów.

Spirale Gianturco-Wallace znajdują tu również zastosowanie. Przygotowanie pacjenta jest takie samo, jak do angiografii. Umieszczenie spiral w żyłakowato zmienionym naczyniu poprzedza ocena występowania krążenia obocznego i rozgałęzień żylnych. W świetle umieszczane są 2-4 gniazda spiral, najczęściej na wysokości pierścienia pachwinowego wewnętrznego, stawu krzyżowo – biodrowego oraz w 1/3 górnej żyły jądrowej. Używane są spirale o średnicy o średnicy 3-10 mm, system .035/.038. Rozmiar spirali powinien być 10-20% większy od żyły. Materiał sklerotyzujący można zastosować dodatkowo, w celu zamknięcia drobnych odgałęzień oraz ustabilizowania spirali. Ilość środka sklerotyzującego na gniazdo spirali to około 2-3 cm. Zakrzepica żyłaków powrózka powstaje do 20 minut po zabiegu. Skuteczność embolizacji wynosi 82%. Po zabiegu zalecany jest spoczynek w łóżku przez około 2 godziny. Wypisu można dokonać po ustąpieniu działania środka sedatywnego, jeśli był stosowany.

Embolizacja żyłaków powrózka przy pomocy klejów cyjanoakrylowych (NBCA) jest jedną z dostępnych metod leczenia tej dolegliwości. Cewnik przesuwany jest wstecznie do przepływu krwi w naczyniu. Ocenie podlega umiejscowienie naczynia, wielkość i obecność krążenia obocznego na tym poziomie. Umieszczamy następnie NBCA w patologicznie zmienionym naczyniu. Po zakończeniu procedury wykonujemy końcowy wenogram ISV w celu upewnienia się o zamknięciu wszystkich gałęzi żyły. Cewnik usuwamy, po czym uciskamy manualnie przez 10 minut okolicę wprowadzenia cewnika do układu żylnego. Obserwację pacjenta zaleca się prowadzić przez 2-3 godziny, po czym w razie braku komplikacji można go wypisać. Aktywność zawodową pacjent może podjąć już następnego dnia, z zaleceniem unikania dźwigania ciężkich przedmiotów przez najbliższe kilka dni.

Powikłania embolizacji żyły jądrowej występują w 1-5% przypadków. Obserwuje się obrzęk w okolicy pachwiny i jądra, który ustępuje po 3-4 dniach, ból lewej okolicy lędźwiowej, reakcję uczuleniową na środek cieniujący. Zakrzepica żyły udowej występuje w mniej niż 1% przypadków. Zabieg bardzo rzadko może być powikłany martwicą jądra oraz przebicciem żyły jądrowej z wynaczynieniem krwi – czemu dodatkowo towarzyszy ból [25].

4. Dyskusja

W literaturze istnieją rozbieżności już co do celowości zabiegowego leczenia żyłaków powrózka nasiennego jako przyczyny niepłodności. Udowodniono, że leczenie takie poprawia parametry nasienia, jak ilość plemników, ich ruchomość, zmniejsza odsetek plemników nieprawidłowych, a także lokalnie obniża temperaturę drenowanego przez naczynie żyłne jądra i zmniejsza stres oksydacyjny. Końcowy efekt (*endpoint*) powinien jednak odpowiadać sytuacji

klinicznej pacjenta, a także jego oczekiwaniom co do danej procedury leczniczej. Przed podjęciem leczenia warto zatem rozważyć możliwe do osiągnięcia cele. Prospektywna obserwacja pacjentów poddanych leczeniu jest ważna dla ewaluacji korzyści w perspektywie czasu. Dla przykładu, w celu leczenia niepłodności męskiej należy poszukiwać metody umożliwiającej stosunkowo szybką poprawę parametrów nasienia i poziomu testosteronu u pacjenta. Analiza prospektywna pozwala następnie ocenić odsetek powodzeń prokreacyjnych w jednostce czasu, przedstawić tę skuteczność w odniesieniu do zaawansowania choroby przed leczeniem, przyporządkować częstość niepowodzeń do konkretnej metody leczenia.

Rozumienie wieloaspektowości niepłodności męskiej jest kluczowe dla pacjentów poddających się zabiegowemu leczeniu żyłaków powróżka nasiennego. Łączenie zamknięcia żyłaków powróżka z założeniem jak najszybszego uzyskania ciąży, w sposób bezpośredni i z pominięciem pozostałych ważnych czynników, jest problemem wielu omówień badań klinicznych [26].

Badania kliniczne oceniające skuteczność poszczególnych metod są jednak trudne do przeprowadzenia. Upływ czasu potrzebny do ostatecznej oceny skuteczności jest dla poszczególnych pacjentów nie do zaakceptowania. Rozwiązaniem może być zastosowanie nowych parametrów do oceny wpływu żyłaków powróżka na płodność, takich jak współczynnik fragmentacji DNA (DFI), czy oznaczanie reaktywnych form tlenu (ROS) [27] jako markera stresu oksydacyjnego. Przy porównywaniu wyników badań klinicznych należy wziąć pod uwagę czynniki różniące poszczególne grupy badawcze, takie jak ich liczebność, kryteria doboru pacjentów, wiek partnerek, dostępne/zastosowane metody leczenia, czas oczekiwania na potomstwo po zabiegu, dotychczasowy okres niepłodności czy odsetek wyników nieistotnych statystycznie.

Odsetek sukcesu prokreacyjnego u pacjentów po przebytym leczeniu żyłaków powróżka nasiennego waha się w przedziale od 25% do 35% – w większości randomizowanych badań [28, 29], z czego ok 14% poczęć uzyskuje się metodami rozrodu wspomaganego. U 50% chorych cierpiących na żyłaki powróżka i niepłodność terapia umożliwia zaniechanie procedury rozrodu wspomaganego i wiążące się z tym pozyskania nasienia bezpośrednio z jądra [30].

Najlepsza metoda leczenia żyłaków powróżka nasiennego powinna cechować się jak najwyższą częstością posiadania potomstwa przez pacjenta, poprawą opisanych wyżej parametrów nasienia, przy możliwie najrzadszym występowaniu powikłań. W praktyce klinicznej metoda taka powinna umożliwiać zamknięcie wszystkich naczyń żylnych drenujących splot wiciowaty z zachowaniem drożności tętnic i naczyń limfatycznych.

Porównanie dostępnych metod chirurgicznych przeprowadzono w badaniu [31]. Najkrótszy czas zabiegu zanotowano podczas stosowania metody laparoskopowej. Wczesne powikłania pooperacyjne oraz czas powrotu do pracy były porównywalne we wszystkich ocenianych metodach. Najniższą częstość

nawrotów i najrzadsze tworzenie się wodniaka zapewniała metoda mikrochirurgiczna. Wszystkie metody skutkowały znaczącą poprawą jakości nasienia, wyróżniała się tutaj również metoda mikrochirurgiczna.

Metoda mikrochirurgiczna staje się w niektórych ośrodkach rutynową metodą leczenia dolegliwości. Brane są tutaj pod uwagę stosunkowo korzystna poprawa jakości nasienia, poziomu testosteronu, także u chorych z nawrotami żylaków powrózka. Ryzyko powikłań jest minimalne [32].

Skleroterapię i zabiegi chirurgiczne z laparotomią porównało badanie [33]. Czas zabiegu był znacznie krótszy podczas skleroterapii. Także ruchomość plemników poprawiała się szybciej w tej metodzie. Częstość powikłań i nawrotów była porównywalna. Skleroterapia została także porównana z zabiegiem laparoskopowym w badaniu [34]. Do porównania użyto około 6% subklinicznych przypadków żylaków powrózka. Jedynie 62% pacjentów przeszło leczenie tej dolegliwości z powodu niepłodności. Uzyskano nieistotne statystycznie różnice w częstości nawrotów. Pozostałe powikłania pooperacyjne, jak i koszty zabiegu były wyraźnie niższe w przypadku skleroterapii.

Embolizacja żylaków powrózka nasiennego przy użyciu klejów cyjanoakrylowych została opisana przez Sze i wsp. [35] jako metoda leczenia nawrotów choroby po uprzednim leczeniu chirurgicznym. W wenogramie pacjenci prezentowali krążenie oboczne do ISV, a także liczne rozgałęzienia naczyń, co wydaje się tłumaczyć wystąpienie nawrotów żylaków powrózka. Wykorzystano dostęp ramienny bądź udowy. Pacjentów wypisano odpowiednio 1 i 4 godziny po zakończeniu procedury, w zależności od wybranego dostępu naczyniowego. Uzyskano 100% skuteczność leczenia, obserwując pacjentów do 6 miesięcy po zabiegu. U części pacjentów oprócz kleju zastosowano jednocześnie spirale. Jedynym obserwowanym powikłaniem było zakrzepowe zapalenie splotu wiciowatego u pacjenta, który 6 dni po zabiegu dźwigał ciężkie bagaże.

Opisano także skuteczność techniczną innych metod endowaskularnych w leczeniu nawrotów żylaka powrózka po okluzji chirurgicznej. Puneekar i wsp. [36] użyli spiral do zamknięcia ISV u 24 pacjentów, uzyskując 85% skuteczności zabiegu. Nie sprecyzowano jednak, jakie metody chirurgiczne były uprzednio stosowane. Feneley i wsp. [37] u 27 pacjentów zastosowali metodę skleroterapii, z 78% powodzeniem. Przypadki nawrotów były powikłaniem chirurgicznego tzw. wysokiego zamknięcia ISV.

5. Wnioski

Bazując na przytoczonych badaniach klinicznych, możemy wysunąć następujące spostrzeżenia: (i) Leczenie żyłaków powrózka może istotnie zwiększyć spermatogenezę i przywrócić dostateczną produkcję plemników. (ii) Metody embolizacyjne umożliwiają szybszą poprawę parametrów nasienia w porównaniu z metodami chirurgicznymi. (iii) Częstość występowania powikłań w przypadku embolizacji jest obecnie niższa niż w przypadku metod chirurgicznych (z wyłączeniem zabiegu mikrochirurgicznego).

Literatura

1. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A et al. *Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair*, Eur Urol. 2011 Oct;60(4):796-808;
2. Wishahi MM *Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects*, J Urol, 1991; 145(4): 780-784;
3. Alhberg NE, Bartley O, Chidekel N *Right and left gonadal veins. An anatomical and statistical study*, Acta Radiol Diagn (Stockh), 1966; 4(6): 593-601;
4. Bigot JM Le Blanche AF, Carette S et al. *Anastomoses between spermatic and visceral veins: a retrospective study of 500 consecutive patients*, Abdom Imaging, 1997; 22(2): 226-232;
5. Hargreave TB *Varicocele – A clinical enigma*, Br. J. Urol. 1993; 72: 401-408;
6. Bomalski MD, Mills JL, Argueso LR et al. *Iliac vein compression syndrome: an unusual cause of varicocele*, J. Vasc. Surg. 1993; 18: 1064-1068;
7. Mali WP, Oei HY, Arndt JW et. al. *Hemodynamics of varicocele: Part II. Correlation among the results of renocaval pressure measurements, varicocele scintigraphy and phlebography*, J.Urol. 1986, 135: 489-493;
8. Carl P, Stark L *Venous pressure in idiopathic varicocele*, Eur. Urol. 1993; 24: 214-220;
9. Gat Y, Gornish M, Chakraborty J et al. *Azoospermia and maturation arrest: malfunction of valves in erect poster of humans leads to hypoxia in sperm production sit.*, Andrologia, 2010; 42: 389-394;
10. Stachwski T, Skrzywanek P, Kwias et al. *Własne doświadczenia w leczeniu powrózka nasiennego sposobem obliteracji żyły nasiennej u 54 chorych*. Urol. Pol. 1997; 50 181-190.
11. Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI *Effect of varicocele grade and age on seminal parameters*, Urol Int. 2010; 85(2) 194-9. Epub 2010 Apr 29;
12. Evers JH, Collins J, Clarke J *Surgery or embolisation for varicoceles in subfertile men*, Cochrane Database Syst Rev. 2008 Jul 16;(3) CD000479. Review. Update in Cochrane Database Syst Rev. 2009; (1) CD000479;
13. Valentino M, Bertolotto M, Derchi L et al. *Role of contrast enhanced ultrasound in acute scrotal diseases*, EurRadiol. 2011 Sep; 21(9) 1831-40;
14. Eskew LA, Watson NE, Wolfman N et al. *Ultrasonographic diagnosis of varicoceles*, Fertil Steril. 1993 Oct; 60(4) 693-7;

15. Gat Y, Gornish M, Chakraborty J et al. *Azoospermia and maturation arrest malfunction of valves in erect poster of humans leads to hypoxia in sperm production site*, *Andrologia* 2010; 42 389-394;
16. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A et al. *Varicocele and male factor infertility treatment a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair*, *Eur Urol* 2011 Oct;60(4)796-808;
17. Wunsch R, Efinger K *The interventional therapy of varicocele amongst children, adolescents and young men*, *Eur J Radiol* 2005; 53 46-56;
18. Zieliński J, Leńko J (red.). *Urologia*, Tom 3. *Urologia operacyjna*. PZWL, Warszawa 1993; 319-320;
19. Waldemar Kostewicz (red.). *Chirurgia laparoskopowa*, PZWL, Warszawa 2002; 403-404;
20. Cayan S, Kadioglu TC, Tefekli A et al. *Comparison of results and complications of high ligation surgery and microsurgical high inguinal varicocelectomy in the treatment of varicocele*, *Urology* 2000 May; 55(5) 750-4;
21. Esposito C, Monguzzi GL, Gonzalez-Sabin MA et al. *Laparoscopic treatment of pediatric varicocele a multicenter study of the italian society of video surgery in infancy*, *J Urol* 2000 Jun; 163(6) 1944-6;
22. Cayan S, Acar D, Ulger S et al. *Adolescent varicocele repair long-term results and comparison of surgical techniques according to optical magnification use in 100 cases at a single university hospital*, *J Urol*. 2005 Nov;174(5) 2003-6; discussion 2006-7;
23. Matthews GJ, Matthews ED, Goldstein M *Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia*, *Fertil Steril*. 1998 Jul; 70(1) 71-5;
24. Reiner E, Pollak JS, Henderson KJ et al *Initial experience with 3% sodium tetracycl sulfate foam and fibered coils for management of adolescent varicocele*, *J Vasc Interv Radiol*. 2008; 19 207-210;
25. Reyes BL, Trerotola SO, Venbrux AC et al. *Percutaneous embolotherapy of adolescent varicocele results and long-term follow-up*, *J Vasc Interv Radiol*.1994 Jan-Feb; 5(1) 131-4;
26. Ficarra V, Cerruto M, Liguori G et al. *Treatment of Varicocele in Subfertile Men The Cochrane Review- A Contrary Opinion*, *Euro Urol* 2006; 49 258-263;
27. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A et al. *Varicocele and male factor infertility treatment a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair*, *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4) 796-808;
28. Nabi G, Asterlings S, Greene DR et al. *Percutaneous embolization of varicoceles outcomes and correlation of semen improvement with pregnancy*, *Urology*. 2004 Feb; 63(2) 359-63;
29. Gat Y, Bachar GN, Everaert K et al. *Induction of spermatogenesis in azoospermic men after internal spermatic vein embolization for the treatment of varicocele* *Hum Reprod*. 2005 Apr; 20(4) 1013-7;
30. Flacke S, Schuster M, Kovacs A et al. *Embolization of varicoceles pretreatment sperm motility predicts later pregnancy in partners of infertile men*, *Radiology*. 2008; 248 540-549;
31. S. Al-Said, A. Al-Naimi, A. Al-Ansari et al. *Varicocelectomy for male infertility a comparative study of open, laparoscopic and microsurgical approaches*, *J Urol* 2008; 180 266-270;

32. Grober ED, Chan PT, Zini A et al. *Microsurgical treatment of persistent or recurrent varicocele*, Fertil Steril. 2004 Sep; 82(3) 718-22;
33. A. Zucchi, L. Mearini, E. Mearini et al. *Treatment of varicocele randomized prospective study on open surgery versus Tauber antegrade sclerotherapy*, J Androl 2005; 26 328-332;
34. A. Zucchi, L. Mearini, E. Mearini et al. *Treatment of varicocele randomized prospective study on open surgery versus Tauber antegrade sclerotherapy*, J Androl 2005; 26 328-332;
35. Sze DY, Kao JS, Frisoli JK et al. *Persistent and recurrent postsurgical varicoceles venographic anatomy and treatment with N-butyl cyanoacrylate embolization*, J Vasc Interv Radiol. 2008 Apr; 19(4) 539-45;
36. Puneekar SV, Prem AR, Richorkar et al. *Post-surgical recurrent varicocele efficacy of internal spermatic venography and steel-coil embolization*, Br J Urol. 1996; 77 124-128;
37. Feneley MR, Pal MK, Nockler IB et al. *Retrograde embolization and causes of failure in the primary treatment of varicocele*, Br J Urol. 1997; 80 642-646.

Żylaki powrózka nasiennego – diagnostyka oraz przegląd współczesnych metod leczenia, ze szczególnym uwzględnieniem zabiegów wewnątrz-naczyniowych

Streszczenie

Jako jedną z możliwych przyczyn niepłodności męskiej uważa się w występowaniu żylaków powrózka nasiennego. Częstość występowania schorzenia szacuje się na 10% (5-17%), zaś w grupie mężczyzn cierpiących na niepłodność odsetek ten wzrasta do 30%. Przypuszczalna etiologia niepłodności na tle żylaków powrózka nasiennego jest rozpatrywana w kontekście parametrów hemodynamicznych upośledzonego drenażu żylnego, zmiany miejscowych stosunków anatomicznych, patologii tkanek miękkich okolicy krocza, zaburzeń hormonalnych – miejscowych, jak i osiowych. Poszukuje się metod leczenia żylaków powrózka nasiennego, które gwarantowałyby możliwie maksymalną skuteczność przy jak najmniejszym odsetku nawrotów, a także innych powikłań. Niniejsza praca zawiera skrótowy opis jednostki chorobowej, przeglądowe przedstawienie współcześnie stosowanych metod leczenia żylaków powrózka nasiennego, a także dyskusję na temat zalet i wad poszczególnych metod leczenia. Przedstawienie problemu klinicznego poprzedzono opisem anatomicznym i patofizjologicznym, z uwzględnieniem zmienności oraz poszczególnych mechanizmów, będących przyczyną bądź następstwem występowania żylaków powrózka nasiennego. Ma to na celu podkreślenie specyfiki leczenia, a także przedstawienie parametrów, będących przedmiotem szerokiej polemiki w literaturze.

Słowa kluczowe: żylaki powrózka nasiennego, embolizacja, niepłodność męska

Male varicocele – diagnostic standards and review of actual treatment methods, including endovascular procedures

Abstract

Male varicocele is considered to be one of male infertility risk factor. Occurrence of this vascular abnormality is estimated to be 10% (5-17%) in general population and up to 30% in subpopulation of men with clinically confirmed infertility. The male varicocele as the etiologic factor of infertility is suspected in the context of hemodynamic impairment in the spermatic vein, defects of local anatomy, soft tissue of scrotum area pathology, hormonal disorders – both local and axial. The desired treatment method for varicocele should provide the most possible technical success chance along with minimal recurrence risks and other complications possibility. This article contains a brief description of the disease, the systematic review of currently accepted treatment methods of male varicocele, as well as the discussion about positives and negatives of these treatment options. The clinical problem analysis is preceded by anatomical and pathological description, including the anatomical variability and the particular mechanisms underlying the varicocele formation and occurring in course of its development. The aim of this review is to describe the current approaches to the treatment and to present the actual discussion area in that matter.

Keywords male varicocele, embolization, male infertility

INDEKS AUTORÓW

Amarowicz Magdalena	31	Osiak Magdalena	7
Binko Paweł	49	Pająk Natalia	7
Choroszyńska Dorota	7	Pawlik Paulina	49
Czerwonka Arkadiusz	73	Roman Tomasz	39, 89
Frant Maciej	73	Schab Katarzyna	31
Gałaszkiwicz Katarzyna	61	Szablowska Karina	19
Gawroński Maciej	19	Szajerska Anna	49
Horbaczewska Joanna	49	Szymczyk Agnieszka	39, 89
Iwaniuk Adam	49	Urbańczuk Marcin	31
Karpiarz Milena	49	Wandtke Tomasz	19
Kotuła Lidia	31	Wielikdzień Joanna	19
Macheta Arkadiusz	39, 89	Woś Aleksandra	61
Markowicz Justyna	39, 89	Zdzisińska Barbara	73
Mazur-Stążka Elżbieta	49	Zwierz Agata	61
Mulawka Dominika	31	Żurek Aleksandra	73
Mulawka Paulina	31		