

Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

2

Redakcja

Grzegorz Winiarski

Mirosław Szala

Kamil Maciąg

Politechnika Lubelska

Lublin 2013

Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

2

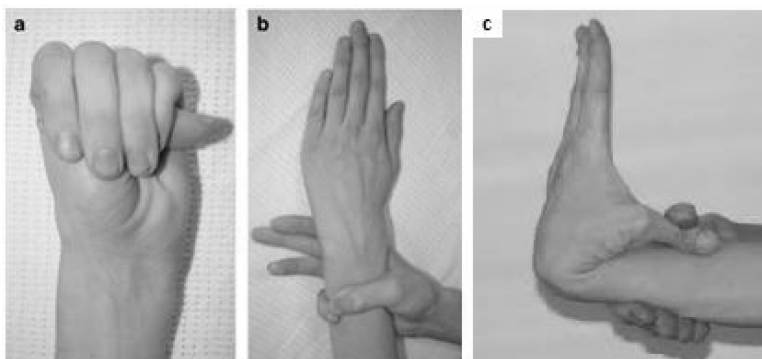
Politechnika Lubelska 60 lat



Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

2



redakcja

Grzegorz Winiarski

Mirosław Szala

Kamil Maciąg



Politechnika Lubelska
Lublin 2013

RECENZENCI

dr hab. n. med. Halina Antosz, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
prof. dr hab. n. med. Ewa Dmoch-Gajzlerska, Warszawski Uniwersytet Medyczny
dr hab. n. farm. Beata Jakubowska-Solarska, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
dr hab. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
dr hab. Roman Paduch, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
prof. dr hab. Anna Skorupska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ks. prof. dr hab. Leon Szot, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2013

ISBN 978-83-63569-64-8

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

ARKADIUSZ CZERWONKA, ALEKSANDRA ŻUREK PAULINA JANIEC, JAN SOBSTYL, KAROLINA GASIŃSKA, JOLANTA KARWAT	
REARANŻACJA GENU ALK – ZNACZENIE I DIAGNOSTYKA W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUC (NDRP).....	6
SYLWIA KIELBASA, LIDIA KOTUŁA, EWA KOŁODZIEJ, DOROTA KOŁODZIEJ, JOLANTA KARWAT, PAULINA GIL–KULIK, ALICJA NIEDOJADŁO, KAROLINA GIL	
ROLA I REGULACJE PRAWNE ZWIĄZANE Z FORTYFIKACJĄ FOLIANAMI.....	15
JUSTYNA KINGA STĘPKOWSKA, KATARZYNA MAŁGORZATA STĘPKOWSKA	
STOSOWANIE SUBSTANCJI PSYCHOTROPOWYCH: SPOŁECZNO – KULTUROWE I PSYCHO – MEDYCZNE UWARUNKOWANIA.....	24
ANNA GRAD, KATARZYNA KAŁAKUCKA, PAULINA GIL–KULIK	
ŚWIADOMOŚĆ ANKIETOWANYCH NA TEMAT DIAGNOSTYKI PRENATALNEJ ORAZ CZYNNIKÓW WPLYWAJĄCYCH NA ROZWIJAJĄCY SIĘ PŁÓD.....	33
KAROLINA OKŁA, ANNA WAWRUSZAK, MONIKA ORZEŁOWSKA, ARTUR ANISIEWICZ	
THE ROLE OF MICRORNAs IN DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND THERAPY OF MALIGNANT GLIOMAS.....	42
JUSTYNA KINGA STĘPKOWSKA	
ZABURZENIA GOSPODARKI WĘGLOWODANOWEJ U CIĘŻARNYCH – ETIOPATOGENEZA I LECZENIE	58
NATALIA FRĄCZEK, ILONA DUDEK, PAULINA GIL–KULIK	
ZACHOWANIA ZDROWOTNE STUDENTÓW LUBELSKICH UCZELNI.....	66
GRZEGORZ ADAMCZUK, MAGDALENA CZOCHRA, PAULINA CISZEK	
ZAGROŻENIE ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA OOCYSTAMI PIERWOTNIAKA CRYPTOSPORIDIUM PARVUM	73
ALEKSANDRA ŻUREK, MACIEJ FRANT, ARKADIUSZ CZERWONKA, MATEUSZ SZYMAŃSKI	
ZESPÓŁ MARFANA – PRZYCZYNY, OBJAWY, DIAGNOSTYKA	83
NATALIA PAJĄK, MAGDALENA OSIĄK, KATARZYNA WOJCIECHOWSKA DOROTA CHOROSZYŃSKA	
ZWIĄZEK POMIĘDZY RECEPTORAMI TLR A PROCESEM NOWOTWORZENIA W HEMATOLOGII.....	94
INDEKS AUTORÓW	104

Arkadiusz Czerwonka¹, Aleksandra Żurek²
Paulina Janiec³, Jan Sobstyl⁴, Karolina Gasińska⁵, Jolanta Karwat

Rearanżacja genu ALK – znaczenie i diagnostyka w niedrobnokomórkowym raku płuc (NDRP)

1. Rak płuca – epidemiologia

Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie, oraz najczęstszym pod względem umieralności z powodu choroby nowotworowej. W ciągu roku z powodu tego właśnie nowotworu umiera na świecie ponad 1,3 miliona osób, a 5 lat od chwili rozpoznania przeżywa mniej niż 15% chorych. Pięć razy częściej chorują mężczyźni (5:1).

Od lat 90 XX wieku zauważa się spadek zachorowalności i umieralności wśród mężczyzn, natomiast wzrost tych współczynników w populacji kobiet. Zachorowalność na raka płuca rośnie z wiekiem, największa zapadalność występuje w grupie wiekowej 65–80 latków. Klasyfikacja kliniczna, opierająca się na różnym przebiegu choroby, odpowiedzi na chemioterapię, możliwości leczenia operacyjnego, różnicuje nowotwór na raka drobnokomórkowego (DRP) oraz raka niedrobnokomórkowego (NDRP). Leczeniem z wyboru w przypadku raka drobnokomórkowego jest chemioterapia, natomiast raka niedrobnokomórkowego – operacja połączona z chemioterapią uzupełniającą (adiuwantową) mającą na celu usunięcie ewentualnych przerzutów oraz chemioterapią indukcyjną (neoadiuwantową), której celem jest zmniejszenie masy pierwotnego guza jeszcze przed jego usunięciem. Chemioterapia w przypadku NDRP jest mniej skuteczna niż w przypadku DRP, ale równie toksyczna. Działania niepożądane występujące w czasie chemioterapii, stanowią poważny problem kliniczny zarówno dla pacjenta jaki i zespołu leczącego. Nadzieją na zmniejszenie działań niepożądanych chemioterapii jest wprowadzenie terapii celowanej. Włączenie pacjenta to terapii celowanej wymaga identyfikacji specyficznych mutacji występujących u chorych z rakiem

¹arkadiuszczerwonka87@interia.pl Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii

²zurekaleksandra@wp.pl SKN Biotechnologów „Mikron” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii

³Email: janiecpaulina02@gmail.com Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej

⁴Email: jan.sobstyl@gmail.com Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej

⁵Email: karolina.gasinska@onet.eu Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej

płuca. Odkryta w 2007 roku przez Japońskich naukowców, rearanżacja genu ALK występuje u około 3–13% pacjentów z NDRP we Wschodniej Azji. Przekładając te doniesienia na populację światową rearanżacja ta występuje u około 70 000 pacjentów ze zdiagnozowanym NDRP każdego roku na świecie.

1.1. Budowa, funkcje białka ALK

Gen ALK odpowiedzialny jest za kodowanie receptora z aktywnością kinazy tyrozynowej ALK, zwanego inaczej cząsteczką CD 246, jest glikoproteiną o masie 220 kDa, należący do rodziny receptorów dla insuliny. Locus genu to 2p23.2. Gen składa się z 29 egzonów. U ludzi w warunkach fizjologicznych po urodzeniu ulega ekspresji jedynie w niektórych komórkach nerwowych w mózgu, jądrach ale nie w limfocytach [1, 2]. Samo białko składa się z 1620 aminokwasów i jego masę ocenia się na 177 kDa. W procesie potranslacyjnej modyfikacji ulega glikozylacji i produkowana jest dojrzała glikoproteina o masie 200 kDa. Produkt białkowy genu w warunkach fizjologicznych odpowiada za rozwój układu nerwowego poprzez wpływ na różnicowanie się poszczególnych grup komórek [3]. Sekwencje aminokwasowe białka ALK wskazują, że jest to receptor kinazy tyrozynowej. Sam receptor zawiera domenę przezbłonową oraz domenę zewnątrzkomórkową. ALK wykazuje największe podobieństwo sekwencji do LTK (kinazy tyrozynowej leukocytów oraz domenę kinazy cytoplazmatycznej.

1.2. Patofizjologia

Gen ALK należy do protoonkogenów. Właściwości protoonkogenne sam gen ALK może nabyć poprzez trzy procesy patologiczne: tworząc gen fuzyjny z dowolnym innym genem, poprzez powstanie dodatkowych kopii genu oraz mutacji DNA genu. Udowodniono rolę CD 246 w powstawaniu anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek (ALCLs). Zmutowana forma genu powstaje przez translokacje chromosomów 2 i 5. Taki związek występuje w około 60% anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek (ALCLs). Najczęściej występuje (ok. 84% przypadków) translokacja t(2;5)(p23;q35), prowadząca do fuzji genu nukleofozminy na chromosomie 5 z genem ALK na chromosomie 2. Podczas takiej translokacji tworzy się gen fuzyjny składający się z genu ALK (kinazy chłoniaka anaplastycznego) i genu nukleofozminy (NPM). Część 3' genu ALK, pochodzącego z chromosomu 2 łączy się z częścią 5' genu NPM z chromosomu 5, który koduje domenę katalityczną. Produkt genu fuzyjnego NPM–ALK jest onkogenny. Mogą też powstać inne geny fuzyjne. U mniejszej części pacjentów z ALCLs, część 3' ALK jest połączona z końcem 5' sekwencji TPM3 genu, kodującego tropomiozynę. Translokacja chromosomów z udziałem ALK i NPM powoduje wystąpienie w cytoplazmie białka fuzyjnego, który występuje w postaci dimeru. Domena kinazy NPM–ALK jest konstytutywnie aktywna (cały czas) i bierze udział w transformacji komórkowej. Jeśli występuje mutacja

to choroba różni się częściowo obrazem histologicznym oraz immunofenotypem.

Gen ALK może łączyć się także z genem EML4 (echinoderm microtubule-associated protein – like 4). Nowo powstały fuzyjny onkogen EML4 – ALK determinuje niekontrolowaną produkcję białka ALK – kinazy tyrozynowej, w konsekwencji powodując szybki wzrost nowotworu. Fuzyjny onkogen EML4 – ALK jest odpowiedzialny za około 3–5% niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) [4]. Zdecydowana większość przypadków takiego nowotworu to histologiczny typ gruczolakorak [5, 6]. Rak płuc, związany z mutacją w genie ALK można wystąpić u pacjentów w każdym wieku, ale średni wiek pacjentów jest nieco niższy niż w ogólnej populacji pacjentów z rakiem płuca. Nowotwory ALK płuc są częstsze u osób niepalących lub tzw. „former light smokers”, ale znaczna liczba pacjentów z mutacją jest obecna u obecnych lub byłych palaczy papierosów [7].

Translokacje ALK znajdują się w różnych nowotworach. W domenie zewnątrzkomórkowej, ludzkie i mysie sekwencje ALK w 88% wykazują identyczność sekwencji aminokwasów. W rzadkich przypadkach, część 3' genu ALK może się połączyć z innym genami, takimi jak TFG, ATIC, CLTC1, TPM4, MSN, ALO17, MYH9 [8, 9]. Ponadto scharakteryzowano wiele innych mutacji genetycznych dotyczących genu ALK1 i innych genów z chromosomów 1, 2, 3, 17, 19, 22 i X, z których najczęstsze to translokacja t(1;2)(q25;p23) dotycząca genu TPM3 na chromosomie 1 (ok. 13% przypadków) czy inwersja Inv(2)(p23q35), w której zaangażowany jest gen ATIC (ok. 1% przypadków). Powyższe aberracje chromosomowe prowadzą do ekspresji i konstytutywnej aktywności onkogennej kinazy tyrozynowej w komórkach chłoniaka. Należy jednak zaznaczyć, że nie stwierdzono istotnych różnic w przebiegu choroby w zależności od rodzaju stwierdzanej aberracji. Udowodniono też rolę zmutowanego genu ALK w innych typach nowotworów np. w rozlanym chłoniaku z dużych komórek B (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; brak wtedy ekspresji CD30) czy w nowotworach niehematologicznych, np. mięsaku prążkowanokomórkowym, w nowotworze jelita grubego, raka piersi oraz przełyku [10, 11, 12, 13].

2. Diagnostyka i leczenie

Kluczowym etapem w procesie diagnostyki jest identyfikacja miejsca i rodzaju rearanżacji genu ALK, ponieważ na tej podstawie pacjenci są kwalifikowani do odpowiedniego typu leczenia chemioterapeutycznego – klasycznej cytotoksycznej chemioterapii lub zastosowania nowoczesnej terapii celowanej. Przez ostatnie 15 lat od identyfikacji rearanżacji genu ALK wykorzystywano wiele technik diagnostycznych różniących się czułością i specyficznością. Standardowym testem stosowanym do wykrywania fuzyjnego genu w próbkach nowotworów jest fluorescencyjna hybrydyzacji in situ (FISH),

ale także inne techniki, takie jak badanie immunohistochemiczne (IHC) i PCR z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) mogą być również stosowane do wykrywania mutacji w diagnostyce nowotworów płuc.

2.1. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oznacza się największą czułością detekcji rearanżacji genu ALK. Metoda FISH, uważana obecnie jest za „złoty standard” w diagnostyce pacjentów z NDRP. Dużą zaletą techniki FISH jest możliwość wykorzystania komercyjnych zestawów używanych do diagnostyki rearanżacji ALK u pacjentów ALCLs (Anaplastic large-cell lymphoma) i u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. W diagnostyce wykorzystuje się technikę FISH z użyciem tzw. „break-apart probe” (Vysis LSI ALK (2p23) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; Abbott Molecular). Break-apart FISH polega na flankowaniu (znakowaniu) końców fragmentów 3' i 5' genu ALK na kolor zielony oraz czerwony. W normalnych warunkach (komórce bez mutacji) sondy znajdują się blisko siebie i emitowany jest pośredni sygnał czyli żółty sygnał. W przypadku rearanżacji ALK dochodzi do rozdzielenia fragmentów końcowych genu (translokacji końca 5') i w związku z tym przyłączone do produktu zmutowanego genu sondy oddalają się od siebie, emitują zielony i czerwony sygnał. Próbę uważa się za pozytywną, jeśli dochodzi do fluorescencji czerwonej lub czerwonej i zielonej w więcej niż 15% komórek nowotworowych w preparacie histopatologicznym. W każdym innym przypadku próbę uznaje się za negatywną. Mimo wielu zalet technika FISH posiada pewne ograniczenia. Po pierwsze sygnał charakterystyczny dla obecności genu fuzyjnego może być bardzo subtelny, na skutek utraty i inwersji jedynie małej ilości materiału genetycznego na chromosomie 2. Po drugie sonda przyłączana do końca 5' sporadycznie może nie ulegać hybrydyzacji, prawdopodobnie z powodu utraty locus. Po trzecie znacznym utrudnieniem jest uzyskanie odpowiedniego jakościowo materiału do analizy, jeśli materiał tkankowy został utrwalony za pomocą formaliny (FFPE).

Spośród aktualnie używanych metod w diagnostyce rearanżacji genu ALK, jedynie technika FISH została zatwierdzona przez FDA (Food and Drug Administration) jako kryterium do kwalifikacji leczenia celowanego, z użyciem crizotinibu.

2.2. Badanie IHC – immunohistochemiczne

Badanie immunohistochemiczne jest kolejną techniką diagnostyczną używaną w celu wykrycia rearanżacji genu ALK u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Badanie to polega na użyciu znakowanych fluorochromem przeciwciał, specyficznych w stosunku do

poszukiwanego antygeny (białkowe produkty genu po rearanżacji). Nowe skryningowe metody IHC pozwalają na ocenę bardzo małej ilości materiału.

O ile w anaplastycznym chłoniaku wielkokomórkowym stężenie produktów białkowych rearanżacji ALK jest wysokie i nie stwarza problemów diagnostycznych, o tyle w przypadku ALK pozytywnego gruczolakoraka płuc niskie stężenia tych produktów wymagają użycia nowoczesnych, wysoce czułych przeciwciał. Poprawę czułości testów umożliwiło zastosowanie techniki TSA (Tyramide Signal Amplification). Umożliwia ona zastosowanie mniej swoistych przeciwciał przez wzmocnienie fluorescencji. Metody te wykorzystywane są do badania materiałów pobranych w czasie operacji oraz tkanek uzyskanych z przezoskrzelowej aspiracyjnej biopsji igłowej (transbronchial needle aspiration TBNA). Badanie IHC jest metodą łatwiejszą oraz mniej ekspansywną, która może być wykonywana jako badanie preskryningowe przed zastosowaniem metody FISH. Badanie IHC wykonuje się na skrawkach o grubości 4µm, które poddaje się deparafinizacji, a następnie inkubuje z przeciwciałami monoklonalnymi ALK. Do oceny wyników stosuje się punktację IHC (IHC score) według następujących kryteriów: 3+ intensywne, ziarniste zabarwienie cytoplazmy, 2+ średnie, jednolite zabarwienie cytoplazmy, 1+ słabe zabarwienie cytoplazmy w $\geq 10\%$ komórek, oraz 0 brak zabarwienia. Mimo ciągłego udoskonalania metody IHC, to technika FISH pozostaje ciągle złotym standardem w diagnostyce rearanżacji genu ALK raka gruczołowego płuc. Metoda ta umożliwia identyfikację ekspresji białka ALK często niewykrywalnej za pomocą konwencjonalnej metody IHC.

2.3. Reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR)

PCR z odwrotną transkrypcją jest jedną z metod wykorzystywanych do identyfikacji rearanżacji genu ALK. Jest to szybka metoda diagnostyczna, a jej kolejną zaletą jest bardzo wysoka czułość identyfikacji mutacji, obecność jakichkolwiek produktów amplifikacji powoduje detekcję rearanżacji genu ALK. Jednak, aby skutecznie zastosować tę technikę należy spełnić kilka warunków. Po pierwsze do reakcji RT-PCR musi być wprowadzone wiele primerów. Po drugie większość materiałów biopsyjnych pobieranych od pacjentów jest przechowywanych i utrwalonych w formalinie FFPE (formalin-fixed paraffin embedded), co wiąże się z dużym stopniem degradacji mRNA wyekstrahowanego z tkanki, a to uniemożliwia uzyskanie odpowiedniego cDNA w reakcji z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy. Mogą się z tym wiązać fałszywie ujemne wyniki reakcji RT-PCR. Najlepszą metodą do uzyskania materiałów do przeprowadzenia reakcji jest użycie tkanek świeżych lub mrożonych. Po trzecie istnieją doniesienia o uzyskaniu fałszywie dodatnich wynikach na tkankach uzyskanych zarówno ze zmiany nowotworowej jak i zdrowych organów, w przypadku nieobecności rearanżacji genu ALK.

2.4. Terapia celowana jako metoda leczenia u pacjentów z mutacją genu ALK

W terapii celowanej raka płuca u pacjentów ze stwierdzoną mutacją w genie ALK stosowany jest inhibitor białka czyli Xalkori (crizotinib). Preparat ten został wyprodukowany przez firmę Pfizer a potem zatwierdzony przez FDA (Federację Leków Stanów Zjednoczonych) do leczenia raka płuc późnym stadium zaawansowania choroby dnia 26 sierpnia 2011 roku [14]. Wczesne wyniki wstępnej fazy próbnej z 82 chorych na raka płuc wywołanego ALK wykazało całkowitą odpowiedź 57%, wskaźnik kontroli choroby po 8 tygodniach 87% i przeżycia bez progresji po 6 miesiącach 72%.

3. Podsumowanie

Rak płuca jest nowotworem o bardzo poważnym rokowaniu. Ogólne rokowanie 5-letniego przeżycia wynosi jedynie 15%. W wielu przypadkach przebieg choroby nowotworowej bardzo długo jest bezobjawowy i dlatego tak trudno postawić rozpoznanie we wczesnym etapie choroby. Z tego powodu tak ważne jest zwracanie uwagi na systematyczną kontrolę u osób szczególnie predysponowanych i z grup ryzyka. Objawy raka płuc mogą wynikać z miejscowego rozrostu guza, przerzutów w obrębie klatki piersiowej a także manifestować się pod postacią zespołów paraneoplastycznych. Do niepokojących objawów należą: krwioplucie, spadek masy ciała, duszność oraz kaszel. Nową nadzieją pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc jest zastosowanie terapii celowanej, ukierunkowanej indywidualnie do pacjenta, skierowanej przeciwko konkretnym onkogenom. Aby móc zastosować u pacjenta terapię celowaną należy znaleźć mutację w procesie diagnostycznym.

Nie ma ustalonej standardowej metody diagnostyki. Jednak pacjent, zgłaszający się z rozpoznaniem histologicznym typem gruczolakoraka płuc, powinien mieć oznaczony w pierwszej kolejności genotyp w kierunku obecności mutacji EGFR, jako że występuje ona częściej niż rearanżacja genu ALK, bo w około 24% wśród pacjentów z NDRP [15,16,17]. W przypadku nieobecności mutacji EGFR, materiał pobrany od pacjenta powinien być przebadany w celu wykazania rearanżacji ALK metodą IHC. W wypadku, gdy wynik będzie pozytywny, obecność mutacji ALK powinna zostać potwierdzona metodą FISH uważaną za złoty standard. Jedynie użycie metody z „the Vysis Break Apart FISH Probe Kit” zostało uznane przez FDA jak metoda zalecana do identyfikacji rearanżacji ALK. Dzięki tej metodzie można wykryć wszystkie warianty rearanżacji ALK. Mimo, wielu zalet techniki FISH posiada ona pewne ograniczenia takie jak: cena, posiadanie odpowiedniego sprzętu i umiejętności do jego obsługi, a także ograniczonej powtarzalności tej metody. RT-PCR może być użyta gdy ilość materiału jest naprawdę ograniczona, jednakże nie jest ona w stanie wykryć jeszcze nie znanych dotąd non-EML4 wariantów rearanżacji. Dodatkowym minusem jest konieczność wysokiej jakości próbki tkanki do

przeprowadzenia reakcji RT-PCR, gdyż mRNA łatwo ulega destrukcji w nieodpowiednio przechowywanych materiałach. IHC natomiast ma stosunkowo niski koszt, a specyficzność i czułość badania jest bardzo wysoka dzięki zastosowaniu nowoczesnych przeciwciał. Tak przeprowadzona diagnostyka jest podstawą do zakwalifikowania pacjenta do leczenia z zastosowaniem inhibitora kinazy tyrozynowej ALK. Inhibitory kinazy tyrozynowej są obecnie największą nadzieją medycyny w walce z rakiem płuc. Jak do tej pory nie ma doniesień o wyleczeniu pacjenta z NDRP z występującymi przerzutami, jednakże w dalszym ciągu trwają długo terminowe terapie. Około 30% pacjentów nie odpowiada na leczenie, natomiast u pozostałych w większości dochodzi do rozwoju oporności w przeciągu jednego roku od rozpoczęcia terapii. W około 25–30% przypadków dochodzi do rozwoju wtórnych mutacji, z równoczesnym pojawieniem się onkogenów do tej pory niewystępujących takich jak EGFR oraz KRAS. Niezwykle ważna jest ścisła współpraca patomorfologa i onkologa. W celu zapobiegania szerzenia się oporności na crizotinib w badaniach klinicznych poszukiwane i opracowywane są nowe, bardziej specyficzne inhibitory ALK.

Podziękowania

Autorzy pracy pragną złożyć serdeczne podziękowania dla lek. Lidii Kotuła (Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie).

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (Apr 1994). "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma". *Science* 263 (5151): 1281–4. doi:10.1126/science.8122112
2. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ALK.html>
3. Entrez Gene: ALK anaplastic lymphoma kinase (Ki-1)
4. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci.* 2008;99:2349–55
5. Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19893–7
6. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* 2009;361:947–57.

7. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4–ALK transforming gene in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68:4971–6.
8. Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers CS, Mohan S, Pandita A, Tang J, Modrusan Z (September 2009). "Exon array profiling detects EML4–ALK fusion in breast, colorectal, and non–small cell lung cancers". *Mol. Cancer Res.* 7 (9): 1466–76. doi:10.1158/1541–7786.MCR–08–0522
9. Yaakup H, Sagap I, Fadilah SA (October 2008). "Primary oesophageal Ki (CD30)–positive ALK+ anaplastic large cell lymphoma of T–cell phenotype". *Singapore Med J* 49 (10): e289–92.
10. Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, et al. A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 2004;127:294–9.
11. Mologni L (July 2012). "Inhibitors of the anaplastic lymphoma kinase". *Expert Opin Investig Drugs* 21 (7): 985–94. doi:10.1517/13543784.2012.690031
12. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. i wsp. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Wyd. 4. WHO PRESS 2008; 300–301, 312–319
13. Savage K.J., Harris N.L., Vose J.M. i wsp. ALK–anaplastic large cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T–cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T–cell Lymphoma Project. *Blood* 2008; 111: 5496–5504.
14. Cui JJ, Tran–Dubé M, Shen H, Nambu M, Kung PP, Pairish M, Jia L, Meng J, Funk L, Botrous I, McTigue M, Grodsky N, Ryan K, Padriqué E, Alton G, Timofeevski S, Yamazaki S, Li Q, Zou H, Christensen J, Mroczkowski B, Bender S, Kania RS, Edwards MP (September 2011). "Structure based drug design of crizotinib (PF–02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal–epithelial transition factor (c–MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK)". *J. Med. Chem.* 54 (18): 6342–63. doi:10.1021/jm2007613
15. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, et al. Inhibition of drug–resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11011–6.
16. Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:352–66.
17. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2(3):e73

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Rearanżacja genu ALK – znaczenie i diagnostyka w niedrobnokomórkowym raku płuc (NDRP)

Streszczenie

U części pacjentów z rozpoznaniem niedrobnokomórkowych rakiem płuc (non-small-cell lung carcinoma NSCL) dochodzi do fuzji genów ALK (anaplastic lymphoma kinase) i EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like4). Nowo powstały fuzyjny onkogen EML4-ALK determinuje niekontrolowaną produkcję białka ALK – kinazy tyrozynowej, w konsekwencji powodując szybki wzrost nowotworu. Nowoczesne techniki genetyki molekularnej oparte na metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) umożliwiają identyfikację rearanżacji genu ALK i kwalifikację chorego do zastosowania terapii celowanej. Praca przedstawia zależności pomiędzy obecnością zmutowanego genu ALK, a możliwością zastosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych w terapii NSCL.

Słowa Kluczowe: gen ALK, FISH, RT-PCR, IHC, terapia celowana

ALK gene rearrangements – importance and diagnosis in non-small cell lung carcinoma (NSCL)

Abstract

A group of patients with non-small cell lung cancer have the fusion of ALK gene and EML4 gene. New fusion oncogene EML4-ALK determines the uncontrolled production of ALK protein – tyrosine kinase, resulting in the fast growth of the tumor. Modern molecular genetic techniques based on fluorescence in situ hybridization (FISH) allows to identify ALK gene rearrangement and qualify patient to use the targeted therapy. This article present relationship between the presence of the ALK gene mutation and the possibility of using the tyrosine kinase inhibitors in NSCL therapy.

Keywords: ALK gene, FISH, RT-PCR, IHC, targeted therapy

Autorzy pracy:

Paulina Janiec, janiecpaulina02@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym

Jan Sobstyl, jan.sobstyl@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

Karolina Gasińska, karolina.gasinska@onet.eu, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Klinicznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

Jolanta Karwat, zgkumlub@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Nutrigenomiki przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

Rola i regulacje prawne związane z fortyfikacją folianami

1. Foliany

Kwas foliowy (kwas pteroiloglutaminowy), zwany także witaminą B9, odgrywa kluczową rolę w podziałach komórkowych. Kwas foliowy nie jest wytwarzany przez ludzki organizm dlatego musi być przyjmowany wraz z pokarmem lub w postaci suplementów żywnościowych. Najwięcej folianów jest w warzywach zielonolistnych (szpinak, kapusta, sałata, brokuły), drożdżach piwnych, soku z pomarańczy, fasoli, cykorii, groszku, szparagach, rzemie, soczewicy, ryżu, soi, kielkach pszenicy. Foliany są wrażliwe na gotowanie. Chroni je natomiast dodatek kwasu askorbinowego, czyli witaminy C.

Kwas foliowy zawarty w pokarmach jest wchłaniany głównie w górnej części jelita cienkiego i dwunastnicy. Dochodzi tam do odszczepienia od jego cząsteczki reszt kwasu glutaminowego, aż do formy monoglutaminowej oraz utworzeniu na powierzchni komórek rąbka szczoteczkowego jelita kwasu metylotetrahydrofoliowego, który ulega wchłonięciu. Część kwasu foliowego jest zmagazynowana w wątrobie i ten zapas wystarcza na 3–4 miesiące. Natomiast z wątroby jest wydalany do żółci i ponownie wchłaniany w jelicie cienkim. Nadmiar kwasu foliowego jest wydalany z moczem. Nawet dieta bogata w tę witaminę, w połączeniu z suplementacją w standardowej dawce, nie spowoduje przekroczenia jej bezpiecznego poziomu. Nie jest znana toksyczna dawka kwasu foliowego. Natomiast niewskazane jest (poza zaleceniem lekarza w konkretnym przypadku) przekraczanie 1,5 mg syntetycznego kwasu foliowego. Zbyt duże dawki kwasu foliowego mogą powodować utratę apetytu, nudności i wzdęcia. U niektórych osób mogą tworzyć się szkodliwe kryształy folacyny w moczu oraz mogą wystąpić alergiczne odczyny skórne. Kwas foliowy może przysłonić ujawnienie się objawów niedokrwistości złośliwej.

2. Pozytywna rola folianów dla organizmu ludzkiego

Kwas foliowy jest niezbędny do zapewnienia prawidłowej reakcji syntezy nukleotydów. Niedobór czy całkowity brak tej witaminy bezpośrednio prowadzi do zahamowania syntezy kwasów nukleinowych, czego wyrazem jest nieprawidłowe tworzenie i dojrzewanie wszystkich komórek w ustroju,

¹ zgkumlub@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

a zwłaszcza krwinek czerwonych – niedokrwistość megaloblastyczna z niedoboru kwasu foliowego. Ponadto, niedobór kwasu foliowego prowadzi do zaburzenia reakcji transmetylacji, w wyniku której powstaje metionina, oraz do zaburzenia kluczowej reakcji katabolizmu kwasów tłuszczowych, tj. przemiany metymalonylo-CoA w bursztynylo-CoA. Brak metioniny i zaburzenia w katabolizmie kwasów tłuszczowych prowadzą do poważnych uszkodzeń układu nerwowego np. wady cewy nerwowej. Niedobór kwasu foliowego ujawnia się stosunkowo szybko, bo już w 15 tygodniu we krwi pojawiają się makrocyty, czyli powiększone krwinki czerwone.

Kwas foliowy ma także wpływ na płodność, zarówno kobiet jak i mężczyzn. W przypadku kobiet odgrywa on rolę w dojrzewaniu oocytów, zagnieżdżaniu się zygoty oraz wykształcaniu łożyska. U mężczyzn natomiast kwas foliowy wpływa na proces spermatogenezy czyli produkcji plemników. W wielu jednak przypadkach dochodzi do wad rozwojowych dziecka jeszcze zanim przyszła mama uświadomi sobie, że jest w ciąży. Kwas foliowy jest konieczny przy syntezie DNA, co ma znaczenie przy szybkim wzroście komórek tworzącym nowe tkanki i organy we wczesnym okresie ciąży. Najczęściej wymienianą wadą płodu spowodowaną niedoborem kwasu foliowego jest wada cewki nerwowej prowadząca do upośledzenia rozwoju kręgosłupa, mózgu i czaszki a zwłaszcza do rozszczepu kręgosłupa czy też bezmózgowia. Suplementację kwasem foliowym uważa się za skuteczną także w zapobieganiu rozdwojeniu podniebienia, wadom serca, kończyn oraz przewodów moczowych. Uważa się także, że przyjmowanie tej witaminy pomaga zapobiec zaburzeniom wzrostu płodu i zmniejsza ryzyko urodzenia dziecka z niedowagą. Kwas foliowy wpływa również na układ nerwowy. Wiadomo iż podawanie kwasu foliowego stymuluje receptory serotoniny oraz noradrenaliny w mózgu. Dzięki temu działa jako antydepresant. Kwas foliowy stosowany jako środek leczący depresje byłby doskonałym specyfikiem dla kobiet w ciąży, które nie mogą przyjmować innych antydepresantów. Takie podejście terapeutyczne wymaga jeszcze weryfikacji. Foliany działają także protekcyjnie w kierunku nowotworów np. raka jelita grubego [1, 2]. Oprócz znanego wpływu folianów na układ nerwowy, suplementacja związkiem okazuje się być także ważnym czynnikiem zapobiegawczym w rozwoju wad serca– noworodki, których matki przyjmowały kwas foliowy w ciąży miały mniej wad wrodzonych serca. Według Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, kwas foliowy należy przyjmować do końca drugiego trymestru ciąży, mimo że po upływie pierwszego trymestru nie zapobiega on już oczywiście wadom cewy nerwowej. Poprawia jednak wchłanianie żelaza i zmniejsza ryzyko nadciśnienia indukowanego ciążą. Przyjmowanie kwasu foliowego w dawce od 400 do 800 µg dziennie zalecane jest kobietom w pierwszych tygodniach ciąży [3]. Szacuje się, że jego przyjmowanie w ciąży redukuje ryzyko defektów w rozwoju cewy nerwowej zarodka o 50% [4].

W wielu krajach zaleca się kobietom w wieku 15–45 lat przyjmowanie 400 µg kwasu foliowego jako standardowy element codziennej diety. Nie jest to szczególnie kłopotliwe gdyż, ze względu na regulacje prawne (np. w USA) lub w trosce o wysoką jakość produktów wielu producentów żywności dodaje kwasu foliowego

do swoich wyrobów. Można go znaleźć w wielu płatkach zbożowych, makaronach, pieczywie i wielu innych.

3. Sposoby zwiększenia spożycia folianów w żywności

Działająca na terenie Unii Europejskiej fundacja Folate FuncHealth [5], zajmująca się sposobami zwiększenia zawartości naturalnych folianów w żywności, zaleca:

- zwiększyć stężenie folianów przez zastosowanie szczepów drożdży bogatych w foliany, używanych w procesie produkcyjnym artykułów spożywczych fermentowanych, takich jak chleb, piwo, wino,
- właściwy dobór szczepów bakterii kwasu mlekowego w wytwarzaniu fermentowanych produktów mlecznych, takich jak sery, jogurty,
- użycie bogatych w foliany odmian owoców i warzyw oraz stosowanie metod technologii produkcji minimalizujących straty folianów, przy produkcji żywności przetworzonej np. koncentraty zup, soki owocowe,
- zwiększyć zawartość folianów w mące stosując metody mielenia całego ziarna wraz z otrębami, które są bogatym źródłem naturalnych folianów [6].

4. Fortyfikacja

Ze względu na stwierdzenie w badaniach populacyjnych, w tym także w Polsce [7], powszechnie występujących niedoborów folianów w diecie, dyskusji poddawana jest kwestia wzbogacania żywności kwasem foliowym.

Zgodnie z definicją opracowaną przez ekspertów FAO/WHO wzbogacanie żywności (fortyfikacja) to proces polegający na dodawanie kilku składników odżywczych do wybranych produktów bez względu na to, czy występują one w tym produkcie naturalnie czy nie. Najczęściej stosowana jest fortyfikacja żywności składnikami mineralnymi, błonnikiem pokarmowym, NNKT. Celem takich działań jest korygowanie lub zapobieganie niedoborom danego składnika w całych populacjach lub grupach populacyjnych. Aby fortyfikacja była efektywna i przynosiła oczekiwane efekty obejmować powinna produkty łatwo dostępne, spożywane często i w stałych ilościach.

Jednym z pierwszych przykładów wzbogacania żywności było jodowanie soli stołowej (1922 r.). Stosunkowo wcześniej wprowadzono też w krajach północnej półkuli wzbogacanie mieszanek dla dzieci oraz mleka i przetworów mlecznych witaminą D jako profilaktyka krzywicy (mniejsza naturalna synteza witaminy D związana z mniejszym nasłonecznieniem). W latach 30. XX wieku w Danii w związku ze stwierdzeniem powszechnych niedoborów witaminy A, wprowadzono wzbogacanie tą witaminą margaryn. Wiązało się to z szybkim rozwojem produkcji margaryn na skalę przemysłową i związanym z tym spadkiem spożycia masła (źródła naturalnej witaminy A). Lata 40. XX wieku to wzbogacanie mąki w witaminy z grupy B i żelazo (Stany Zjednoczone, Wielka Brytania).

Od momentu odkrycia związku pomiędzy niedoborem kwasu foliowego i wadami cewy nerwowej, wiele rządów państw i organizacji na świecie wydało zalecenia dotyczące suplementacji kwasu foliowego, szczególnie wśród młodych kobiet w wieku rozrodczym. W wielu krajach uznane za celowe zostało wzbogacanie mąki pszennej w kwas foliowy [8]. Obecnie w ponad 60 krajach fortyfikacja folianami jest obowiązkowa. Większość krajów w Ameryce oraz na Środkowym–Wschodzie posiada specjalne programy fortyfikacji kwasem foliowym [9].

Celem zwiększenia spożycia tej witaminy oraz pośrednio redukcji powszechnie występującej wady cewy nerwowej rząd amerykański w 1998 r. wprowadził obowiązkowe wzbogacanie mąki, makaronów i innych produktów zbożowych w kwas foliowy w ilości 140 µg/100 g produktu [10,11]. W Wielkiej Brytanii natomiast na każde 100 mąki dodawane jest 0,24 mg kwasu foliowego [12]. Obowiązkowa fortyfikacja kwasem foliowym wprowadzona została także w Kanadzie (1998 r.) oraz w Chile (2000 r.). W Zachodniej Australii procedura fortyfikacji została wdrożona już w 1995 r. ale jedynie na zasadzie dobrowolności.

5. Regulacje prawne dotyczące wzbogacania żywności

Na obszarze Unii Europejskiej wzbogacanie żywności regulowane jest rozporządzeniem nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji [13] oraz rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady 108/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r. zmieniającym powyższe rozporządzenie [14]. Regulacje te mają na celu harmonizację przepisów w poszczególnych Państwach Członkowskich Unii Europejskiej i dotyczą w szczególności wymagań, ograniczeń i warunków dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji.

W Polsce jak dotąd wzbogacanie żywności kwasem foliowym nie jest obowiązkowe, a jedynie dobrowolne. Regulacje prawne dotyczące zasad wzbogacania żywności zawarte są przede wszystkim w ustawie z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia [15]. Ustawa ta określa żywność bezpieczną m.in. jako taką, która spełnia warunki dotyczące stosowania substancji dodatkowych. Nie zawiera jednak konkretnych ilości substancji, które mogą być dodawane do żywności. Maksymalną ilość witamin i składników mineralnych, które mogą być dodawane do żywności określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności [16]. Zgodnie z tym rozporządzeniem ze względu na straty zachodzące podczas procesu przygotowywania żywności, dopuszczalna maksymalna ilość folianów w 100 g albo 100 ml, albo w jednej porcji, jeżeli jest ona mniejsza niż 100 g albo 100 ml

środka spożywczego, wynosi nie więcej niż 100 % zalecanego dziennego spożycia.

W powyższych aktach prawnych nie określono poziomów zalecanego dziennego spożycia, dlatego też kwestie wzbogacania żywności regulowane są dodatkowo w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego [17]. Rozporządzenie to zawiera m.in. wykaz substancji chemicznych należących do kategorii substancji dodawanych w szczególnych celach żywieniowych do środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego, które mogą być wykorzystane w produkcji tych środków spożywczych oraz warunki ich stosowania. Zgodnie z ustawową definicją środkiem spożywczym specjalnego przeznaczenia żywieniowego jest środek spożywczy, który ze względu na specjalny skład lub sposób przygotowania wyraźnie różni się od środków spożywczych powszechnie spożywanych i zgodnie z informacją zamieszczoną na opakowaniu jest wprowadzany do obrotu z przeznaczeniem do zaspokajania szczególnych potrzeb żywieniowych osób, których procesy trawienia i metabolizmu są zachwiane lub osób, które ze względu na specjalny stan fizjologiczny mogą odnieść szczególne korzyści z kontrolowanego spożycia określonych substancji zawartych w żywności – taki środek spożywczy może być określany jako „dietetyczny”, oraz zdrowych niemowląt i małych dzieci w wieku od roku do 3 lat.

Zarówno polskie jak i unijne regulacje prawne nie określają dopuszczalnych wahań pomiędzy wartością, która jest deklarowana na etykietach produktów, a rzeczywistą zawartością składników odżywczych dodawanych do żywności. Takie regulacje wymagałyby uwzględnienia różnorodności produktów, która wynika z charakteru surowców, strat witamin podczas procesów produkcji oraz przechowywania, a także różnej stabilności dodawanych składników odżywczych. Mając na uwadze wymienione aspekty producenci żywności, chcąc uniknąć sytuacji, w której wartość rzeczywista byłaby niższa od wartości deklarowanej, zwłaszcza pod koniec procesu przechowywania często stosują wysokie tzw. nadatki technologiczne. Dobra praktyka przyjmuje, aby wartość nadatków technologicznych nie przekraczała 20%, chyba że dodawany składnik jest stosunkowo labilny [18].

Szczegółowe wymagania w zakresie składu suplementów diety określone zostały w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety [19]. Zgodnie z załącznikiem nr 1 w procesie produkcji suplementów diety mogą być stosowane witaminy: A, D, E, K, tiamina, ryboflawina, niacyna, kwas pantotenowy, witamina B6, B12, kwas foliowy, biotyna, witamina C, a także składniki mineralne: wapń, magnez, żelazo, miedź, jod, cynk, mangan, sód, potas, selen, chrom, molibden, fluorki, chlorki, fosfor, bor i krzem. Rozporządzenie określa również dozwolone formy chemiczne wymienionych witamin i składników mineralnych (zał. nr 2) oraz zalecane dzienne spożycie

witamin i składników mineralnych (zał. nr 3). Ponadto, jak wynika z § 4 poziom witamin i składników mineralnych w zalecanej przez producenta dziennej porcji spożywanego suplementu diety powinien uwzględniać: górne bezpieczne poziomy witamin i składników mineralnych ustalone na podstawie naukowej oceny ryzyka, w oparciu o ogólnie akceptowane dane naukowe, uwzględniając zmienne stopnie wrażliwości różnych grup konsumentów, spożycie witamin i składników mineralnych wynikające z innych źródeł diety oraz zalecane spożycie witamin i składników mineralnych dla populacji.

6. Polska – działania na rzecz fortyfikacji folianami

W odpowiedzi na apel polskich naukowców, wyrażony w tzw. Stanowisku Grupy Ekspertów w sprawie wzbogacania mąki kwasem foliowym z 9 lutego 2005 roku, a także w ślad za doświadczeniami Amerykanów, firma Polskie Młyny SA zawarła porozumienie o współpracy z Polskim Towarzystwem Badań Nad Miazdżycą (PTBNM), którego głównym celem jest wspólne działanie na rzecz zdrowia publicznego. Konsekwencją porozumienia jest m.in. projekt dotyczący produkcji mąki fortyfikowanej kwasem foliowym.

Technika wzbogacania mąki w witaminy, w tym w kwas foliowy, jest stosunkowo prosta, trzeba tylko dysponować odpowiednią mieszaniną. Warto również podkreślić, że koszt takiej mieszaniny jest bardzo niski, gdyż wynosi niecały 1 grosz na 1 kg mąki.

Według badań Sicińskiej i Pelc [24] obecnie na polskim rynku obecnych jest ponad 160 produktów wzbogacanych kwasem foliowym. Wśród najliczniejszych są produkty zbożowe (mąki pszenne, płatki śniadaniowe) oraz soki, napoje i słodczyce. By jednak wzbogacanie produktów żywnościowych miało wymierny skutek, powinno być prowadzone na skalę ogólnokrajową.

7. Efektywność fortyfikacji folianami

Nauka potwierdza wysoką efektywność fortyfikacji kwasem foliowym. Zgodnie z badaniami Honein i in. wprowadzenie w Stanach Zjednoczonych obowiązku fortyfikacji kwasem foliowym przyczyniło się do redukcji występowania wad cewy nerwowej o około 19 % [20]. Podobne prawidłowości zauważyli Kim oraz Hertrampf, którzy zwracają uwagę na znaczny wzrost stężenia kwasu foliowego, a jednocześnie spadek stężenia homocysteiny we krwi w takich krajach jak Stany Zjednoczone, Kanada i Chile. W wymienionych krajach oraz w Zachodniej Australii zaobserwowano 15–20% spadek występowania WCN [22, 22]. W wymienionych krajach zaobserwowano nie tylko zmniejszenie przypadków narodzin dzieci z wadami cewy nerwowej ale również obniżenie liczby przypadków niedokrwiennego udaru mózgu u osób starszych [23].

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Duthie SJ, Narayanan S. et al (2004) Folate, DNA stability and colo–rectal neoplasia. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63; 571–578
2. Peters GJ, Hooijberg JH, et al (2005) Foliates and anti–folates in the treatment of cancer; role of folic acid supplementation on efficacy of folate and non–folate drugs. *Trends in Food Science and Technology* 16; 289–297
3. Dietary Supplement Fact Sheet: Folate; Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health – <http://ods.od.nih.gov/factsheets/folate/>
4. MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects; results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The Lancet* 338; 131–137
5. FolateFuncHealth and EU funded pan EU project, www.ifr.ac.uk/Folate
6. Jägerstad M, Piironen V. et al (2005) Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends in Food Science and Technology* 16: 298–306
7. Bieżanowska–Kopeć R, Leszczyńska T., Pisulewski P.M.: Oszacowanie zawartości folianów i innych witamin z grupy B w dietach młodych kobiet (20–25 lat) z województwa małopolskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 6 (55), 352–358
8. Kunachowicz H., Nadolna I., Wojtasik A., Przygoda B.: *Żywność wzbogacana a zdrowie*. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2004
9. FFI (Flour Fortification Initiative), <http://www.sph.emory.edu/wheatflour/globalmap.php>
10. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Steegers–Theunissen RP. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutr Res Rev*. 2001; 14(2): 267–294
11. Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist.*, 1996, 61, 8781–8797
12. Czeczot H. Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 2008, 62: 405–419
13. Rozporządzenie nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji (Dz.U. UE L 404 z 30.12.2006)
14. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 108/2008 z dnia 15 stycznia 2008r w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji (Dz. U. UE L 39 z 13.2.2008)
15. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. z 2006 r. Nr 171, poz. 1225 z późn. zm.)
16. Rozporządzenie Ministra Zdrowia dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności (Dz. U. z 2010 r. Nr 174, poz. 1184)

17. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego (Dz. U. z 1010 r. Nr 180, poz. 1214)
18. Gujska E., Majewska K.: Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. *Plant Food for Human Nutrition*, 2005, 60, 37–42
19. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety (Dz. U. z 2007 r. Nr 196, poz. 1425 z późn. zm.)
20. Honein M.A., Paulozzi L.J., Mathews T.J., Erickson J.D., Wong L.-Y.C.: Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*, 2001, 285, 2981–2986
21. Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr* 2004; 80(5): 1123–1128
22. Hertrampf E, Cortes F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of Folic Acid–Fortified Bread Improves Folate Status in Women of Reproductive Age in Chile. *J Nutr*. 2003; 133(10): 3166–3169
23. Kawka A. Przetwory zbożowe – aspekty wzbogacania wartości odżywczej. *Przegląd Zbożowo–Młynarski* 2009: 10
24. Sicińska E, Pelc A. Produkty wzbogacone jako potencjalne źródło kwasu foliowego w żywieniu człowieka. *Roczniki PZH* 2011, 62, 2

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Rola i regulacje prawne związane z fortyfikacją folianami

Streszczenie

Kwas foliowy należy do witamin z grupy B. Problem spożycia odpowiedniej ilości folianów należy do czołowych zagadnień żywienia, ponieważ jego niedobór to jedna z częstszych awitaminoz. Odpowiednia podaż ma znaczenie profilaktyczne w powstawaniu wad cewy nerwowej u płodów, chorób układu sercowo – naczyniowego, anemii, chorób nowotworowych oraz zaburzeń neurologicznych. W pracy przedstawiono zalecenia dotyczące fortyfikacji folianów oraz obowiązujące regulacje prawne.

Słowa Kluczowe: foliany, kwas foliowy, fortyfikacja, prawo

The role and legal regulations of folate fortification

Abstract

Folic acid belongs to B group vitamins. Problem of adequate intake of foliate is one of the most leading issues of nutrition, because its deficit is one of the more frequent avitaminosis. Adequate supply is important in prevention of neural tube defects in developing embryos, cardiovascular problems, anaemia, cancer and neurological disorders. This thesis presents recommendations for folate fortification and discusses legal regulations.

Key words: folate, folic acid, fortification, legal regulations

*Sylwia Kielbasa, Lidia Kotuła, Ewa Kołodziej, Dorota Kołodziej,
Jolanta Karwat, Paulina Gil–Kulik, Alicja Niedojadło, Karolina Gil*

Autorzy pracy:

mgr Sylwia Kielbasa

lek. Lidia Kotuła

mgr Ewa Kołodziej

mgr Dorota Kołodziej

mgr Jolanta Karwat

mgr Paulina Gil–Kulik

mgr Alicja Niedojadło

Karolina Gil

*zgkumlub@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło
Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu
Medycznego w Lublinie*

Stosowanie substancji psychotropowych: społeczno – kulturowe i psycho – medyczne uwarunkowania

1. Wprowadzenie

Substancje psychotropowe od wieków wykorzystywane były w medycynie ludowej. Ich zdolność wpływania na nastrój i postrzeganie oraz walory lecznicze coraz częściej próbuje się wykorzystać również we współczesnej medycynie.

Aktualnie, w dyskusji dotyczącej wpływu substancji psychotropowych na układ nerwowy, podnosi się coraz częściej wątek ich niewłaściwego stosowania oraz możliwy destrukcyjny wpływ na konsumenta. Podkreśla się szczególnie negatywne, psychiczne i społeczne konsekwencje stosowania substancji psychotropowych.

2. Substancje psychomodulujące – zarys historyczny

Substancje wpływające na nastrój oraz procesy myślowe znane były już w czasach neolitu. Surowce o właściwościach psychotropowych były bardzo cenione a nierzadko również przypisywano im „boskie” właściwości. Podstawową rolę używanych surowców psychoaktywnych, było ich wykorzystanie w celach kultowych oraz leczniczych [1,2,9]. Jak wskazują źródła, najwcześniej używaną substancją psychotropową był wywar z muchomora czerwonego *Amanita muscaria*, stosowany już około 10 000 lat temu [1]. Substancją psychotropową znaną od około 6 000 lat jest opium, którego głównym składnikiem warunkującym działanie psychotropowe jest morfina (opium to stężałe mleczko niedojrzałych makówek maku *Papaver somniferum*) [9]. Znano zarówno jego działanie psychotropowe i zdolność wprowadzania w stan euforii, jak również doskonały efekt analgezyjny [2,9].

Dużą popularnością, wynikającą między innymi z szerokiego zasięgu geograficznego występowania rośliny, cieszyły się preparaty z konopi siewnych *Cannabis sativa* [9]. W Chinach i Azji Środkowej otrzymywany z konopi haszysz znany był już 5000 lat temu, potem pojawił się w Indiach [9]. Konopie ceniono nie tylko jako źródło haszyszu i marihuany, lecz również ze względu na ich doskonałe właściwości budulcowe [9].

¹ e-mail: jstepkowska@wum.edu.pl, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Nauki o Zdrowiu, Zakład Dydaktyki Ginekologiczno-Położniczej

² e-mail: k.stepkowska@uksw.edu.pl, Instytut Politologii Wydział Nauk Historycznych i Społecznych, Instytut Psychologii Wydział Filozofii Chrześcijańskiej, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego

Bieluń dziedzierzawy *Datura stramonium*, który zawiera skopolaminę, atropinę i hyoscyaminę jest przykładem surowca halucynogennego, silnie trującego i nieprzyjemnego w działaniu [9]. Stosowany był wyłącznie w celach leczniczych i rytualnych [2].

Z psychotropowych substancji warto wymienić również ibogainę, otrzymywaną z korzenia afrykańskiej rośliny *Tabernanthe iboga*. W latach 60-tych ibogaina znalazła zastosowanie do produkcji płynów tonizujących [9]. Była też używana przez sportowców jako środek dopingujący [1]. Dziś zaś substancja ta przeżywa swój renesans, ze względu na możliwość wykorzystania jej w terapii uzależnień. W roku 1995 Lotsof opatentował w USA ibogainę jako uniwersalny środek przeciw uzależnieniom [3]. Niestety prowadzone nad ibogainą badania kliniczne wykazały jej potencjalne działanie neurotoksyczne [3].

Kokaina to alkaloid występujący w liściach krzewu koka *Erythroxylum coca*. Do dziś dnia wykorzystywane są doskonałe właściwości kokainy takie jak: usuwanie objawów zmęczenia czy głodu, jak również zwiększania wytrzymałości organizmu na złe warunki środowiska [9].

W roku 1884 Carl Koller, zastosował kokainę po raz pierwszy, jako środek znieczulający przy operacji oka, otwierając w ten sposób drogę nowoczesnemu znieczuleniu miejscowemu [9]. Niezależnie jednak od właściwości wykorzystywanych w lecznictwie, substancja ta rozpowszechniła się jako używka [2, 9].

Obok powyżej wymienionych nie sposób nie wspomnieć nikotynie. To alkaloid obecny w roślinach rodzaju *Nicotiana*. Rodzaj ten pochodzi z Ameryki i obejmuje około 50 gatunków, z których dwa: *N. tabacum* i *N. rustica* są używanym przez człowieka źródłem nikotyny [9].

3. Substancje psychoaktywne a uzależnienia

Przy omawianiu substancji psychoaktywnych, poza możliwością wykorzystania ich silnych właściwości w medycynie, nie sposób nie wspomnieć o wpływie substancji psychotropowych na procesy wykształcania się zależności. Zasadniczą rolę w procesie wykształcenia uzależnienia odgrywa mezolimbiczny układ dopaminowy, obejmujący obszar nakrywki brzusznej, w której znajdują się neurony dopaminowe dające projekcje do jądra półleżącego przegrody oraz do kory przedczołowej [9]. W nakrywce brzusznej są zlokalizowane receptory odpowiedzialne za nagradzające działanie morfiny [5, 9]. W jądrze półleżącym zlokalizowane jest działanie uzależniających środków stymulujących: kokainy i amfetaminy, które po podaniu obwodowym podnoszą poziom dopaminy [9, 10].

Mianem uzależnienia, określa się złożoną chorobę ośrodkowego układu nerwowego, która objawia się silnym dążeniem, do użycia substancji uzależniającej [9]. Choroba ta, dotyczy zaburzeń w funkcjonowaniu

dopaminowego układu nagrody w mózgu a jej cechą charakterystyczną jest dominacja zachowań poszukiwawczych nad wszelkimi innymi [9]. Specjaliści podkreślają fakt, iż uzależnienie od substancji psychoaktywnych jest chorobą przewlekłą, mogącą indukować inne nieprawidłowe mechanizmy natury psychiatrycznej.

W wytworzenie zależności zaangażowane są trzy najważniejsze układy funkcjonalne mózgu: układ pobudzenia, nagrody oraz poznawczy [9]. Układ nagrody odkryty został na początku lat 50-tych. Obecnie zaś dostępne są już szczegółowe mapy „obszarów przyjemności” mózgu [9]. Układ nagrody pobudzany jest za pośrednictwem szeregu neurotransmiterów takich jak aminy katecholowe a szczególnie dopamina i serotonina [9,12]. Działanie wielu substancji uzależniających, polega na zwiększonym uwalnianiu tych mediatorów lub działaniu agonistycznym w stosunku do nich [9].

Warto w tym miejscu wspomnieć, iż wśród neurobiologicznych mechanizmów wykształcenia się uzależnienia, podkreśla się trzy najważniejsze. Teorię dopaminową (bardzo silne działanie nagradzające jest efektem pobudzenia neuronów dopaminowych [12]), teorię przełącznika (sygnał dopaminowy zwraca uwagę na nieoczekiwane a znaczące wydarzenia [14]) oraz teorię zakładającą, że uzależnienie stanowi chorobę procesu uczenia asocjacyjnego zależnego od dopaminy [15].

4. Typy substancji uzależniających

WHO wyodrębniło kilka typów substancji uzależniających [9, 18]:

- I typ morfinowy

Naturalne alkaloidy, uzyskiwane z maku lekarskiego, półsyntetyczne oraz syntetyczne opioidy takie jak pentazocyna, heroina, petydyna [9]. Cechą charakterystyczną związków tej grupy jest zdolność wywoływania silnego uzależnienia psychicznego i fizycznego oraz szybki wzrost tolerancji, wyraźne objawy abstynencji oraz duża toksyczność [9,18].

- II typ barbituranowo-alkoholowy

Część leków psychotropowych takich jak benzodiazepiny, barbiturany, neuroleptyki, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, alkohol etylowy oraz inne alkohole. Substancje te wywołują wyraźną zależność psychiczną i nieco mniejszą fizyczną [9,18].

- III typ kokainowy

Wszystkie przetwory z liści krzewu *Erythroxylon coca*.

Wysoka toksyczność narządowa.

- IV typ kanabinoliny

Substancje pozyskiwane z konopi indyjskich lub gatunków pokrewnych. Możliwość uzależnienia fizycznego w przypadku tych związków jest wciąż dyskusyjna, objawy abstynencyjne są niewielkie [9,18].

- V typ amfetaminowy

Składa się na niego około 30 substancji (amfetamina, metamfetamina, MDMA, Extase, UFO, Mitsubishi) [19]. Cechy charakterystyczne to silna zależność psychiczna, słabo wyrażona fizyczna, szybki wzrost tolerancji [9,18].

- VI typ khat

Alkaloid uzyskiwany z krzewu *Khata edulis*.

- VII typ halucynogeny

W większości są to pochodne aryloalkiloaminowe [18].

- VIII typ – lotne rozpuszczalniki

Wysoko neurotoksyczne. Wysoka toksyczność dla narządów miękkich.

Chcimy zatrzymać się nad VII typem substancji uzależniających. Do grupy tej należą substancje wywołujące zaburzenia czynności psychicznych pod postacią halucynacji oraz mogące powodować zmiany nastroju i pobudzenie ruchowe [9,20]. Wśród efektów działania halucynogenów znajdują się również omamy wzrokowe [30].

Pod względem chemicznym, substancje halucynogenne można podzielić na pochodne indolowe oraz pochodne fenyletyloaminy [9, 21].

W Polsce najczęściej stosowanym surowcem halucynogennym są grzyby z rodzaju *Psilocybe*, a zwłaszcza łysiczka lancetowata *Psilocybe semilanceata* [9, 18]. Jest to mały grzyb, którego kapelusz o wysokości 1-2 cm jest lancetowato zaokrąglony lub stożkowaty, na szczycie kapelusza nierzadko występuje brodawka [9]. W czasie suszy łysiczka lancetowata jest gładka, płowóżółta, z zielonkawym odcieniem, natomiast w porze deszczowej staje się ciemnooliwkowata i śluzowata [9,18]. Grzyb jest twardy, o zbitej konsystencji, często wygięty. Z reguły jest silnie przyrośnięty z grzybnią do podłoża [18] Psychotropowe działanie tego grzyba przypisuje się zawartym w nim alkaloidom: psilocybinie, psilocynie, baeocystynie oraz norbaeocystynie [9,22].

Stosowanie halucynogenów zawartych w grzybach z rodzaju *Psilocybe* powoduje po upływie ok. 20 minut pojawienie się zaburzeń koncentracji, halucynacji wzrokowych i słuchowych, euforii, urojeń [9]. Mogą również pojawić się objawy nieprzyjemne jak lęk, agresja, zaburzenia mowy, do myśli samobójczych włącznie [9].

5. Psychospołeczne uwarunkowania korzystania z substancji psychomodulujących

Badania ankietowe prowadzone w szkołach dostarczają nowych informacji o rozpowszechnianiu się eksperymentalnego i okazjonalnego zażywania przez młodzież substancji psychoaktywnych [9,26]. Między 1992 a 2003 rokiem pięciokrotnie (z 5% do 24%) wzrosła liczba uczniów, którzy w ciągu roku poprzedzającego badanie eksperymentowali z nielegalnymi substancjami odurzającymi [9,26]. Dane te zasługują na wnikliwą uwagę również ze względu

na fakt, że substancje psychostymulujące przyjmują osoby coraz młodsze [8,9]. Młody człowiek, przyjmujący środki psychoaktywne jest w szczególności sposobem narażony na doznanie trwałych zaburzeń psychicznych, jako efektu zmian związanych z upośledzeniem dojrzewania centralnego układu nerwowego przez te substancje [9,24].

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na istniejącą modę na spożywanie grzybów o właściwościach halucynogennych. Grzyby halucynogenne występują w naturze w wielu częściach Europy, ale z dostępnych danych wynika, że większość grzybów wykorzystywanych ze względu na właściwości psychoaktywne hoduje się, a nie zbiera z ich naturalnego środowiska. Grzyby są sprzedawane zarówno w postaci świeżej, jak i suszonej oraz gotowe do uprawy domowej jako zarodniki, grzybnie lub zestawy do hodowli.

Badania szkolne ESPAD przeprowadzone w 2003 r. wskazują, że odsetek uczniów w wieku 15–16 lat, którzy uważają grzyby halucynogenne za „bardzo” lub „dość łatwe” do zdobycia, waha się od 4% do 28%. W Polsce odsetek ten przekracza 20% [27].

W roku 2004 Hibbel ze współpracownikami przeprowadził badania [28] z których wynika, że wskaźnik przynajmniej jednokrotnego zażycia grzybów halucynogennych jest wyższy wśród młodych ludzi uczestniczących w imprezach muzyki tanecznej (bywalców klubów) niż wśród ogólnej populacji. To dowodzi, jak bardzo na przestrzeni lat zmienił się profil jakości spędzania wolnego czasu. Coraz częściej młodzieżowe kluby rozrywkowe stają się centralnym miejscem spotkań dealerów oferujących również substancje halucynogenne [29].

6. Młodzież a substancje psychoaktywne [31,32]

Problem używania przez młodzież nielegalnych substancji psychoaktywnych, zyskiwał od początku lat dziewięćdziesiątych rangę priorytetową. Rosła liczba działań profilaktycznych skierowanych do młodzieży. Przez mass media przetoczyły się kampanie mające na celu zahamowanie wzrostu zjawiska. Wyniki omawianych badań świadczą jednak, że mimo tych działań stale mamy do czynienia ze zwiększaniem się zarówno podaży tych substancji, jak i popytu na nie [20].

Wyniki badań, przeprowadzonych przez CBOS w 2009 roku pokazują, że najczęściej substancje psychoaktywne przyjmuje młodzież z wielkich i małych miast (22% i 21%). Nielegalne środki są najmniej popularne na wsi, gdzie w ciągu ostatniego roku sięgnęło po nie 12% młodzieży. Co ważne z punktu widzenia edukacyjnego, zaangażowanie w praktyki religijne jest czynnikiem chroniącym przed eksperymentowaniem z narkotykami. W roku bieżącym wśród tych, którzy deklarują uczestniczenie w praktykach religijnych raz

w tygodniu, 10% używało środków psychoaktywnych, wobec 27% niebiorących udziału w praktykach religijnych.

Innym czynnikiem różnicującym prawdopodobieństwo sięgania po nielegalne substancje psychoaktywne jest emigracja zarobkowa rodziców. Kontakt z narkotykami deklaruje 28% uczniów, których oboje rodzice na stałe lub sezonowo przebywają poza granicami kraju, i 14% dzieci rodziców niepracujących w ciągu ostatnich dwunastu miesięcy za granicą.

7. Substancje halucynogenne w edukacji zdrowotnej młodzieży – zadania

Podstawowym zadaniem edukacyjnym jest prowadzenie działalności informacyjnej, głównie poprzez media oraz upowszechnianie informacji nt. działania placówek profilaktycznych, aktualizowanie informacji nt. programów profilaktycznych czy udział w kampaniach edukacyjnych.

Nie mniej ważnym zadaniem, jest wzrost zaangażowania społeczności lokalnych w działania profilaktyczne: uwzględnienie problematyki narkomanii w lokalnej i regionalnej strategii rozwiązywania problemów społecznych; organizowanie szkoleń dla samorządów lokalnych nt. tworzenia i realizacji strategii działań profilaktycznych; wspieranie lokalnych inicjatyw działań profilaktycznych

Działania edukacyjne i profilaktyczne winny być skierowane równolegle do wszystkich zainteresowanych tzn. bezpośrednio do młodzieży ale i tych, którzy współtworzą proces wychowania: rodziców, nauczycieli i wychowawców.

8. Podsumowanie

Substancje psychotropowe od wieków towarzyszyły człowiekowi. Po odkryciu ich psychoaktywnych właściwości zaczęto badać je również pod kątem leczniczym. Surowce naturalne, zawierające w swym składzie omawiane związki, wciąż jednak kryją w sobie wiele biochemicznych tajemnic. Niewątpliwie konieczne są zarówno dalsze badania nad możliwym działaniem substancji psychotropowych, jak i również edukacja zdrowotna młodzieży w kontekście konsekwencji ich stosowania.

Podziękowania

Pragniemy złożyć serdeczne podziękowania Księdzu Prof. dr hab. Leonowi Szotowi za życzliwe przyjęcie niniejszej pracy do recenzji.

Literatura:

1. Vetulani J. Psychoactive substances in the past and presence, *Pol.J.Pharmacol.*, 53(3), 2001.s. 201-214.
2. Vetulani J. Krótka historia narkotyków. *Wszechświat*, 1(3), 2001.s. 37-42.
3. Vetulani J. Pharmacotherapy of addiction, *Pol.J.Pharmacol.*, 53(5), 2001.s. 415-434.

4. Agurell S., Nilsson L. Biosynthesis of Psilocybin. *Acta Chem. Scand.*, 22, 1968. s. 1210-1218.
5. Bozarth M.A., Wise R.A. Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci.*, 28, 1981. s. 551-555.
6. Bals-Kubik R., Ableitner A., Herz A., Shippenberg T.S. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 264, 1993. s. 489-495.
7. Johnson S.W., North R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci.*, 12(2), 1992. s. 483-488.
8. Clement J.A., Yoder B.J., Kingston D.G.I. Natural Products as a Source of CSN-Active Agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 1(2), 2004. s. 183-208.
9. Stępkowska J.K., Stępkowska K.M., Naturalne związki psychoaktywne, ze szczególnym uwzględnieniem substancji halucynogennych grzybów z rodzaju *Psilocybe* w aspekcie biomedycznym i społecznym. Praca w druku.
10. Hurd J.L., Weiss F., Koob G.F., Anden N.E., Ungerstedt U. Cocaine reinforcement and extracellular dopamine overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.*, 498, 1989. s. 199-203.
11. Vetulani J. Uzależnienia lekowe: mechanizmy neurobiologiczne i podstawy farmakoterapii. *Alkoholizm i Narkomania*, 14(1), 2001. s. 13-58.
12. Vetulani J. Neurobiology of addiction. *Pol.J.Pharmacol.*, 53(4), 2001. s.303-317.
13. Schultz W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.*, 7(2), 1997. s. 191-197.
14. Redgrave P., Prescott T.J., Gurney K. Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error?. *Trends Neurosci.* 22, 1999. s. 146-151.
15. Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol.*, 12(1), 1998. s. 54-67.
16. Kuhar M.J., Dall S.E. CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends Neurosci.*, 22(7), 1999. s. 316-320.
17. Douglass J., McKinzie A.A., Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci.*, 15, 1995. s. 2471-2481.
18. Machoy-Mokrzyńska A. Ocena działania kardiotoksycznego naturalnych halucynogennych zawartych w grzybach z rodzaju *Psilocybe*. Szczecin: Pomorska Akademia Medyczna. 2002. s. 10-14.
19. Felgate H.E., Felgate P.D., James R.A., Sims D.N., Vozzo D.C. Recent paramethoxy-amphetamine deaths. *J. Anal. Toxicol.*, 22, 1998. s. 169-172.
20. Baker R.W., Chothia C., Pauling P. Molecular structures of hallucinogenic substances LSD, Psilocybin and 2,4,5-trimethoxyamphetamine. *Mol. Pharmacol.*, 9(1), 1973. s. 23-32.
21. Aghajanian G.K., Marek G.J. Serotonin and hallucinogens. *Neuropharmacology*, 21(2S), 1999. s. 17-23.
22. Suppran T., Frey U., Suppran R., Rösler M., Wanke K. Über dem Gebrauche psychoactiver Pilze als Rauschmittel. *Fortschr Neurol Psychiatr.*, 69(12), 2001. s. 597-602.
23. Badanie ankietowe zrealizowane przez CBOS. Centrum Badania Opinii Społecznej, Młodzież a substancje psychoaktywne, Komunikat z badań, Warszawa 2004.
24. Uziąłło J. Zaburzenia psychiczne u młodzieży przyjmującej środki psychoaktywne. *Biuletyn Informacyjny Problemy Narkomanii*, 3, 2005. s.11-17.

25. Kovar K.A. Chemistry and pharmacology of hallucinogens, entactogens and stimulants. *Pharmacopsychiatry*, 31(2), 1998.s. 69-72.
26. Badanie ankietowe zrealizowane przez CBOS. Centrum Badania Opinii Społecznej, Młodzież a substancje psychoaktywne, Komunikat z badań, Warszawa 2004.
27. Sprawozdanie Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii EMCDDA, Urząd Oficjalnych Publikacji Wspólnot Europejskich, Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii 2007.
28. Sprawozdanie Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii EMCDDA, Hallucinogenic mushrooms: an emerging trend case study, EMCDDA Thematic Papers, Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii 2006.
29. Maurupt R.C. Usages contemporains de plantes et champignons hallucinogènes, Observatoire français des drogues et des toxicomanies, SaintDenis, 2006.str.160-180.
30. Chruściel T. Epidemiologia uzależnień lekowych, Biuletyn Informacyjny Problemy Narkomanii (3). Koszalin; 2005.str.18-33.
31. Badanie ankietowe zrealizowane przez CBOS. Centrum Badania Opinii Społecznej, Młodzież a substancje psychoaktywne, Warszawa 2009.
32. Badanie ankietowe zrealizowane przez CBOS, Badania nad młodzieżą: Młodzież 2008, Warszawa 2008

Pracę recenzował: Książd Prof. dr hab. Leon Szot, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.

Stosowanie substancji psychotropowych: społeczno-kulturowe i psychomedyczne uwarunkowania

Streszczenie

Substancje wpływające na poprawę nastroju oraz procesy myślowe znane były już w czasach neolitu. Podstawową rolą używanych surowców psychoaktywnych było ich wykorzystanie w celach kulturowych oraz leczniczych. Obecnie coraz częściej obserwujemy stosowanie substancji psychoaktywnych przez młodzież. Bez znajomości psycho-medycznych i społecznych konsekwencji zażywania substancji psychotropowych młody człowiek, przyjmujący niektóre spośród środków psychoaktywnych, jest w szczególności narażony na doznanie trwałych zaburzeń psychicznych.

W niniejszym artykule omówione zostały: historyczne aspekty stosowania substancji modelujących, wpływ substancji psychoaktywnych na wykształcenie uzależnienia, typy substancji uzależniających oraz psycho-medyczne i społeczno-kulturowe uwarunkowania korzystania z substancji psychoaktywnych. Jednocześnie przedstawiono dane dotyczące stosowania substancji psychotropowych przez młodzież w kontekście potrzeby wprowadzenia edukacji zdrowotnej w tym zakresie.

Słowa kluczowe: narkotyki, halucynogeny, uzależnienie, grzyby

**The usage of psychotropic substances – their sociokultural and
psychomedical consequences**

Abstract

Psychoactive substances were known already in neolithic times. The primary role of usage psychoactive substances was their use for worship and healing. Now we are seeing increasing use of psychoactive substances by youth. Young people are particularly vulnerable to the adverse effects. The discussion about the psychosocial aspect of the problem with inappropriate use of psychotropic substances and their simultaneous influence on the socio-cultural attitudes of young people is very important nowadays.

Keywords: drugs, hallucinogens, addiction, mushrooms

Autorzy:

*Lek. med. mgr Justyna Kinga Stepkowska, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Wydział Nauki o Zdrowiu, Zakład Dydaktyki Ginekologiczno-Położniczej.
E-mail: jstepkowska@wum.edu.pl.*

*Mgr Katarzyna Małgorzata Stepkowska, Uniwersytet Kardynała Stefana
Wyszyńskiego, Wydział Filozofii Chrześcijańskiej, Instytut Psychologii.
E-mail: k.stepkowska@uksw.edu.pl*

Świadomość ankietowanych na temat diagnostyki prenatalnej oraz czynników wpływających na rozwijający się płód

Wstęp

Badania prenatalne są ważną dziedziną diagnostyki dla kobiet planujących ciążę lub ciężarnych, u których w wywiadzie rodzinnym występowały choroby genetyczne, mają powyżej 35 lat, poroniły, przedwcześnie urodziły lub mają dzieci z wadą genetyczną. Jest to grupa osób predysponująca do przeprowadzenia diagnostyki prenatalnej. Badania prenatalne dzieli się na dwie grupy: badania nieinwazyjne i inwazyjne. Do grupy nieinwazyjnej zaliczamy badanie markerów biochemicznych w krwi matki, badanie USG genetyczne. Wymieniona grupa badań jest całkowicie bezpieczna dla płodu. Polega ona na pobraniu próbki krwi od matki i wykonanie testów biochemicznych.

W surowicy krwi ocenia się takie parametry jak markery jajnikowe (estradiol), łożyskowe (β -HCG, PAPP-A) i płodowe (AFP). Określają one tylko prawdopodobieństwo wystąpienia choroby [1].

W grupie badań inwazyjnych istnieje ryzyko wystąpienia powikłań. Do których możemy zaliczyć krwawienia, przedwczesne odpłynięcie wód płodowych, infekcje wewnątrzmaciczne, nakłucie narządów płodu, uszkodzenie pępowiny lub łożyska oraz przedwczesny poród. Wiąże się to z metodą pobrania materiału do badań którym są komórki płodu. Techniki które umożliwiają otrzymanie komórek nienarodzonego jeszcze dziecka to amniopunkcja czyli pobranie płynu owodniowego, kordocenteza to jest pobranie krwi z naczyń pępowinowych oraz biopsja kosmówki. Zabiegi te wykonuje się pod kontrolą ultrasonografii. Amniopunkcja umożliwia stwierdzenie nieprawidłowości chromosomalnych takich jak zespół Turnera lub zespół Downa. Kordocenteza ma dużo większe ryzyko wystąpienia powikłań u płodu. Umożliwia ono ocenę

1 anna_grad@onet.pl Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej.

2 kkaalakucka@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej.

3 kkaalakucka@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej.

kariotypu, wad chromosomowych jak również wrodzone zakażenia wirusowe. Biopsja kosmówki umożliwia otrzymanie wyniku szybciej niż w przypadku amniopunkcji, ale wiąże się to z nieznacznym wzrostem ryzyka powikłań [2, 3].

Do czynników wpływających na rozwój płodu należą między innymi zakażenia wirusowe, pasożytnicze i cukrzyca ciężarnych. Ważnym aspektem, który powinna rozważyć kobieta planująca ciążę lub już spodziewająca się dziecka, są wirusy, które mogą nie tylko wpłynąć na samopoczucie i zdrowie matki, ale przede wszystkim mogą być szczególnie niebezpieczne dla młodego organizmu. Zakażenia wirusowe są udowodnioną przyczyną powstawania wad rozwojowych u płodu, zwiększają ryzyko poronienia, urodzenia martwego dziecka, opóźnionego wzrostu, czy występowania chorób przewlekłych u dziecka. Jednym z wirusów zagrażających ciąży jest wirus cytomegalii. U osób zdrowych przeważnie nie daje on żadnych objawów, jest jednak groźny dla dzieci. W przypadku, gdy matka jest nosicielką wirusa, istnieje ryzyko uaktywnienia się go w okresie ciąży lub gdy nie miała wcześniej styczności z CMV, może dojść do zakażenia. Jeśli stanie się to w I trymestrze istnieje duże prawdopodobieństwo poronienia lub urodzenia dziecka z wadą układu nerwowego. Zakażenie w II i III trymestrze najczęściej powoduje uszkodzenie mózgu płodu, przedwczesny poród lub zespół wrodzonej cytomegalii charakteryzujący się powiększeniem śledziony i wątroby, żółtaczką, wylewami podskórnymi, zapaleniem płuc. Ponadto w późniejszym rozwoju dziecka obserwuje się zaburzenia słuchu, widzenia czy opóźnienie umysłowe [4].

Kolejnym przykładem groźnego patogenu jest wirus różyczki. Najcięższe powikłania obserwuje się gdy zakażenie nastąpi w pierwszym trymestrze ciąży i dotyczą one właściwie wszystkich organów i narządów, a najczęściej słuchu i wzroku, układu sercowo–naczyniowego oraz zaburzenia neurologiczne, małogłowie czy upośledzenie umysłowe. Po 16 tygodniu ciąży zakażenie nie jest już takie groźne [8].

W przypadku wirusa HIV ryzyko zakażenia płodu w czasie ciąży przy odpowiednim leczeniu wynosi <2%, a największe ryzyko obserwuje się w czasie porodu. Ten patogen powoduje upośledzenie odporności dziecka, co w konsekwencji prowadzi do częstych infekcji, które z reguły mają cięższy przebieg w porównaniu z nieobciążonymi wirusem rówieśnikami. W ich wyniku pospolite choroby stają się niebezpieczne i mogą skończyć się śmiercią młodego organizmu [9].

Toksoplazmoza jest jednym z przykładów chorób pasożytniczych, które mają znamienny wpływ na rozwijające się płód. Wywoływana jest przez pierwotniaka *Toxoplasma gondii* przenoszonego głównie przez koty, ale możliwe są też przeniesienia przez ptaki czy muchy. Źródłem zarażenia dla człowieka są najczęściej kocie odchody, dlatego bardzo ważna jest właściwa higiena osobista, szczególnie jeśli posiada się w domu zwierzę i czyści się jego kuwetę. Na szczęście przypadki zarażenia są rzadkie, ale jeśli wystąpią diagnostyka jest żmudna, trudna i kosztowna. Najbardziej niebezpieczny dla płodu przypadek,

kiedy kobieta, wcześniej zdrowa, zarazi się pasożytem w trakcie trwania ciąży. Inwazja śródmaciczna w pierwszym trymestrze ciąży często skutkuje poronieniem. W przypadku zarażenia w czasie drugiego trymestru część dzieci rodzi się z wodogłowie, zwapnieniami w mózgu czy padaczką. Natomiast, gdy do inwazji patogenu dojdzie w trakcie trzeciego trymestru, dzieci zazwyczaj rodzą się zdrowe, ale po 3–12 miesiącach życia mogą pojawić się objawy ze strony centralnego układu nerwowego, a po kilku lub kilkunastu latach zmiany w gałce ocznej. W przypadku wczesnego wykrycia zarażenia w czasie ciąży możliwa jest skuteczna antybiotykoterapia [5, 7].

Cukrzycę ciężarnych definiuje się jako stan nietolerancji glukozy która pojawia się w czasie ciąży u wcześniej zdrowych kobiet. W przypadku nieleczonej lub nieprawidłowo leczonej cukrzycy ciężarnych rodzą się bardzo duże dzieci, powoduje to trudności położowe i potrzebę przeprowadzenia cesarskiego cięcia. Wzrasta również ryzyko urazu okołoporodowego, zespołu zaburzeń oddychania, a nawet zgonu przy porodzie. Groźnym skutkiem jest niedojrzałość płodu i wystąpienie wad wrodzonych, które mogą objąć układy: sercowo–naczyniowe (wady serca), kostny (rozszczep kręgosłupa), nerwowy, pokarmowy i moczowo–płciowy. Mogą również wystąpić wady genetyczne jak np. Zespół Downa. Ryzyko wystąpienia cukrzycy ciężarnych jest większe w przypadku urodzenia poprzedniego dziecka z masą powyżej 4kg, występowaniem w rodzinie cukrzycy typu 2 oraz gdy kobieta ciężarna ma nadciśnienie tętnicze lub nadwagę [6].

1. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest ukazanie stanu wiedzy na temat badań prenatalnych oraz czynników wpływających na płód podczas jego rozwoju wewnątrzmacicznego.

2. Materiał i metody

Badanie przeprowadzono metodą sondażu diagnostycznego

Badania przeprowadzono na grupie 100 losowo wybranych kobiet i mężczyzn. Największą grupą wiekową były osoby w przedziale 20–25 lat (62% kobiet i 66% mężczyzn – w tej grupie wiekowej). Wykształcenie prezentują się następująco: wykształcenie średnie/zawodowe ma 52% kobiet i 59% mężczyzn, wyższe 46% kobiet i 38% mężczyzn a tylko 2% kobiet i 3% mężczyzn podstawowe. Potomstwo posiada 32% badanych kobiet i 41% badanych mężczyzn.

3. Wyniki

W badaniach analizowano wiedzę respondentów na temat diagnostyki prenatalnej. Wyniki są następujące: 72% ankietowanych kobiet i 56% mężczyzn wie w jakim celu wykonują się badania prenatalne. Natomiast 20% kobiet i 22%

mężczyzn słyszało o badaniach prenatalnych ale niewiele wiedzą na ten temat. Brak jakiegokolwiek wiedzy deklarowało 8% kobiet i 25% mężczyzn.

44% kobiet i 44% mężczyzn uważa że istnieją jakieś szczególne wskazania do wykonania badań genetycznych. 26% ankietowanych kobiet i 31% mężczyzn zaznaczyło, że raczej istnieją jakieś wskazania do wykonania tych badań. Tylko nieliczni 4% kobiet i 9% mężczyzn odpowiedziało, że nie ma specjalnych wskazań do przeprowadzenia diagnostyki genetycznej.

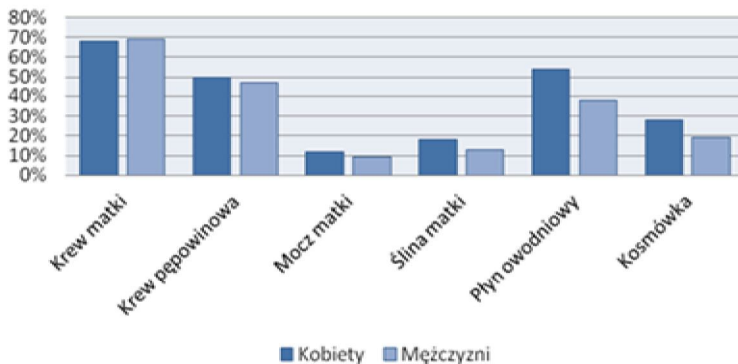
Respondenci wybrali najbardziej prawdopodobne ze wskazań do przeprowadzenia badań genetycznych. Najwięcej osób bo aż 92% kobiet i 69% mężczyzn za najbardziej prawdopodobną przyczynę uważa „wystąpienie choroby genetycznej w rodzinie matki lub ojca dziecka”. Drugą najczęściej zaznaczoną odpowiedzią (u kobiet 80% a 66% u mężczyzn) było „urodzenie dziecka z wadą genetyczną”. Odpowiedź „wiek ciężarnej >35 lat” wybrało 62% kobiet, 66% mężczyzn. Kolejną co do częstości wyboru była odpowiedź „poronienia”(40% kobiet, 44% mężczyzn). Natomiast najrzadziej wybieranymi odpowiedziami były „przedwczesne porody” (24% kobiet, 31% mężczyzn) i „niska masa urodzeniowa dziecka” (20% kobiet, 22% mężczyzn).

Zbadano wiedzę na temat materiału z jakiego mogą być wykonywane badania genetyczne zarówno inwazyjne jak i nieinwazyjne. Wyniki przedstawiono na wykresie 1. Ponad połowa przebadanych osób wybrało odpowiedź „krew matki” (68% kobiet, 69% mężczyzn). Odpowiedź „płyn owodniowy” zaznaczyło 54% u kobiet i 38% u mężczyzn, a odpowiedź „krew pępowinowa” 50% kobiet i 47% mężczyzn. Natomiast 28% badanych kobiet i 19% mężczyzn odpowiedziało „kosmówka” a 18% kobiet i 13% u mężczyzn „ślina matki”. Niewielki procent ankietowanych udzieliło odpowiedzi „mocz matki”(12% kobiet, 9% mężczyzn).

Zdecydowana większość respondentów (68% kobiet, 59% mężczyzn) nie wie czy diagnostyka prenatalna inwazyjna płodu może być przyczyną utraty ciąży, krwawienia, zakażenia lub przedwczesnego odpłynięcia wód ciążowych. Wiedzę tą deklaruje tylko 24% kobiet i 31% mężczyzn.

W kwestionariuszu zbadano również wiedzę na temat czynników wpływających na płód takich jak zakażenia wirusowe w trakcie ciąży oraz cukrzyca ciężarnych. Ponad połowa (78% kobiet i 66% mężczyzn) badanych posiada zwierzęta w domu. Prawie 98% kobiet i 62% mężczyzn zdają sobie sprawę że zwierzęta te mogą być niebezpieczne ze względu na choroby odzwierzęce dla kobiet w ciąży i/lub rozwijającego się płodu. Przykładem jest toksoplazmoza która jest chorobą odzwierzęcą. Zadano pytanie o niebezpieczeństwo związane z zakażeniem toksoplazmozą. Najczęstszymi odpowiedziami były „może wywoływać wady płodu” (68% kobiety, 63% mężczyźni) oraz „może prowadzić do obumarcia płodu” (32% kobiety, 22% mężczyźni). Nieliczna grupa osób odpowiedziało że „jest niebezpieczna dla matki dziecka”(16% kobiety, 16% mężczyźni) a bardzo niewiele (2% kobiet, 6% mężczyzn) że „nie jest niebezpieczna”.

Z jakiego materiału może być wykonywane badanie genetyczne?



Wykres 1. Z jakiego materiału może być wykonane badanie genetyczne? [badania własne]

Większość respondentów (84% kobiet, 69% mężczyzn) wie że zachorowanie w trakcie ciąży na różyczkę ma wpływ na jej przebieg. Tylko 4% kobiet i 3% mężczyzn uważa że zachorowanie na różyczkę nie wpływa na płód. Aczkolwiek 12% kobiet i 28% mężczyzn osób nie ma wiedzy na ten temat. Ponad połowa badanych osób (72% kobiet i 84% mężczyzn) wie, że kobieta która zaszła w ciążę a wcześniej nie chorowała na różyczkę nie może się już zaszczepić. 14% kobiet i 6% mężczyzn odpowiedziało że powinna się zaszczepić jak najszybciej. Natomiast 4% kobiet i 3% mężczyzn zaznaczyło odpowiedź „może się zaszczepić”.

Sprawdzono również wiedzę odnośnie wpływu wirusa HIV na płód. Odpowiedź „może powodować wady genetyczne u płodu np. Zespół Downa” zaznaczyło 76% kobiet i 13% mężczyzn. Część respondentów (20% kobiet, 66% mężczyzn) udzieliła odpowiedzi, że „może spowodować osłabioną odporność dziecka po urodzeniu”, część (10% kobiet, 6% mężczyzn) że „może spowodować urodzenie się dziecka zdeformowanego” a 6% kobiet i 9% mężczyzn uważa że „nie ma negatywnego wpływu na dziecko”.

Niekorzystny wpływ na rozwój płodu ma również wirus cytomegalii. Badając wiedzę respondentów tylko 38% kobiet i 31% mężczyzn słyszało o tym wirusie. Z czego 34% kobiet i 25% mężczyzn uważa, że jest on niebezpieczny dla dziecka, a 4% kobiet i 6% mężczyzn że jest bezpieczny dla dziecka, ale niebezpieczny dla matki (wykres 2).



Wykres 2. Czy słyssał Pan/Pani o wirusie cytomegalii? [badania własne]

W części ankiety dotyczącej cukrzycy ciężarnych badaliśmy wiedzę respondentów odnośnie badania poziomu glukozy w krwi u kobiet w ciąży. Ponad połowa (76% kobiet i 63% mężczyzn uważa że oznaczanie poziomu glukozy jest zalecane dla kobiet ciężarnych. 22% ankietowanych kobiet i 34% mężczyzn nie wie czy kobiety w ciąży powinny wykonać to badanie. Tylko nieliczni (2% kobiet i 3% mężczyzn) odpowiedzieli że badanie stężenia glukozy we krwi nie jest zalecane. 38% ankietowanych kobiet i 25% mężczyzn wiedziało jaki jest prawidłowy poziom glukozy we krwi. Błędna odpowiedz podało 22% badanych kobiet i 22% mężczyzn a 40% badanych kobiet i 53% mężczyzn przyznało, że nie wie ile powinien wynosić. W pytaniu o termin tego badania 30% kobiet i 16% mężczyzn odpowiedziało prawidłowo, że wykonują się je na początku ciąży. Z kolei 36% respondentów wśród kobiet i 56% wśród mężczyzn nie znało odpowiedzi na to pytanie a 34% kobiet i 28% odpowiedziało błędnie.

Ponad połowa przebadanych osób (56% kobiet i 72% mężczyzn) nie wiedziała czy u kobiet w ciąży wykonują się doustny test obciążenia glukozą. Jednak 42% kobiet i 25% mężczyzn prawidłowo wskazało odpowiedz, że przeprowadza się go w 24–28 tygodniu ciąży. Jedynie 2% kobiet i żaden mężczyzna odpowiedzieli że nie ma potrzeby wykonywać tego testu.

4. Wnioski

Ponad połowa kobiet i mężczyzn słyssało o badaniach prenatalnych. O tym, że istnieją specjalne wskazania do badań deklaruje nieco mniej niż połowa respondentów. Zaledwie co trzecia badana osoba wśród mężczyzn i co czwarta wśród kobiet wie że diagnostyka prenatalna inwazyjna płodu może być przyczyną utraty ciąży, krwawienia, zakażenia lub przedwczesnego odpląnięcia wód ciążowych. Większość ankietowanych zdają sobie sprawę, że zwierzęta

domowe mogą być niebezpieczne dla kobiety w ciąży lub płodu ze względu na możliwość wystąpienia choroby odzwierzęcej. Przy czym większą wiedzę na ten temat mają panie. Ponad połowa przebadanych osób posiada wiedzę na temat szkodliwości zachorowania na różyczkę podczas ciąży. W tym przypadku również więcej kobiet udzieliło poprawnej odpowiedzi. W części dotyczącej skutków wirusa HIV na płód odpowiedzi różniły się znacząco w zależności od płci. Najczęściej wybieraną odpowiedzią wśród mężczyzn było „może spowodować osłabioną odporność dziecka po urodzeniu” natomiast u kobiet „może powodować wady genetyczne u płodu np. Zespół Downa”. Badając wiedzę odnośnie wirusa cytomegalii uzyskano następujące wyniki. Tylko co trzecia osoba słyszała o tym wirusie i uważa że jest on niebezpieczny dla płodu. W części sondażu poświęconemu cukrzycy ciężarnych ponad połowa respondentów uważa, że badanie poziomu glukozy we krwi u kobiet w ciąży jest zalecane. Jednak wiedzę na temat terminu tego badania i prawidłowego wyniku posiadało znacznie mniej ankietowanych. W przypadku przeprowadzenia doustnego testu obciążenia glukozą ponad połowa badanych nie wiedziała czy stosuje się go u kobiet w ciąży. Zarówno w przypadku cukrzycy ciężarnych jak i innych zagadnień mających wpływ na rozwój płodu większą wiedzę dysponowały kobiety.

Podziękowania

Autorzy publikacji pragną złożyć podziękowania recenzentowi dr hab. n. med. Januszowi Kockiemu, prof. UM, za poświęcony czas na sformułowanie merytorycznej opinii o naszej pracy.

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Perenc M., Diagnostyka prenatalna wad rozwojowych i genetycznych – metody inwazyjne i nieinwazyjne, Przewodnik Lekarza, 94–99.
2. Ławicki S., Gościński M. Laboratoryjna diagnostyka prenatalna. Diagnosta laboratoryjny, 2013; 1(30):16–21.
3. Bradley J. R., Johnson D.R., Pober B.R. Genetyka medyczna, Warszawa, PZWL, 2009.
4. Bonalumi S., Trapanese A., Santamaria A., D’Emidio L., Mobili L., Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature, J Prenat Med. 2011; 5(1): 1–8.
5. Robert–Gangneux F., Dardéc M., Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis Clin Microbiol Rev. 2012; 25(2): 264–296.

6. Standardy Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego postępowania u kobiet z cukrzycą z dnia 9–10 września 2005.
7. Holec–Gąsior L., Lautenbach D., Drapała D., Kur J. Prawidłowe rozpoznanie toksoplazmozy u kobiet ciężarnych– ważność badań diagnostycznych oraz nowe możliwości, Forum Medycyny Rodzinnej 2010; 4, (4): 255– 262.
8. Zapobieganie zachorowaniom na odrę, różyczkę i świnkę Aktualne (1998) zalecenia Komitetu Doradczego ds. Szczepień Ochronnych Centers for Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report, 1998; 47 (No. RR–8): 1–57, Medycyna Praktyczna, Pediatria 1999/06.
9. Marczyńska M., Szczepańska– Putz M., Problem dziecka zakażonego HIV w opiece podstawowej, Krajowe Centrum do Spraw AIDS, www.aids.gov.pl, ISBN 83– 87068–26–8.

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Świadomość ankietowanych na temat diagnostyki prenatalnej oraz czynników wpływających na rozwijający się płód

Streszczenie

Wstęp: Diagnostyka prenatalna obejmuje badania dziecka oraz matki przeprowadzone w trakcie ciąży. Obecnie mają one duże znaczenie dla kobiet planujących ciążę lub ciężarnych. Badania prenatalne dzieli się na inwazyjne i nieinwazyjne. Obejmują one wykonanie badania ultrasonograficznego oraz szerokiego panelu diagnostyki biochemicznej (między innymi oznaczenie poziomu niektórych hormonów, białka PAPP–A czy glukozy), diagnostyki immunologicznej oraz diagnostykę genetyczną. Badania te umożliwiają wykluczenie lub stwierdzenie obecności genetycznych wad rozwojowych i wielu innych chorób u płodu. Dokładna diagnoza pozwala zastosować wszystkie sposoby leczenia tuż po urodzeniu lub nawet jeszcze w łonie matki. Umożliwia również przewidzieć przyszłe losy dziecka: sposoby opieki, rehabilitacji oraz rokowania co do jego stanu zdrowia, które są powiązane z nieustannym postępem medycyny, szczególnie genetyki.

Cel pracy: Przeprowadzone badania ankietowe miały na celu ukazanie stanu wiedzy na temat badań prenatalnych oraz czynników wpływających na płód podczas jego rozwoju wewnątrzmacicznego. Jednym z poruszanych problemów była diagnostyka kobiety ciężarnej i wpływ zmian stężenia glukozy we krwi matki i cukrzycy ciężarnych na rozwijające się dziecko oraz wiedzy na temat zakażeń wirusowych takich jak wirus różyczki, cytomegalii, HIV, na płód.

Materiał i metody: Badanie przeprowadzono metodą sondażu diagnostycznego z wykorzystaniem autorskiego kwestionariusza ankiety. Objęto nim grupę mężczyzn i kobiet w wieku 20– 45 lat. W badaniach uczestniczyło 100 wybranych losowo osób.

Wyniki i wnioski: Pytania sprawiły wielu ankietowanym problemy, jednak znaczna część posiada szeroką wiedzę na temat poruszanych zagadnień. Zdecydowana większość osób, biorących udział w ankiecie wie, że zachorowanie na różyczkę w czasie ciąży oraz wirus HIV mogą być niebezpieczne dla płodu, jednak bardzo nieznaczna ilość osób słyszała o wirusie cytomegalii. Powyżej 50% badanych uważa, że należy badać poziom cukru we krwi matki w czasie ciąży, niestety w większości nie wiedzą jakie jest prawidłowe stężenie glukozy ani czy wykonuje się u kobiet ciężarnych doustny test obciążenie glukozą.

Słowa kluczowe: diagnostyka prenatalna, badania prenatalne, cukrzyca ciężarnych, zakażenia wirusowe w ciąży

The respondents awareness on the subject of prenatal diagnostic and factors that have influence on the developing fetus

Abstract

Introduction.

Prenatal diagnostics covers medical examinations of the mother and child conducted during pregnancy. Currently, these examinations are of a great value to the women who are expecting a child, and to the ones intending to get pregnant. Prenatal tests are divided into invasive and non-invasive ones. They do not only include ultrasonography, but also a wide array of biochemical tests (including, among others, determining the levels of some hormones, PAPP-A protein, or glucose), immunological tests, and genetic tests. These tests allow to rule out, or to confirm the presence of developmental genetic defects, and many other diseases in the fetus. A precise diagnosis allows for employing all the ways of treatment after birth, or even in the womb. It also makes it possible to foresee the future fate of the child: the ways of taking care of the child, rehabilitation, and the prognosis as to his or her state of health, which are connected to the constant progress of medicine, especially in the area of genetics.

Aim of the study.

The aim of the survey that we carried out is to show the level of knowledge on the subject of prenatal tests and the factors influencing the fetus during its intrauterine development. One of the issues broached was diagnosing pregnant women and the influence of the changes in glucose concentration in mother's blood and gestational diabetes on the developing child, as well as the knowledge on the subject of virus infections: rubella, cytomegalovirus, and HIV and their influence on the fetus.

Material and methods.

The study was carried out using the diagnostic poll method with the use of an original survey questionnaire. The study was conducted on a group of men and women aged 20–45. 100 randomly selected individuals took part in the study.

Results and conclusions.

The questions were problematic to a number of participants. However, a large proportion of participants have a wide knowledge on the issues broached. The definite majority of the respondents know that acquiring rubella or the HIV virus during pregnancy can be dangerous to the fetus; nevertheless, only a slight minority of the respondents had heard about the cytomegalovirus. Over 50 % of the respondents think that it is necessary to measure the level of blood sugar in mother's blood during pregnancy. Unfortunately, most of them do not know what the right concentration of glucose is, or if the oral glucose tolerance test is done on pregnant women.

Key words: prenatal diagnostics, prenatal screening, gestational diabetes mellitus, virus infections in pregnancy

Autorzy pracy:

Anna Grad, anna_grad@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

Katarzyna Kalakucka, kkalakucka@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

mgr Paulina Gil-Kulik, pgil.poczt@vp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

Karolina Okła¹, Anna Wawruszak², Monika Orzełowska³, Artur Anisiewicz⁴

The role of microRNAs in diagnosis, prognosis and therapy of malignant gliomas

1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding endogenous RNAs which regulate a wide spectrum of gene expression in a posttranscriptional manner [1, 2]. At present, it is predicted that more than half of protein coding genes would be regulated by miRNAs [3]. MiRNAs play important roles in a wide variety of physiological and pathological processes of cancer including tumorigenesis, angiogenesis, invasion, apoptosis and regulation of cell cycle [4, 5]. They can exert tumor suppressive or oncogenic functions by regulating the expressions of mRNAs. Recent reports have revealed that miRNAs play crucial roles in glioma formation and growth [6].

Gliomas are the most common and primary malignant brain tumors. Despite the treatment with combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy, glioblastoma multiforme (GBM), the most malignant and most common glioma, is associated with an average life expectancy of only 14 months [7]. Actually, treatment of glioblastoma is primarily through tumor resection and subsequent radio- and chemotherapy, typically alkylating agents, e.g., temozolomide [8, 9]. Because of highly invasive nature of GBM, it is impossible to completely remove all tumor cells during surgical resection [10]. The origin of gliomas is largely unknown but there is increasing speculation that they might arise from glioma stem cells (GSCs), which might consist of transformed neural stem cells (NSCs). MiRNAs have been shown to regulate various cancer-associated genes and oncogenic functions in gliomas. Some evidence also suggests a role for miRNAs in the regulation of GSC biology [6, 7].

MiRNA expression patterns of malignant glioma are opening up the potential for molecularly targeted therapies, through delivery of a therapeutic gene or microRNA. Several miRNAs are differentially expressed in a variety of

¹ lolikik@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

² anna_wawruszak@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

³ monik17@vp.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

⁴ a.anisiewicz@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

malignancies compared to corresponding healthy tissue. Some of these miRNAs have been shown to modulate oncogenes and tumor suppressors of gliomas. Therefore, microRNAs could hold a great potential in the future treatment of this disease [11–14].

In this review we have focused on the most common and malignant adult primary brain tumors, including glioblastoma. Here we have discussed the role of miRNAs in multiple aspects of malignant gliomas pathobiology and their clinical and functional significance in regulating factors such as angiogenesis, tumorigenesis, apoptosis, metabolic reprogramming and GSCs behavior.

2. MicroRNAs

The microRNAs are noncoding class of endogenous ribo-regulators that modulate gene expression via the RNA interference (RNAi) pathway. The definition of miRNAs is based on their generation by the action of Dicer, an RNase that processes hairpin structured precursors into mature miRNAs. More than 1000 microRNAs (miRNAs) are present in the human genome [6]. About two thirds of miRNA encoding genes are located in the intronic regions of protein-coding or –noncoding transcription units [2]. The discovery of miRNAs dates back to 1993 when Lee et al. described a small RNA, lineage-deficient-4 (lin-4), with antisense complementarity to lin-14 involved in the regulation of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. In the year 2000, the second miRNA let-7 was discovered in the same organism. During the last years, the number of miRNAs have expanded enormously [15, 16].

In humans, approximately one third of miRNAs are organized in clusters [17, 18]. A significant portion of miRNAs are located in the intronic region of protein-coding or non-coding transcription units [18], while a minor subset of miRNAs are mapped in the LINEs (long interspersed nuclear elements) [19]. Many miRNAs are expressed in a tissue-specific manner. Analogous to mRNA expression, miRNA expression is determined by intrinsic cellular factors as well as diverse environmental variables. Many malignant tumors have deregulated miRNA expression as compared to normal cells and tissues [20, 21]. Many different mechanisms of miRNA deregulation in cancer have been identified including deregulations at the genetic, epigenetic, transcriptional, and processing levels. Various miRNA genes are located at fragile sites in the genome or regions that are commonly amplified or deleted in cancers [22]. Some miRNAs are repressed by CpG hypermethylation in cancers relative to normal tissue [23] or regulated by transcription factors such as p53, c-Myc and E2F [24–26]. miRNA levels can also be deregulated via deregulation of Dicer or Drosha as has been observed in many human cancers [27]. Most miRNAs are downregulated in cancer but a number of miRNAs are also upregulated.

Because miRNAs target a large number of mRNAs of genes associated with cancer, they regulate all aspects of cancer pathobiology such as cell cycle,

proliferation, cell death, apoptosis, cell migration and invasion, metastasis, angiogenesis, tumor microenvironment, tumor immunology as well as many aspects of CSCs biology. MicroRNAs could serve as therapeutic targets and as diagnostic, prognostic and therapeutic tools. MiRNA expression patterns can distinguish between normal and tumor tissue and help classify and grade various cancers [28, 29]. In summary, microRNAs are important and critical regulator of cancer and therefore could be useful for novel therapeutic strategy.

2.1. Biogenesis of microRNAs

The process of miRNA biogenesis involves several steps: transcription, pri miRNA processing, nuclear transport to the cytoplasm, precursor miRNA (pre-miRNA) processing, strand selection, transcript targeting, and transcript fate. This multistep processing pathway helps ensure that only RNAs with the correct structures and sequences are able to regulate gene expression (Fig. 1).

Biogenesis of a miRNA begins with the synthesis of a long transcript called a pri-miRNA that is both capped and polyadenylated. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II or III, from independent miRNA genes, or from the introns of protein-coding or non-protein-coding genes [30]. In the nucleus, pri-miRNA is processed to pre-miRNA by RNase III enzyme Drosha and its interacting partner DGCR8. DGCR8 recognizes the stem and the flanking single stranded RNA (ssRNA) and serves as a ruler for Drosha to cut the stem approximately 11 nucleotides away from the stem-ssRNA junction to release the hairpin-shaped pre-miRNA. The pre-miRNA is actively exported by exportin-5 in the presence of Ran-GTP cofactor to the cytoplasm and converted to mature duplex miRNA by another RNase III enzyme, Dicer. Dicer cleavage yields an approximately 21-nucleotide miRNA duplex. One of the miRNA strands which has relatively less stability at the 5' end is incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC) while as the other strand is generally degraded [30-32]. The RISC includes Dicer, the double-stranded RNA binding factor (TRBP), and Argonaut protein 2 (Ago2). The posttranscriptional silencing the target mRNA expression is mediated through binding of miRNA within RISC to the mRNA 3' untranslated region, resulting in mRNA cleavage, mRNA decay or translational inhibition [32]. The mechanism of translational repression is somewhat vague with some evidences suggesting that microRNAs block translational initiation while as others suggest a block in elongation. The intensive study of the past several years demonstrated that miRNAs are the selective excretion via lipoproteins or microvesicles, possibly functioning as a way of intercellular communications. Moreover, secreted extracellular miRNAs may reflect molecular changes in the cells from which they are derived and can therefore potentially serve as biomarkers of disease. In addition several studies suggest their potential application as a new therapeutic strategy for treating diseases [33, 34].

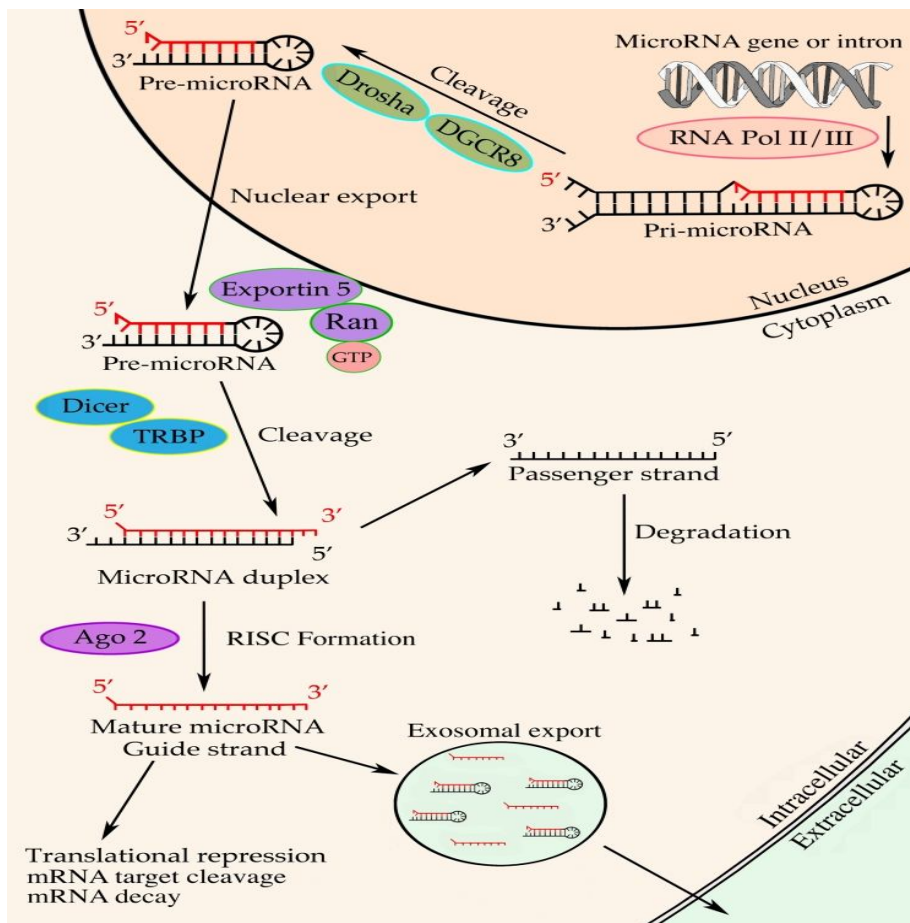


Fig. 1. MicroRNA biogenesis pathway. miRNA biogenesis involves transcription, pri-miRNA processing, nuclear transport to the cytoplasm, precursor miRNA (pre-miRNA) processing, strand selection, transcript targeting, and transcript fate [29]

2.2. MicroRNAs in malignant gliomas

Various miRNA profiling studies carried out in glioma tissue samples identified differentially regulated miRNAs in gliomas. The first report of expression profiling of large number of miRNAs in GBM was reported almost simultaneously in 2005 [35,36]. Chan et al. demonstrated that inhibition of miRNA-21 resulted in significantly increased apoptosis and, therefore, miRNA may function as a microonkogene [35]. For several years, the number of studies published on this subject has steadily increased and demonstrated new miRNAs, whose expression was significantly altered in malignant gliomas compared with normal brain tissues or lower – grade gliomas. We review four miRNAs which may be important in malignant gliomas.

2.2.1. MiR-21

One of the most common miRNAs identified by recent studies of gliomas is miR-21 which was the first miRNA to be linked with glioma malignancy. The expression profiling of miRNAs in GBM tissues identifies miR-21 as an upregulated miRNA in glioma [35, 38]. Moreover, miR-21 levels in gliomas correlate with tumor grade and low miR-21 levels in human tumors are associated with slightly better survival [37]. MiR-21 has been revealed to act as an anti-apoptotic factor that targets a network of p53, transforming growth factor (TGF)-beta, and mitochondrial apoptosis tumor suppressor genes in GBM cells. Inhibition of miR-21 induces glioma cell apoptosis, inhibits invasion and represses growth of cancer cells (39-40). MiR-21 was also shown to modulate the chemosensitivity of glioma cells to many chemotherapeutic agents such as doxorubicin, taxol, temozolomide [41]. Transfection with antisense-miR-21 has been shown to significantly increase GBM cell line sensitivity to both radio- and chemotherapy [41, 42]. This aspect of its function makes miR-21 of particular interest for exploitation in molecular therapy.

2.2.2. MiR-196

MiR-196a was found upregulated in GBM (grade IV) as compared with grade III gliomas (anaplastic astrocytoma) and its expression levels correlated with the malignant progression and poor prognosis. Expression of both miRNAs (miR-196a, miR-196b) was extremely high compared with other overexpressed miRNAs in GBM, therefore miR-196a and miR-196b are considered to be associated with the malignant transformation of gliomas. Moreover Guan et al. suggest that miR-196 may be a prognostic predictor in GBM [43]. The characteristic of miR-196 is the location in the vicinity of homeobox (HOX) clusters within the genome of vertebrate genomes [44]. Recent studies have also indicated clinical implications of HOX genes in GBM [45, 46], so the implications of miRNA dysregulations in HOX clusters should be clarified for GBM. However, this is more complicated, since the targets of miRNA usually number more than 100. Another target of miR196a, annexin A1 (ANXA1), has also been implicated in GBM as a mediator of apoptosis and an inhibitor of cell proliferation [47]. Further studies are necessary to explain the clinical implications and biological functions of miR-196 in malignant gliomas.

2.2.3. MiR-10b

Sasayama et al. reported that miR-10b plays a role in glioma invasion and migration. MiR-10b expression was found upregulated in 43 glioma samples as compared to non-neoplastic brain tissues and expression levels of miR-10b were associated with higher grade glioma. Moreover, mRNA expressions of RhoC and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), which were thought to be regulated by miR-10b via HOXD10, statistically significantly

correlated with the expression of miR-10b. Also, protein expression levels of RhoC and uPAR were associated with expression levels of miR-10b. In addition, multifocal lesions on enhanced MRI of 7 malignant gliomas were associated with higher expression levels of miR-10b [48]. However, Gabriely et al. demonstrated that in GBM a miR-10b regulated cell cycle and programmed cell death via regulation of Bim, TFAP2C, p16, and p21 but not HOXD10. Moreover, survival of GBM patients expressing high levels of miR-10 family members is significantly reduced in comparison to patients with low miR-10 levels, indicating that miR-10 may contribute to glioma growth in vivo. In addition, inhibition of miR-10b in a mouse model of human glioma results in significant reduction of tumor growth. This investigation suggest an important role of miR-10b in gliomagenesis, reveal a novel mechanism of miR-10b-mediated regulation, and suggest the possibility of its future use as a therapeutic target in gliomas [49].

2.2.4. MiR-128

The expression analysis revealed that miR-128 was downregulated miRNAs in glioma and over expression of the miRNA led to the decreased cell proliferation and tumour growth in vivo. The first target investigated, Bmi-1, which normally drives stem cell renewal and glioma growth, was found to be downregulated upon miR-128 induction [50]. MiR-128 was also found by another study to inhibit the proliferation of established glioma cells by targeting the transcription factor E2F3a [51]. Papagiannakopoulos et al. found the two growth factor receptors EGFR and PDGFRA, both typically overexpressed in glioblastoma, to be repressed by miR-128 [52]. Moreover, other direct targets of miR-128 include WEE1 [53] and Msi1, involved in proliferation, and p70S6K1, involved in angiogenesis [54]. MiR-128 has been shown to be able to repress the growth of glioma initiating cell in vivo [55]. These findings support that miR-128 has a potential to achieve its therapeutic effect by suppressing proliferation and enhancing differentiation of glioma initiating cells (GICs).

3. Glioma stem cells (GSCs)

Gliomas contain a small number of treatment-resistant glioma stem cells (GSCs), and it is thought that tumor regrowth originates from GSCs, thus rendering GSCs an attractive target for novel treatment approaches. Glioma Stem Cells (GSCs) have been isolated from GBM by several research groups [56–58]. Some studies suggest that GSCs form a small fraction of the total cell population within GBM with the bulk of other tumor cells consisting of a mix of partially differentiated cancer progenitor-like cells with limited proliferative capacity and terminally differentiated cancer cells. GSCs have similar characteristics to normal neural stem cells (NSCs), including self-renewal, tumorigenesis and multipotency. A subset of GSCs expresses neural stem cell surface markers such as nestin and CD133, a hematopoietic stem cell marker [59–62].

Many studies reported that the fraction of CD133+ glioma stem cells increased with the grade of the tumor as well as GSCs from more aggressive tumors exhibited increased self renewal capacity compared to less aggressive tumors. Moreover, CD133 + GSCs were found to be very resistant to chemotherapeutic agents including temozolomide, carboplatin, paclitaxel (Taxol) and etoposide (VP16) compared to autologous CD133 negative cells. This resistance was probably contributed by the high expression in the SCs of BCRP1 and MGMT, as well as the anti-apoptosis protein and inhibitors of apoptosis protein families [62]. It is suggested that treatment should target this small population of CD133 + CSCs in tumors to improve the survival of brain tumor patients.

Several signaling pathways and molecules have been implicated in the regulation of GSCs. The expression of PDGFR on NSCs led to the speculation that their dysregulation might link NSCs to GSCs [63]. Moreover, the BMP–BMPR signalling system, which controls the activity of normal brain stem cells, was identified as a key inhibitory regulator of tumour–initiating, stem–like cells from GBM [64] while STAT3 was shown to regulate the growth and self–renewal of GSCs [65]. Blockage of the Sonic hedgehog (SHH) as well as the NOTCH signaling pathways depletes GSC populations in GBM [66]. Myc was shown to be an important target for the cooperative actions of p53 and Pten in the regulation of normal and malignant stem/progenitor cell differentiation, self–renewal and tumorigenic potential of GBM [67]. All of the above SCs regulators could theoretically regulate various aspects of GSCs biology.

3.1. MicroRNAs in glioma stem cells

From among more than 100 published articles on microRNAs in gliomas, only few addressed their roles in GSCs (Fig 2). One of the miRNAs– miR–7 is implicated in the regulation of gene expression and function of glioblastoma stem cells. MiR–7 inhibited the expression of EGFR and the activation of Akt in the SCs line. Furthermore, miR–7 inhibited GBM stem cell proliferation and invasion. MiR–7 was downregulated in human GBM tissue. This studies therefore suggested, for the first time, a miRNA in the regulation of critical genes and malignant parameters in GBM stem cells [68]. Others miRNAs–miR–124 and miR–124 were implicated in the differentiation of NSCs and GSCs, on the based on their CD 133 positivity [69]. Gal et al. examined the miRNA profiles of glioblastoma stem cell (CD133+ cells) and non–stem cell (CD133 cells) populations and found that several miRNAs including miR–451, miR–486, and miR–425 were upregulated in the CD133 – cells [70]. Moreover, recent interesting study found that miR–451 promotes glioma cell growth and that its levels are repressed by low glucose and induced by high glucose concentrations. The effects of miR–451 were mediated by LKB1, which it represses through targeting its binding partner, CAB39 (MO25 α). Overexpression of miR–451 sensitized cells to glucose deprivation, suggesting that its downregulation is

necessary for robust activation of LKB1 in response to metabolic stress. Thus, miR-451 was proposed as a regulator of the LKB1/AMPK pathway, and as a component of a fundamental mechanism that contributes to cellular adaptation in response to altered energy availability [71]. Another study identified miR-128 as downregulated in GBM tissue as compared to normal brain by inhibited the polycomb transcriptional repressor Bmi-1 [72]. MiR-128 was also found by to inhibit the proliferation of established glioma cells by targeting the transcription factor E2F3a. The protein levels of E2F3a in gliomas and normal brain tissues were negatively correlated to the expression levels of miR-128 in these tissues. Overexpression of miR-128 suppressed a luciferase-reporter containing the E2F3a-3'UTR and reduced the level of E2F3a protein in T98G cells. Moreover, knocking down of E2F3a had similar effect as overexpression of miR-128, and overexpression of E2F3a can partly rescue the proliferation inhibition caused by miR-128 [73].

Recent study uncovered critical roles for miRNA-34a in glioblastoma stem cells and showed that miR-34a expression inhibits various malignancy endpoints in glioma stem cells. Importantly, data show for the first time that miR-34a expression induces GSCs differentiation. This study suggest that miR-34a is a tumor suppressor and a potential therapeutic agent that acts by targeting multiple oncogenic pathways in brain tumors and by inducing the differentiation of cancer stem cells [74]. MicroRNA-326 was identified as a direct regulator of Notch expression in glioblastoma stem cells. Interestingly, miR-326 suppressed Notch and was suppressed by Notch. MicroRNA-326 was downregulated in gliomas via decreased expression of its host gene. Transfection of miRNA-326 into stem cell-like glioma lines was cytotoxic, and was rescued by Notch restoration. Furthermore, miR-326 transfection reduced glioma cell tumorigenicity in vivo. In addition, miR-326 partially mediated the toxic effects of Notch knockdown. This study suggesting microRNA-326 delivery as a therapy [75]. The miR-17-92 cluster was also implicated in the regulation of glioblastoma differentiation, apoptosis and proliferation. The study shown that expression of several members of miR-17-92 was significantly higher in primary astrocytic tumors than in normal brain tissue and significantly increased with tumor grade. A high-level amplification of the miR-17-92 locus was also detected in one glioblastoma specimen. Inhibition of miR-17-92 induced apoptosis and decreased cell proliferation in glioblastoma neurospheres. MiR-17-92 inhibition was also associated with increased mRNA and/or protein expression of CDKN1A, E2F1, PTEN and CTGF. The CTGF gene was shown to be a direct target of miR-17-92 in glioblastoma neurospheres by luciferase reporter assays. The study therefore proposed that miR-17-92 and its target CTGF mediate effects of differentiation-promoting treatment on glioblastoma cells through multiple regulatory pathways [76].

4. The role of microRNA expression patterns in malignant gliomas future directions in therapy

The identification of differences in the expression of miRNA genes in tumour samples compared to normal brain tissues provides an automatic basis for their utility for glioma diagnosis, classification and prognosis [77]. Furthermore, miRNAs appear to be an attractive target for therapeutic intervention because the aberrantly expressed miRNAs seem to play key role in pathobiology of cancer [78].

Since the introduction of the chemotherapeutic– temozolomide (TMZ) as standard chemotherapy, concomitant TMZ and radiotherapy have improved both progression–free survival and overall survival in patients with glioblastoma. However, the clinical prognosis of patients with GBM remains poor, with a median overall survival of only 14.6 months with radiotherapy plus temozolomide and 12.1 months with radiotherapy alone [82].

The cancer stem cell (CSC) hypothesis, that tumors are driven by a subpopulation of tumor cells with stem cell–like properties, may provide new insights into the radio– and chemo–resistance of GBM. Based on this hypothesis, some therapies in which shrink tumors show reduced diameter might not be associated with improved rates of cure if CSCs fail to be eliminated, and the therapies targeting CSCs should prove clinically more effective [81].

The use of microRNAs in cancer therapy involves two approaches. The first approach, which is rather more commonly followed, is to inhibit oncogenic miRNAs with a gain of function using miRNA antagonists. The second approach involves reintroduction of a tumour suppressor miRNA with the resultant restoration of loss of function. Several research have shown the potential use of miRNA–based approach in therapy of malignant glioma. One of microRNAs– miR–21 being one of the most upregulated miRNAs in gliomas, with anti–apoptotic and pro–invasive functions, appears to be an automatic choice for therapeutic interventions [37–40]. Corsten et al studied the combined effect of inhibiting miR–21 and neural precursor cells (NPC)–mediated secretable variant of the cytotoxic agent tumour necrosis factor–related apoptosis inducing ligand (S–TRAIL) on glioma (U87) tumour growth using an intra–cranial glioma model using athymic mice. The ability of U87 glioma cells to form tumour reduced significantly upon introduction of locked nucleic acid (LNA) antimiR–21 oligonucleotides. Further, simultaneous injection of NPCs expressing STRAIL along with miR–21 anti–miR treated U87 cells led to synergistic cytotoxicity with the complete elimination of tumour growth [82]. Recently, some miRNAs have been reported to contribute to CSC properties and cancer heterogeneity. MicroRNA–124, –137 [69], –34a [74], and –326 [75] have been reported to play roles in the maintenance of cancer stem cell properties. Further study of microRNAs function in cancer stem cell may lead to novel therapy for GBM patients by inhibition of oncogenic miRNAs or replacement of tumor–suppressor miRNAs. Molecular–targeted therapy based on microRNA expression in cancer stem cells has the potential to allow more personalized and effective therapy in the near future.

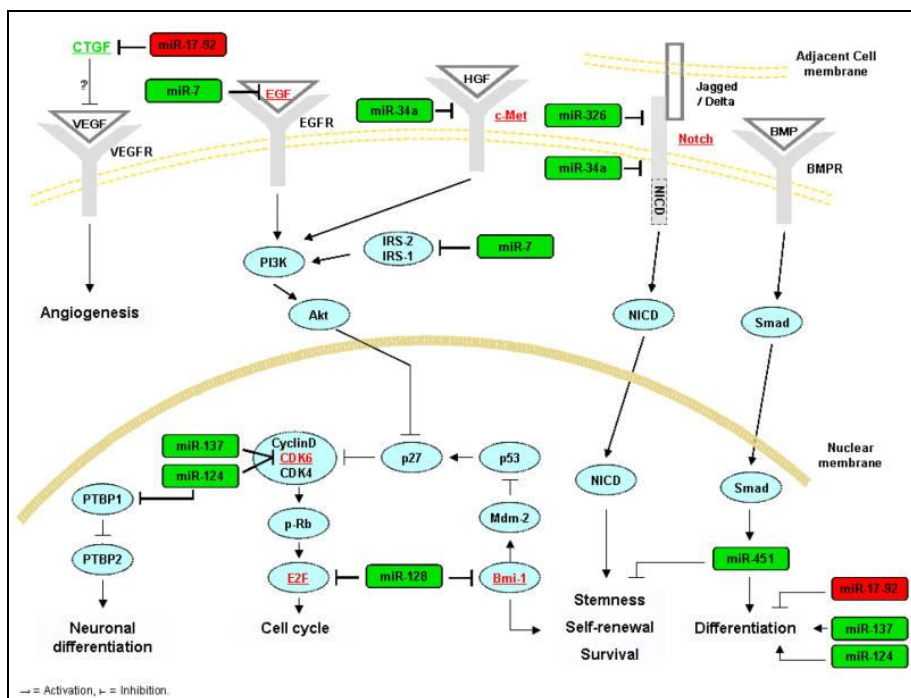


Fig 2. MicroRNAs that have been shown to regulate SCs targets and functions [6]

5. Conclusions

In the multiple steps in cancer progression, microRNAs play significant roles in each stage. For few years miRNAs have generated a huge excitement in the cancer pathobiology. During this years, many studies demonstrated their role in cell cycle, proliferation, cell death, apoptosis, cell migration and invasion, metastasis, angiogenesis of gliomas, as well as many aspects of CSCs biology. All of this aspects indicate that defects in microRNA regulatory network appear to play a key role in glioma malignant pathogenesis. Many of reports have clearly showed the utility of miRNA in glioma diagnosis, prognosis, therapy as well as grading. However, further studies are needed to confirm these findings for the eventual application in clinics and use of microRNAs as future agents or target for glioma therapy.

Literatura

1. Ambros V, Lee RC. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *Methods Mol Biol.* 2004; 265: 131–58.
2. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 199–227.
3. W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics.* 2008; 9(2): 102–114.
4. D. P. Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2): 281–297.
5. ScopusV. Ambros. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004. 431(7006): 350–355,
6. Zhang Y, Dutta A, Abounader R. The role of microRNAs in glioma initiation and progression. *Front Biosci.* 2012; 1(17): 700–712.
7. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008; 359(5): 492–507.
8. Hong B, Wiese B, Bremer M, Heissler HE, Heidenreich F, Krauss JK and Nakamura M (2012) Multiple microsurgical resections for repeated recurrence of glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol.*
9. Becker KP, Yu J. Status quo–standard–of–care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer J.* 2012; 18(1): 12–19.
10. Koo S, Martin GS, Schulz KJ, Ronck M, Toussaint LG. Serial selection for invasiveness increases expression of miR–143/miR–145 in glioblastoma cell lines. *BMC Cancer.* 2012; 12(1): 143.
11. Mohyeldin A, Chiocca EA. Gene and viral therapy for glioblastoma: a review of clinical trials and future directions. *Cancer J.* 2012; 18(1): 82–88.
12. Lee S–J, Kim S–J, Seo H–H, Shin S–P, Kim D, Park C–S, Kim K–T, Kim Y–H, Jeong J–S, Kim I–H. Over–expression of miR–145 enhances the effectiveness of HSVtk gene therapy for malignant glioma. *Cancer Lett.* 2012; 320(1): 72–80.
13. Skalsky RL, Cullen BR. Reduced expression of brain–enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One.* 2011; 6(9): e24248.
14. Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol res int.* 2012; 2012: 878425.
15. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin–4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin–14*. *Cell* 1993, 75(5): 843–854.
16. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, et al. *Rna.* 2003; 9: 277–9.
17. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, et al. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349: 59–68.
18. Rodriguez A, Griffiths–Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14: 1902–10.
19. Smalheiser NR, Torvik VI. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet.* 2005; 21: 322–6.
20. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(11): 857–66.

21. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2007; 67(6): 2456–68.
22. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(9): 2999–3004.
23. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Céspedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67(4): 1424–9.
24. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature.* 2007; 447(7148): 1130–4.
25. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006; 38(9): 1060–5.
26. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem.* 2007; 282(4): 2135–43.
27. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006; 20(16): 2202–7.
28. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435(7043): 834–8.
29. Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Duroux M. A Systematic Review of MicroRNA in Glioblastoma Multiforme: Micro-modulators in the Mesenchymal Mode of Migration and Invasion. *Mol Neurobiol.* 2013; 47(1): 131–144.
30. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23: 4051–4060.
31. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13: 1097–1101.
32. Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol.* 2011; 676: 3–22.
33. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood.* 2012; 119(3): 646–648.
34. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell.* 2012; 3(1): 28–37.
35. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65(14): 6029–6033.
36. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(4): 1351–1358.

37. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE, Reifenberger G. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol.* 2010; 20(3): 539–50.
38. J. A. Chan, A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik. MicroRNA–21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research.* 2005; 65(14): 6029–6033.
39. T. Papagiannakopoulos, A. Shapiro, and K. S. Kosik. MicroRNA–21 targets a network of key tumor–suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research.* 2008; 68(19): 8164–8172.
40. S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006; 103(7): 2257–2261.
41. Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan X–B, Han L, Wang GX, Jia Z–F, Xu P, Pu P–Y, Kang C–S. MicroRNA–21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN–mutant) and LN229 (PTEN–wild type) to taxol. *BMC Cancer.* 2010; 10: 27.
42. Ren Y, Kang C–S, Yuan X–B, Zhou X, Xu P, Han L, Wang GX, Jia Z, Zhong Y, Yu S, Sheng J, Pu P–Y. Co–delivery of as–miR–21 and 5–FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010; 21(3): 303–314.
43. Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T. MiRNA–196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(16): 4289–97.
44. S. Yekta, I. H. Shih, and D. P. Bartel. MicroRNA–directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004; 304(5670): 594–596.
45. A. Murat, E. Migliavacca, T. Gorlia et al. Stem cell–related “self–renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2008; 26(18): 3015–3024.
46. N. Gaspar, L. Marshall, L. Perryman et al. MGMT–independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3–kinase–mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Research.* 2010; 70(22): 9243–9252.
47. R. Luthra, R. R. Singh, M. G. Luthra et al. MicroRNA–196a targets annexin A1: a microRNA–mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene.* 2008; 27(52): 6667–6678.
48. Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA–10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer.* 2009; 125(6): 1407–13.
49. G. Gabriely, M. Yi, R. S. Narayan et al. Human glioma growth is controlled by microRNA–10b. *Cancer Research.* 2011; 71(10): 3563–3572.
50. J. Godlewski, M. O. Nowicki, A. Bronisz et al. Targeting of the Bmi–1 oncogene/stem cell renewal factor by MicroRNA–128 inhibits glioma proliferation and self–renewal. *Cancer.* 2008; 68(22): 9125–9130.
51. Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J, Peng X. MicroRNA–128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med.* 2009; 87(1): 43–51.
52. Papagiannakopoulos T, Friedmann–Morvinski D, Neveu P, Dugas JC, Gill RM, Huillard E, Liu C, Zong H, Rowitch DH, Barres BA, Verma IM, Kosik KS. Pro–

- neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene*. 2012; 31(15): 1884–1895.
53. Wuchty S, Arjona D, Li A, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Zhang A, Maric D, Anolik R, Zenklusen JC, Fine HA. Prediction of associations between microRNAs and gene expression in glioma biology. *PLoS One*. 2011; 6(2): e14681.
 54. Shi Z-M, Wang J, Yan Z, You Y-P, Li C-Y, Qian X, Yin Y, Zhao P, Wang Y-Y, Wang X-F, Li M-N, Liu L-Z, Liu N, Jiang B-H. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32709.
 55. Lages E, Guttin A, Atifi El M, Ramus C, Ipas H, Dupré I, Rolland D, Salon C, Godfraind C, deFraipont F, Dhobb M, Pelletier L, Wion D, Gay E, Berger F, Issartel J-P. MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20600.
 56. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008; 68(10): 3566–3572.
 57. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432(7015): 396–401.
 58. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004; 64(19): 7011–21.
 59. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med*. 2009; 15(11): 519–30
 60. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444(7120): 756–60.
 61. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432: 396–401.
 62. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006; 5: 67.
 63. Kesari S, Stiles CD. The bad seed: PDGF receptors link adult neural progenitors to glioma stem cells. *Neuron*. 2006; 51(2): 151–3.
 64. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 2006; 444(7120): 761–5.
 65. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells*. 2009; 27(10): 2383–92.
 66. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2524–33.
 67. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA. p53 and Pten control neural

- and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature*. 2008; 455(7216): 1129–33.
68. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008.
 69. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008; 6: 14
 70. Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 376(1): 86–90.
 71. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, De Lay M, Van Brocklyn J, Ostrowski MC, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell*. 2010; 37(5): 620–32.
 72. Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S. shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(1): 87–99.
 73. Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J, Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med*. 2009; 87.
 74. Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, Purow B, Abounader R. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle*. 2010; 9(6).
 75. Kefas B, Comeau L, Floyd DH, Seleverstov O, Godlewski J, Schmittgen T, Jiang J, diPierro CG, Li Y, Chiocca EA, Lee J, Fine H, Abounader R, Lawler S, Purow B. The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci*. 2009; 29(48): 15161–8.
 76. Ernst A, Campos B, Meier J, Devens F, Liesenberg F, Wolter M, Reifenberger G, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B. De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene*. 2010; 29(23): 3411–22.
 77. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435: 834–8.
 78. Bader AG, Brown D, Winkler M The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*70: 7027–30.
 79. Verdine GL. Drugging the "undruggable". *Harvey Lect*. 2006; 102: 1–15.
 80. Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res*. 2007; 67: 8994–9000.
 81. T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414(6859): 105–111.

82. R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 352(10): 987–996.
83. J. Silber, D. A. Lim, C. Petritsch et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Medicine*. 2008(6):14.

Recenzent pracy: Dr hab. Roman Paduch, Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii–Curie Skłodowskiej

Rola mikro-Rna w diagnostyce, prognozowaniu i terapii złośliwych glejaków

Streszczenie

MikroRNAs (miRNAs) to małe, 21–23 nukleotydowe cząsteczki, niekodujące białka, których kluczową rolą jest regulacja ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Chociaż stanowią stosunkowo nową grupę cząsteczek RNA, odkrytą na początku lat 90- tych, to udowodniono, że odgrywają one istotną rolę w regulacji wielu różnych aspektów związanych z patobiologią nowotworów, w tym: w nowotworzeniu, angiogenezie, inwazji, apoptozie, a także biorą one udział w regulacji cyklu komórkowego oraz wpływają na ekspresję glejowych komórek macierzystych. Glejaki stanowią najczęstszą i najbardziej śmiertelną grupę pierwotnych guzów mózgu u ludzi (głównie glejak wielopostaciowy o średniej długości przeżycia pacjentów zaledwie 14 miesięcy). Pochodzenie glejaków w dużej mierze jest nieznanne, ale sugeruje się, że mogą one powstawać z glejowych komórek macierzystych (GSCs), które prawdopodobnie składają się z transformowanych, neuronalnych komórek macierzystych (NSCs). Zastosowanie miRNA jako biomarkerów nowotworowych wzbudziło w ostatnich latach duże zainteresowanie. Globalne wzory ekspresji miRNA w glejakach nie tylko pozwalają odróżnić guzy nowotworowe od prawidłowych tkanek, ale mogą również służyć jako potencjalne biomarkery diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne.

Słowa kluczowe: mikroRNA, glejak, GBM, biomarker, GSCs, NSCs

The role of micro-Rna in diagnosis, prognosis and therapy of malignant gliomas

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, 21– 23 nucleotide-long, non-protein-coding molecules that a key role is regulation of gene expression at the posttranscriptional manner. Although discovered only recently in the early 1990s, this relatively new group of RNAs has already been proven to play an essential role in the regulation of many various aspects of tumor pathobiology, including tumorigenesis, angiogenesis, invasion, apoptosis, regulation of cell cycle and expression of glioma stem cells (GSCs). Gliomas are the most common and deadly primary human brain tumors (mostly glioblastoma with an average life expectancy of only 14 months). The origin of gliomas is largely unknown but there is suggestion that they might arise from glioma stem cells (GSCs), which might consist of transformed neural stem cells (NSC). The use of miRNAs as tumor biomarkers has gained growing interest in the last few years. Global expression patterns of miRNA in gliomas may not only distinguish brain tumors from normal tissues, but can also have potential diagnostics, prognostic and therapeutic values.

Keywords: microRNA, glioma, GBM, biomarker, GSCs, NSCs

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u ciężarnych – etiopatogeneza i leczenie

1. Wprowadzenie

Obecnie, poprzez rozwój medycyny, kobieta ciężarna może uzyskać dobrą opiekę lekarską. Szeroki wachlarz działań profilaktycznych ma zapewnić możliwość wczesnego wykrywania zaburzeń zdrowotnych, a przez to dać szansę na wczesne podjęcie leczenia.

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej wraz z ich najpoważniejszą formą czyli cukrzycą stanowią zespół chorób, z którymi boryka się coraz większa część mieszkańców naszego globu. Pomimo, iż zaburzenia gospodarki węglowodanowej są diagnozowane już na etapie podstawowej opieki zdrowotnej, a mechanizm ich powstawania został bardzo dobrze poznany, wciąż nie jesteśmy w stanie opanować doświadczanej dziś epidemii tych schorzeń.

Szczególnie narażone na skutki zaburzeń gospodarki węglowodanowej są dzieci na prenatalnym etapie rozwoju. Przykładowo, wady wrodzone u dzieci z ciąż powikłanych cukrzycą występują

2–3-krotnie częściej w porównaniu do populacji ogólnej [1]. Dlatego też wczesne wykrycie zaburzeń w gospodarce węglowodanowej u kobiet w ciąży stanowi jeden z podstawowych elementów opieki położniczej.

2. Cukrzyca a ciąża

Kluczowymi w rozwoju dziecka są pierwsze tygodnie życia, kiedy ma miejsce organogeneza. W związku z tym każda kobieta w okresie aktywności prokreacyjnej powinna zadbać o zdrowie, między innymi poprzez regularny monitoring glikemii. Kobiety chorujące na cukrzycę powinny być w stanie wyrównania metabolicznego cukrzycy już na kilka miesięcy przed poczęciem. Za główną bowiem przyczynę wszystkich zagrożeń związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej w ciąży uważana jest hiperglikemia [2,22].

Należy również podkreślić, iż ciąża, ze względu na fizjologiczne zmiany zachodzące w organizmie kobiety, ma diabetogeny wpływ na organizm. Podczas ciąży dochodzi do wyraźnego wzrostu stężenia niektórych hormonów mających bezpośredni lub pośredni wpływ na gospodarkę węglowodanową organizmu np. prolaktyny, hormonu luteinizującego, ludzkiej gonadotropiny

¹ jstepkowska@wum.edu.pl; Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Dydaktyki Ginekologiczno – Położniczej

kosmówkowej, laktogenu łożyskowego, glukagonu. Wzrost stężenia tych hormonów w ciąży skutkuje wzrostem insulinooporności i zwiększonym zapotrzebowaniem organizmu na insulinę [4, 22].

Szczególną wnikliwością diagnostyczną powinny być objęte kobiety z grupy ryzyka cukrzycowego (są to: otyłość lub nadwaga, wiek powyżej 25 lat, poprzednio stwierdzona cukrzyca ciężarnych, cukrzyca w rodzinie, obecność przeciwciał przeciwwyspowych) [22].

Pacjentki w ciąży, ze zdiagnozowanymi zaburzeniami węglowodanowymi powinny przez okres całej ciąży monitorować co ok. 3 tygodnie parametry wrównania diabetologicznego [2]. Podczas wizyt lekarskich, oprócz podstawowych badań (jak morfologia krwi, stężenie mocznika, kreatyniny oraz badanie dna oka raz w trymestrze [2]) oceniana być powinna samokontrola glikemii, stężenie fruktozaminy – co 3 tygodnie, stężenie hemoglobiny glikowanej w każdym trymestrze – przy czym należy wziąć pod uwagę, że niedobór żelaza występujący u wielu kobiet w ciąży, zwiększa ilość HbA1c poprzez zmianę struktury cząsteczki hemoglobiny ułatwiającą jej glikację [3, 22].

3. Zdefiniowanie pojęć

Cukrzyca to zespół zaburzeń metabolicznych objawiających się hiperglikemią, która jest wynikiem bezwzględnego lub względnego niedoboru insuliny. Z hiperglikemią związane są zaburzenia w metabolizmie węglowodanów, białek, tłuszczów oraz w gospodarce wodno–elektrolitowej, które prowadzić mogą do uszkodzeń narządów i układów, ze szczególnym uwzględnieniem naczyń krwionośnych, nerek, nerwów i narządu wzroku [5,22]. Biorąc pod uwagę wszystkie zaburzenia gospodarki węglowodanowej, najpoważniejszym z nich jest cukrzyca.

Polskie Towarzystwo Ginekologiczne w opublikowanych pod koniec 2011 roku standardach postępowania u kobiet z cukrzycą wyróżnia dwa rodzaje cukrzycy występujące w ciąży: cukrzycę ciążową (Gestational Diabetes Mellitus – GDM) – gdy zaburzenia tolerancji węglowodanów lub cukrzyca rozwijają się lub są po raz pierwszy wykryte w ciąży, oraz cukrzycę przedciążową (Pregestational Diabetes Mellitus – PDM) – gdy kobieta chorująca na którykolwiek z typów cukrzycy jest w ciąży [5,22].

Wysoce szkodliwy wpływ hiperglikemii na rozwijający się organizm ludzki wynika z fizjologii działania glukozy na komórki i narządy. Glukoza fizjologicznie przechodzi przez łożysko zgodnie z gradientem stężeń, zaś prawidłowo zbudowane łożysko stanowi barierę dla hormonów białkowych matki w tym również dla insuliny matczynej [22]. Zatem podstawowy metabolizm cukrów w organizmie dziecka regulowany jest wyłącznie przez insulinę płodową [22]. Hiperglikemia matki przekłada się na hiperglikemię u dziecka a w przypadku dłuższego braku wyrównania metabolicznego matki, rozwinięta ketoza matki skutkuje przechodzeniem ketonów również do krwi

płodu [22]. Oba te czynniki zaś posiadają teratogeny wpływ na rozwijający się organizm ludzki [22]. Nawet krótkie epizody płodowej hiperinsulinemii, zwiększają zapotrzebowanie na tlen (prowadząc do przejściowej hipoksji, a ta stymuluje wyrzut katecholamin nadnerczowych) oraz stymulują nadmierne gromadzenie glikogenu [1, 22]. W dalszych następstwach wyrzuty katecholamin płodowych mogą być przyczyną płodowego nadciśnienia, przerostu mięśnia sercowego oraz nadmiernej produkcji erytropoetyny [1, 7, 22].

Wszystkie opisane powyżej konsekwencje stanów hiperglikemicznych stanowiących potencjalny obraz metaboliczne niewyrównanej cukrzycy mogą być przyczyną poronień, porodów przedwczesnych, oraz poważnych odległych zaburzeń rozwojowych dzieci (jak przenikanie z organizmu matki do krwi płodu przeciwciał przeciwiinsulinowych) [22].

4. Pregestational Diabetes Mellitus – cukrzyca przedciążowa (PDM)

Jak wspomniano we wstępie niniejszej pracy, kobiety w wieku rozrodczym, planujące ciążę i jednocześnie chorujące na cukrzycę powinny być objęte monitoringiem parametrów wyrównania metabolicznego. Wyrównanie metaboliczne cukrzycy zapewnione być powinno jeszcze przed poczęciem dziecka i obejmować powinno cały okres przedkoncepcyjny (3–6 miesięcy przed zapłodnieniem) [8, 22]. Według standardów, w okresie planowania ciąży niezbędne jest uzyskanie wartości glikemii na czczo w granicach 60–100 mg/dl, w 1godz. po posiłku w granicach 120–140 mg/dl, w 2 godz. po posiłku w granicach 100–120 mg/dl, a w nocy 70–90 mg/dl oraz nie powinna występować, ani glukozuria, ani ketonuria [5, 8, 9, 22]. Hemoglobina glikowana nie powinna przekraczać dopuszczalnych wartości $HbA1C < 6,5\%$. [5]

Według zatwierdzonych przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne standardów dla kobiet z cukrzycą przedciążową dla prawidłowego przebiegu ciąży niezbędne jest uzyskiwanie wartości glikemii na czczo w granicach 60–90mg/dl, przed posiłkami 60–105mg/dl, w 1 godz. po posiłku $<120\text{mg/dl}$, w nocy $>60\text{mg/dl}$ zaś kontrolę stężenia glikowanej hemoglobiny należy dokonywać co 6 tygodni [5, 22]. Oprócz samej kontroli glikemii, kobiety w ciąży z cukrzycą przedciążową powinny mieć wykonywane regularne kontrole okulistyczne, co najmniej jeden raz w każdym trymestrze ciąży [22].

Lekiem z wyboru u kobiet z cukrzycą przedciążową, zarówno w okresie przedkoncepcyjnym jak i przez cały okres trwania ciąży jest insulina [9,22]. Zasadą jest intensywna terapia insulinowa, najlepiej przy użyciu osobistej zewnętrznej pompy insulinowej z zastosowaniem ciągłego podskórnego wlewu insuliny (CSII – continuous subcutaneous insulin infusion) [10,22].

5. Gestational Diabetes Mellitus – Cukrzyca ciążowa (GDM)

Cukrzyca ciążowa obejmuje zaburzenia tolerancji glukozy, które po raz pierwszy wystąpiły albo zostały wykryte w trakcie ciąży. Na cukrzycę ciążową chorują głównie kobiety, u których hiperglikemia rozwinęła się w czasie ciąży, ale oczywiście w grupie tej mogą znaleźć się również takie, u których cukrzyca (zarówno typu 1 jak i 2) istniała przed ciążą, lecz nie została wykryta [22].

Czynniki ryzyka rozwinięcia cukrzycy ciążowej obejmują: wywiad rodzinny w kierunku cukrzycy typu 2, cukrzyca ciążowa w przeszłości (u 30% kobiet powtarza się w kolejnej ciąży), wielorództwo, ciąża po 35 rż, urodzenie uprzednio dzieci o masie powyżej 4 kg, zgon wewnątrzmaciczny, urodzenie noworodka z wadą, nadciśnienie tętnicze lub BMI>27kg/m² przed ciążą [4,22].

Obecnie wyróżnia się dwie klasy cukrzycy ciążowej: G1 –gdy dla uzyskania normoglikemii wystarcza leczenie dietą oraz G2 – gdy dla uzyskania normoglikemii konieczne jest leczenie dietą oraz insuliną [5,22]. Pozytywną cechą cukrzycy ciążowej jest fakt, iż po porodzie najczęściej dochodzi do normalizacji glikemii, choć uważa się, że większość przypadków cukrzycy ciążowych stanowi de facto wolno rozwijająca się cukrzyca 2 typu [11,22]. Wskazuje się również na podobieństwa genetyczne między cukrzycą ciążowych a cukrzycą 2 typu. Sugeruje się, że cukrzyca ciążowa oraz cukrzyca typu 2 mogą mieć wspólne podłoże genetyczne, tj. niektóre warianty genów związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 mogą również predysponować do pojawienia się cukrzycy ciążowej [15,22].

Podstawową kwestią w opiece położniczej jest wczesne rozpoznanie cukrzycy ciążowej oraz wdrożenie właściwego postępowania leczniczego. Wczesne wykrycie zaburzeń gospodarki węglowodanowej jest jednym z podstawowych parametrów rzutujących na rozwój nienarodzonego dziecka i jego późniejszą kondycję zdrowotną.

Pierwsze oznaczenie stężenia glukozy we krwi powinno być wykonane na samym początku ciąży, przy okazji pierwszej wizyty u ginekologa, w celu zdiagnozowania ewentualnych, niewykrytych wcześniej zaburzeń gospodarki węglowodanowej [22]. Gdy wynik pomiaru glikemii na czczo wynosi poniżej 100mg/dl, ciężarna powinna zostać zakwalifikowana do diagnostyki pomiędzy 24–28 tygodniem ciąży. Gdy glikemia na czczo jest nieprawidłowa i wynosi między 100mg/dl a 125mg/dl, należy wykonać w jak najkrótszym czasie test obciążenia 75g glukozy, natomiast w przypadku, gdy stężenie glukozy na czczo jest równe bądź wyższe niż 126mg/dl należy powtórzyć badanie na czczo i w razie ponownego wyniku równego lub wyższego niż 126mg/dl należy rozpoznać cukrzycę ciążową [5,22].

Leczenie kobiety z rozpoznaną cukrzycą ciążową stanowić może leczenie wyłącznie dietą lub dietą i insuliną. Należy podkreślić, że dieta cukrzycowa stanowi podstawę terapii cukrzycy ciążowej i powinna być prawidłowo skonstruowana pod względem jakości i ilości składników [22].

Dzienna racja pokarmowa powinna składać się w 40–45% z węglowodanów (z przewagą złożonych – warzywa, pieczywo pełnoziarniste, kasze), w 30% z białka, w 20–30% z tłuszczów (z przewagą wielonienasyconych) [18,22]. Przyjmowane posiłki powinny zabezpieczyć prawidłowy przyrost masy ciała, tj. średnio 8–12kg w zależności od wyjściowej masy ciała. Prawidłowa dieta zapewnia fizjologiczny rozwój płodu i pozwala na lepszą kontrolę metaboliczną cukrzycy a nawet redukcję dawek insuliny [5 18, 22].

Wszystkie kobiety w ciąży, szczególnie zaś ze zdiagnozowaną cukrzycą ciążową należy również uczulać na konieczność podejmowania umiarkowanej, systematycznej aktywności fizycznej. Wysiłek fizyczny bowiem nie tylko wspomaga rozkład glukozy, lecz również zmniejsza insulinooporność tkanek [22].

W każdym przypadku, gdy leczenie dietetyczne nie zapewnia wyrównania metabolicznego cukrzycy należy dodatkowo wdrożyć insulinoterapię. Terapeutyczne dawki insuliny w cukrzycy ciążowej wahają się od kilku do kilkudziesięciu jednostek na dobę, zawsze dobierane być powinny indywidualnie, według poziomów glikemii [5,22].

W trakcie ciąży u kobiet z cukrzycą ciążową pamiętać należy również o zwiększonym ryzyku wystąpienia nadciśnienia indukowanego ciążą (częstość występowania ocenia się na 9,9–30% w porównaniu z 4,3% w grupie kontrolnej [6]) oraz stanu przedrzucawkowego [22]. Przyczyny częstszego występowania tych patologii upatruje się w mikroangiopatii cukrzycowej oraz w niewystarczającym metabolicznym wyrównaniu cukrzycy [6,22].

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej i wynikające z nich inne patologie jak zaburzenia lipidowe pojawiają się najczęściej w drugiej połowie ciąży i skutkować mogą występowaniem nadmiernej masy płodu (powyżej 90 centyla dla danego wieku ciążowego) lub makrosomii (bezwzględna masa płodu powyżej 4200g) [5,22]. W patomechanizmie tych zmian uwzględnić należy działanie samej glukozy. Glukoza przenikająca przez łożysko w nadmiarze, powoduje u płodu przerost komórek beta i ich wtórną nadczynność. Efektem nadczynności komórek beta płodu mogą być stany hiperinsulinemii zaś nadmierna produkcja insuliny płodowej prowadzi bezpośrednio do nadmiernego wzrostu dziecka. [6,22] Insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu I i II (insulin-like growth factors – IGF) są głównymi czynnikami wzrostu płodu [6,22].

Zarówno hiperglikemia jak i hiperinsulinemia płodowa stymuluje proces lipogenezy i rozrost tkanki tłuszczowej. Nadmierna masa płodu, makrosomia odpowiadać mogą za występowanie urazów okołoporodowych. Wiąże się z nimi również coraz większy odsetek cesarskich cięć i urazów okołoporodowych kanału rodnego rodzącej [5,22].

Po porodzie dziecka matki z cukrzycą należy szczególną opieką otoczyć noworodka. Ze względu na możliwe powikłania związane z zaburzeniami metabolicznymi w okresie życia płodowego, stan kliniczny noworodka trzeba ocenić bardzo wnikliwie oraz pilnie monitorować funkcje życiowe w pierwszych dobach po narodzinach [22]. Nadmierna produkcja insuliny u płodu

w odpowiedzi na hiperglikemię u matki może być przyczyną ciężkiej hipoglikemii w okresie noworodkowym (hipoglikemia u noworodka klinicznie manifestuje się niepokojem, niechęcią do picia, błądzością powłok skórnych, płaczliwością, drżeniami, przyspieszeniem oddechu, drgawkami, ze śpiączką włącznie) [9,22]. Poza hipoglikemią, należy brać pod uwagę też inne zaburzenia u noworodka matki z cukrzycą (hiperbilirubinemii, hipokalcemii czy hipomagnezemii) [9,22].

6. Podsumowanie

Cukrzyca towarzysząca ciąży stanowi poważny problem kliniczny, gdyż wiąże się z wysokim ryzykiem zdrowotnym zarówno dla matki jak i dziecka. Jednocześnie może indukować odległe zaburzenia metaboliczne u dzieci z ciąż powikłanych cukrzycą. Leczenie zaburzeń gospodarki węglowodanowej u kobiet w ciąży wymaga specjalistycznej opieki lekarskiej oraz dyscypliny i samokontroli ze strony pacjentki. Bardzo istotnym zagadnieniem jest również edukacja matek w zakresie prawidłowej pielęgnacji noworodka, która obejmuje też odpowiednie karmienie – karmienie piersią, które wywiera dobroczynny wpływ na rozwój dziecka, szczególnie z ciąży powikłanej cukrzycą.

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Ewie Dmoch–Gajzlerskiej – Kierownik Zakładu Dydaktyki Ginekologiczno – Położniczej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za życzliwe przyjęcie niniejszej pracy do recenzji.

Literatura:

1. Wender–Ożegowska E., Zawiejska A. Cukrzyca i ciąża, problem nie tylko diabetologów i położników. *Przew. Lek.* 2007; 4: 64–72.
2. Karnafel W., Józwicka E. Cukrzyca a ciąża. *Przew. Lek.* 2000; 2: 82–83.
3. Coban E., Ozdogan M., Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol.* 2004; 112: 126–128.
4. Sieradzki J. Cukrzyca u kobiet w ciąży. W: Szczeklik A. (red.). *Choroby wewnętrzne*. Wydawnictwo Medycyna praktyczna, Kraków 2009: 657–659.
5. Standardy Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego postępowania u kobiet z cukrzycą. *Ginekol. Pol.* 2011; 82: 474–479.
6. Wilczyński J., Dziatosz K. Cukrzyca ciążowa – ryzyko dla matki i jej dziecka. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia* 2009; 2: 85–89.
7. Langer O., Conway D.L. Level of glycemia and perinatal outcome in pregestational diabetes. *J. Matern. Fetal. Med.* 2000; 9: 35–41.
8. American Diabetes Association. Preconception, Care in women with diabetes. *Diabetes Care* 2001; 1: 66–68.
9. Otto–Buczowska E. Cukrzyca matki czynnikiem ryzyka dla płodu i noworodka. *Gin. Prakt.* 2003; 11: 29–33.

10. Gabbe S.G. New concepts and applications in the use of the insulin pump during pregnancy. *J. Matern. Fetal. Med.* 2000; 9: 42–45.
11. Chu S.Y., Callaghan W.M., Kim S.Y., Schmid C.H., Lau J., England L.J., Dietz P.M. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes care* 2007; 8: 2070–2076.
12. Lauenborg J., Mathiesen E., Hansen T., et al. The prevalence of the metabolic syndrome in a danish population of women with previous gestational diabetes mellitus is three-fold higher than in the general population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 4004–4010.
13. Lauenborg J., Grarup N., Damm P., et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 145–150.
14. Lauenborg J., Hansen T., Jensen D.M., et al. Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population. *Diabetes Care* 2004; 27: 1194–1199.
15. Telejko B. Gestational diabetes and the risk of metabolic syndrome for mother and child. *Przeg. Kardiometabol.* 2010; 5: 120–122.
16. Konarzewska J., Wójcikowski C. Risk of diabetes mellitus after pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus (GDM). *Ginekol. Pol.* 2004; 75: 754–759.
17. Wójcikowski C., Królikowska B., Konarzewska J., et al. The prevalence of gestational diabetes mellitus in Polish population. *Ginekol. Pol.* 2002; 73: 811–816.
18. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2010. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetol. Prakt.* 2010; 11: 38–43.
19. Langer O., Conway D.L. Level of glycemia and perinatal outcome in pregestational diabetes. *J. Matern. Fetal. Med.* 2000; 9: 35–41.
20. Coustan D.R., Lowe L.P., Metzger B.E., et al. The Hyperglycemia and Adverse Perinatal Outcome (HAPO) study: paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010; 202: 654–656.
21. Manderson J.G., Mullan B., Patterson C.C., Hadden D.R., Traub A.I., McCance D.R. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetol.* 2002; 45: 991–996.
22. Stępkowska J.K. Cukrzyca w ciąży, Położna. *Nauka i Praktyka.* 2013; 3, praca w druku.

Pracę recenzowała:

**Pani Prof. dr hab. n. med. Ewa Dmoch–Gajzlerska,
Kierownik Zakładu Dydaktyki Ginekologiczno–Poloźniczej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.**

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u ciężarnych – etiopatogeneza i leczenie

Streszczenie

Cukrzycą określa się zespół przewlekłych zaburzeń metabolicznych, objawiających się hiperglikemią spowodowaną bezwzględny lub względnym niedoborem insuliny, który prowadzi do zaburzeń w metabolizmie węglowodanów, białek, tłuszczów i w gospodarce wodno–elektrolitowej.

Cukrzyca ciążowa obejmuje zaburzenia tolerancji węglowodanów, rozwijające się lub po raz pierwszy rozpoznane w czasie trwania ciąży. Po porodzie zaburzenia tolerancji glukozy zazwyczaj ustępują, jednak u części pacjentek w następnych latach ujawniają się stany przedcukrzycowe lub cukrzyca typu 2.

U kobiet z cukrzycą ciążową częściej obserwowane są powikłania w trakcie ciąży i porodu. Częściej obserwuje się również powikłania wśród noworodków.

Wczesne rozpoznanie choroby może ograniczyć narażenie płodu na matczyną hiperglikemię i zmniejszyć ryzyko powikłań. Cięża powikłana cukrzycą stanowi ciężę wysokiego ryzyka i wymaga szczególnego nadzoru ze strony specjalistów różnych dziedzin nad ciężarną i jej dzieckiem.

Słowa kluczowe: ciąża, cukrzyca przedciążowa, cukrzyca ciążowa, kontrola glikemii, leczenie cukrzycy ciążowej.

Disorders of carbohydrate metabolism in pregnancy – etiology and treatment

Abstract

The term of diabetes mellitus describes a syndrome of chronic metabolic disorders, manifested by hyperglycaemia, resulting from either absolute or relative hypoinsulinaemia, leading to disturbances in the metabolism of carbohydrates, proteins, fats, and in the water–electrolyte balance.

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as a carbohydrate intolerance of varying severity with onset or first recognition during pregnancy. Most women with GDM return to normal glucose tolerance after delivery, but have an increased risk of developing diabetes in the next years. In women affected by GDM, complications are more frequently observed, both in the course of pregnancy and during delivery, as well as problems are also more frequent in neonates from mothers with GDM vs. healthy newborns.

Early diagnosis of the disease may reduce fetal exposure to maternal hyperglycemia and decrease the risk of complications.

Diabetic pregnancy is a high risk pregnancy, requiring targeted, highly specialized monitoring of woman and foetus by physicians of different specializations.

Key words: pregnancy, pregestational diabetes, gestational diabetes, glycemic control, management of gestational diabetes.

Autor:

*Lek. med. Justyna Kinga Stępkowska, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Wydział Nauki o Zdrowiu, Zakład Dydaktyki Ginekologiczno–Poloźniczej.*

E–mail: jstepkowska@wum.edu.pl.

Zachowania zdrowotne studentów lubelskich uczelni

Wstęp

Czym są zachowania zdrowotne? Najogólniej mówiąc są to czynności lub ich brak, podjęte w celu podnoszenia potencjału zdrowia lub jego utrzymania. Zachowania te mogą mieć charakter pozytywny, wtedy nazywamy je prozdrowotnymi lub negatywny, czyli antyzdrowotny. Biorąc pod uwagę czynniki środowiskowe mające istotny wpływ na zachowanie zdrowia, zaliczyć można między innymi: sposób odżywiania, aktywność fizyczną, pewne postawy oraz nawyki, co stanowi ogólnie pojęty styl życia. W ramach badań na bazie, których powstała poniższa publikacja postanowiliśmy wziąć pod lupę podejście studentów lubelskich uczelni wyższych do własnego zdrowia oraz do podstawowych badań laboratoryjnych. Interesujące jest czy osoby zdobywające wykształcenie wyższe i posiadające potencjalną wiedzę na temat prawidłowych zachowań zdrowotnych stosują się do nich. Poza ogólnie pojętym stylem życia mającym wpływ na zachowanie zdrowia, ważne są również efekty działania medycyny, do których poniekąd zaliczyć możemy badania laboratoryjne oraz niektóre działania profilaktyczne. Profilaktyka chorób to wszelkie działania i środki stosowane w celach zapobiegawczych. Może być prowadzona na różnych poziomach i w różnych strategiach. Jednym z ważniejszych zachowań prozdrowotnych jest wykonywanie laboratoryjnych badań profilaktycznych. Są to badania tak mało wymagające, bo głównej mierze bezbolesne, nieinwazyjne, powszechnie dostępne oraz szybkie, a zarazem niosące za sobą wiele korzyści. Stanowią często pierwszy krok w wieloetapowej diagnostyce poważnych schorzeń [1–6].

Do panelu laboratoryjnych badań diagnostycznych zaliczamy między innymi: morfologię krwi z rozmazem, analizę ogólną moczu, badanie kału oraz badania biochemiczne. Oznaczanie morfologiczne parametrów czerwono- i białokrwinkowych może być bardzo przydatne we wstępnym rozpoznaniu

¹Email: natalia_from@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

²Email: ilonkadudek@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

³Email: pgil.poczt@vp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

choroby układu krwiotwórczego i krwionośnego, takich jak anemia czy białaczka oraz innych patologii. Analiza ogólna moczu natomiast dostarcza informacji na temat stanu układu moczowego, zakażeń dróg moczowych oraz układu krążenia. Dzięki temu badaniu możemy również uzyskać informacje na temat obecności u pacjenta chorób metabolicznych jak np. cukrzyca. Z kolei w ramach badań biochemicznych możemy wykonać pomiar poziomu glukozy, lipidogram, enzymy wątrobowe, hormony. Odpowiednio wczesne wykrycie i prawidłowo postawiona diagnoza pozwala w większości przypadków na skuteczne wyleczenie lub zapobiegnięcie rozwoju choroby. Ze względu na to, że wiele jednostek chorobowych przebiega bezobjawowo, często jedynym sposobem ich ujawnienia w odpowiednio wczesnym stadium, jest wykonanie badań profilaktycznych [1–6].

1. Cel pracy

Celem naszej pracy było zobrazowanie podejścia studentów lubelskich uczelni wyższych, do własnego zdrowia, profilaktyki najpowszechniejszych chorób, podstawowych badań laboratoryjnych, oraz rozumienia wyników badań.

Postanowiłyśmy również sprawdzić oraz przedstawić źródła, z których młodzi ludzie czerpią wiedzę na tematy związane z medycyną, profilaktyką oraz zachowaniem zdrowia.

2. Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 350 studentów, w tym 249 kobiet.

Przepytaliśmy studentów w wieku od 19 do 26 lat, z czego większość stanowili 24-latkowie.

Badani byli studentami następujących lubelskich uczelni wyższych: Uniwersytet Przyrodniczy (30%), Uniwersytet Marie Curie-Skłodowskiej (27%), Politechnika (15,5%), Katolicki Uniwersytet Lubelski (13%), Uniwersytet Medyczny (10%). Wśród ankietowanych, przeważającą część stanowią mieszkańcy wsi (ok. 37%), oraz dużego miasta (30%). Pozostali to mieszkańcy mniejszych miast (ok. 33%).

Spośród pytaných, ok. 43,2% określa swój status materialny jako średni, znaczna mniejszość, bo nieco mniej niż 6% deklaruje status bardzo dobry.

Wyniki badań zostały uzyskane na podstawie własnej autorskiej ankiety zawierającej 50 pytań (w niniejszym opracowaniu wykorzystano część wyników przeprowadzonej ankiety, pozostałe stanowią podstawę innego opracowania). Formularze rozesłane zostały drogą internetową, a studenci wybrani zostali losowo i odpowiadali na pytania anonimowo.

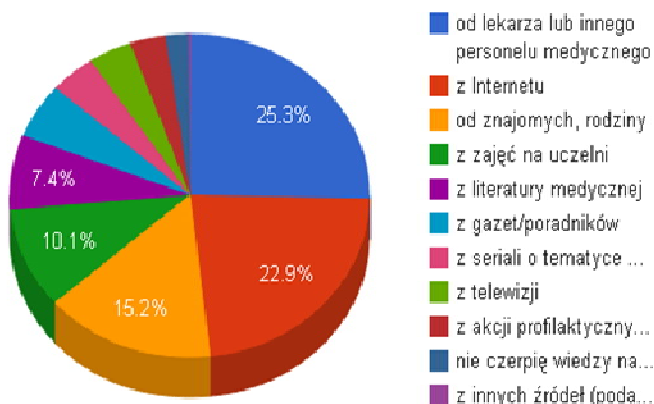
3. Wyniki badań

Respondenci na pytanie „czy dbasz o swoje zdrowie?” Najczęściej odpowiadali „nie dbam”, 1/3 z nich odpowiedziało, iż nieszczególnie dba o swoje zdrowie, jedynie 20% ankietowanych odpowiedziało twierdząco „tak, dbam o własne zdrowie”. Ponad 2/3 studentów twierdzi, że żyje w ciągłym stresie, tylko 15% z nich deklaruje, że potrafi sobie z nim radzić. Na pytanie jak określają swój sposób odżywiania, studenci najczęściej odpowiadali „odżywiam się niezdrowo” lub „odżywiam się niezbyt zdrowo”, jedynie 19% ankietowanych deklaruje zdrowy sposób odżywiania. Co do aktywności fizycznej respondenci przyznają, iż „nie uprawiają sportu”(34%), 22% odpowiedziało, że uprawia sport, ale nieregularnie. Pozostali deklarują regularną aktywność fizyczną. Na pytanie o stosowanie używek studenci odpowiedzieli następująco: 31% regularnie pije alkohol i\lub pali papierosy. 40% odpowiedziało „zdarza mi się, natomiast ok. 1/3 nie pije regularnie alkoholu i nie pali papierosów. Zdecydowana większość respondentów (ponad 90%) przynajmniej raz w życiu wykonała badania laboratoryjne. Połowa z nich wykonała badania w ciągu ostatnich 6 miesięcy, a prawie 1/4 w przeciągu ostatniego roku. Niepokojące jest jednak to, że ok. 7,4% ankietowanych przyznaje, że nigdy do tej pory nie wykonało żadnego badania laboratoryjnego. Zdecydowana większość badanych studentów zdaje sobie sprawę, że badania laboratoryjne są niezbędne do diagnozy wielu chorób.

Studenci niewykonyjący badań, jako usprawiedliwienie najczęściej podawali: brak symptomów choroby, brak czasu deklarowało 58 osób, strach przed pobraniem krwi – 52 osoby. Ok. 10% studentów nie wiedziało, że badania laboratoryjne można wykonać w celach profilaktycznych, i że cena badań panelu podstawowego jest dość niska. Taki sam odsetek ankietowanych unika badań, ze względu na obawy wykrycia u siebie możliwej choroby.

Młodzi ludzie najczęściej wykonywali badania krwi, moczu i kału. W 1/3 przypadków badania te były wykonane na zlecenie lekarza, a 76 pytanych wykonało badania z własnej inicjatywy.

Byliśmy również ciekawi, z jakich źródeł wiedzy korzystają studenci poszukując informacji na temat badań laboratoryjnych oraz profilaktyki chorób. Rozkład uzyskanych odpowiedzi prezentował się w następujący sposób: rysunek [1].



Rys.1. Przedstawia źródła informacji na temat badań profilaktycznych, z których najczęściej korzystają studenci [opracowanie własne]

W celu sprawdzenia wiedzy badanych na temat jednego z podstawowych i najczęściej wykonywanych badań diagnostycznych, a mianowicie morfologii, zapytaliśmy studentów czy wiedzą, na czym dokładnie polega to badanie. Ok. 95% studentów wie, czym jest badanie morfologiczne krwi jednakże prawie połowa z nich nie potrafi rozszyfrować pojawiających się na wyniku skrótów takich jak: RBC (Red Blood Cells, czyli krwinki czerwone), WBC (White Blood Cells, czyli krwinki białe), oraz PLT (Platelets, oznaczające płytki krwi).

W ramach podstawowego panelu badań wykonuje się również biochemiczne oznaczanie lipidów krwi. W związku z tym zadaliśmy pytanie czy lubelscy studenci wiedzą, czym są frakcje HDL i LDL cholesterolu. Blisko połowa z nich posiada podstawową wiedzę na ten temat, 1/4 tylko częściowo, z kolei prawie 30% respondentów nie rozróżnia frakcji cholesterolu o wysokiej (HDL) i niskiej (LDL) gęstości lipoprotein, potocznie zwanego dobrym i złym cholesterolu.

Połowa badanych studentów uważa, że badania powinny być wykonywanie przynajmniej raz w roku natomiast pozostali twierdzą, że taka konieczność istnieje dwa razy w roku.

Coraz prężniej rozwijającym się w ostatnich czasach działem diagnostyki jest genetyka laboratoryjna. Dlatego też byliśmy zainteresowani czy lubelscy studenci posiadają wiedzę związaną z tym tematem. 82% badanych słusznie kojarzy badania genetyczne z diagnostyką chorób genetycznych, oraz równie często nasuwają się skojarzenia z kryminalistyką i ustalaniem ojcostwa. Poprosiliśmy badanych by wybrali kilka określeń, które według nich najlepiej obrazują badania genetyczne, co prezentujemy w poniższej tabeli:

Tabela 1. W tabeli przedstawiono rozkład odpowiedzi dotyczących badań genetycznych

	Odpowiedzi	Ilość	Procent
1	Badania genetyczne można wykonać u każdego człowieka	264	31,13
2	Badania genetyczne są bezpieczne, bezbolesne i nie są obciążone żadnym ryzykiem	215	25,35
3	Badania genetyczne można wykonać z próbki krwi	197	23,23
4	Badania genetyczne można wykonać przed zajściem w ciążę	105	12,38
5	Badania genetyczne są bardzo skomplikowane i wykonuje się je bardzo rzadko	60	7,08
6	Badania genetyczne są bardzo inwazyjne, bolesne i niebezpieczne	5	0,59
7	Badania genetyczne nie są wykonywane w Polsce	2	0,24

Źródło: Opracowanie własne

Jak pokazują badania, nasi studenci wykazują się również znaczącym poziomem wiedzy na temat choroby cywilizacyjnej jaką jest cukrzyca. Wiedzą oni, że choroba ta może dotknąć każdego z nas. Studenci są świadomi, że w celu postawienia diagnozy cukrzycy, nie można kierować się jednorazowym, przygodnym oznaczaniem poziomu glukozy we krwi włośniczkowej za pomocą glukometru, natomiast w celu postawienia diagnozy, należy wykonać badania według konkretnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego.

W celu podsumowania naszych badań poprosiliśmy ankietowanych, aby samodzielnie ocenili swój stan wiedzy z zakresu laboratoryjnych badań profilaktycznych. W tym celu stworzyliśmy skalę od 1 do 5, gdzie 1 to bardzo słaby stan wiedzy, natomiast 5 – odzwierciedla stan bardzo dobry.

Niecałe 50 % respondentów określa swój poziom wiedzy dostatecznie, natomiast blisko 30% twierdzi, że jest dobrze zorientowanych w kwestii profilaktyki laboratoryjnej. Wśród pozostałej części studentów (ok. 20%) samoocena wypadła raczej słabo.

4. Wnioski

W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że studenci nie przykładają się zbyt do dbania o własne zdrowie. Wśród studentów przeważają raczej zachowania antyzdrowotne niż prozdrowotne. Po za tym większość studentów żyje w ciągłym stresie, a tylko nieliczni potrafią sobie z nim radzić. Większość deklaruje, że odżywia się niezdrowo i nie prowadzi aktywnego trybu życia. Na podstawie przeprowadzonych przez nas badań, możemy twierdzić też, że lubelscy studenci posiadają znaczącą wiedzę na temat profilaktyki oraz wykonywanych w jej celu badań laboratoryjnych. Dość istotny jest również fakt, iż potrafią samodzielnie ocenić swoją wiedzę na ten temat. Są oni zorientowani co na wyniku badań oznaczają podstawowe skróty oraz czym zajmuje się genetyka laboratoryjna.

Młodzi ludzie są świadomi, że badania należy wykonywać nie tylko, gdy pojawią się symptomy choroby, ale bardzo ważne jest regularne monitorowanie stanu swojego zdrowia. Studenci wiedzą również, że odpowiednio wczesne zdiagnozowanie danej choroby, umożliwia skuteczniejsze i szybsze jej leczenie. Jak wynika z badań, najbardziej znaczącą rolę w edukacji zdrowotnej młodych ludzi odgrywają lekarze mający bezpośredni kontakt ze studentami. W związku z tym, powinni oni dokładać wszelkich starań, aby w możliwie największym stopniu kształtować świadomość młodego pokolenia o wielkiej wadze wczesnej profilaktyki oraz namawiać do prozdrowotnego stylu życia.

Należy mieć, świadomość, że informacje zamieszczane w sieci powinny być rzetelne i potwierdzone, gdyż znaczna większość młodych ludzi swoją wiedzę czerpie właśnie z Internetu. Bardzo łatwy dostęp oraz mnogość informacji nie są niestety gwarantem ich wiarygodności, z tego też względu należy zawsze potwierdzać zwłaszcza te informacje, które mogą przyczyniać się do pogorszenia stanu zdrowia. W całościowym ujęciu, należy przyznać, że wyniki badań są dla nas satysfakcjonujące. Świadczą one o dość dużym zaangażowaniu młodego pokolenia w profilaktykę własnego zdrowia oraz świadomości na temat stanu zdrowia społeczeństwa. Dzięki przeprowadzonym badaniom jesteśmy w stanie przynajmniej w pewnym stopniu wskazać, które dziedziny diagnostyki laboratoryjnej należy bardziej promować, aby polepszyć, jakość leczenia lub zupełnie zapobiec pewnym stanom chorobowym. Niepokojący jest jednak fakt, iż mimo tak wysokiego stanu wiedzy na temat profilaktyki chorób, studenci rzadko się do niego stosują.

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Romanowska-Tłoczko A. Styl życia studentów oceniany w kontekście zachowań zdrowotnych. *Hygeia Public Health* 2011, 46(1): 89–93.
2. Pietryka Michałowska E., Wdowiak L. Zachowania zdrowotne studentów akademii medycznej. I. Wpływ czynników demograficznych na ocenę zachowań zdrowotnych. *Zdr Publ* 2004; 114(3):326–330.
3. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Red. A. Dembińska-Kieć, J. W. Naskalski. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2010.
4. Badania laboratoryjne w hematologii. Red. J. Fabijańska-Mitek, J. Windyga. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009.
5. Choroby wewnętrzne. Red. A. Szczeklik. Medycyna Praktyczna. Kraków 2010.
6. Wiedza o nowotworach i profilaktyce w województwie lubelskim. M. Nowakowski. Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej. Lublin 2010.

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Zachowania zdrowotne studentów lubelskich uczelni

Streszczenie

Praca ma na celu przedstawienie postaw studentów uczelni lubelskich, dotyczących dbania o własne zdrowie. Studenci wypowiedzieli się na temat stylu życia, jaki prowadzą, sposobu radzenia sobie ze stresem, aktywności fizycznej oraz sposobu odżywiania. W pracy poruszyliśmy też temat profilaktyki chorób oraz źródła, z jakiego studenci czerpią wiedzę na ten temat. Artykuł ten został napisany na podstawie wyników badań uzyskanych metodą sondażu diagnostycznego z wykorzystaniem autorskiego kwestionariusza. W tym celu przepytano 350 studentów, wybranych losowo, a przeprowadzona ankieta była anonimowa. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że studenci żyją w stresie i mały odsetek z nich potrafi sobie z nim radzić. Młodzi ludzie nie przykładają zbyt dużej wagi do zdrowego stylu życia. Stan wiedzy studentów odnośnie profilaktyki chorób jest zadowalający. Nasuwającym się wnioskiem jest jednak konieczność stałego poszerzania zasobów wiedzy młodych ludzi, poprzez propagowanie zdrowego stylu życia i przeprowadzania w tym celu akcji profilaktycznych.

Słowa kluczowe: zachowania zdrowotne, zdrowy styl życia, diagnostyka, profilaktyka

Health behavior of Lublin university students

Abstract

The article below aims at showing attitudes of Lublin university students towards taking care of their own health. Students said about life-style that they are leading, physical activity and nutrition. They also told us how do they cope with stress. The other problem that we mentioned in this study was disease prevention and the sources where young people are looking for information about it. The article was written on the basis of the results obtained using the diagnostic poll method with the use of an original survey questionnaire. In order to do this, 350 randomly selected students were surveyed, and the poll was anonymous. Based on the obtained results, one may state that students live in stress and just a small part of them is able to cope with it. Young people don't care too much about healthy life-style. The level of knowledge in relation to preventive laboratory tests is satisfying. However, the conclusion that comes to mind is that there is still a need for the continuous efforts to increase young people's knowledge through the promotion of healthy life-style and through the undertaking of prophylactic efforts for this reason.

Key words: health behaviors, healthy lifestyle, diagnostics, prophylaxis

Autorzy pracy:

Natalia Frączek, natalia_from@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

Ilona Dudek, ilonkadudek@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

mgr Paulina Gil-Kulik, pgil.poczta@vp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

Zagrożenie zanieczyszczenia środowiska oocystami pierwotniaka *Cryptosporidium parvum*

Wstęp

Cryptosporidium jest kosmopolitycznym (występującym we wszystkich krajach świata) i monoksenicznym (rozwój odbywa się u jednego żywiciela) pasożytem, głównie jelita cienkiego. Osiedla się w enterocytach w wakuoli między cytoplazmą, a błoną komórkową. Spotykane są również przypadki inwazji pierwotniaka w układzie oddechowym szczególnie u dzieci, ale do tej pory nie został opisany cykl rozwojowy w tym układzie. Najbardziej pierwotniak zasiedla drogi żółciowe, pęcherzyk żółciowy, spojówkę oraz przewody trzustkowe. Najbardziej rozpowszechniony w środowisku jest *C. parvum*, posiada aż 152 żywicieli. Gatunek *C. parvum* obejmuje ponad 90 typów i składa się na niego kilka populacji o różnych genotypach i odmiennej specyficzności gatunkowej, w tym genotyp antropotyczny atakujący wyłącznie ludzi, genotyp zoonotyczny występujący u ludzi i przeżuwaczy oraz wiele innych genotypów odpowiedzialnych za infekcje u naczelnych, świni, myszy, psów i innych. [1, 2]

Cryptosporidium parvum jest drobnym, owalnym pierwotniakiem o wielkości 2–3 μm . W jelicie cienkim żywiciela występuje w postaci wegetatywnej czyli trofozoitu, zdolnego do wykonywania podstawowych czynności życiowych. [3]

Szacuje się, że u zdrowych ludzi dawka inwazyjna wynosi około 10 oocyst, a u osób z obniżoną odpornością już jedna może wywołać chorobę. Według danych WHO dla dawki wynoszącej 1000 oocyst prawdopodobieństwo inwazji wynosi 100%. [4, 5]

Wrotami inwazji pasożyta są w organizmie człowieka jama ustna i jama nosowa. Oocysty mogą dostawać się do naszego ustroju wraz z zanieczyszczonym pożywieniem/wodą lub inhalacyjnie z wdychanym powietrzem. Postać inwazyjna pierwotniaka może wnikać na drodze kontaktu z zarażonym zwierzęciem lub pacjentem. Największym rezerwuarem

¹ Studenckie Koło Naukowe działające przy Katedrze i Zakładzie Biologii z Genetyką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, grzegorz.adamczuk3@wp.pl

² Studenckie Koło Naukowe działające przy Katedrze i Zakładzie Biologii z Genetyką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, m.czochra@gmail.com

zoonotycznym są zarażone zwierzęta, które wraz z kałem wydalają oocysty do środowiska i są ciągłym źródłem inwazji. Szczególnie cielęta zarażone w warunkach naturalnych wydalają kilka do kilkunastu milionów oocyst na dobę. Opisano również zarażenia człowieka oocystami wydalanymi wraz z kałem przez koty, psy i konie. Zauważono jednak, że czasem stały i bliski kontakt ludzi ze zwierzętami hodowanymi może powodować zwiększoną odporność na inwazję i wzrost liczby przypadków bezobjawowej kryptosporidiozy. [6, 7]

Cryptosporidium nie roznosi się poprzez kontakt z zarażoną krwią. Główną drogą zarażenia jest zanieczyszczona oocystami woda powierzchniowa, wodociągowa, bądź woda na pływalniach, co udowodniono na podstawie analizy przyczyn licznych epidemii. W USA oocysty *Cryptosporidium* stwierdzono w 65 – 97% badanych próbkach wody. Bezpośrednie zarażenia człowiek – człowiek są najczęstsze w skupiskach ludzi jakie stanowią domy opieki, przedszkola itp. Nierzadko dochodzi do zarażeń rodzinnych. U osób immunologicznie kompetentnych oocysty są wydalane zazwyczaj przez 1 – 2 tygodnie, natomiast osoby z obniżoną odpornością stanowią źródło zarażenia przez wiele miesięcy, a niekiedy przez lata. [6, 8]

Kryptosporidioza jest jedną z najpowszechniejszych na świecie chorób zakaźnych przenoszonych przez wodę. Stanowi ona ponad 50% chorób wywoływanych przez pasożyty bytujące w tym środowisku. Czynnikiem ryzyka zarażenia się oocystami *Cryptosporidium parvum* są:

- osoby z obniżoną odpornością,
- osoby leczone lekami immunosupresyjnymi,
- osoby chore na AIDS,
- turyści odwiedzający kraje tropikalne,
- hodowcy zwierząt, weterynarze,
- osoby chore na cukrzycę,
- osoby w młodym i podeszłym wieku,
- osoby czynnie uprawiające sporty wodne, odwiedzające baseny rekreacyjne, jacuzzi, naturalne kąpieliska,
- osoby pijące niefiltrowaną wodę z naturalnego źródła czy studni.

Objawy kryptosporidiozy zależą od stanu odporności żywiciela, który definiuje czas trwania inwazji. Symptomy choroby są niespecyficzne, występuje łagodna biegunka z obecnością śluzu w wodnistym kale, zmęczenie, osłabienie, odwodnienie, niska gorączka, bóle brzucha, nudności, obniżenie łaknienia, rzadko występują wymioty. Jeśli zarażeniu ulega układ oddechowy występuje wysoka gorączka, sięgająca 39°C, obfita wydzielina śluzowa, kaszel, duszności, a w przypadku zakażeń dróg żółciowych pojawiają się stany zapalne.

U osób z obniżoną odpornością *Cryptosporidium parvum* może przyczynić się do powstawania poważnych schorzeń, a nawet śmierci. Biegunka u osób immunoniekompentnych jest przewlekła, trwa od kilku tygodni do kilku miesięcy, w konsekwencji może prowadzić do śmierci lub do zaostrzenia się

innych zakażeń występujących oportunistycznie. Śmiertelność wśród chorych z obniżoną odpornością immunologiczną spowodowana przez zarażenie *C.parvum* sięga nawet 80%. Osoby chore na AIDS bardzo często miewają dolegliwości ze strony dróg żółciowych, jak i bóle w prawej części brzucha. Bilirubina u tych osób utrzymuje się na stałym poziomie, ale obserwuje się wzrost stężenia w surowicy fosfatazy alkalicznej i transpeptydazy gamma-glutarowej.

Rozpoznanie kliniczne kryptosporidiozy może być zarówno kliniczne, opierające się na objawach, które sugerują inwazję, a także laboratoryjne, polegające na wykryciu oocyst w kale pacjenta.

1. Cel pracy

Kryptosporidioza jest poważną chorobą ludzi i zwierząt, której objawy nie są specyficzne, dlatego też rzadko dochodzi do jej diagnozowania. Szczególnie zagrożeni są ludzie z obniżoną odpornością, gdzie inwazja *Cryptosporidium* może prowadzić nawet do śmierci. Postacie dyspersyjne wykazują dużą przetrwalność w środowisku zewnętrznym i wnikają do organizmu żywiciela najczęściej przez przewód pokarmowy.

Celem pracy jest określenie ekstensywności zarażenia *Cryptosporidium parvum* u psów oraz określenie korelacji inwazji z wiekiem, płcią, rasą i miejscem życia badanych zwierząt. Badania przeprowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) amplifikującej gen *hsp 70*.

Celem badań jest również określenie czułości i specyficzności wykorzystanych metod prowadzących do wykrycia oocyst *Cryptosporidium*.

2. Materiał i metody badań

2.1. Materiał

Do badań wykorzystano próbki kału 48 psów różnej rasy, płci, wieku oraz miejsca bytowania. Badany materiał był przechowywany w temperaturze -20°C dla zapewnienia trwałości. Do izolacji DNA z badanych próbek kału użyto zestawu GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit firmy BLIRT S.A z Gdańska (wersja zestawu 1,2). Zestaw ten zawiera następujące odczynniki:

- bufor aktywujący Buffer ST,
- minikolumnę wiążącą DNA (DNA binding spin- column),
- probówki Bead Tube,
- bufor Lyse ST,
- bufor PR,
- bufor Sol ST,
- bufor płuczący Wash STX,
- bufor wymywający DNA elution.

Do detekcji DNA użyty zestaw do elektroforezy agarozowej (BioRad). Do amplifikacji genu hsp 70 *Cryptosporidium parvum* użyto zestaw diagnostyczny PCR firmy BLIRT S.A z Gdańska (wersja 1. 2011). Zestaw wykrywa DNA nawet z jednej oocysty *C. parvum*. Zestaw zawiera następujące odczynniki:

- Master mix PCR– OUT do wstępnej amplifikacji,
- Master miź PCR– IN do reamplifikacji,
- mieszanina dNTP–s,
- termostabilną polimerazę DNA TaqNova, – kontrolę pozytywną (DNA *C. parvum*),
- marker DNA M100– 500.

Do detekcji produktów amplifikacji użyto zestawu do elektroforezy agarozowej.

2.2. Metody

- Z zamrożonego materiału pobierano po 200 mg próbek kału w celu izolacji DNA z oocyt,
- Do izolacji DNA użyto zestawu, który umożliwia usunięcie inhibitorów występujących w dużej ilości w kale. Oczyszczone DNA może zostać bezpośrednio użyte w metodzie PCR.

Do wykrywania DNA pochodzącego z oocysty *C. parvum* użyto łańcuchowej reakcji polimerazy. Enzymatycznej amplifikacji ulega fragment genu hsp 70 w układzie nested PCR, gdzie dochodzi do przeprowadzenia dwóch kolejnych reakcji PCR. W pierwszym etapie wykorzystywana jest jedna para starterów flankująca powielany fragment. Polimeraza przyłącza się do nich i syntetyzuje produkt o wielkości 361 pz. Produkt uzyskany w pierwszym etapie amplifikacji jest wykorzystany w drugim etapie, gdzie zostaje użyta druga para starterów, komplementarna do miejsc wewnątrz produktu 361 pz. Po reamplifikacji powstaje produkt 199 pz, który jest widoczny w żelu agarozowym. Warunki amplifikacji materiału:

- 2 min. 94°C (wstępna denaturacja DNA),
- 0,5 min. 94°C (denaturacja DNA),
- 0,5 min. 55°C (dołączanie starterów),
- 0,5 min 72°C (elongacja),
- 5 min. 72°C (wydłużanie końcowe).

Ilość cykli w podczas amplifikacji fragmentu DNA wynosi w tej metodzie 35. W takich samych warunkach przeprowadza się reakcje reamplifikacji.

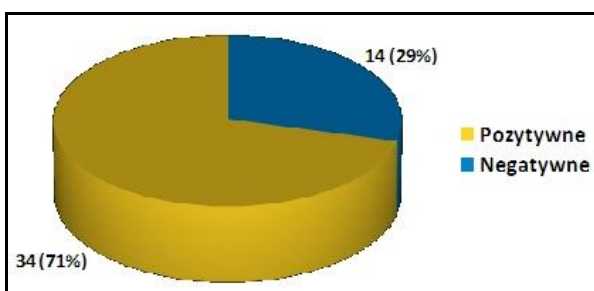
Detekcja produktów reamplifikacji polega na przeprowadzeniu elektroforezy na 2% żelu agarozowym. Wynik pozytywny występuje w przypadku obecności w żelu reakcji PCR o wielkości 199 pz.

3. Wyniki

Badanie metodą PCR na obecność oocyst *Cryptosporidium* w kale umożliwiło ich wykrycie u 34 spośród 48 badanych zwierząt, co stanowi 70,38%.

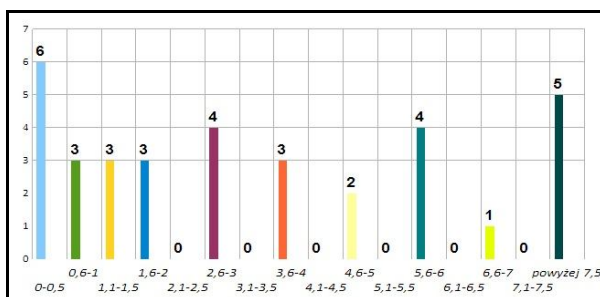
Wyniki	Ilość
Pozytywne	34
Negatywne	14

Rys. 1. Tabela przedstawiająca liczbę psów zdrowych i zarażonych *Cryptosporidium parvum*



Rys. 2. Wykres ilustrujący ilość psów chorych i zdrowych

Najwięcej zarażonych psów było w przedziale wiekowym 0–0,5 roku (6) oraz powyżej 7,5 lat (5), a następnie w wieku 2,5–3 lat (4) oraz 5,5–6 lat (4).



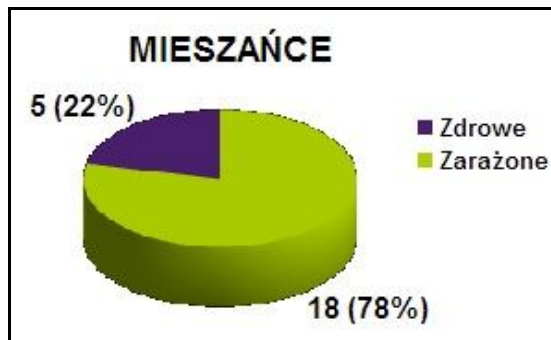
Rys. 3. Wykres ilustrujący przedział wiekowy zarażonych psów

Badaniem objęto 48 psów różnej rasy, wśród których największą grupę stanowiły mieszańce (23), następnie owczarki niemieckie (7), labradory (5), maltańczyki (4), syberian husky (3), cane corso (2), owczarek środkowoazjatycki (1), owczarek francuski (1), cairn terier (1) oraz owczarek kaukaski (1).

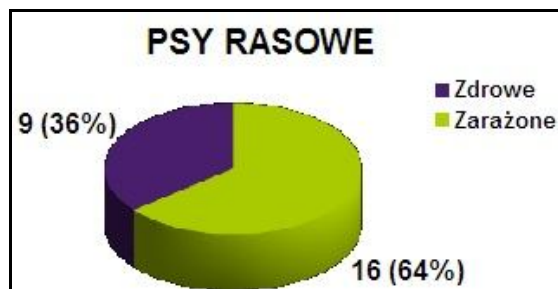
Obecność oocyst zaobserwowano u 18 mieszańców, co stanowi prawie 53% prób pozytywnych, 4 maltańczyków oraz 4 owczarków niemieckich, co stanowi po 11,8% prób pozytywnych, 2 labradorów oraz 2 syberian husky – po 5,9% prób pozytywnych, natomiast pozostałe gatunki stanowią po 3% prób dodatnich (oprócz owczarka środkowoazjatyckiego).

Rasa psa	Ilość psów	Rasa psa	Ilość psów
mieszaniec	23	cana corso	2
owczarek niemiecki	7	owczarek francuski	1
labrador	5	cairn terier	1
maltańczyk	4	owczarek środkowoazjatycki	1
syberian husky	3	owczarek kaukaski	1

Rys. 4. Tabela przedstawiająca poszczególne rasy psów zarażone oocystami *Cryptosporidium parvum*



Rys. 5. Zestawienie mieszańców ze względu na zarażenie oocystami *C. parvum*



Rys. 6. Zestawienie psów rasowych ze względu na zarażenie oocystami *C. parvum*

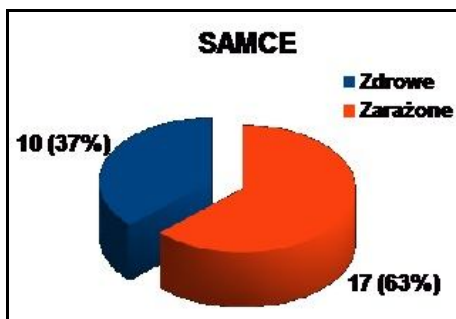
Największą ekstensywnością zarażeń zauważono w grupie wiekowej 0–0,5 roku, gdzie aż u 6 psów na 7 badanych wykryto oocysty, co stanowi 85,7% tej grupy. Nie jest to zadziwiający fakt, ponieważ młode zwierzęta są bardziej podatne na zarażenia.

W grupach wiekowych 2,5–3 oraz 5,5–6 lat również zaobserwowano wysoką ekstensywność obejmującą wszystkie psy z pierwszej grupy oraz 4 psy na 5 badanych z drugiej. Wykryto po 3 próby dodatnie w przedziałach wiekowych 0,5–1, 1–1,5, 1,5–2, 3,5–4 lat, natomiast w grupie powyżej 7,5 lat stwierdzono 5 prób dodatnich.

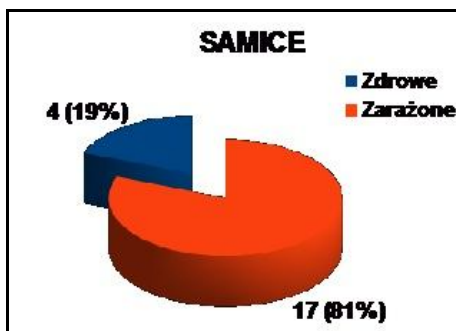
Samice stanowiły 21 badanych zwierząt, a samce 27. W grupie samców wykryto 17 prób pozytywnych, co stanowi 63% prób pozytywnych, natomiast liczba zarażonych samic to 17 osobników. Stanowi to 81 % prób pozytywnych u samic.

Ilość	Ogółem	Zdrowe	Zarażone	Procent zarażonych
Samce	27	10	17	63%
Samice	21	4	17	81%

Rys.7. Tabela zestawiająca ilość zarażonych i zdrowych psów w zależności od płci



Rys. 8. Zestawienie samców pod kątem zarażenia C.parvum



Rys. 9. Zestawienie samic pod kątem zarażenia C.parvum

Miasto reprezentowało 27 psów, z czego 18 było zarażonych. Stanowi to 66,7% tej grupy oraz 53% prób pozytywnych, natomiast z okolic wiejskich pochodziło 21 psów z czego 16 było zarażonych, co stanowi aż 76,2% tej grupy oraz 47% prób pozytywnych. Psy zamieszkujące obszary wiejskie są bardziej narażone na zarażenie.



Rys. 10. Zestawienie psów wiejskich pod kątem zarażenia *C.parvum*



Rys. 11. Zestawienie psów z miasta pod kątem zarażenia *C.parvum*

Przedstawione wyniki świadczą o tym, że psy zamieszkujące środowisko wiejskie są bardziej narażone na zarażenie, a kryptosporidioza szerzy się głównie wśród młodych osobników. Rasa psa może mieć znaczenie, gdyż można podejrzewać różny poziom odporności u poszczególnych psów.

4. Wnioski

Prewalencja zarażeń na poziomie 70,1% dowodzi, że wykorzystana podczas badań metoda PCR jest bardzo czuła i selektywna. Potwierdziliśmy występowanie oocyst w 4 próbkach na 5 pozytywnych wyników testu ELISA. Metoda ta wykrywa nawet jedną oocystę *Cryptosporidium*.

Wiek badanego psa ma znaczący wpływ na podatność na zarażenia. Największą tendencję zaobserwowaliśmy w grupie wiekowej do 0,5 roku, gdzie aż u 6 psów na 7 badanych wykryliśmy oocysty, co stanowi 85,7% tej grupy. Powodem takiego zjawiska jest najprawdopodobniej słabo rozwinięty układ odpornościowy młodych psów. Badania potwierdziły, że kryptosporidioza jest chorobą zwierząt młodych.

Psy zamieszkujące wieś okazały się bardziej narażone na kryptosporidiozę, co zapewne wynika z warunków w których żyją. Właściciele wiejskich

gospodarstw domowych w mniejszym stopniu dbają o warunki sanitarne życia przydomowych zwierząt, co dowodzi konieczności edukacji ludzi w tym zakresie.

W grupie samic zaobserwowaliśmy wyższą zachorowalność na kryptosporidiozę. Aż 81% z nich wydaląło z kałem oocysty. Może to sugerować obniżoną odporność u tej płci.

Rasa psa ma istotne znaczenie w częstoci zarażeń. W badanej grupie najwięcej było mieszanćów (23), wśród których 18 psów wydaląło oocysty, co stanowi 78,3% tej rasy. Może to dowodzić, że psy nierasowe wykazują niższy poziom odporności niż psy rasowe.

Podziękowania

Dla Pani prof. dr hab. Jolanty Rzymowskiej za merytoryczną opiekę nad pracą i działalnością Koła, jak również za umożliwienie nam przeprowadzenia niniejszych badań.

Dla pracowników Katedry i Zakładu Biologii z Genetyką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej UM w Lublinie za pomoc w badaniach.

Literatura

1. Polok M.: Kryptosporidioza gadów. *Weterynaria w Praktyce* 2007; 6: 60–65
2. Spausta G., Ciarkowski J., Wiczkowski A., Adamek B.: Pierwotniaki oportunistyczne – problem u chorych z obniżoną odpornością. *Polski Merkurusz Lekarski* 2005; 18(105): 339–341
3. Kadłubowski R., Kurantowska A.: *Zarys parazytologii lekarskiej*. PZWL. Warszawa 1999
4. Leońska–Duniec A., Adamska M.: *Biologia, epidemiologia i diagnostyka chorobotwórczych pierwotniaków przenoszonych za pośrednictwem wody*. *Wiadomości Parazytologiczne* 2010; 56(2): 125–132
5. Matuszewska R.: Pierwotniaki pasożytnicze z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 2007; 58(3): 569–577
6. Buczek A.: *Atlas pasożytów człowieka*. Koliber. Lublin 2005
7. Majewska A. C.: Epidemiologiczno–kliniczne aspekty zarażenia *Cryptosporidium*. *Nowiny Lekarskie* 2005; 74 supl.1: 26–27
8. <http://wis.pol.lublin.pl/kongres3/tom1/24.pdf>; 18.05.2013r.

**Recenzent pracy: dr hab. n. farm. Beata Jakubowska–Solarska,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

**Zagrożenie zanieczyszczenia środowiska oocystami pierwotniaka
*Cryptosporidium parvum***

Streszczenie

Pierwotniak *Cryptosporidium parvum* to kosmopolityczny i monokseniczny pasożyt, głównie jelita cienkiego. Pasożyt szerzy się następującymi drogami: człowiek–człowiek, człowiek–środowisko zewnętrzne–człowiek, zwierzę–człowiek, zwierzę–środowisko zewnętrzne–człowiek.

Celem pracy było określenie zagrożenia zanieczyszczenia środowiska oocystami pierwotniaka *Cryptosporidium parvum* na podstawie badań kału psów.

Materiał do badań stanowiły próbki kału 48 psów różnej rasy, płci, wieku oraz miejsca bytowania. Metodą z jakiej skorzystano w pracy była technika PCR, która posłużyła do amplifikacji genu *hsp70* u *Cryptosporidium parvum*.

Badanie metodą PCR na obecność oocyst *Cryptosporidium parvum* w kale psów umożliwiło ich wykrycie u 34 psów, czyli w 70,83% badanych próbek. Tak wysoka prevalencja (71%) dowodzi, iż zagrożenie zanieczyszczenia środowiska oocystami pierwotniaka *Cryptosporidium parvum* jest znaczne. Szczególną uwagę należy zwrócić na transmisję oocyst ze zwierząt na człowieka.

Słowa kluczowe: kryptosporidioza, łańcuchowa reakcja polimerazy, *Cryptosporidium parvum*

Contamination of environmental with *Cryptosporidium parvum* oocysts

Abstract

Cryptosporidium parvum belongs to protozoa is cosmopolitan and monoxenic parasite, mainly of small intestine. Parasite is spreading by following routes: human–human, human–environment–human, animal–human, animal–environment–human.

The aim of this study was to define danger of contamination of the environment with *Cryptosporidium parvum* oocysts in the dogs feces.

Material for this research was constituted samples of 48 dogs feces samples with different race, sex, age and the place of living. There was used PCR method to amplification of *hsp70* gene in *Cryptosporidium parvum* oocysts.

Examination with PCR for presence of *Cryptosporidium parvum* oocysts in the dog feces enable their descrey in 34 dogs, which constitute 70,8% of the all samples. Such high prevalence (71%) proves considerable danger of contamination of environment with *Cryptosporidium parvum* oocysts. Particularly attention should be paid to transsmition of oocysts from animals to a human.

Keywords: cryptosporidiosis, polimerase chain reaction, *Cryptosporidium parvum*

Autorzy pracy

Grzegorz Adamczuk Studenckie Koło Naukowe działające przy Katedrze i Zakładzie Biologii z Genetyką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, grzegorz.adamczuk3@wp.pl

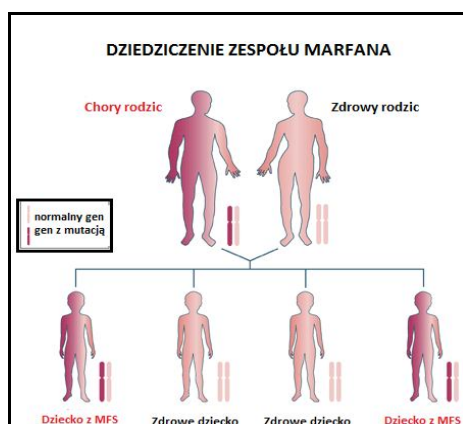
Magdalena Czochna Studenckie Koło Naukowe działające przy Katedrze i Zakładzie Biologii z Genetyką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, m.czochna@gmail.com

Paulina Ciszek

Zespół Marfana – przyczyny, objawy, diagnostyka

1. Zespół Marfana (MFS) – informacje ogólne

Zespół Marfana jest dziedziczną chorobą tkanki łącznej, przekazywaną jako cecha autosomalna dominująca (Rys.1.). Występuje na całym świecie z częstością 1:5000 urodzeń. Schorzenie to charakteryzuje się dużą zmiennością objawów klinicznych, z których część może stanowić poważne zagrożenie dla życia chorego [1]. Choroba ta dotyka wielu układów, a charakterystyczne objawy występujące u większości chorych to m.in.: wysoki wzrost, zwichnięcie soczewki, wypadanie płątka zastawki mitralnej, poszerzenie i rozwarstwienie aorty. Około trzy czwarte pacjentów dziedziczy mutację po rodzicu, reszta przypadków spowodowana jest mutacjami de novo [1,2].



Rys.1. Schemat dziedziczenia zespołu Marfana [3]

¹zurekaleksandra@wp.pl, SKN Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

²maciej.frant@gmail.com, SKN Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

³arkadiuszczerwonka87@interia.pl, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

⁴mateuszszymani87@wp.pl, SKN Młodych Medyków, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra Anatomii Prawidłowej Człowieka, ul. Jaczewskiego 4, 20–090 Lublin

2. Patofizjologia

Zespół Marfana jest wywoływany mutacją w genie FBN1 na chromosomie 15. Gen ten koduje glikoproteinę – fibrylinę, która jest składnikiem pozakomórkowych mikrofibryli wchodzących w skład włókien sprężystych. Nieprawidłowa fibrylina kodowana przez zmutowany gen FBN1 nie potrafi efektywnie polimeryzować, co zakłóca tworzenie się mikrofibryl. U heterozygot mimo występowania jednego prawidłowego allelu kodującego fibrylinę, nie dochodzi do efektywnego tworzenia mikrofibryl, ponieważ nieprawidłowy gen FBN1 jest dominujący [4].

W badaniach *in vitro* prowadzonych na hodowlach fibroblastów wyprowadzonych od pacjentów z zespołem Marfana zaobserwowano, że mikrofibryle produkowane przez te komórki mają nieprawidłową strukturę i są znacznie mniejsze od normalnych mikrofibryl. Fibrylina łącząc się z elastyną wchodzi w skład tkanki łącznej (buduje m. in. ścianę aorty), dlatego chorzy na MFS są szczególnie narażeni na zmiany w obrębie aorty, które mogą być niebezpieczne dla życia. Mikrofibryle są również strukturalnym komponentem więzadeł wieszadłowych soczewki, stąd u chorych często dochodzi do zwichnięcia soczewki i niedowidzenia [4,5].

Ostatnie badania wykazały, że mutacja w genie kodującym receptor dla transformującego czynnika wzrostu (TGF- β) leżącym na chromosomie 9 również może prowadzić do rozwoju fenotypu Marfana. Defekt tego genu prowadzi bowiem do zmniejszonego i zaburzonego wbudowywania fibryliny do macierzy tkanki łącznej [6].

3. Historia

W 1896 roku pediatra z Paryża, dr Antoine Bernhard–Jean Marfan zbadał 5–letnią dziewczynkę – Gabrielle, u której zaobserwował zespół wad rozwojowych układu kostnego. Zmiany te określił pojęciem dolichostenomelii (termin oznaczający nieprawidłowo długie kończyny górne lub dolne) [5,7]. Ta sama pacjentka została ponownie przebadana w wieku 11 lat przez dr Méry i dr Babonneix. Opisano wtedy silną skoliozę i przykurcze palców, nie stwierdzono jednak żadnych nieprawidłowości w układzie sercowo–naczyniowym czy wad narządu wzroku [8]. Co ciekawe, później okazało się, że dziewczynka ta nie była chora na MFS, jednak jej przypadek z pewnością przyczynił się do wzrostu zainteresowania podobnymi schorzeniami, a w konsekwencji do odkrycia zespołu Marfana.

W 1902 roku do literatury wprowadzono termin „arachnodaktylia”, czyli pająkowatość palców, oznaczający nadmiernie długie, szczupłe i giętkie palce. W 1914 dr Friedrich Börger jako pierwszy opisał występowanie u pacjentów z arachnodaktylią przypadków zwichnięcia soczewki [9]. Dziedziczenie autosomalne dominujące zespołu Marfana opisał Henricus Jacobus Marie Weve w 1931 roku. Termin "zespół Marfana" prawdopodobnie został użyty po raz

pierwszy w 1929 roku, wcześniej bowiem choroba ta określana była mianem arachnodaktylii [10]. W 1943 pojawiły się pierwsze opisy przypadków występowania tętniaka rozwarstwiającego aortę u pacjentów z zespołem Marfana. W następstwie tego odkrycia lekarze dokonali analizy rodowodów wielu pacjentów z MFS, u których występowały powikłania sercowo-naczyniowe, co pozwoliło określić różnorodność i zmienność nasilenia objawów choroby [11]. W 1956 określono podobieństwo strukturalne między włóknami wieszadłowymi soczewki a warstwą środkową aorty. Fibrylina – glikoproteina, której nieprawidłowa struktura jest przyczyną zespołu Marfana została odkryta w 1986 roku, a więc ponad 100 lat po pierwszym opisie tej choroby [5,7,12].

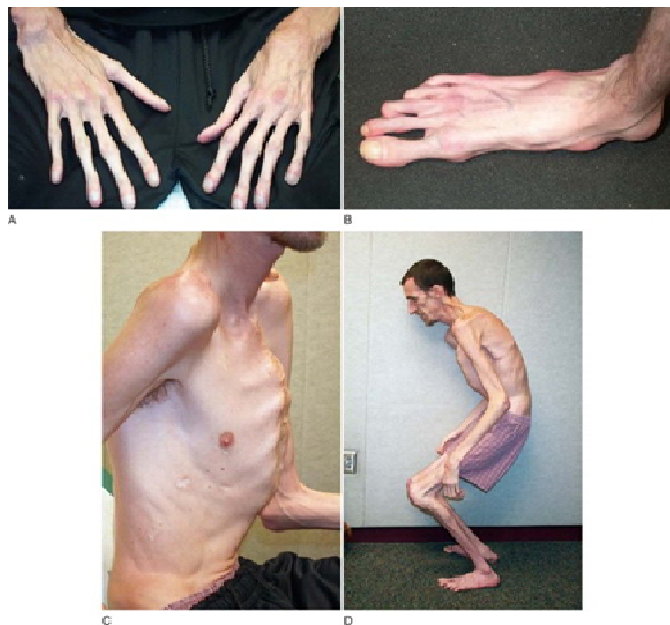
4. Objawy

Zespół Marfana charakteryzuje się dużą zmiennością i różnym stopniem nasilenia objawów, od niegroźnych zmian w wyglądzie chorego, do ciężkich dolegliwości mogących stanowić bezpośrednie zagrożenie życia. Różnorodność objawów powodowana jest faktem, że mutacja w genie *FBN1* może różnie wyrażać się fenotypowo. Ponadto za występowanie zespołu Marfana odpowiedzialnych jest szereg różnych mutacji w obrębie tego genu, a nie jedna, prowadzi to więc do tym większego zróżnicowania objawów. U poszczególnych pacjentów z MFS nasilenie objawów w różnych układach, a także czas pojawienia się objawów mogą się znacznie różnić. Badania genetyczne rodzin dotkniętych zespołem Marfana ukazały, że większość z nich posiada unikalną, niespotykaną u innych, niespokrewnionych z nimi chorych mutację w genie *FBN1*. Niektórzy chorzy, szczególnie ci, u których zaszła mutacja *de novo* są diagnozowani późno, ponieważ ich objawy często są początkowo mylone z innymi schorzeniami, lub bagatelizowane. Ważne jest więc odpowiednio wczesne postawienie diagnozy, które może uchronić pacjenta przed poważnymi konsekwencjami jakie niesie za sobą MFS [4,7].

Objawy, jakie możemy zaobserwować na pierwszy rzut oka u pacjentów z zespołem Marfana, to te, które dotyczą ich układu szkieletowego. Chorzy często wyróżniają się bardzo wysokim wzrostem i szczupłą budową ciała. Ich ręce i nogi są nieproporcjonalnie długie, czaszka jest wąska i wydłużona (Fot. 1). Bardzo często charakteryzuje ich skrzywienie boczne kręgosłupa, a także deformacje klatki piersiowej (kurza lub lejkowata klatka piersiowa). Chorzy na MFS mają również bardzo długie palce, co określane jest mianem arachnodaktylii (pająkowatość palców). Wyróżnia ich też nadmierna giętkość stawów, płaskostopie czy obniżony tonus mięśniowy [2,6].

Noworodki z zespołem Marfana różnią się nieco od zdrowych dzieci, ponieważ często ich ciało jest nadmiernie wydłużone i szczupłe. Takie dzieci po urodzeniu nie mają odruchu zaciskania piąstek, a w późniejszym okresie więcej czasu zajmuje im nauka chodzenia, mają też problemy z koordynacją ruchową z powodu obniżonego tonusu mięśniowego. Ważne jest więc, szczególnie dla

osób u których w rodzinie były przypadki MFS, aby obserwować dziecko już od pierwszych dni po urodzeniu i udać się do specjalisty w przypadku zauważenia niepokojących nieprawidłowości [6,7,13].



Fot. 1. Charakterystyczna budowa ciała pacjenta z zespołem Marfana [14]

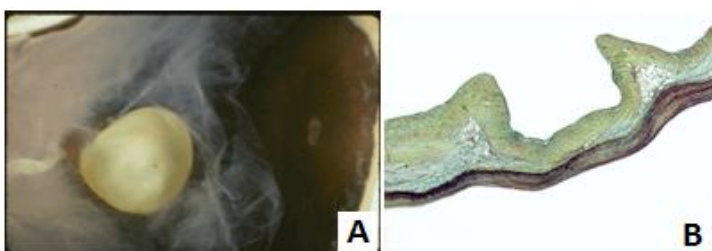
4.1. Wady układu sercowo–naczyniowego

Do najgroźniejszych zaburzeń towarzyszących zespołowi Marfana należą wady układu sercowo–naczyniowego. Z powodu wadliwej struktury tkanki łącznej dochodzi do osłabienia wszystkich struktur przez nią tworzonych. Prowadzi to między innymi do poszerzenia aorty i osłabienia jej ścian, co może skutkować wytworzeniem tętniaka lub rozwarstwieniem aorty. Częstym objawem jest również wypadanie płatków zastawki mitralnej, wywołujące dodatkowy szmer w sercu, który może być jednym z kryteriów pomocniczych w postawieniu prawidłowej diagnozy. Pęknięcie tętniaka aorty lub perforacja ściany aorty to najczęściej przyczyny zgonów pacjentów z zespołem Marfana. Z tego powodu zanim poznano przyczynę choroby i rozwinięto profilaktykę, chorzy dożywali tylko ok. 30 roku życia. Śmierć występowała w większości przypadków podczas zwiększonego wysiłku fizycznego (mężczyźni umierali podczas ciężkiej pracy fizycznej, a kobiety przy porodzie). Dzisiaj można minimalizować ryzyko wystąpienia śmiertelnych komplikacji poprzez odpowiedni styl życia (unikanie ciężkiego wysiłku), a także stałe kontrolowanie szerokości aorty (echokardiografia). W przypadku, gdy aorta osiągnie określony rozmiar, konieczna jest operacyjna wymiana ściany aorty [2,7].

4.2. Wady narządu wzroku

Chorzy na MFS często cierpią z powodu problemów z oczami. Najczęściej występującą wadą, będącą jednocześnie jednym z głównych kryteriów diagnostycznych zespołu Marfana jest zwichnięcie soczewki (Fot. 2). Fibrylina wchodzi w skład więzadeł wieszadłowych soczewki, które utrzymują soczewkę we właściwym miejscu. U chorych na MFS więzadła te są słabe i zdarza się, że soczewka ulega przesunięciu – mamy wtedy do czynienia z jej zwichnięciem. Może to prowadzić do zmniejszonej ostrości widzenia i często jest pierwszym symptomem prowadzącym do postawienia prawidłowej diagnozy [5,6].

Pacjenci z zespołem Marfana doświadczają też innych problemów związanych z narządem wzroku, takich jak: krótkowzroczność powodowana zwiększonym wymiarem gałki ocznej w osi długiej lub spłaszczeniem rogówki, zwiększone ciśnienie w gałce ocznej prowadzące do wczesnej jaskry, hipoplazja tęczówki, odwarstwienie siatkówki i wczesna zaćma. Wady te, choć z pewnością są uciążliwe dla pacjentów, nie stanowią poważnego zagrożenia, gdyż odpowiednio wcześnie zastosowane leczenie farmakologiczne bądź chirurgiczne zwykle daje dobre wyniki [5].



Fot. 2. Zwichnięcie soczewki (A) i zwyrodnienie ściany aorty (B) u pacjenta z MFS [15]

4.3. Zaburzenia układu nerwowego

Tkanka łączna jest głównym składnikiem opon otaczających mózg i rdzeń kręgowy. U chorych z defektami tkanki łącznej opony mózgowej mogą więc ulegać poszerzeniu i mają słabszą strukturę niż u ludzi zdrowych. U większości pacjentów z zespołem Marfana występuje poszerzenie przestrzeni zewnątrzoponowej (dural ectasia), szczególnie w obrębie odcinka lędźwiowego kręgosłupa, co może powodować bóle głowy, krzyża, oraz szereg objawów neurologicznych, zwykle jednak pozostaje bezobjawowe. W przypadku dolegliwości bólowych stosowane jest doraźne leczenie środkami przeciwbólowymi [16,17].

4.4. Wady układu oddechowego

Najczęstszymi objawami ze strony układu oddechowego jest odma płucna i zapadanie się płuc, do którego dochodzi gdy zbyt duża ilość gazu odłoży się w przestrzeni między płucem, a klatką piersiową. Zapadnięciu płuca towarzyszy

nagły, silny ból w klatce piersiowej i płytki oddech. W takiej sytuacji pacjent musi niezwłocznie zgłosić się do lekarza, ponieważ może ona zagrażać życiu. Tego typu incydenty zdarzają się jednak stosunkowo rzadko. Rozedma płuc jest następstwem nieprawidłowej struktury ścian oskrzelików, które ulegają poszerzeniu, co prowadzi do rozedmy [6,16,17].

Skolioza i wgłębienie w mostku także mogą być przyczyną problemów z oddychaniem u pacjentów z zespołem Marfana, ponieważ zmniejszenie objętości klatki piersiowej może uniemożliwić pacjentowi zaczerpnięcie odpowiednio głębokiego oddechu. Aby tego uniknąć stosuje się chirurgiczną korekcję wad kręgosłupa i klatki piersiowej.

Z powodu wad rozwojowych kości twarzy, zębów i podniebienia u pacjentów z zespołem Marfana często obserwuje się bezdech senny [16].

5. Diagnostyka

MFS jest diagnozowany na podstawie charakterystycznych objawów obserwowanych u pacjenta. Testy genetyczne nie odgrywają tu znaczącej roli, ponieważ z uwagi na dużą liczbę mutacji mogących prowadzić do rozwoju tej choroby nie istnieje jeden skuteczny test pozwalający postawić jednoznaczną diagnozę. Zespół Marfana jest diagnozowany na podstawie kryteriów Ghent (opracowanych przez Belgijskich lekarzy) i określanych jako małe lub duże zmiany w pięciu układach [1,6]:

- szkieletowym,
- narządu wzroku,
- krążenia,
- oddechowym,
- skórze,
- oponie twardej.

W postawieniu diagnozy oprócz oględzin zewnętrznych przydatne są następujące metody:

- echokardiogram,
- elektrokardiogram,
- badanie oczu lampą szczelinową (pozwala określić położenie soczewek),
- MRI dolnego odcinka pleców.

Do postawienia pozytywnej diagnozy niezbędne jest wystąpienie zmian w co najmniej trzech układach, przy czym przynajmniej dwie nieprawidłowości muszą dotyczyć kryterium dużego [1,6,7].

Kryteria Ghent [6,7]:

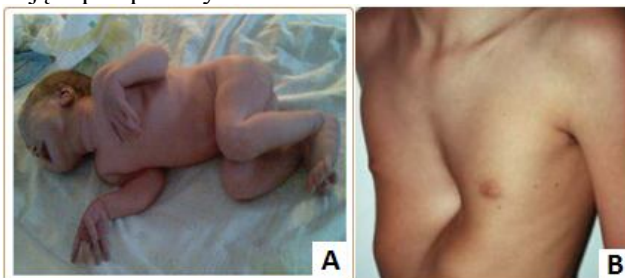
DUŻE:

- kurza lub lejkowata klatka piersiowa wymagająca operacji (Fot. 3),
- proporcja górnej do dolnej części ciała 0,85 (N=0,93),
- stosunek długości rozpostartych ramion do wysokości ciała >1,05,
- arachnodaktylia,

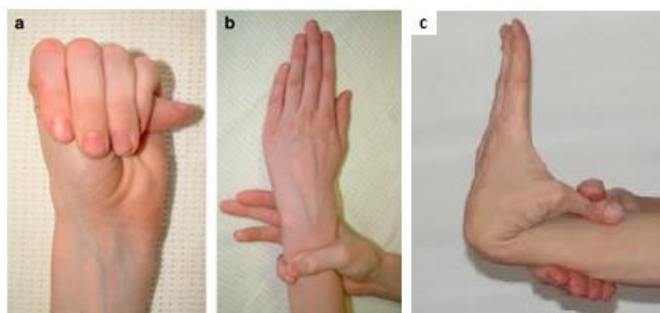
- dodatni objaw Steinberga (przywiedzenie kciuka do długiej szczupłej dłoni) (Fot. 4),
- dodatni objaw nadgarstkowy Walkera–Murdocha (nachodzenie kciuka na palec mały przy objęciu przeciwległego nadgarstka),
- skolioza $>20^\circ$,
- wyprost w stawach łokciowych $<170^\circ$,
- zwichnięcie panewki kości udowej,
- płaskostopie,
- zwichnięcie soczewki,
- poszerzenie pnia aorty,
- rozwarstwienie ściany aorty wstępującej,
- poszerzenie przestrzeni zwnątrzołonowej odcinka Th–L.

MAŁE:

- nadmierna ruchliwość stawów,
- wysoko wysklepione podniebienie z zacieśnieniem zębów,
- dysmorfia twarzy: dolichocefalia, opadnięcie zewnętrznych kątek oczu, cofnięcie żuchwy,
- nieprawidłowa, płaska rogówka,
- zwiększona długość gałki ocznej w osi długiej,
- hipoplastyczna tęczęwka lub mięsień rzęskowy powodujący zmniejszone zwięzanie źrenicy.
- wypadanie płatków zastawki mitralnej,
- poszerzenie tętnicy płucnej przed 40 r.ż.,
- tętniaki i rozwarstwienia ściany aorty,
- samoistna odma opłucnowa,
- rozstępy skórne,
- nawracające przepukliny.



Fot.3. Noworodek z dysmorficznymi cechami zespołu Marfana (A) [19], lejkowata klatka piersiowa (B) [20]



Fot. 4. Dodatni objaw: kciuka (a) i nadgarstkowy (b) [18] oraz nadmierna giętkość stawów u pacjenta z MFS (c) [13]

6. Leczenie i profilaktyka

Do tej pory nie wynaleziono leku eliminującego MFS, jednak rozwój medycyny pozwolił na podwyższenie jakości oraz przedłużenie życia chorego. Wczesnie zdiagnozowany i stale monitorowany zespół Marfana pozwala choremu dożyć zaawansowanego wieku. Ważne jest, aby pacjent był świadomy swojej choroby i zagrożeń jakie ona niesie, nie bagatelizował jej i przestrzegał zaleceń lekarza.

Monitorowanie postępu zmian kostnych, szczególnie w okresie intensywnego wzrostu (okres dzieciństwa i dojrzewania) pozwala w odpowiednim czasie podjąć decyzję o rehabilitacji, bądź w razie potrzeby operacyjnej korekcji skoliozy, czy deformacji klatki piersiowej. Dzięki temu chory może uniknąć problemów z oddychaniem i poruszaniem się. Regularne badanie wzroku również jest konieczne w przypadku chorych na MFS, ponieważ odpowiednio wczesne wykrycie zmian w narządzie wzroku często pozwala uniknąć interwencji chirurgicznej [16,17].

Ponieważ zespołowi Marfana towarzyszą groźne komplikacje ze strony układu sercowo-naczyniowego, ważne jest również monitorowanie funkcjonowania serca i naczyń krwionośnych. Regularnie wykonywane badanie ECHO serca pozwala śledzić zmiany powstające w aorcie i w razie potrzeby w odpowiednim momencie zastosować leczenie chirurgiczne. Zanim zmiany w aorcie znajdą się w stadium kwalifikującym pacjenta do operacji, stosuje się leki (głównie z grupy β -blokerów), które zmniejszają tempo wzrostu tętniaka i poszerzania aorty [16,17,21].

Chorzy na MFS powinni szczególnie dbać o zdrowie. Zalecenia kierowane do wszystkich, którzy chcą długo cieszyć się dobrym zdrowiem nabierają tu dużo większego znaczenia. Chorzy nie powinni palić papierosów, aby zmniejszyć ryzyko wystąpienia powikłań ze strony układu oddechowego. Oprócz tego pacjenci z MFS powinni utrzymywać umiarkowaną aktywność fizyczną, co jest zalecane w celu poprawienia kondycji mięśni. Powinni jednak unikać sportów kontaktowych i takich, które nadmiernie forsują organizm, gdyż

to z kolei może zaszkodzić ich słabym naczyniom krwionośnym. Kobiety w czasie ciąży są szczególnie narażone na powikłania ze strony układu sercowo-naczyniowego, dlatego powinny pozostawać pod szczególną opieką lekarską [17,21].

Nadzieję na polepszenie metod leczenia chorych na MFS dało odkrycie wpływu mutacji receptora TGF- β na rozwój tej choroby. Oprócz faktu, że w niektórych przypadkach pacjenci z MFS mają defekt w genie kodującym ten receptor odkryto również zwiększoną aktywację TGF- β w przypadku występowania zmutowanej fibryliny. Nadaktywny TGF- β był czynnikiem wywołującym większość cech chorobowych w mysim modelu MFS. Wiele objawów, tj: osłabienie ścian aorty, wypadanie płątka zastawki mitralnej, czy rozwój rozedmy płucnej i miopatii mięśni szkieletowych rozwijało się słabiej po podaniu chorym myszom przeciwciał neutralizujących TGF- β . Co interesujące, podobne osłabienie objawów zaobserwowano po podaniu myszom lorastanuleku blokującego receptor AT1R. Wyniki te ukazują jak wiele czynników może mieć wpływ na rozwój objawów charakterystycznych dla zespołu Marfana, a także jak ważne jest ciągłe poszerzanie wiedzy na temat tej choroby i potencjalnych sposobów jej leczenia [1].

7. Podsumowanie

W ostatnich latach zespół Marfana przestał stanowić takie zagrożenie dla życia chorego jakim był dawniej. Rozwój medycyny, metod diagnostycznych, a także większa świadomość pacjentów przyczyniły się do poprawy życia chorych i dały im szansę na dożycie zaawansowanego wieku. Wciąż zdarzają się przypadki śmierci chorych na MFS z powodu pęknięcia ściany aorty i innych powikłań, jednak prawidłowo prowadzony pacjent ma dużą szansę na normalne życie w dobrym zdrowiu.

Literatura

1. Franken R., den Hartog A.W., Singh M., Pals G., Zwinderman A.H., Groenink M., Mulder B.J.M., Marfan syndrome: Progress report Original Research Article, "Progress in Pediatric Cardiology", 2012, vol. 34, s. 9–14
2. De Backer J., Loeyls B., De Paepe A., Marfan and Marfan-like syndromes, "Artery Research", 2009, vol. 3, s. 9–16
3. http://www.daviddarling.info/images/Marfan_syndrome.gif
4. Ramirez F., Fibrillin mutations in Marfan syndrome and related phenotypes, "Current Opinion in Genetics & Development", 1996, vol. 6, s. 309–315
5. Nemet A.Y., Assia E.I., Apple D.J., Barequet I.S., Current Concepts of Ocular Manifestations in Marfan Syndrome, "Survey of Ophthalmology", 2006, vol. 51, s. 561–575
6. Ziara K., Wierzyk A., Wszolek M., Smerdziński S., Ziara-Jakutowicz K., Zajaczek S.: Późne rozpoznanie zespołu marfana, „Przegląd Pediatryczny”, 2011, vol. 41, s. 183–186

7. Pyeritz R.E., The Marfan syndrome in childhood: features, natural history and differential diagnosis, "Progress in Pediatric Cardiology", 1996, vol. 5, s. 151–157
8. Méry H., Babonneix L., Un cas de deformation congenitale des quatre membres: Hyperchondroplasie, "Bulletins et mémoires de la Société médicale des hôpitaux de Paris", 1902, vol. 19, s. 671–676
9. Börger F., Über zwei Fälle von Arachnodaktylie, "Z. Kinderheilk", 1914, vol. 12, s. 161–184
10. Weve H.J.M., Ueber Arachnodaktylie (Dystrophia mesodermalis congenita, Typus Marfan), "Archiv für Augenheilkunde", 1931, vol. 104, s. 1–46
11. Ruettimann B., Steinmann B. A., Marfan: his life and times, "European Journal of Pediatrics", 1996, vol. 155, s. 725–726
12. <http://www.marfan.org/marfan/>
13. <http://www.ownzee.com/attachments/2012/03/pic6/4f5abac0-91c4-431a-b0a0-5dfacdbab12d.jpg>
14. <http://www.nasagap.com/marfan-syndrome-symptoms-cause-effects-treatment-and-cure/>
15. http://pl.wikipedia.org/wiki/Zesp%C3%B3%C5%82_Marfana
16. <http://emedicine.medscape.com/article/946315-overview>
17. <http://www.nlm.nih.gov/health/health-topics/topics/mar/>
18. <http://www.nature.com/ejhg/journal/v15/n7/images/5201851f3.jpg>
19. Syweński E., Suchańska D., Góralewicz-Lenartowicz R., Baran L., Zespół wiotkiego dziecka współistniejący z infekcją wewnątrzmaciczną – trudności diagnostyczne. Opis przypadków, "Pediatria Polska", 2009, vol. 84, s. 95–100
20. <http://nasze-choroby.pl/image.php?id=1104&r=3>
21. Meijboom L.J., Drenthen W., Pieper P.G., Groenink M., van der Post J.A.M., Timmermans J., Voors A.A., Roos-Hesselink J.W., van Veldhuisen D.J., Mulder B.J.M., Obstetric complications in Marfan syndrome, "International Journal of Cardiology", 2006, vol. 110, s. 53–59

Recenzent pracy: prof. dr hab. Anna Skorupska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

ZESPÓŁ MARFANA – PRZYCZYNY, OBJAWY, DIAGNOSTYKA

Streszczenie:

Zespół Marfana (MFS) jest genetycznie uwarunkowaną chorobą tkanki łącznej. Pacjenci z MFS cierpią z powodu szeregu objawów, wyróżniających się zróżnicowanym nasileniem, dotyczących układu ruchu, układu sercowo-naczyniowego, narządu wzroku i wielu innych. Choroba ta pierwszy raz została opisana ponad sto lat temu i od tego czasu mechanizmy leżące u jej podłoża są coraz lepiej poznawane. Mimo braku skutecznego leku, który eliminowałby zespół Marfana, postęp w naukach medycznych pozwolił na przedłużenie i poprawę jakości życia pacjentów. Trwają badania nad potencjalnymi lekami zmniejszającymi nasilenie objawów MFS, co pozwala pacjentom patrzeć w przyszłość z nadzieją, że kiedyś uda się poskromić tę chorobę. W pracy opisano przyczyny choroby, jej historię oraz objawy charakterystyczne dla zespołu Marfana, a także kryteria diagnostyczne i sposoby leczenia objawów MFS. Zwrócono również uwagę na kierunki w których idą naukowcy szukający nowych metod leczenia zespołu Marfana.

Słowa Kluczowe: Zespół Marfana, MFS, fibrylina,

MARFAN SYNDROME – CAUSES, SYMPTOMS, DIAGNOSIS

Abstract:

Marfan syndrome (MFS) is a genetically determined disease of the connective tissue. MFS patients suffer from a number of symptoms, distinguished by varied intensity, affecting the musculoskeletal system, cardiovascular system, ocular system and many others. This disease was first described over a hundred years ago, and since then we have known much more about its mechanisms. Despite the lack of an effective drug that would eliminate the Marfan syndrome, progress in medical science made it possible to extend and improve the quality of life of the patients. Studies for finding new drugs which would reduce the intensity of MFS symptoms are carried out, so that allows patients to look to the future with hope that someday this disease will be tamed. This paper describes the causes of the disease, its history and symptoms characterizing Marfan syndrome, as well as diagnostic criteria and methods for treating the symptoms of MFS. It also drew attention to the direction in which scientists go while seeking new treatment methods for Marfan syndrome.

Keywords: Marfan Syndrome, MFS, fibrylin

Autorzy:

mgr Aleksandra Żurek

zurekaleksandra@wp.pl, SKN Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

mgr Maciej Frant

maciej.frant@gmail.com, SKN Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

mgr Arkadiusz Czerwonka

arkadiuszczerwonka87@interia.pl, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

lek. med. Mateusz Szymański4

mateuszszymanski87@wp.pl, SKN Młodych Medyków, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra Anatomii Prawidłowej Człowieka, ul. Jaczewskiego 4, 20–090 Lublin

Natalia Pająk¹, Magdalena Osiak², Katarzyna Wojciechowska³
Dorota Choroszyńska⁴

Związek pomiędzy receptorami TLR a procesem nowotworzenia w hematologii

Wstęp

Każdego dnia organizm ludzki narażony jest na kontakt z tysiącami drobnoustrojów. Dlaczego jednak, nikt z nas nie cierpi przewlekłe na zakażenia bakteryjne? Właściwą ochronę zawdzięczamy układowi odpornościowemu, który za pomocą wyspecjalizowanych mechanizmów skutecznie chroni nasz organizm przed patogenami. Identyfikacja patogennych drobnoustrojów przez układ odpornościowy jest możliwa dzięki grupie receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptors – PRR). Rozpoznają one struktury charakterystyczne dla drobnoustrojów, określane jako wzorce molekularne związane z patogenami – PAMP (pathogen associated molecular patterns). Do grupy receptorów PRR zaliczamy m.in.: receptory Toll-podobne, które stanowią ważny element aktywujący i pobudzający nie tylko odporność wrodzoną (nieswoistą), ale także odpowiedź nabytą (swoistą). Stanowią w ten sposób ogniwo łączące te dwa typy odporności [1,2].

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych poglądów na temat roli receptorów TLR w procesie nowotworzenia w hematologii.

1. Receptory Toll-podobne – ogólna charakterystyka

Gen Toll po raz pierwszy opisany został podczas badań nad muszką owocową (*Drosophila melanogaster*). Stwierdzono wtedy, że receptor kodowany przez gen Toll bierze udział w rozwoju embrionalnym. Kolejne badania wykazały, że receptor Toll aktywuje efektywną odpowiedź przeciwko pewnym gatunkom grzybów [3]. Oprócz skutecznej odpowiedzi przeciwgrzybiczej aktywacja receptorów Toll u muszki owocowej prowadzi do wzmożonej syntezy

¹ natalia.pajak@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej ul Radziwiłłowska 11 20–950 Lublin

² magdalenaosia@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej ul Radziwiłłowska 11 20–950 Lublin

³ kate.woj@hotmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej ul Radziwiłłowska 11 20–950 Lublin

⁴ dorota.ch.um@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej ul Radziwiłłowska 11 20–950 Lublin

białek skierowanych zarówno przeciw bakteriom Gram-dotatnim jak i Gram-ujemnym. Niedługo po tym odkryto receptory o homologicznej budowie i funkcji u ssaków w tym także u człowieka i nazwano je receptorami Toll podobnymi (Toll – like receptor – TLR) [4]. Dotychczas u człowieka opisano 10 receptorów TLR [1].

Receptory TLR są glikoproteinami o zbliżonej wielkości, ich masa cząsteczkowa waha się od 90 do 115 kDa. Część z nich wstępuje na powierzchni błony komórkowej (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), a niektóre związane są z błoną endosomów (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [5]. To typowe transmembranowe białka o charakterystycznej budowie. Składają się z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, śródbłonkowej oraz wewnątrzkomórkowej. Część zewnątrzkomórkową stanowią regiony z powtórzeniami bogatymi w leucynę LRR (Leucine rich repeats). Główną rolą tej domeny jest rozpoznawanie odpowiednich ligandów. Część wewnątrzkomórkowa wykazuje podobieństwo z receptorem dla interleukiny 1 (IL-1R1), stąd wzięła się jej nazwa TIR (Toll/IL-1R receptor domain). Domena TIR zwrócona jest zawsze w kierunku cytoplazmy komórki, z kolei domena LRR skierowana jest na zewnątrz komórki lub do wnętrza endosomu [6,7]. Niektóre z receptorów TLR mogą tworzyć homodimery (parę identycznych cząsteczek TLR, np. TLR4, TLR3, TLR9), a także postać heterodimeru (dwóch różnych cząsteczek TLR, TLR2/1 i TLR2/6). Występowanie postaci heterodimerycznej jest niezwykle istotne, gdyż poszerza spektrum rozpoznawanych ligandów [8]. Pomimo podobnej budowy rola receptorów TLR w układzie odpornościowym jest różna.

2. Miejsce występowania TLR

Receptory TLR występują powszechnie w całym organizmie, bogato reprezentowane są w takich miejscach ustroju, które stanowią potencjalne wrota infekcji (komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego i oddechowego). Ta charakterystyczna lokalizacja TLR powoduje aktywację komórek nabłonka, które wydzielają cytokiny i chemokiny, co skutkuje migracją komórek układu immunologicznego do miejsca inwazji patogenu [5,7]. Jednak główna funkcja TLR jest związana z występowaniem tych receptorów na komórkach układu immunologicznego między innymi na makrofagach, limfocytach, komórkach dendrytycznych i neutrofilach [5]. Ponadto występowanie TLR opisano w: śródbłonku naczyń, adipocytach, kardiomiocytach, komórkach śledziony, grasicy, fibroblastach, nerkach, płucach i mikrogleju) [2,5,7].

3. Aktywacja receptorów TLR

Każdy z receptorów rozpoznaje charakterystyczną dla siebie grupę ligandów, którymi mogą być antygeny bakterii, wirusów czy grzybów. Dowiedziono również, że ligandami dla TLR mogą być białka pochodzenia endogenne, które uwalniane są z wnętrza komórek w wyniku reakcji stresowych

(m.in. białka szoku cieplnego HSP60 rozpoznawane przez TLR4) [9]. Ligandami dla TLR1 są peptydoglikany (PGN), lipopolisacharyd (LPS), lipopeptydy, lipoproteiny czy modulina. Ligandami dla TLR2 są między innymi: bakteryjne lipoproteiny, kwas lipotejchojowy, glikolipidy, zymosan, PGN. Dla TLR3 – podwójna nić RNA. Podstawowym ligandem dla TLR4 jest (LPS). Flagelina jest rozpoznawana przez TLR5. TLR6 związane z TLR2 rozpoznaje diacylowe lipopeptydy. TLR7 i TLR8 rozpoznają wirusową pojedynczą nić RNA. Z kolei TLR9 rozpoznaje niemetylowane sekwencje CpG DNA. Ligand dla TLR10 do tej pory nie został jednoznacznie zidentyfikowany. Połączenie ligandu z charakterystycznym dla siebie rodzajem TLR inicjuje kaskadową ścieżkę sygnalizacyjną prowadzącą do uwolnienia z komórki szeregu cytokin prozapalnych i chemokin [4,9].

Aktywacja TLR prowadzi do transdukcji sygnału poprzez dwa główne szlaki tzw. szlak niezależnym i zależny od MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), ze względu na zaangażowanie tej cząsteczki w proces transmisji sygnału. Szlak MyD88–zależny jest charakterystyczny dla większości TLR. Natomiast szlak MyD88–niezależny charakterystyczny jest dla receptorów TLR3 oraz jednej z dwóch ścieżek typowych dla TLR4 [10, 11]. Przekaz sygnału jest skomplikowany i aby był efektywny, wymaga aktywności wielu białek adaptorowych i kinaz charakterystycznych dla obu szlaków. Efektem uruchomienia tych kaskad sygnalizacyjnych jest uwolnienie i transport do jądra komórkowego aktywnych czynników transkrypcyjnych takich jak NF- κ B, AP1, IRF3 czy IRF7. Ich funkcją jest indukcja ekspresji genów dla różnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych i interferonu. W ten sposób zainicjowany zostaje sygnał do rozwoju odpowiedzi swoistej [10–12].

4. Rola receptorów TLR w odpowiedzi immunologicznej

Główną funkcją receptorów Toll–podobnych jest indukcja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, gdzie najbardziej istotną rolę pełnią TLR znajdujące się na komórkach prezentujących antygen (APC). Prawidłowe funkcjonowanie receptorów TLR jest bardzo ważnym elementem integrującym działanie układu immunologicznego a szczególnie odpowiedź nieswoistą i swoistą [5–7].

W pierwszym etapie po rozpoznaniu drobnoustrojów następuje aktywacja odpowiednich ścieżek transmisyjnych, skutkująca uwolnieniem cytokin prozapalnych, chemokin i defensyn. Następnie dochodzi do migracji makrofagów, komórek tucznych i komórek dendrytycznych do miejsca infekcji. W wyniku aktywacji TLR na makrofagach dochodzi do zwiększenia syntezy cytokin prozapalnych, a także do zwiększenia zdolności fagocytarnej. Makrofagi bardziej efektywnie prezentują antygeny limfocytom T, a także stymulują swoistą odpowiedź immunologiczną, w wyniku zwiększonej ekspresji cząsteczek ko–stymulujących CD80 i CD86 limfocytów B oraz antygenów

zgodności tkankowej klasy I i klasy II (MHC I, MHC II). Natomiast brak receptorów TLR2 i TLR4 na makrofagach skutkuje zaburzeniami w procesie fagocytozy wielu bakterii [5,7,10].

Istotną rolę odgrywają również receptory TLR w biologii komórek dendrytycznych. Komórki dendrytyczne dzielimy na dwie subpopulacje: niedojrzałe komórki dendrytyczne, wykazujące silne właściwości endocytarne i pinocytarne, oraz komórki plazmocytoidalne. Ekspresja TLR znacząco się różni w obrębie tych dwóch populacji. Pierwsze z nich wyrażają na powierzchni ekspresję TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 i TLR8, natomiast komórki plazmocytoidalne: TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 i TLR10. Aktywacja receptorów TLR wywołuje dojrzewanie niedojrzałych komórek dendrytycznych, które zdobywają cechy komórek prezentujących antygen. W wyniku dojrzewania na komórkach dendrytycznych pojawiają się cząsteczki ko stymulujące oraz receptory chemokin. Dochodzi również do wzmożonej ekspresji MHC I i MHC II oraz wzrostu uwalniania cytokin prozapalnych. Mechanizmy te potwierdzają fakt, że aktywacja TLR umożliwia indukcję swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację limfocytów T [5,7, 13, 14].

5. Udział TLR w nowotworzeniu

Obecność receptorów TLR odnotowano również na komórkach zmienionych nowotworowo. Dane na ten temat sugerują, że ścieżki sygnałowe receptorów TLR w nowotworach mogą wiązać się ze zniesieniem obrony gospodarza wobec procesu nowotworowego. W wyniku aktywacji TLR w komórkach nowotworowych następuje indukcja syntezy czynników prozapalnych i cząsteczek immunosupresyjnych. Skutkuje to zmniejszeniem podatności komórek nowotworowych na atak cytotoksycznych limfocytów, co ułatwia im wymknięcie się spod nadzoru immunologicznego. Stymulacja TLR może także sprzyjać procesowi proliferacji komórek nowotworowych. Następuje to, poprzez indukcję uwalniania cytokin np.: IL-6, IL-13 oraz TNF- α , a także innych czynników wzrostowych. Dodatkowo, receptory TLR mogą wywoływać oporność na apoptozę, powodować wzrost angiogenezy i przepuszczalności naczyń, jak również zwiększać inwazyjność komórek nowotworowych przez regulację uwalniania metaloproteinaz i integryn. Wyżej wymienione procesy potwierdzają związek pomiędzy przewlekłym stanem zapalnym i zakażeniami a patogenezą nowotworów. W ten sposób podkreślają rolę receptorów TLR w procesach nowotworzenia. Fakt, że TLR biorą udział w rozwoju nowotworów nasuwa nowe sugestie, że receptory te mogą stać się nowym celem terapeutycznym. Udowodniono, że zablokowanie szlaku TLR4 odwraca, zależne od guza, hamowanie proliferacji limfocytów T oraz aktywność komórek NK zarówno *in vivo* i *in vitro*. W ten sposób opóźniony zostaje wzrost guza, a w konsekwencji wzrasta przeżycie myszy z nowotworem. Receptory TLR regulują też odporność lub tolerancję wobec nowotworu, poprzez limfocyty

T regulatorowe, komórki dendrytyczne oraz inne komórki układu immunologicznego. Istnieje kilka doniesień, które dowodzą, że niektóre produkty drobnoustrojów i niektóre leki wykazują kliniczną aktywność przeciwnowotworową, która wynika z wiązania się tych cząsteczek z receptorami TLR na komórkach immunologicznych. Pomimo faktu, że stymulacja TLR na komórkach nowotworowych może wpływać korzystnie na progresję, stworzono kilka strategii opracowania szczepionek na bazie agonistów TLR. Uwzględnia się tu szczególnie zdolność do rozpoznawania i niszczenia komórek zmienionych nowotworowo. Zastosowanie adiuwantów immunologicznych może jednak powodować zmianę szlaków transdukcji sygnału poszczególnych TLR, a przez to wywoływać różne reakcje w organizmie. Podczas, gdy niektóre z reakcji immunologicznych stają się korzystne, inne mogą być szkodliwe w czasie terapii przeciwnowotworowej. Istotne jest więc, aby starannie dobrać receptor docelowy, używając właściwej mieszaniny agonistów, jak również należy wziąć pod uwagę udział innych czynników takich jak np.: mikrośrodowisko nowotworu [15,16].

6. Receptory Toll-podobne w nowotworach hematologicznych

Receptory TLR mogą być zaangażowane w patogenezę nowotworów hematologicznych poprzez modulacje odpowiedzi immunologicznej, a także poprzez dostarczanie komórkom nowotworowym sygnałów do przeżycia. Do tej pory najwięcej uwagi poświęcono receptorom TLR w klonalnych chorobach limfoproliferacyjnych, takich jak: przewlekła białaczka limfocytowa, szpiczak mnogi, chłoniak Hodgkina, chłoniaki nieziarnicze oraz ostra białaczka szpikowa. Coraz częściej bada się ekspresję tych receptorów w komórkach po transformacji nowotworowej, mając nadzieję na lepsze poznanie ich funkcji oraz opracowanie nowych, skutecznych schematów terapeutycznych [17–19].

6.1. TLR w klonalnych chorobach limfoproliferacyjnych

Najwięcej danych literaturowych dotyczy receptorów TLR w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL). Ważną cechą komórek białaczkowych jest ich długi czas życia, z powodu zaburzonej apoptozy. Dochodzi do akumulacji monoklonalnych limfocytów B w krwi obwodowej, w szpiku i w tkance limfatycznej. Bardzo ważną rolę w patogenezie PBL odgrywa również nadmierna proliferacja limfocytów, prowadząca do stopniowego nagromadzenia komórek białaczkowych. Antygeny indukujące proliferację komórek PBL, nie zostały jeszcze jednoznacznie zidentyfikowane. Zarówno autoantygeny jak i egzogenne antygeny mogą być zaangażowane w inicjowanie i/lub progresję PBL poprzez pobudzenie białaczkowych limfocytów B, wyposażonych w odpowiednie receptory antygenowe. Wydaje się, że sygnalizacja poprzez receptor limfocytów B (BCR) nie jest głównym czynnikiem w patogenezie PBL. Dojrzałe limfocyty B rozpoznają antygeny drobnoustrojów w określony sposób,

za pomocą receptorów BCR oraz za pośrednictwem receptorów TLR. TLR są pomostem pomiędzy wrodzoną, a nabytą odpowiedzią immunologiczną. Receptory te działają jako cząsteczki ko-stymulujące dla limfocytów B, indukując dojrzewanie i proliferację limfocytów oraz produkcję przeciwciał, po wcześniejszym rozpoznaniu patogenu. Stymulacja powierzchniowych lub endosomalnych TLR wywołuje czynnik jądrowy NF- κ B, który ostatecznie powoduje produkcję defensyn, cytokin prozapalnych i cząsteczek kostymulujących. To z kolei indukuje rekombinację przełącznika klasy do konkretnego izotypu. Wszystko to zależy od prawidłowego wewnątrzkomórkowego przemieszczania i lokalizacji włączonych receptorów TLR oraz od obecności innych sygnałów, takich jak te pochodzące od BCR. Przypuszcza się, że aktywacja limfocytów B, poprzez zaangażowanie TLR, może prowadzić do bardziej efektywnego współdziałania z komórkami T i komórkami dendrytycznymi. Ponadto TLR zależne sygnały mogą być zamieszane w regulację B komórkowej odpowiedzi immunologicznej, zarówno przez indukcję tolerancji TLR lub zniesienie mechanizmów zapewniających wyciszenie autoreaktywnych limfocytów B, wspierając autoreaktywność. Informacje dotyczące ekspresji TLR w przewlekłej białaczce limfocytowej w większości dotyczą TLR7, TLR8 i TLR9. Pomimo istniejących różnic pomiędzy chorymi, a także między liniami komórkowymi, receptory TLR7 i TLR9 wykrywane są w większości przypadków, natomiast TLR8 jest nieobecny. W oparciu o dane piśmiennictwa największą ekspresję wśród receptorów odnotowuje się dla TLR7 [20,21].

Badanie ekspresji i funkcji receptorów TLR wykazują znaczący wpływ TLR na reakcje układu immunologicznego oraz na wzrost komórek nowotworowych [22]. Ekspresja i funkcje receptorów TLR były intensywnie badane między innymi w białaczkach i szpiczaku mnogim. W klasycznym chłoniaku Hodgkina, będącym także chorobą limfoproliferacyjną, objawy kliniczne oraz patologiczne odzwierciedlają nieprawidłową odpowiedź immunologiczną. Uważa się, że dzieje się to poprzez wydzielanie różnych cytokin, przez komórki Reed Sternberga lub tkanki otaczające [23]. Do tej pory jest mało doniesień na temat ekspresji i funkcjonalności TLR w chłoniakach. W komórkach Reed Sternberga u chorych z chłoniakiem Hodgkina wykryta została ekspresja hiporeaktywnych receptorów TLR4, TLR7 i TLR9. Nie wykryto natomiast receptora TLR2 [22,23].

Badania TLR w chłoniakach nieziarniczych (NHL) pozwoliły założyć hipotezę, że receptory TLR mogą być czynnikami wpływającymi na rozwój choroby. Zakłada się tak, ponieważ znana jest ich rola w rozpoznawaniu ligandów drobnoustrojów oraz w stymulowaniu wielu ścieżek sygnałowych układu odpornościowego. Wykazano, że polimorfizmy genów receptorów TLR1, TLR6 i TLR10 mogą wiązać się z ryzykiem choroby. Aby lepiej poznać znaczenie szlaków TLR w patogenezie NHL konieczne są dalsze badania.

Do tej pory słabo poznana jest etiologia NHL. Przypuszcza się, że zakażenia i upośledzenie odporności mogą mieć pewny wpływ na ich rozwój [24].

Kolejną chorobą z grupy chorób limfoproliferacyjnych, w której badano receptory TLR jest szpiczak mnogi (MM). Należy do gammapatii monoklonalnych. Choroba ta charakteryzuje się proliferacją jednego klonu komórek plazmocytowych, produkującego homogenne immunoglobuliny. Na szybkość wzrostu i przeżycia komórek szpiczaka mogą mieć wpływ ligandy receptorów TLR [25]. Komórki szpiczaka mnogiego charakteryzują się obecnością TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 i TLR9. Najczęściej jednak występuje ekspresja receptorów TLR1, TLR4, TLR7 i TLR9. U chorych z nadekspresją TLR4 wykazano gorsze rokowanie. Istnieją sugestie, że wysoki poziom TLR i MyD88 może być nabywany w okresie przechodzenia z gammapatii monoklonalnej do gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS), aż wreszcie do szpiczaka mnogiego. W związku z tym ekspresja TLR może być związana z progresją choroby [26].

6.2. TLR w białaczkach szpikowych

Pomimo intensywnych badań nad receptorami TLR, niewiele jest jeszcze informacji na temat ich roli w białaczkach nielimfoblastycznych. Szczególnie dużo uwagi poświęca się funkcji TLR w ostrych białaczkach szpikowych, mniej w przewlekłych. Szczegółowo bada się rolę TLR i działanie agonistów dla poszczególnych receptorów, pod kątem wykorzystania ich potencjału i możliwości związanych z immunoterapią tych chorób nowotworowych [22].

Ostre białaczki szpikowe stanowią grupę nowotworów, wywodzącą się z prekursorów komórek krwi. Są najczęstszymi ostrymi białaczkami. U dorosłych występują rzadziej niż u dzieci. Charakteryzują się nagromadzeniem niedojrzałych form komórek w szpiku, oraz naciekaniem różnych narządów i tkanek [27]. Wiadomo, że w blastach ostrej białaczki szpikowej jest aktywowany jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (NF- κ B), natomiast nie ulega aktywacji w niezmiennych chorobowo, prekursorowych komórkach krwiotwórczych CD34+. Czynnik ten poprzez aktywację ścieżek sygnałowych receptorów Toll podobnych pobudza produkcję cytokin prozapalnych. Ekspresję receptorów TLR7 i TLR8 zaobserwowano na komórkach ostrej białaczki nielimfoblastycznej. Mechanizmy związane z aktywacją szlaków kontrolowanych przez TLR mogą przyczyniać się do wystąpienia agresywnego fenotypu białaczki. W dalszym ciągu niewiele jednak wiadomo na temat tych receptorów w białaczce [22,28].

7. Podsumowanie

Receptory TLR uczestniczą w interakcjach pomiędzy odpornością swoistą i nieswoistą. Obecne są nie tylko w zdrowych komórkach układu immunologicznego, ale także w komórkach zmienionych nowotworowo.

Dodatkowo stwierdzono, że w komórkach po transformacji nowotworowej szlaki sygnalizacji receptorów TLR mogą być zamieszane w zniesienie obrony gospodarza wobec procesu nowotworowego. W związku z tym wiele ośrodków naukowych prowadzi liczne badania ekspresji i funkcji receptorów TLR. Dotychczas najlepiej zbadano udział receptorów TLR w chorobach limfoproliferacyjnych, w szczególności w PBL. Przypuszcza się, że sygnały TLR zależne mogą być zamieszane w regulację B komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Literatura

1. Kędziora S, Słotwiński R. Molekularne mechanizmy towarzyszące rozpoznawaniu patogenu przez receptory wrodzonej odporności. *Postępy Hig Med Dosw.* 2009; 63: 30 – 38
2. Majewska M, Szczepanik M. Rola receptorów Toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post Hig Med Dosw.* 2006; 60: 52–63
3. Keith FJ, Gay NJ. The Drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J* 1990; 9: 4299–4306
4. Arancibia S, Beltran C, Aguirre I i wsp. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biol Res.* 2007; 40: 97 – 112
5. Pachówka M, Kluk M, Korczak – Kowalska G. Rola receptorów Toll – podobnych (TLR) w indukcji i regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post Biol Kom.* 2009; 36: 429 – 442
6. Chan WF, Mecklenbrauker I, Su I i wsp. The Molecular Mechanism of B Cell Activation by toll-like Receptor Protein RP-105. *J Exp Med* 1998; 188, 1: 93 – 101
7. Tokarz-Deptuła B, Niedźwiedzka P, Deptuła W. Receptory Toll-podobne – nowe znaczniki w immunologii. *Aler Astma Immunol* 2006; 11: 23–28
8. Bodwisch D, Sakamoto K, Kim M i wsp. MARCO, TLR2, and CD14 Are Required for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2009; 5, 6
9. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA i wsp. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll like receptors. *Trends Immunol.* 2003; 24: 528 – 533
10. Akira S, Takeda K, Kaisho T i wsp. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2: 675 – 680
11. McGettrick AF, O'Neill LA. Regulators of TLR4 signaling by endotoxins. *Subcell Biochem.* 2010; 53: 153–171
12. Medzhitov R. Toll – like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1, 2: 135–145
13. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1–14
14. Żeromski J, Samara H, Mozer-Lisewska I. Komórki dendrytyczne: czy wszystko o nich wiemy? *Postępy Biol Komorki* 2007; 34: 541–556
15. Montero Vega M. T, de Andrés Martín A. The significance of toll-like receptors in human diseases. *Allergol Immunopathol* 2009; 37: 252–263
16. Sato Y, Goto Y, Narita N. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2009; 2: 205–214

17. Wolska A, Lech–Maranda, Robak T. Toll–Like Receptors and their Role in Hematologic Malignancies. *Curr Mol Med* 2009; 9: 324–335
18. Xu C, Visser L, Diepstra A. i wsp. Expression and Function of Toll Like Receptors in Classical Hodgkin Lymphoma. Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands and Institute of Pathology, University of Ulm, Ulm, Germany: 54–72
19. Spaner D. E, Foley R, Galipeau J, Bramson J. Obstacles to effective Toll–like receptor agonist therapy for hematologic malignancies. *Oncogene* 2008; 27: 208–217
20. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N. i wsp. Toll–like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematol* 2011; 96: 1644–1652
21. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio M. T. S. i wsp. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2008; 144: 507–516
22. Smits E. L. J. M, Cools N, Lion E. i wsp. The Toll–like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 35–46
23. Skinnider B. F, Mak T. W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283–4297
24. Purdue M. P, Lan Q, Wang S. S. i wsp. A pooled investigation of Toll–like receptor gene variants and risk of non–Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis* 2009; 30: 275–281
25. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen S. H. Toll–like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20: 1138–1144
26. Chiron D, Bekeredjian–Ding I, Pellat–Deceunynck C, Bataille R, Jego G. Toll like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 2008; 112: 2205–2213
27. Dmoszyńska A, Robak T. *Podstawy hematologii* 2003; 243–253, ISBN: 83 88063 94 4
28. Marcucci G, Radmacher M. D, Maharry K. i wsp. MicroRNA Expression in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1919–1928

Pracę recenzowała: dr hab. n. med. Halina Antosz, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Genetyki Klinicznej

Związek pomiędzy receptorami TLR a procesem nowotworzenia w hematologii

Streszczenie

Głównym zadaniem TLR jest aktywacja komórek odpornościowych. Receptory TLR mogą indukować odpowiedź wrodzoną, mogą wzbudzać odpowiedź nabytą, a ponadto mogą uczestniczyć w ich wzajemnych interakcjach. TLR występują nie tylko na zdrowych komórkach, ale także tych zmienionych nowotworowo. Mogą one być zaangażowane w patogenezę nowotworów hematologicznych. Ich obecność wykazano na komórkach u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową, chłoniaku Hodgkina, chłoniakach nieziarnicznych i szpiczaku mnogim oraz w ostrej białaczce szpikowej. Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego w nowotworach hematologicznych przyczyniają się do powstania licznych infekcji, a jednocześnie mogą odpowiadać za ucieczkę transformowanych nowotworowo komórek spod nadzoru immunologicznego.

Słowa kluczowe: TLR, odpowiedź immunologiczna, nowotwory hematologiczne, nowotworzenie

The relationship between tlr receptors and the process of carcinogenesis in hematology

Summary

The main function of the TLRs is activation of immune system cells. TLRs can induce an innate and adaptive response and take part in mutual interactions between these two mechanisms. TLRs are not only on healthy cells, but also on cancer cells. They may be involved in the pathogenesis of hematological malignancies. TLRs has been expressed on B cells of chronic lymphocytic leukemia and other lymphoproliferative disorders such as: Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. In addition, they are present in acute myeloid leukemia. Disorders in functioning of the immunological system are responsible for many infectious complications.

Key words: TLR, immune response, hematological malignancies, carcinogenesis

Autorzy:

mgr Natalia Pajak natalia.pajak@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

mgr Magdalena Osiak magdalenaosia@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

lek Katarzyna Wojciechowska kate.woj@hotmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

mgr inż. Dorota Choroszyńska dorota.ch.um@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

Indeks autorów

Adamczuk Grzegorz.....	73	Kołodziej Dorota	15
Anisiewicz Artur.....	42	Kołodziej Ewa	15
Choroszyńska Dorota	94	Kotuła Lidia.....	15
Ciszek Paulina	73	Niedojadło Alicja.....	15
Czerwonka Arkadiusz	6, 83	Okła Karolina	42
Czochra Magdalena.....	73	Orzełowska Monika.....	42
Dudek Ilona	66	Osiak Magdalena	94
Frant Maciej.....	83	Pająk Natalia.....	94
Frączek Natalia	66	Sobstyl Jan.....	6
Gasińska Karolina	6	Stępkowska Justyna Kinga	24, 58
Gil Karolina	15	Stępkowska Katarzyna Małgorzata	
Gil-Kulik Paulina	15, 33, 66	24
Grad Anna	33	Szymański Mateusz	83
Janiec Paulina	6	Wawruszak Anna.....	42
Kałakucka Katarzyna	33	Wojciechowska Katarzyna	94
Karwat Jolanta	6, 15	Żurek Aleksandra.....	6, 83
Kielbasa Sylwia	15		