

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Część I



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2024

Redakcja naukowa

dr hab. n. med. Zbigniew Pasięka, prof. UMŁ

Redakcja pomocnicza

mgr inż. Karol Kłosiński

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-67991-13-1)

ISBN (wydanie online 978-83-67991-14-8)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-67991-15-5)

Data wydania: maj 2024

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Drotaweryna w leczeniu bólu	7
<i>Drzazga Agnieszka, Mularczyk Joanna, Wieczorek Edyta, Parys Wioletta</i>	
2. Problem nadużywania leków z grupy benzodiazepin	13
<i>Drzazga Agnieszka, Frydrych Michał, Parys Wioletta</i>	
3. Porównanie parametrów lipofilowości deksametazonu uzyskanych różnymi metodami	19
<i>Daria Klimoszek, Małgorzata Dołowy</i>	
4. Roślinne adaptogeny – charakterystyka i wykorzystanie w fitoterapii	26
<i>Małgorzata Kołtun-Jasion, Anna Kiss</i>	
5. Terapia zaparc w populacji pacjentów geriatrycznych	33
<i>Małgorzata Kołtun-Jasion, Anna Kiss</i>	
6. Znaczenie monocytów krwi obwodowej w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym	41
<i>Sandra Murawska, Aleksandra Opęchowska, Aleksandra Starosz</i>	
7. Anticancer properties of metformin in the non-small cell lung cancer treatment – a micro review	47
<i>Aleksandra Opęchowska, Sandra Murawska, Aleksandra Starosz</i>	
8. Current perspectives and novel directions of research in the immunotherapy of glioblastoma using immune checkpoint inhibitors (ICIs)	52
<i>Aleksandra Opęchowska, Aleksandra Starosz</i>	
9. Zaburzenia depresyjne oraz zaburzenia snu wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników: badanie pilotażowe	57
<i>Katarzyna Stańczyk, Katarzyna Wielemborek-Musiał, Anna Lipert</i>	
10. Oznaczanie zawartości kofeiny w próbkach kawy	64
<i>Joanna Kostecka, Jakub Graca, Barbara Dunajska-Gawron, Alicja Habzik, Sabina Mrozek, Jadwiga Nędzka</i>	
11. Oznaczanie zawartości kofeiny w próbkach herbaty	70
<i>Jakub Graca, Joanna Kostecka, Robert Polok, Barbara Gawron, Alicja Habzik, Sabina Mrozek, Bernadeta Nowak, Jadwiga Nędzka</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk przyrodniczych, technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodszy absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zaczną publikować prace naukowe w prestiżowych czasopiśmie. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Drotaweryna w leczeniu bólu

Drotaverine in the treatment of pain

Drzazga Agnieszka⁽¹⁾, Mularczyk Joanna⁽¹⁾, Wieczorek Edyta⁽¹⁾, Parys Wioletta⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Drzazga Agnieszka: s79377@365.sum.edu.pl

Słowa klucze: spazmolityki, inhibitory fosfodiesterazy, stany skurczowe

Streszczenie

Drotaweryna należy do leków spazmolitycznych z grupy pochodnych tetraizochinoliny. Lek hamuje działanie fosfodiesterazy i w konsekwencji prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich. Drotaweryna jest lekiem dobrze tolerowanym i wykazuje niewiele interakcji z innymi lekami. Dzięki swojemu mechanizmowi działania i korzystnemu profilowi farmakokinetycznemu stanowi składnik jednych z najczęściej wybieranych przez pacjentów preparatów leczniczych w zwalczaniu stanów skurczowych zarówno dróg żółciowych, przewodu pokarmowego, dróg moczowo-płciowych, jak i narządów rodnych.

1. Wstęp

Leki spazmolityczne o działaniu muskulotropowym stosowane są powszechnie w stanach skurczowych mięśni gładkich. Ich mechanizm działania związany jest z hamowaniem aktywności fosfodiesteraz i poprzez zwiększenie w komórkach stężenia cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) prowadzi do rozkurczu mięśniówki. Wśród spazmolityków muskulotropowych można wyróżnić grupę alkaloidów izochinolinowych oraz ich analogów, a także grupę leków o różnej budowie chemicznej. Do leków z grupy alkaloidów izochinolinowych zalicza się papawerynę, moksawerynę oraz drotawerynę (Pawłowski 2020).

2. Opis zagadnienia

Ból jest powszechnym doświadczeniem ludzkim, który może mieć wiele przyczyn oraz stopni nasilenia. Niemniej jednak każdy rodzaj bólu wpływa na prawidłowe funkcjonowanie i samopoczucie człowieka. Istnieje wiele sposobów zwalczania i łagodzenia bólu opartych na różnych mechanizmach działania leków. Jednym z leków, którego działanie przeciwbólowe opiera się na relaksacji mięśni gładkich jest drotaweryna. W obecnych czasach stała się coraz częściej stosowanym lekiem zarówno wśród osób dorosłych jak i dzieci. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań oceniających wpływ drotaweryny na zwalczanie bólu w obrębie przewodu pokarmowego, brzucha i miednicy.

3. Przegląd literatury

3.1 Właściwości fizykochemiczne

Drotaweryna jest lekiem z grupy pochodnych tetraizochinoliny o wzorze sumarycznym $C_{24}H_{31}NO_4$. Nazwa systematyczna tego leku to (1Z)-1-[(3,4-dietoksyfenylo)metylideno]-6,7-dietoksy-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina. W produktach leczniczych stosowana jest w postaci soli - chlorowodorku drotaweryny. Chlorowodorek drotaweryny ma postać krystalicznego proszku o barwie jasnożółtej lub lekko żółtozielonej. Jego masa molowa wynosi $433,97 \text{ g mol}^{-1}$, a temperatura topnienia waha się w granicach $211-213^\circ\text{C}$. Wartość pKa jest równa 7,11, co wskazuje na słabe właściwości zasadowe leku. Związek ten jest dobrze rozpuszczalny w acetonie, słabo rozpuszczalny

w 96% etanolu, trudno rozpuszczalny w wodzie oraz praktycznie nierozpuszczalny w eterze naftowym (Pawłowski 2020; Kumar i in. 2019; <https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>).

3.2 Mechanizm działania

Drotaweryna jest lekiem o działaniu spazmolitycznym, czyli rozkurczającym mięśnie gładkie. Zaliczana jest do selektywnych inhibitorów fosfodiesterazy 4 (PDE4). Fosfodiesterazy (PDE) stanowią różnorodną grupę enzymów, które hydrolizują cykliczne nukleotydy i odgrywają istotną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu wtórnych przekaźników - cAMP (cykliczny adenosynomonofosforan) i cGMP (cykliczny guanosynomonofosforan). Zatem w wyniku działania drotaweryny dochodzi do wewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia cAMP, co prowadzi do inaktywacji kinazy łańcucha lekkiego miozyny (MLCK) i w konsekwencji dochodzi do rozkurczu mięśni gładkich. *In vitro* drotaweryna hamuje aktywność fosfodiesterazy 4, lek ten nie ma jednak zdolności hamowania izoenzymów fosfodiesterazy 3 i fosfodiesterazy 5. Ponieważ w komórkach mięśnia sercowego oraz mięśni gładkich naczyń krwionośnych swoje działanie wywiera głównie izoenzym PDE3 drotaweryna nie wykazuje działań niepożądanych ze strony układu krążenia (Pawłowski 2020; <https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinalproducts/8890/characteristic>).

3.3 Właściwości farmakokinetyczne

Na rynku polskim chlorowoderek drotaweryny występuje w postaci roztworu do wstrzykiwań, tabletek powlekanych oraz tabletek niepowlekanych (<https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=253>).

Wchłanianie

Lek po podaniu pozajelitowym wchłania się całkowicie, natomiast wchłanianie z przewodu pokarmowego po podaniu doustnym nie jest całkowite. W wyniku doustnego podania leku w dawce wynoszącej 80 mg średnie maksymalne stężenie drotaweryny we krwi (C_{max}) było równe 292 ± 88 ng ml⁻¹, a czas w którym dochodziło do osiągnięcia podanej wartości C_{max} wynosił 45-60 minut (<https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>; <https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

Dystrybucja

Substancja jest w dużym stopniu wiązana z białkami osocza. Do białek, z którymi wiąże się drotaweryna należą albuminy, gamma globuliny oraz beta globuliny. Średnia objętość dystrybucji po przyjęciu leku doustnie w dawce 80 mg osiągnęła wielkość 193 ± 48 l. Natomiast po przyjęciu tej samej dawki, ale drogą dożylną wartość średniej objętości dystrybucji wynosiła 195 ± 48 l. Do krążenia w postaci niezmienionej przechodzi jedynie 65% zastosowanej dawki leku, ponieważ ulega on efektowi pierwszego przejścia w wątrobie. Wiadomo, iż substancja ma zdolność przenikania przez łożysko, nie ma natomiast potwierdzonej informacji co do przenikania leku do mleka kobiety karmiącej (<https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>; <https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

Metabolizm

Wątroba jest głównym miejscem biotransformacji i eliminacji drotaweryny, lecz może ona również ulec wydaleniu z żółcią pod postacią sprzężonych metabolitów. Do tej pory zidentyfikowano jedynie metabolity tego leku u zwierząt. Do głównych metabolitów drotaweryny u szczurów należą: 4'-desetylo-drotaweryna, drotaweraldyna oraz 6-desetylo-drotaweryna (<https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>; <https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

Eliminacja

Mimo, że drotaweryna ulega eliminacji przede wszystkim na drodze metabolizmu wątrobowego, jest ona usuwana z organizmu również w około 67% z kałem oraz w około 20% z moczem. Biologiczny okres półtrwania ($T_{1/2}$) jest równy 8-10 godzin, natomiast do całkowitego

usunięcia substancji z ustroju dochodzi w ciągu 72 godzin (<https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>; <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

3.4 Zastosowanie

Drotaweryna wchodzi w skład wielu dostępnych preparatów o działaniu spazmolitycznym. W preparatach farmaceutycznych występuje w postaci chlorowodoru drotaweryny. Jest lekiem powszechnie stosowanym, a w Polsce znajduje się wśród najczęściej kupowanych leków (Eder i in. 2022). Większość z dostępnych preparatów to leki OTC - dostępne bez recepty. Należą do nich m.in. Deespa, Dospax, Drotafemme, NO-SPA, Spastyna. (<https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinalproducts/8890/char-acteristic>, <https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>).

3.5 Przeciwwskazania

Drotaweryna przeciwwskazana jest u osób, u których występuje nadwrażliwość na tę substancję oraz u pacjentów z niewydolnością krążenia i zaburzeniami przewodnictwa w mięśniu sercowym, do których należą blok przedsionkowo-komorowy zarówno II, jak i III stopnia. Lek nie powinien być stosowany w przypadku występowania ciężkiej niewydolności nerek oraz wątroby. Jest przeciwwskazana także u dzieci poniżej 6 roku życia. Należy zachować szczególną ostrożność, jeżeli lek ma być stosowany u kobiet w ciąży oraz u dzieci od 6 roku życia. (Lasota i in. 2011; <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

3.6 Działania niepożądane

Drotaweryna jest stosunkowo bezpiecznym i dobrze tolerowanym lekiem. W porównaniu do innych leków z grupy alkaloidów izochinolinowych głównie papaweryny, drotaweryna wykazuje korzystniejszy profil bezpieczeństwa. W wyniku jej stosowania bardzo rzadko obserwuje się poważniejsze działania niepożądane. Najczęściej mogą pojawić się bóle i zawroty głowy, a także nudności i wymioty. Ponadto może czasem wystąpić ogólne osłabienie, zaburzenia snu, zaburzenia słuchu oraz reakcje alergiczne, takie jak pokrzywka, świąd, wysypka (Dębski 2010; Lasota 2011).

3.7 Interakcje

Do jednych z ważniejszych interakcji inhibitorów fosfodiesterazy należy interakcja z lewodopą. Drotaweryna osłabia działanie tego leku i może prowadzić do nasilenia objawów drżenia i sztywności mięśni u pacjentów przyjmujących jednocześnie obydwa leki. Substancja osłabia również przeczyszczające działanie leku jakim jest prukalopryd. W wyniku jednoczesnego stosowania z loperamidem dochodzi do nasilenia działania zapierającego, a podczas stosowania z riocyguatem oraz monoazotanem izosorbidu potęguje się działanie hipotensyjne tych leków. Wzmocnienie działania rozkurczającego mięśnie gładkie następuje podczas jednoczesnego stosowania drotaweryny z atropiną, suchym wyciągiem z liści pokrzyki oraz z oksybutyniną. Skuteczność drotaweryny może być osłabiona przez błękit patentowy, czyli barwnik wykorzystywany do oznaczeń w medycynie (<https://go.drugbank.com/drugs/DB06751>; <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic>).

W celu wzmocnienia działania rozkurczowego drotawerynę można jednocześnie stosować z metamizolem lub/i hioscyną. Dzięki temu, że wymienione leki działają według różnych mechanizmów farmakologicznych, ale prowadzą do tego samego efektu, takie połączenie jest bezpieczne i jest przykładem politerapii. Nie należy natomiast łączyć leku z inną substancją o tym samym mechanizmie działania tj.: mebeweryna lub papaweryna. Połączenie takie jest przykładem polipragmazji. Nie nastąpi silniejsze działanie spazmolityczne, a jedynie zwiększy się ryzyko wystąpienia działań niepożądanych tych substancji (Woroń i in. 2020).

3.8 Drotaweryna w leczeniu bólu menstruacyjnego

Drotaweryna jest często stosowanym lekiem przez kobiety cierpiące na dolegliwości bólowe spowodowane miesiączkowaniem. Obecnie uważa się, że istotną rolę w bolesnym miesiączkowaniu odgrywają prostaglandyny, których wydzielanie w błonie śluzowej macicy wzrasta podczas cykli związanych z owulacją. U kobiet skarżących się na bolesne cykle menstruacyjne obserwowane jest nawet 4 krotnie większe stężenie prostaglandyn. Prostaglandyny odpowiadają za skurcze błony

mięśniowej macicy i naczyń wewnątrzmacicznych, a intensywność skurczów wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia prostaglandyn. Badano skuteczność stosowania 80 mg drotaweryny w porównaniu z 400 mg ibuprofenu u pacjentek z bolesnymi miesiączkami. Badanie to wykazało pozytywny wpływ drotaweryny na znoszenie bólu menstruacyjnego, jednak słabszy niż ibuprofenu (Dębski i in. 2010).

3.9 Drotaweryna w leczeniu objawów zespołu jelita drażliwego

Zespół jelita drażliwego (IBS) to schorzenie układu pokarmowego o charakterze czynnościowym objawiające się bólem brzucha, zaburzeniami perystaltyki jelit przy braku konkretnych zmian patologicznych. Przeprowadzono badanie mające na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania drotaweryny w leczeniu objawów zespołu jelita drażliwego. W badaniu wzięło udział 180 osób, które zostały podzielone losowo na dwie równe grupy. Pierwsza grupa otrzymywała drotawerynę a druga placebo, leczenie trwało 4 tygodnie i następnie oceniono zmiany w częstości i nasileniu bólu brzucha i innych objawów. W badaniu tym potwierdzono skuteczność drotaweryny w zmniejszaniu częstości i nasilenia bólu w zespole jelita drażliwego. Po 4 tygodniach stosowania drotaweryny częstość bólu znacząco się zmniejszyła u 77,7% pacjentów, a w grupie stosującej placebo u 30,6 % pacjentów. Nasilenie bólu również uległo zmniejszeniu odpowiednio o 66,0 % pacjentów leczonych drotaweryną i 26,0 % w grupie placebo. W badaniu nie stwierdzono również żadnych poważnych działań niepożądanych mogących wpływać na bezpieczeństwo stosowania drotaweryny (Rai i in. 2014).

3.10 Drotaweryna w leczeniu bólu brzucha u dzieci

Jak wiadomo drotaweryna jest popularnym i skutecznym lekiem stosowanym przez dorosłych w leczeniu zaburzeń spastycznych i motoryki mięśni gładkich przewodu pokarmowego. Stała się również coraz częściej podawana dzieciom w wieku szkolnym skarżącym się na dolegliwości bólowe brzucha. Ból brzucha u dzieci jest powszechnym problemem, mogącym mieć wiele przyczyn, m.in. problemy trawienne, infekcje czy zaparcia. W celu oceny skuteczności i bezpieczeństwa drotaweryny w leczeniu nawracających bólów brzucha u dzieci przeprowadzono badanie wśród dzieci w wieku od 4 do 12 lat. Jedna grupa otrzymywała chlorowoderek drotaweryny, a druga placebo. W grupie przyjmującej lek wystąpiło znacznie mniej epizodów bólowych oraz obserwowano mniejszą nieobecność w szkole w porównaniu z grupą przyjmującą placebo. Częstość występowania działań niepożądanych w czasie obserwacji była porównywalna w obu grupach. Badanie to wykazało, że drotaweryna jest skutecznym i bezpiecznym lekiem w leczeniu nawracających bólów brzucha u dzieci (Narang i in. 2015).

3.11 Drotaweryna w ostrych bólach kolkowych spowodowanych kamieniami nerkowymi i moczowodowymi

Pojawienie się kamieni w układzie moczowym może powodować utrudniony przepływ moczu i prowadzić do zakażeń dróg moczowych. Głównym objawem kamicy nerkowej i moczowodowej jest ból i dyskomfort. Do podstawowych czynników wywołujących ból w tych strukturach należą nieprawidłowe rozciągnięcie ścian moczowodu i miedniczki nerkowej oraz napięcie torebki nerkowej. Przeprowadzono randomizowane badanie kliniczne mające ocenić skuteczność stosowania drotaweryny w zmniejszaniu bólu występującego w kamicy nerkowej. Wyniki badania pokazały, iż stosowanie drotaweryny było skuteczne u 79% pacjentów, w porównaniu z grupą placebo – 46%. Podczas stosowania leku nie wystąpiły żadne poważne działania niepożądane, najczęściej występowały nudności, wymioty, przejściowy spadek ciśnienia i zawroty głowy. Udowodniono, że drotaweryna skutecznie może zmniejszać ból u pacjentów z ostrymi bólami kolkowymi, gdyż działa na mięśnie gładkie, zmniejszając ich skurcz i tym samym łagodząc ból (Romics i in. 2003).

3.12 Stosowanie drotaweryny przez kobiety ciężarne

W charakterystyce produktu leczniczego No-spa widnieje informacja, iż stosowanie drotaweryny przez pacjentki ciężarne powinno mieć miejsce tylko w przypadkach, kiedy korzyść ze stosowania leku przewyższa ryzyko. Ponieważ substancja przenika przez łożysko może mieć

negatywny wpływ na rozwijający się płód. Producent nie zaleca zażywania leku w okresie porodu, ponieważ w badaniu klinicznym wykazano ryzyko krwotoku poporodowego u kobiet stosujących ten lek w czasie porodu. Zainteresowaniem jednak cieszy się temat stosowania drotaweryny przez kobiety rodzące. Wiele ośrodków przeprowadziło badania, których celem było zbadanie bezpieczeństwa stosowania drotaweryny podczas porodu. Istnieją badania wskazujące na skuteczność leku w skracaniu czasu trwania aktywnej fazy porodu (Ikeotunoye i in. 2022). Na podstawie opisanych badań wysnuto wnioski, iż chlorowoderek drotaweryny może być bezpieczny i skuteczny w celu przyśpieszenia porodu, szczególnie pierwszego okresu porodu u kobiet, które jeszcze nie rodziły. Singh 2004; Ibrahim i in. 2014).

3.13 Potencjalne zastosowanie drotaweryny w innych wskazaniach

Obecnie prowadzone są rozmaite badania w celu poszukiwania właściwości drotaweryny, które mogłyby pozwolić na jej szersze zastosowanie w świecie medycyny. Istnieją publikacje, w których naukowcy badali rolę leku w leczeniu zaburzeń poznawczych wywołanych chorobą Alzheimera u myszy. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia wykazano, iż drotaweryna moduluje stężenie neuroprzekazników w mózgu oraz łagodzi zaburzenia poznawcze u tych zwierząt (Nazir i in. 2021). W innym badaniu skupiono się na potencjalnych właściwościach cytostatycznych leku (Pavel i in. 2017). Dowiedziono, że drotaweryna działa cytostatycznie na kilka ludzkich linii komórkowych nowotworów oraz na niezłośliwe fibroblasty mysie. Wykazano natomiast, że właściwości cytotoksyczne leku są niewielkie (Pavel i in. 2017). Oczywiście na podstawie przedstawionych wyników badań nie można jednoznacznie stwierdzić, iż drotaweryna wykazuje przedstawiane właściwości, ale przeprowadzanie takich badań niesie nadzieje związane z odnajdywaniem zastosowań obecnych już na rynku leków, które będą mogły poszerzyć ich wykorzystanie w lecznictwie.

4. Podsumowanie

Drotaweryna, należąca do spazmolityków muskulotropowych z grupy pochodnych tetraizochinoliny jest skutecznym lekiem powszechnie stosowanym przez społeczeństwo w zmniejszaniu dolegliwości bólowych. Blokując enzym fosfodiesterazę prowadzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego cyklicznego adenozynomonofosforanu oraz cyklicznego guanozynomonofosforanu i w konsekwencji powoduje rozkurcz mięśni gładkich. Dzięki temu, drotaweryna jest z dużą skutecznością stosowana w schorzeniach wynikających z nadmiernego skurczu mięśni. Wciąż prowadzone są badania nad innymi potencjalnymi zastosowaniami substancji, które być może poszerzą zakres wskazań terapeutycznych leku jakim jest drotaweryna.

5. Literatura

Charakterystyka produktu leczniczego No-spa. Available online:

<https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/8890/characteristic> [Data dostępu: 28.11.2023r.]

Dębski R, Niemiec T, Mazurek M, i in. (2010) Porównanie skuteczności i tolerancji 80 mg drotaweryny i 400 mg ibuprofenu u pacjentek z pierwotnym bolesnym miesiączkowaniem-badanie DOROTA. *Postępy Nauk Medycznych* 23: 664-669.

DrugBank Online. Available online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06751> [Data dostępu: 28.11.2023r.]

Eder P, Kowalski P, Mastalerz-Migas A, et al. (2022) Self-Medication with Drotaverine among Patients with Common Abdominal Symptoms and Treatment Efficacy from the Perspectives of Patients and General Practitioners-An Observational, Retrospective, Cross-Sectional Study Using Real-World Data. *Journal of Clinical Medicine* 11: 3156.

Ibrahim MI, Alzeeniny HA, Ellaihy MI, et al. (2014) Drotaverine to improve progression of labor among nulliparous women. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 124(2): 112-117.

- Ikeotuonye AC, Umeora OJ, Nwafor JI, et al. (2022) Drotaverine to shorten the duration of labour in primigravidas: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *African Health Sciences* 22: 108-116.
- Kumar D, Kumar A, Malik JK (2019) Preformulation studies of drotaverine HCl *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 6: 304-307.
- Lasota B (2011) Rola leków spazmolitycznych w terapii chorób układu pokarmowego ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania mebeveryny. *Świat medycyny i farmacji* 8, 46-50. *Medycyna Praktyczna*. Available online: <https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=253> [Data dostępu: 28.11.2023r.]
- Narang M, Shah, D, Akhtar H (2015) Efficacy and Safety of Drotaverine Hydrochloride in Children with Recurrent Abdominal Pain: A Randomized Placebo Controlled Trial. *Indian Pediatrics* 52: 847-851.
- Nazir S, Anwar F, Saleem U (2021) Drotaverine Inhibitor of PDE4: Reverses the Streptozotocin Induced Alzheimer's Disease in Mice. *Neurochemical Research* 46(7):1814-1829.
- Pavel IZ, Heller L, Sommerwerk S, et al. (2017) Drotaverine - a Concealed Cytostatic! *Archiv der Pharmazie* 350(1).
- Pawłowski M (2020) *Chemia leków*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie: Warszawa, Polska, 274-276.
- Rai RR, Dwivedi M, Kumar N (2014) Efficacy and safety of drotaverine hydrochloride in irritable bowel syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Saudi Journal of Gastroenterology* 20: 378-382.
- Rai RR, Nijhawan S (2021) Comparative evaluation of efficacy and safety of drotaverine versus mebeverine in irritable bowel syndrome: A randomized double-blind controlled study, *Saudi Journal of Gastroenterology* 27: 136-143.
- Romics I, Molnár DL, Timberg G, et al. (2003) The effect of drotaverine hydrochloride in acute colicky pain caused by renal and ureteric stones. *British Journal of Urology International* 92: 92-96.
- Singh KC, Jain P, Goel N, et al. (2004) Drotaverine hydrochloride for augmentation of labor. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 84(1):17-22.
- Woroń J, Kutaj-Wąsikowska H (2020) Mechanizmy interakcji leków. Czynniki modyfikujące ryzyko wystąpienia interakcji leków w praktyce klinicznej. *Niekorzystne interakcje leków: aspekty kliniczne i prawne*. Warszawa, Medical Tribune Polska, 11-18.

2. Problem nadużywania leków z grupy benzodiazepin

The problem of benzodiazepine drugs misuse

Drzazga Agnieszka⁽¹⁾, Frydrych Michał⁽¹⁾, Parys Wioletta⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Drzazga Agnieszka: s79377@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: anksjolityki, problem lekozależności, agoniści receptora GABA_A

Streszczenie

Benzodiazepiny (BDZ) od kilkudziesięciu lat stanowią podstawową grupę leków w terapii zaburzeń lękowych oraz w leczeniu depresji. Wysoka skuteczność, szybki czas działania i niska toksyczność sprawiają, że jest to jedna z najpowszechniej stosowanych grup leków we wspomnianych wcześniej schorzeniach - świadczy o tym m.in. fakt, że alprazolam jest jednym z najczęściej przepisywanych psychotropów. Należy jednak pamiętać, że charakteryzują się one wysokim potencjałem uzależniającym, zwłaszcza jeżeli są stosowane w sposób przewlekły, w dawkach przekraczających zalecane przez producentów. Jedną z grup pacjentów szczególnie narażonych na uzależnienie od benzodiazepin są osoby starsze. Pomimo istniejących schematów postępowania i leczenia, odstawienie BDZ nadal jest dla wielu pacjentów trudno osiągalne. Niniejszy artykuł ma na celu przybliżyć niektóre aspekty związane ze stosowaniem, uzależnieniem oraz rekomendowane wytyczne, dotyczące odstawiania leków z tej grupy.

1. Wstęp

Benzodiazepiny zostały wprowadzone na światowy rynek w drugiej połowie XX wieku. Pierwszą benzodiazepiną zatwierdzoną przez Agencję Żywności i Leków (FDA) był chlordiazepoksyd w 1960 roku. Natomiast po 3 latach od tego wydarzenia zatwierdzono dobrze znany wszystkim diazepam. Leki te miały znosić lęk u pacjentów, ułatwiać zasypianie i do tego być o wiele bezpieczniejsze, niż dobrze znane już ludzkości barbiturany i ich pochodne. W związku z tym pojawiło się duże zainteresowanie omawianymi lekami. Szacuje się, że nawet 20% hospitalizowanych pacjentów w latach 70 otrzymywało diazepam. Początkowo uważane za nieszkodliwe leki, z czasem zaczęły zbierać wiele negatywnych opinii, zaczęto mówić o ich skutkach ubocznych, a nawet o rozwijaniu się zależności lekowej (Dubovsky i Marshall 2022). Przyczyniło się to do określenia czasu trwania standardowej terapii na 2-4 tygodnie przez Federalny Instytut ds. Leków i Wyrobów Medycznych w Niemczech oraz do zaostrzenia procedur dotyczących przepisywania benzodiazepin przez lekarzy, m.in. w stanie Nowy Jork w latach 80-tych (Janhsen i in. 2015). Obecnie w dalszym ciągu stosuje się leki z tej grupy, dodatkowo praktycznie z roku na rok zwiększa się ilość pacjentów zażywających leki z grupy benzodiazepin. Zjawisko to obserwuje się także u pacjentów niepełnoletnich - młodzieży i dzieci. Szacuje się, że od 2 do 7,5% całej populacji stosuje te leki przewlekłe, szukając skutecznej pomocy m.in. w zaburzeniach snu (Dubovsky i Marshall 2022).

2. Przegląd literatury

2.1 Mechanizm działania

Podstawą do zrozumienia wpływu leku na organizm ludzki jest zapoznanie się z mechanizmem jego działania. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) występuje wiele typów receptorów, należą do nich m.in. receptory GABA wiążące kwas γ -aminomasłowy (GABA), które

znajdują się we wszystkich strukturach OUN. Jednym z ich podtypów są receptory GABA_A-mają one charakter jonotropowy, po przyłączeniu agonisty następuje w nich otwarcie kanału chlorkowego, wskutek czego obserwuje się hiperpolaryzację błony komórkowej neuronu i zahamowanie jego funkcji. Benzodiazepiny wiążą się z receptorem GABA_A, z podjednostką α , dokładniej z receptorami benzodiazepinowymi (BDZ) znajdującymi się na tej podjednostce. Z kolei wyżej wymieniony kwas γ -aminomasłowy łączy się z podjednostką β tego samego receptora. Przez wiązanie się benzodiazepiny z receptorem BDZ następuje aktywacja receptora GABA_A, nasila się powinowactwo endogennego kwasu γ -aminomasłowego do podjednostki β receptora, dzięki czemu następuje otwarcie kanałów chlorkowych oraz hiperpolaryzacja błony komórkowej. Leki te wobec receptorów benzodiazepinowych mają zarówno duże powinowactwo jak i małą selektywność, z tego powodu oprócz pozytywnych skutków terapii, takich jak np. zniesienie lęku, obserwuje się także skutki negatywne jak sedacja, spowolnienie czasu reakcji, niepamięć wsteczna, osłabienie funkcji psychoruchowych i rozwój uzależnienia lekowego. Wyróżnia się benzodiazepiny o krótkim (m. in. alprazolam, oksazepam), pośrednim i długim (m.in. diazepam, klonazepam) okresie półtrwania (Janiec 2015). Leki te podawane mogą być różnymi drogami: doustnie, domięśniowo i dożylnie. Po podaniu doustnym stężenie maksymalne w osoczu krwi osiągają po upływie od 30 minut do 2 godzin. Oprócz tego poszczególne leki z tej grupy różnią się od siebie m.in. stopniem wiązania z białkami i lipofilowością, co przekłada się bezpośrednio na szybkość pojawienia się pierwszych efektów po zastosowaniu leków i różnicach w ich czasie działania (Griffin i in. 2013; Dubovsky i Marshall 2022). Skupiając się na negatywnych aspektach zażywania benzodiazepin zauważa się upośledzenie pamięci długotrwałej po zażyciu leków. Jest ona wynikiem tego, że informacje przechowywane w pamięci krótkotrwałej nie są prawidłowo składowane w pamięci długotrwałej, skutkiem czego może wystąpić amnezja wsteczna, czyli niepamięć występująca po zażyciu leku. Co istotne niepamięć ta nie dotyczy zdarzeń występujących przed zastosowaniem dawki benzodiazepiny. Ciężko ustalić czy długotrwałe zażywanie tych leków ma permanentny wpływ na zdolności poznawcze ze względu na sprzeczności w wynikach przeprowadzonych dotychczas badań. Leki te często są przepisywane osobom w wieku podeszłym, a działania niepożądane, takie jak sedacja mogą przyczynić się u pacjenta geriatrycznego do niebezpiecznego dla jego zdrowia upadku, z tego względu należy uwzględnić bilans potencjalnych korzyści i ryzyka dla każdego takiego pacjenta (Uzun i in. 2010).

2.2 Mechanizm rozwoju zależności psychicznej i fizycznej, rozwoju tolerancji oraz główne objawy uzależnienia

Benzodiazepiny to grupa leków, na działanie których bardzo szybko rozwija się tolerancja, a po ich odstawieniu występuje zespół abstynencyjny. Mechanizm rozwoju tolerancji na leki z tej grupy jest bezpośrednim wynikiem działań różnych układów, mających na celu utrzymanie homeostazy, czyli względnie stabilnych warunków w środowisku wewnętrznym organizmu. Zjawiska te są prawdopodobnie wynikiem złożonych procesów, takich jak zmiany w receptorach (wtórna niedoczynność ośrodkowego kompleksu receptora GABA_A), nasilenie metabolizmu leków oraz zmiany strukturalne w neuronach hipokampa i miejsca sinawego. Powoduje to, że przez adaptację organizmu pacjenta stan po zażyciu leku odczuwany jest jako normalny, co daje wrażenie słabnącego efektu terapeutycznego (Grotthus i in. 2004). Z kolei odchyleniem staje się dla pacjenta sam fakt braku przyjmowania benzodiazepin, których to niedobór może powodować wystąpienie u długo leczonego nimi pacjenta uczucia lęku, bezsenności i drgawek (jest to tzw. efekt "z odbicia"). W wyniku "efektu z odbicia" pacjent stale odczuwa nieprzyjemne dolegliwości, głównie niepokój i lęk, objawy te towarzyszą mu, aż do przyjęcia kolejnych, zazwyczaj stopniowo coraz wyższych dawek. W organizmach pacjentów stosujących leki z grupy benzodiazepin dochodzi również do syntezy endogennych substancji, które przeciwdziałają efektom wywoływanym przez zażycie tych leków. Rozwój tolerancji i zespołu abstynencyjnego powoduje, że w stosowaniu leków z omawianej grupy wprowadzono ograniczenia- zalecenia FDA mówią jasno, że nie powinno się przyjmować ich dłużej, niż miesiąc. Pacjenci wymagający leczenia nimi przez okres dłuższy niż miesiąc, powinni stosować leki z innych grup (np. leki z tak zwanej grupy "z"- m.in. zopiklon), a w razie konieczności dalszego stosowania benzodiazepin zmienić lek na inny z tej grupy. Największą zdolnością do wywoływania uzależnienia wykazują leki z grupy benzodiazepin o silnym działaniu i krótkim czasie

półtrwania. Pacjenci uzależnieni od omawianych substancji wykazują szereg charakterystycznych zachowań, które powinny wzbudzić czujność lekarza, mogących świadczyć o ich problemie lekozależności. Należą do nich m.in. zwiększanie dawki przyjmowanego leku bez konsultacji z lekarzem, próby manipulowania lekarzem, by ten przepisał lek w wyższej dawce oraz wizyty u kilku specjalistów naraz w celu otrzymania większej ilości recept. Objawy nagłego odstawienia benzodiazepin stosowanych długotrwale stanowią przeciwieństwo ich efektu farmakologicznego, są to m. in. zaburzenia snu, wzrost uczucia lęku, dysforia, wystąpić mogą również objawy grypopodobne. Szybkość wystąpienia objawów zespołu abstynencyjnego jest odwrotnie proporcjonalna do długości działania danej grupy pochodnych benzodiazepin (Grotthus i in. 2004; Brett i Murnion 2015). Grupą pacjentów szczególnie narażonych na uzależnienie od pochodnych BDZ są osoby w wieku podeszłym. Wynika to ze zmian socjo-społecznych w życiu osób starszych. Dotychczas w pełni sprawni, aktywni zawodowo i społecznie ludzie muszą mierzyć się z wynikającymi z przejścia na emeryturę i naturalnego procesu starzenia problemami, takimi jak osamotnienie, nasilenie uciążliwości dotychczas występujących dolegliwości oraz większą trudnością wykonywania prostych czynności w życiu codziennym, które do tej pory nie sprawiały im problemu. Znalezienie się w tej nowej, skrajnie niekomfortowej sytuacji powoduje wystąpienie u pacjentów w wieku starszym objawów takich jak lęk, przewlekłe poczucie stresu, bezsenność, a niekiedy również depresja (Sobów 2010). Powoduje to, że leki te stosowane są w tej grupie pacjentów bardzo często, nierzadko przewlekłe, pomimo istniejących zaleceń, ograniczających czas terapii tymi substancjami do 2 tygodni. Na dużą popularność BDZ wpływa również ich dobra tolerancja oraz niemal natychmiastowy efekt farmakologiczny. Wszystkie te czynniki powodują, że są one stosowane u osób starszych, pomimo szeregu działań niepożądanych szczególnie niebezpiecznych dla pacjentów w wieku podeszłym, takich jak np. zaburzenia koncentracji, senność, osłabienie siły mięśniowej i sprawności psychomotorycznej, problem z zapamiętywaniem oraz zaburzenia równowagi. Przed rozpoczęciem stosowania leków z grupy benzodiazepin należy poinformować pacjenta, że leki te cechują się wysokim ryzykiem rozwoju uzależnienia. Dużym problemem dotyczącym pacjentów przewlekłe je stosujących jest podobieństwo pomiędzy objawami pierwotnymi (tymi, które poprzedziły decyzję o leczeniu danego pacjenta z udziałem benzodiazepin) z wtórnymi objawami, spowodowanymi uzależnieniem od tej grupy leków (Basińska-Szafrńska 2019). Leki te powinny być stosowane możliwie jak najkrócej, w najmniejszej dawce znoszącej objawy, a ich bezpieczne odstawienie powinno przeprowadzać się, redukując dawkę o około ¼ tygodniowo. Oprócz tego zaleca się również zamianę benzodiazepin krótko działających na pochodne o długim okresie półtrwania. Odstawienie leków poprzez redukcję dawki może być nieskuteczne u pacjentów stosujących je przez okres dłuższy niż rok, a także u pacjentów starszych, uzależnionych od substancji psychoaktywnych, z zaburzeniami psychicznymi oraz u chorych, u których wcześniej wystąpiły ciężkie zespoły abstynencyjne. W takich przypadkach konieczne może być przeprowadzenie detoksykacji w warunkach szpitalnych. Poza wymienionymi metodami pomocne może być wdrożenie leków, redukujących objawy odstawienne benzodiazepin, np. karbamazepiny, klonidyny, haloperidolu oraz środków z grupy antagonistów receptorów β -adrenergicznych (Grotthus i in. 2004).

2.3 Najczęściej nadużywane substancje z grupy benzodiazepin

Według FDA alprazolam nie jest jedynie najczęściej przepisywaną benzodiazepiną, jest on także jednym z częściej stosowanych leków psychotropowych. Występuje pod wieloma nazwami handlowymi, jedną z popularniejszych na rynku jest "Xanax". Omawiana substancja czynna mimo, że tak często używana nie cieszy się dobrą opinią jeśli mowa o jej skutkach ubocznych, głównie ze względu na występowanie cięższych objawów odstawiennych, w porównaniu do pozostałych leków z tej grupy. Analizując bezpieczeństwo leku trzeba mieć na uwadze także właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne (Ait-Daoud i in. 2018). Alprazolam jest triazolową pochodną benzodiazepiny, działa silnie i krótko, a jego biologiczny okres półtrwania wynosi 8-16 godzin. Stosowany jest doraźnie w napadach lęku, w celu szybkiego zniesienia niepokoju o dużym nasileniu, objawiającego się m.in tachykardią, uczuciem bólu lub ucisku w klatce piersiowej, dusznościami, derealizacją lub/i depersonalizacją. Pomocny jest także przy agorafobii- lęku przed przebywaniem na otwartych przestrzeniach (Ait-Daoud i in. 2018). Lek ten ma większe ryzyko

niewłaściwego stosowania, w porównaniu do innych benzodiazepin, głównie przez wzgląd na jego dużą siłę działania i krótki czas biologicznego półtrwania, a także stosunkowo małą lipofilowość oraz mały stopień wiązania się z białkami krwi. Oprócz wyżej wymienionych przyczyn nadużywania alprazolamu trzeba zaznaczyć także, że wykazano wpływ leku na wyraźny wzrost transmisji dopaminergicznej w rejonie prążkowiec w mózgu oraz delikatny wpływ na wzrost stężenia serotoniny w tym obszarze. Z tego powodu alprazolam może działać podobnie do substancji narkotycznych o charakterze stymulującym, poprzez aktywację ośrodka nagrody. W przeprowadzonym badaniu z udziałem 14 pacjentów, którzy w przeszłości nadużywali środków uspokajających wykazano, że zażycie alprazolamu w preparatach o natychmiastowym uwalnianiu w dawce 1 i 2 miligramów było dla nich w pełni satysfakcjonujące, uzyskały one maksymalną ilość punktów- 6 (oceniano 6 parametrów, m.in. siłę działania i odczuwalne efekty), zaś zażycie preparatów o wydłużonym uwalnianiu w dawce 2 mg nie uzyskało żadnych punktów, ten sam preparat w dawce 3 mg uzyskał 3 na 6 punktów. W związku z tym można zakładać, że stosowanie preparatów o przedłużonym uwalnianiu zmniejsza ryzyko nadużywania alprazolamu, przy czym należy zauważyć, że dawkowanie dobowe przekraczające 3-6 mg będzie miało podobny efekt psychoaktywny, jak zażycie dużej ilości preparatu o natychmiastowym uwalnianiu. Przypuszcza się, że obecność pierścienia triazolowego w budowie cząsteczki ma wpływ na sposób metabolizowania leku. Alprazolam w stężeniach w osoczu wynoszących 20-40 ng ml⁻¹ działa skutecznie anksjolitycznie, zaś po przekroczeniu tych wartości nasila się jego działanie depresyjne na ośrodkowy układ nerwowy, objawia się to m.in. sennością, splątaniem, problemami z pamięcią i niezbornością ruchową (Ait-Daoud i in. 2018). Poza wymienionymi symptomami w przypadku alprazolamu obserwuje się także większe ryzyko pojawienia się zawrotów głowy, dezorientacji, zaburzeń mowy, obniżenia libido, drażliwości, a także pojawienia się odczynów skórnych takich jak dermatozy i wysypki (Dubovsky i Marshall 2022).

Inną, często używaną substancją leczniczą z grupy pochodnych benzodiazepin jest diazepam. Jest to lek o szybkim i długim działaniu. Na rynku pojawił się w latach 60 XX wieku, a ze względu na lepszy profil bezpieczeństwa i obecność odtrutki- flumazenilu, stopniowo przyczynił się do zmniejszenia zażywania niebezpiecznych barbituranów. Czas biologicznego półtrwania diazepamu wynosi od 22 do 72 godzin. Jest on znacznie bardziej lipofilowy, niż alprazolam, a także wiąże się w większym stopniu z białkami osocza. Dzięki kumulacji diazepam oraz jego metabolitów (głównie nordazepam) w organizmie, można zaobserwować mniejsze objawy abstynencyjne po odstawieniu leku (Juergens 1991). Stosowany jest m.in. w premedykacji pacjenta, w znoszeniu objawów abstynencyjnych u osób uzależnionych od alkoholu, w krótkotrwałym leczeniu zaburzeń lękowych, a także w padaczce, ze względu na jego działanie miorelaksacyjne (Dhaliwal i in. 2023). W badaniach wykazano, że diazepam preferencyjnie wybierany był częściej, niż alprazolam w przypadku osób nieuzależnionych fizycznie, którym zależało na doprowadzeniu się do odurzenia. Ciężko jednak stwierdzić na tej podstawie, czy ma on większy czy mniejszy potencjał uzależniający w porównaniu do alprazolamu. Wiadomo jednak, że ma on duże ryzyko nadużywania (Juergens 1991).

2.4 Leczenie uzależnienia od benzodiazepin

Zaleca się, aby odstawiać BDZ stopniowo, przez 4-6 tygodni (lub dłużej w przypadku diazepam podawanego w dawkach przekraczających 30 mg na dobę). Według powszechnie przyjętego schematu należy obniżać dawkę o 50% co tydzień. Jeżeli dany pacjent stosuje pochodną BDZ o krótkim czasie działania, należy zamienić ją na pochodną długo działającą- najczęściej diazepam. Co do zasady, większą szansę na skuteczne odstawienie BDZ mają pacjenci stosujący pochodne o długim czasie działania (Soyka 2017). U pacjentów ze współistniejącymi zaburzeniami psychicznymi (depresją, schizofrenią, stanami lękowymi) zaleca się programy terapii integracyjnej, obejmującej zarówno pierwotną chorobę psychiczną, jak również objawy abstynencyjne. Istnieje jedynie kilka opartych na dowodach zaleceń dotyczących farmakoterapii. W leczeniu objawowym stosuje się leki przeciwd depresyjne i stabilizatory nastroju, a także karbamazepinę w dawce 200 mg dwa razy na dobę, chociaż dowody na skuteczność tego leku w tym wskazaniu są ograniczone. W tym celu także używa się niebenzodiazepinowych leków przeciwlękowych, takich jak gabapentyna i pregabalina (która również wykazuje duży potencjał uzależniający). W przypadku występowania

zaburzeń snu zaleca się trazodon (w dawce od 25 mg do 150 mg na dobę), doksepinę (10 mg do 150 mg na dobę), mirtazapinę (7,5 mg do 30 mg na dobę). Leki te działają antagonistycznie do receptora histaminowego H1, częściowo także przez efekt antycholinergiczny oraz nie wykazują dużego potencjału uzależniającego. Poza tym stosować można również leki przeciwhistaminowe, takie jak difenhydramina (maksymalnie 50 mg na dobę), doksylamina (25 mg do 50 mg na dobę), hydroksyzyna oraz prometazyna (Fluyau i in. 2018). Należy pamiętać, że przy próbie odstawienia benzodiazepin duże znaczenie ma również świadomość pacjenta i dobrze prowadzona psychoterapia, szczególnie skuteczna jest tu terapia poznawczo-behawioralna. Obejmuje ona badanie psychospołecznych czynników stresu, trening umiejętności interpersonalnych oraz trening przewycięzania lęku. Z punktu widzenia omawianego w tym artykule zagadnienia najważniejsze jest wyrobienie nowych schematów zachowań, pojawiających się w sytuacjach zagrożonych ryzykiem ponownego zażycia benzodiazepin. Istotne jest również rozwijanie u pacjenta umiejętności samokontroli (Brett i Murnion 2015). Terapia poznawczo-behawioralna jest najbardziej rozpowszechnioną metodą leczenia uzależnienia od omawianych leków, chociaż kontrolowane badania wykazują, że 15-miesięczny okres odstawienia BDZ w kontrolowanych warunkach bez psychoterapii jest skuteczniejszy, niż standardowe leczenie z psychoterapią. W tym badaniu wskaźnik abstynencji krótkoterminowej wyniósł 29-36%, a wskaźnik abstynencji 10-letniej wyniósł 59%. Ogólne rokowania dla pacjentów poddawanych leczeniu z powodu odstawienia BDZ są dobre. Jeżeli jednak powodem pierwotnego stosowania u pacjenta jest zaburzenie psychiczne, konieczne może się okazać zastosowanie dodatkowego podejścia terapeutycznego (Soyka 2017).

3. Podsumowanie

Benzodiazepiny, mimo, że są bardzo skuteczne mogą stanowić zagrożenia dla pacjenta, gdyż stosowane niezgodnie z zaleceniami lekarza i/lub producenta, mogą przyczynić się do rozwoju niebezpiecznej dla życia i zdrowia lekozależności. Leki te powinny być stosowane możliwie jak najkrócej, a ryzyko uzależnienia nie powinno być bagatelizowane. Właśnie z tego względu benzodiazepiny nie powinny stanowić w farmakoterapii leków pierwszego rzutu, a stan pacjenta powinien być stale monitorowany przez specjalistę, m.in. przez częste wizyty kontrolne, a także przez edukację pacjenta w zakresie potencjalnego ryzyka przy przyjmowaniu tych medykamentów. Szczególną ostrożność należy zachować u pacjentów, którzy przyjmują substancje działające szybko i silnie, takie jak np. alprazolam, ze względu na większe ryzyko rozwoju lekozależności, w porównaniu do substancji długodziałających lub do postaci leków o opóźnionym uwalnianiu (stosowanych w zalecanych dawkach). Obecnie istnieje wiele skutecznych sposobów pomocy pacjentom zmagającym się z problemem uzależnienia, począwszy od metod farmakologicznych, przebiegających zazwyczaj z zastosowaniem leków przeciwdepresyjnych oraz stabilizujących nastroj, kończąc na uczestnictwie chorego w procesie psychoterapii, dzięki której ma on możliwość wraz ze specjalistą opracować nowe, zdrowsze mechanizmy działania w sytuacjach kryzysowych.

4. Literatura

- Ait-Daoud N, Scott Hamby A, Sharma S, et. al. (2018) A Review of Alprazolam Use, Misuse, and Withdrawal. *Journal of Addiction Medicine* 12(1): 4–10.
- Basińska-Szafrańska A (2019) Lekooporny nawrót wyjściowej choroby czy przewlekły zespół odstawienny? Objawy “lustrzane” u pacjentów przewlekłe leczonych benzodiazepinami. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 28 (3): 225-230.
- Brett J, Murnion B (2015) Management of benzodiazepine misuse and dependence. *Australian Prescriber* 38(5): 152-155.
- Dhaliwal JS, Rosani A, Saadabadi A (2023) Diazepam. StatPearls Publishing LLC.
- Dubovsky SL, Marshall D (2022) Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice. *Psychotherapy and Psychosomatics* 91: 307–334.
- Fluyau D, Revadigar N, Manobianco BE (2018) Challenges of the pharmacological management of benzodiazepine withdrawal, dependence, and discontinuation. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 8(5): 147–168.

- Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD (2013) Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects. *Ochsner Journal* 13(2): 214–223.
- Grotthus B, Radzik J, Leszek J (2004) Uzależnienie od benzodiazepin. *Psychiatria* 1: 23-30.
- Janhsen K, Roser P, Hoffman K (2015) The Problems of Long-Term Treatment With Benzodiazepines and Related Substances. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112: 1–7.
- Janiec W. (2015) *Farmakologia*. Warszawa: PZWL, 317, 328.
- Juergens S (1991) Alprazolam and Diazepam: Addiction Potential. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 8:43-51.
- Sobów T (2010) Benzodiazepiny u pacjentów w wieku podeszłym. *Psychiatria* 7 (6): 244-249.
- Soyka M (2017) Treatment of Benzodiazepine Dependence. *The New England Journal of Medicine*, 376:1147-1157.
- Uzun S, Kozumplik O, Jakovljević M, et. al. (2010) Side Effects of Treatment with Benzodiazepines. *Psychiatria Danubina*, 22(1): 90–93.

3. Porównanie parametrów lipofilowości deksametazonu uzyskanych różnymi metodami

Comparison of dexamethasone lipophilicity parameters obtained using different methods

Daria Klimoszek^(1,2), Małgorzata Dołowy⁽³⁾

⁽¹⁾Szkoła Doktorska SUM, Wydział Nauk Farmaceutycznych SUM w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych SUM w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

Daria Klimoszek: d201204@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: deksametazon, lipofilowość, logP, RMW

Streszczenie

Przedmiotem badań był deksametazon, fluorowany glikokortykosteroid wykazujący aktywność biologiczną i różnorodne zastosowanie w leczeniu. Jednym z ważniejszych parametrów fizykochemicznych wpływających na aktywność deksametazonu i jego losy w organizmie jest lipofilowość. Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza chromatograficzna deksametazonu metodą chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych pozwoliła na wyznaczenie optymalnych warunków chromatograficznych pozwalających na uzyskanie w sposób prosty i efektywny parametrów lipofilowości tego związku w postaci R_{MW} o wartości zbliżonej do eksperymentalnej logP uzyskanej metodą ekstrakcji w układzie n-oktanol-woda. Wykonana w pracy analiza teoretycznych wartości współczynnika podziału tego związku w postaci logP uzyskanych za pomocą różnych algorytmów obliczeniowych, takich jak: AlogPS, logP_{chemaxon}, MlogP, ilogP, logP_{silicos-it}, XlogP3, XlogP2, logP_{consensus}, WlogP, logP_{ACD/Labs}, AClogP i Alog również pozwoliła na ocenę przydatności tych parametrów do oceny lipofilowości badanego związku. Otrzymane rezultaty mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie w projektowaniu nowych pochodnych lub preparatów badanego deksametazonu.

1. Wstęp

Deksametazon to związek o wzorze sumarycznym $C_{22}H_{29}FO_5$ z grupy fluorowanych syntetycznych glikokortykosteroidów. Jego struktura została opracowana w 1957 roku. Natomiast w 1958 r. zatwierdzono go jako środek leczniczy przez FDA (Food and Drug Administration Agency) tj. Agencję Żywności i Leków (DrugBank, 2024). Deksametazon może być stosowany w różnej formie tj. tabletek, roztworów do wstrzykiwań, a także maści i kremów. Ponieważ wykazuje on działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwbólowe i immunosupresyjne, w tym znacznie silniejsze niż inny popularny steroid jak prednizon, stosowany on jest m.in. w ostrym reumatoidalnym zapaleniu stawów, zesztywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, astmie o ciężkim przebiegu, ostrej niedoczynności kory nadnerczy, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, zapaleniu gałki ocznej i różnych chorobach skóry jak np. łuszczyca czy rumień (Radkowski i in. 2022). Innym kierunkiem zastosowania omawianego glikokortykosteroidu jako środka o działaniu przeciwalergicznym i przeciwobrzękowym jest anestezjologia i medycyna ratunkowa (Radkowski i in. 2022). Ponadto od 2020 roku deksametazon stosowany jest także w leczeniu ciężkiego przebiegu COVID-19 (Ahmad et al. 2022).

Głównym determinantem losu każdej cząsteczki biologicznie aktywnej w organizmie ludzkim, w tym również deksametazonu, jest lipofilowość. Najczęściej wyznacznikiem lipofilowości jest współczynnik podziału n-oktanol-woda (P) lub jego logarytm (logP), który można określić

bezpośrednio metodą ekstrakcji ciecz-ciecz tzw. metodą *shake-flask* lub pośrednio za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (Józwiak i in. 2001). Ponadto dużym zainteresowaniem w procesie projektowania nowych leków lub ich zmodyfikowanych postaci cieszą się metody teoretyczne przeznaczone do predykcji współczynnika podziału oparte na różnych algorytmach obliczeniowych. Niewątpliwie główną zaletą ww. metod teoretycznych w odniesieniu do eksperymentalnych jest ich szybkość i ekonomiczność dzięki czemu pozwalają one na określenie właściwości ADME (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, wydalanie) nowo zaprojektowanej molekuly już na wstępnym etapie jej syntezy.

W niniejszej pracy dokonano oceny przydatności metody chromatografii cieczowej cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych (RP-TLC) oraz wybranych algorytmów obliczeniowych do wyznaczania lipofilowości deksametazonu, co może być przydatne w procesie projektowania nowych preparatów lub pochodnych tego związku.

2. Materiały i Metody

W analizie chromatograficznej stosowano wzorzec deksametazonu o czystości ≥ 96 (Sigma-Aldrich, Chiny). Fazy stacjonarne stanowiły płytki aluminiowe i odpowiednio szklane do TLC pokryte żelazem krzemionkowym RP-2F₂₅₄, RP-8F₂₅₄ i RP-18F₂₅₄ (E. Merck, Niemcy). Fazy ruchome składały się z etanolu i wody, acetonitrylu i wody oraz 1,4-dioksanu i wody, w których zawartość modyfikatora organicznego zmieniała się od 30% do 90% w odniesieniu do całkowitej objętości stosowanej fazy ruchomej. W badaniach używano metanolowy roztwór deksametazonu o stężeniu 2 mg/ml, który nanoszono każdorazowo na płytki chromatograficzne w ilości 5 mikrolitrów. Po rozwinięciu chromatogramów deksametazonu w danej fazie ruchomej na wysokość 7 cm i następnie ich wysuszeniu w temperaturze pokojowej przez okres 1h określano wartości współczynnika opóźnienia badanego steroidu tj. R_f , analizując położenie plamek tego związku na uzyskanych chromatogramach w świetle UV ($\lambda=254$ nm). Zgodnie ze wcześniejszymi badaniami (Sochacki i Dołowy 2021; Kuształ i in. 2022) w dalszym etapie tego eksperymentu wartości współczynnika R_f deksametazonu zostały wykorzystane do obliczenia parametru R_M według następującego wzoru (1):

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (1)$$

W celu wyznaczenia chromatograficznego parametru lipofilowości deksametazonu wartości R_M ekstrapolowano zgodnie z równaniem Soczewińskiego-Wachtmeistera (Józwiak i in. 2001) wg poniższego wzoru (2):

$$R_M = R_{MW} - S \cdot \varphi \quad (2)$$

gdzie: R_{MW} – chromatograficzny parametr lipofilowości deksametazonu, S – współczynnik kierunkowy prostej, φ – ułamek objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej.

Otrzymane dla różnych warunków chromatograficznych wartości chromatograficznego parametru deksametazonu tj. w dziewięciu układach do RP-TLC złożonych z płytek odpowiednio RP-2F₂₅₄, RP-8F₂₅₄ i RP-18F₂₅₄ i rozwijanych kolejno za pomocą trzech różnych faz ruchomych, takich jak etanol-woda (E), 1,4-dioksan-woda (D) oraz acetonitryl-woda (A) porównano ze sobą w dalszej części pracy.

Wartości teoretyczne parametrów lipofilowości analizowanego związku w postaci $\log P$: $A\log P_S$, $\log P_{\text{Chemaxon}}$, $M\log P$, $i\log P$, $\log P_{\text{silicos-it}}$, $X\log P_3$, $X\log P_2$, $\log P_{\text{consensus}}$, $W\log P$, $\log P_{\text{ACD/Labs}}$, $AC\log P$ i $A\log P$ uzyskano przy użyciu różnych algorytmów obliczeniowych dostępnych w postaci następujących baz danych i odpowiednio programów obliczeniowych: DrugBank (<https://go.drugbank.com/> 2024), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/> 2024), Virtual Computational Chemistry Laboratory (<https://www.vcclab.org> 2024) oraz programu ChemSketch (<https://www.acdlabs.com/products/chemsketch/> 2024). Za pomocą bazy danych DrugBank

otrzymano również $\log P_{ex}$ tj. eksperymentalną wartość $\log P$ deksametazonu w układzie n-oktanol-woda, którą porównano ze wszystkimi parametrami lipofilowości wyznaczonymi w niniejszej pracy.

Statystyczną ocenę otrzymanych wyników chromatograficznego parametru lipofilowości oraz analizę podobieństwa tych wyników przeprowadzono z zastosowaniem programu Statistica 13.3.

3. Wyniki

W Tab. 1 zaprezentowano wyniki analizy chromatograficznej deksametazonu tj. parametry liniowych zależności R_M od ϕ oznaczonych jako równania (3) – (11), które uzyskano dla poszczególnych faz niestacjonarnych (tj. płytek do RP-TLC) i faz ruchomych zgodnie z równaniem (2), takie jak: wyraz wolny tj. wartość R_{Mw} stanowiąca parametr lipofilowości badanego deksametazonu, współczynnik kierunkowy każdego równania liniowego (S) i współczynnik korelacji (r).

Tab.1. Parametry liniowych zależności $R_M=f(\phi)$ otrzymanych zgodnie z równaniem Soczewińskiego-Wachtmeistera.

Faza nieruchoma	Faza ruchoma	$R_{Mw}(\pm SD)$	$S(\pm SD)$	r	Nr równania
RP-2F ₂₅₄	acetonitryl/woda	1,18(±0,13)	2,23(±0,22)	-0,981	(3)
RP-8F ₂₅₄	acetonitryl/woda	1,86(±0,16)	3,54(±0,25)	-0,987	(4)
RP-18F ₂₅₄	acetonitryl/woda	1,48(±0,12)	2,68(±0,18)	-0,991	(5)
RP-2F ₂₅₄	1,4-dioksan/woda	1,94(±0,10)	3,55(±0,16)	-0,995	(6)
RP-8F ₂₅₄	1,4-dioksan/woda	2,11(±0,10)	3,65(±0,15)	-0,996	(7)
RP-18F ₂₅₄	1,4-dioksan/woda	2,28(±0,11)	3,87(±0,17)	-0,995	(8)
RP-2F ₂₅₄	etanol/woda	1,75(±0,15)	3,23(±0,23)	-0,987	(9)
RP-8F ₂₅₄	etanol/woda	2,50(±0,27)	4,18(±0,42)	-0,975	(10)
RP-18F ₂₅₄	etanol/woda	1,82(±0,12)	3,01(±0,18)	-0,993	(11)

Natomiast w kolejnej Tab. 2 przedstawiono wartości teoretyczne $\log P$ otrzymane za pomocą zastosowanych w pracy algorytmów obliczeniowych i dodatkowo wartość eksperymentalną tego parametru $\log P_{ex}$ wyznaczoną w układzie n-oktanol-woda uzyskaną z bazy DrugBank.

Tab.2. Zestawienie teoretycznych wartości współczynnika podziału deksametazonu.

Współczynnik podziału ($\log P$)	Wartość współczynnika podziału	Źródło
$\log P_{ex}$ (n-oktanol-woda)	1,83	Drugbank
AlogPS	1,93	Drugbank
$\log P_{chemaxon}$	1,68	Drugbank
ilogP	2,29	SwissADME
XlogP3	1,94	SwissADME
WlogP	2,32	SwissADME
MlogP	1,62	SwissADME
$\log P_{silicos-it}$	2,58	SwissADME
$\log P_{consensus}$	2,15	SwissADME
$\log P_{ACD/Labs}$	1,87	ChemSketch
AClogP	1,63	VCCLAB
AlogP	1,64	VCCLAB
MlogP	1,86	VCCLAB
XlogP2	1,14	VCCLAB

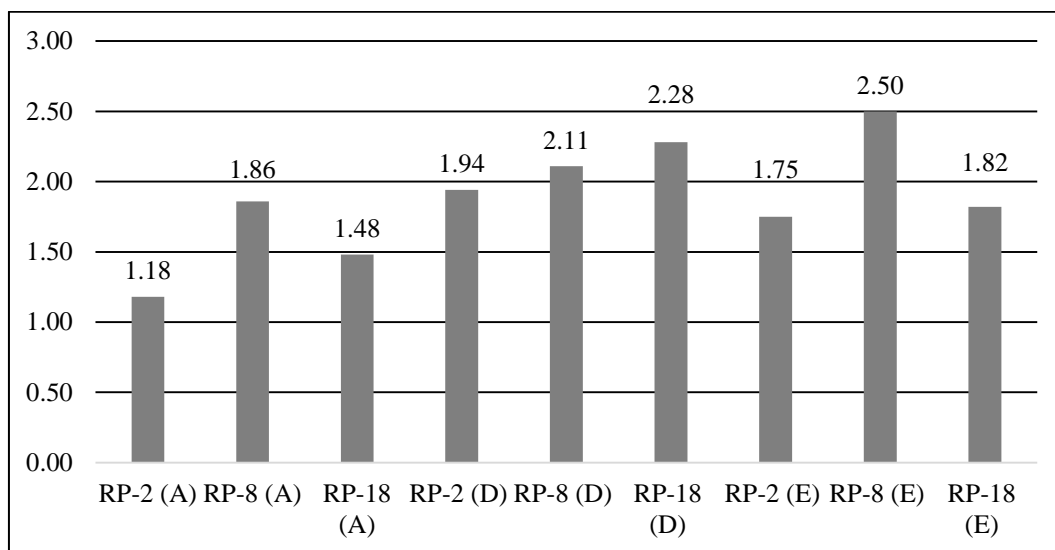
4. Dyskusja

Poszukiwanie szybkich i efektywnych, a przy tym ekonomicznych metod do wyznaczania parametrów fizykochemicznych wpływających na proces ADME związków chemicznych o aktywności biologicznej, takich jak badana w pracy lipofilowość jest ważnym nurtem prowadzonych w ostatnim czasie badań przez wielu naukowców. W związku z tym celem niniejszej pracy była ocena przydatności prostej w użyciu i ekonomicznej w porównaniu z innymi metodami chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych oraz wybranych algorytmów obliczeniowych do wyznaczania parametru lipofilowości deksametazonu. Dla badanego związku dostępna jest w bazie danych (DrugBank) wartość eksperymentalna $\log P$ wyznaczona metodą ekstrakcji w układzie n-oktanol-woda jako $\log P_{ex}=1,83$. Natomiast brak jest dokładnych danych na temat tego parametru określonego w innych układach niż n-oktanol-woda metodą RP-TLC. W związku z tym ważnym celem tej pracy okazała się ocena przydatności metody RP-TLC i wybranych algorytmów obliczeniowych do wyznaczenia wartości parametru lipofilowości deksametazonu, co może być również przydatne w przyszłości do oceny lipofilowości jego nowych pochodnych. Nasze wcześniejsze badania poświęcone zastosowaniu obu ww. metod do wyznaczania parametru lipofilowości innych związków steroidowych, takich jak danazol (Sochacki i Dołowy 2021) oraz drospirenonu i linestrenolu (Kusztal i in. 2022) potwierdziły przydatność metody chromatografii cienkowarstwowej i różnych faz stacjonarnych oraz ruchomych do wyznaczania w sposób prosty, szybki i ekonomiczny nie tylko lipofilowości samego danazolu, ale również drospirenonu i linestrenolu równocześnie. Podobieństwo do chromatograficznych parametrów lipofilowości tych związków wykazały wartości teoretyczne $\log P$ otrzymane za pomocą metod obliczeniowych w postaci m.in. AClogP, XlogP3, AlogPS, MlogP i AlogP (Sochacki i Dołowy, 2021; Kusztal i in. 2022). Uzyskane w obecnej pracy rezultaty mogą więc wzbogacić ten zbiór informacji w odniesieniu do badanej grupy steroidów. Analiza danych zebranych w Tabeli 1 prezentujących parametry liniowych zależności $R_M=f(\varphi)$ otrzymanych zgodnie z równaniem Soczewińskiego-Wachtmeistera dla deksametazonu badanego w różnych układach chromatograficznych, wskazuje na to, że zastosowane warunki chromatograficzne tj. fazy ruchome i płytki są optymalne, ponieważ pozwalają otrzymać liniowe zależności z wysokim współczynnikiem korelacji (r). W związku z czym uzyskane na ich podstawie wartości chromatograficznego parametru lipofilowości deksametazonu w postaci R_{MW} mogą być stosowane do oceny lipofilowości badanego związku. Rys. 1 przedstawiający zestawienie wszystkich chromatograficznych parametrów lipofilowości deksametazonu wskazuje na to, że istnieją pewne różnice w wartościach R_{MW} deksametazonu uzyskanych metodą RP-TLC, co można tłumaczyć wpływem zastosowanych warunków tj. typem fazy stacjonarnej oraz ruchomej. Niemniej jednak różnice te są mniejsze w porównaniu z wynikami wcześniejszych badań dotyczących drospirenonu i linestrenolu (Kusztal i in. 2022). Najniższe spośród wszystkich wartości R_{MW} (1,18) otrzymano dla fazy ruchomej acetonitryl-woda (A). Największą wartość obserwuje się dla płytek RP-8F₂₅₄ rozwijanych za pomocą fazy ruchomej etanol-woda (E) i wynosi ona 2,50. Z kolei najniższy wynik uzyskano dla fazy stacjonarnej w postaci płytek RP-2F₂₅₄ analizowanych za pomocą mieszaniny acetonitryl-woda (A).

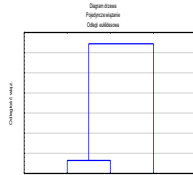
Wpływ fazy ruchomej na wartości chromatograficznego parametru lipofilowości deksametazonu otrzymane dla trzech różnych mieszanin jako faz ruchomych potwierdza poniższy Rys. 2 obrazujący analizę podobieństwa wyników R_{MW} . Na podstawie Rys. 2 można wnioskować, że najbardziej zbliżone do siebie, ponieważ wykazują najmniejszą odległość na dendrogramie są wartości tego parametru otrzymane za pomocą faz ruchomych złożonych z etanolu i wody ($R_{MW(E)}$) oraz 1,4-dioksanu i wody ($R_{MW(D)}$). Świadczy to o tym, że obie fazy można stosować zamiennie w badaniach lipofilowości deksametazonu. Podobieństwo wartości $R_{MW(A)}$ tzn. uzyskanych za pomocą fazy ruchomej acetonitryl-woda jest mniejsze do pozostałych dwóch, co przedstawia Rys. 2.

Analiza wartości teoretycznych współczynników podziału deksametazonu zaprezentowanych w Tab.2 oraz zestawionych razem na Rys. 3 w postaci wykresu kolumnowego, wskazuje na nieznaczące różnice w wartościach parametru lipofilowości dla badanego steroidu. Największe różnice wykazuje $\log P_{silicos-it}=2,58$, który jest najwyższy oraz XlogP2=1,14, który z kolei prezentuje najniższą wartość spośród wszystkich wartości $\log P$ deksametazonu. Wartości te uzyskano

za pomocą dwóch różnych źródeł tj. programu SwissADME i odpowiednio Virtual Computational Chemistry Laboratory. Można to tłumaczyć różnicą w różnej sile predykcji zastosowanych programów komputerowych. Natomiast najbardziej zbliżone do siebie są wartości AClogP (1,63), AlogP (1,64) oraz MlogP (1,62) uzyskane za pomocą predyktora dostępnego w Virtual Computational Chemistry Laboratory oraz SwissADME. Podobnie zbliżone do siebie są wartości współczynników podziału AlogPS (1,93) i XlogP3 (1,94) zaczerpnięte z bazy DrugBank. Bardzo istotny jest fakt, że większość z zaprezentowanych wartości teoretycznych logP jest zbliżona do eksperymentalnej uzyskanej w układzie n-oktanol-woda tj. $\log P_{ex}=1,83$ (DrugBank 2024). Są to współczynniki podziału obliczone w postaci $MlogP_{(VCCLAB)}$ (1,86), $\log P_{ACD/Labs}$ (1,87) za pomocą programu komputerowego Virtual Computational Chemistry Laboratory oraz ChemSketch.



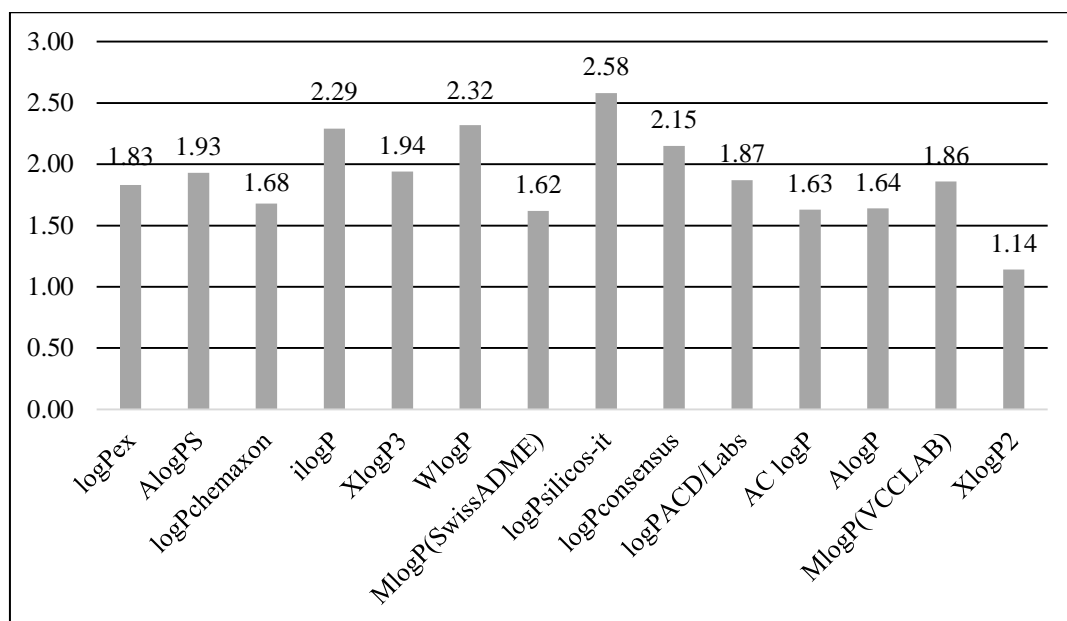
Rys.1. Zestawienie wartości chromatograficznych parametrów lipofilowości deksametazonu uzyskanych za pomocą RP-TLC na płytkach RP-2F₂₅₄, RP-8F₂₅₄ i RP-18F₂₅₄ przy użyciu faz ruchomych złożonych z acetonitrylu i wody (A), 1,4-dioksanu i wody (D) oraz etanolu i wody (E).



Rys.2. Dendrogram podobieństwa chromatograficznych parametrów lipofilowości deksametazonu uzyskanych za pomocą różnych faz ruchomych.

Porównanie wartości teoretycznych logP z chromatograficznymi parametrami lipofilowości deksametazonu w postaci R_{MW} uzyskanymi w dziewięciu różnych układach chromatograficznych wskazuje na to, że w dużej mierze wykazują one podobieństwo względem siebie. W szczególności można to zaobserwować dla następujących wartości:

- RP-2 (A)=1,18 i $XlogP_2=1,14$,
- RP-8 (A)=1,86 oraz RP-18 (E)=1,82 do $MlogP_{(VCCLAB)}=1,86$ i $\log P_{ACD/Labs}=1,87$,
- RP-18 (D)=2,28 i $ilogP=2,29$ oraz $WlogP=2,32$,
- RP-8 (E)=2,50 i $\log P_{silicos-it}=2,58$,
- RP-2 (D)=1,94 i $XlogP_3=1,94$,
- RP-8 (D)=2,11 i $\log P_{consensus}=2,15$.



Rys.3. Wartości logP deksametazonu.

Natomiast największe podobieństwo spośród wszystkich wartości R_{MW} do $\log P_{ex}$ wyznaczonego w układzie n-oktanol-woda wykazują wartości otrzymane na płytkach RP-8F₂₅₄ rozwijanych za pomocą acetonitrylu i wody ($RP-8(A)=1,86$) oraz na płytkach RP-18F₂₅₄ analizowanych za pomocą fazy ruchomej etanol-woda ($RP-18(E)=1,82$). Świadczy to o tym, że zaprezentowana w niniejszej pracy metoda TLC w ww. warunkach chromatograficznych może być z sukcesem stosowana jako metoda alternatywna do ekstrakcji w układzie n-oktanol-woda, w celu wyznaczenia wiarygodnej wartości parametru lipofilowości nie tylko deksametazonu ale jego pochodnych.

5. Wnioski

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza chromatograficzna deksametazonu w różnych warunkach chromatograficznych pozwoliła na wyznaczenie optymalnych warunków chromatograficznych pozwalających na uzyskanie wartości chromatograficznego parametru lipofilowości w postaci R_{MW} zbliżonego do eksperymentalnej wartości $\log P$ uzyskanej metodą ekstrakcji w układzie n-oktanol-woda. Warunkami tymi okazały się płytki pokryte żelom krzemionkowym RP-8F₂₅₄ rozwijane za pomocą mieszaniny acetonitrylu-woda oraz odpowiednio płytki RP-18F₂₅₄ analizowane za pomocą fazy ruchomej złożonej z etanolu i wody. Zaproponowana w pracy metoda RP-TLC pozwoliła na uzyskanie w sposób szybki i ekonomiczny wiarygodnych wartości parametru lipofilowości deksametazonu. Ponadto przydatność jeżeli chodzi o wyznaczenie wartości współczynnika podziału zbliżonego do $\log P$ eksperymentalnego wykazały niektóre z zastosowanych algorytmów obliczonych, w tym w szczególności MlogP oraz $\log P_{ACD/Labs}$ uzyskane za pomocą programów Virtual Computational Chemistry Laboratory i ChemSketch, co może znaleźć w przyszłości zastosowanie w projektowaniu nowych pochodnych deksametazonu lub jego preparatów.

6. Podziękowania

Badania przeprowadzono dzięki wsparciu finansowemu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, projekt BNW-1-006/N/3/F.

7. Literatura

- Ahmed MH, Hassan A (2020) Dexamethasone for the treatment of coronavirus disease (COVID-19): A review. *SN Comprehensive Clinical Medicine* 2(12): 2637-2646.
- DrugBank, <https://go.drugbank.com/drugs/DB01234> (dostęp styczeń 2024).
- Jóźwiak K, Szumiło H, Soczewiński E (2001) Lipophilicity, methods of determination and its role in biological effect of chemical substances. *Wiadomości Chemiczne* 55: 1047–1074.
- Kuszał A, Dołowy M, Bober Majnusz K (2022) Porównanie parametrów lipofilowości drospirenonu i linestrenolu. *Farmacja Polska* 78(10): 571-579.
- Radkowski P, Jabłoński G, Dawidowska-Fidrych J i in. (2022) Wykorzystanie deksametazonu w anestezjologii, intensywnej terapii, medycynie ratunkowej i paliatywnej. *Aktualny stan wiedzy Anestezjologia i Ratownictwo* 16: 155-163.
- Rutkowska E, Pajak K, Jóźwiak K (2013) Lipophilicity—methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 70: 3–18.
- Sochacki R, Dołowy M (2021) Zastosowanie różnych metod do przewidywania parametru lipofilowości danazolu. *Farmacja Polska* 77(10): 601–607.

4. Roślinne adaptogeny – charakterystyka i wykorzystanie w fitoterapii

Plant adaptogens - characteristics and application in phytotherapy

Małgorzata Kołtun-Jasion, Anna Kiss

Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Opiekun naukowy: Prof. dr hab. n. farm. Anna Kiss

Małgorzata Kołtun-Jasion: malgorzata.koltun@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: stres, zmęczenie, osłabienie

Streszczenie

Dynamiczny styl życia, charakteryzujący się intensywnym tempem pracy, długotrwałym narażeniem na stres oraz nadmiarem bodźców zewnętrznych, stanowi istotne wyzwanie dla współczesnego społeczeństwa. Nadmierne narażenie na czynniki stresowe prowadzi do dysregulacji homeostazy organizmu, osłabiając jego zdolność do adaptacji oraz zwiększając podatność na choroby cywilizacyjne. Ostatnie dziesięciolecia przyniosły wzmoczone zainteresowanie roślinnymi adaptogenami jako jednym z potencjalnych narzędzi, skutecznych w zmniejszeniu uczucia przemęczenia, poprawie koncentracji, a także wzmacnianiu odporności organizmu na infekcje. Wprowadzenie naturalnych adaptogenów do fitoterapii sięga czasów starożytnych. Roślinne wyciągi z surowców adaptogennych były elementem terapii w okresach rekonwalescencji, osłabieniu fizycznym, zaburzeniach pamięci oraz procesach starzenia. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat roślinnych adaptogenów, ich kluczowych właściwości farmakologicznych oraz potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

1. Wstęp

W obliczu rosnącego obciążenia stresem, zarówno na poziomie jednostki, jak i całych społeczeństw, istnieje pilna potrzeba poszukiwania bezpiecznych, naturalnych metod adaptacji organizmu do niesprzyjających warunków środowiskowych oraz obciążeń fizycznych. Do przetworów roślinnych o potencjalnych właściwościach adaptogennych należą wyciągi przygotowane z korzeni żeń-szenia właściwego (*Panax ginseng* C.A. Mayer), korzeni eleuterokoka kolczastego (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.), zwanego inaczej żeń-szeniem syberyjskim, kłączy różenia górskiego (*Rhodiola rosea* L.), owoców i nasion cytryńca chińskiego (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.), korzeni witanii (*Withania somnifera* L. Dunal), czy korzeni szczodraka krokoszowatego (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin).

Pomimo wieloletniego wykorzystania adaptogenów w medycynie naturalnej, dopiero teraz, dzięki postępowi nauki, zaczynamy pełniej rozumieć ich działanie i potencjalne korzyści dla zdrowia ludzkiego. Metaanaliza z 2022 roku oceniająca 115 prac dotyczących mechanizmów działania adaptogenów na podłożu molekularnym oraz ich wpływu na organizm człowieka, w tym 14 badań klinicznych, 81 badań w warunkach *in vivo* oraz 8 badań w warunkach *in vitro* dzieli mechanizmy działania adaptogenów na 7 głównych klas:

- modulacja stresu,
- aktywność przeciwutleniająca,
- środki przeciwmęczeniowe
- środki zwiększające wytrzymałość fizyczną,
- działanie nootropowe,
- modulacja immunologiczna,
- ochrona układu sercowo-naczyniowego
- radioprotekcja (Esmaelzadeh 2022).

Pomimo wielu obiecujących doniesień oceniających wpływ adaptogenów na organizm człowieka oraz ich powszechnej dostępności w aptekach ogólnodostępnych w postaci suplementów

diety dokładne zrozumienie działania tej grupy wymaga poszerzonych analiz *in vivo* oraz badań klinicznych. W poniższym rozdziale zostanie przedstawiona krótka charakterystyka najpopularniejszych surowców o działaniu adaptogennym, uwzględniająca ich skład fitochemiczny, zastosowanie oraz potencjalne mechanizmy działania.

2. Opis zagadnienia

2.1 Żeń-szeń prawdziwy, koreański (*Panax ginseng* C.A. Mayer), z rodziny araliowatych (Araliaceae)

Pierwsze dowody na stosowanie przetworów z żeń-szenia prawdziwego pochodzą sprzed 4000 lat. Miejscem rodzimego występowania żeń-szenia prawdziwego były północne obszary Półwyspu Koreańskiego, północno-wschodnie tereny Chin, oraz wschodnie wybrzeże Rosji – obszar basenu Morza Ochockiego (Lamer-Zarawska 2009).

Surowcem wykorzystywanym w terapii jest białopopielaty (poddany działaniu SiO₂ i wysuszony w temperaturze 100°C) lub czerwony (sterylizowany parą wodną o temp. 120 - 130°C, przez 2-3 godziny, w celu zwiększenia trwałości i wysuszony) korzeń żeń-szenia prawdziwego, będący bogatym źródłem związków z grupy saponin triterpenowych typu damaranu (ginsenozydów R_a - R_h) oraz saponin triterpenowych typu oleanu. Według aktualnych doniesień do tej pory zidentyfikowano ponad 25 ginsenozydów, przy wyraźnej dominacji ginsenozydu Rg1 (protopanaksatriolu) oraz Rg2 (protopanaksadiolu). Według wytycznych monografii Farmakopei Polskiej XII surowiec powinien zawierać nie mniej niż 0,4% sumy ginsenozydów Rg1 i Rb1, natomiast jego wyciąg suchy nie mniej niż 4,0% sumy ginsenozydów Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 i Rg2 w przeliczeniu na ginsenozyd Rb1 (Kiss 2021).

Głównym wskazaniem do stosowania preparatów zawierających wyciągi z korzenia żeń-szenia są przewlekłe stany zmęczenia fizycznego oraz wyczerpania psychicznego, a także długotrwałe narażenie na czynniki stresogenne. W badaniu oceniających wpływ surowca na subiektywną ocenę nastroju oraz pamięci w 32-dniowym badaniu, w populacji 30 pacjentów dorosłych przyjmujących żeń-szeń w dawce 200-400 mg, dowiedziono pozytywnego wpływu surowca na poprawę nastroju i zdrowia psychicznego u osób badanych *vs.* grupy placebo (Reay i in. 2010). Z kolei w metaanalizie podsumowującej wyniki 12 randomizowanych badań (z placebo), w których udział wzięło łącznie 1298 uczestników, dowiedziono pozytywnego wpływu suplementacji żeń-szeniem na procesy zmęczenia psycho-fizycznego związanego z występowaniem choroby tj. nowotwór, stwardnienie rozsiane, fibromialgia (Zhu i in. 2022).

Stan zapalny jest częścią odpowiedzi immunologicznej organizmu na infekcję lub uraz, a jego niekontrolowany przebieg jest związany z rozwojem przewlekłych chorób niezakaźnych tj. cukrzyca typu II, miażdżyca czy choroby neurodegeneracyjne. W szeregu badań *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzono skuteczność działania przeciwzapalnego wyciągów z żeń-szenia, a także pojedynczych ginsenozydów, w modelach komórek układu odpornościowego tj. monocyty, makrofagi, komórki NK. W toku badań stwierdzono m.in. negatywną regulację ekspresji cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β i IL-6) oraz ekspresji enzymów (iNOS i COX-2) jako jednego z mechanizmów przeciwzapalnego działania ginsenozydów w modelu komórek mikrogleju oraz makrofagach podtypu M1. Co więcej ocena mechanizmów działania surowca wykazała jego hamujący wpływ na rozwój stanu zapalnego wywołanego przez IL-1 β lub bakteryjny Lipopolisacharyd oraz związaną z tym degradację macierzy, poprzez obniżenie ekspresji metaloproteinaz (MMP3, MMP9) oraz hamowanie fosforylacji i translokacji podjednostki NF- κ B p65. Ponadto dla poszczególnych związków z grupy ginsenozydów potwierdzono wielokierunkowe mechanizmy działania przeciwzapalnego związane z aktywacją szlaków Nrf2 i wzrostem produkcji przeciwzapalnej oksygenazy hemowej 1 (HO-1) – ginsenozyd Rg1, Rb1, Ro, Rg5, aktywację przeciwzapalnego szlaku PPAR γ – ginsenozyd Rg3, Re, Rb1, Rg1, Rf oraz aktywności antyoksydacyjnej związanej z ograniczeniem produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS) – ginsenozyd Rg1, Rb1, Ro (Im 2020).

Jedną z właściwości żeń-szenia prawdziwego, jest także jego modulujący wpływ na procesy związane z gospodarką glukozy i insulinowrażliwością tkanek. W badaniach *in vivo* dowiedziono m.in. wpływu surowca na wzrost ekspresji transporterów glukozy 4 (GLUT4) na powierzchni

komórek insulinowrażliwych, a także uwalnianie glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP-1), indukującego wydzielanie insuliny przez komórki β trzustki. W metaanalizie oceniającej wpływ suplementacji żeń-szenia na stan zdrowia oraz parametry biochemiczne pacjentów z cukrzycą typu II oraz stanem przedcukrzycowym wykazano, że przyjmowanie preparatów zawierających wyciągi z żeń-szenia prawdziwego miało istotny wpływ na spadek poziomu glukozy w osoczu (badanej na czczo), a także zmniejszeniu współczynnika HOMA-IR (ocena stopnia insulinoporności mierzona w doustnym teście obciążenia glukozą). Co więcej, w metaanalizie oceniającej 20 badań (13 z nich oceniało wpływ żeń-szenia prawdziwego, 5 – żeń-szenia amerykańskiego, w 2 nie podano konkretnego gatunku) związanych z długotrwałą suplementacją żeń-szenia wykazano istotny spadek stężenia IL-6 w osoczu, jako jednego z markerów zapalnych związanych z progresją miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych (Naseri i in. 2022, Zanuso i in. 2022).

Na polskim rynku farmaceutycznym dostępnych jest wiele preparatów, zarejestrowanych w formie suplementów diety zawierających wyciągi z korzeni żeń-szenia prawdziwego, występujących w formie monopreparatów oraz preparatów złożonych, z dodatkiem wyciągów z żeń-szenia syberyjskiego (*Eleutherococcus senticosus*) oraz żeń-szenia amerykańskiego (*Panax quinquefolius*), standaryzowanych na określone zawartości ginsenozydów (najczęściej 4, 8% zawartości wyciągu). Warto jednak dodać, że preparaty zawierające wyciągi z przetworów żeń-szenia są jednymi z najczęściej fałszowanych preparatów, stąd ich stosowanie powinno być poprzedzone weryfikacją autentyczności i jakości preparatu.

Pomimo wieloletnich doniesień, potwierdzających skuteczność działania preparatów zawierających wyciągi z żeń-szenia, surowiec nie jest pozbawiony działań niepożądanych. Według monografii Europejskiej Agencji Leków przy przewlekłym stosowaniu, dozwolonym u pacjentów dorosłych, powyżej 18 roku życia mogą pojawić się działania niepożądane ze strony układu pokarmowego tj. biegunka, wymioty, mdłości, a także zawroty głowy oraz reakcje nadwrażliwości (świąd, pokrzywka). W literaturze można spotkać także pojęcie „*ginseng abuse syndrom*”, związane z przypadkami przewlekłego nadużywania surowca, charakteryzującego się występowaniem nagłych skoków ciśnienia, drażliwością, niepokojem i bezsennością. Szczególną ostrożność związaną ze stosowaniem preparatów zawierających wyciągi z żeń-szenia powinny zachować osoby starsze, chorujące na cukrzycę (ryzyko działania hipoglikemizującego) oraz nadciśnienie tętnicze (mimo braku jednoznacznych dowodów potwierdzonych badaniami klinicznymi) (Lamer-Zarawska 2009).

2.2 Eleuterokok kolczasty (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.), z rodziny araliowatych (Araliaceae)

Obszary rodzimego występowania eleuterokoka kolczastego, zwanego inaczej żeń-szeniem syberyjskim, obejmują tereny wschodniej Azji, w tym Chin, Korei, Japonii, Mandżurii oraz Syberii. W odróżnieniu od żeń-szenia koreańskiego żeń-szeń syberyjski jest także powszechnie uprawiany na terenie Europy. Surowcem stosowanym w lecznictwie jest kłącze i korzeń eleuterokoka.

Analiza składu fitochemicznego korzeni eleuterokoka wskazuje na obecność licznych związków z różnych grup metabolitów wyspecjalizowanych, jednak w przeciwieństwie do korzeni żeń-szenia koreańskiego zawartość saponin jest niewielka. W składzie surowca dominują związki z grupy pochodnych fenylopropanu (syringina – 4-O-glukozyd syringeniny, syn. eleuterozyd B) oraz lignany (matairezynol, pinorezynol, sezamina – eleuterozyd B4, syringarezynol, jego glukozyd – eleuterozyd E1 oraz diglukozyd – eleuterozyd E), co znajduje także odzwierciedlenie w wymaganiach farmakopealnych dla korzeni eleuterokoka, wskazujących na wymóg zawartości eleuterozydu B i eleuterozydu E w ilości nie mniejszej niż 0,08%. W toku analizy fitochemicznej potwierdzono także obecność związków z grupy kumaryn (fraksetyna, izofraksydyna i jej glukozyd – eleuterozyd E1, eskulina, umbeliferon), kwasów fenolowych (kwas chlorogenowy, ferulowy, protokatechowy), steroli (glikozyd β -sitosterolu – eleuterozyd A) oraz polisacharydów (eleuterany A-G).

Stosowanie korzenia eleuterokoka oparte jest o wieloletnią tradycję stosowania w medycynie tradycyjnej różnych kultur, zwłaszcza w medycynie chińskiej i ajurwedyjskiej, gdzie uznawany jest za środek wzmacniający i tonizujący. W kulturze europejskiej głównymi wskazaniami do stosowania surowca jest okres astenii, ze szczególnym nasileniem zmęczenia i stanem osłabienia, a także w okresie rekonwalescencji. Zgodnie z monografią Europejskiej Agencji Leków surowiec nie

powinien być stosowany przez dzieci poniżej 12 roku życia oraz kobiety w ciąży, a czas stosowania surowca nie powinien być dłuższy niż 2 miesiące. Na polskim rynku farmaceutycznym, korzeń eleuterokoka występuje w postaci suplementów diety, w formie monopreparatów zawierających od 200 do 500 mg surowca lub w formie surowca sproszkowanego dedykowanego do przygotowania naparów lub nalewek.

W porównaniu do ilości badań *in vitro* oraz *in vivo*, niewiele badań klinicznych potwierdza wpływ korzeni eleuterokoka na określone mechanizmy adaptogenne. W badaniu oceniającym wpływ 8-tygodniowej suplementacji korzeniem eleuterokoka w grupie 144 uczestników, odczuwających osłabienie i zmniejszoną zdolność do pracy związaną z przewlekłym stresem stwierdzono subiektywną poprawę samopoczucia i lepszą wydolność, jednak brak grupy kontrolnej może poddawać w wątpliwość uzyskane wyniki (Schaffler i in. 2013). Z kolei w badaniu Lee M. i in., oceniono wpływ 6-miesięcznej suplementacji *E. senticosus* jako dodatku do suplementacji wapniem u kobiet po menopauzie. W grupie przyjmującej preparaty zawierające korzeń eleuterokoka stwierdzono istotne zmniejszenie stężenia frakcji cholesterolu o niskiej gęstości (LDL), stosunku LDL/HDL (niskiej/wysokiej gęstości), a także poziomu uszkodzeń DNA limfocytów, w porównaniu z grupą suplementującą wapń w monoterapii, bez dodatkowych skutków ubocznych (Lee i in. 2008).

2.3 Cytryniec chiński (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.), z rodziny cytryńcowatych (Schizandraceae)

Siedliskami naturalnego występowania cytryńca chińskiego są górskie lasy i doliny rzek Dalekiego Wschodu, głównie Rosji, Korei, Japonii oraz Chin. Surowcem stosowanym w terapii są czerwone, owoce cytryńca chińskiego (nazywane owocem o pięciu smakach), zawierające w swoim składzie ponad 306 struktur z grupy lignanów (schizandrynę, schizandrol, schizanenol, schizanteryny A-E oraz gromissyny A-E), kwasów organicznych (kwas cytrynowy, jabłkowy, winowy), witamin (witamina C i E) i cukrów.

Owoc cytryńca chińskiego, stosowany był od tysięcy lat w medycynie tradycyjnej. Jednym z jego zastosowań była terapia impotencji u mężczyzn, rzeżączka oraz infekcje dróg moczowych związane z częstym oddawaniem moczu. Owoc cytryńca znalazł także zastosowanie w terapiach chorób układu pokarmowego, biegunkach i czerwonce. Co ciekawe owocom *S. chinensis* przypisuje się także działanie kardioprotekcyjne, hipoglikemiczne, przeciwkaszlowe i przeciwastmatyczne, jednak większość z nich nie została do tej pory potwierdzona w badaniach klinicznych (Yang i in. 2022).

Na rynku europejskim przetwory z *S. chinensis* występują pod postacią suplementów diety (kapsułki oraz nalewki), najczęściej w formie monopreparatów. Wskazaniem do ich stosowania są stany stresowe i lękowe, a także przypadki wyczerpania fizycznego i psychicznego. W przeciwieństwie do innych adaptogenów owoce cytryńca są rekomendowane do stosowania w trakcie rekonwalescencji i obniżonej odporności, przede wszystkim u pacjentów geriatrycznych, z uwagi na ich niski stopień toksyczności, oraz niewielką ilość opisanych działań niepożądanych (Lamer-Zarawska 2009). Z uwagi na duże podobieństwo pod względem składu fitochemicznego oraz podobnych siedlisk występowania preparaty zawierające owoce cytryńca, bywają zanieczyszczone gatunkiem pokrewnym – *S. sphenanthera*.

W badaniach *in vivo* potwierdzono wpływ owoców cytryńca na funkcję osi przysadka-nadnercza wyrażoną spadkiem poziomu kortyzolu oraz cytokin prozapalnych w surowicy szczurów. Co więcej, w kilku badaniach *in vivo* opisano także pozytywny wpływ suplementacji *S. chinensis* na profil lipidowy, wyrażony spadkiem poziomu trójglicerydów, LDL, a także cholesterolu całkowitego, przy jednoczesnym spadku poziomu glukozy w porównaniu z grupami kontrolnymi. Z kolei w badaniu oceniającym wpływ grupy polisacharydów, wyizolowanych z owoców cytryńca na funkcje komponentów układu odpornościowego, wykazano zwiększoną aktywność fagocytarną makrofagów otrzewnowych i transformację limfocytów, co może sugerować działanie immunostymulujące tej grupy związków, w kontekście aktywności całego surowca (Todorova i in. 2021).

Niewielka ilość doniesień pochodzących z przeprowadzonych badań klinicznych potwierdza celowość stosowania surowca w wybranych schorzeniach. W randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu Park J i in. oceniającym wpływ owoców cytryńca na objawy menopauzy,

w grupie 30 kobiet w wieku 40-70 lat, potwierdzono wpływ surowca na zmniejszenie uderzeń gorąca, pocenie się oraz obniżenie tętna względem grupy kontrolnej (Park i Kim 2016). Z kolei w badaniu klinicznym oceniającym wpływ 12-tygodniowej suplementacji przetworów z owoców cytryńca na zmiany parametrów biochemicznych tj. stężenie glukozy, trójglicerydów oraz parametrów wątrobowych (ALT, AST) a także składu mikrobioty jelitowej u 28 otyłych kobiet wykazano jedynie niewielkie zmiany w badanych parametrach w porównaniu z grupą kontrolną (Song i in. 2015). W tym miejscu należy jednak podkreślić niewielką liczebność grup w omawianych badaniach oraz stosunkowo niewielką liczbę badań klinicznych dotyczących aktywności owoców cytryńca w porównaniu do innych surowców omawianych w niniejszym przeglądzie.

2.4 Różeniec górski (*Rhodiola rosea* L.), z rodziny gruboszowatych (Crassulaceae)

Rhodiola rosea to roślina wysokogórska, pochodząca z północnych terenów Skandynawii i Syberii, spotykana również na terenie Karpat, Alp czy Himalajów. Surowcem stosowanym w lecznictwie jest kłącze i korzeń o barwie złotometalicznej, czemu zawdzięcza swoją nazwę synonimiczną - „złoty korzeń”. Stosowanie korzenia różenia w ziołolecznictwie znajduje swój początek w tradycyjnej medycynie ludowej Syberii, Chin i Azji Środkowej, w terapii choroby wysokościowej, zmęczenia czy zaburzeń nastroju. W Mongolii przetwory z różenia były niegdyś stosowane w terapii gruźlicy i niektórych nowotworów. Z uwagi na bardzo zawężony obszar naturalnego występowania gatunku *R. rosea*, wiele preparatów dostępnych na europejskim rynku farmaceutycznym jest zafałszowanych łatwiej dostępnymi gatunkami pokrewnymi (*R. crenulata*, *R. sachalinensis*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*). Co więcej istotnym problemem są także przypadki rozkładu substancji czynnych w dostępnych suplementach diety, zawierających *R. rosea*, co może przekładać się niekiedy na wątpliwą jakość dostępnych preparatów (Kiss 2021, Lamer-Zarawska 2018).

W składzie fitochemicznym surowca dominuje obecność fenylopropanoidów, charakterystycznych jedynie dla tego gatunku, zwanych rozawinami (rozawina, rozyna, rozaryna). Ponadto w surowcu opisano obecność fenyloetanoidu - salidrozydu, flawonoidów, garników, fenolokwasów, monoterpenu (geraniolu, rozyrydolu) i ich glikozydów (rozyrydyny i rodiozydów A-E). Stosowane w fitoterapii ekstrakty z korzenia różenia są standaryzowane na zawartości salidrozydu (0,8-1%) oraz rozawin (3%). Europejska Agencja Leków klasyfikuje m.in. suchy ekstrakt (DER 13- 25:1) otrzymywany z kłączy i korzeni *R. rosea* jako tradycyjny ziołowy produkt leczniczy stosowany do czasowego łagodzenia stanów zmęczenia i osłabienia, zalecany do stosowania u pacjentów powyżej 12 roku życia. Suplementacja *R. rosea* jest także zalecana w trakcie wzmoczonego wysiłku fizycznego i umysłowego, związanego z funkcjami poznawczymi tj. pamięć i koncentracja.

Pomimo ciągłej aktualizacji doniesień opisujących mechanizmy działania *R. rosea* na poziomie molekularnym, korzystny efekt działania surowca związany jest prawdopodobnie z efektywnym działaniem antyoksydacyjnym, a także modulującym wpływem na stężenia neuroprzekazników tj. serotonina, noradrenalina czy dopamina, co zostało potwierdzone w licznych badaniach w warunkach *in vivo*. Co więcej pojedyncze doniesienia wskazują na aktywność wyciągów z różenia na szlaki sygnałowe p-SAPK/p-JNK, a także stężenia tlenku azotu (NO) oraz kortyzolu, uczestniczących w formowaniu przewlekłych reakcji stresowych (Kiss 2021, Lamer-Zarawska 2018).

Według pojedynczych badań przeprowadzonych na grupie osób pracujących w trybie zmianowym, po nawet krótkotrwałej terapii wyciągiem z *R. rosea* zaobserwowano wyższe poziomy koncentracji, skupienia oraz szybkości reakcji w sytuacjach stresowych. W badaniu wykonanym na grupie 80 studentów, deklarujących się jako osoby zdrowe, jednak mierzące się z codziennym stresem, podawanie 400 mg wyciągu z korzeni *R. rosea* prowadziło do subiektywnego zmniejszenia lęku, stresu, złości, dezorientacji po 14 dniach stosowania suplementacji oraz znaczną poprawę ogólnego nastroju w porównaniu do grupy kontrolnej (Croleya i in. 2015). Z kolei w badaniu klinicznym II fazy, porównującym wpływ wyciągów z *R. rosea* z aktywnością sertraliny wykazano obiecujące wyniki świadczące o możliwym, umiarkowanym działaniu p/depresyjnym wyciągów *R. rosea* w terapii pacjentów z łagodnymi lub umiarkowanymi stanami depresyjnymi, przy

jednoczesnym ograniczeniu występowania działań niepożądanych w porównaniu do badanego leku syntetycznego (Mao i in. 2015).

3. Podsumowanie

Roślinne adaptogeny stanowią obiecującą grupę surowców znajdujących zastosowanie w naturalnym łagodzeniu stanów zmęczenia, osłabienia psycho-fizycznego czy zmian nastroju w odpowiedzi na przewlekłe bodźce stresowe. Wyznacznikiem właściwości adaptogennych jest także zdolność do redukcji stanów napięcia, zwiększenie ogólnej wytrzymałości, przy jednoczesnym niezaburzaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu oraz braku działań niepożądanych. Pomimo obiecujących wyników z badań przedklinicznych oraz klinicznych, dowodzących znamiennego wpływu roślinnych adaptogenów na poprawę zdolności adaptacyjnych do trudnych warunków środowiskowych, podstawy aktywności na poziomie molekularnym poszczególnych surowców adaptogennych oraz związków w nich dominujących są ciągłym przedmiotem badań. W obliczu stosowania substancji adaptogennych, a także ich rekomendacji pacjentom w codziennej praktyce aptecznej, warto także zwrócić szczególną uwagę na powszechny problem wątpliwej jakości dostępnych suplementów diety, ograniczeniom dotyczącym stosowania niektórych z nich, a także potencjalnym interakcją z lekami syntetycznymi.

4. Literatura

- Cropleya M, Banks A, Boyle J (2015), The Effects of *Rhodiola rosea* L. Extract on Anxiety, Stress, Cognition and Other Mood Symptoms. *Phytotherapy research*, 29(12):1934-9.
- Esmaealzadeh N, Iranpanag A, Sarris J (2022), A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies. *Phytomedicine*, 105, 154354.
- Im D (2020), Pro-Resolving Effect of Ginsenosides as an Anti-Inflammatory Mechanism of *Panax ginseng*. *Biomolecules*, 10(3), 444.
- Kiss AK (2021), Lek pochodzenia naturalnego/ Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 9788320064452.
- Lamer-Zarawska E (2009), Fitoterapia i leki roślinne w geriatrici. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 978-83-200-3839-2.
- Lee Y, Chung H, Kwak H (2008), The effects of *A. senticosus* supplementation on serum lipid profiles, biomarkers of oxidative stress, and lymphocyte DNA damage in postmenopausal women. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, 1, 44-48.
- Mao J, Xie S, Zee J (2015), *Rhodiola rosea* versus sertraline for major depressive disorder: A randomized placebo-controlled trial. *Phytomedicine*, 22, 3, 394-399.
- Naseri K, Saadati S, Sadeghi A (2022), The Efficacy of Ginseng (*Panax*) on Human Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(12), 2401.
- Park J, Kim K (2016), A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of *Schisandra chinensis* for menopausal symptoms, *Climacteric*. 19, 6, 574–580.
- Reay J, Scholey A, Kennedy D (2010), *Panax ginseng* (G115) improves aspects of working memory performance and subjective ratings of calmness in healthy young adults. *Human Psychopharmacology*, 25: 462–471.
- Schaffler K, Wolf O, Burkat M (2013), No benefit adding *eleutherococcus senticosus* to stress management training in stress-related fatigue/weakness, impaired work or concentration, a randomized controlled study. *Pharmacopsychiatry*, 46(5):181-90.
- Song M, Wang J, Eom T i in. (2015), *Schisandra chinensis* fruit modulates the gut microbiota composition in association with metabolic markers in obese women: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Nutrition Research*, 35, 8, 655-663.
- Todorova V, Ivanov K, Delattre C i in. (2021), Plant Adaptogens—History and Future Perspectives. *Nutrients* 2021, 13(8), 2861.

- Yang K, Qiu J, Huang Z i in. (2022) A comprehensive review of ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114759.
- Zanuso B, Oliveira Dos Santos A, Miola V i in. (2022) *Panax ginseng* and aging related disorders: A systematic review. *Experimental Gerontology*, 161, 111731.
- Zhu J, Xu X, Zhang X i in. (2022) Efficacy of ginseng supplements on disease-related fatigue: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 101, 26.

5. Terapia zaparc w populacji pacjentów geriatrycznych

The treatment of constipations in the geriatric population

Małgorzata Kołtun-Jasion, Anna Kiss

Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Opiekun naukowy: Prof. dr hab. n. farm. Anna Kiss

Małgorzata Kołtun-Jasion: malgorzata.koltun@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: układ pokarmowy, defekacja, osoby starsze

Streszczenie

Problem zaparc jest jedną z najczęstszych dolegliwości przewodu pokarmowego, dotykającą co szóstą osobę na świecie. Do typowych objawów zaparc należy zmniejszona liczba wypróżnień (<3/tydzień), wysiłek podczas defekacji, oddawanie twardego stolca z towarzyszącym uczuciem niepełnego wypróżnienia. Terapia zaparc jest procesem złożonym z uwagi na niejednorodną etiologię problemu klinicznego, wynikającą często z kilku nakładających się na siebie przyczyn. W zależności od podłoża i skali dolegliwości farmakoterapia zaparc uwzględnia stosowanie preparatów pochodzenia naturalnego, jak również preparatów syntetycznych. Duża różnorodność dostępnych preparatów przeczyszczających potęguje także skalę problemu ich nadużywania, szczególnie w populacji geriatrycznej.

1. Wstęp

Zaparcia są powszechnym problemem występującym zarówno u dzieci jak i osób dorosłych, jednak częstość występowania tego objawu wzrasta szczególnie w populacji pacjentów geriatrycznych. Szacuje się, że problem zaparc dotyka 14% ludzkości na całym świecie (od 2 do 24%), natomiast aż 37% z nich to pacjenci w wieku powyżej 65 roku życia. Miarą potwierdzenia powyższych statystyk może być fakt, że środki przeczyszczające zajmują drugie miejsce po lekach przeciwbólowych sprzedawanych w aptekach ogólnodostępnych osobom w wieku podeszłym.

Dane epidemiologiczne oceniające skalę problemu u pacjentów naszego kraju wskazują, że na zaparcia w Polsce cierpi co ósmy Polak. Zaparcia występują zdecydowanie częściej (2-3 krotnie) u kobiet, co może być spowodowane różnicami anatomicznymi i wyższym poziomem progesteronu w surowicy, w porównaniu z populacją mężczyzn. Problem zaparc jest także częstą dolegliwością kobiet ciężarnych, ze szczególnym nasileniem objawów w III trymestrze ciąży z uwagi na zmiany hormonalne oraz opóźnione opróżnianie jelit, wywołane uciskiem mechanicznym.

O ile rozpoznanie problemu zaparc zarówno u dzieci jak i osób dorosłych, w zależności od przyjętych kryteriów, jest relatywnie proste, o tyle rozróżnienie postaci oraz nakładających się przyczyn wymaga starannego badania podmiotowego oraz dokładnego wywiadu z pacjentem. W zależności od etiologii, zaparcia możemy podzielić na pierwotne (nazywane inaczej czynnościowymi, idiopatycznymi) oraz wtórne, towarzyszące innym stanom patologicznym lub jako efekt uboczny prowadzonej farmakoterapii. U kobiet szczególnie często obserwuje się także występowanie zaparc nawykowych.

2. Opis zagadnienia

Zaparcia czynnościowe są najczęstszą przyczyną zaburzeń defekacji w wieku geriatrycznym, wynikającym z procesów starzenia się organizmu oraz wieloletnich błędów żywieniowych. Zgodnie z Kryteriami Rzymskimi IV zaparcia czynnościowe można rozpoznać w przypadku występowania w ciągu ostatnich 3 miesięcy (z początkiem objawów \geq 6 miesięcy) dwóch lub więcej z poniższych symptomów:

- wysiłek podczas parcia na stolec w ponad $\frac{1}{4}$ przypadków defekacji,

- grudkowy lub twardy stolec w ponad ¼ defekacji,
- uczucie niepełnego wypróżnienia w ponad ¼ przypadków defekacji,
- uczucie przeszkody/blokady w obrębie odbytnicy/odbycie w ponad ¼ przypadków wypróżnień,
- ręczne zabiegi celem ułatwienia ewakuacji stolca w ponad ¼ przypadków wypróżnień,
- mniej niż 3 samoistne wypróżnienia na tydzień

Dodatkowo luźne stolce występują rzadko, bez zastosowania leków przeczyszczających oraz nie są spełnione kryteria zespołu jelita drażliwego (Mearin i in. 2016).

Podłożem zaparcć pierwotnych są zaburzenia czynności jelita grubego oraz nieprawidłowości wynikające z funkcji dna miednicy i zwieracza odbytu. Na tej podstawie zaparcia idiopatyczne zostały podzielone na 3 grupy w zależności od przebiegu i podłoża dysfunkcji. Pierwszym z nich są zaburzenia defekacji wynikające z nieprawidłowości anatomicznych tj. uchyłek/wypadanie odbytnicy, obniżenie dna miednicy będące przyczyną ponad połowy przypadków zaparcć przewlekłych. Zaparcia z prawidłowym pasażem jelitowym, a także zaparcia ze zwolnionym pasażem jelitowym są kolejnymi przyczynami zaparcć czynnościowych, mogących wynikać z ograniczonej aktywności motorycznej przewodu pokarmowego po posiłkach, zmniejszoną amplitudą skurczów propulsywnych jelit, wydłużonym czasem pasażu stolca oraz zwiększoną częstością wstecznej perystaltyki powodującej cofanie się treści jelitowej. Patofizjologia zaparcć u pacjentów w wieku podeszłym związana jest także z postępującymi zmianami w budowie i funkcjach układu pokarmowego tj. zaniku błony śluzowej na całej długości przewodu pokarmowego, ograniczeniu dopływu krwi przez zmienione miażdżycowo naczynia tętnicze i zmniejszeniu ukrwienia jelit, a także wydłużeniu pasażu okrężniczego czy zmniejszeniu wrażliwości okrężnicy (Bharucha i in. 2013).

Patogeneza zaparcć wtórnych jest pojęciem wieloczynnikowym, wynikającym ze współdziałania wielu elementów behawioralnych, społecznych oraz środowiskowych, do których należą m.in. niski status społeczno – ekonomiczny, dieta ubogoresztkowa, niewielkie spożycie produktów wysokobłonnikowych i produktów pochodzenia roślinnego, nieregularne czy pośpieszne posiłki, a także brak odpowiedniej podaży płynów, połączone z niską aktywnością fizyczną lub całkowitym/częściowym unieruchomieniem. Podłożem zaparcć wtórnych mogą być także schorzenia układu pokarmowego np. rak jelita grubego, zwężenie okrężnicy, szczelina lub żyłaki odbytu, a także jatrogenne uszkodzenie przewodu pokarmowego spowodowane radio lub chemioterapią czy uszkodzeniem chirurgicznym. Zaparcia mogą także współtowarzyszyć innym dolegliwościom??? np. chorobom metabolicznym tj. cukrzyca typu II, niedoczynność tarczycy, nadczynność przytarczyc, chorobom neurologicznym tj. udar mózgu, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, a także miopatiom tj. dystrofia mięśniowa, sklerodermia, amyloidoza.

Ponad to, jako jedna z istotnych przyczyn leżących u podłoża występowania zaparcć wymieniane są też uwarunkowania psychologiczne, związane z przewlekłym stresem, depresją, demencją, stanami lękowymi oraz zaburzenia odżywiania tj. jadłowstręt psychiczny, a także nagła zmiana diety wynikająca ze zmiany miejsca pobytu czy wielogodzinnych podróży. Z uwagi na częste występowanie zaparcć w populacji geriatrycznej jako jednej z przyczyn upatruje się także w procesach deformacji zgryzu, oraz wad konstrukcyjnych i złego dopasowania protez zębowych, utrudniających żucie pokarmu. Co więcej u pacjentów w wieku starszym pojawiają się trudności z polykaniem oraz zanik uczucia głodu i pragnienia, co dodatkowo nasila skalę problemu.

Zaparcia mogą również stanowić efekt niepożądany stosowanej farmakoterapii w obliczu powszechnej w populacji geriatrycznej polipragmatyzacji. W poniższej tabeli (Tab.1) zaprezentowano przykładowe grupy preparatów leczniczych, których stosowanie związane jest z występowaniem okazyjnych lub przewlekłych zaparcć, z uwzględnieniem grupy preparatów leczniczych oraz ich celu terapeutycznego (Xu i in. 2021).

Tab.1. Wykaz preparatów leczniczych zwiększających występowanie zaparć.

Typ schorzenia	Grupa preparatów leczniczych	Przykłady substancji
Stany depresyjne i lękowe	Antagoniści receptorów 5-HT ₃	Ondansetron
	Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne	Amitryptylina, nortryptylina
	Leki antypsychotyczne	Chlorpromazyna, klozapina, haloperidol, risperidon
	Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego	Fluoksetyna
Padaczka	Leki p/padaczkowe	Fenytoina, karbamazepina, pregabalina
Nadciśnienie tętnicze	Blokery kanałów wapniowych	Nifedypina, werapamil, diltiazem
	Sartany	Losartan, telmisartan, walsartan
	β-adrenolityki	Propranolol
	Pochodne dihydroksyfenyloalaniny	Metyldopa
Ból i stan zapalny	Leki opioidowe	Morfina, kodeina, tramadol, oksykodon
	NLPZ	Ibuprofen
Choroba Parkinsona	Leki antycholinergiczne i dopaminergiczne	Lewodopa, bromokryptyna, amantadyna
Diuretyki	Leki tiazydowe	Furosemid, hydrochlorotiazyd
Nietrzymanie moczu	Blokery receptorów muskarynowych	Oksybutynina
Biegunka	-	Loperamid
Zgaga i nadkwaśność	Leki zobojętniające	Preparaty glinu i wapnia
Suplementacja	Suplementy diety i leki uzupełniające niedobory	Preparaty żelaza i wapnia (szczególnie węglan wapnia)
Zaparcia	Pochodne antrachinonu stosowane przewlekle	Korzeń rzewienia, kora kruszyny, liść senesu

3. Farmakoterapia zaparć

W przypadku pacjentów dorosłych, u których zaobserwowano zaparcia związane ze spowolnieniem pasażu jelitowego, terapię zaparć należy rozpocząć od identyfikacji przyczyny dolegliwości, z uwzględnieniem modyfikacji nawyków żywieniowych, opartej o większą podaż produktów wysokobłonnikowych – (frakcji nierozpuszczalnej w wodzie (celuloza, hemiceluloza) oraz frakcji rozpuszczalnej (pektyny, śluzu), a także innych produktów pochodzenia roślinnego. Skutecznym także może okazać się wzrost podaży płynów oraz udział codziennej aktywności fizycznej (w ramach możliwości pacjenta). Poniżej przedstawiono przegląd preparatów stosowanych

w terapii zaparć, uwzględniający pochodzenie oraz mechanizmy działania poszczególnych preparatów.

4. Surowce pochodzenia naturalnego

Coraz większą popularnością w terapii zaparć cieszą się preparaty zawierające surowce pochodzenia naturalnego, których szeroki asortyment, obejmujący zarówno preparaty lecznicze jak również wyroby medyczne i suplementy diety stanowi częsty wybór pacjentów aptek ogólnodostępnych. Do głównych grup surowców naturalnych o działaniu przeczyszczającym zaliczamy surowce śluzowe, wykazujące łagodne działanie przeczyszczające oraz surowce zawierające w swoim składzie pochodne antrachinonów o silnym działaniu przeczyszczającym.

4.1 Surowce śluzowe

Śluz roślinne to mieszaniny polisacharydów, cukrów prostych oraz kwasów uronowych, powszechnie występujących w wielu surowcach pochodzenia roślinnego np. nasionach i łupinie babki jajowatej (*Plantago ovata* Forssk.), nasionach babki płesznik (*Plantago afra* L.), nasionach lnu (*Linum usitatissimum* L.).

Mechanizm działania substancji śluzowych opiera się na wzmoczeniu napływu wody do światła jelita grubego i hamowaniu jej resorpcji zwrotnej, powodując wzrost objętości mas kałowych, oraz łagodnej stymulacji perystaltyki, widoczniej po 12-24 godzinach po zastosowaniu preparatu. Z uwagi na wysoki wskaźnik pęcznienia, terapia maceratami preparatów śluzowych powinna być połączona ze zwiększoną podażą płynów, co skraca czas ich pasażu przełykowego (1 g surowca – 30 ml płynu). Preparaty zawierające substancje śluzowe nie powinny być stosowane nieprzerwanie dłużej niż 2 tygodnie, z uwagi na możliwość upośledzenia wchłaniania składników odżywczych, prowadząc między innymi do awitaminozy oraz anemii. Co więcej, współtowarzysząca farmakoterapia powinna być oddzielona od przyjmowanych preparatów śluzowych w odstępie czasowym (1 godzina przed i po przyjęciu preparatu). Szczególną uwagę należy zwrócić podczas jednoczesnego stosowania preparatów zawierających substancje o działaniu przeciwzakrzepowym, glikozydy nasercowe, karbamazepinę oraz lit, a także niektóre związki mineralne i witaminy (sole wapnia, żelaza, cynku, wit. B₁₂), których przyjmowanie w połączeniu z preparatami śluzowymi może skutkować zaburzeniami ich wchłaniania.

Ze względu na stosunkowo łagodne działanie przeczyszczające, surowce roślinne zawierające związki śluzowe są polecane w terapii okresowych lub przewlekłych zaparć u pacjentów geriatrycznych i osób unieruchomionych. Wśród innych wskazań do stosowania preparatów śluzowych, zawierających np. nasiona babki jajowatej wymieniane są przewlekłe zaparcia nawykowe, zaburzenia wypróżniania występujące w zespole jelita drażliwego, jak również w schorzeniach tj. szczelina odbytu, hemoroidy czy po zabiegach chirurgicznych.

Preparaty zawierające substancje śluzowe nie wykazują działań niepożądanych. Przeciwwskazane są jednak do stosowania u pacjentów z niedrożnością lub atonią jelit, zaparciem spastycznym, niezdiagnozowanymi krwawieniami z odbytu oraz schorzeniami przełyku i wpustu żołądka. Według wielu doniesień i baz danych stosowanie preparatów zawierających substancje śluzowe jest określane jako bezpieczne w okresie ciąży i laktacji (nasiona babki płesznik i babki jajowatej) (Kiss 2021).

4.2 Surowce zawierające antrazwiązki

Grupą preparatów o działaniu silnie przeczyszczającym są preparaty bazujące na aktywności pochodnych 1,8-dihydroksyantracenu (antranoidy, antrazwiązki). Elementem struktury warunkującym aktywność przeczyszczającą antrazwiązków są wolne aglikony (z grupami hydroksylowymi w pozycji C1 i C8 oraz podstawnikiem w pozycji C3) uwolnione z ich form glikozydowych w jelicie grubym, w wyniku hydrolizy enzymatycznej pod wpływem mikroflory bakteryjnej. Wolne aglikony pochodnych antracenu mogą występować w postaci antrachinonów, antranoli, diantronów oraz antronów, przy czym ostatnia z nich jest formą najaktywniejszą, powstającą w wyniku procesów rozpadu form dimerycznych, a także na drodze procesów oksydoredukcyjnych.

Antrachinony wywierają drażniący wpływ na receptory błony śluzowej jelita, skracając tym samym czas pasażu treści jelitowej. Mechanizmem działania pochodnych antrachinonu na poziomie komórkowym jest hamowanie ATP-azowej pompy sodowo-potasowej, wpływając na ograniczenie resorpcji zwrotnej wody i elektrolitów. Dwutorowy mechanizm działania antrazwiązków, jest odpowiedzialny za wysoką efektywność i silny efekt przeczyszczający uzyskany po 8-14 godzinach od momentu przyjęcia preparatu.

Jednym z najpopularniejszych surowców, w których składzie zidentyfikowano obecność antrazwiązków jest owoc i liść strączyńca (senesu) ostrolistnego (*Senna alexandrina* Mill.). Innymi preparatami, zawierającymi pochodne antrachinonu, powszechnie stosowanymi w terapii są kora kruszyny pospolitej (*Rhamnus frangula* L.), korzeń rzewienia palczastego (*Rhem palmatum* L.), kora szakłaku amerykańskiego (*Rhamnus purshiana* L.) oraz zagęszczony sok aloesowy zwany aloną (*Aloe vera* L.).

Istotnym ograniczeniem stosowania preparatów zawierających antrazwiązki są stany zapalne jelit, w szczególności wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa*), choroba Crohna, owrzodzenia czy czynne krwawienia z przewodu pokarmowego. Preparaty zawierające antrazwiązki nie powinny być stosowane u kobiet w ciąży (alona całkowicie przeciwwskazana) oraz dzieci poniżej 12 roku życia. U osób dorosłych, bez wyraźnych przeciwwskazań zdrowotnych antrazwiązki mogą być stosowane nie dłużej niż 7 dni (Nawrot 2018).

4.3 Olej rycynowy

Kolejnym substancją pochodzenia roślinnego znajdującą zastosowanie w terapii zaparć (obecnie stosowany sporadycznie) jest olej rycynowy, pozyskiwany nasion z rącznika pospolitego (*Ricinus communis* L). Substancją warunkującą działanie przeczyszczające jest kwas rycynolowy, powstający na skutek hydrolizy oleju rycynowego, ulegający rozkładowi pod wpływem lipazy i kwasów żółciowych, wykazując aktywność przeczyszczającą zarówno w obrębie jelita cienkiego oraz jelita grubego. Według monografii Europejskiej Agencji Leków olej rycynowy może być stosowany do krótkotrwałego stosowania w terapii zaparć sporadycznych. Przeciwwskazaniem do stosowania preparatu jest okres ciąży (ryzyko poronienia), laktacji, a także wiek poniżej 18 roku życia (Nawrot 2018).

5. Preparaty syntetyczne

5.1 Laktuloza

Preparatem popularnym w terapii zaparć u pacjentów geriatrycznych jest laktuloza, należąca do grupy leków osmotycznie czynnych, wykazujących łagodne działanie przeczyszczające. Jest to syntetyczny dwucukier, powstały w wyniku połączenia galaktozy z fruktozą. Laktuloza nie podlega procesom trawienia, wchłaniając się do krwiobiegu jedynie w nieznacznym stopniu. Laktuloza w formie niezmięnionej trafia do jelita grubego, gdzie ulega rozkładowi do dwutlenku węgla i kwasów organicznych, zwiększających na drodze osmotycznej napływ wody do jelita grubego, skutkując wzrostem ciśnienia osmotycznego, zmiękczeniem mas kałowych i przyspieszeniem perystaltyki przewodu pokarmowego. Widoczne efekty działania laktulozy obserwuje się po 24-48 godzinach od podania preparatu. Jednym z istotnych ograniczeń stosowania laktulozy w terapii zaparć jest nietolerancja laktozy, cukrzyca oraz galaktozemia.

5.2 Makrogole (polietylenoglikol, PEG)

Podstawę terapii farmakologicznej przewlekłych zaparć stanowią substancje o łagodnym działaniu przeczyszczającym, których przedstawicielami są syntetyczne makrogole, o budowie polimerycznej, złożone z ugrupowań tlenu etylenu. Makrogole nie są wchłanianie oraz metabolizowane w przewodzie pokarmowym. Dzięki wysokiej zdolności wiązania wody, PEG należą do osmotycznych środków przeczyszczających, które według ostatnich doniesień są bardziej skuteczne oraz lepiej tolerowane w porównaniu z laktulozą i innymi substancjami przeczyszczającymi. W metaanalizie 5 badań klinicznych u pacjentów z przewlekłymi zaparciami wykazano znamienne przewagę działania glikolu polietylenowego nad grupą placebo w złagodzeniu objawów zaparć (NNT = 3; 95% CI 2–4), przy jednoczesnym braku różnicy w odniesieniu do

zgłaszanych działań niepożądanych (Ford A i in. 2014). Z kolei, w badaniu porównującym skuteczność i bezpieczeństwo 6-miesięcznego stosowania PEG 4000 (10–30 g/d.) i laktulozy (10–30 g/d.) u osób powyżej 70. rż., wykazano istotną statystycznie przewagę PEG nad laktulozą ocenianą mianem zwiększonej częstości oddawanego stolca i poprawy jego konsystencji (Chassagne i in. 2017). Zalecana dawka dobową w terapii uporczywych zaparć wynosi 20–34 g PEG u osoby dorosłej, przy możliwości długoterminowego stosowania (nawet do kilku miesięcy) oraz dobrej tolerancji po podaniu osobom w podeszłym wieku. W praktyce aptecznej makrogole w wysokich dawkach, w połączeniu z innymi substancjami np. kwasem askorbinowym, chlorkiem i siarczanem sodu czy chlorkiem potasu znajdują zastosowanie do oczyszczenia jelit przed zabiegami diagnostycznymi.

5.3 Czopki glicerolowe

Mechanizm działania preparatu opiera się na drażnieniu dolnego odcinka jelita grubego, wywołując niemal natychmiastowy efekt przeczyszczający, pojawiający się po 15–60 minutach od aplikacji preparatu. Z uwagi na zróżnicowanie dostępnych na rynku farmaceutycznym rozmiarów produktu (1–2 g), czopki glicerolowe znajdują zastosowanie w terapii zaparć zarówno u osób dorosłych jak również u pacjentów pediatrycznych. Z uwagi na formę podania jest to preparat o ograniczonej tolerancji, szczególnie wśród pacjentów geriatrycznych.

5.4 Pikosiarżan sodu

Pikosiarżan sodu należący do związków z grupy triarylometanów, to substancja o miejscowym działaniu przeczyszczającym, polecanym do krótkotrwałej terapii zaparć przewlekłych oraz nawykowych u pacjentów powyżej 10 roku życia. Mechanizm działania pikosiarżanu sodu opiera się na osmotycznym napływie wody do światła jelita grubego, skutkując rozluźnieniem mas kałowych i przyspieszeniem pasażu jelitowego. W aktualnej praktyce aptecznej pikosiarżan sodu w połączeniu z tlenkiem magnezu oraz kwasem cytrynowym stosowany jest w celu oczyszczenia jelit i okrężnicy przed badaniem obrazowym u pacjentów dorosłych.

5.5 Dokuzynian sodowy

Dokuzynian sodowy to powierzchniowo czynna pochodna kwasu sulfonobursztynowego, z grupy detergentów anionowych. Mechanizm działania związku w terapii zaparć opiera się na emulgacji i zmniejszeniu napięcia powierzchniowego na granicy nabłonka przewodu pokarmowego i mas kałowych, stymulując ich zmiękczenie i ułatwienie defekacji. Preparaty zawierające dokuzynian sodowy występujące najczęściej w formie czopków doodbytniczych lub kapsułek doustnych nie wpływają na perystaltykę jelit ani częstość oddawania stolca. Pożądaný efekt terapeutyczny jest najczęściej obserwowany po 1–3 dniach stosowania preparatu.

5.6 Bisakodyl

Według Charakterystyki Produktu Leczniczego bisakodyl zalecany jest do terapii zaparć nawykowych i przewlekłych u pacjentów leżących, a także u osób w okresie około i pooperacyjnym. Mechanizm działania bisakodylu opiera się na bezpośredniej stymulacji śluzówkowych i podśluzówkowych splotów nerwowych błony śluzowej jelita grubego, a efekt przeczyszczający osiągany jest 30–60 minutach po podaniu doodbytniczym i ok. 6–12 godzinach po podaniu doustnym.

5.7 Agoniści receptora 5-HT₄

Przykładem agonistów receptora serotoninowego 4, stosowanym w terapii zaparć przewlekłych, w przypadku braku skuteczności innych środków przeczyszczających jest prukalopryd. Prukalopryd selektywnie pobudza receptory 5HT₄ w ścianie jelita, stymulując gromadzenie się wody w świetle okrężnicy, tym samym zwiększając nawodnienie i przesuwanie mas kałowych. Sugerowana dawka dobową to 2 mg u pacjentów dorosłych lub 1 mg u osób w podeszłym wieku (Ford i in. 2014).

5.8 Leczenie zaparć poopiodowych

Długotrwała terapia przeciwbólowa pochodnymi opioidowymi inicjuje powstawanie przewlekłych i uporczywych zaparć (*opioid induced constipation*), często niewrażliwych na

tradycyjną farmakoterapię. Zaparcia towarzyszące terapii opioidami mogą wynikać zarówno z ich działania ośrodkowego jak również komponenty obwodowej, co skutkuje spowolnieniem pasażu jelitowego, wydłużeniem czasu opróżniania żołądka oraz zmniejszeniem czynności wydzielniczej związanej ze zmniejszeniem wrażliwości odbytnicy na rozciąganie. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Medycyny Paliatywnej profilaktyczna terapia preparatami ułatwiającymi wypróżnianie jest koniecznym elementem współtowarzyszącym terapii opioidami, od pierwszych dni jej stosowania (Leppert i in. 2014). W terapii zaparcia poopoidowego, opornego na stosowanie środków osmotycznych oraz preparatów drażniących śluzówkę jelita grubego skutecznym okazała się terapia skojarzona oksykodonu z antagonistą opioidowym - naloksonem w formie tabletek doustnych lub podskórna terapia metylonaltreksonem, nieznoszącym ośrodkowego działania przeciwbólowego opioidów (Farmer i in. 2018). Z uwagi na brak refundacji oraz wysoką cenę obu preparatów, ich stosowanie w praktyce klinicznej jest wysoce ograniczone.

Spośród wyżej wymienionych preparatów stosowanych w leczeniu zaparcí u osób w podeszłym wieku, na szczególną uwagę zasługują surowce naturalne. Co więcej, zalecenia wg. monografii substancji roślinnych Europejskiej Agencji ds. Leków rekomendują stosowanie leków zwiększających objętość mas kałowych (nasienie lnu, nasienie płesznika, oraz łupina nasienna babki jajowatej) jako leków pierwszego wyboru, poprzedzonych modyfikacją diety oraz ilością spożywanych płynów. Natomiast, w przypadku zaburzeń defekacji wynikających z przyczyn organicznych tj. choroba Hirschsprunga, wypadanie odbytnicy, uporczywe zaparcia wymagają leczenia chirurgicznego.

6. Podsumowanie

Zaparcia są powszechnym zaburzeniem funkcjonowania układu pokarmowego, istotnie wpływającym na jakość i komfort życia pacjentów. Zaparcia opisywane jako zaburzenia o niejednorodnej etiologii nierzadko wymagają postępowania wielokierunkowego, z uwzględnieniem przeciwdziałania czynnikom ryzyka, błędom żywieniowym, behawioralnym i pielęgnacyjnym, edukację pacjentów i ich opiekunów, a ich eliminacja szczególnie u pacjentów geriatrycznych stanowi duże wyzwanie terapeutyczne.

7. Literatura

- Bharucha A, Dorn S, Lembo A i in. (2013) American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement on constipation. *Gastroenterology*, 144(1), 211–217
- Chassagne P, Ducrotte P, Garnier P i in. (2017) Tolerance and Long-Term Efficacy of Polyethylene Glycol 4000 (Forlax®) Compared to Lactulose in Elderly Patients with Chronic Constipation, *The journal of nutrition, health & aging*; 21(4): 429–439
- Charakterystyka Produktu Leczniczego, Fortrans 09/2021
- Charakterystyka Produktu Leczniczego, Avenalax, 03/2022
- Charakterystyka Produktu Leczniczego, Bisacodyl VP, 03/2022
- Daniluk J (2018), Chronic constipation — an underestimated clinical concern. *Varia Medica*, 2, 4, 286–296
- Farmer A, Holt C, Downes T (2018) Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation. *The Lancet, Gastroenterology & Hepatology*, 3,3, 203- 212
- Ford A, Moayyedi P, Lacy B (2014) Task Force on the Management of Functional Bowel Disorders. American College of Gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation. *American Journal of Gastroenterology*, 109 Suppl 1: S2–26; quiz S27
- Jachowicz R (2016) *Farmacja praktyczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN 978-83-200-5026-4
- Kiss AK (2021) *Lek pochodzenia naturalnego*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 9788320064452

- Lamer-Zarawska E (2009) Fitoterapia i leki roślinne w geriatric. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 978-83-200-3839-2
- Leppert W, Dzierżanowski T, Stanowiak A i in. (2014) Zaparcie stolca u chorych na nowotwory – zalecenia postępowania Grupy Ekspertów Polskiego Towarzystwa Medycyny Paliatywnej. *Medycyna Paliatywna*, 6(3), 117–126
- Mearin F, Lacy B, Chang L i in. (2016) Bowel disorders. *Gastroenterology*, 50: 1393–407
- Nawrot J (2018), Lek pochodzenia naturalnego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 978-83-7597-324-2
- Xu Y, Amdanee N, Zhang X (2021) Antipsychotic-Induced Constipation: A Review of the Pathogenesis, Clinical Diagnosis, and Treatment. *CNS Drugs*, 35, 1265–1274

6. Znaczenie monocytów krwi obwodowej w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym

The role of peripheral blood monocytes in autoimmune diseases

Sandra Murawska, Aleksandra Opęchowska, Aleksandra Starosz

Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Opiekun: dr hab. Kamil Grubczak

Sandra Murawska: sandra111mu@wp.pl

Słowa kluczowe: choroby autoimmunologiczne, odporność wrodzona, monocyty

Streszczenie

Choroby autoimmunologiczne charakteryzują się zaburzeniem równowagi w układzie odpornościowym pomiędzy czynnikami regulatorowymi i efektorowymi. W rezultacie dochodzi do odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko własnym antygenom, co powoduje niszczenie własnych tkanek oraz utratę pełnionych funkcji. Rozwój chorób autoimmunologicznych przebiega stopniowo, przez co może dojść do poważnego uszkodzenia narządów, zanim wystąpi pełna manifestacja kliniczna. Obecnie na świecie z chorobami autoimmunologicznymi zmagają się 3-5% populacji. Patomechanizm tych zaburzeń nie został do końca poznany, m.in. z uwagi na dużą różnorodność jednostek chorobowych oraz towarzyszącym im objawom. Niemniej jednak, kluczową rolę odgrywa nadmierna aktywność układu odpornościowego. W niniejszej pracy skupiamy się na wpływie monocytów krwi obwodowej jako elementu układu odporności wrodzonej na przebieg chorób autoimmunologicznych. Omówione zostaną najważniejsze rodzaje subpopulacji monocytów i ich funkcje, a także podamy przykłady, w jaki sposób przedstawione informacje mogą zostać wykorzystane w dalszych badaniach nad patogenezą chorób autoimmunologicznych.

1. Wstęp

Choroby z autoagresji stanowią zróżnicowaną grupę chorób przewlekłych. Mogą dotyczyć określonych narządów lub występować ogólnoustrojowo. Podstawą ich powstania jest złamanie tolerancji immunologicznej, polegające na błędnym rozpoznawaniu własnych antygenów jako obcych i indukowaniu reakcji obronnej przez autoreaktywne limfocyty T i B. W wyniku autoimmunizacji rozwija się proces zapalny, następuje produkcja autooprzeciwciał, co prowadzi do niszczenia tkanek. Choć badania nad patogenezą tych zaburzeń trwają od dawna, wciąż brakuje wielu informacji. Znane są istotne czynniki takie jak płeć żeńska, czynniki środowiskowe czy genetyczne, które mogą predysponować do rozwoju tych chorób. Monocyty stanowią element wrodzonego układu odpornościowego. Pełnią funkcje w homeostazie, stanowiąc pulę rezerwową dla makrofagów i komórek dendrytycznych oraz kontrolują stan naczyń krwionośnych. Odgrywają kluczowe role w obronie przed drobnoustrojami, należąc m.in. do komórek prezentujących antygen (APC- *antigen presenting cells*). Co więcej, komórki te wytwarzają wiele cytokin i chemokin np. IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , CCL2, CCL3, CCL5, stymulując inne leukocyty do określonych funkcji. Ponadto monocyty mogą przekształcać się w makrofagi tkankowe w miejscu zapalenia. Co najbardziej istotne z punktu widzenia tej pracy, istnieje coraz więcej dowodów na to, że uczestniczą w powstawaniu chorób o podłożu autoimmunologicznym. (Ma i in. 2019) Dlatego naszym celem jest ocena znaczenia monocytów krwi obwodowej zarówno w rozwoju jak i przebiegu tych chorób.

2. Przegląd literatury

2.1 Monocyty

Monocyty są komórkami linii mieloidalnej. Ze szpiku trafiają do krwiobiegu, gdzie stanowią do 8% leukocytów, a ich średni czas życia wynosi 3-4 dni. Należą do komórek odporności wrodzonej tuż obok granulocytów i makrofagów. Komórki te tworzą heterogenne subpopulacje, które różnią się między sobą występowaniem antygenów powierzchniowych oraz wynikającymi z tego funkcjami. Dzięki zastosowaniu technik cytometrii przepływowej wyszczególnione są trzy główne subpopulacje monocytów w oparciu o poziomy białek powierzchniowych CD14 i CD16 tj.: monocyty klasyczne (CD14⁺⁺CD16⁻), pośrednie (CD14⁺⁺CD16⁺) i nieklasyczne (CD14⁺CD16⁺⁺). Najliczniej we krwi występują monocyty klasyczne CD14⁺⁺CD16⁻, których główną rolą jest fagocytoza i migracja w miejsce zapalenia. Subpopulacja ta posiada zdolność wytwarzania cytokin prozapalnych takich jak IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 i CCL5. (Kapellos i in. 2019) Kolejną subpopulację stanowią monocyty pośrednie CD14⁺⁺CD16⁺, które wykazują największe zdolności do prezentacji antygenów. Dodatkowo produkują cytokiny np. TNF- α , IL-1 β , IL-6 i CCL3, a także generują najwięcej wolnych rodników tlenowych spośród wszystkich trzech subpopulacji. Mają działanie proangiogenne, co wskazuje na ich rolę w powstawaniu miażdżycy. Ich poziom wzrasta również w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych. Do trzeciej grupy należą monocyty nieklasyczne CD14⁺CD16⁺⁺. Ze względu na zwiększoną ekspresję CD16 inicjują fagocytozę za pośrednictwem układu dopełniacza. Kontrolują stan naczyń krwionośnych i usuwają resztki martwych komórek. (Sprangers i in. 2016) Zauważono, że w przebiegu niektórych chorób procentowy udział tych wymienionych subpopulacji zmienia się. Przykładowo, u pacjentów otyłych zwiększa się odsetek monocytów pośrednich i nieklasycznych. Natomiast pacjenci z ciężką przewlekłą obturacyjną chorobą płuc charakteryzują się zwiększonym poziomem monocytów nieklasycznych. (Cornwell 2018) W tej pracy przeanalizowaliśmy, jak zachowują się dane subpopulacje monocytów w przebiegu chorób autoimmunologicznych.

2.2 Choroba Gravesa-Basedowa

Najczęstszą przyczyną nadczynności tarczycy jest choroba Gravesa-Basedowa zaliczana do chorób autoimmunologicznych narządowo swoistych, związana z nadmiernym uwalnianiem hormonów tarczycy. W jej przebiegu dochodzi do produkcji autoprzeciwciał przeciwko receptorowi dla hormonu tyreotropowego (anty-TSHR). Przeciwciała łączą się z receptorami na komórkach pęcherzykowych tarczycy, co powoduje wzmożoną syntezę hormonów tarczycy T3 (trójiodotyronina) i T4 (tyroksyna). Najczęstszymi objawami nadczynności tarczycy są: kołatanie serca, pocenie się, słaba koncentracja, drażliwość, chwiejność emocjonalna oraz przyspieszony wzrost i dojrzewanie kości. Aktualne standardy zalecają leczenie lekami przeciwarczycowymi np. metimazolem lub jodem radioaktywnym, w przypadkach znacznego stopnia powikłanej nadczynności stosuje się także tyreoidektomię, zabieg chirurgiczny polegający na wycięciu tarczycy (Lane i in. 2023) W badaniach nad patomechanizmem tej choroby zauważono znaczące różnice w parametrach układu immunologicznego osób chorych w porównaniu do osób zdrowych. Pacjenci z nowo rozpoznaną chorobą Gravesa-Basedowa cechowali się istotnie wyższym odsetkiem monocytów pośrednich CD14⁺⁺CD16⁺, obniżającym się w przebiegu terapii, oraz niższym poziomem monocytów klasycznych w porównaniu do osób zdrowych i pacjentów w stanie remisji. Ponadto monocyty pośrednie mogą infiltrować tkankę tarczycy, co tylko w nieznacznym stopniu jest obserwowane u osób z grupy kontrolnej. (Chen i in. 2021) Monocyty pośrednie w chorobie Gravesa charakteryzują się zwiększoną ekspresją czynnika BAFF, czyli czynnika aktywującego limfocyty B. Częsteczką BAFF odgrywa ważną rolę w proliferacji i różnicowaniu limfocytów B. Nadmierny poziom tego białka prowadzi do zwiększonej produkcji przeciwciał a zwiększona ekspresja tego czynnika na monocytach pośrednich u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa może sugerować ich istotną rolę w indukcji produkcji przeciwciał anty-TSHR. Dodatkowo monocyty u osób chorych cechują się zwiększonym występowaniem białka GPR15⁺, którego rola choć nie do końca poznana, wskazuje na udział w zasiedlaniu przez limfocyty T miejsc w organizmie takich jak skóra, jelita czy tarczyca. Blokada tego białka mogłaby stanowić potencjalny cel terapeutyczny. (Zhao i in. 2022)

Reasumując, monocyty w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa mogą przyczyniać się do rozwoju zmian patologicznych poprzez naciekanie tarczycy, promowanie proliferacji limfocytów B oraz migracji limfocytów T.

2.3 Cukrzyca typu 1

Cukrzyca typu 1 jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, w której dochodzi do niszczenia komórek beta wysepek trzustkowych, czego rezultatem jest spadek wydzielania insuliny oraz przetrwała hiperglikemia. Do głównych objawów zalicza się polidypsję, poliurię, polifagię, utratę masy ciała. Chorobę najczęściej rozpoznaje się u dzieci i młodzieży w wieku 10-14 lat. Niestety cukrzyca typu 1 jest najczęściej rozpoznawana podczas ostrego incydentu kwasicy ketonowej, która rozwija się w organizmie w wyniku wzmożonego metabolizmu kwasów tłuszczowych. Dotychczasowe badania wskazują na zwiększony poziom monocytów pośrednich (CD14⁺⁺CD16⁺) u pacjentów z cukrzycą typu 1 w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto, monocyty pośrednie wykazują zwiększoną ekspresję niektórych antygenów powierzchniowych takich jak CD11b, który pośredniczy w adhezji i migracji leukocytów. Obserwuje się także zwiększoną obecność receptora CD62L na powierzchni monocytów zapalnych, który odpowiada za migrację komórek do miejsca zapalenia. Dodatkowo, u pacjentów z cukrzycą typu 1 monocyty pośrednie wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczki CD86, co może sugerować ich wysoką zdolność do prezentacji antygeny komórkom immunokompetentnym. (Ren i in. 2017) W jednym z badań monocyty krwi obwodowej u pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 charakteryzowały się wzmożoną produkcją cytokin zapalnych takich jak IL-6, IL-1 β , co indukowało limfocyty T do wydzielania IL-17 oraz w konsekwencji prowadząc do zwiększenia odsetka populacji limfocytów Th17. Mechanizm zablokowania IL-6 oraz IL-1 β lub samej IL-1 β wpływał w sposób bezpośredni na hamowanie wydzielania IL-17. Subpopulacja limfocytów pomocniczych, limfocyty Th17 pełni rolę w promowaniu chorób autoimmunologicznych szczególnie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) oraz stwardnienia rozsianego (SM). IL-17, łącząc się ze swoim receptorem na monocytach, powoduje uwolnienie cytokin np. TNF- α , IL-8 działających jak chemoatraktanty dla granulocytów obojętnochłonnych a komórki nabłonkowe i fibroblasty pod jej wpływem wytwarzają czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Dane te sugerują, że wrodzony układ odpornościowy, do którego należą monocyty, stymuluje odporność nabytą do produkcji limfocytów Th17. (Bradshaw i in. 2009) Analiza transkryptomu monocytów krwi obwodowej pacjentów z cukrzycą typu 1 wykazała zwiększoną ekspresję czynników transkrypcyjnych pośredniczących w odpowiedzi zapalnej tj.: *JUN*, *CXCL5*, *CXCL8*, *FOSB*. Pacjenci z niewyrównaną cukrzycą typu 1 cechowali się istotnie większą ekspresją *JUN* oraz *CXCL5* w porównaniu z osobami zdrowymi. (Thiem i in. 2020) Podsumowując, monocyty krwi obwodowej w przebiegu cukrzycy typu 1 warunkują wzmożoną odpowiedź zapalną, niszczenie tkanek i niewydolność wydzielniczą trzustki. Rozszerzenie badań dotyczących monocytów w kontekście cukrzycy typu 1 może dostarczyć istotnych klinicznie informacji, które posłużą jako cele terapeutyczne bądź zostaną wykorzystane do wyznaczenia nowych markerów prognostycznych tej choroby.

2.4 Reumatoidalne zapalenie stawów

Do przewlekłych, układowych chorób autoimmunologicznych zalicza się reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). W przebiegu choroby dochodzi do produkcji autoprzeciwciał w tym RF- czynnika reumatoidalnego i ACPA- przeciwko białku cytrulinowanemu. Proces zapalny rozwija się w obrębie błony maziowej symetrycznych stawów kończyn górnych i dolnych prowadząc do jej rozrostu. Dochodzi do wytworzenia tzw. łuszczyki, która składa się głównie z synowocytów, makrofagów, wielojądrzastych neutrofilów i komórek mezenchymalnych. Pacjenci z RZS skarżą się na ból, tkliwość stawów oraz ich ograniczoną ruchomość. Niestety, postępujące uszkodzenie może spowodować brak samodzielności oraz niepełnosprawność. Zmiany w obrębie błony stawowej, powodują deformacje, uszkodzenia chrząstek i kości. Ponadto, pacjentom mogą towarzyszyć inne choroby ogólnoustrojowe- dotyczące układu oddechowego, sercowo-naczyniowego, szkieletowego. U pacjentów z RZS zaobserwowano zwiększony odsetek monocytów pośrednich CD14⁺⁺CD16⁺ i nieklasycznych CD14⁺CD16⁺⁺ oraz zmniejszony poziom monocytów klasycznych CD14⁺⁺CD16⁻. Badanie, w którym monocyty krwi obwodowej wyizolowano od pacjentów z RZS na początku i po

12 tygodniach leczenia metotreksatem wykazało, że istnieje silna dodatnia korelacja pomiędzy odsetkiem monocytów pośrednich a aktywnością choroby. Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego- Mo-DC (*Monocyte-Derived Dendritic Cell*) indukują dojrzewanie limfocytów T do komórek Th17. Badania wskazują, że wszystkie trzy subpopulacje monocytów wyrażają zwiększoną ekspresję TLR9, który może przyczyniać się do utrzymywania stanu zapalnego w stawach pacjentów z aktywnym RZS. Natomiast subpopulacje monocytów klasycznych i pośrednich dodatkowo prezentują podwyższone poziomy TLR2. Stymulacja tych receptorów powoduje wydzielanie zwiększonej ilości cytokin prozapalnych. (Zhao i in. 2021) Monocyty i makrofagi w RZS produkują zwiększone ilości cytokin prozapalnych IL-6 i TNF- α , co wspomaga proliferację komórek FSL (synowocytów o fenotypie fibroblastów) i inwazję błony maziowej. Komórki FLS wytwarzają białko alfa-enolazę, które promuje proliferację i przeżycie komórek, a łącząc się receptorem TLR4 na monocytach, powoduje dodatkowe wytwarzanie czynników prozapalnych CCL3, IL-8 i CXCL1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, nasilając tym samym istniejący już stan zapalny. (Jang i in. 2022) Ocena transkryptomiczna monocytów wyizolowanych od pacjentów z RZS, wykazała zwiększoną ekspresję genów powiązanych z monocytami prozapalnymi takich jak: *NR4A2*, *HBEGF*, *PLAUR* i *IFITM3*. Ponadto zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genów związanych z monocytami NUPR1+, które dzięki obecności markerów osteoaktywiny i katepsyny K, prawdopodobnie odpowiadają za kontrolę przebudowy kości. Dodatkowo, częstość występowania tej subpopulacji monocytów wykazywała negatywną korelację ze stanem zapalnym tkanek. (Zhang i in. 2019) Powyższe dane wskazują na zróżnicowaną rolę monocytów w przebiegu RZS. Uwagę zwracają ich właściwości potęgujące proces zapalny i degradację tkanek. Prezentowane informacje potwierdzają, że ocena monocytów krwi obwodowej u pacjentów z RZS może stanowić istotny biomarker aktywności choroby i w przyszłości może zostać wykorzystana do oceny stopnia odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie.

2.5 Zespół Sjögrena

Zespół Sjögrena (ZS) występuje z częstością 0,5 do 5% w populacji. Dotyka on głównie kobiet w 5. dekadzie życia oraz często współistnieje z RZS czy twardziną układową. Pacjenci zgłaszają głównie objawy takie jak: suchość w ustach, uczucie piasku pod powiekami czy zmęczenie. Choroba atakuje gruczoły zewnątrzwydzielnicze głównie gruczoły łzowe i ślinowe, jednak wraz z jej rozwojem może dotyczyć wielu narządów wewnętrznych. W jej przebiegu organizm produkuje przeciwciała przeciwjądrowe SS-A (antygenem jest rybonukleoproteina zawierająca RNA (Y1-Y5) oraz SS-B (antygenem jest fosfoproteina). Co istotne, zespół Sjögrena zwiększa 40-krotnie ryzyko chłoniaka nieziarniczego z komórek B. Niestety, dotychczas nie poznano dokładnej patogenezы tej przypadłości. (Stefanski i in. 2017) Choć wiadomo, że zaburzenia w funkcji limfocytów istotnie przyczyniają się do rozwoju ZS, nowe odkrycia naukowe wskazują na istotną rolę monocytów krwi obwodowej, które tworzą środowisko zapalne, uszkadzają tkanki za pomocą enzymów oraz nadmiernie aktywują limfocyty B. W badaniach nad rolą monocytów w zespole Sjögrena zauważono, że krążące monocyty cechują się zwiększoną ekspresją *IFN1*, co przyczynia się do powstania stanu zapalnego. Ponadto, monocyty w ZS produkują istotnie więcej prozapalnych cytokin w tym IL-6. Monocyty tych pacjentów wyrażają zwiększoną ekspresję *BAFFR*, czyli receptora dla czynnika aktywującego komórki B (rodzina białek TNF), co intensyfikuje ich zdolności prozapalne poprzez działanie tego receptora. Podobnie jak w innych chorobach o podłożu autoimmunologicznym, monocyty mogą wydzielać BAFF, który uczestniczy w proliferacji limfocytów B oraz stymuluje je do tworzenia autoprzeciwciał. (Yoshimoto i in. 2011) Monocyty w przebiegu Zespołu Sjögrena wykazują zwiększoną ekspresję receptora dla VIP (*VPAC2*), co skutkuje nasileniem procesu fagocytozy. Co więcej, zaobserwowano, że monocyty klasyczne w gruczołach ślinowych pacjentów z ZS po fagocytozy komórek apoptotycznych wydzielają więcej TNF- α niż w warunkach prawidłowych. (Sequi-Sabater i in. 2022)

2.6 Autoimmunologiczne zapalenie naczyń.

Autoimmunologiczne zapalenie naczyń (AZN) powoduje uszkodzenie ścian dużych, średnich i małych naczyń krwionośnych w wyniku zapalenia. Zapalenie dużych naczyń, do którego zalicza się olbrzymiomórkowe zapalenie tętnic i chorobę Takayasu, obejmuje aortę i jej główne

gałęzie. Olbrzymiokomórkowe zapalenie tętnic to najczęstsze pierwotne układowe zapalenie naczyń, którego zapadalność w Europie wynosi 12/100000 osób. Zwykle dotyczy ludzi po 5. dekadzie życia. Zapadalność na wskazaną chorobę szacuje się na poziomie 1,2-2,6/1 mln osób. Co istotne, rozwija się ono w młodszej populacji, a średnia wieku pacjentów to 45 lat. Cechą charakterystyczną tych dwóch chorób jest powstawanie ziarniaków w ścianie naczyń, w których skład wchodzi przeważnie monocyty, makrofagi, limfocyty T. Monocyty i makrofagi stanowią zatem kluczowy element w patomechanizmie tych chorób. We krwi pacjentów z aktywnym zapaleniem tętnic obserwuje się podwyższony poziom monocytów, w tym klasycznych i pośrednich. Co istotne, w przebiegu zapalenia naczyń wśród makrofagów tkankowych dominują makrofagi M1, czyli te o fenotypie zapalnym. Monocyty oraz makrofagi produkują cytokiny prozapalne, w tym m.in. IL-6. Ponadto komórki te wytwarzają nadmiar enzymów proteolitycznych i proteinaz, takich jak kolagenazy, katepsyny oraz metaloproteinazy macierzy MMP-2 i MMP-9, co powoduje niszczenie ściany naczynia. (Watanabe i in. 2022) Zwracając uwagę na patogenezę zapalenia naczyń, hamowanie migracji krążących monocytów lub hamowanie ich różnicowania w tkankach może okazać się obiecującą strategią leczenia. Natomiast do zapaleń małych naczyń krwionośnych możemy zaliczyć się trzy główne jednostki chorobowe: mikroskopowe zapalenie naczyń, ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (dawniej ziarniniakowatość Wegenera) ziarniniakowatość eozynofilowa z zapaleniem naczyń (zespół Churga-Straussa). W ich przebiegu dochodzi do powstawania przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA). Występują dwa rodzaje przeciwciał ANCA: cytoplazmatyczne c-ANCA oraz okołojądrowe p-ANCA. Celem tych przeciwciał są mieloperozydaza oraz proteinaza 3. Naciek zapalny, zawierający przede wszystkim neutrofile, limfocyty, monocyty oraz makrofagi, prowadzi do destrukcji małych naczyń, zaburzenia dopływu substancji odżywczych oraz niedotlenieniem tkanek. W dotychczasowych badaniach skupiano się przeważnie na znaczeniu neutrofilii, jednak ta tendencja ulega zmianie, dlatego też również monocyty są uważane jako jedne z kluczowych komórek odgrywających istotną rolę w rozwoju i w przebiegu tej grupy chorób. Potwierdzając powyższe założenia monocyty stymulowane autoprzeciwciałami ANCA, mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu, w tym nadtlenek wodoru, cytokiny prozapalne: IL-1 β , IL-6 i IL-8, co prowadzi do powstania mikrośrodowiska zapalnego. (Vegting i in. 2021) U pacjentów z MPO-AAV zaobserwowano zmniejszony poziom monocytów nieklasycznych we krwi, natomiast zwiększony ich naciek w nerce. Prawdopodobną przyczyną obserwowanego zjawiska jest zwiększonej ekspresji CX3CL1 w osoczu pacjentów, będącej chemoatraktantem tej subpopulacji komórek. Co istotne, infiltracja komórek CD14+ i CD16+ w nerkach pozytywnie korelowała z obecnością białkomoczu, co może wskazywać na potencjalną możliwość hamowania CX3CR1, zmniejszając tym samym naciek z leukocytarny oraz poprawiając funkcjonowanie nerek. (Tang i in. 2022) Inne źródła wskazują na zwiększony poziom monocytów pośrednich w przebiegu AAV. Badania in vivo jak i in vitro dowodzą, że ANCA powodują wzmożoną ekspresję CD14 na monocytach, co może sugerować nasiloną odpowiedź zapalną. Dodatkowo w monocytach u pacjentów z AAV zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptora TLR2, co może zwiększać aktywację innych leukocytów. (Vegting i in. 2021)

3. Podsumowanie

Choroby autoimmunologiczne dotyczą około 5% populacji, co stanowi istotny problem zdrowotny jak i społeczny. Monocyty krwi obwodowej tworzą heterogenną grupę komórek, która poprzez zaburzone procesy produkcji cytokin, chemokin czy ROS prowadzi do zmian patologicznych i promuje autoagresję. Badania, które skupiają się na elementach układu odpornościowego, w tym na monocytach krwi obwodowej mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezы tych chorób. Ponadto dane gromadzone na temat tych komórek można łączyć z parametrami klinicznymi i wykorzystywać je jako potencjalne biomarkery prognostyczne, a identyfikacja markerów powierzchniowych oraz białek może stanowić nowy cel terapeutyczny dla immunoterapii.

4. Literatura

- Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W (2009) Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 183(7): 4432–4439.
- Chen X, Wang Y, Qi Y (2021) Expansion of inflammatory monocytes in periphery and infiltrated into thyroid tissue in Graves' disease. *Scientific reports* 11(1): 13443.
- Cornwell WD, Kim V, Fan X (2018) Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. *BMC pulmonary medicine* 18(1): 101.
- Jang S, Kwon EJ, Lee JJ (2022) Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *International journal of molecular sciences* 23(2): 905.
- Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I i in. (2019) Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology* 10: 2035.
- Lane LC, Wood CL, Cheetham T (2023) Graves' disease: moving forwards. *Archives of disease in childhood* 108(4): 276–281.
- Ma WT, Gao F, Gu K, (2019) The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Frontiers in immunology* 10: 1140.
- Ren X, Mou W, Su C (2017) Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *International journal of biological sciences* 13(2): 209–218.
- Rose NR (2016) Prediction and Prevention of Autoimmune Disease in the 21st Century: A Review and Preview. *American journal of epidemiology* 183(5): 403–406.
- Sequí-Sabater JM, Beretta L (2022) Defining the Role of Monocytes in Sjögren's Syndrome. *International journal of molecular sciences* 23(21): 12765.
- Sprangers S, de Vries TJ, Everts V (2016) Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *Journal of immunology research* 2016: 1475435.
- Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U i in. (2017) The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. *Deutsches Arzteblatt international* 114(20): 354–361.
- Tang J, Liao Z, Luo L i in. (2022) CX3CL1-induced CD16⁺ monocytes extravasation in myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis correlates with renal damage. *Frontiers in immunology* 13: 929244.
- Thiem K, van Dierendonck XAMH, Janssen AWM i in. (2020) A High Glycemic Burden Relates to Functional and Metabolic Alterations of Human Monocytes in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 69(12): 2735-2746.
- Vegting Y, Vogt L, Anders HJ i in. (2021) Monocytes and macrophages in ANCA-associated vasculitis. *Autoimmunity reviews* 20(10): 102911.
- Watanabe R, Hashimoto M (2022) Pathogenic role of monocytes/macrophages in large vessel vasculitis. *Frontiers in immunology* 13: 859502.
- Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M i in. (2011) Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis research & therapy* 13(5): R170.
- Zhang F, Wei K, Slowikowski K i in. (2019) Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature immunology* 20(7): 928–942.
- Zhao J, Guo S, Schrodri SJ i in. (2021) Molecular and Cellular Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms and Clinical Implications. *Frontiers in immunology* 12: 790122.
- Zhao J, Liu X, Xu J (2022) Elevated Expression and Activation of GPR15 in Immune Cells in Graves' Disease. *Biomolecules* 12(12): 1899.

7. Anticancer properties of metformin in the non-small cell lung cancer treatment – a micro review

Aleksandra Opęchowska⁽¹⁾, Sandra Murawska⁽¹⁾, Aleksandra Starosz⁽²⁾

⁽¹⁾ Student Science Club at the Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, Poland

⁽²⁾ Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, Poland

Research supervisor: dr hab. Kamil Grubczak & mgr Aleksandra Starosz

Aleksandra Opęchowska; aleksandraopechowska@gmail.com

Keywords: metformin, non-small cell lung cancer, anti-cancer immunity, immunomodulation

Abstract

Over the past few decades, type 2 diabetes has been recognized as one of the major public health problems globally. The popular, easily accessible, glucose-controlling drug - metformin, is used for the therapy of millions of patients worldwide. Due to its wide range of metabolic effects, metformin has been recently proven to demonstrate also anti-cancer effects in various malignancies. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the second most common cancer in the world, killing thousands of people every year. Despite intense efforts and complex therapeutic approaches implemented, the prognosis is still unfavourable. Consequently, that provides the basis for searching for new treatment options, supporting conventional management of NSCLC. In our micro review, we will discuss the novel discoveries regarding the potential impact of metformin on NSCLC, with particular emphasis on its immunomodulatory effects.

1. Introduction

Metformin is a well-known oral glucose-regulating agent, commonly used as a first-line therapy in type 2 diabetes mellitus (T2DM). Since millions of people globally are treated for type 2 diabetes, a significant amount of metformin is consumed every day. It possesses a wide range of metabolic effects, mainly involving carbohydrate and lipid metabolism regulation in various organs. Among many other properties, it can diminish gluconeogenesis in the liver and sensitize the adipose tissue and skeletal muscles to insulin action, thus, increase glucose uptake (Alfaraidi and Samaan 2022). What seems to be particularly crucial is the fact that metformin does not stimulate Langerhans beta cells directly. Consequently, it does not cause hypoglycemia resulting from excessive endogenous insulin - an unfavourable side effect of many other glucose-lowering drugs. Its properties of glycemia control were originally discovered in the 1920s, but its potential was underappreciated at that time. Before it received renewed attention for its metabolic potential, metformin was studied in the search for anti-influenza and anti-malaria agents in the 1940s. It was 1957 when the French physician Jean Sterne reported the possibility of metformin to be used in diabetes therapy, and since then, hopes have begun to rise for a more extensive use of the drug. As a result, new research directions have been considered, including studies on its possible protective effect on insulin resistance (IR) development, impact on the intestinal microbiome, anti-tumour and anti-aging properties (Bailey 2017). It was proven that apart from its numerous metabolic effects in various tissues, metformin has immunomodulatory properties, including those supporting the immune systems' reaction against developing cancer (Foretz et al. 2023). Research on that topic is constantly progressing worldwide, using different cancer models.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) – a tumour common in the human population and, unfortunately, very aggressive at the same time. NSCLC is a term that covers types of lung cancer other than neuroendocrine-related small-cell lung cancer (SCLC), consequently including squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large-cell (undifferentiated) carcinoma. Although we have been battling the NSCLC for ages now, we still seem not to fully understand its pathomechanism. Even

though, we are already armed with highly advanced technology and a wide range of therapeutic options. That partially explains the reason why even well-known, old-fashioned drugs, are being re-studied nowadays in case they potentially hold the desired miraculous anti-cancer effect. Metformin is emerging as such a candidate, given its immunomodulatory and metabolism–redirecting properties discussed below.

2. The issue of the review

The potential use of metformin in immune oncology is a multidimensional subject, and the features of different types of tumours are incredibly diverse. Therefore, in that micro review, we will exclusively focus on the knowledge available in the field of non-small cell lung cancer. Here, we present the up-to-date research achievements related to the effect of metformin studied in NSCLC models. First, we will focus on demonstrating the most important facts and statistics regarding NSCLC epidemiology. In accordance, allowing us to explain why the search for effective drugs that could support the fight against that type of tumour is so crucial, right now. Subsequently, we will elicit the substantial recent discoveries regarding metformin and its anti-tumour properties against NSCLC. We will additionally explore the future perspectives of metformin application in lung cancer. Particular attention would also be paid to metformin's adverse effects that could be potential limitations of that drug.

3. Literature review

Lung cancer, according to 2020 WHO Global Cancer Observatory reports, is the second most common cancer type globally, right behind breast cancer. Every year, it takes its deadly toll since, despite the doctors' efforts, the prognosis remains poor. Unfortunately, high incidence goes hand in hand with high mortality rates. In 2020, the reported estimated number of deaths caused by lung cancer was 1.2 million people worldwide, with an incidence of 1.5 million cases, making it the deadliest type of cancer. In addition, a higher mortality rate is being reported among men. According to the American Cancer Society, the most common type is non-small cell lung cancer (NSCLC), accounting for approximately 85% of all lung cancer cases. It includes such cancer types as squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large-cell (undifferentiated) carcinoma, each of them slightly different in terms of metabolism and mutations within the neoplastic cells. The 5-year survival rate in NSCLC, relying on information obtained from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database (maintained by the American National Cancer Institute (NCI)), is 65% if the cancer has not spread outside the primary niche - the lung. It further declines to 37% if it spreads to nearby structures or lymph nodes, and only 9% if distant organs such as the brain, bones, liver or second lung are affected. A serious problem is the fact that the tumour usually remains asymptomatic until the disease reaches an advanced level. As a consequence, the diagnosis is most often made at stage III or IV of cancer development, when the tumour has already invaded the surrounding tissues or caused distant metastases. Commonly, whenever possible, patients undergo surgery accompanied by chemotherapy and radiotherapy, although often with little therapeutic success. That is predominantly a result of late diagnosis at an advanced stage when the treatment options are limited. Numbers associated with incidence and estimated survival rate in NSCLC exhibit the seriousness of a health problem that type of cancer is causing. In consequence, efforts are being multiplied, and research continues to find substances that could potentially support conventional lung cancer therapy.

As the studies progress, metformin emerges as a promising anti-cancer candidate. Used every day by millions of diabetic patients worldwide, it became a subject of interest in numerous academic centres of cancer treatment research. One of the main mechanisms of its anti-cancer action is probably achieved through its immunomodulatory properties. Those were proven to involve multiple types of tumours other than NSCLC, including hepatocellular carcinoma (HCC), esophageal squamous cell carcinoma, and others (Foretz et al. 2023). However, existing differences in mutations that initially cause cancer to develop are the reason for the considerable heterogeneity of cancers. Consequently, the extent of response to metformin application might be varied, depending on the cancer model used in the research.

The immunomodulatory effect of metformin was studied in the context of NSCLC studies focusing on primary resistance to immune checkpoint inhibitors (ICIs). A flagship example of immune checkpoints broadly studied nowadays in immune oncology is the axis of programmed death receptor 1 and its ligand - PD-1/PD-L1 axis. PD-L1 molecule, when expressed on tumour cells, can suppress natural anti-cancer immune reactions. When linked to its receptor - PD-1, on the surface of lymphocytes, it inhibits lymphocyte activation, proliferation, and survival, thus, promoting cancer development. The xenograft research model prepared by Wang et al. demonstrated that the application of metformin in combination with a PD-1 blocking antibody - pembrolizumab, significantly decreased tumour growth and simultaneously promoted infiltration of CD8+ T cells at the cancer site (Wang et al. 2022). Comparable research results, confirming that phenomenon, were obtained subsequently in animal models (Lu et al. 2022) and clinical studies (Yang et al. 2023). Simultaneous use of metformin (or metformin in combination with dipeptidyl peptidase 4 inhibitors) and anti-PD-1 or anti-PD-L1 blocking antibodies, improved significantly the overall survival and extended progression-free survival time in NSCLC patients by 2.3 months. Importantly, without the substantial increase of immune-related adverse effects incidence (Yang et al. 2023). Except for widely reported immunomodulatory effects in immune checkpoint inhibitors-based treatment, other immune-related properties of metformin in NSCLC were observed. CD8+ lymphocytes are fundamental for developing the acquired immunity against the tumour elements and play a crucial role in cancer cells destruction through cytotoxic mechanisms. It was demonstrated in a study conducted by Eikawa et al. that growth inhibition of non-small cell carcinoma tumours was achieved due to metformin administration to mice, with the anti-cancer effect attributed to CD8+ T cells (Eikawa et al. 2015). In another study, metformin administration resulted in elevated frequencies of memory cells within peripheral and tumour-infiltrating CD8+ T cells in lung cancer patients. Also, in the CAR-T cell (chimeric antigen receptor T cells) therapy model, metformin exhibited cytotoxicity-promoting properties, enhancing tumour growth suppression by immune response (Z. Zhang et al. 2020). Besides acting on CD8+ cells, it became evident that metformin also influences natural killer (NK) cells. NK cells do not require activation in the context of major histocompatibility complex (MHC) and, therefore, they are crucial in primary anti-tumour cytotoxic response. Moreover, it was broadly remarked that disruption of NK cell actions promotes cancer development. In an *in vitro* study by Xia et al., the effect of metformin on the cytotoxic activity of NK cells against NSCLC cell line A549 was examined. It was demonstrated that NK cytolytic properties were significantly increased in a dose-dependent manner after additional treatment with metformin concentrations ranging from 1µM to 100µM. However, in the experimental setting involving metformin alone, the viability of A549 cells remained unchanged, elucidating the role of NK cells in the process (Xia et al. 2021). Other effects of metformin are associated with its positive impact on lung tissue during treatment, apart from already discussed direct support of the anti-tumour immunity. It was revealed that metformin could reduce macrophage recruitment, leading to suppression of pulmonary fibrosis caused by side effects of crizotinib - a first-line anti-NSCLC drug (Y. Zhang et al. 2023). In summary, metformin demonstrates bidirectional activity at the site of lung cancer niche. On one hand, it improves effects of other anti-cancer drugs and, on the other, it might improve the condition of lung tissue exposed to high doses of cytotoxic drugs during chemotherapy.

Although the immunomodulatory properties of metformin are undeniably most encouraging, they are other significant aspects of the drug when investigating its anti-cancer actions. In this part of our literature review, we will present most recent findings regarding metformins' biological activity. Lately, more potent mitochondria-targeted metformin (mitomet) was tested as an effective drug in *in vitro* and *in vivo* cancer models, in a study conducted by Shameem et al. The induction of mitochondrial reactive oxygen species generation was identified as the principal cause of the described beneficial anti-cancer effects. Those were associated with downregulated viability of transformed bronchial cells, reduction in multiplicity and size of lung tumours induced by tobacco smoke in mice. What seems to be crucial is the fact that the mitomet was relatively safe for normal bronchial cells, with concomitant high efficiency towards cancer cells (Shameem et al. 2023). Moreover, metformin has a synergistic effect with KRAS inhibitor – sotorasib, enhancing cytotoxicity and apoptosis in lung cancer cells (Barrios-Bernal et al. 2023). When discussing the properties of

different drugs in the context of killing cancer cells, their potential impact on cancer stem cells (CSCs) cannot be ignored. In the study provided by Tang et al., it was demonstrated that metformin can suppress the self-renewal ability of NSCLC-resistant (CSCs) to cytostatic drug paclitaxel. It was also noted that in concomitance with the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), metformin also reduced the expression of stemness-related markers (Tang et al. 2023).

In the final part of our micro review, the advantages and drawbacks of metformin, as well as the potential adverse effects and future research directions will be discussed. First of all, metformin as a relatively cheap, old-fashioned drug, has beneficial economic aspects in cancer therapy. Additionally, it should be emphasized that this drug is relatively easily accessible and well-tolerated among patients. As mentioned before, metformin, due to its lack of direct effect on insulin secretion by pancreatic beta cells, rarely causes hypoglycemia. That adverse effect can be observed most likely only when treatment with metformin is combined with other glucose-lowering drugs. One of the most common adverse effects is gastrointestinal intolerance, manifested by nausea, vomiting, stomach upset, and diarrhoea, while more severe effects, such as lactic acidosis, are relatively rare. In the 1990s, a study was conducted to determine what percentage of people qualified for metformin treatment have contraindications to its use and whether, for that reason, discontinuation of the drug is common. The study revealed that contraindications were present in the case of approximately one-quarter of the study population and that the development of mild adverse reactions rarely resulted in suspension of metformin admission. Severe allergic reactions to that drug are also infrequent, making it relatively safe for general use (Nasri and Rafieian-Kopaei 2014).

Keeping in mind its high incidence and strongly unfavourable prognosis, the NSCLC is an example of cancer in which we face an urgent need for novel pharmaceuticals that could safely support conventional chemotherapy. It should be emphasized here that metformin acting alone has poorly defined anti-cancer properties when compared to standard cytostatic drugs. However, we should remember that metformin in the NSCLC was never intended to be applied in monotherapy. The concept of adding metformin to a standard chemotherapy regimen in the future is based on its metabolism–redirecting and immunomodulating properties. In such circumstances, the cancer cells would be sensitized to the cytotoxic action of the immune system cells (CD8+ lymphocytes and NK cells) or targeted chemotherapy, thus, increasing the effectiveness of the therapy. We hope that combining metformin with commonly used cytotoxic drugs in the future could be a novel formula for integrated multi-agent chemotherapy. That could presumably be applied also to new radiopharmaceuticals and immunotherapy, that gain enormous popularity recent years. However, despite the promising aspects, research in that field should be handled diligently and carefully. Regardless of the demonstrated beneficial outcomes of pre-clinical studies, in clinical trials, the addition of metformin to chemoradiotherapy was associated with decreased treatment efficacy (Tsakiridis et al. 2021). Noteworthy, that study did not analyse the actions of metformin in specific histological subtypes of cancer (squamous cell, adenocarcinoma, etc.), making it impossible to relate their data to all lung cancer cell responses. On the contrary, another clinical trial demonstrated that implementation of metformin to chemotherapy for advanced NSCLC did not significantly improve the treatment outcome but was safe and did not cause any side effects (Parikh et al. 2017). In our opinion, we should consider each histological subtype as a separate metabolic entity with unique characteristics. In addition to the histological subtype, another factor that may influence the extent of metformin effects might be the dose used, but also a proper selection of patients that can actually benefit from such combination. In accordance, metformin remains a promising research direction for scientists to establish its potential in novel therapeutic methods for the management of non-small cell lung cancer.

4. Conclusions

In the light of information mentioned above, metformin seems to be a substance worth substantial attention when searching for novel pharmaceuticals that could improve the effectiveness of standard NSCLC therapy. Recent years have been full of discoveries regarding metformin and its subcellular and cellular actions. It is essential to understand its precise impact on different populations of immune cells, especially those involved in anti-cancer immunity. The immune system affects all

of the cells in the human body, constantly monitoring for cells that underwent the neoplastic process. However, despite the great potential hidden within the capabilities of the human immune system, additional support might be required in the case of various cancer cells' escape mechanisms. Finding effective ways for that – presumably through drugs like metformin, can open a completely new direction of studies on innovative lung cancer therapy approaches.

5. Literature

- Alfaraidi H, Samaan MC (2022). Metformin therapy in pediatric type 2 diabetes mellitus and its comorbidities: A review. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
- Bailey CJ (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60(9), 1566–1576.
- Barrios-Bernal P, Lucio-Lozada J, Ramos-Ramírez M et al. (2023). A Novel Combination of Sotorasib and Metformin Enhances Cytotoxicity and Apoptosis in KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through MAPK and P70S6K Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5).
- Eikawa S, Nishida M, Mizukami S. et al. (2015). Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1809–1814.
- Foretz M, Guigas B, Viollet, B. (2023). Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nature Reviews. Endocrinology*, 19(8), 1.
- Lu T, Li M, Zhao M et al. (2022). Metformin inhibits human non-small cell lung cancer by regulating AMPK-CEBPB-PDL1 signalling pathway. *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII, 71(7), 1733–1746.
- Nasri H, Rafieian-Kopaei M (2014). Metformin: Current knowledge. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(7), 658.
- Parikh AB, Kozuch P, Rohs N et al (2017). Metformin as a repurposed therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a phase II trial. *Investigational New Drugs*, 35(6), 813–819.
- Shameem M, Bagherpoor AJ, Nakhi A et al. (2023). Mitochondria-targeted metformin (mitomet) inhibits lung cancer in cellular models and in mice by enhancing the generation of reactive oxygen species. *Molecular Carcinogenesis*, 62(11), 1619–1629.
- Tang Z, Zhang Y, Yu Z et al. (2023). Metformin Suppresses Stemness of Non-Small-Cell Lung Cancer Induced by Paclitaxel through FOXO3a. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(23), 16611,
- Tsakiridis T, Pond GR, Wright J et al. (2021). Metformin in Combination With Chemoradiotherapy in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The OCOG-ALMERA Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 7(9), 1333.
- Wang Z, Lu C, Zhang K et al. (2022). Metformin Combining PD-1 Inhibitor Enhanced Anti-Tumor Efficacy in STK11 Mutant Lung Cancer Through AXIN-1-Dependent Inhibition of STING Ubiquitination. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1.
- Xia W, Qi X, Li M et al. (2021). Metformin promotes anticancer activity of NK cells in a p38 MAPK dependent manner. *Oncoimmunology*, 10(1).
- Yang J, Kim SH, Jung EH et al. (2023). The effect of metformin or dipeptidyl peptidase 4 inhibitors on clinical outcomes in metastatic non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Thoracic Cancer*, 14(1), 52.
- Zhang Y, Gao Z, Pan Z et al. (2023). Crizotinib induces pulmonary toxicity by blocking autophagy flux in alveolar epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 215.
- Zhang Z, Li F, Tian Y. et al. (2020). Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8+ T Lymphocytes via the AMPK-miR-107-Eomes-PD-1 Pathway. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 204(9), 2575–2588.

8. Current perspectives and novel directions of research in the immunotherapy of glioblastoma using immune checkpoint inhibitors (ICIs)

Aleksandra Opęchowska⁽¹⁾, Aleksandra Starosz⁽²⁾

⁽¹⁾ Student Science Club at the Department of Regenerative Medicine and Immunoregulation, Medical University of Białystok, Poland

⁽²⁾ Department of Regenerative Medicine and Immunoregulation, Medical University of Białystok, Poland

Research supervisor: dr hab. Kamil Grubczak & mgr Aleksandra Starosz

Aleksandra Opęchowska; aleksandraopechowska@gmail.com

Keywords: glioblastoma, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors, programmed death receptor 1

Abstract

Glioblastoma multiforme is an aggressive, most common primary brain tumour with a poor survival prognosis. It is characterized by rapid development and extensive infiltration of the surrounding brain tissue. Due to poor response to the conventional treatment, it remains an incurable disease. Therefore, significant efforts are made in search of new effective glioblastoma treatment methods. In addition to new radiotherapy and chemotherapy administration regimens, hopes are attributed to a novel branch of cancer management – immunotherapy. One of the elements includes immune checkpoint inhibitors (ICIs), that have been previously studied and applied efficiently in the treatment of cancers like melanoma or lung cancer. Although no breakthrough was achieved in the context of ICIs implementation in glioblastoma therapy, the research in that field is continuously being carried out. In the micro-review, we summarized the most recent discoveries regarding the usage of ICIs in the immunotherapy of glioblastoma, with particular emphasis on the anti-PD-1/anti-PD-1L axis. In addition, clinical trials conducted to date and potential future directions were discussed.

1. Introduction

With the development of civilization, the leading health problems affecting society are also dynamically changing. Just a few decades ago, the major causes of death were infectious diseases leading to deaths of hundreds of millions of people, regardless of age. The discovery of antibiotics in the 1940s was a milestone in the history of medicine that enabled the treatment of previously incurable conditions. That resulted in a crucial change of trends regarding the principal causes of death in developed countries, with chronic diseases taking the lead. Nowadays, cancer is a significant cause of death in highly-developed countries, and, unfortunately, no improvement in the incidence and mortality rates is expected shortly. The primary concern regards especially those types of cancer for which no effective treatment options are available, and with highly unfavourable prognosis. One of the poorly differentiated cancers is astrocytoma – the WHO grade IV glioblastoma, formerly known as glioblastoma multiforme (GBM) – a huge challenge for both, patients and doctors. Unfortunately, it is the most prevalent primary brain malignancy, constituting up to 49% of malignant brain tumours, with the incidence of primary malignant brain tumours amounting to approximately 7/100 000 individuals annually (Schaff and Mellinghoff 2023). The prognosis of the disease is poor, with the median survival time from diagnosis being approximately 15 months (Tamimi and Juweid 2017). The estimated 5-year survival rate for glioblastoma decreases with advancing age and is 22% in those aged 20 – 44 years, and only 6% in the 55 – 64 years old group, according to the American Cancer Society. In general, glioblastoma is diagnosed predominantly at older age, with the median age at diagnosis reaching 64 years. It was shown to be more common in males than females. Glioblastoma is usually located in the supratentorial region of the brain, most often in the frontal lobe. However, it

tends to infiltrate other lobes as well (overlapping tumours). That type of tumour is rarely observed in the cerebellum or the spinal cord (Tamimi and Juweid 2017).

Typical, first-line therapy for glioblastoma is maximally possible surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy using temozolomide (Schaff and Mellinshoff 2023). Other methods beyond the usual treatment standards are being introduced. Recently, immunotherapy has become popular in the field of oncology. The mentioned strategy has been gradually introduced in the therapy of leukemias, lymphomas, and solid tumours like melanoma, non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma, and others (Yu et al. 2023).

Diffusing tumours generate a response from immune system cells, engaging innate and adaptive immunity. In proper conditions, that is beneficial since leukocytes neutralize cancer cells in a cytotoxic mechanism. However, cancer cells have developed evasion mechanisms able to silence or completely block the body's response against the tumour. That phenomenon occurs through so-called immune checkpoint molecules - present on leukocytes (lymphocytes and antigen-presenting cells predominantly) but reported also on some types of cancer. A well-known example of the immune checkpoint proteins is the axis of programmed death receptor 1 and its ligand (PD-1/PD-L1). The PD-1 is expressed on lymphocytes and its ligand on the surface of cancer cells, thus, blockage of the PD-1 by PD-L1 of tumour cells leads to the blocking of the immune cells' activation. Consequently, the discovery of immune checkpoint molecules proceeded with the subsequent finding of new therapeutic agents called immune checkpoint inhibitors (ICIs) - monoclonal antibodies capable of blocking the immunosuppressive signal transmitted by cancer cells, hence promoting the anti-cancer properties of lymphocytes.

Studies regarding the ICIs are also conducted in glioma models, including glioblastoma. Unfortunately, despite that revolutionary approach supporting the management of other cancers, no significant progress has yet been made in the case of glioblastoma (Yu et al. 2023). The immune escape of glioblastoma tumours is one of the crucial reasons for its resistance to standard treatments, providing the basis for the development of novel effective immunotherapeutic methods. In that micro-review, we aimed to summarize the latest discoveries in the field of immune checkpoint inhibitors use in glioblastoma models.

2. The issue of the review

Recently, immunotherapy in oncology has gained popularity in newly conducted pre-clinical and clinical research studies. Glioblastoma is a tumour in which potential immunological therapeutic options are being broadly investigated. In our review, we aimed to summarize discoveries that have been made recently regarding the use of immune checkpoint inhibitors (ICIs) with particular emphasis on the PD-1/PD-L1 axis influence in *in vitro* and *in vivo* glioblastoma models. We further discuss finished or currently ongoing clinical studies. Finally, we outlined new research directions aimed at effective treatment of glioblastoma.

3. Literature review

The PD-1/PD-L1-related pathway is one of the most broadly studied in the field of immune checkpoint inhibitors. Here, we summarized the latest findings regarding the axis of mentioned proteins in glioblastoma therapy. *In vitro* and *in vivo* experiments conducted by Hou et al. demonstrated that the knockdown of tumour necrosis alpha-induced protein 2 (TNFAIP2) increased cell surface migration of heat shock proteins and calreticulin, hence inducing immunogenic cell death. Decrease of TNFAIP2 expression synergized with anti-PD-1 therapy influence, improving overall survival in the murine model (Hou et al. 2023). Furthermore, intraperitoneal application of bioengineered interleukin 2 (IL-2) (with extended half-time) combined with an anti-PD-1 monoclonal antibody allowed for efficient treatment of approximately 50% of mice bearing orthotopic GL261 gliomas and prolonged median survival time. The GL261 glioma model is minimally immunogenic and resistant to standard anti-PD-1 inhibitors. Therefore, administering the engineered IL-2 molecule significantly boosted the anti-tumor acquired immune response (Tritz et al. 2023). Over the years, it has been indicated that intestinal microbiota has significant impact on the development of various

diseases, including cancers. In accordance, recent experiments explored the association between oral probiotics and the effectiveness of PD-1 blockage with ICIs. It has been proven that gut microbiota affects the anti-tumor responses in glioblastoma. However, none of the tested probiotics significantly influenced the survival rate by the mean of synergistic action when combined with ICIs in the GL261 orthotopic glioma mouse model (J. Kim et al. 2023).

Pharmaceuticals that may potentiate the effects of anti-PD-1 or anti-PD-1L therapy should be continuously investigated. In the study performed by Li et al., it was demonstrated that metformin, a popular hypoglycemic drug for type 2 diabetes mellitus, enhanced the efficacy of the anti-PD-1 immunotherapy in a GBM mouse model. Related inhibition of CCR8 expression on Treg cells infiltrating the tumour promoted anti-cancer immune responses. Previously conducted studies proved that targeting CCR8+ Tregs was associated with their depletion and, thus, reduced tumour growth (Li et al. 2023). Another study used a novel dual inhibitor of CSF1R and VEGFR, which has a good ability to cross the brain-blood barrier (BBB) - SYHA1813. The inhibitor modulates tumour immune microenvironment and synergistically enhances anti-PD-1 treatment response in the immunocompetent mouse allograft glioblastoma model (Liu et al. 2023).

Besides inhibition of the signalling through PD-1/PD-1L axis, CTLA-4 blockade is another immune checkpoint-related protein studied extensively in glioblastoma models. Interestingly, the cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) is an immune checkpoint molecule whose presence was demonstrated in glioblastoma tumour cells, apart from its well-known expression in lymphocytes (Fathi et al. 2022). Chen et al. implemented using anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in a mesenchymal-like glioblastoma murine model. It has been demonstrated that anti-CTLA-4 treatment suppressed tumor growth and improved survival even 3-fold, while anti-PD-1 antibodies did not affect median survival. Since the therapeutic efficacy of anti-CTLA-4 therapy was more remarkable than anti-PD-1, it was suggested that in glioblastoma CTLA-4 blockage might be more efficient in supporting anti-cancer responses (Chen et al. 2023). More recently, the promising potential of new immune checkpoints has been revealed. Siglec-9, a molecule expressed on tumour-derived macrophages, was linked to immunosuppressive response in glioblastoma. Tumour-associated macrophage (TAMs) subpopulations, highly expressing the *SIGLEC9* gene, were identified. The accumulation of those cells was presumably associated with the lack of response to anti-PD-1 therapy in patients. Using a mouse model allowed for obtaining consistent results. Deletion of mouse *SIGLEC9* gene equivalent led to prolonged animal survival and limited tumor progression. Additionally, reduction of *SIGLEC9* expression promoted the activity of anti-PD-1/anti-PD-1L agents (Mei et al. 2023).

Techniques involving nanotechnology are one of the most innovative modern potential treatment methods in oncology. Study provided by Chen et al. highlighted that a synergistic combination of nanoparticles, with golden core and silica shell, and low doses of radiation improved substantially the clinical efficacy of atezolizumab - an anti-PD-L1 antibody (S. F. Chen et al. 2023). Use of nanoparticles allowed for overcoming another obstacle in glioma tumour therapy – the hindered transfer of pharmaceuticals used in GBM through the BBB. One study developed ferritin-based nanocages using a BBB-permeable heavy chain of human ferritin modified by the addition of 24 copies of PD-L1 blocking peptides. Nanocage administration significantly inhibited glioblastoma growth in a murine orthotopic intracranial model. *In vitro* model of the same study also revealed that nanocages could disrupt the PD-1/PD-1L blockage by cancer cells, and consequently restore the T cell activity (M. Kim et al. 2023).

Clinical trials regarding glioblastoma immunotherapy involving the immune checkpoint inhibitors were an obvious consequence of the promising data obtained in the pre-clinical setting. Expression of PD-L1 on glioblastoma cells is quite common, reported in up to 60-70% of patients, justifying the purpose of those clinical trials. Phase 1 studies engaging Nivolumab - human monoclonal antibody against PD-1, with or without the addition of Ipilimumab – human monoclonal antibody blocking the CTLA-4 antigen were conducted. It was demonstrated that while Nivolumab monotherapy was better tolerated than combined therapy, the tolerability of the combination relied on the Ipilimumab dose (Omuro 2022; Omuro et al. 2018). Unfortunately, phase 3 treatment trials with Nivolumab did not show promising results in its effectiveness, regarding median overall survival

time or progression-free survival time (Wang et al. 2023). One of the main drawbacks in glioma management appears to be the limited ability of chemotherapeutic drugs to cross the BBB, which is omitted in *in vitro* models. Masood et al. have recently performed a retrospective cohort study regarding plasma PD-L1 levels in GBM patients. They demonstrated that PD-L1 protein level and corresponding mRNA pre-surgery plasma levels were significantly increased in the group of GBM patients compared to healthy controls. Moreover, increased PD-1L levels were found to be correlated with poor survival. The results of that study indicate a potential diagnostic value of PD-L1 concentrations in plasma and have raised hopes for the potential discovery of a GBM biomarker easily accessible in the blood (Masood et al. 2023).

Unfortunately, despite all the mentioned results, no significant progress has been made in implementing ICIs into clinical practice for glioblastoma treatment. That can be attributed, among other factors, to the strongly immunosuppressive character of the tumour microenvironment and its heterogeneous nature (Bikfalvi et al. 2023). As a result, the natural anti-tumour response of the immune system is enormously diminished in those patients. The main obstacle to achieve effective local concentration of the ICIs is crossing the brain-blood barrier. Therefore, novel methods that would enable direct delivery of these drugs to the parenchyma of the tumour are of great importance. Due to the dynamic development of nanotechnology, it might be the future of the successful transport of molecules through the BBB. Other techniques that could increase the immunogenicity of the GBM tumor are also necessary. Concomitantly, potential toxicity and possible adverse effects in GBM patients should be investigated profoundly at each step of ICIs investigation. Finally, novel study directions could also include the search for other, yet scarcely described immune checkpoints, that might contribute to the modulation of the tumour microenvironment. Since the immune checkpoint inhibitors have already been effective therapeutic option in other solid tumours, promising preclinical and clinical data provide the basis for further study of ICIs potential use also in the case of glioblastoma.

4. Conclusions

For now, the effectiveness of immunotherapy against glioblastoma is still limited. However, since the *in vitro* results remain optimistic with the promising potential of the glioma treatment, finding a way to translate these research discoveries into clinical settings remains an ongoing issue. Our knowledge regarding implementing immune checkpoint inhibitors in oncology is comprehensive, yet, contains numerous gaps in reference to glioblastoma. In accordance, it requires substantial expansion, especially in the face of emerging medical innovations. Perhaps the key to success are new solutions regarding the molecular structure of ICIs, or the application of novel drug delivery systems. Learning how to overcome the blood-brain barrier could open new research directions and possible therapeutic options in the management of glioblastoma, but also neurooncology and neurology in general.

5. Literature

- Bikfalvi A, da Costa CA, Avril T et al. (2023). Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment. *Trends in Cancer*, 9(1), 9–27.
- Chen D, Varanasi SK, Hara T et al. (2023). CTLA-4 blockade induces a microglia-Th1 cell partnership that stimulates microglia phagocytosis and anti-tumor function in glioblastoma. *Immunity*, 56(9), 2086-2104.
- Chen SF, Kau M, Wang YC et al. (2023). Synergistically Enhancing Immunotherapy Efficacy in Glioblastoma with Gold-Core Silica-Shell Nanoparticles and Radiation. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 76-77
- Fathi M, Razavi SM, Sojoodi M et al. (2022). Targeting the CTLA-4/B7 axes in glioblastoma: preclinical evidence and clinical interventions. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 26(11), 949–961.

- Hou C, Shi S, Gao M et al. (2023). Targeting TNFAIP2 induces immunogenic cell death and sensitizes glioblastoma multiforme to anti-PD-1 therapy. *Journal of Neuro-Oncology*, 165(1), 79–90.
- Kim J, Kim Y, La J et al. (2023). Supplementation with a high-glucose drink stimulates anti-tumor immune responses to glioblastoma via gut microbiota modulation. *Cell Reports*, 42(10).
- Kim M, Yoon HJ, Lee C et al. (2023). Immune Checkpoint-Blocking Nanocages Cross the Blood-Brain Barrier and Impede Brain Tumor Growth. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.
- Liu Y, Zhan Z, Kang Z et al. (2023). Preclinical and early clinical studies of a novel compound SYHA1813 that efficiently crosses the blood-brain barrier and exhibits potent activity against glioblastoma. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 13(12).
- Li Y, Liu B, Cao Y et al. (2023). Metformin-induced reduction of CCR8 enhances the anti-tumor immune response of PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *European Journal of Pharmacology*, 964, 176274.
- Masood A, Batool S, Bhatti SN et al. (2023). Plasma PD-L1 as a biomarker in the clinical management of glioblastoma multiforme—a retrospective cohort study. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Mei Y, Wang X, Zhang J et al. (2023). Siglec-9 acts as an immune-checkpoint molecule on macrophages in glioblastoma, restricting T-cell priming and immunotherapy response. *Nature Cancer*, 4(9), 1273–1291.
- Omuro A. (2022). Immune-checkpoint inhibitors for glioblastoma: what have we learned? *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 80 (5 Suppl 1), 266–269.
- Omuro A, Vlahovic G, Lim M et al. (2018). Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro-Oncology*, 20(5), 674.
- Schaff LR, Mellinghoff IK. (2023). Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA*, 329(7), 574–587.
- Tamimi AF, Juweid M. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. *Glioblastoma*, 143–153.
- Tritz ZP, Ayasoufi K, Wolf DM et al. (2023). Anti-PD-1 and extended half-life IL-2 synergize for treatment of murine glioblastoma independent of host MHC class I expression. *Cancer Immunology Research*, 11(6), 763.
- Wang Y, Li S, Peng Y et al. (2023). Progress in phase III clinical trials of molecular targeted therapy and immunotherapy for glioblastoma. *Cancer Innovation*, 2(2), 114–130.
- Yu C, Hsieh K, Cherry DR et al. (2023). Immune Escape in Glioblastoma: Mechanisms of Action and Implications for Immune Checkpoint Inhibitors and CAR T-Cell Therapy. *Biology*, 12(12), 1528.

9. Zaburzenia depresyjne oraz zaburzenia snu wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników: badanie pilotażowe

Depressive disorders and sleep disorders in women with polycystic ovary syndrome: a pilot study

Katarzyna Stańczyk⁽¹⁾, Katarzyna Wielemborek-Musiał⁽²⁾, Anna Lipert⁽³⁾

⁽¹⁾ Zakład Medycyny Sportowej, Katedra Medycyny Społecznej i Zapobiegawczej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁽²⁾ Zakład Koordynowanej Opieki, Katedra Nauczania Pielęgniarstwa, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁽³⁾ Zakład Medycyny Zapobiegawczej, Katedra Medycyny Społecznej i Zapobiegawczej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Katarzyna Stańczyk: katarzyna.stanczyk@stud.umed.lodz.pl

Słowa kluczowe: zaburzenia hormonalne, zaburzenia neuropsychiatryczne

Streszczenie

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest najczęściej diagnozowanym zaburzeniem endokrynnym wśród kobiet w wieku rozrodczym, z częstością występowania szacowaną na 5–20%. Pacjentki z PCOS są od 3 do 8 razy bardziej narażone na rozwój zaburzeń depresyjnych niż ogół populacji, a także charakteryzują się zwiększonym ryzykiem rozwoju zaburzeń snu. Celem pracy była ocena zależności między częstością występowania objawów zaburzeń depresyjnych a jakością snu wśród pacjentek z PCOS. W badaniu wykorzystano dane uzyskane od 15 kobiet w wieku 23–43 lata. Badanie ankietowe zostało przeprowadzone z zastosowaniem Skali Depresji Becka (BDI–II) oraz Kwestionariusza Jakości Snu Pittsburgh (PSQI), które udostępniono on-line na 3 grupach na portalu Facebook wśród kobiet z PCOS. PCOS rozpoznano średnio $4,64 \pm 3,76$ roku przed udziałem w badaniu. Nadmierną masę ciała stwierdzono wśród $\frac{1}{5}$ kobiet. Niemal $\frac{3}{4}$ ankietowanych zadeklarowało współwystępowanie wraz z PCOS innych zaburzeń. Blisko $\frac{3}{4}$ kobiet uzyskało w BDI wynik wskazujący na zaburzenia depresyjne: ciężkie ($f=0,20$), umiarkowane ($f=0,13$) lub łagodne ($f=0,33$). Na podstawie PSQI wśród ponad $\frac{3}{4}$ uczestniczek badania jakość snu określono jako złą ($f=0,86$). Wykazano dodatnią oraz umiarkowaną silną korelację między stanem psychicznym a jakością snu ($r_s=0,49$; $p>0.05$). Zaobserwowano zależność między stanem psychicznym a jakością snu. Istnieją wskazania do wdrożenia opieki interdyscyplinarnej wśród pacjentek z PCOS, w tym wsparcia psychologicznego.

1. Wstęp

Zespół policystycznych jajników (*polycystic ovary syndrome*, PCOS) jest najczęściej diagnozowanym zaburzeniem endokrynnym wśród kobiet w wieku rozrodczym, z częstością występowania w populacji szacowaną na 5–20% (Azziz i in. 2016). Podłoże patogenetyczne rozwoju PCOS jest niejednorodne i kształtowane przez interakcje między zaburzeniami metabolicznymi a dysfunkcją układu rozrodczego. Na szczególną uwagę zasługują wzajemnie nasilające się hiperandrogenizm i oporność tkanek na działanie insuliny, a także powiązana z tym oddziaływaniem dysfunkcja osi podwzgórze–przysadka–jajnik. Do istotnych aspektów należą również czynniki środowiskowe, podobnie jak wpływ programowania wewnątrzmacicznego w okresie prenatalnym (Harada 2022). W diagnozowaniu PCOS od 2004 roku wykorzystywane są tzw. Kryteria Rotterdamskie, przy czym do potwierdzenia występowania opisywanego zespołu zaburzeń konieczne jest spełnienie co najmniej dwóch z trzech poniższych kryteriów:

- oligoowulacja lub anowulacja,
- kliniczne objawy hiperandrogenizmu lub hiperandrogenemia,

- obraz wielotorbielowatych jajników (co najmniej 12 pęcherzyków o śr. 2–9 mm, objętość jajnika >10 ml) w badaniu USG.

Rozpoznanie PCOS wymaga jednak wykluczenia innych możliwych przyczyn hiperandrogenizmu, takich jak guz hormonalnie czynny, zespół Cushinga, wrodzony przerost nadnerczy czy niedoczynność tarczycy (Johnstone i in. 2010). Z kolei aby zdiagnozować zaburzenie homeostazy glukozy, jakim jest insulinooporność, stosuje się wskaźnik HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*), który uwzględnia stężenie glukozy oraz stężenie insuliny we krwi żyłnej po spoczynku nocnym, z punktem odcięcia na poziomie 2,0 (Sengupta i in. 2018).

Wśród kobiet z PCOS występuje zwiększone ryzyko rozwoju zespołu metabolicznego, zaburzeń sercowo-naczyniowych, dyslipidemii, hipertriglicerydemii oraz cukrzycy typu 2 (Sengupta i in. 2018). Jednocześnie wszystkie główne zaburzenia występujące w ramach PCOS, a zatem otyłość, insulinooporność, hiperandrogenizm, niepłodność oraz procesy zapalne, powiązано ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zaburzeń neuropsychiatrycznych. Pacjentki są nie tylko od 3 do 8 razy bardziej narażone na rozwój zaburzeń depresyjnych, ale również wykazują zwiększone ryzyko rozwoju zaburzeń lękowych (Cooney i in. 2017), czy zaburzeń rytmu okołodobowego (Zhang i in. 2022). Wśród kobiet z PCOS zauważono także zwiększone narażenie na rozwój choroby afektywnej dwubiegunowej (*Bipolar Affective Disorder*, ChAD), zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych (*Obsessive Compulsive Disorder*, OCD) oraz zaburzeń somatyzacyjnych (Brutocao i in. 2018). Jednocześnie wykazano związek między występowaniem depresji a niedoczynnością tarczycy, która stanowi jedną z chorób najczęściej współwystępujących z PCOS (Nuguru i in. 2022). W związku z tym celem pracy była ocena zależności między częstością występowania objawów zaburzeń depresyjnych a jakością snu wśród pacjentek z zespołem policystycznych jajników.

2. Materiał i metody

Badanie przeprowadzono w kwietniu 2023 roku wśród kobiet z PCOS. W celu zebrania danych posłużono się autorskim kwestionariuszem ankiety oraz dwoma wystandaryzowanymi kwestionariuszami – Skalą Depresji Becka (*Beck Depression Inventory*, BDI-II) oraz Kwestionariuszem Jakości Snu Pittsburgh (*Pittsburgh Sleep Quality Index*, PSQI), udostępnionych on-line na 3 grupach społecznościowych portalu Facebook. Autorski kwestionariusz ankiety składał się z metryczki, w której zawarto pytania socjo-demograficzne, a także 9 pytań problemowych odnoszących się do stanu zdrowia, stosowanej farmakoterapii oraz zachowań zdrowotnych. Do oceny zaburzeń depresyjnych wykorzystano kwestionariusz samoopisowy BDI-II, spełniający kryteria równoważności psychometrycznej adaptacji kulturowej zalecanym w badaniach naukowych. Kwestionariusz BDI-II zawiera 21 pytań z czterema odpowiedziami w skali 0–3 punkty, gdzie 0 oznacza brak objawu, a 3 jego największe nasilenie. Zgodnie z wynikami polskiej adaptacji punkt odcięcia przyjęto na poziomie 14 punktów, interpretując wynik 14–19 punktów jako epizod łagodny, 20–28 punktów jako epizod umiarkowany, a wartość 29–63 punkty jako epizod ciężki (Zawadzki i in. 2009). Do oceny jakości snu zastosowano kwestionariusz PSQI charakteryzujący się wysoką rzetelnością oraz dobrą zgodnością z wynikami uzyskiwanymi w polisomnografii. Kwestionariusz PSQI umożliwia ocenę 7 komponentów snu tj. subiektywnej jakości snu (C1), latencji snu (C2), długości trwania snu (C3), wydajności snu (C4), zaburzeń snu (C5), stosowania leków nasennych (C6), zaburzeń funkcjonowania w ciągu dnia (C7). Poszczególne komponenty oceniane są w skali 0–3 punkty, gdzie 0 oznacza brak trudności, a 3 oznacza największą trudność. Zgodnie z wynikami polskiej adaptacji jako punkt odcięcia przyjęto wartość 5 punktów, interpretując wynik 0–5 jako dobrą jakość snu, a wynik 5–21 jako złą jakość snu (Badzio-Jagiello i in. 1999).

Kryterium włączenia do próby badanej stanowiło ukończenie 18. roku życia oraz nieukończenie 45. roku życia, posiadanie polskiego obywatelstwa, a także zdiagnozowany zespół policystycznych jajników – ankietowane kobiety udzielały informacji nt. czasu, jaki upłynął od zdiagnozowania PCOS. Kryterium wyłączenia z badania stanowił wiek poniżej 18. roku życia, a także powyżej 45. roku życia, brak polskiego obywatelstwa oraz brak występowania ww. zaburzenia. Do badania zakwalifikowano 15 kobiet w wieku 23–43 lata. Do oceny stanu odżywienia zastosowano wskaźnik wagowo-wzrostowy (*Body Mass Index*, BMI), według którego wartość <18,50 kg/m²

świadczy o niedowadze; 18,50–24,99 kg/m² o prawidłowej masie ciała; 25,00–29,99 kg/m² o nadwadze; natomiast wartość BMI $\geq 30,00$ kg/m² o występowaniu otyłości (WHO 2010). Uzyskane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Microsoft Office Excel oraz STATISTICA v. 13.1 (Tibco Software Inc., Palo Alto, CA, United States). Wyniki przedstawiono wskaźnikiem struktury jako frakcje, ponieważ liczebność badanej grupy nie przekraczała 100. jednostek, a cechy mierzalne przedstawiono jako średnia i przedziały ufności dla średniej. Do oceny różnic między zmiennymi wykorzystano odpowiednie testy nieparametryczne, przyjmując różnicę za istotną statystycznie przy $p < 0.05$ oraz wielkość efektu d Cohena, gdzie $d > 0,3$ uznaje się za efekt średni, a $d > 0,5$ za efekt duży.

3. Wyniki i dyskusja

Do badania włączono 15 kobiet w wieku 23–43 lata. Średni wiek uczestniczek wynosił $29,60 \pm 5,04$ roku, podobnie jak w przypadku badań prowadzonych przez innych badaczy (Jiskoot i in. 2020; Adamczak i in. 2023; Basirat i in. 2019; Hachul i in. 2019). Większość kobiet zakwalifikowanych do badania zadeklarowało otrzymanie diagnozy zespołu policystycznych jajników powyżej 5 lat przed udziałem w badaniu ($f=0,46$), przy czym średni czas od zdiagnozowania omawianego zaburzenia wynosił $4,64 \pm 3,76$ roku. Nadmierna masa ciała występowała wśród $\frac{1}{5}$ ankietowanych kobiet, a średnia wartość BMI wynosiła $23,32 \pm 4,13$ kg/m², co stanowi znacznie mniej niż w przypadku wyników prezentowanych w innych badaniach (Jiskoot i in. 2020; Adamczak i in. 2023; Basirat i in. 2019; Karasu i in. 2021; Hachul i in. 2019; Benham i in. 2023). Powyższe dane przedstawiono w Tab.1.

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy.

Zmienna	Ogółem (n=15) (f)
Stan cywilny	
w związku	12 (0,80)
stanu wolnego	3 (0,20)
Liczba dzieci	
brak	14 (0,93)
jedno	1 (0,07)
Próby poczęcia dziecka	
brak	7 (0,47)
podejmowane	8 (0,53)
Wskaźnik BMI [kg/m²]	
<18,50	1 (0,07)
18,50–24,99	11 (0,73)
25,00–29,99	1 (0,07)
30,00–34,99	2 (0,13)
Diagnoza PCOS	
<0,5 roku	2 (0,13)
0,5–1,0 rok	4 (0,27)
1,0 rok–2,0 lata	1 (0,07)
2,0–5,0 lat	1 (0,07)
>5,0 lat	7 (0,46)
Miejsce zamieszkania	
obszar wiejski	3 (0,20)
miasto <50 tys. mieszkańców	4 (0,26)
miasto 50–100 tys. mieszkańców	1 (0,07)

miasto 150–500 tys. mieszkańców	1 (0,07)
miasto >500 tys. mieszkańców	6 (0,40)
<hr/>	
Średni miesięczny dochód [zł]*	
2000–4000 brutto	8 (0,53)
4000–6000 brutto	3 (0,20)
6000–8000 brutto	3 (0,20)
>8000 brutto	1 (0,07)

*w przeliczeniu na jednego mieszkańca gospodarstwa domowego

W badaniu oceniono częstość występowania zaburzeń towarzyszących PCOS, związanej z tym wdrożonej farmakoterapii oraz stosowanej suplementacji (Tab.2). Niemal ¼ ankietowanych kobiet zadeklarowało współwystępowanie wraz z PCOS co najmniej jednego innego zaburzenia ($f=0,67$), a blisko połowa uczestniczek badania zgłosiła jednoczesne występowania dwóch lub więcej zaburzeń ($f=0,47$). Najczęściej występującym zaburzeniem była insulinooporność, która dotyczyła blisko ¾ uczestniczek badania, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Al-Jefout i in. 2017. Uczestniczki badania zadeklarowały otrzymanie diagnozy insulinooporności średnio $3,07 \pm 2,28$ miesiąca przed udziałem w badaniu. Brakuje danych dotyczących występowania insulinooporności w populacji jako odrębnego zaburzenia, natomiast współwystępowanie PCOS oraz oporności tkanek na działanie insuliny szacowane jest na 35–80% (Amisi 2022). Zgodnie z aktualną wiedzą, podłożem rozwoju PCOS jest insulinooporność, która sprzyja rozwojowi procesów zapalnych w organizmie, a także nasila produkcję i wydzielanie hormonów androgennych. To z kolei prowadzi do hiperandrogenemii lub klinicznych objawów hiperandrogenizmu, w tym hirsutyzmu, będącego składową wrylizacji. Nadmierne owłosienie typu męskiego jest jedną z głównych przyczyn niskiej samooceny wśród kobiet z PCOS, a także istotnym czynnikiem rozwoju zaburzeń neuropsychiatrycznych. Potwierdzają to wyniki badania własnego, w którym kobiety ze zdiagnozowanym PCOS oraz współistniejącą insulinoopornością uzyskały wysokie wyniki w kwestionariuszu BDI-II.

Wśród niemal połowy uczestniczek badania występowały zaburzenia depresyjne, natomiast ⅓ kobiet zgłosiła współistnienie z PCOS niedoczynności tarczycy. Jak wykazali inni badacze, istnieje związek między niedoczynnością tarczycy oraz autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy a depresją (Nuguru i in. 2022). Wynika to z faktu, iż somatostatyna oraz serotonina wpływają na funkcjonowanie osi podwzgórze–przysadka–tarczyca. Stwierdzono również, że niezdiagnozowane lub niedostatecznie leczone pacjentki z niedoczynnością tarczycy wykazują zwiększone ryzyko rozwoju depresji, a występowanie niedoczynności tarczycy należy do głównych przyczyn rozwoju depresji odpornej na leczenie. Wykazano jednak, że terapia lewotyroksyną może łagodzić objawy depresyjne oraz sprzyjać uzyskaniu niższego wyniku w kwestionariuszu BDI-II (Nuguru i in. 2022), co zaobserwowano również w badaniu własnym. Ponad połowa uczestniczek badania regularnie przyjmowała co najmniej jeden lek ($f=0,53$), najczęściej lewotyroksynę lub metforminę. Wszystkie kobiety uwzględniały suplementację witaminą D, co jest zgodne z zaleceniami dla populacji polskiej, natomiast niewiele ponad połowa regularnie przyjmowała kwas foliowy, zalecany kobietom w okresie reprodukcyjnym.

W kwestionariuszu BDI-II blisko ¾ kobiet uzyskało wynik wskazujący na zaburzenia depresyjne, a zatem więcej niż w badaniu przeprowadzonym przez Adamczak i in. 2023 ($f=0,67$ vs. 42,17%). Średnia wartość uzyskanej punktacji wynosiła $17,47 \pm 7,18$ punktu, a zatem porównywalnie z danymi prezentowanymi przez Basirat i in. 2019. To jednak znacznie więcej niż przedstawiono w badaniu Jiskoot i in. 2020, w którym średnia wartość wynosiła 12,17 punktu. Wyniki dotyczące częstości występowania łagodnych zaburzeń depresyjnych ($f=0,33$ vs. 29,40%) oraz ciężkich zaburzeń depresyjnych ($f=0,20$ vs. 16,80%) uzyskane w pracy własnej były zbliżone do wyników przedstawionych przez Basirat i in. 2019. Zaobserwowano jednak znacznie rzadsze występowanie umiarkowanych zaburzeń depresyjnych ($f=0,14$ vs. 27,70%).

Tab. 2. Częstość występowania zaburzeń współistniejących oraz stosowana farmakoterapia i suplementacja wśród badanych kobiet.

Zmienna	Ogółem (n) (f)
Zaburzenie zdrowotne	
insulinooporność	10 (0,67)
zaburzenia depresyjne	6 (0,40)
niedoczynność tarczycy	5 (0,33)
zaburzenia lękowe	4 (0,27)
zespół jelita drażliwego	2 (0,13)
przewlekłe limfocytarne zapalenie tarczycy	1 (0,07)
Farmakoterapia	
lewotyroksyna	5 (0,33)
metformina	4 (0,27)
SSRI*	3 (0,20)
leki uspokajające z grupy benzodiazepin	1 (0,07)
Suplementacja	
witamina D	15 (1,00)
kwask foliowy	9 (0,60)
mio-inozytol lub D-chiro-inozytol	9 (0,60)
probiotyki	6 (0,40)
<i>Mentha spicata</i> ** lub <i>Mentha piperita</i> ***	4 (0,27)
<i>Withania somnifera</i> ****	1 (0,07)
kwasy tłuszczowe n-3	1 (0,07)

*selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny

**mięta zielona

***mięta pieprzowa

****Ashwagandha

Wyniki uzyskane w kwestionariuszu PSQI umożliwiły określenie jakości snu jako złej wśród ponad ¼ badanych kobiet, co potwierdzili w swoich badaniach Benham i in. 2023 oraz Karasu i in. 2021, uzyskując odpowiednio odsetek 79,00% oraz 90,00%. Średni wynik PSQI wśród uczestniczek badania był jednak niemal dwukrotnie wyższy niż w przypadku danych zaprezentowanych przez innych badaczy (Benham i in. 2023; Karasu i in. 2021; Hachul i in. 2019) i wynosił 14,80±7,00 punktu. Co ciekawe, ponad połowa badanych kobiet (f=0,60) subiektywnie oceniła jakość swojego snu jako dobrą lub bardzo dobrą. Średnia długość snu wynosiła 7,20±1,51 godziny, a zatem dłużej niż w przypadku wyników uzyskanych przez Hachul i in. 2019 (5,66±0,19 godziny) oraz Karasu i in. 2021 (6,12±0,27 godziny). Podobnie w przypadku latencji snu uzyskano wyższy średni wynik w porównaniu do danych przedstawionych przez Karasu i in. 2021 (32,73±41,73 minuty vs. 15,90±5,20 minuty). Powyższe dane zaprezentowano w Tab.3.

Średnie wartości wybranych zmiennych wraz z przedziałami ufności dla średniej zaprezentowano w Tab.4. W analizie statystycznej wykazano dodatnią oraz umiarkowanie silną korelację między zaburzeniami depresyjnymi a jakością snu wśród badanych kobiet (Tab.5). Badanie własne umożliwiło zatem potwierdzenie zwiększonej częstości występowania takich zaburzeń neuropsychiatrycznych, jak zaburzenia depresyjne, czy zaburzenia snu wśród kobiet z PCOS, co zostało wykazane uprzednio przez innych badaczy (Adameczak i in. 2023; Basirat i in. 2019; Jiskoot i in. 2020). Wysokie wyniki uzyskane w kwestionariuszach BDI-II oraz PSQI stanowią uzasadnienie dla wdrożenia badań przesiewowych w tej grupie kobiet, a także poszukiwania metod zapobiegania rozwojowi omawianych zaburzeń. Jednocześnie, jak dowiedli Jiskoot i in. 2020, korzystnie we wspomaganie farmakologicznego leczenia zaburzeń depresyjnych mogłoby być wdrożenie

trójelementowej interwencji, złożonej z terapii behawioralno-poznawczej (*cognitive behavioral therapy*, CBT), prawidłowego sposobu żywienia oraz regularnej i dostosowanej do indywidualnych potrzeb aktywności fizycznej. Umożliwiłoby to redukcję nadmiernej masy ciała, uwrażliwienie tkanek na działanie insuliny oraz uzyskanie wsparcia psychicznego, nieodzownego do uzyskania poprawy samooceny i szeroko pojętej jakości życia.

Tab. 3. Interpretacja wyników BDI–II oraz PSQI.

Zmienna	Ogółem (n=15) (f)
Zaburzenia depresyjne	
łagodne	5 (0,33)
umiarkowane	2 (0,14)
ciężkie	3 (0,20)
brak	5 (0,33)
Jakość snu	
dobra	2 (0,14)
zła	13 (0,86)

Tab. 4. Średnie wartości wybranych zmiennych wraz z przedziałami ufności dla średniej.

Zmienna	Średnia	Ufność -95,000%	Ufność +95,000%
wiek [lata]	29,60	26,71	32,49
wskaźnik BMI [kg/m ²]	23,32	20,95	25,68
diagnoza PCOS*	55,67	29,79	81,55
BDI–II	17,47	13,35	21,58
PSQI	14,80	10,79	18,81

*czas od otrzymania diagnozy w miesiącach

Tab. 5. Wyniki analizy statystycznej.

Zmienne	Współczynnik korelacji rang Spearmana	Poziom istotności	Wielkość efektu <i>d</i> Cohena
stan psychiczny i jakość snu	rS=0,49	p>0.05	0,38

Ograniczeniem badania była mała liczebność próby, a także brak dostępu do dokumentacji medycznej, co skutkowało włączaniem do badania pacjentek jedynie na podstawie deklaracji co do uprzedniego zdiagnozowania zespołu policystycznych jajników. Istnieje konieczność przeprowadzenia pogłębionych badań w analizowanym zakresie, aby ocenić związek między zaburzeniami występującymi w ramach PCOS a stanem psychicznym pacjentek, w celu skutecznego przeciwdziałania ich negatywnym konsekwencjom zdrowotnym i psychospołecznym.

4. Wnioski

Zaobserwowano zależność między stanem psychicznym a jakością snu wśród badanych kobiet. Istnieją wskazania do wdrożenia opieki interdyscyplinarnej wśród pacjentek z PCOS, w tym wsparcia psychologicznego oraz badań przesiewowych, aby zapobiegać lub możliwie niezwłocznie diagnozować zaburzenia neuropsychiatryczne, takie jak zaburzenia depresyjne, zaburzenia lękowe, czy zaburzenia snu.

5. Literatura

- Adamczak A, Płotek W, Głowińska A et al. (2023) Time Perspective as a Mediator of Depressive Symptoms in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Healthcare (Basel)* 11(7): 993.
- Al-Jefout M, Alnawaiseh N, Al-Qtaitat A (2017) Insulin resistance and obesity among infertile women with different polycystic ovary syndrome phenotypes. *Scientific Reports* 7: 5339.

- Amisi CA (2022) Markers of insulin resistance in Polycystic ovary syndrome women: An update. *World Journal of Diabetes* 15; 13(3): 129–149;
- Azziz R, Carmina E, Chen Z et al. (2016) Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 11(2): 16057.
- Badzio-Jagiello H, Nowicki Z, Jakitowicz J i in. (1999) Kwestionariusz zaburzeń snu u pacjentów z zaburzeniami psychicznymi – ocena psychometryczna. W: Nowicki Z, Szelenberger W (red.) *Zaburzenia snu. Diagnostyka i leczenie – wybrane zagadnienia*. Kraków: Biblioteka Psychiatrii Polskiej.
- Basirat Z, Faramarzi M, Esmaelzadeh S et al. (2019) Stress, Depression, Sexual Function, and Alexithymia in Infertile Females with and without Polycystic Ovary Syndrome: A Case-Control Study. *International Journal of Fertility & Sterility* 13(3): 203–208.
- Benham JL, Booth JE, Goldfield G et al. (2023) Self-reported sleep quality and exercise in polycystic ovary syndrome: A secondary analysis of a pilot randomized controlled trial. *Clinical Endocrinology* 98(5): 700–708.
- Brutocao C, Zaiem F, Alsawas M et al. (2018) Psychiatric disorders in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine* 62(2): 318–325.
- Cooney LG, Lee I, Sammel MD et al. (2017) High prevalence of moderate and severe depressive and anxiety symptoms in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 1;32(5): 1075–1091.
- Hachul H, Polesel DN, Tock L et al. (2019) Sleep disorders in polycystic ovary syndrome: influence of obesity and hyperandrogenism. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 65(3):375–383.
- Harada M (2022) Pathophysiology of polycystic ovary syndrome revisited: Current understanding and perspectives regarding future research. *Reproductive Medicine and Biology* 21(1): e12487.
- Jiskoot G, Dietz de Loos A, Beerthuizen A et al. (2020) Long-term effects of a three-component lifestyle intervention on emotional well-being in women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A secondary analysis of a randomized controlled trial. *PLoS One* 15(6): e0233876.
- Johnstone EB, Rosen MP, Neril R et al. (2010) The Polycystic Ovary Post-Rotterdam: A Common, Age-Dependent Finding in Ovulatory Women without Metabolic Significance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(11): 4965–4972.
- Karasu AFG, Sahbaz C, Eren ZF et al. (2021) Chronotype and sleep quality assessment of patients with polycystic ovary syndrome. *Haseki Tip Bulteni* 59(1): 53–7.
- Nuguru SP, Rachakonda S, Sripathi S et al. (2022) Hypothyroidism and Depression: A Narrative Review. *Cureus* 14(8): e28201.
- Sengupta S, Jaseem T, Ambalavanan J et al. (2018) Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR 2) in Mild Subclinical Hypothyroid Subjects. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 33(2): 214–217.
- World Health Organization (2010) *Nutrition Landscape Information System (NLIS) country profile indicators: interpretation guide*. ISBN: 9789241599955.
- Zawadzki B, Popiel A, Pragłowska E (2009) Charakterystyka psychometryczna polskiej adaptacji kwestionariusza depresji BDI-II Aarona T. Becka. *Psychologia Etiologia Genetyka* 19: 71–95.
- Zhang J, Ye J, Tao X et al. (2022) Sleep disturbances, sleep quality, and cardiovascular risk factors in women with polycystic ovary syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology* 13: 971604.

10. Oznaczanie zawartości kofeiny w próbkach kawy

Determination of caffeine content in coffee samples

Joanna Kostecka, Jakub Graca, Barbara Dunajska-Gawron, Alicja Habzik, Sabina Mrozek, Jadwiga Nęcza

Śląska Wyższa Szkoła Medyczna w Katowicach

Opiekun naukowy: dr Jadwiga Nęcza

Joanna Kostecka: joanna.kostecka@sws.edu.pl

Słowa kluczowe: kofeina, arabica, robusta, ekstrakcja

Streszczenie

Kofeina to popularny alkaloid występujący w wielu roślinach, odgrywa znaczącą rolę w codziennym życiu ludzi na całym świecie. Najczęściej kojarzona z kawą, jednakże jest obecna również w herbacie, napojach energetycznych, a nawet w niektórych lekach. Jako jeden z elementów kultury i codziennych rytuałów, kofeina wywiera wpływ zarówno na zdrowie fizyczne, jak i na samopoczucie psychiczne. W niniejszym artykule omówiono różnorodność gatunków kawy, ze szczególnym uwzględnieniem *Coffea Arabica* i *Coffea Canephora*, ich smak, zawartość kofeiny oraz wpływ na zdrowie. Analiza dotyczyła ośmiu rodzajów kaw, z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis do określenia zawartości kofeiny. Podczas badań wykazano, że arabica zawiera mniej kofeiny niż robusta. Zawartość kofeiny w naparze zależy również od metody przygotowania kawy.

1. Wstęp

Kawa to jeden z najbardziej znanych napojów na świecie. Jej historia zaczyna się w Etiopii, dawniej nazywanej Abisynią. W Etiopii ludzie używali ziaren kawy, żeby dodać energii i pomóc sobie w walce z zmęczeniem. Ziarna te były szczególnie popularne wśród wojowników, którzy potrzebowali dodatkowej siły przed walką. Z Etiopii kawa trafiła do Arabii, dzisiejszego Jemenu, gdzie otrzymała swoją łacińską nazwę, *Coffea arabica* L. (Dąbrowska-Molenda i in., 2019)

Coffea arabica, to rodzaj rośliny z rodziny Rubiaceae. W tej rodzinie jest około 500 innych rodzajów roślin i ponad 6 tysięcy różnych gatunków. Kawowiec, czyli roślina, z której zbiera się ziarna kawy, ma zielone, błyszczące liście. Kwitnie na biało, a jego kwiaty pachną podobnie do jaśminu. Owoce kawowca na początku są zielone, potem zmieniają kolor na żółty, a gdy są dojrzałe, stają się czerwone, przypominając wyglądem czereśnie (Szwedziak 2018).

2. Gatunki kawy i jej uprawa

Kawa wyróżnia się swoją złożonością oraz różnorodnością gatunków. Dwa główne gatunki kawy, które dominują na rynku światowym to *Coffea Arabica*, znana jako arabika, oraz *Coffea Canephora*, znana jako robusta. Arabika, ceniona za swój delikatniejszy i bardziej złożony profil smakowy, często charakteryzuje się niższą zawartością kofeiny w porównaniu do robusty. Z kolei robusta, znana ze swojego mocniejszego i intensywniejszego smaku oraz wyższej zawartości kofeiny, często jest preferowana w regionach, gdzie kawa ma służyć jako mocny napój pobudzający. Znaczące różnice między tymi dwoma gatunkami wynikają nie tylko z odmiennych profili sensorycznych, ale również z ich różnorodnych wymagań agroklimatycznych, co przekłada się na różne obszary upraw w różnych częściach świata. Zrozumienie tych różnic jest kluczowe dla przemysłu kawowego, począwszy od uprawy, poprzez przetwarzanie, aż po końcowy produkt, który trafia do konsumenta (Żukiewicz-Sobczak i in. 2012).

Arabika może być uprawiana zarówno na nizinach jak i wyżynach (od 0-2500 m n.p.m.), kwitnie po opadach deszczu, a czas dojrzewania owoców to 7-9 miesięcy. Smak po paleniu jest łagodny, średnio kwaśny oraz mało gorzki. Charakteryzuje się mocnym aromatem. Zawartość kofeiny wynosi od 0,7-1,6% co czyni ją łagodniejszą w smaku niż robusta.

Robusta uprawiana jest na nizinach (do 900 m n.p.m.), kwitnie nieregularnie, a czas dojrzewania owoców wynosi od 9-11 miesięcy. Smak po paleniu jest mocny, kwaśny, gorzki. Charakteryzuje się słabym aromatem. Posiada wyższą zawartość kofeiny niż arabika 1,7-4,0%.

Mniej znane odmiany kawy obejmują Arabustę i Liberikę. Arabusta jest hybrydą, która powstała przez skrzyżowanie Arabiki i Robusty. Liberica, z kolei, wzięła swoją nazwę od pierwszego miejsca uprawy – Liberii. Obecnie największe obszary jej upraw znajdują się w Malezji i na Filipinach. Liberica jest znana ze swojego stosunkowo gorzkiego smaku oraz niezbyt intensywnego aromatu (Baran i in. 2021).

Plantacje kawy na nizinnych terenach sprzyjają szybszemu wzrostowi i dojrzewaniu owoców. Jednak wiąże się to z niższą jakością ziaren. Klimat terenów nizinnych sprzyja również szkodnikom, pleśnionom czy pasożytom, a szybki czas dojrzewania sprawia, że ziarno kawy nie ma czasu by w pełni rozwinąć swój smak. W rezultacie taka kawa jest bardziej gorzka, kwaśna, o słabym bukacie smakowym. Plantacje wyżynne położone od 900 do 2500 m n.p.m. są mniej opłacalnymi z punktu widzenia ekonomicznego, gdyż wzrost roślin oraz dojrzewanie owoców przebiega znacznie wolniej. To jednak czas sprawia, że smak kawy uprawianej na terenach wyżynnych jest bardziej wyrafinowany o nieporównywalnie delikatnej goryczce. Na tych wysokościach uprawiana jest jedynie arabika (Baran i in. 2021).

3. Wpływ spożycia kawy na zdrowie

Kawa, będąca nie tylko popularnym napojem, ale i przedmiotem intensywnych badań naukowych, zawdzięcza swoje unikalne właściwości głównie obecności kofeiny, która jest naturalnie występującym alkaloidem purynowym (1,3,7-trimetyloksantyna). Alkaloid ten, znany jest ze swoich stymulujących efektów na układ nerwowy człowieka. Kofeina jest wchłaniana w jelicie cienkim, a jej absorpcja jest wolniejsza, gdy jest spożywana wraz z pokarmem. Najbardziej efektywne wchłanianie kofeiny następuje, gdy znajduje się ona w gumie do żucia. Kofeina szybko przenika przez barierę krew-mózg, co tłumaczy jej szybkie działanie na ośrodkowy układ nerwowy. Należy podkreślić, że kofeina ma niski stopień ekstrakcji przez wątrobę, co pozwala jej łatwo dostawać się do krwiobiegu. Okres półtrwania kofeiny w organizmie, przy dawkach mniejszych niż 10 mg/kg ciała wynosi około godziny, a dla większych dawek może osiągać nawet 4 godziny (Surma et al. 2020).

Kawa zawiera około 1000 różnych substancji roślinnych, z których wiele wykazuje wysoką aktywność biologiczną. Spożycie kawy i zawartej w niej kofeiny w umiarkowanych ilościach może przynieść korzystne efekty zdrowotne, w tym obniżenie ryzyka wystąpienia wielu chorób przewlekłych. Badania epidemiologiczne wskazują, że konsumpcja kawy może zmniejszać ryzyko chorób układu krążenia, cukrzycy typu 2, otyłości, oraz niektórych nowotworów, w tym raka jelita grubego i piersi. Ponadto, kawa wykazuje działanie neuroprotektyjne, zmniejszając ryzyko chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona i Alzheimera. Kawa zawiera kofeinę, kwas chlorogenowy i inne związki bioaktywne, które wpływają na różne aspekty metabolizmu i funkcji organizmu. Chociaż kawa może wywierać niekorzystny wpływ na wchłanianie niektórych minerałów i ryzyko osteoporozy przy spożyciu w dużych ilościach, umiarkowana jej konsumpcja, oceniana na 3–4 filiżanki dziennie, jest uznawana za bezpieczną i korzystną dla zdrowia (Pelczyńska i in. 2019).

Publikacje naukowe potwierdzają pozytywne działanie kawy na zdrowie. Badania wykazały, że picie kawy wiąże się z obniżonym ryzykiem wystąpienia szeregu schorzeń, w tym chorób neurodegeneracyjnych, śmierci spowodowanej problemami mózgowymi i sercowo-naczyniowymi, różnych rodzajów nowotworów, takich jak rak endometrium, rak prostaty, białaczka, czerniak i raki skóry nieczerniakowe, rak jamy ustnej oraz wątroby. Zauważono również korzyści w przypadku innych schorzeń wątroby, w tym niealkoholowego stłuszczenia wątroby, zwłóknienia i marskości wątroby, a także cukrzycy typu 2 i zespołu metabolicznego. Jednakże, zaleca się unikanie kawy przez osoby z problemami żołądkowymi, takimi jak refluks żołądkowo-przełykowy, choroba wrzodowa czy ostry niezbyt żołądka, a także przez kobiety w ciąży i karmiące piersią, ze względu na brak wystarczających badań dotyczących bezpieczeństwa w tych grupach (Olechno et al. 2021).

4. Sposoby przygotowywania kawy

Kawa może być przygotowana na wiele różnych sposobów. Każda metoda parzenia ma swoje unikatowe cechy, które wpływają na smak, aromat, a nawet na właściwości zdrowotne kawy. Wśród najważniejszych czynników mających wpływ na ostateczny profil smakowy naparu znajdują się metoda parzenia, stopień zmielenia ziaren, czas ekstrakcji, ilość i temperatura wody, a także ciśnienie pary w przypadku kawy espresso.

Jedną z najbardziej tradycyjnych metod jest zaparzenie kawy w dzbanku przelewowym. Dzięki tej technice można uzyskać łagodniejszy napar, co wynika z dłuższego czasu kontaktu wody z kawą. Inną popularną metodą, French Press, pozwala na ekstrakcję intensywniejszych smaków dzięki zanurzeniu grubo zmielonych ziaren w gorącej wodzie.

Z kolei kawa przygotowana przy użyciu metody przelewowej, takiej jak dripper, charakteryzuje się większą klarownością i subtelnością smaku. Dzięki precyzyjnemu kontrolowaniu przepływu wody przez filtr, kawa ta jest delikatniejsza i mniej gorzka.

W przypadku kawy espresso, kluczowym elementem jest wysokie ciśnienie, które pozwala na ekstrakcję intensywnych aromatów i smaków z drobno zmielonych ziaren. To ciśnienie, w połączeniu z krótkim czasem ekstrakcji, daje gęstą, koncentrowaną napar.

Innowacyjne metody, takie jak Aeropress, łączą elementy różnych technik, pozwalając na eksperymentowanie z czasem parzenia, ciśnieniem i temperaturą, aby uzyskać różnorodność smaków. Natomiast dzbanek neapolitański, klasyczny dla włoskiej kultury kawowej, pozwala na przygotowanie kawy o bogatym aromacie, będącej pośrednią między espresso a kawą przelewową.

Wszystkie te metody oferują różne doznania smakowe i aromatyczne, a wybór odpowiedniej techniki zależy od indywidualnych preferencji oraz od charakterystyki użytych ziaren kawy (Dąbrowska-Molenda i in., 2019).

5. Materiał i Metody

Kluczowym elementem pracy jest analiza zawartości kofeiny w wybranych kawach naturalnych. Współczesne metody analizy chemicznej pozwalają na dokładne określenie zawartości kofeiny w różnych gatunkach kawy, co ma istotne znaczenie zarówno dla przemysłu kawowego, jak i dla konsumentów.

Materiał badawczy stanowiły kawy naturalne. Analizie poddano osiem rodzajów kaw naturalnych zakupionych na terenie województwa śląskiego. W przeważającej części były to kawy o niższej cenie. Tylko dwie z nich (próbki 6 i 8) stanowiły tzw. „średnią półkę cenową”. Większość producentów nie zamieszcza informacji o kraju pochodzenia kawy, a także o gatunkach. Kawa nr 6 to arabika, kawa nr 8 jest mieszanką arabiki i robusty natomiast kawy 5 i 7 są również mieszankami, ale w tych przypadkach producenci nie podali informacji jakie gatunki kaw wchodzi w skład tych mieszanek. Dla pozostałych próbek nie zamieszczono informacji o gatunku kawy (Tab.1.).

Tab.1. Charakterystyka badanych próbek kaw.

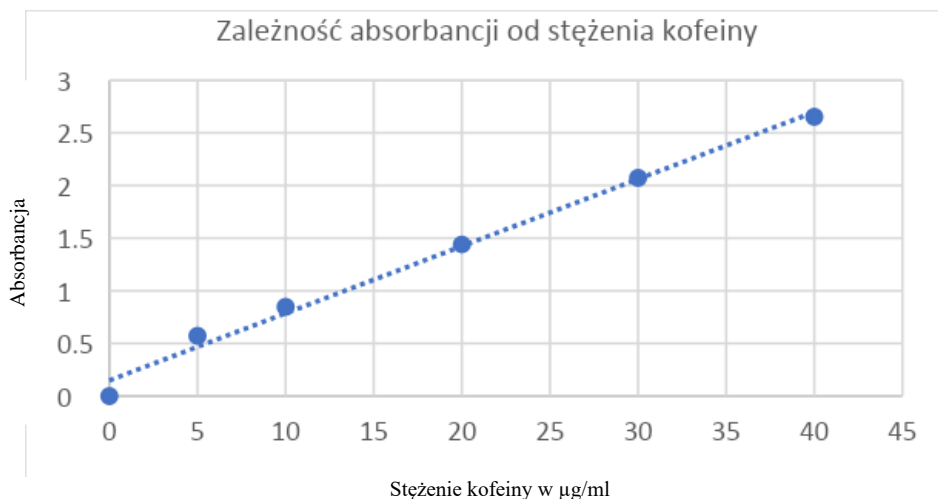
Lp.	Kraj pochodzenia	Gatunek kawy
1	Brak danych	Brak danych
2	Brak danych	Brak danych
3	Brak danych	Brak danych
4	Brak danych	Brak danych
5	Brak danych	mieszanka
6	Brak danych	100% Arabica
7	Afryka, Azja, Ameryka południowa	mieszanka
8	Brak danych	Arabica i Robusta

Zawartość kofeiny oznaczono z zastosowaniem spektrofotometru UV-Vis przy długości fali wynoszącej 276nm i odpowiadającej maksimum absorbancji dla kofeiny. Odważono próbki kawy o masie 0,2 g i zalano 100 ml wrzącej wody. Kawę zaparzano pod przykryciem przez 30 minut, następnie napary przesączono. Do analizy pobrano 10 ml naparu kawowego doprowadzając go wcześniej do pH=12 przy użyciu wodorotlenku sodu. Wykonano trzykrotną ekstrakcję naparu

używając do tego chloroformu 10 ml/ 5ml/ 5ml. Kofeinę oznaczono w ekstrakcie chloroformowym używając spektrofotometru UV-Vis firmy Biobase.

6. Wyniki

Wyniki obliczono w oparciu o wykonaną wcześniej krzywą wzorcową o równaniu: $y=0,0637x+0,1494$, przygotowaną dla roztworów o stężeniach 5, 10, 20, 30 i 40 $\mu\text{g/ml}$. Wyznaczona krzywa została przedstawiona na rycinie 1 (Rys.1).



Rys.1. Wykres zależności absorbancji od stężenia kofeiny.

Wyniki z przeprowadzonych badań zostały przedstawione w Tab. 2.

Tab.2. Zawartość kofeiny w próbkach kawy

Lp.	Zawartość kofeiny w kawie [mg/100g]
1	1033,12
2	803,14
3	700,31
4	1074,73
5	1053,53
6	132,03
7	537,83
8	354,16

Zaprezentowane wyniki przedstawiają znacznie mniejszą zawartość kofeiny w próbkach 6 i 8 czyli w próbkach zawierających w składzie kawę arabikę. Próbka nr 6 zawiera 100% arabiki i w prezentowanych wynikach zawartości kofeiny posiada najniższą wartość. Inne badane gatunki kawy prezentują wyższą zawartość kofeiny, co pozwala przypuszczać, że zawierają w składzie kawę robustę, gdyż ta charakteryzuje się wyższą zawartością kofeiny.

7. Dyskusja

W przeglądzie dostępnych badań naukowych porównano uzyskane wyniki z wynikami innych naukowców.

W badaniu Caracostea et al. stwierdzono, że zawartość kofeiny w ziarnach zielonej kawy robusta i arabica z Indii wynosi odpowiednio 182 mg/100g i 154 mg/100g, potwierdzając wyższą zawartość kofeiny w kawie Robusta (Caracostea, et al., 2021). Jest to zgodne z uzyskanymi wynikami przedstawionymi w tabeli (Tab.2). Podobne wyniki uzyskano w badaniu Adnan i wsp. (2020). Różne

gatunki kawy mogą mieć różne stężenia kofeiny. Badanie ziaren kawy arabika i robusta z Indonezji ujawniło różnice w zawartości kofeiny i kwasu chlorogenowego między tymi dwoma gatunkami (Adnan, et al., 2020). Olechno et al. przeanalizowali wpływ różnych czynników na zawartość kofeiny w parzonej kawie, w tym wpływ gatunków kawy, czasu parzenia, temperatury wody i ciśnienia. Stwierdzili, że zawartość kofeiny może się znacznie różnić w zależności od wybranej metody parzenia i gatunku kawy stwierdzając również, że kawa Robusta charakteryzuje się wyższą zawartością kofeiny (Olechno i in., 2021).

Bobková et al. (2022) sugerują, że region pochodzenia może wpływać na zawartość kofeiny w kawie arabica. To wskazuje na to, że poza gatunkiem kawy, również jej pochodzenie geograficzne może być istotnym czynnikiem determinującym zawartość kofeiny. Na opakowaniach kaw badanych na potrzeby niniejszej pracy producenci w większości nie zamieścili informacji dotyczących regionu pochodzenia ziaren. Taka informacja widniała tylko na opakowaniu kawy w próbce nr 6 (Afryka, Azja, Ameryka południowa). Trudno więc w tym wypadku odnieść uzyskane wyniki badań do wyników innych naukowców.

Biorąc pod uwagę zalecane limity spożycia kofeiny, ważne jest, aby konsumenci byli świadomi zmienności zawartości kofeiny w różnych rodzajach kawy. Badanie Manolis et al. (2021) podkreśla, że umiarkowane spożycie kofeiny (mniej niż 300-400 mg/dzień) jest uznawane za bezpieczne.

Porównując uzyskane wyniki z wynikami z innych źródeł naukowych, można zauważyć, że zawartość kofeiny w kawie jest zmienna i zależna od wielu czynników, takich jak gatunek kawy, sposób jej przygotowania oraz warunki uprawy. Zauważono również, że kawa arabika charakteryzuje się niższą zawartością kofeiny w porównaniu z kawą robustą, co jest zgodne z wynikami aktualnych badań naukowych. Autorzy badań naukowych również często podkreślają, że metoda parzenia ma istotny wpływ na zawartość kofeiny w naparze.

8. Wnioski

Kawa arabika charakteryzuje się niższą zawartością kofeiny w porównaniu z kawą robustą. Potwierdzają to wyniki przeprowadzonych badań lecz wyłącznie dla kawy arabiki, gdyż dla innych próbek producenci nie podają gatunku kawy.

W świetle wyników badania, ważne jest, aby producenci kawy umieszczali na opakowaniach szczegółowe informacje na temat gatunku kawy oraz kraju pochodzenia. Takie informacje pozwalają na szczegółową interpretację wyników badań.

Sposób parzenia kawy ma decydujący wpływ na jej walory smakowe, aromat oraz skład biochemiczny.

9. Literatura

- Adnan, A., Naumann M., Mörlein, D. i in. (2020) Reliable discrimination of green coffee beans species: A comparison of UV-Vis-based determination of caffeine and chlorogenic acid with non-targeted near-infrared spectroscopy. *Foods*, 9(6), 788.
- Babova, O.; Occhipinti A.; Maffei M. (2016) Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (Coffea arabica and Coffea canephora) of different geographical origin. *Phytochemistry*, 123, 33–39.
- Baran J., Kubit P. (2021) Kawa i jej prozdrowotne właściwości, *Herbalism*, 2021, 1(7), s. 19–30.
- Bobková A., Poláková K., Demianová A. et al. Comparative Analysis of Selected Chemical Parameters of Coffea arabica, from Cascara to Silverskin. *Foods*. 2022; 11(8):1082.
- Caracostea L.-M., Sîrbu R., Buşuricu F. (2021) Determination of caffeine content in Arabica and Robusta green coffee of indian origin, *European Journal of Natural Sciences and Medicine*, Volume 4, Issue 1.
- Dąbrowska-Molenda M., Szwedziak K., Zabłudowska Ż. (2019), Analiza zawartości kofeiny w wybranych rodzajach kawy, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 68-71.
- Gaibor J.; Morales D.; Carrillo W., (2020) Determination of caffeine content in robusta roasted coffee (*Coffea canephora*) by RP-UHPLC-PDA. *Asian J. Crop Sci.*

- Illy E.; Navarini L. (2011) Neglected food bubbles: The espresso coffee foam; *Food Biophys*, 6, 335–348.
- Ludwig I.A.; Mena P.; Calani et al. (2014) Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: What are we drinking? *Food Funct.*, 5, 1718–1726.
- Manolis A. Antonis, Manolis A. Theodora , Apostolopoulos J. Evdoxia ,et al. , The Cardiovascular Benefits of Caffeinated Beverages: Real or Surreal? “Metron Ariston - All in Moderation”, *Current Medicinal Chemistry* 2022; 29 (13)
- Olechno E., Puścion-Jakubik A., Zujko M., et al. (2021) Influence of Various Factors on Caffeine Content in Coffee Brews *Foods Jun*; 10(6)
- Pelczyńska M., Bogdański P. (2019) Prozdrowotne właściwości kawy; *Varia Medica* 2019
- Rao N.Z.; Fuller M.; Grim M.D.(2020) Physiochemical characteristics of hot and cold brew coffee chemistry: The effects of roast level and brewing temperature on compound extraction; *Foods*, 9, 902.
- Salamanca C.A.; Fiola, F.; González C. et al. (2017) Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso. *Food Chem.*, 214, 622–630.
- Surma S., Romańczyk M., Fojcik J. i in.(2020) Kawa — lekarstwo, używka i narkotyki; *Psychiatria* tom 17, nr 4, 237–246
- Szwedziak W., Polańczyk E., Kuźel M. (2018) Wpływ technologii produkcji kawy typu arabica i robusta na ich jakość sensoryczną. *Postępy techniki przetwórstwa spożywczego*. 1/2018 30-33
- Tjahjani N. P., Chairunnisa A., & Handayani H. (2021). Analisis perbedaan kadar kafein pada kopi bubuk hitam dan kopi bubuk putih instan secara spektrofotometri UV-Vis. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 5(1), 52-62. tom 3, nr 4, strony 311–317.
- Woźniczko M.; Orłowski D. (2019) Profesja baristy i specyfika jego pracy w branży kawiarnianej na rynku horeca w Polsce. *Zeszyty Naukowe. Turystyka i Rekreacja.*, 1 , 185–202
- Żukiewicz-Sobczak W., Krasowska E., Sobczak P., i in. (2012) Wpływ spożycia kawy na organizm człowieka. *Med Og Nauk Zdr.*; 18(1): 71-76.

11. Oznaczanie zawartości kofeiny w próbkach herbaty

Determination of caffeine content in tea samples

Jakub Graca, Joanna Kostecka, Robert Polok, Barbara Gawron, Alicja Habzik, Sabina Mrozek, Bernadeta Nowak, Jadwiga Nęcza

Śląska Wyższa Szkoła Medyczna w Katowicach

Opiekun naukowy: dr Jadwiga Nęcza

Jakub Graca: kubagraca9900@op.pl

Słowa kluczowe: kofeina, polifenole, zielona herbata, epigallokatechina.

Streszczenie

Herbata pochodząca z krzewu *Camellia sinensis* jest poddawana różnym procesom produkcji, dając różnorodne jej rodzaje: zieloną, czarną, czerwoną, żółtą i białą. Proces zbioru obejmuje selektywne zrywanie dwóch najwyższych liści i pączka, gwarantujące najwyższą jakość. Ekstrakty z herbaty, bogate w polifenol epigallokatechinę (EGCG), wykazują właściwości prozdrowotne. Badania sugerują, że EGCG może być skuteczny w terapii białaczek, zwłaszcza przy współdziałaniu z cytostatykiem etopozydem. Stężenia 50 i 100 μM EGCG eliminują komórki białaczki szpikowej, wzmacniając jednocześnie cytotoxyczność etopozydu.

1. Wstęp

Herbata, będąca jednym z najstarszych i najbardziej popularnych napojów na świecie, stanowi istotny element wielu kultur i tradycji. Jej wyjątkowy smak, aromatyczny bukiet oraz różnorodność odmian sprawiają, że herbata nie tylko cieszy się uznaniem jako napój ale także staje się źródłem inspiracji dla wielu rytuałów społecznych i artystycznych. Przez wieki herbata ewoluowała z prostego napoju do symbolu gościnności, medytacji, a nawet sztuki kulinarno-ziołowej. W dzisiejszym zglobalizowanym społeczeństwie, herbatę spożywa się na całym świecie, zarówno w tradycyjnej, jak i nowoczesnej formie. Jej różnorodność obejmuje klasyki, takie jak chińska zielona herbata czy brytyjski Earl Grey, po nowatorskie kompozycje smakowe i funkcjonalne mieszanki ziołowe. Jednak jednym z najważniejszych składników, który nadaje herbatce nie tylko smak, ale także charakter pobudzający, jest kofeina. Wraz z kofeiną, herbata jest również bogatym źródłem naturalnych związków, takich jak epigallokatechina. Jej właściwości przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne i przeciwzapalne stawiają ją w centrum zainteresowania w kontekście badań naukowych.

2. Charakterystyka herbaty

Herbata jest uprawiana w ponad trzydziestu krajach na całym świecie, a najwcześniejsze informacje o jej uprawie pochodzą z Chin i Indii około 2000 lat przed naszą erą. Na początku IX wieku herbata dotarła do Japonii, a w pierwszej połowie XIX wieku została rozpowszechniona na Jawie, Sumatrze, w Wietnamie, na Cejlonie w Gruzji. Później uprawa rozszerzyła się także na Afrykę i Amerykę Południową. Tradycja spożywania zielonej herbaty ma więc już 4000 lat. Początkowo używano jej głównie w celach leczniczych. W Japonii odkryto, że zielona herbata może być pomocna w leczeniu 61 różnych schorzeń. Jej właściwości obejmują poprawę koncentracji, wzmocnienie odporności, obniżenie poziomu cholesterolu, wsparcie procesów metabolicznych oraz leczenie infekcji. Chińska medycyna traktowała zieloną herbatę jako środek poprawiający krążenie krwi, oczyszczający organizm, wzmacniający odporność oraz łagodzący problemy ze stawami. W dzisiejszych czasach herbata jest najczęściej spożywanym naparem na całym świecie (Arte i in. 2016).

Herbata, należąca do rodziny herbatowatych (*Theaceae*), wywodzi się z jednego gatunku krzewu herbacianego o nazwie *Camellia sinensis*. Istnieją dwie główne odmiany: *Camellia sinensis*

var. sinensis oraz *Camellia sinensis var. assamica*. Odmiana *sinensis* jest powszechnie uprawiana, zwłaszcza w klimacie umiarkowanym, osiągając wysokość do 6 metrów i charakteryzując się liśćmi o rozmiarze 5-12 centymetrów. Z kolei odmiana *assamica* występuje m.in. w Indiach w formie dzikiej, osiągając wysokość do 15 metrów, a długość liści do 20 centymetrów. W zależności od regionu, w którym rosną krzewy herbaciane, istnieje wiele różnych odmian, a najbardziej aromatyczne występują na południowych stokach Himalajów (Stańczyk 2010; Stańczyk i in. 2008).

3. Zbiory

Proces zbioru herbaty trwa kilka tygodni i obejmuje zrywanie jedynie dwóch najwyższych liści i pączka z krzewu, co ma zagwarantować najwyższą jakość (Hicks 2009). W zależności od lokalizacji, liście z krzewów mogą być zbierane przez kilka miesięcy w ciągu roku, a nawet przez cały rok. Okres od posadzenia krzewu do czasu zbiorów wynosi od 4 do 5 lat (Miazga-Sławińska i Grzegorzczak 2014). Osoba odpowiedzialna za zbieranie liści umieszcza je w wiklinowym koszu na plecach, a gdy nazbiera 20-30 kg liści, kosz ten zostaje przetransportowany do fabryki. Proces przetwarzania liści herbaty w fabryce obejmuje etapy takie jak suszenie, rolowanie, fermentacja, opalanie i pakowanie. Kluczowym etapem w produkcji herbaty jest fermentacja (utlenianie), ponieważ to właśnie ona wpływa na ostateczną jakość herbaty (Hicks 2009). Ten etap ma również wpływ na obniżenie poziomu garbników, a także uwalnianie kofeiny i olejków eterycznych. Przed finalnym pakowaniem herbata jest sortowana ze względu na wielkość suszu za pomocą sit. Każdy rodzaj herbaty podlega innemu procesowi produkcji, zgodnie z badaniami Miazgi-Sławińskiej i Grzegorzczaka (2014).

4. Rodzaje herbat

Proces przetwarzania świeżych liści herbaty determinuje rodzaj otrzymanej herbaty. Istnieją różne rodzaje, takie jak czarna, charakteryzująca się ciemną esencją zwaną fermentowaną, czerwona, częściowo fermentowana, zielona oraz biała z liści niepoddawanych procesowi fermentacji. Napar z zielonej herbaty charakteryzuje się jasnym kolorem oraz zapachem ziołowym. Kluczowym celem przy produkcji zielonej herbaty jest zapobieżenie fermentacji liści, która w rzeczywistości polega na cyklu złożonych przemian enzymatycznych. Proces ten rozpoczyna się poprzez uaktywnienie oksydazy polifenolowej, enzymu obecnego w liściach, za pomocą mechanicznego przerwania struktury liścia. Następnie liście poddawane są działaniu podwyższonej temperatury w celu dezaktywacji enzymów, a na końcu zachodzi proces suszenia. Dezaktywacji ulegają również enzymy odpowiadające za rozkład barwnego pigmentu w liściach, co sprawia, że zielona herbata zachowuje swoją charakterystyczną barwę (Całka i in. 2008; Miazga-Sławińska i Grzegorzczak 2014).

Skład chemiczny suchych świeżych liści zielonej herbaty obejmuje różne składniki, takie jak polifenole (36%), węglowodany (25%), białka (15%), aminokwasy (4%), alkaloidy purynowe (3,5%), lipidy (3%), kwasy organiczne (1,5%), chlorofil (0,5%), karotenoidy i substancje lotne (0,1%). Ten skład może się różnić w zależności od odmiany krzewu, miejsca uprawy, co wpływa na biologiczne działanie herbaty, jej zalety smakowe oraz zapach (Artc i in. 2016).

Herbaty, takie jak biała, zielona, żółta, czerwona i czarna, podlegają różnym procesom produkcji, jak opisują naukowcy (Miazga-Sławińska i Grzegorzczak 2014). Istnieją dwa przekonania co do określenia "biała herbata". Według jednego z nich Chińczycy określenie to rezerwują tylko dla dwóch odmian herbaty, *Camellia sinensis var. Khenghe bai hao* i *Camellia sinensis var. fudin bai hao*, rosnących w prowincji Fujian. Inne kraje, produkujące białą herbatę, rozumieją ją jako herbatę z pąków i pierwszych liści zrywanych na wiosnę i suszonych niezależnie od gatunku herbaty (Miazga-Sławińska i Grzegorzczak 2014; Hicks 2009).

Herbatę białą uzyskuje się z wiosennych pąków liściowych, które poddawane są ogrzewaniu parą wodną w celu inaktywacji enzymów, a następnie suszeniu. Ten proces nadaje napojowi słomkową barwę, delikatny smak i aromat, dzięki mniejszej zawartości garbników. Analiza popularnych herbat białych dostępnych w Polsce wykazała ich wysoką jakość. Zawierają one od 4 do 8% wody, około 5-6% popiołu, 26-30% białka, 15-21% garbników i 5-11% tłuszczu. Badane herbaty wykazywały także silne właściwości przeciwutleniające. Herbaty białe zawierają około dwukrotnie

więcej kofeiny niż herbaty zielone i około czterokrotnie więcej niż herbaty czarne, co nadaje im orzeźwiający smak i bardziej pobudzające działanie (Świdorski i Waszkiewicz-Robak 2012).

Herbata zielona, jest popularna głównie w Chinach i Japonii. Jej produkcja obejmuje parowanie lub prażenie liści w celu inaktywacji enzymów, a następnie suszenie. Otrzymany napój charakteryzuje się oliwkowo-zieloną barwą i różnymi odcieniami ekstraktu. Zawiera różnorodne związki fenolowe, takie jak flawanole, flawony, flawonole, a także alkaloidy purynowe, aminokwasy (Hicks 2009; Świdorski i Waszkiewicz-Robak 2012).

Herbata żółta, znana również jako herbata cesarska, była pierwotnie spożywana jedynie na dworze cesarskim w Chinach i używana w wybranych ceremoniach religijnych. Otrzymuje się ją z najmłodszych pędów, a proces zwiędnięcia liści obejmuje niepełną fermentację, co nadaje napojowi delikatny kolor i subtelny aromat (Miazga-Sławińska i Grzegorzczak 2014, Hicks 2009).

Herbata czerwona uznawana jest za najbardziej aromatyczną, o korzennym smaku i charakterystycznym zapachu. Poddaje się ją lekkiej fermentacji, przerywanej, gdy listki stają się lekko czerwone. Pu-erh to jedna z najbardziej znanych herbat czerwonych, pochodząca z Chin, poddawana dodatkowej fermentacji i leżakowaniu, co pozwala na przechowywanie jej nawet przez 50 lat (Hicks 2009).

Herbata czarna uzyskiwana jest z liści, pączków i łodyżek *Camellia sinensis*. Istnieje kilka metod produkcji, w tym metoda ortodoksyjna, metoda CTC, proces "Legg-cut" i inne, które obejmują różne etapy wędnięcia, zwijania, fermentacji i suszenia liści (Świdorski i Waszkiewicz-Robak 2012).

Przed przystąpieniem do parzenia herbaty, należy najpierw ogrzać naczynie, w którym herbata będzie parzona. Wykonywane jest to poprzez wlanie wrzątku do naczynia, a po nagrzanu woda jest wylewana. Do nagrzanego naczynia wsypuje się liście herbaty i zalewa się wodą. W zależności od gatunku herbaty używa się innego rodzaju naczynia. Na przykład parząc zieloną herbatę, powinno się używać przezroczystego dzbanka, aby kontrolować, czy liście są jeszcze świeże. Czarną herbatę najlepiej zaparzać w naczyniu glinianym, ceramicznym lub porcelanowym, ponieważ zachowuje on wtedy swoje walory smakowe i zapachowe (Wu L 2013). Wstępnego przygotowania wymagają również same liście herbaty. Zanim rozpocznie się zaparzenie, należy ją przepłukać. Robi się to wlewając gorącą wodę do naczynia z liśćmi herbaty i bardzo szybko ją wylać. Tak przygotowane liście można już zaparzać. Smak, zapach i moc herbaty, zależy m.in. od czasu parzenia i jej temperatury. Na przykład herbatę zieloną należy parzyć w temperaturze od 80 do 85°C przez okres od 2 do 3 minut. Wyższa temperatura mogłaby negatywnie wpłynąć na jej pożyteczne składniki (Wu L 2013). Czas i sposób parzenia herbaty ma także wpływ na zawartość kofeiny. Gotowy napar może jej zawierać od 14 do 65 mg. Szklanka czarnej herbaty ekspresowej, która była parzona przez 15 sekund, zawiera około 15 mg kofeiny. Jeśli zwiększymy czas parzenia do 1 minuty, to średnia ilość kofeiny wzrasta do 22 mg. Herbata parzona przez 5 minut, ma już jej średnio 38 mg (Wierzejska 2012).

5. Działanie herbaty na organizm człowieka

Herbata, gdy jest spożywana w umiarkowanych ilościach, stanowi bezpieczny napój prozdrowotny. Potencjalne negatywne skutki mogą wystąpić jedynie przy nadmiernym spożyciu herbaty w diecie. Wynikają głównie z nadmiernego spożycia kofeiny oraz zdolności polifenoli zawartych w herbacie do wiązania żelaza niehemowego, co ogranicza jego wchłanianie w przewodzie pokarmowym nawet o 79%. Szczególnie taniny, będące polifenolami w herbacie czarnej, silnie hamują absorpcję żelaza w porównaniu do katechin obecnych w herbacie zielonej. Osoby z niedokrwistością z niedoboru żelaza lub narażone na ryzyko rozwoju anemii powinny unikać spożywania herbaty, zwłaszcza czarnej, szczególnie w trakcie posiłków. Z drugiej strony, herbatę czarną zaleca się w diecie osób z hemochromatozą, która charakteryzuje się nadmiernym gromadzeniem żelaza w organizmie (Wierzejska 2014).

Pod względem zawartości kofeiny, bezpieczne spożycie herbaty zależy od ogólnej konsumpcji innych produktów kofeinowych, takich jak kawa, napoje typu cola czy napoje energetyzujące. Według obecnej wiedzy, zdrowi dorośli powinni ograniczyć dzienne spożycie kofeiny do 400 mg. Przy braku innych źródeł kofeiny w diecie, osoba dorosła mogłaby spożywać nawet kilkanaście porcji herbaty (Wierzejska 2014).

Zdaniem niektórych ekspertów, maksymalne spożycie czarnej herbaty nie powinno przekraczać 8 filiżanek dziennie. Wynika to z zawartości kofeiny i jej właściwości moczopędnych, oraz potencjalnie niekorzystnego wpływu na pulę żelaza w organizmie. Wyniki badań w tym obszarze są obiecujące, ale ich interpretacja wymaga rozważenia, ponieważ skład naparu herbaty jest warunkowany przez wiele czynników. Chociaż rośnie zainteresowanie dodawaniem ekstraktów z herbaty do żywności funkcjonalnej, to ostateczne dowody na to, który rodzaj herbaty jest najbardziej korzystny i w jaki sposób wpływa na organizm, wymagają dalszych badań naukowych (Wierzejska 2014).

Herbata, dzięki swojemu bogatemu składowi, od wieków znajduje zastosowanie nie tylko w przemyśle spożywczym, ale także w kosmetyce. Liście zielonej herbaty stanowią wartościowe źródło substancji o właściwościach przeciwutleniających, co sprawia, że są powszechnie wykorzystywane w produkcji kosmetyków, zwłaszcza tych przeciwstarzeniowych, łagodzących podrażnienia, zabezpieczających przed promieniami UV oraz działających przeciwobrzękowo (Pytkowska 2002).

Zawartość zielonej herbaty obejmuje polifenolowe związki, takie jak flawonole, flawonoidy, proantocyjanidy, kwasy fenolowe. Głównym składnikiem tych polifenoli są wspomniane wcześniej katechiny. Te związki korzystnie wpływają na mikrokrążenie skórne, przez co zmniejszają ryzyko powstawania mikrozakrzepów. Dodatkowo wykazują działanie przeciwzapalne, hamują rozwój mikroorganizmów oraz mają pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy (Perucka 2001; Pytkowska 2002). Spośród znanych katechin wyróżnia się galusan epigallokatechiny (EGCG). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że EGCG - główny składnik zielonej herbaty, może być korzystny w leczeniu białaczki, zwłaszcza przy zastosowaniu cytostatyku, takiego jak etopozyd. Obiecujące rezultaty uzyskano przy stężeniach 50 i 100 μM EGCG, które skutkowały eliminacją komórek przewlekłej białaczki szpikowej. Co więcej, w połączeniu z cytostatykiem, EGCG wzmacniał jego właściwości cytotoksyczne. Skuteczność synergii między EGCG a etopozydem na komórkach K562 została potwierdzona również przez zwiększenie odsetka komórek z uszkodzonymi DNA. Co istotne komórki, które nie zostały wyeliminowane przez cytotoksyczne działanie etopozydu i EGCG, wydają się być ukierunkowane na apoptozę, co potwierdzają wyniki badań. Obserwowany wzrost liczby komórek apoptotycznych po działaniu EGCG i etopozydu to proces nieodwracalny, nazywany "późną apoptozą" (Cierniak i in. 2018).

6. Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiło 10 próbek herbat najczęściej obecnych w sprzedaży na rynku spożywczym. Herbaty zakupiono w lokalnych sklepach na terenie województwa śląskiego. Większość z nich stanowiły herbaty czarne, ale była również jedna herbata zielona. Krótką charakterystykę badanych herbat przedstawiono w Tab.1.

Tab.1. Charakterystyka badanych herbat.

Lp.	Rodzaj herbaty	Kraj pochodzenia
1	Herbata czarna	Kenia
2	Ekologiczna herbata czarna	Cejlon
3	Mieszanka herbat czarnych	Kenia
4	Herbata czarna liściasta	Indie
5	Herbata zielona z imbirem	Indie
6	Herbata czarna	Cejlon
7	Mieszanka herbat czarnych	Nieokreślony
8	Herbata czarna	Kenia
9	Herbata czarna liściasta	Chiny
10	Herbata czarna	Nieokreślony

Oznaczenie kofeiny przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 276nm. Zastosowano spektrofotometr UV-Vis firmy Biobase oraz kuwety kwarcowe firmy Medson. Wykonano krzywą kalibracyjną dla roztworów o stężeniach 5; 10; 20; 30; 40 i 50 µg/ml, używając do ich przygotowania kofeiny firmy POL-AURA nr partii: 17091536. Równanie krzywej wyznaczono przy zastosowaniu programu Excel i przyjęło ono postać: $y = 0,052x + 0,4973$. W oparciu o równanie krzywej obliczono stężenia kofeiny w poszczególnych herbatkach.

Na wadze analitycznej odważono po 0,5 g każdej z kilku rodzajów herbat. W celu sprawdzenia wiarygodności badań z każdej z herbat wykonano dwie próbki równoległe. Każdą z próbek zalano 100 ml wrzącej wody destylowanej i pozostawiono pod przykryciem na 30 minut. Po tym czasie próbki przesączono przez sączone bibułowy, ilościowy, średni. Do ekstrakcji chloroformem pobrano 10 ml przesączu, który doprowadzono do pH=12 roztworem wodorotlenku sodu (producent: Chempur). Dla każdej próbki wykonano po 3 ekstrakcje używając 10 ml/5 ml/5 ml chloroformu. Każda z ekstrakcji trwała 5 minut, warstwy chloroformowe (20 ml) zebrano w kolbie o pojemności 25 ml. W ekstrakcie oznaczono zawartość kofeiny przy użyciu spektrofotometru UV-Vis firmy Biobase.

7. Wyniki

W oparciu o równanie krzywej obliczono stężenia kofeiny w poszczególnych herbatkach. Otrzymane wyniki zaprezentowano w Tab.2.

Tab.2. Zawartość kofeiny w próbkach herbaty

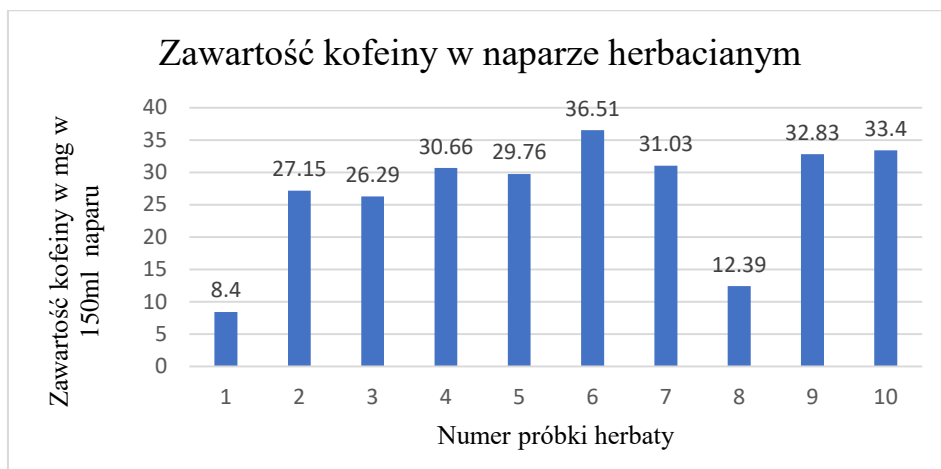
Lp.	Zawartość kofeiny w herbacie mg/100g
1	420
2	1357
3	1315
4	1532
5	1488
6	1826
7	1552
8	619
9	1641
10	1670

Przyjmując jako standardową objętość filiżanki 150 ml oraz biorąc pod uwagę fakt, że zazwyczaj porcja herbaty (torebka) zawiera 2 g suszu, przedstawiono dane dotyczące zawartości kofeiny w tym roztworze. Zawartość kofeiny w mg w tak przygotowanym naparze zaprezentowano w postaci diagramu na Rys.1.

Największą zawartość kofeiny oznaczono w czarnej herbacie pochodzącej z Ceylonu. Taka zawartość kofeiny (36,51mg) stanowi połowę zawartości tej substancji jaka może być w słabej kawie.

8. Dyskusja

Badania Jarosza i współpracowników z 2009 roku dostarczają informacji, że zawartość kofeiny w herbatkach czarnych i zielonych może być podobna, co znajduje pewne odzwierciedlenie wśród badanych próbek, szczególnie w odniesieniu do próbki nr 5 - herbaty zielonej z imbirzem. W badaniu, próbka ta wykazała zawartość kofeiny na poziomie 1488 mg/100g, co jest porównywalne z niektórymi próbkami herbaty czarnej w przeprowadzonej analizie (Jarosz i in. 2009). Natomiast w badaniach innych autorów (Vuletić i in. 2021) stwierdzono najniższą zawartość kofeiny w próbce z zieloną herbatą z dodatkiem imbiru, co może sugerować, iż przetwarzanie oraz dodatki takie jak np. imbir, mogą wpływać na ostateczną zawartość kofeiny w badanych próbkach.



Rys.1. Zawartość kofeiny w sporządzonych naparach badanych herbat.

Herbata liściasta, mogą zawierać więcej kofeiny niż herbaty ekspresowe, co potwierdzają badania Jarosza i współpracowników, jednakże w przeprowadzonej analizie, nie wykazano znaczących różnic, pomiędzy zawartością kofeiny wśród naparów z herbat liściastych, a naparów z herbat ekspresowych.

Według amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA), określa bezpieczną dzienną dawkę na poziomie do 400 mg dla zdrowych dorosłych, bezpiecznie można wypić około 4,2 filiżanki kawy (przyjmując średnią zawartość kofeiny na poziomie 95 mg na filiżankę). Dla naszej najmocniejszej próbki herbaty, z zawartością kofeiny 1826 mg na 100g i przy standardowej masie 2g suszu na filiżankę, maksymalna liczba bezpiecznych do wypicia filiżanek herbaty wynosi około 11. Posiadanie wiedzy na temat kofeiny w herbacie, może stanowić przydatną informację dla osób nadwrażliwych na kofeinę oraz kobiet w ciąży.

9. Wnioski

Herbata zielona i herbata czarna zawierają podobne ilości kofeiny.

Zawartość kofeiny w herbatach jest zmienna i zależy od rodzaju herbaty, oraz sposobu jej przygotowania.

Obecność dodatków smakowych w herbatach, może mieć wpływ na zawartość kofeiny.

10. Literatura

- Arct J, Tomaszewska K, Pytkowska K (2016) Zielona herbata. *Pol J Cosmetol*, 19(2), s. 110.
- Całka J, Zasadowski A, Juranek J (2008) Niektóre aspekty leczniczego działania zielonej herbaty. *Bromatol Chem Toksykol*, 41, s. 5-14.
- Cierniak A, Skubal M, Kalemba-Drożdż M (2018) Czy galusan epigallokatechiny może być skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej?. *Państwo I Społeczeństwo*, 2018(3), s. 9-28.
- Hicks A (2009) Current status and future development of global tea production and tea products. *Au Jt*, 12(4), s. 253.
- Jarosz M, Wierzejska R, Mojska H, Świdarska K, Siuba M (2009) Zawartość kofeiny w produktach spożywczych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, XLII, 3, s. 776-781.
- Miązga-Sławińska M, Grzegorzczak A (2014) Herbaty-rodzaje, właściwości, jakość i zafałszowania. *Kosmos*, 63(3), s. 473-475.
- Perucka I (2001) Skład chemiczny liści herbaty. *Biul Magnezol*, 6, s. 443-451.
- Pytkowska K. (2002) Herbata – działanie kosmetyczne. *J Pol Soc Cosm Chem*, 5, s. 23-26.

- Stańczyk A, Skolimowska U, Wędzisz A (2008) Zawartość garbników w zielonych i czarnych herbatach oraz właściwości antybakteryjne metanolowych wyciągów. *Bromatol Chem Toksykol*, 41, s. 976-980.
- Stańczyk A (2010) Właściwości zdrowotne wybranych gatunków herbat. *Bromatol Chem Toksykol*, 43, s. 498-504.
- Świderski F, Waszkiewicz-Robak B (2012) Towaroznawstwo żywności przetworzonej z elementami technologii. Wydawnictwo SGGW.
- Vuletić N, Bardic L, Odžak R (2021) Spectrophotometric determining of caffeine content in the selection of teas, soft and energy drinks available on the Croatian market. *Food Research*, 5, s. 325-330.
- Waszkiewicz-Robak B (2002) Porównanie zawartości kofeiny i garbników w herbatach zielonych i czarnych. *Żyw. Człow. Metab.*, 29 supl., s. 451-455.
- Wierzejska R (2012) Kofeina-powszechny składnik diety i jej wpływ na zdrowie. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(2), s. 144-145.
- Wierzejska R (2014) Wpływ picia herbaty na zdrowie – aktualny stan wiedzy. *Przeegl Epidemiol*, 68, s. 598-599.
- Wu L (2013) Chińska herbata. *Gdańskie Studia Azji Wschodniej*, (4), s. 108-109.