

# NAJNOWSZE DONIESIENIA WSPÓŁCZESNEJ MEDYCYNY



POD REDAKCJĄ

NATALIA OSIAŁ  
EMILIA NOWAK  
RAFAŁ STACHYRA  
AGNIESZKA KACZYŃSKA  
MAGDALENA OSTOJSKA  
ADRIANNA GORECKA  
MARTYNA KŁOSIŃSKA  
MARIA GROMEK

ARCHAEGRAPH  
Wydawnictwo Naukowe

NAJNOWSZE DONIESIENIA  
WSPÓŁCZESNEJ MEDYCYNY

REDAKCJA NAUKOWA

NATALIA OSIAŁ  
EMILIA NOWAK  
RAFAŁ STACHYRA  
AGNIESZKA KACZYŃSKA  
MAGDALENA OSTOJSKA  
ADRIANNA GORECKA  
MARTYNA KŁOSIŃSKA  
MARIA GROMEK





# NAJNOWSZE DONIESIENIA WSPÓŁCZESNEJ MEDYCyny



POD REDAKCJĄ

NATALIA OSIAŁ  
EMILIA NOWAK  
RAFAŁ STACHYRA  
AGNIESZKA KACZYŃSKA  
MAGDALENA OSTOJSKA  
ADRIANNA GORECKA  
MARTYNA KŁOSIŃSKA  
MARIA GROMEK



ARCHAEOGRAPH  
Wydawnictwo Naukowe

REDAKCJA NAUKOWA:

NATALIA OSIAŁ  
EMILIA NOWAK  
RAFAŁ STACHYRA  
AGNIESZKA KACZYŃSKA  
MAGDALENA OSTOJSKA  
ADRIANNA GORECKA  
MARTYNA KŁOSIŃSKA  
MARIA GROMEK

RECENZENCI:

PROF. DR. HAB. INŻ. TOMASZ ONISZCZUK  
DR N. MED. ANNA MRÓZ  
DR N. MED. BOŻENA BACZEWSKA  
DR N. MED. IWONA DĘBIŃSKA  
DR N. MED. HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA

KOREKTA REDAKTORSKA I SKŁAD:

KAROL ŁUKOMIAK  
DIANA ŁUKOMIAK

PROJEKT OKŁADKI:

KAROL ŁUKOMIAK

© COPYRIGHT BY AUTHORS & ARCHAEGRAPH

ISBN: 978-83-67074-43-8

WERSJA ELEKTRONICZNA DOSTĘPNA NA STRONIE INTERNETOWEJ WYDAWCY:  
[www.archaeograph.pl](http://www.archaeograph.pl)

ARCHAEGRAPH  
*Wydawnictwo Naukowe*

ŁÓDŹ 2022

# SPIS TREŚCI

<b>Wstęp</b> .....	7
<b>Rola probiotyków w leczeniu wybranych przewlekłych chorób układu oddechowego</b> .....	9
Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Halina Pieciewicz-Szczęсна	
<b>Zastosowanie spektrometrii mas sprzężonej z kolumnową chromatografią cieczową w analizie żywności funkcjonalne</b> .....	21
Maciej Poznań	
<b>Płynna biopsja jako metoda diagnostyczna wczesnego wykrywania raka wątrobowokomórkowego</b> .....	31
Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Halina Pieciewicz-Szczęсна	
<b>Metformina w terapii zespołu policystycznych jajników</b> .....	45
Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Maria Gromek, Halina Pieciewicz-Szczęсна	
<b>Zastosowanie melatoniny w leczeniu raka wątrobowokomórkowego</b> .....	57
Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska	
<b>Operacje bariatryczne jako metoda leczenia otyłości</b> .....	69
Adrianna Gorecka, , Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Halina Pieciewicz-Szczęсна	
<b>Zespół WAGR – rzadki zespół delecji 11p</b> .....	79
Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Halina Pieciewicz-Szczęсна	
<b>Wpływ diety ketogenicznej na wybrane choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera i choroba Parkinsona)</b> .....	89
Maria Gromek, Martyna Kłosińska, Agnieszka Kaczyńska, Natalia Osiał, Magdalena Ostojcka, Emilia Nowak, Adrianna Gorecka, Halina Pieciewicz-Szczęсна	



# WSTĘP

Medycyna jest dziedziną nauki, która towarzyszy człowiekowi od zarania dziejów. Już starożytne źródła zawierają opisy schorzeń, dotyczących ówczesnych mieszkańców świata, oraz terapii, które były stosowane w celu ich leczenia. Spojrzenie na choroby i zabiegi lecznicze zmieniało się znacząco na przestrzeni wieków. Pod koniec XIX wieku, wraz z ogólnym rozwojem nauk przyrodniczych, rozpoczął się ogromny postęp w medycynie, który pozwolił na skuteczne leczenie wielu chorób. Wiek XXI to także wiek dynamicznego rozwoju nauk medycznych. Współczesna medycyna przełamuje kolejne bariery, które dotychczas mogły wydawać się nieprzekraczalne. Odkrycia w tej dziedzinie bez wątpienia pozostają jednymi z najbardziej wpływających na ludzkie życie, niejednokrotnie mogąc je przedłużyć lub znacząco poprawić jego jakość. Jednak istnieją wciąż liczne aspekty patofizjologii ludzkiego organizmu, które pozostają dla nas tajemnicą. Współcześni naukowcy stale pogłębiają zasób wiedzy w tej dziedzinie, w celu poznania nowych, lepszych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Autorzy poszczególnych rozdziałów niniejszej publikacji omawiają najnowsze doniesienia na temat wybranych zagadnień nauk medycznych. Wierzę, że książka ta stanowi istotny wkład w toczącą się dyskusję wokół problemów współczesnej medycyny. Serdecznie zachęcam do lektury i pogłębiania wiedzy na temat poruszanych w niej aspektów.

Pragnę również podziękować Autorom rozdziałów, Recenzentom, Wydawnictwu Naukowemu ArchaeGraph, członkom Komitetu Redakcyjnego i wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej monografii.

Natalia Osial  
Emilia Nowak





AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>, NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>,  
MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>, EMILIA NOWAK<sup>(1)</sup>,  
ADRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>, MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>,  
MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA<sup>(2)</sup>

(1) STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

(2) KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

## ROLA PROBIOTYKÓW W LECZENIU WYBRANYCH PRZEWLEKŁYCH CHORÓB UKŁADU ODDECHOWEGO

### ABSTRAKT

Astma, alergiczny nieżyt nosa i przewlekła obturacyjna choroba płuc pozostają najczęstszymi chorobami układu oddechowego. Chorobowość tych schorzeń stale rośnie, co najprawdopodobniej wyjaśnia hipoteza higieniczna. Ponadto przewlekłe narażenie na czynniki szkodliwe wpływa na rozwój stale toczącego się zapalenia dróg oddechowych. Skuteczność leczenia opisywanych chorób nie jest satysfakcjonująca, a ich działanie obciążone jest skutkami ubocznymi. Sprawia to, iż konieczne jest poszukiwanie nowych, bezpiecznych i skutecznych preparatów zapobiegających rozwojowi opisywanych chorób. W ostatnim czasie szczególną uwagę badaczy zwróciły probiotyki wchodzące w skład immunomodulatorów. Przypuszcza się, iż mechanizm ich działania opiera się na zmianach mikrobioty jelit poprzez konkurencję z bakteriami szkodliwymi oraz na modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Charakteryzują się skutecznością w przywracaniu do prawidłowego balansu odpowiedzi Th1 i Th2 zależnych, których nieprawidłowe poziomy są typowe dla chorób alergicznych. Aktualnie probiotyki nie są zalecane przez żadne rekomendacje w terapii przewlekłych chorób układu oddechowego, jednak liczne badania wskazują na ich pozytywne oddziaływanie na przebieg kliniczny opisywanych schorzeń. W niniejszym rozdziale zwięźle opisano korzyści i wyzwania związane ze stosowaniem probiotyków w terapii wybranych chorób układu oddechowego.

**Słowa kluczowe:** probiotyki, astma, alergiczny nieżyt nosa, przewlekła obturacyjna choroba płuc

## ABSTRACT

Asthma, allergic rhinitis, and chronic obstructive pulmonary disease remain the most common respiratory diseases. The incidence of them is constantly increasing, which could be explained by the hygiene hypothesis. Moreover, chronic exposure to harmful factors leads to chronic inflammation of the respiratory tract. The effectiveness of medications used in described diseases may be limited. Furthermore, they are burdened with side effects which creates a need to find new treatment methods. The research on the use of probiotics has been gathering pace in recent years. It is presumed that their mechanism of action is based on changes in the intestinal microbiota through competition with harmful bacteria. Moreover, they are effective in modulating the immune response by maintaining the balance of Th1 and Th2 responses. It is well known that the unstable balance of these cytokines is typical for allergic diseases. Currently, probiotics are not recommended by any recommendations in the treatment of chronic respiratory diseases, but numerous studies indicate their positive impact on the clinical course of these diseases. This chapter briefly describes the benefits and challenges of using probiotics in the treatment of described respiratory diseases.

**Keywords:** probiotics, asthma, allergic rhinitis, chronic obstructive pulmonary disease

## WSTĘP

Wśród przewlekłych chorób zapalnych układu oddechowego wymienia się dotyczące górnych dróg oddechowych: alergiczny nieżyt nosa (ANN) oraz dolnych dróg oddechowych: przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) i astmę.

Częstość występowania wymienionych schorzeń stale wzrasta, co w przypadku ANN i astmy można wiązać z globalnym trendem zwiększenia zachorowań na choroby alergiczne. Zjawisko to najprawdopodobniej wyjaśnia hipoteza higieniczna, według której w wyniku wyższego poziomu higieny, szczególnie w okresie niemowlęcym, organizm nie jest narażony na patogeny, co skutkuje niedostatecznym rozwojem układu immunologicznego. W konsekwencji, układ wykazuje nadwrażliwość na czynniki, które w prawidłowych warunkach nie powinny powodować objawów alergii (Jackson i in. 2014). Ponadto, wzrastająca zapadalność na choroby alergiczne, skutkuje zwiększoną częstotliwością zachorowań na inne choroby układu oddechowego takie jak POChP i zapalenie zatok przynosowych. Podejrzewa się, iż toczące się stale zapalenie w przebiegu alergii prowadzi do rozwoju wymienionych schorzeń następczych (Amelink i in. 2013).

Liczne komplikacje opisywanych chorób i ich znaczący wpływ na poziom życia pacjentów sprawiają, iż niezbędne jest prowadzenie skutecznego leczenia niewywołującego skutków ubocznych. Większość aktualnie stosowanych leków bazuje na zwalczaniu przewlekłego zapalenia będącego nieodzowną częścią wyżej wymienionych schorzeń. Wśród nich szczególną uwagę zwracają glikokortykosteroidy (GKS), będące jednymi z najskuteczniejszych farmaceutyków. Jednakże, ich wysoka skuteczność idzie w parze z licznymi działaniami niepożądanymi, wśród których należy wymienić zwiększoną podatność na infekcje dróg oddechowych, przyrost masy ciała, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę oraz osteoporozę (Rekomendacje GINA). Ponadto nadużywanie przez pacjentów i lekarzy pierwszego kontaktu antybiotyków skutkuje wzrostem oporności bakterii, w wyniku czego leczenie infekcji dróg oddechowych jest coraz trudniejsze (Stefan i in. 2019).

W związku z przytoczonymi wyżej niedogodnościami związanymi ze stosowaniem obecnie rekomendowanego leczenia konieczne jest znalezienie alternatywnej terapii pozbawionej licznych skutków ubocznych. W ostatnich latach uwagę naukowców zwracają probiotyki, które według definicji WHO są preparatami lub produktami żywnościowymizawierającymi pojedyncze lub mieszane hodowle żywych drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach wywierają korzystny wpływ na zdrowie (Mortaz i in. 2013). Uważa się, że mikrobiota zasiedlająca organizm znacząco oddziałuje na stan zdrowia, szczególnie metabolizm, odżywienie i procesy immunologiczne. W związku z tym zasadnym jest korygowanie flory bakteryjnej obecnej u pacjenta poprzez zasiedlanie jelita dobroczynnymi bakteriami wypierającymi potencjalne patogeny (Papizadeh i in. 2017).

Celem niniejszej pracy jest omówienie korzyści i wyzwań związanych ze stosowaniem probiotyków w terapii wybranych chorób układu oddechowego. Podczas przygotowywania pracy wykorzystano z danych zgromadzonych w bazach PubMed i Google Scholar opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat.

## PROBIOTYKI

Do najczęściej stosowanych probiotyków należą bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (*L.acidophilus*, *L.rhamnosus*, *L.bulgaricus*, *L.reuteri*, *L.casei*, *L.johnsonii*, *L.pantarum*) i *Bifidobacterium* (*B.animalis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.lactis*, *B.longum*). (Stavropoulou i Bezirtzoglou 2020). Wybór poszczególnych gatunków stosowanych w leczeniu uzależniony jest przede wszystkim od możliwości przetrwania bakterii w przewodzie pokarmowym

oraz ich zdolności do oddziaływania z komórkami układu immunologicznego gospodarza. Droga podania leku zależy od typu bakterii znajdujących się w preparacie. Najczęściej leki podawane są doustnie, jednak znane są także preparaty wziewne lub donosowe (Bezirtzoglou i Stavropolou 2011).

Probiotyki są zdolne do wypierania niekorzystnej mikrobioty poprzez oddziaływania antagonistyczne, wśród których należy wymienić konkurencję o składniki odżywcze i miejsce wzrostu oraz zmianę warunków środowiska wzrastania poprzez wpływ na pH błony śluzowej jelita. Ponadto wspierają one barierę chroniącą organizm przed wnikaniem drobnoustrojów przez ścianę jelita, pobudzają produkcję substancji bakteriobójczych (mucyny, lizozym) oraz przede wszystkim modulują odpowiedź immunologiczną gospodarza. Są zdolne do stymulowania receptorów Toll-like, co skutkuje produkcją substancji prozapalnych, pobudzeniem odporności komórkowej i fagocytozy niepożądanych gatunków bakterii (Zuccottii in. 2015).

Probiotyki wykazały wysoką skuteczność w leczeniu schorzeń przewodu pokarmowego, szczególnie biegunek czynnościowych, infekcyjnych i poantibiotykowych, oraz układu moczowo-płciowego. Ich użycie poprawia także przebieg kliniczny choroby Crohna, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, nietolerancji laktozy, chorób atopowych i zapalenia ucha (Stavropoulou i Bezirtzoglou 2020). Nieliczne badania wykazały skuteczność probiotyków w leczeniu chorób zapalnych układu oddechowego. Ich sposób działania nie jest do końca zbadany, jednak uważa się, że probiotyki, podobnie jak inne immunomodulatory wpływają na odpowiedź immunologiczną gospodarza poprzez podniesienie poziomu IFN- $\gamma$ , będącego cytokiną prozapalną Th1-zależną oraz obniżenie miana IL-4, która należy do cytokin Th2-zależnych. Jak wiadomo, opisywane w niniejszym artykule choroby (astma i ANN) należą do chorób alergicznych, w przebiegu których obserwuje się odwrócenie stosunku Th1/Th2 w stronę odpowiedzi Th2-zależnej (Debock i Flamand 2014). Możliwe, że przywrócenie prawidłowego balansu wpływa korzystnie na przebieg kliniczny astmy i ANN oraz ogólny spadek częstości i nasilenia zapaleń dróg oddechowych, które są bezpośrednią przyczyną rozwoju POChP.

## ASTMA OSKRZELOWA

Astma to niejednorodna choroba układu oddechowego związana z przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych, której występowanie stale rośnie. Obecnie około 300 milionów osób cierpi na to schorzenie, co czyni astmę jedną z najczęściej występujących chorób na świecie (Wang i in. 2013).

Podejrzewa się, iż rosnąca zachorowalność związana jest ze zmianami stylu życia, wzrastającym poziomem zanieczyszczenia oraz częstszym narażeniem na toksyczne czynniki prenatalne takie jak stres w ciąży, palenie papierosów i narodziny przezcięcie cesarskie (Jackson i in. 2014). Najczęstszymi objawami astmy są: duszność wydechowa, świszczący oddech, kaszel i uczucie ściskania w klatce piersiowej. (Reddel i in. 2015). Aktualne leczenie opiera się na lekach kontrolujących przebieg choroby takich jak: glikokortykosteroidy wziewne, LABA, LAMA oraz lekach objawowych: beta2-mimetyki, SAMA, antybiotyki, tlen, adrenalina (Rekomendacje GINA). Niestety, preparaty stosowane w terapii astmy obarczone są licznymi działaniami niepożądanymi oraz mają ograniczoną skuteczność. W związku z tym konieczne jest poszukiwanie nowych ścieżek leczenia i kontrolowania przebiegu astmy.

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych sugerują, iż użycie probiotyków w terapii astmy może być korzystne poprzez ich wpływ na skład mikrobiomu jelita (Anatriello i in. 2019). Jak opisano powyżej, rozwój chorób alergicznych, w tym astmy, jest związany z niedostatecznym narażeniem układu immunologicznego na różnorodne czynniki pochodzenia drobnoustrojowego i alergeny. Obecność probiotyków wpływa na organizm gospodarza poprzez modulowanie jego odporności, co skutkuje słabszą odpowiedzią zapalną na potencjalne alergeny (Feleszko i in. 2007).

W 2018 roku Lin i in. przeprowadzili metaanalizę obrazującą wpływ probiotyków na przebieg astmy u dzieci. Analizie poddano 11 badań, w których wzięło udział sumarycznie 910 pacjentów. Wykazano, że w grupie dzieci, u których zastosowano leczenie probiotykami, obserwowano statystycznie istotny spadek występowania objawów choroby. Ponadto, zwrócono uwagę na obniżenie poziomu Il-4 oraz wzrost poziomu IFN-gamma. Jak opisywano wyżej, są to cytokiny, których zmiany poziomów są typowe dla chorób atopowych. Wspomniana metaanaliza dowiodła, iż faktycznie istnieje korelacja pomiędzy nasileniem objawów choroby, a odwróceniem zależności odpowiedzi Th1 i Th2. Niestety, w metaanalizie dowiedziono, iż probiotyki wpływają skrócenie trwania objawów astmy oraz poprawę wskaźnika Tiffenau u dzieci (Lin i in. 2018).

Podobną metaanalizę przeprowadził Du i in. w 2019 roku. Do analizy włączono 17 badań, w których udział wzięło sumarycznie 5264 dzieci. Dane dotyczące ryzyka rozwoju astmy po suplementacji probiotykami nie wykazały istotnego statystycznie spadku w porównaniu z grupą kontrolną. Zwrócono uwagę, iż suplementacja *Lactobacillus rhamnosus* spowodowała zmniejszenie częstotliwości występowania choroby. Niestety nie udało się ustalić, czy

terapia uzupełniająca probiotykami ma wyraźną korzyść w odniesieniu do drugorzędowych wyników:świszczącego oddechu, alergicznego nieżytu nosa, dodatniego wyniku skórniego testu alergenów wziewnych. Badanie wykazało znaczną korzyść z suplementacji probiotykami w okresie przed- i poporodowym, jednak efekty te były zależne od rodzaju zastosowanych probiotyków (Du i in. 2019).

Obie prace wykazały, iż istnieje możliwość wykorzystania probiotyków w leczeniu astmy dzieci. Aktualnie nie opublikowano metaanaliz i badań dotyczących użycia opisywanej terapii u dorosłych. Ponadto, wyniki przytoczonych analiz nie korespondują ze sobą we wszystkich aspektach. Aktualnie żadne rekomendacje nie polecają stosowania probiotyków w leczeniu astmy. Sprawia to, że konieczne są dalsze badania wysokiej jakości dotyczące ich użycia.

## ALERGICZNY NIEŻYT NOSA

Alergiczny nieżyt nosa to choroba górnych dróg oddechowych dotykająca około 30% światowej populacji (Meirlaen, Levy i Vandenas 2021). Częstość występowania schorzenia stale rośnie, co jak w przypadku astmy najprawdopodobniej jest związane ze wzrastającym poziomem higieny i niedostatecznym narażeniem układu immunologicznego na różnorodne czynniki stymulujące (Hallit i in. 2018). Do najczęstszych objawów choroby należą: kichanie, katar, zatkanie i swędzenie nosa. ANN cechuje duży wpływ na jakość życia pacjentów. Jako szczególnie uciążliwe wymieniane są bezdechy senne spowodowane zataniem przewodów nosowych, które obniżają jakość snu (Mir, Panjabi i Shah 2012). Ponadto choroba poprzez swój stały zapalny przebieg może prowadzić do zaostrzeń astmy, POChP, zapalenia ucha i zapalenia zatok przynosowych (Rhee i in. 2004). Aktualne leczenie opiera się na terapii objawowej, w skład której wchodzi: leki przeciwhistaminowe, glikokortykosteroidy i leki antyleukotrienowe. Niestety wymienione preparaty nie wykazują wysokiej skuteczności, a ponadto obciążone są działaniami niepożądanymi (szczególnie glikokortykosteroidy) przez co konieczne jest poszukiwanie nowych, bezpiecznych i skutecznych metod leczenia ANN.

Opublikowana w 2017 roku metaanaliza autorstwa Ye i in. objęła 16 badań klinicznych, w których wzięło udział łącznie 1374 pacjentów z rozpoznaniem alergicznego nieżytu nosa. Analiza wykazała, iż istnieje istotna statystycznie różnica w nasileniu objawów klinicznych (zarówno dotyczących nosa jak i oczu) w porównywanych grupach badawczych i kontrolnych. Ponadto, wśród pacjentów przyjmujących probiotyki obserwowano niższy poziom

eozynofili w surowicy. Niestety nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie IgE pomiędzy badanymi grupami. Sprawia to, iż niezbędne są dalsze badania nad probiotykami jako preparatami skutecznymi w hamowaniu procesu alergicznego. Jednakże, optymizmem napawają wyniki wskazujące na ich skuteczność w redukcji objawów klinicznych choroby (Yei in. 2017).

Interesującym źródłem wiedzy jest badanie kliniczne przeprowadzone przez Kang i in. w 2020 roku. Do próby włączono 95 pacjentów z rozpoznaniem ANN i podzielono ich na grupę badaną (n=47) i grupę placebo (n=48). Chorzy w grupie badanej przyjmowali przez 4 tygodnie preparat NVP-1703 będący mieszaniną *Bifidobacterium longum* i *Lactobacillus plantarum*. Na początku badania i po czterech tygodniach porównywano całkowitą punktację objawów nosowych, test kontrolny nieżyty nosa, liczbę eozynofili we krwi, alergenowo swoiste IgE oraz cytokiny typowe dla reakcji alergicznej w krwi i moczu. W grupie pacjentów przyjmujących preparat obserwowano znaczący spadek nasilenia objawów ANN, chorzy ci uzyskiwali także wyższy wskaźnik kontroli objawów choroby. Ponadto, zauważalne były niższe poziomy cytokin typowych dla procesu alergicznego (Il-4, Il-13) w surowicy oraz prostaglandyny F2 $\alpha$  i leukotrienu E4 w moczu. Jest to jedno z nielicznych badań przeprowadzonych na grupie pacjentów dorosłych oraz jedno z pierwszych, które wykazało skuteczność terapii probiotykami tych chorych (Kang i in. 2020).

Przytoczone próby badawcze wykazały, iż probiotyki mogą być preparatami skutecznymi w zmniejszaniu nasilenia objawów alergicznego nieżyty nosa. Jednakże, w aktualnych wytycznych nie ma wzmianki o użyciu ich jako zalecanej terapii. Sprawia to, iż niezbędne jest prowadzenie nad nimi dalszych badań, które mogłyby wykazać ich skuteczność oraz bezpieczeństwo.

## PRZEWLEKŁA OBTURACYJNA CHOROBA PŁUC

Przewlekła obturacyjna choroba płuc to heterogenna choroba związana z utrzymującymi się objawami ze strony układu oddechowego oraz ograniczeniem przepływu powietrza, które prowadzą do nieprawidłowości w obrębie przestrzeni pęcherzykowej. Rozwój choroby jest związany ze stałą ekspozycją na czynniki szkodliwe, szczególnie dym tytoniowy. Ponadto, choroba częściej rozwija się u pacjentów cierpiących na inne schorzenia układu oddechowego, w szczególności astmę, ANN i przewlekłe zapalenie oskrzeli (Postma, Bush i van den Berge 2015). Związane jest to ze stale toczącym się zapaleniem w obrębie błony śluzowej układu oddechowego, co wpływa niekorzystnie na



przepływ powietrza, utrudnia wydech i prowadzi do nieodwracalnych zmian w postaci rozdęcia płuc.

Aktualnie istnieje niewiele artykułów traktujących o użyciu probiotyków w terapii POChP. W 2005 roku Morimoto i in. przeprowadzili próbę kliniczną, w której zbadano wpływ podawania fermentowanego mleka zawierającego *L.casei* na przebieg reakcji zapalnej u palaczy. Dowiedziono, że w wyniku podawania ww. preparatu hamujący wpływ dymu papierosowego na NK-1 był osłabiony (Morimoto i in. 2005). W innym badaniu z 2015 roku, Mortaz i in. wykazali, iż hamowanie reakcji zapalnej na dym tytoniowy jest związane z fagocytozą przez makrofagii bakterii *L.rhamnosus* i *B.breve*. Prawdopodobnie istnieje związek między podawaniem probiotyków, a hamowaniem reakcji zapalnej w odpowiedzi na dym tytoniowy (Mortaz i in. 2015). Jednakże, aktualnie dane dotyczące tego zagadnienia są zbyt ograniczone, co stwarza potrzebę przeprowadzenia dalszych, wysokiej jakości badań klinicznych.

## PODSUMOWANIE

Mimo, że w ostatnich latach badania dotyczące probiotyków w terapii chorób układu oddechowego nabierają tempa, dane dotyczące ich wpływu na przebieg kliniczny pozostają niejednorodne. Początkowe zainteresowanie probiotykami zostało złagodzone przez niesatysfakcjonujące dane dotyczące zapobiegania astmie i POChP mimo, że obserwowano pewną skuteczność w zapobieganiu procesom zapalnym i poprawie kontroli objawów. Chociaż immunomodulatory pochodzenia bakteryjnego są stosowane w praktyce klinicznej od wielu lat, w ciągu ostatniej dekady znacznie lepiej poznano mechanizmy leżące u podstaw ich efektów klinicznych. Jednakże pozytywne wyniki badań należy postrzegać przez pryzmat sceptycyzmu ze względu na niską jakość wielu z nich. Aktualne rekomendacje nie uznają probiotyków za wartą uwagi czy skuteczną terapię, jednakże biorąc pod uwagę dobry profil bezpieczeństwa tych preparatów, należy poważniej rozważyć ich użyteczność jako potencjalnych terapii uzupełniających, które mogą zmniejszać zależność od obciążonych licznymi skutkami ubocznymi aktualnie stosowanych preparatów.

## BIBLIOGRAFIA

Amelink M. i in.

2013 *Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype*, "J Allergy Clin Immunol", 132(2): p. 336-41.

Anatriello E. i in.

2019 *Oral feeding of Lactobacillus bulgaricus N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet*, "Cell Immunol", 341:103928.

Bezirtzoglou E. i Stavropoulou E.

2011 *Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinalmicroflora*, "Anaerobe", Dec;17(6):369-74.

Debock I. i Flamand V.

2014 *Unbalanced neonatal CD4(+) T-cell immunity*, "Front Immunol", 5:393.

Du X. i in.

2019 *Efficacy of probiotic supplementary therapy for asthma, allergic rhinitis, and wheeze: a meta-analysis of randomized controlled trials*, "Allergy Asthma Proc", Jul 1;40(4):250-260.

Feleszko W. i in.

2007 *Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma*, "Clin Exp Allergy", 37(4): 498-505.

GINA

2015 *Global strategy for asthma management and prevention*, "Global Initiative for AsthmaGINA"

Hallit S. i in.

2018 *The AAA Risk Factors Scale: A New Model to Screen for the Risk of Asthma, Allergic Rhinitis and Atopic Dermatitis in Children*, "Med Princ Pract", 27(5): p. 472-480.

Jackson DJ. i in.

2014 *Asthma: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases*, "Ann Am Thorac Soc", 11 Suppl 3: p. S139-45.

Kang MG. i in.

2020 *Probiotic NVP-1703 Alleviates Allergic Rhinitis by Inducing IL-10 Expression: A Four-week Clinical Trial*, "Nutrients", May 15;12(5):1427

Lin J. i in.

2018 *Probiotics supplementation in children with asthma: a systematic review and meta-analysis: probiotics in children with asthma*, "J Paediatr Child Health", 54(9):953–961.

Meirlaen, L., Levy EI., i Vandenplas Y.

2021 *Prevention and Management with Pro-, Pre and Synbiotics in Children with Asthma and Allergic Rhinitis: A Narrative Review*, "Nutrients", 13(3).

Mir E., Panjabi C. i Shah A.

2012 *Impact of allergic rhinitis in school going children*, "Asia Pac Allergy", 2(2): p. 93-100.

Morimoto K. i in.

2005 *Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing Lactobacillus casei in habitual smokers*, "Prev Med", 40(5):589– 594.

Mortaz E. i in.

2013 *Probiotics in the Management of Lung Diseases*, "Mediators Inflamm", 1– 10.

Mortaz E. i in.

2015 *Anti-inflammatory effects of lactobacillus rhamnosus and bifidobacterium breve on cigarette smoke activated human macrophages*, "Plos One", 10 (8):e0136455.

Papizadeh M. i in.

2017 *Probiotic characters of Bifidobacterium and Lactobacillus are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends*, "Microb Pathog", 111:118– 131.

Postma DS., Bush A. i van den Berge M.

2015 *Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease*, "Lancet", Mar 7;385(9971):899-909. Epub 2014 Aug 11.

Reddel, HK. i in.

2015 *The GINA asthma strategy report: what's new for primary care?*, "NPJ Prim Care Respir Med", 25: p. 15050.

Rhee CS. i in.

2004 *Allergen-independent immunostimulatory sequence*

*oligodeoxynucleotide therapy attenuates experimental allergic rhinitis*,  
 "Immunology", 113(1): p. 106-13.

Stavropoulou E. i Bezirtzoglou E.

2020 *Probiotics in Medicine: A Long Debate*, "Front Immunol", 11:2192.  
 Published 2020Sep 25

Stefan MS. i in.

2019 *Association of antibiotic treatment with outcomes in patients hospitalized for an asthma exacerbation treated with systemic corticosteroids*,  
 "JAMA Intern Med", 179(3):333–339.

Wang D. i in.

2013 *Cross-sectional epidemiological survey of asthma in Jinan, China*, "Respirology", 18(2): p. 313-22.

Ye SF. i in.

2017 *The therapeutic effect of probiotics on allergic rhinitis: a Meta analysis*, "Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi", Mar 20;31(6):467-474.

Zuccotti G. i in.

2015 *Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: systematic review and meta-analysis*, "Allergy", 70(11): p. 1356-71.



MACIEJ POZNAŃ

STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY ZAKŁADZIE CHEMII  
NIEORGANICZNEJ KATEDRY CHEMII, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,  
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

# ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS SPRZĘŻONEJ Z KOLUMNOWĄ CHROMATOGRAFIĄ CIECZOWĄ W ANALIZIE ŻYWNOSCI FUNKCJONALNEJ

## ABSTRAKT

Żywność funkcjonalna to żywność, która poza efektem odżywczym wywołuje selektywny prozdrowotny efekt w odniesieniu do określonych funkcji organizmu człowieka przeciwdziałając występowaniu i/lub wspomagając leczenie chorób, także cywilizacyjnych. Działanie żywności funkcjonalnej powinno opierać się na dodatku substancji bioaktywnych, stymulujących pożądaną przebieg przemian metabolicznych oraz na optymalnej fizjologicznie proporcji poszczególnych składników. Uznanie produktu za żywność funkcjonalną musi zostać poprzedzone przeprowadzonymi badaniami naukowymi. Jedną z metod wykorzystywanych do badań nad żywnością funkcjonalną jest spektrometria mas sprzężona z kolumnową chromatografią cieczową. Sprzężenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrometrii mas jest obecnie najbardziej selektywną techniką analityczną służącą do analizy związków z surowych lub częściowo oczyszczonych próbek żywności, a także roślin. Pozwala ona m.in. na oznaczenie jakościowe i ilościowe związków polifenolowych w sporządzonych ekstraktach żywności.

**Słowa kluczowe:** żywność funkcjonalna, polifenole, kwasy fenolowe, chromatografia

## ABSTRACT

Functional food is food that, apart from the nutritional effect, has a selective pro-health effect in relation to specific functions of the human body, preventing the occurrence and / or supporting the treatment of diseases, including civilization diseases. The action of functional food should be based on the addition of bioactive substances stimulating the desired course of metabolic changes and on the physiologically optimal proportion of the individual ingredients. Recognition of a product as a functional food must be preceded by scientific tests. One of the methods used for

functional food research is mass spectrometry coupled with column liquid chromatography. The coupling of high-performance liquid chromatography with a mass spectrometry detector is currently the most selective analytical technique for the analysis of compounds from raw or partially purified food samples as well as plants. It allows, among others, for the qualitative and quantitative determination of polyphenolic compounds in prepared food extracts.

**Keywords:** functional food, polyphenols, phenolic acids, chromatography

## WSTĘP, DEFINICJA ŻYWNOŚCI FUNKCJONALNEJ

Japonia to kraj, z którego wywodzi się definicja żywności funkcjonalnej. Powstała w 1991 roku jako efekt prac w ramach programu *Foods For Specified Health Uses* (FOSHU). Według tego dokumentu, działając ponad efekt odżywczy, wywołuje selektywny prozdrowotny efekt w odniesieniu do określonych funkcji organizmu człowieka (Błaszczak i Grześkiewicz 2014).

*Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) to program badawczy Komisji Europejskiej, którego zadaniem było porozumienie dotyczące definicji naukowych żywności funkcjonalnej w Europie. W roku 1998 powstał pierwszy „roboczy dokument”, w którym zawarto zarówno definicję, jak i wymogi stawiane temu typowi żywności (Contor 2001, Ramalingum i Mahomoodally 2014). Według FUFOSE żywność może być uznana za funkcjonalną, jeżeli został udokumentowany jej ponad odżywczy korzystny wpływ na funkcje organizmu, objawiający się poprawą zdrowia lub prewencją chorób. Aby to osiągnąć musi być spożywana w standardowych, odżywczych ilościach. Są różne metody produkcji żywności funkcjonalnej – może to być dodatek określonych substancji pochodzenia naturalnego, nowatorski skład chemiczny, czy też zoptymalizowanie proporcji składników (np. ograniczenie ilości tłuszczu, czy glutenu). Aby można było nazwać żywność funkcjonalną, musi uprzednio zostać poddana profesjonalnym badaniom naukowym (Błaszczak i Grześkiewicz 2014, Ramalingum i Mahomoodally 2014). Kilka lat później zaproponowano, aby żywność funkcjonalna musiała być kontrolowana pod kątem toksyczności (w terapeutycznych dawkach) (Martirosyan i Singh 2015). Zastosowanie żywności funkcjonalnej jest jednym z elementów promocji zdrowia, stanowi rodzaj pośredniego ogniwa pomiędzy żywnością a lekiem (Bultosa 2016, Domínguez Díaz, Fernández-Ruiz i Cámara 2020).

Można podzielić żywność funkcjonalną według kilku kategorii. Jedną

z nich jest ustalenie konkretnej grupy odbiorców wyprodukowanej żywności – na przykład ludzi wyczynowo uprawiających określony sport, kobiet w okresie ciąży i laktacji, czy seniorów (Błaszczak i Grzeškiewicz 2014).

Żywność funkcjonalna może być produkowana aby zaspokoić specyficzne potrzeby zdrowotne. Przykłady to wpływ na zmniejszanie ryzyka występowania lub łagodzenie przebiegu chorób, także tych cywilizacyjnych (Bultosa 2016) - m.in. układu krążenia (Alissa i Ferns 2012, Arauna i in. 2019), neurodegeneracyjnych (Trziszka i Róžański 2015), cukrzycy (Krawęcka, Sobota i Sykut-Domańska 2019), nieprawidłowej masy ciała (Hirai i in. 2010), procesów nowotworzenia, schorzeń immunologicznych (Ahn-Jarvis, Parihar i Doseff 2019, McClements i Xiao 2017) i nietolerancji glutenu (Bouasla i in. 2016, Oniszczuk i in. 2019b, Wójtowicz i in. 2017).

## ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS SPRZĘŻONEJ Z KOLUMNOWĄ CHROMATOGRAFIĄ CIECZOWĄ W ANALIZIE ŻYWNOCI FUNKCJONALNEJ

Chromatografia to jedna z najistotniejszych technik analitycznych, która ugruntowała swoją pozycję w wielu dziedzinach życia. Jest to metoda rozdziału jednorodnych mieszanin na poszczególne składniki, zachodząca na drodze wielokrotnych podziałów substancji między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego. To także metoda analizy jakościowej i ilościowej poszczególnych składników rozdzielonej mieszaniny. Chromatografię można podzielić na szereg różnych technik, w zależności od rodzaju fazy ruchomej (chromatografia cieczowa, gazowa, nadkrytyczna), czy stacjonarnej (podziałowa, adsorpcyjna, sitowomolekularna). Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), rodzaj kolumnowej chromatografii cieczowej, jest optymalną metodą analityczną służącą do rozdzielania i oznaczania związków polifenolowych. Potwierdzenie obecności w badanej próbce poszukiwanego analitu realizuje się poprzez porównanie chromatogramu (zapisu wyniku chromatografii) otrzymanego dla substancji wzorcowej z chromatogramem otrzymanym w tych samych warunkach analizy (Witkiewicz, Wardecki i Malinowska 2019). Odwroconym układem faz (RP, *reversed phase*) to najpowszechniejsza metodyka analiz żywności z dodatkami roślinnymi. Jako fazy stacjonarne stosowane są adsorbenty na bazie żelu krzemionkowego o powierzchni modyfikowanej łańcuchami węglowodorów alifatycznych – najczęściej C18. Średnica cząstek ziaren w kolumnie (LC-MS) wynosi około 1,7µm. Fazę ruchomą stanowi roztwór składnika wodnego oraz



mieszającego się z wodą składnika organicznego (przeważnie metanolu czy acetonitrylu). Stosuje się także dodatki kwasów (octowego, mrówkowego) lub buforów. Faza ruchoma jest z założenia tylko czynnikiem transportującym rozdzielaną mieszaninę wzdłuż kolumny i nie powinna oddziaływać ani z fazą stacjonarną, ani z rozdzielanymi substancjami. Czas jaki potrzebny jest na fizyczne pokonanie drogi od komory nastrzykowej, poprzez kolumnę, do detektora nazywa się czasem martwym (Valls i in. 2009, Witkiewicz, Wardecki i Malinowska 2019).

Metody kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączone z detektorami fotometrycznymi, fluorescencyjnymi i elektrochemicznymi znalazły szerokie zastosowanie w analizie polifenoli w próbkach żywności. Jednak wadą tych metod detekcji jest brak jednoznacznych informacji o strukturze analizowanych związków i niespecyficzność oznaczenia, mogąca prowadzić do wystąpienia niepożądanego zjawiska interferencji matrycy próbki lub błędnej oceny tożsamości pików. Sprzężenie detektorów spektrometrii mas z systemem chromatografii cieczowej znacznie poprawiło identyfikację i możliwość określenia struktury związków fenolowych. Spektrometria masowa jest od wielu lat jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się metod analizy związków pochodzenia naturalnego. W klasycznej wersji tej metody związek doprowadza się do jonizacji i rozpadu na naładowane fragmenty, które przyspiesza się w polu elektrycznym. Strumień jonów rozdziela się (za pomocą różnych metod) według stosunku ich masy do ładunku, następnie poddane pomiarowi zostaje natężenie prądu jonowego odpowiadające poszczególnym jonom. W celu analizy polifenoli istotny jest rodzaj zastosowanej techniki jonizacji analitu – metodą z wyboru jest jonizacja w polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym: przez elektorozpylenie lub jonizację chemiczną (Valls i in. 2009, Witkiewicz, Wardecki i Malinowska 2019). Wykorzystywanych są głównie cztery typy analizatorów: sektorowo-magnetyczny, kwadrupolowy, czasu przelotu oraz pułapka jonowa. Sprzężenie cieczowej chromatografii kolumnowej z tandemową spektrometrią mas (MS/MS), gdzie rozdzielone substancje mogą być identyfikowane na podstawie widm fragmentacyjnych, pozwala uzyskać szczególnie korzystne rezultaty w kierunkowej analizie złożonych mieszanin oraz charakteryzuje się jeszcze większą czułością, selektywnością, przepustowością (Stolarczyk i Kutner 2009, Ulanowska i Strączyński 2012, Valls i in. 2009). Znane jest zastosowanie tej techniki zarówno w celu poszukiwania nieznanymi substancji, jak i potwierdzenia obecności związków, wykorzystując identyfikację na podstawie charakterystycznych danych strukturalnych (Stolarczyk i Kutner 2009).

Dane literaturowe donoszą o wykorzystaniu spektrometrii mas w badaniach dotyczących żywności funkcjonalnej. Martín-García i in. (2019) za pomocą HPLC-ESI/MS porównywali profil polifenolowy funkcjonalnej mąki gryczanej o różnym stopniu rozdrobnienia. W konsekwencji określona została optymalna wielkość oczek sita (215µm), służącego do produkcji mąki gryczanej (Martín-García i in. 2019). Inni autorzy za pomocą tandemowej spektrometrii mas badali wzajemne zależności pomiędzy obecnością flawonoidów ze skórki *Punica granatum* i wzrostem kultur bakterii *Lactobacillus acidophilus* w fermentowanym mleku. Roślinny dodatek nie wykazywał negatywnego wpływu na żywotność komórek podczas procesu fermentacji. W analizowanych próbkach zidentyfikowano związki polifenolowe, głównie elagotaniny (Chan i in. 2018). Inne badanie w tematyce żywności funkcjonalnej dotyczyło oznaczenia profilu polifenolowego makaronów z mąki gryczanej wyprodukowanych za pomocą nowoczesnej metody ekstruzji. Wytypowano najoptymalniejsze parametry technologiczne produkcji. Jednym z wniosków doświadczenia był fakt, że zastosowana technika ekstruzji nie spowodowała degradacji termolabilnych związków polifenolowych (Oniszczuk i in. 2019a). Wysokosprawną chromatografią cieczową z tandemowym analizatorem mas posłużyła do badań nad funkcjonalnymi makaronami instant wyprodukowanych z rafinowanych oraz pełnoziarnistych mąk z pszenicy i orkiszu (za pomocą ekstruzji). Makarony z mąk pełnoziarnistych były zasobniejsze w kwasy fenolowe niż makarony z uprzednio oczyszczonych zbóż. Wykonano analizę jakościową i ilościową o 8 kwasów fenolowych (Wójtowicz i in. 2020).

Stosując omawianą technikę oznaczono także zawartość flawonoidów oraz kwasów fenolowych obecnych w próbkach ekspandowanych produktów zbożowych wzbogaconych o różne procentowo dodatki *Camomillae anthodium*, jednocześnie porównując efektywność różnych typów ekstrakcji i ich warunków. W ekstraktach z samego rumianku oraz w produktach zbożowych z jego dodatkiem w ilości 10 i 20% oznaczono 11 kwasów fenolowych oraz 6 związków flawonoidowych (Blicharski i in. 2017).

Restuccia i in. (2019) wykorzystali spektrometrię masową do porównania składu chemicznego wyrobów z trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum*) – soku oraz powstającej jako produkt uboczny procesu melasy. Spośród oznaczanych wtórnych metabolitów roślinnych zidentyfikowano 9 związków flawonoidowych, w tym glukuronidową pochodną tricinu, nigdy wcześniej nie opisaną w trzcinie cukrowej i melasie (Restuccia i in. 2019).

Chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym wykorzystywana jest także w analizie żywności funkcjonalnej

wyprodukowanej przy użyciu nowoczesnych metod technologicznych. Jedną z nich jest mikrokapsułkowanie, które służy m.in. zapobieganiu niepożądanym reakcji z innymi składnikami czy procesom biodegradacji. González i in. (2019) przeprowadzili analizę profilu polifenolowego rozpyłowo mikrokapsułkowanego (za pomocą alginianu sodu) ekstraktu z liści z drzewa oliwnego (*Olea europea*), także po przeprowadzeniu symulowanego trawienia. W ekstrakcie z rośliny zidentyfikowano 26 związków polifenolowych, zaś oleuropeina stanowiła około 85% z nich. Zanotowano zmianę składu ekstraktów w różnych etapach doświadczenia. Stwierdzono, że mikrokapsułkowanie zapobiega degradacji oleuropeiny podczas procesu trawienia w żołądku, umożliwiając jej stopniowy rozkład w jelicie, co warunkuje wyższą biodostępność tego związku (González i in. 2019).

Omawiana technika analityczna znalazła zastosowanie także do oznaczania związków polifenolowych zawartych w roślinach w celu oceny zasadności ich wykorzystania w projektowaniu oraz produkcji nowego asortymentu żywności funkcjonalnej.

## PODSUMOWANIE

W dobie coraz częściej występujących chorób cywilizacyjnych, spożywanie żywności funkcjonalnej wydaje się być jednym z najlepszych sposobów zapobiegania im lub łagodzenia ich przebiegu. Zastosowanie żywności funkcjonalnej jest jednym z elementów promocji zdrowia, stanowi rodzaj pośredniego ogniwa pomiędzy żywnością a lekiem. Istotna jest odpowiednia jakość badań naukowych dotyczących tego typu żywności.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahn-Jarvis JH., Parihar A. i Doseff AI.  
2019 *Dietary Flavonoids for Immunoregulation and Cancer: Food Design for Targeting Disease*, "Antioxidants", 8, 202.
- Alissa EM. i Ferns GA.  
2012 *Functional Foods and Nutraceuticals in the Primary Prevention of Cardiovascular Diseases [WWW Document]*, "Journal of Nutrition and Metabolism"

- Arauna D. i in.  
2019 *Natural Bioactive Compounds As Protectors Of Mitochondrial Dysfunction In Cardiovascular Diseases And Aging*, "Molecules", 24, 4259.
- Błaszczak A. i Grzeškiewicz W.  
2014 *Żywność funkcjonalna - szansa czy zagrożenie dla zdrowia?*, "Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu", 20(49).
- Blicharski, T. i in.  
2017 *Puffed cereals with added chamomile – quantitative analysis of polyphenols and optimization of their extraction method*, "Ann Agric Environ Med", 24, 222–228.
- Bouasla, A. i in.  
2016 *Gluten-Free Precooked Rice-Yellow Pea Pasta: Effect of Extrusion-Cooking Conditions on Phenolic Acids Composition, Selected Properties and Microstructure*, "Journal of Food Science", 81, C1070–C1079.
- Bultosa, G.  
2016 *Functional Foods: Overview*, in: *Reference Module in Food Science*, "Elsevier"
- Chan CL. i in.  
2018 *Enhancing antioxidant capacity of Lactobacillus acidophilus-fermented milk fortified with pomegranate peel extracts*, "Food Bioscience", 26, 185–192.
- Contor L.  
2001 *Functional Food Science in Europe*, "Nutr Metab Cardiovasc Dis", 11, 20–23.
- Domínguez Díaz L., Fernández-Ruiz V. i Cámara M.  
2020 *An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling*, "Journal of Functional Foods", 68, 103896.
- González E. i in.  
2019 *Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion*, "Food Chemistry", 279, 40–48.

Hirai S. i in.

2010 *Functional Food Targeting the Regulation of Obesity-Induced Inflammatory Responses and Pathologies [WWW Document]*, “Mediators of Inflammation”

Krawęcka A., Sobota A. i Sykut-Domańska E.

2019 *Functional Cereal Products in the Diet for Type 2 Diabetes Patients*, “International Journal of Food Science”, 1–7.

Martín-García B. i in.

2019 *Use of Sieving as a Valuable Technology to Produce Enriched Buckwheat Flours: A Preliminary Study*, “Antioxidants”, 8, 583.

Martirosyan DM. i Singh J.

2015 *A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?*, “Functional Foods in Health and Disease”, 5, 209-223–223.

McClements DJ. i Xiao H.

2017 *Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition*, “Seminars in Cancer Biology”, 46, 215–226.

Oniszczyk A. i in.

2019a *The Impact of Processing Parameters on the Content of Phenolic Compounds in New Gluten-Free Precooked Buckwheat Pasta*, “Molecules”, 24, 1262.

Oniszczyk A. i in.

2019b. *Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of New Gluten-Free Pasta with the Addition of Chestnut Flour*, “Molecules”, 24, 2623.

Ramalingum N. i Mahomoodally MF.

2014 *The Therapeutic Potential of Medicinal Foods*, “Advances in Pharmaceutical Sciences”, 1–18.

Restuccia D. i in.

2019 *Autochthonous white grape pomaces as bioactive source for functional jams*, “International Journal of Food Science & Technology”, 54, 1313–1320.

Stolarczyk E. i Kutner A.

2009 *Zastosowanie spektrometrii mas w analizie farmaceutycznej zanieczyszczeń organicznych*, "Farm Pol", 65, 586–593.

Trziszka, T. i Róžański H.

2015 *Żywność funkcjonalna i nutraceutyki w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*, "Herbalism", 1, 9.

Ulanowska A. i Strączyński G.

2012 *Nowe perspektywy w analizie żywności*, "LAB Laboratoria, Aparatura, Badania", R. 17, nr 4, 31–34.

Valls J. i in.

2009 *Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. Journal of Chromatography A*, "Advanced Separation Methods in Food Analysis", 1216, 7143–7172.

Witkiewicz Z., Wardecki W. i Malinowska I.

2019 *Chromatografia cieczowa teoria i praktyka*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Wójtowicz A. i in.

2020 *Chemical composition and selected quality characteristics of new types of precooked wheat and spelt pasta products*, "Food Chemistry", 309, 125673.

Wójtowicz A. i in.

2017 *Application of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) leaves addition as a functional component of nutritionally valuable corn snacks*, "Journal of Food Science and Technology", 54.



MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>, EMILIA NOWAK<sup>(1)</sup>,  
ADRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>, MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>,  
MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>, AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>,  
NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

<sup>(2)</sup> KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII I METODOLOGII  
BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

# PŁYNNNA BIOPSIJA JAKO METODA DIAGNOSTYCZNA WCZESNEGO WYKRYWANIA RAKA WĄTROBOWOKOMÓRKOWEGO

## ABSTRAKT

Rak wątrobowokomórkowy jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów związaną z nowotworami. Ze względu na niekorzystne rokowanie płynna biopsja stanowi nową, obiecującą metodę diagnostyczną ukierunkowaną na jak najwcześniejsze wykrywanie tego nowotworu i rozpoczęcie leczenia. Badanie to wykorzystuje uwolnione do krwiobiegu molekularne składniki guza: krążące komórki nowotworowe, kwasy nukleino-we (wolne DNA i miRNA) oraz zewnątrzkomórkowe pęcherzyki. Ich podwyższone stężenie koreluje z większym rozmiarem guza, wyższym stopniem zaawansowania raka, obecnością przerzutów odległych oraz zwiększonym prawdopodobieństwem nawrotu. Płynna biopsja jest powtarzalna i małoinwazyjna. Stanowi alternatywę dla czasochłonnych biopsji wątroby narażających na szereg powikłań włącznie z miejscowym rozsiewem nowotworu w kanale wklucia. Ponadto może stanowić badanie przesiewowe w kierunku raka wątrobowokomórkowego wśród pacjentów z istotnymi czynnikami ryzyka lub utrudnionym dostępem do opieki medycznej.

**Słowa kluczowe:** rak wątrobowokomórkowy, płynna biopsja, biomarker, rokowanie

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is the second leading cause of cancer-related death. Due to the poor prognosis, liquid biopsy is a new, promising diagnostic method aimed at early detection of this neoplasm and initiation of treatment. This test uses the molecular components of the tumor that are released into the bloodstream: circulating tumor



cells, nucleic acids (cell-free circulating tumor DNA, miRNA) and extracellular vesicles. Their increased concentration correlates with a larger tumor size, a higher cancer stage, the presence of metastases and an increased risk of recurrence. The liquid biopsy is repeatable and minimally invasive. It is an alternative to time-consuming liver biopsies that cause various complications, including local tumor spreading in the puncture canal. In addition, it may be a screening test for hepatocellular carcinoma in patients with significant risk factors or difficult access to healthcare.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma, liquid biopsy, biomarker, prognosis

## WSTĘP

Według danych Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) z 2020 roku rak wątroby i wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych jest szóstym najbardziej rozpowszechnionym na świecie nowotworem złośliwym. Stanowi on czwartą najczęstszą przyczynę zgonów związaną z nowotworami, po raku płuc, jelita grubego i żołądka (gco.iarc.fr, Singal, Lampertico i Nahon 2020). Wskaźnik pięcioletniego przeżycia dla raka wątroby wynosi 18%, w związku z tym jest on drugą najczęstszą przyczyną śmiertelności wśród pacjentów onkologicznych zaraz po raku trzustki (uptodate.com). Rak wątrobowokomórkowy (HCC - hepatocellular carcinoma) stanowi ponad 90% przypadków pierwotnych nowotworów złośliwych wątroby. Wywodzi się z właściwych komórek wątrobowych – hepatocytów. Standaryzowany wiekowo wskaźnik zachorowalności (ASMR) na HCC jest najwyższy w Azji Południowo-Wschodniej oraz Afryce Północnej. Natomiast najmniej przypadków HCC odnotowuje się w Azji Południowo-Środkowej i Zachodniej oraz w Europie Środkowo-Wschodniej (Singal, Lampertico i Nahon 2020). W Polsce według Krajowego Rejestru Nowotworów każdego roku odnotowuje się niemal 3000 nowych przypadków zachorowań.

Rak wątrobowokomórkowy występuje około trzy razy częściej u mężczyzn niż u kobiet (Sagnelli i in. 2020). Prawdopodobieństwo zachorowania zwiększa się wraz z wiekiem i osiąga swój szczyt około 60.-70. roku życia (onkologia.org.pl, Yang i in. 2019).

Wśród czynników ryzyka wystąpienia HCC wyróżnia się: marskość wątroby, wirusowe zapalenia wątroby (typu B, C i D), narażenie na toksyny środowiskowe zanieczyszczające zboża i nasiona roślin oleistych (aflatoksyny B1) oraz zaburzenia metaboliczne takie jak cukrzyca, otyłość i niealkoholowa tłuszczeniowa choroba wątroby. Z rozwojem HCC powiązane są również

zaburzenia genetyczne: dziedziczna hemochromatoza, niedobór alfa-1 antytrypsyny oraz ostra przerywana porfiria. Ponadto dużą rolę odgrywa styl życia pacjenta, w szczególności przewlekłe spożywanie alkoholu czy palenie tytoniu (uptodate.com, Yang i in. 2019, Sagnelli i in. 2020).

## CEL I METODY

Celem niniejszej pracy jest zwrócenie uwagi na niekorzystne rokowanie HCC spowodowane zbyt późno stawianym rozpoznaniem oraz dowiedzenie, że płynna biopsja może stanowić obiecującą metodę diagnostyczną ukierunkowaną na wczesne wykrywanie tego nowotworu. Analizie poddano artykuły wyszukane w bazie PubMed i uptodate.com oraz informacje zamieszczone na stronach internetowych Krajowego Rejestru Nowotworów i Global Cancer Observatory. Użyto słów-kluczy: płynna biopsja, rak wątrobowokomórkowy, biomarker, rokowanie.

## NIEKORZYSTNE ROKOWANIE RAKA WĄTROBOWOKOMÓRKOWEGO

Głównym problemem wpływającym niekorzystnie na rokowanie HCC oraz stosunkowo niską medianę życia, wynoszącą zaledwie dwa lata, jest zbyt późno stawiana diagnoza. Zazwyczaj ma to miejsce, kiedy obserwowana jest dużego stopnia progresja raka. Manifestuje się ona poprzez obecność guza znacznych rozmiarów lub guzów mnogich, jak również naciekanie i poza-wątrobowy rozsiew komórek nowotworowych. Należy zaznaczyć, że aż 70% pacjentów z HCC otrzymuje diagnozę dopiero na etapie znacznego zaawansowania nowotworu oraz powikłań. Wobec tego pacjenci nie mogą zostać zakwalifikowani do standardowego leczenia operacyjnego HCC, polegającego na zabiegu chirurgicznym resekcji wątroby i ewentualnym jej przeszczepie (Chen i in. 2020, Zhang i in. 2020). W efekcie chorzy z zaawansowanym nowotworem zdani są na leczenie paliatywne. Na ogół są to terapie celowane z użyciem inhibitorów kinaz wykazujących działanie przeciwaproliferacyjne i przeciwiangiogenne (Singh i in. 2020). Towarzyszy temu znaczne obniżenie jakości życia. Wskaźnik pięcioletniego przeżycia obejmujący chorych z zaawansowanymi, nieoperacyjnymi postaciami HCC oraz chorych niekwalifikujących się do przeszczepu jest niski i wynosi mniej niż 10% (Ng i in. 2018).

Zatem biorąc pod uwagę niepomysłne rokowanie HCC, istotne znaczenie ma jego jak najwcześniejsze rozpoznanie i zapoczątkowanie leczenia (Chen

i in. 2020). Badania dowodzą, że wskaźnik pięcioletniego przeżycia pacjentów leczonych chirurgicznie, w tym pacjentów po transplantacji wątroby, wynosi około 70% (Singh i in. 2020).

## PRZYCZYNY ZBYT PÓŹNEGO ROZPOZNAWANIA RAKA WĄTROBOWOKOMÓRKOWEGO

Należy zaznaczyć, iż wczesne rozpoznanie HCC nie zawsze jest możliwe. Wpływają na to różne czynniki. Jedną z istotnych kwestii są objawy HCC. Nowotwór ten może bowiem prezentować szereg objawów, takich jak: łagodny do umiarkowanego ból w nadbrzuszu, wodobrzusze, a w związku z tym powiększenie obwodu brzucha, wczesne uczucie sytości podczas posiłku, utrata masy ciała, postępujące wyniszczenie, żółtaczka, gorączka, hipoglikemia, biegunka, a niekiedy nawet krwawienia śródtrzewnowe i ropnie wątroby. Jednakże zwykle występują one dopiero na zaawansowanym etapie choroby. Natomiast w początkowym stadium rozwoju HCC często ma przebieg bezobjawowy (Singh i in. 2020, uptodate.com).

Ponadto warto zaznaczyć, iż alfa-fetoproteina (AFP) wydaje się być niewystarczającym biomarkerem klinicznym HCC z uwagi na niskie czułość i swoistość, wynoszące odpowiednio 63% i 84% (Tzartzeva i in. 2018). Co więcej marker ten nie jest specyficzny jedynie dla HCC. Jego poziom wzrasta w przewlekłej chorobie wątroby, nowotworach układu pokarmowego (rak żołądka), guzach pochodzenia gonadalnego (zarówno z komórek zarodkowych, jak i niezarodkowych) oraz u kobiet w ciąży (Zhang i in. 2020, uptodate.com).

Kolejną przyczyną zbyt późnego wykrywania HCC są ograniczenia stosowanych metod obrazowania, takich jak rezonans magnetyczny (MR), tomografia komputerowa (TK) i ultrasonografia z kontrastem. Pomimo, iż czułość MR i TK osiąga wartości od 66 do 82%, a swoistość wynosi powyżej 90%, badania te znajdują zastosowanie jedynie w przypadku guzów o średnicy większej niż 1 cm (Villanueva 2019, Singh i in. 2020, Zhang i in. 2020).

## PŁYNNNA BIOPSJA

Płynna biopsja to stosunkowo nowa i prosta metoda, która znalazła zastosowanie między innymi w diagnostyce nowotworów. Polega ona na pobraniu próbek niestałych tkanek biologicznych i analizie ich pod kątem obecności krążących w nich molekularnych składowych guza. Próbkę do badań mogą

stanowić płyny ustrojowe pacjenta. Rodzaj badanego płynu ustrojowego zależy w głównej mierze od typu nowotworu, w kierunku którego diagnozowany jest dany pacjent. W przypadku guzów ośrodkowego układu nerwowego brany jest pod uwagę płyn mózgowo-rdzeniowy, w guzach głowy i szyi jest to ślina, w nowotworach klatki piersiowej – płyn opłucnowy, w raku jamy brzusznej – płyn nagromadzony w jamie otrzewnej, natomiast w nowotworach układu pokarmowego i moczowego – odpowiednio stolec i mocz (Ye i in. 2019, Corcoran i Chabner 2020, Zhang i in. 2020).

Jednakże to krew obwodowa jest najczęściej wykorzystywanym materiałem diagnostycznym podczas płynnej biopsji, a badanie to może stanowić obiecującą, skuteczną metodę diagnostyczną wczesnego wykrywania HCC (Ye i in. 2019). Wykorzystuje ono krążące we krwi obwodowej markery nowotworowe pochodzące z guza i predysponuje do rozwiązania problemu zbyt późnego wykrywania HCC w populacji objętej podwyższonym ryzykiem. Dodatkowo pomaga w monitorowaniu stanu pacjenta i odpowiedzi na zastosowane leczenie, określa prawdopodobieństwo nawrotu raka oraz dostarcza danych na temat molekularnych cech HCC (Bhan i in. 2019).

W HCC podczas płynnej biopsji we krwi obwodowej wykrywane są molekularne składniki guza. Są to: krążące komórki nowotworowe, egzosomy (zwnątrzkomórkowe pęcherzyki guza) oraz krążące kwasy nukleinowe, takie jak wolne DNA i niekodujący RNA.

## KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Krążące komórki nowotworowe uwalniane są do krwiobiegu zarówno z pierwotnych jak i przerzutowych HCC. Prawdopodobnie odbywa się to w dwóch mechanizmach: biernym polegającym na rozsiewie komórek na skutek nieprawidłowego unaczynienia tkanek oraz aktywnej migracji komórek w ramach przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. We krwi obwodowej krążą pojedynczo lub w grupach (Bhan i in. 2019). Jednakże w związku z krótkim okresem półtrwania wynoszącym od 1 do 2,5 godziny ich żywotność to jedynie kilka godzin. Przyczyną tego jest utrata adhezji do macierzy zwnątrzkomórkowej oraz działanie układu odpornościowego organizmu, co skutkuje apoptozą we krwi obwodowej (Ye i in. 2019). Wobec tego u większości pacjentów z nowotworem komórki te nie są wykrywane w krwiobiegu już po 24 godzinach od resekcji guza (Bhan i in. 2019).

Biorąc pod uwagę budowę molekularną są to komórki jądrzaste o wielkości powyżej 4  $\mu\text{m}$ . Wykazują ekspresję cząsteczek adhezji komórek nabłonka

(EpCAM - epithelial cell adhesion molecule; u 20-35% przypadków HCC) i cytokeratyn 8, 18 oraz 19. Ponadto nie zawierają na swojej powierzchni antygenu CD45 swoistego dla leukocytów (Ye i in. 2019). Krążące komórki nowotworowe w krwiobieg pacjenta z HCC występują w niewielkich ilościach. Na ogół jest to maksymalnie 10 komórek na każdy 1 ml krwi (Haber i Velculescu 2014). Choć Micalizzi, Maheswaran i Haber w swoim badaniu z 2017 roku sugerują, że może być ich jeszcze mniej, to znaczy maksymalnie 10 komórek na 10 ml krwi obwodowej. Poza tym im wcześniejsze stadium nowotworu, tym mniej komórek rakowych (Micalizzi, Maheswaran i Haber 2017). Pomimo tego krążące komórki nowotworowe mogą dostarczać cennych informacji na temat nieprawidłowości DNA, białek, transkryptów fuzji genów i ekspresji RNA.

W 2013 roku Sun i in. przy użyciu standaryzowanego systemu CellSearch badali znaczenie kliniczne krążących komórek nowotworowych, wykazujących ekspresję EpCAM, u 123 pacjentów z HCC, którzy poddawani byli potencjalnie skutecznej resekcji guza. Próbkę krwi zostały pobrane zarówno przed resekcją jak i porównawczo miesiąc po niej. Przed leczeniem komórki nowotworowe były obecne u prawie 67% chorych. Natomiast ich konkretna wartość różniła się u poszczególnych chorych: na każde 7,5 ml krwi przypadało od 1 do 34 komórek. U 51 pacjentów we krwi były obecne minimum 2 komórki w 7,5 ml krwi i właśnie w tej grupie badanych nawrót HCC wystąpił wcześniej niż w przypadku pacjentów, u których zidentyfikowano mniej niż 2 komórki w 7,5 ml krwi. W związku z tym Sun i in. wykazali, że przedoperacyjna obecność 2 lub więcej krążących komórek nowotworowych w 7,5 ml krwi obwodowej stanowi niezależny czynnik prognostyczny określający wysokie ryzyko nawrotu HCC. Dotyczy to zwłaszcza pacjentów, u których poziom AFP jest mniejszy bądź równy 400 ng/ml oraz tych z niskim ryzykiem nawrotu HCC. Daje to lekarzom wgląd w rokowanie i wspomaga ich decyzje dotyczące leczenia HCC. W 2017 roku von Felden i in. przeprowadzili podobne badanie. Wykazało ono, że wykrycie krążących komórek rakowych w krwiobieg przed zabiegiem resekcji wątroby wskazuje na podwyższone ryzyko nawrotu HCC, a dodatkowo koreluje z krótszym czasem przeżycia po resekcji w przypadku braku nawrotu raka. W innym badaniu dowiedziono, że liczba krążących komórek nowotworowych, wykazujących ekspresję EpCAM, stanowi niezależny predyktor przeżycia wolnego od progresji u pacjentów z nieoperacyjnym HCC leczonych metodą przezcewnikowej chemoembolizacji tętniczej (Shen i in. 2018). Zatem komórki te mogą odgrywać istotną rolę podczas monitorowania odpowiedzi na leczenie i oceny

minimalnej choroby resztkowej (Bhan i in. 2019).

Należy jednak zaznaczyć, iż korzystanie z krążących komórek nowotworowych podczas diagnostyki HCC ma również pewne wady. Jedną z nich jest to, że ich wykrywanie bazuje na wykorzystaniu markerów trzustkowych, głównie EpCAM i kinazy keratynowej. Zatem wskazuje to na niezupełną swoistość tychże komórek (Mocan i in. 2020). Co więcej porównywanie badań nad diagnostyką HCC z wykorzystaniem płynnej biopsji i krążących komórek rakowych jest utrudnione. Wynika to z faktu, iż badania te są przeprowadzane z użyciem nieujednoliconych technik izolowania i wykrywania komórek. Utrudnia to wyciąganie uniwersalnych wniosków i tworzenie konkretnych wytycznych co do diagnostyki HCC. Ponadto Sun i in. w 2017 roku przeprowadzili metaanalizę, która wykazała, że diagnostyka HCC z użyciem krążących komórek nowotworowych ma czułość rzędu 67% przy swoistości równej 98%. Wskazuje to na konieczność dalszego udoskonalania tej metody diagnostycznej.

## KWASY NUKLEINOWE: DNA I RNA

Kolejne składowe guza wykorzystywane do diagnostyki z użyciem płynnej biopsji to kwasy nukleinowe: DNA oraz RNA. cfDNA i cfRNA są uwalniane do krwiobiegu na drodze aktywnego wydzielania lub poprzez apoptozę, martwicę i lizę zarówno komórek gospodarza (w tym limfocytów) jak i komórek złośliwych. Ich podgrupę stanowią ctDNA i ctRNA, których źródłem są wyłącznie krążące komórki nowotworowe, wywodzące się z guza pierwotnego oraz przerzutowego. We krwi obwodowej ctDNA i ctRNA to krótkie fragmenty kwasów nukleinowych określane jako nukleosomy oraz długie fragmenty zgromadzone w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV - extracellular vesicles) (Mocan i in. 2020, Ye i in. 2019).

cfDNA to fragmenty 160-180 par zasad zbliżone wielkością do jednostki mononukleosomalnej (Ng i in. 2018). Niestety ich okres półtrwania, podobnie jak krążących komórek nowotworowych, jest krótki i wynosi od 16 minut do 2,5 godziny (Singh i in. 2020). Jeden mililitr krwi zdrowej osoby może zawierać od 10 do 100 ng cfDNA, zazwyczaj wartość ta jest mniejsza niż 25 ng. Natomiast u chorych na nowotwór stężenie cfDNA jest kilka razy wyższe z uwagi na rosnący udział ctDNA. Odsetek ctDNA w ogólnej puli cfDNA waha się w zakresie od mniej niż 0,1% do więcej niż 10% w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (Bhan i in. 2019). Dowiedziono, że stężenie cfDNA jest 20 razy wyższe u pacjentów z HCC niż u osób zdrowych

z grupy kontrolnej oraz 3-4 razy wyższe w porównaniu z chorymi na przewlekłe zapalenie wątroby. Ponadto wyższe stężenie cfDNA może korelować z większymi rozmiarami guza, krótszym całkowitym czasem przeżycia oraz prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów odległych po leczeniu operacyjnym. Jedna z metaanaliz wykazała, że cfDNA może być dobrym narzędziem diagnostycznym, ale zawsze w połączeniu z innymi parametrami, na przykład poziomem AFP (Ng i in. 2018).

Co więcej analiza ctDNA w płynnej biopsji pozwala określić jego molekularne cechy w kontekście HCC: mutacje punktowe, zmiany liczby kopii, rearanżacje genów i sekwencjonowanie całego genomu. Dotychczas w tym celu opracowano wiele technik analizy ctDNA charakteryzujących się wysoką czułością i swoistością. Dotyczy to również poszczególnych subpopulacji komórek rakowych, które ze względu na ograniczony badany obszar nie mogą być wyodrębnione podczas standardowej biopsji wątroby (Bhan i in. 2019, Ye i in. 2019). Co istotne analiza ctDNA metodami PCR i sekwencjonowaniem nowej generacji pozwala na wykrycie ewentualnych aberracji, które mogą powodować oporność na określoną terapię celowaną HCC. Dzięki temu możliwe jest spersonalizowanie terapii dla danego pacjenta (Ye i in. 2019).

W 2018 roku Cohen i in. w swoim badaniu dowiedli, że przy pomocy sekwencjonowania w osoczu 16 genów oraz 8 białek surowicy związanych z nowotworem można ocenić prawdopodobieństwo zachorowania na HCC. Czułość i swoistość zastosowanej metody wynosiły blisko 100%, ale defektem badania było to, że w skład próby kontrolnej wchodziły wyłącznie osoby zdrowe. W przyszłości próbę kontrolną należałoby rozszerzyć na przykład o osoby z przewlekłym zapaleniem wątroby.

Z racji tego, że zmiany molekularne oparte na metylacji DNA odgrywają kluczową rolę w kancerogenezie, badania wykazały, że nieprawidłowa metylacja cfDNA w przypadku HCC wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przerzutowania i nawrotów raka oraz guzami większych rozmiarów, a w związku z tym gorszym rokowaniem. Analiza metylacji cfDNA oparta na sekwencjonowaniu całego genomu pozwala na odróżnienie pacjentów z HCC od tych z wirusowym zapaleniem wątroby typu B lub C oraz ze stłuszczeniową chorobą wątroby (Ng i in. 2018).

Niestety niektóre badania dowodzą, że podwyższone stężenie cfDNA nie jest swoiste dla HCC, gdyż może występować również w przypadku cukrzycy, ostrego urazu, udaru czy ciąży (Ng i in. 2018). Co więcej pobierane na drodze płynnej biopsji cfDNA jest mieszaniną DNA pochodzącego ze wszystkich lokalizacji guza, zarówno miejscowych jaki i przerzutów, a identyfikacja



pochodzenia poszczególnych DNA stanowi dla badaczy wyzwanie (Bhan i in. 2019). miRNA to krótkie niekodujące RNA biorące udział w potranslacyjnej regulacji ekspresji genów, a w związku z tym modulujące procesy patofizjologiczne, w tym te związane z rozwojem nowotworów. W krwioobiegu mogą być związane z białkami lub zamknięte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. W HCC szczególną wartość diagnostyczną i prognostyczną odgrywają odmiany miR-122 i miR-192. Podobnie jak w przypadku cfDNA panel kilku różnych odmian miRNA czy też połączenie ich z parametrami klinicznymi zwiększa czułość w diagnostyce HCC. Pozwala to zróżnicować pacjentów z HCC od tych cierpiących na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby czy marskość wątroby (Mocan i in. 2020). Przeprowadzono badanie oparte na modelu diagnostycznym wykorzystującym poziomy ekspresji 8 odmian miRNA. Model ten pozwolił na zdiagnozowanie HCC wśród osób z grup podwyższonego ryzyka. Czułość i swoistość wynosiły odpowiednio 97,7% i 94,7%. Umożliwiło to wykrycie aż 98% przypadków HCC w pierwszym stadium choroby (Yamamoto i in. 2019). Podobnie jak pozostałe biomarkery diagnostyczne w płynnej biopsji, stężenie miRNA również odzwierciedla cechy kliniczne i właściwości guza. W jednym z badań zaobserwowano, że podwyższone stężenie miR-21 i miR-224 koreluje z większym rozmiarem guza, wyższym stopniem zaawansowania HCC, obecnością przerzutów odległych i nawrotów HCC (Mocan i in. 2020).

## ZALETY DIAGNOSTYKI Z UŻYCIEM PŁYNNNEJ BIOPSJI

Płynna biopsja jest powtarzalną i minimalnie inwazyjną alternatywą dla biopsji tkanek. Standardowa biopsja wątroby połączona z badaniem histopatologicznym określane są jako złoty standard w diagnostyce HCC. Niestety posiadają wiele wad. Przede wszystkim stanowią dla pacjenta badanie inwazyjne. Wynika to z faktu, iż biopsja chirurgiczna niesie za sobą ryzyko wystąpienia powikłań takich jak zakażenia, przejściowa bakteriemia, krwawienia (w tym krwotok śródotrzewnowy), zapalenie otrzewnej, odma opłucnowa. Możliwy jest też miejscowy rozsiew komórek nowotworowych igłą biopsyjną w kanale wkłucia (Khalifa i Rockey 2020). W związku z tym standardowa biopsja wątroby nie może być przeprowadzana rutynowo. Jest ona wykonywana jedynie przy wystąpieniu ściśle określonych wskazań, zazwyczaj jednorazowo, na początkowym etapie diagnostyki HCC. Informacje na temat procesu nowotworowego uzyskane podczas przeprowadzania tych badań dotyczą tylko jednego, określonego punktu czasowego. Natomiast płynna biopsja z



krwi obwodowej z uwagi na minimalną inwazyjność jest badaniem powtarzalnym. Daje to możliwość pozyskiwania informacji na temat guza w czasie rzeczywistym, a co za tym idzie poznany jest cały obraz ewolucji od stanu przednowotworowego do stadium nowotworu złośliwego wraz z szybkością jego progresji. Jest to szczególnie przydatne na etapie leczenia HCC, ponieważ ułatwia monitorowanie odpowiedzi na zastosowaną terapię.

Dodatkowo warto zaznaczyć, iż płynna biopsja to szybka metoda diagnostyczna HCC. Dotyczy to zarówno etapu pobrania krwi obwodowej jak i jej analizy. Natomiast biopsja wątroby połączona z badaniem histopatologicznym niewątpliwie stanowią badania czasochłonne, co nie sprzyja szybkiemu postawieniu diagnozy i rozpoczęciu leczenia (Singh i in. 2020).

Ponadto podczas standardowej biopsji chirurgicznej można ocenić jedynie ograniczony obszar tkanki, co nie pozwala na uzyskanie kompletnego obrazu HCC. W płynnej biopsji dokonywana jest analiza molekularnych składników uwalnianych z całego obszaru guza, co daje szerszy ogląd na sytuację danego pacjenta (Bhan in. 2019).

## PODSUMOWANIE

Rozpoznanie HCC we wczesnym stadium zaawansowania znacząco poprawia rokowanie pacjentów. W związku z tym słuszne wydaje się poszukiwanie metod diagnostycznych umożliwiających jak najwcześniejsze wykrywanie tego nowotworu. Płynna biopsja może stanowić jedną z prostszych metod badania przesiewowego w kierunku HCC u pacjentów z istotnymi czynnikami ryzyka lub utrudnionym dostępem do opieki medycznej, zważywszy na to, że ponad 80% przypadków HCC występuje w krajach na niskim i średnim poziomie rozwoju. Ponadto płynna biopsja może wspomagać monitorowanie stanu pacjenta i odpowiedzi na zastosowane leczenie oraz określać ryzyko nawrotu raka. Jednak wciąż wymagane są dokładniejsze, wielośrodkowe badania nad diagnostyką HCC z użyciem płynnej biopsji wraz z ujednoceniem stosowanych technik.

## BIBLIOGRAFIA

Bhan I. i in.

2019 *Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma. Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches [Internet]*, “Cham (CH): Humana Press”, Chapter 7.

Chen VL. i in.

2020 *Utility of Liquid Biopsy Analysis in Detection of Hepatocellular Carcinoma, Determination of Prognosis, and Disease Monitoring: A Systematic Review*, "Clin Gastroenterol Hepatol", 18(13):2879-2902.e9.

Cohen JD. i in.

2018 *Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test*, "Science", 359(6378):926-930.

Corcoran RB. i Chabner BA.

2018 *Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment*, "N Engl J Med", 379(18):1754-1765.

Haber DA. i Velculescu VE.

2014 *Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA*, "Cancer Discov", 4(6):650-61.

Khalifa A. i Rockey DC.

2020 *The utility of liver biopsy in 2020*, "Curr Opin Gastroenterol", 36(3):184-191.

Micalizzi DS., Maheswaran S. i Haber DA.

2017 *A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology*, "Genes Dev", 31(18):1827-1840.

Mocan T i in.

2020 *Liquid Biopsies in Hepatocellular Carcinoma: Are We Winning?*, "J Clin Med", 9(5):1541.

Ng CKY. i in.

2018 *Circulating Cell-Free DNA in Hepatocellular Carcinoma: Current Insights and Outlook*, "Front Med (Lausanne)", 5:78.

Sagnelli E. i in.

2020 *Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma*, "Infection", 48(1):7-17.

Shen J. i in.

2018 *High Epithelial Cell Adhesion Molecule-Positive Circulating Tumor Cell Count Predicts Poor Survival of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Transcatheter Arterial Chemoembolization*, "J Vasc Interv Radiol", 29(12):1678-1684.

Singal AG., Lampertico P. i Nahon P.

2020 *Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends*, "J Hepatol", 72(2):250-261.

Singh G i in.

2020 *Biomarkers for hepatocellular cancer*, "World J Hepatol", 12(9): 558-573.

Sun YF. i in.

2013 *Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection*, "Hepatology", 7(4):1458-68.

Sun C. i in.

2017 *The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis*, "Medicine (Baltimore)", 96(29):e7513.

Tzartzeva K. i in.

2018 *Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis*, "Gastroenterology", 154(6):1706-1718.e1.

Villanueva A.

2019 *Hepatocellular Carcinoma*, "N Engl J Med", 380(15):1450-1462.

von Felden J. i in.

2017 *Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection*, "Oncotarget", 8(52):89978-89987.

Yamamoto Y. i in.

2019 *Highly Sensitive Circulating MicroRNA Panel for Accurate Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Liver Disease*, "Hepatol Commun", 4(2):284- 297.

Yang JD. i in.

2019 *A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management*, "Nat Rev Gastroenterol Hepatol", 16(10):589-604.

Ye Q i in.

2019 *Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA*, "Mol Cancer", 18(1):114.

Zhang T. i in.

2020 *Diagnostic performance of blood-based liquid biopsies in hepatocellular carcinoma: A protocol for systematic review and meta-analysis*, "Medicine (Baltimore)", 99(41):e22594.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf> [dostęp: 25.10.21r.]

[https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-risk-factors-for-hepatocellular-carcinoma?search=liver%20carcinoma&topicRef=3597&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-risk-factors-for-hepatocellular-carcinoma?search=liver%20carcinoma&topicRef=3597&source=see_link) [dostęp: 25.10.21r.]

[https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-hepatocellular-carcinoma?search=hepatocellular%20carcinoma&source=search\\_result&selectedTitle=2~150&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-hepatocellular-carcinoma?search=hepatocellular%20carcinoma&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2) [dostęp: 25.10.21r.]

<http://onkologia.org.pl/nowotwory-watroby/> [dostęp: 25.10.21r.]



MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>, AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>,  
NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>, MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>,  
EMILIA NOWAK<sup>(1)</sup>, ADRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>,  
MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

<sup>(2)</sup> KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII I METODOLOGII  
BADAŃ KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

## METFORMINA W TERAPII ZESPOŁU POLICYSTYCZNYCH JAJNIKÓW

### ABSTRAKT

Zespół policystycznych jajników jest heterogennym schorzeniem endokrynologiczno-ginekologicznym charakteryzującym się hiperandrogenizmem oraz zaburzeniami cyklu miesięczkowego. Choroba dotyka kobiet nastoletnich oraz w wieku reprodukcyjnym, znacząco obniżając ich komfort życia. Z uwagi na wiele manifestacji klinicznych, wymaga ona skutecznego i efektywnego leczenia, które złagodzi liczne objawy zaburzeń hormonalnych oraz umożliwi ewentualną prokreację. W tej pracy pragniemy przedstawić aktualne fakty oraz doniesienia na temat metforminy, a także jej rolę w farmakoterapii PCOS. Analiza literatury i badań została przeprowadzona w oparciu o bazy danych PubMed, Google Scholar oraz Scopus. Zaburzenia hormonalne w PCOS prowadzą do insulinooporności, otyłości, trądziku. Dolegliwości o tle ginekologicznym, takie jak anowulacja oraz liczne cysty na jajnikach, skutkują trudnościami z zajściem w ciążę, często prowadząc do niepłodności. Metformina, charakteryzująca się najbezpieczniejszym działaniem antyhiperglikemicznym, skutecznie zmniejsza oporność pacjentek na insulinę oraz umożliwia redukcję masy ciała. Co więcej, udowodniono jej korzystny wpływ na większość nieprawidłowości metabolicznych towarzyszących chorobie, w tym regulację stężeń hormonów oraz cholesterolu, a także zmniejszenie stężenia białka stanu zapalnego. Zaobserwowano pozytywny wpływ metforminy na zmniejszenie częstości samoistnych poronień i przedwczesnych porodów. Zauważono również możliwy efekt minimalizujący częstość występowania wad rozwojowych płodu. Związek stosowania metforminy oraz zmniejszenia powikłań ciążowych w postaci cukrzycy ciążowej czy preeklampsji wymaga dalszych badań klinicznych. Pomimo zwiększania szans na uzyskanie ciąży, metforminy nie zaleca się stosować jako lek I rzutu w terapii niepłodności u chorych na PCOS. Podsumowując przytoczone źródła oraz naszą interpretację, uważamy, że metformina to bezpieczna i efektywna opcja terapeutyczna PCOS, która zmniejsza dolegliwości metaboliczne

oraz znacząco poprawia komfort życia kobiet. Jest duża nadzieja na poszerzenie jej skuteczności o zakres ginekologiczny przy farmakoterapii pacjentek w ciąży lub jako dodatkowy wybór w leczeniu niepłodności. To spektrum wymaga jednak zebrania większej ilości danych, poszerzenia zaplecza badawczego poprzez analizę przypadków oraz wykonania wielu prób klinicznych.

**Słowa kluczowe:** PCOS; zespół policystycznych jajników; hiperandrogenizm; anowulacja; niepłodność; metformina

## ABSTRACT

The polycystic ovarian syndrome is a heterogenous endocrine-gynaecological disorder characterised by hyperandrogenism and menstrual cycle abnormalities. The disease affects reproductive-aged women and adolescent girls, significantly reducing their quality of life. Due to multiple clinical manifestations, it requires both effective and efficient treatment that will alleviate numerous symptoms of hormonal disorders and enable procreation. We aim to present the current facts and reports on metformin as well as its role in the pharmacotherapy of PCOS. The analysis of literature and research was conducted by using the PubMed, Google Scholar, and Scopus databases. Hormonal disorders in PCOS lead to insulin resistance, obesity and acne. Gynaecological abnormalities such as anovulation and numerous ovarian cysts prevent patients from impregnation, often causing infertility. Metformin, because of its safest antihyperglycemic effect, efficiently reduces insulin resistance and enables weight reduction. Moreover, it is proven to have a beneficial influence on most of the metabolic abnormalities accompanying the disease, including the regulation of hormone and cholesterol levels and the reduction of inflammation. Metformin's positive effect in reducing the incidence of spontaneous abortions and premature births has been observed. A possible impact on minimising the incidence of foetal malformations was also noted. The correlation between the use of metformin and the reduction of pregnancy complications, for instance gestational diabetes or preeclampsia, requires further clinical trials. Despite increasing chances for impregnation, metformin is not recommended as first-line drug in treatment of infertility in patients with PCOS. In conclusion, we believe that metformin is a safe and effective therapeutic option that reduces metabolic ailments and significantly improves the quality of life of women with PCOS. There is a great chance its effectiveness will be extended by gynaecological scope in the pharmacotherapy of pregnant patients or as an additional choice in the treatment of infertility. However, this spectrum requires gathering more data, expanding the research of case studies, and multiple clinical trials.

**Key words:** PCOS; polycystic ovarian syndrome; hyperandrogenism; anovulation; infertility; metformin

## WSTĘP

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest chorobą ze spektrum endokrynologiczno- ginekologicznego, która charakteryzuje się zaburzeniami cyklu miesięczkowego, zwiększonym stężeniem hormonów androgenowych oraz występowaniem licznych torbieli na jajnikach. Schorzenie dotyczy kobiet w wieku reprodukcyjnym (8-13%) oraz nastoletnich dziewcząt (6- 18%) (Witchel, Oberfield i Peña 2019). Jest to najczęstsza przyczyna niepłodności z powodu braku owulacji u płci żeńskiej (Khan, Ullah i Basit 2019). Udowodniono, że różnorodność postaci oraz manifestacji klinicznych jest spowodowana wieloma czynnikami etiologicznymi oraz skomplikowanymi procesami patofizjologicznymi powodującymi zaburzenia endokrynologiczno-metaboliczne obserwowane w schorzeniu (Teede i in. 2018). W związku z tym, wyodrębniono cztery fenotypy PCOS, które różnią się współwystępowaniem hiperandrogenizmu, anowulacji oraz policystycznych jajników stwierdzonych w badaniu USG (Pehlivanov i Orbetzova 2007).

Charakterystycznymi objawami choroby są depresja, hiperinsuline mia, hirsutyzm, łysienie androgenowe, niepłodność, otyłość, trądzik, stany lękowe, ubogie krwawienia miesięczne lub całkowite zatrzymanie cyklu miesięczkowego (Timpatanapong i Rojanasakul 1997, Morgante i in. 2015, Greenwood i in. 2018, Wu i in. 2019). Trafne rozpoznanie PCOS bywa utrudnione poprzez podobieństwo symptomów i obrazów klinicznych wywoływanych przez inne zaburzenia endokrynologiczne. Szybka i skuteczna diagnoza zmniejsza ryzyko wystąpienia u chorych powikłań metabolicznych oraz naczyniowo- sercowych. Dodatkowo umożliwia ona natychmiastowe wdrożenie działań prozdrowotnych, leczenia farmakologicznego lub operacyjnego oraz świadomego planowania prokreacji z uwzględnieniem wieku oraz potrzeb pacjentek (Goodman i in. 2015). Opóźnienie lub zaniechanie postawienia diagnozy może skutkować znaczącym zmniejszeniem możliwości terapeutycznych, pogorszeniem stanu klinicznego oraz jakości życia kobiet (Gibson-Helm i in. 2017).

Celem pracy jest przedstawienie działania, roli oraz korzyści ze stosowania metforminy w farmakoterapii pacjentek leczonych na zespół policystycznych jajników. Analiza wraz z interpretacją literatury i źródeł została przeprowadzona przy użyciu baz PubMed, Google Scholar oraz Scopus.



## WŁAŚCIWOŚCI I DZIAŁANIE METFORMINY

Metformina jest lekiem zmniejszającym stężenie glukozy we krwi, pochodną biguanidu. Mechanizm jej działania polega na zmniejszeniu wytwarzania glukozy w wątrobie poprzez zahamowanie glukoneogenezy i glikogenolizy, zwiększeniu wrażliwości tkanek na insulinę (co zwiększa obwodowy wychwyt i tkankowe zużycie glukozy), zahamowaniu wchłaniania glukozy i innych heksoz w jelicie cienkim oraz obniżeniu osoczowego stężenia wolnych kwasów tłuszczowych. Aktywacja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP odgrywa znaczącą rolę w pożądanym efekcie antyhiperglikemicznym. Najnowsze doniesienia stanowią, że lek ten ma również właściwości przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne, przeciwwązkowe, profibrynolityczne, a nawet przeciwnowotworowe (Zhou i in. 2018, Lv i Guo 2020). Metformina efektywnie zmniejsza insulinoporność oraz koryguje hiperglikemię przy jednoczesnym niepowodowaniu hipoglikemii lub zwiększenia masy ciała, co uczyniło ją najczęściej zalecanym lekiem w terapii cukrzycy typu 2. Znajduje ona również szerokie zastosowanie w leczeniu PCOS (Bailey 2017).

Badanie farmakokinetyki metforminy wykazały brak metabolizmu w wątrobie oraz wydalanie w niezmienionej postaci przez nerki z moczem w ciągu 12 godzin (Wilcock i Bailey 1994). Dostępność biologiczna leku po podaniu doustnym wynosi 50-60% i jest on wchłaniany głównie w jelicie cienkim (Graham i in. 2011).

Najbardziej kontrowersyjnym doniesieniem o działaniu niepożądanym metforminy jest powodowanie kwasicy mleczanowej, która może wystąpić na skutek kumulacji leku lub jego przedawkowania, zwiększenia wytwarzania mleczanu lub zwiększonego jej zużycia (Lalau 2010). Zaobserwowano znaczącą różnicę we wpływie metforminy na metabolizm mleczanu w porównaniu do pozostałych biguanidów. Z uwagi na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne metformina słabo wiąże się z błonami mitochondrialnymi, przez co nie hamuje procesu fosforylacji oksydacyjnej, tym samym nie wpływając na przemianę i utlenianie mleczanu (Lalau i Race 2001). W rezultacie, częstość występowania kwasicy metabolicznej związanej ze stosowaniem metforminy jest około 10-20 razy mniejsza niż w przypadku leczenia innym biguanidem - na przykład fenforminą (DeFronzo i Goodman 1995, Misbin 2004). W 2003 roku Salpeter S.R. i in. w metaanalizie 194 badań kohortowych dotyczących ponad 30000 pacjentów z cukrzycą typu 2, opublikowanych w latach 1959-2002, wykazał brak wyraźnego związku między stosowaniem metforminy a zwiększonym ryzykiem kwasicy mleczanowej lub wzrostem stężenia

mleczanu w krwi, w porównaniu z innym leczeniem hipoglikemizującym (Salpeter i in. 2003).

Oprócz kwasicy mleczanowej, stosowanie metforminy może powodować zaburzenia metabolizmu i odżywiania. U pacjentów bardzo często występują dolegliwości dotyczące układu pokarmowego: nudności, wymioty, bóle brzucha i utrata apetytu (McCreight, Bailey i Pearson 2016).

Stosowanie metforminy jest wskazane nie tylko w terapii cukrzycy typu 2, ale również PCOS, stanu przedcukrzycowego, insulinooporności, hiperlipidemii. Najnowsze doniesienia sugerują możliwy pozytywny wpływ połączenia metforminy z insuliną w celu złagodzenia postępu choroby Alzheimer'a (Grzybowska, Bober i Olszewska 2011).

Terapia metforminą jest przeciwwskazana przy nadwrażliwości na którykolwiek składnik preparatu lub przy niewydolności nerek u osób z eGFR mniejszym niż 30 ml/min. Leczenie chorych z eGFR mieszczącym się w granicach 60-30 ml/min jest dopuszczalne, ale powinno się odbywać pod ścisłą kontrolą funkcji nerek. Zaleca się również ostrożność w terapii pacjentów z niewydolnością serca lub wątroby. Metforminę należy odstawić przed badaniami z kontrastem zawierającym jod oraz planowanym znieczuleniem (Flory i Lipska 2019).

## ROLA METFORMINY W TERAPII PCOS

Metformina jest jednym z leków stosowanych w terapii PCOS w celu zmniejszenia insulinooporności oraz zwiększenia płodności pacjentek (Pasquali i in. 2000). Zaobserwowano jej pozytywny wpływ na minimalizowanie większości zaburzeń metabolicznych, których efektami są zaburzenia cyklu miesiączkowego, hirsutyzm, wzrost masy ciała czy stężenia cholesterolu we krwi (Moggetti i in. 2000). Zalecane dawkowanie metforminy w terapii PCOS mieści się w zakresie 850-1700 mg na dzień w zależności od badań (Wang i in. 2017).

W 2001 roku Glueck C. i in. przeprowadził badanie kliniczne na 11 nastoletnich pacjentkach chorujących na PCOS oraz doświadczających zaburzeń miesiączkowania. Zastosowano połączenie terapii metforminą z wysokobiałkową dietą. Wyniki badania wykazały uregulowanie cyklu miesiączkowego, przywrócenie owulacji, spadek masy ciała, wzrost stężeń estradiolu i progesteronu ( $p=0.0014, 0.027$ ), spadek stężenia całkowitego cholesterolu ( $p=0.026$ ) oraz spadek stężenia testosteronu we krwi ( $p=0.068$ ) u większości badanych pacjentek (80-90%). Wyniki były istotne statystycznie (Glueck i in. 2001).

Morin-Papunen L. i in. w 2003 roku przeprowadzili badanie kliniczne w celu zbadania wpływu terapii metforminą na wyjściowo zwiększony poziom białka CRP u kobiet chorujących na PCOS. Uwzględniono otyłość jako możliwą przyczynę zmiany poziomu białka ostrej fazy, w związku z czym do badania włączono 20 kobiet z BMI  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> oraz 32 kobiet z BMI  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup>. Randomizację uzyskano, podając pacjentkom metforminę albo tabletki antykoncepcyjne [OCP] zawierające etynyloestradiol. Stężenia CRP były początkowo znacznie wyższe u kobiet otyłych [4.08 +/- 0.53 (SE) vs. 1.31 +/- 0.28 mg/l;  $p < 0.001$ ], co powiązano ze zwiększoną masą ciała badanych. Może to wskazywać na równoczesny wpływ zarówno PCOS, jak i otyłości na zwiększone stężenie CRP we krwi. W trakcie 6-miesięcznej terapii metforminą poziom białka CRP znacząco spadł ze średniego poziomu 3.08 +/- 0.7 mg/l do 1.52 +/- 0.26 mg/l, co w szczególności zaobserwowano u pacjentek otyłych ( $p < 0.001$ ). Terapia OCP przyniosła odwrotne efekty, uzyskując wzrost ze stężenia średnio 2.91 +/- 0.68 mg/l do 4.58 +/- 0.84 mg/l ( $p < 0.001$ ). Potwierdza to pozytywny wpływ farmakoterapii metforminą na zaburzenia metaboliczne oraz stan zapalny obserwowalne w przebiegu PCOS oraz sugeruje możliwe wykorzystanie stężenia białka CRP lub innych białek ostrej fazy jako markerów efektywności stosowanego leczenia (Morin-Papunen i in. 2003).

Metaanaliza Lord J i in. z 2003 roku oraz badanie kliniczne Glueck C. i in. z 2013 roku udowodniły, że oprócz pozytywnego wpływu na dolegliwości endokrynologiczne, metformina stosowana przed i w trakcie ciąży zmniejsza częstość samoistnych poronień, powikłań położniczych oraz wad rozwojowych u płodu, a także ryzyka wystąpienia cukrzycy ciążowej u kobiety. (Lord, Flight i Norman 2003, Glueck i in. 2013) W 2016 roku Xingrong Tan i in. przeprowadził metaanalizę 127 publikacji dotyczących korzyści z farmakoterapii metforminą w trakcie ciąży. Wyniki pokazały znaczny spadek liczby poronień oraz przedwczesnych porodów. Nie wykazano statystycznie istotnych danych dotyczących częstości występowania wad rozwojowych u płodu oraz wagi urodzeniowej płodu. Zaproponowano konieczność przeprowadzenia randomizowanych badań kontrolnych dotyczących efektów leczenia metforminą na występowanie cukrzycy ciążowej, nadciśnienia lub preeklampsji (Tan i in. 2016).

W 2002 roku Glueck C. i in. przeprowadzili badanie kliniczne w celu zbadania możliwego wpływu metforminy na zredukowanie liczby spontanicznych poronień w pierwszym trymestrze ciąży oraz na zwiększenie liczby żywych urodzeń bez wad rozwojowych. 72 kobiety z zaburzeniami miesięczkowymi w przebiegu PCOS stosowały 2.55 g metforminy dziennie. Wyniki

ukazały 75% żywych urodzeń bez wad rozwojowych płodu, 17 % poronień w pierwszym semestrze oraz 8% prawidłowych USG bez widocznych wad rozwojowych w przebiegu trwających ciąży powyżej 13 tygodni ( $p < 0.0001$ ). Nie zaobserwowano przypadków kwasicy mleczanowej lub hipoglikemii. Stężenie insuliny na czczo w trakcie pierwszego trymestru było zmienną z ilorazem szans 1.32 (na każde 5  $\mu\text{U/ml}$  wzrostu insuliny), 95% CI 1.09-1.60 ( $P = 0.005$ ). Cukrzyca ciążowa rozwinęła się w 4% ciąży w porównaniu do 26% ciąży przed terapią ( $p=0.025$ ). Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu na wagę urodzeniową lub długość ciała płodów (Glueck i in. 2002).

W metaanalizie z 2012 roku Tang T. i in. przeanalizowali 44 badania kliniczne, w których wzięło udział 3992 kobiet poddanych terapii metforminą. Zaobserwowano zwiększenie liczby ciąży w porównaniu do placebo. Nie zauważono jednak bezpośredniego wpływu metforminy na zwiększenie liczby żywych urodzeń (Tang i in. 2012). Według wytycznych Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine z 2017 roku monoterapia metforminą zwiększa częstość owulacji u kobiet chorujących na PCOS w porównaniu do placebo, jednak nie powinna być ona stosowana jako lek I rzutu przy anowulacji z uwagi na większą efektywność klomifenu cytrynianu lub letrozolu.

Terapia PCOS metforminą stwarza wiele możliwości terapeutycznych, ponieważ lek ten wykazuje szerokie działanie w zakresie zarówno endokrynologicznym, jak i ginekologicznym. Poza kontrolą glikemii, metformina okazuje się łagodzić większość metabolicznych objawów choroby. Obserwuje się również pozytywne działania leku w farmakoterapii kobiet ciężarnych oraz planujących ciążę.

## PODSUMOWANIE

Zespół policystycznych jajników to choroba endokrynologiczno-ginekologiczna prezentująca wiele obrazów klinicznych, z których każdy może sprawiać trudności diagnostyczne i terapeutyczne. Nie wszystkie z wielu czynników powodujących schorzenie zostały poznane, co utrudnia ustalenie efektywnego leczenia przyczynowego. PCOS wywołuje uciążliwe objawy z grona zaburzeń metabolicznych, takie jak anowulacja, hiperandrogenizm czy otyłość. Liczne manifestacje choroby wymagają skutecznego leczenia jak najmniejszą liczbą substancji w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Jednym ze sprawdzonych wyborów terapeutycznych w PCOS pozostaje metformina - lek I rzutu w terapii cukrzycy typu II.

Metformina jest lekiem o szerokim zastosowaniu w terapii chorób endokrynologiczno- metabolicznych. Jej działanie antyhiperglikemiczne zapewnia pewną i efektywną kontrolę nad stężeniem glukozy we krwi, masą ciała oraz wrażliwością na insulinę. W stanach przedcukrzycowych jest to świetna forma prewencji przed rozwinięciem się pełnoobjawowej cukrzycy. Właściwości przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne czy przeciwzakrzepowe to dodatkowe korzyści stosowania metforminy, które zapewniają równoczesną protekcję układu naczyniowo-sercowego. Terapia biguanidami wiąże się z ryzykiem kwasicy mleczanowej w wyniku nadmiernej kumulacji substancji, jej przedawkowania lub zaburzeń metabolizmu mlecza. Udowodniono jednak małe prawdopodobieństwo wystąpienia działań niepożądanych w wyniku stosowania metforminy w porównaniu z innymi pochodnymi biguanidów. Farmakoterapia metforminą jest uważana za bezpieczną z uwagi na brak wywoływania efektu hipoglikemizującego (również u osób zdrowych) lub hiperinsulinemicznego. Głównym przeciwwskazaniem do stosowania leku jest niewydolność nerek, z uwagi na jego wydalanie z moczem, jednakże kontynuacja terapii jest już możliwa przy eGFR większym niż 30 ml/min.

Zastosowanie metforminy w farmakoterapii PCOS zapewnia chorym zmniejszenie insulinooporności, utrzymanie prawidłowej masy ciała, a także uregulowanie cyklu miesiączkowego. U pacjentek zaobserwowano normalizację stężeń estradiolu, progesteronu, cholesterolu, a także testosteronu. Zauważono pozytywny wpływ metforminy na obniżenie stężenia białka stanu zapalnego CRP, co sugeruje możliwość wykorzystania go jako markera efektywności stosowanego leczenia. Endokrynologiczno-metaboliczne efekty działania metforminy zostały szeroko zbadane i uznane za skuteczne w terapii PCOS. Natomiast wpływ leku na manifestacje ginekologiczne choroby do dziś jest kwestią badań. Doniesienia o zmniejszeniu liczby samoistnych poronień, przedwczesnych porodów lub występowania wad rozwojowych płodów pozostają obiecujące, jednak wymagają przeprowadzenia dalszych obserwacji. Możliwy efekt redukcji częstości powikłań ciążowych w postaci cukrzycy ciążowej, nadciśnienia tętniczego czy preeklampsji jest kwestią sporną wymagających większej ilości badań klinicznych. Zaobserwowano znaczący wpływ metforminy na zwiększenie liczbę ciąż w porównaniu do placebo, jednak nie dotyczy to liczby żywych urodzeń. Pomimo zdolności zwiększenia częstości owulacji, uważa się, że metformina nie powinna być lekiem I wyboru w terapii niepłodności w PCOS. Świadczy to o konieczności ustalania dodatkowych rozwiązań terapeutycznych, które swoim działaniem będą pokrywały wszystkie dolegliwości chorych, z uwzględnieniem ich indywidualnych potrzeb

i trosk. Niemniej jednak, metformina pozostaje świetnym i sprawdzonym wyborem w terapii zaburzeń metabolicznych prezentowanych w przebiegu PCOS z uwagi na swoje liczne pozytywne działania oraz stosunkowo niewielkie ryzyko powikłań przy stosowaniu.

## BIBLIOGRAFIA

Bailey CJ.

2017 *Metformin: historical overview*, "Diabetologia", 60(9):1566-1576.

DeFronzo RA. i Goodman AM.

1995 *Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group*, "N Engl J Med", 333(9):541-9.

Flory J i Lipska K.

2019 *Metformin in 2019*, "JAMA", 321(19):1926-1927.

Gibson-Helm M. i in.

2017 *Delayed Diagnosis and a Lack of Information Associated With Dissatisfaction in Women With Polycystic Ovary Syndrome*, "J Clin Endocrinol Metab", 102(2):604-612.

Glueck CJ. i in.

2013 *Effects of metformin-diet intervention before and throughout pregnancy on obstetric and neonatal outcomes in patients with polycystic ovary syndrome*, "Curr Med Res Opin", 29(1):55-62.

2001 *Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrheic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS)*, "J Adolesc Health", (3):160-9.

2002 *Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin*, "Hum Reprod", 17(11):2858-64.

Goodman NF. i in.,

2015 *American Association of Clinical Endocrinologists (AACE); American College of Endocrinology (ACE); Androgen Excess and PCOS Society (AES). American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society Disease State Clinical Review: Guide to the best practices in the evaluation and treatment of Polycystic Ovary Syndrome—Part 1*, "Endocr Pract", 21(11):1291-300.

Graham GG. i in.

2011 *Clinical pharmacokinetics of metformin*, "Clin Pharmacokinet", 50(2):81-98.

Greenwood EA. i in.

2018 *Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Reproductive Medicine Network. Insulin resistance is associated with depression risk in polycystic ovary syndrome*, "Fertil Steril", 110(1):27-34.

Grzybowska M., Bober J. i Olszewska M.

2011 *Metformina - mechanizmy działania i zastosowanie w terapii cukrzycy typu 2 [Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus]*, "Postepy Hig Med Dosw (Online)", 65:277-85.

Khan MJ., Ullah A. i Basit S.

2019 *Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives*, "Appl Clin Genet", 12:249-260.

Lalau JD.

2010 *Lactic Acidosis Induced by Metformin*, "Drug-Safety", 33, 727-740

Lalau JD. i Race JM.

2001 *Lactic acidosis in metformin therapy: searching for a link with metformin in reports of 'metformin-associated lactic acidosis'*, "Diabetes Obes Metab", 3(3):195-201.

Lord JM., Flight IH. i Norman RJ.

2003 *Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome*, "Cochrane Database Syst Rev", (3) Update in: "Cochrane Database Syst Rev", 2009;(3)

Lv Z. i Guo Y.

2020 *Metformin and Its Benefits for Various Diseases*, "Front Endocrinol (Lausanne)", 11:191.

McCreight LJ., Bailey CJ. i Pearson ER.

2016 *Metformin and the gastrointestinal tract*, "Diabetologia", 59(3):426-35.



Misbin RI.

2004 *The phantom of lactic acidosis due to metformin in patients with diabetes*, "Diabetes Care", 27(7):1791-3.

Moggetti P. i in.

2000 *Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation*, "J Clin Endocrinol Metab", 85(1):139-46.

Morgante G. i in.,

2015 *Polycystic ovary syndrome (PCOS) and hyperandrogenism: the role of a new natural association*, "Minerva Ginecol", 67(5):457-63.

Morin-Papunen L. i in.

2003 *Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome*, "J Clin Endocrinol Metab", 88(10):4649-54.

Pasquali R. i in.

2000 *Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome*, "J Clin Endocrinol Metab", 85(8):2767-74.

Pehlivanov B. i Orbetzova M.

2007 *Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome in a Bulgarian population*, "Gynecol Endocrinol", 23(10):604-9.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.

2017 *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Role of metformin for ovulation induction in infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a guideline*, "Fertil Steril", 108(3):426-441.

Salpeter SR. i in.

2003 *Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis*, "Arch Intern Med", 163(21):2594-602.

Tan X. i in.

2016 *Effect of metformin treatment during pregnancy on women with PCOS: a systematic review and meta-analysis*, "Clin Invest Med", 39(4):E120-31.



Tang T. i in.

2012 *Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro- inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility*, "Cochrane Database Syst Rev", (5) Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2017 Nov 29;11

Teede HJ. i in.

2018 *International PCOS Network. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome*, "Fertil Steril", 110(3):364-379.

Timpatanapong P. i Rojanasakul A.

1997 *Hormonal profiles and prevalence of polycystic ovary syndrome in women with acne*, "J Dermatol", 24(4):223-9.

Wang YW. i in.

2017 *Metformin: a review of its potential indications*, "Drug Des Devel Ther", 11:2421-2429.

Wilcock C. i Bailey CJ.

1994 *Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse*, "Xenobiotica", 24(1):49-57.

Witchel SF., Oberfield SE. i Peña AS.

2019 *Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment With Emphasis on Adolescent Girls*, "J Endocr Soc", 3(8):1545-1573.

Wu ZH. i in.

2019 *Prostatic-specific antigen (PSA) levels in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a meta-analysis*, "J Ovarian Res", 12(1):94.

Zhou J. i in.

2018 *Metformin: An Old Drug with New Applications*, "Int J Mol Sci", 19(10):2863.

NATALIA OSIAŁ, MAGDALENA OSTOJSKA,  
EMILIA NOWAK, ADRIANNA GORECKA, MARIA GROMEK,  
MARTYNA KŁOSIŃSKA, AGNIESZKA KACZYŃSKA

STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

# ZASTOSOWANIE MELATONINY W LECZENIU RAKA WĄTROBOWOKOMÓRKOWEGO

## ABSTRAKT

Nowotwór wątroby jest 6. najczęściej diagnozowanym nowotworem i 2. wiodącą przyczyną umieralności z powodu nowotworu na świecie. 65% przypadków raka wątroby stanowi rak wątrobowokomórkowy (HCC). Dlatego, ważnym celem współczesnej medycyny jest opracowanie nowych leków w terapii HCC, o większej skuteczności i mniejszych skutkach ubocznych. Melatonina (MLT) jest neurohormonem o plejotropowym działaniu na organizm człowieka. Głównie odpowiada za regulację rytmów dobowych, ale również wykazuje działanie antyoksydacyjne, przeciwbólowe, przeciwdepresyjne, immunomodulacyjne, a także przeciwnowotworowe. Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* dowodzą, że reguluje ona angiogenezę, proliferację i apoptozę komórek HCC. Świadczy to o jej potencjale do wzmacniania działania przeciwnowotworowego konwencjonalnego leczenia. Celem pracy jest przedstawienie dowodów, potwierdzających hamujący wpływ melatoniny na HCC, ze szczególnym uwzględnieniem jej komórkowych mechanizmów.

**Słowa kluczowe:** melatonina, nowotwór wątroby, rak wątrobowokomórkowy

## ABSTRACT

Liver cancer is the 6<sup>th</sup> most commonly diagnosed cancer and the 2<sup>nd</sup> leading cause of cancer deaths around the world. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 65% of all cases of liver cancer. Therefore, an important goal of modern medicine is to develop new drugs with greater effectiveness and smaller side effects in HCC treatment. Melatonin (MLT) is a neurohormone with pleiotropic effects on the human body. It is mainly responsible for the regulation of circadian rhythms, but also has antioxidant, analgesic, antidepressant, immunomodulating and anti-cancer effects. The results of *in vitro* and *in vivo* studies show that it regulates HCC angiogenesis, proliferation and apoptosis. This demonstrates its potential to enhance the anti-cancer effect of conventional treatment. The aim of the study is to present evidence that melatonin inhibits the growth of HCC, with particular emphasis on its cellular mechanisms.

**Key words:** melatonin, liver cancer, hepatocellular carcinoma

## WSTĘP

Rak wątroby jest 6. najczęściej diagnozowanym nowotworem i 2. wiodącą przyczyną umieralności z powodu nowotworu na świecie. Zdecydowaną większość przypadków nowotworu wątroby stanowi rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*, HCC). Niestety większość pacjentów z rakiem wątroby jest diagnozowana w zaawansowanym stadium, gdy leczenie chirurgiczne nie jest już dostępne (Prieto-Domínguez i in. 2017). Ponadto wysoka śmiertelność pacjentów z rakiem wątroby wiąże się z jego brakiem wrażliwości i rozwojem oporności na leczenie farmakologiczne, co prowadzi do niepowodzenia chemioterapii. Z powodu częstych nawrotów i przerzutów do innych narządów oraz niskiej skuteczności i wielu działań niepożądanych standardowych terapii, jakość życia pacjentów z HCC jest niska, a czas przeżycia krótki. Dlatego ważnym celem współczesnej medycyny jest opracowanie nowych leków o większej skuteczności i mniejszych skutkach ubocznych. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie zastosowaniem melatoniny w terapii HCC.

Melatonina, główny produkt szyszynki, jest indoloaminą o właściwościach antyoksydacyjnych, chronobiotycznych i przeciwzapalnych (Mauriz i in. 2013). Udowodniono, że obniżenie poziomu melatoniny lub zahamowanie wydalania jej głównego metabolitu, 6- sulfatoksymelatoniny, jest związane się ze zwiększonym ryzykiem raka, co już może sugerować przeciwnowotworowe właściwości tej cząsteczki (Sánchez-Hidalgo i in. 2012). Opublikowane dane silnie potwierdzają onkostatyczne działanie melatoniny na różne typy nowotworów, w tym raka wątroby. Hamująca rola melatoniny w nowotworach wątroby obejmuje szereg różnych procesów molekularnych i komórkowych, w tym zmniejszenie proliferacji komórek, zatrzymanie cyklu komórkowego, ograniczenie angiogenezy i przerzutów oraz promowanie śmierci komórek. Ponadto melatonina zwiększa wrażliwość komórek raka wątroby na obecnie dostępne terapie (Reiter i in. 2017).

## METODA I CEL PRACY

Celem pracy jest przedstawienie dowodów, potwierdzających hamujący wpływ melatoniny na HCC, ze szczególnym uwzględnieniem jej molekularnych i komórkowych mechanizmów działania oraz jej potencjalnej przydatności w doskonaleniu leczenia tego typu nowotworu.

W badaniu poddano analizie artykuły wyszukane na platformie PubMed. Zastosowano słowa-kłucze: *melatonin*, *liver cancer*, *hepatocellular carcinoma*. Analiza objęła badania, dotyczące wpływu melatoniny na rozwój HCC.

## RAK WĄTROBOWOKOMÓRKOWY

Nowotwór wątroby jest 6. najczęściej diagnozowanym nowotworem i 2. wiodącą przyczyną umieralności z powodu nowotworu na świecie (Ghouri i in. 2017). Najczęściej występującym pierwotnym nowotworem złośliwym wątroby jest rak wątrobowokomórkowy (HCC), stanowiący około 90% rozpoznań nowotworów tego narządu oraz 7% wszystkich nowotworów złośliwych. Co roku rozpoznaje się około 750 tysięcy nowych przypadków HCC. Wraz z wiekiem zwiększa się częstość występowania tego nowotworu, osiągając szczyt około 70. roku życia. Mężczyźni chorują częściej niż kobiety (Jemal i in. 2008).

Znane są czynniki ryzyka zachorowania na HCC. W 90% przypadków jest to jedna z następujących przyczyn: marskość wątroby, przewlekłe zakażenia HBV i HCV, regularne spożywanie alkoholu, długotrwała ekspozycja na aflatoksyny i preparaty hormonalne (anaboliki, środki antykoncepcyjne) oraz wrodzone choroby metaboliczne (hemochromatoza dziedziczna, porfirię skórna późna). Ze względu na znacznie zwiększone ryzyko zachorowania, osoby z marskością wątroby, włóknieniem oraz chore na przewlekłą WZW typu B powinny być poddawane przesiewowym badaniom USG co 6 miesięcy (Szczeklik i in. 2020). Rozpoznanie HCC opiera się głównie na badaniach obrazowych - pierwszą z nich jest ultrasonografia (USG) - jej czułość diagnostyczna w badaniach przesiewowych wynosi 58–94% z jednoczesną wysoką swoistością przekraczającą 90% (Singal i in. 2009). Dodatkowo można wykonać badanie stężenia AFP we krwi (wartości >200 ng/ml są swoiste dla HCC, ale mało czułe – nie zaleca się oznaczania w celach przesiewowych). Jednak do bezwzględnej diagnozy konieczne jest wykonanie dynamicznych badań obrazowych z zastosowaniem kontrastu. W badaniach tych HCC ujawnia charakterystyczny – prawie patognomoniczny – wzorec kontrastowania.

Rekomendacje Sekcji Hepatologicznej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii sugerują następujący schemat diagnostyczny i kryteria rozpoznania raka wątrobowokomórkowego:

- Chorzy z marskością wątroby i guzkami < 1 cm powinni być poddawani ocenie USG co 3–4 miesiące w pierwszym roku i co 6 miesięcy w następnych latach.
- Guzki > 2 cm z typowym obrazem radiologicznym w pojedynczym, kontrastowym badaniu obrazowym wystarczą do rozpoznania HCC. W razie niepewności należy wykonać ocenę histopatologiczną.
- Gdy guzki mają 1–2 cm, do rozpoznania konieczne są dwa kontrastowe badania obrazowe, a wyjątkowo również ocena histopatologiczna.
- W przypadku złej jakości materiału, podejrzenia błędu pobrania oraz powiększenia się ogniska lub pojawienia się cechy wzmocnienia kontrastowego w kolejnych badaniach obrazowych zalecane jest powtórzenie biopsji.
- Rak wysokodróżnicowany lub dysplastyczny guzek regeneracyjny wymagają uwzględnienia badań immunohistochemicznych, ukierunkowanych na obecność białek GPC3, HSP70 i syntetazy glutaminianowej oraz ekspresję genów *GPC3*, *LYVE1* i surwiwiny (Krawczyk i in. 2016).

Po ustaleniu diagnozy należy wykonać badania dodatkowe, niezbędne do kwalifikacji pacjenta do odpowiedniego typu leczenia. Głównymi metodami terapii HCC są: leczenie operacyjne oraz farmakologiczne, chociaż w niektórych przypadkach stosuje się też nieoperacyjne leczenie inwazyjne, takie jak: termoablacja, chemoembolizacja przezcётnicza, krioablacja, fale ultradźwiękowe o dużym natężeniu, promieniowanie jonizujące, nieodwracalna elektroporacja oraz radioembolizacja. Najskuteczniejszą metodą leczenia HCC (60–80% pięcioletnich przeżyć) pozostaje leczenie chirurgiczne – resekcja lub transplantacja wątroby, jednak jest ono możliwe tylko u <5–35% chorych. U pozostałych pacjentów, niekwalifikujących się do leczenia operacyjnego lub z progresją choroby po zastosowaniu takiego leczenia, należy zastosować leczenie farmakologiczne. W tym celu stosowane są leki biologiczne: zwykle jest to najskuteczniejszy z nich – sorafenib, ale stosuje się także regorafenib, lenwatinib lub niwolumab (Krawczyk i in. 2016, Szczeklik i in. 2020). Jednak skuteczność klasycznej chemioterapii jest bardzo mała, jakość życia pacjentów z HCC jest niska, a czas przeżycia krótki. Dlatego ważnym celem współczesnej medycyny jest opracowanie nowych leków o większej skuteczności i mniejszych skutkach ubocznych. Z tego względu w ostatnich latach wzrasta również zainteresowanie pomocniczym zastosowaniem melatoniny w terapii HCC.

## MELATONINA – HORMON O PLEJOTROPOWYM DZIAŁANIU

Melatonina (MLT), inaczej N-acetylo-5-metoksytryptamina, została wyizolowana po raz pierwszy z szyszynki bydłowej i scharakteryzowana przez dermatologa Aarona Lerner'a w 1958 roku. Jest ona neurohormonem - syntetyzowanym i wydzielanym przede wszystkim przez szyszynkę – niewielki gruczoł dokrewny, zlokalizowany w międzymózgowiu, choć jej niewielkie ilości wytwarzane są także w innych tkankach m.in. w siatkówce, soczewce, komórkach układu immunologicznego, nabłonku dróg oddechowych, skórze czy w układzie pokarmowym (Acuña-Castroviejo i in. 2014). Głównym zadaniem MLT w organizmie człowieka jest regulacja rytmów okołodobowych i sezonowych. Jej fizjologiczne stężenie we krwi człowieka waha się w zależności od pory dnia i roku od 0,4 do 2,3nM. Jest to związane z tym, że aktywność pinealocytów, czyli komórek szyszynki, jest zsynchronizowana z zewnętrznymi warunkami oświetleniowymi. Światło silnie hamuje, natomiast ciemność stymuluje produkcję hormonu. Informacje z otoczenia szyszynka otrzymuje za pośrednictwem siatkówki oka, gdzie obok klasycznych fotoreceptorów znajduje się niewielka subpopulacja wrażliwych na światło komórek zwojowych (ipRGC), zawierających białko fotoreceptyjne - melanopsynę. Impulsy świetlne pobudzają melanopsynę, co prowadzi do powolnej, tonicznej depolaryzacji komórek ipRGC. Następnie informacja z siatkówki, w postaci impulsu elektrycznego, szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym przekazywana jest do jądra nadskrzyżowaniowego podwzgórza (SCN), w którym zlokalizowany jest główny oscylator rytmów okołodobowych i sezonowych, tzw. „zegar biologiczny”. Włókna nerwowe opuszczające SCN przechodzą przez struktury mózgu i rdzenia kręgowego, kończąc się w pobliżu pinealocytów i uwalniają noradrenalinę (NA), stymulującą syntezę MLT. Produkcja hormonu jest zatem zsynchronizowana z cyklami światła i ciemności, co warunkuje okołodobowe i sezonowe wahania stężenia melatoniny, decydujące o fazie rytmu biologicznego. W miarę uwalniania hormonu do krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego, człowiek staje się coraz bardziej senny, aż w końcu, kiedy stężenie melatoniny osiągnie odpowiedni poziom, zasypia. Największe stężenie hormonu obserwuje się między godziną 24. a 3. nad ranem (Claustrat i in. 2005). Poza głównym zadaniem, czyli regulacją rytmów biologicznych, MLT spełnia również inne funkcje, co zostało udowodnione w wielu badaniach eksperymentalnych. Sam fakt, że jej wydzielanie pozaszyszynkowe jest niezależne

od warunków oświetlenia i nie wpływa na rytm dobowy, świadczy o istnieniu dodatkowych funkcji tej substancji w organizmie człowieka.

Wykazano, że melatonina posiada właściwości antyoksydacyjne, hipotensyjne, przeciwbólowe, przeciwdepresyjne, przeciwłękowe, antydiabetogenne czy przeciwzapalne. Działa protekcyjnie na układ pokarmowy, krwionośny i nerwowy oraz moduluje działanie innych układów organizmu człowieka (Słominski i in. 2012, Comai i in. 2014, Emet i in. 2016). Badania wykazały, że hormon ten ma również istotny wpływ na wiele procesów, mających znaczenie w kancerogenezie. Potwierdzono przeciwnowotworowe i onkostatyczne działanie melatoniny w wielu typach nowotworów. Za pośrednictwem różnych szlaków sygnałowych i mechanizmów działania zapobiega ona inicjacji oraz hamuje progresję guza. Działanie to zawdzięcza między innymi swoim właściwościom antyoksydacyjnym czy przeciwzapalnym. Ponadto hamuje ona angiogenezę w tkance nowotworowej i proliferację komórek rakowych, natomiast promuje ich apoptozę oraz moduluje funkcje układu immunologicznego, wzmacniając działanie przeciwnowotworowe komórek odpornościowych (Wamidh i in. 2021). Co więcej, ten nietoksyczny środek jest w stanie wzmocnić działanie leków chemioterapeutycznych i radioterapii, jednocześnie łagodząc ich skutki uboczne (Li i in. 2017). Potencjalne korzystne działanie melatoniny jako substancji pomocniczej w terapii nowotworów było zgłaszane w wielu typach nowotworów, w tym jelita grubego, wątroby, prostaty, endometrium, jajnika, piersi czy kostniakomięsaka (Wamidh i in. 2021).

Jak już wspomniano, w ostatnim czasie rośnie zainteresowanie protekcyjnym wpływem melatoniny na rozwój nowotworów wątroby, w tym raka wątrobowokomórkowego.

## ZASTOSOWANIE MELATONINY W LECZENIU HCC

W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost liczby publikacji, opisujących badania *in vivo*, jak i *in vitro*, prowadzone w celu analizy roli melatoniny w ograniczaniu hepatokancerogenezy.

Melatonina może zapobiegać kancerogenezie wątroby poprzez kontrolowanie i leczenie chorób wątroby, będących czynnikami ryzyka rozwoju HCC. Wpływa ona protekcyjnie na hepatocyty, wykazując działanie hamujące zapalenie wątroby, bezalkoholowe stłuszczenie wątroby, zwłóknienie wątroby oraz marskość wątroby. Dodatkowo stwierdzono, że w rozwoju HCC bierze udział upośledzenie „zegara biologicznego” i zaburzenie rytmów dobowych, co także sugeruje rolę dysregulacji w wydzielaniu melatoniny w

procesie nowotworzenia. U indyjskich myszy polnych z HCC wyindukowanym N-nitrozodietiloaminą (NDEA) stwierdzono zaburzoną aktywność lokomotoryczną w ciągu doby. Następnie zwierzętom podawano MLT lub oksaliplatynę – znany lek cytostatyczny. Oba typy leczenia spowodowały spadek aktywności enzymów wątrobowych AST i ALT, wcześniej sugerujących uszkodzenie hepatocytów, oraz przywróciły prawidłowy rytm dobowy i aktywność ruchową myszy. Dodatkowo, ze względu na znaczny udział stresu oksydacyjnego w rozwoju nowotworu, w badaniu tym oceniano działanie antyoksydacyjne MLT. Po podaniu leku stwierdzono wzrost stężenia enzymów antyoksydacyjnych i zmniejszenie stresu oksydacyjnego (Verma i in. 2014). W innym badaniu, w szczurzym modelu HCC indukowanym przez podawanie dietylnitrozoaminy (DEN) nastąpiło obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), S- transferazy glutationowej (GST) i zredukowanego glutationu (GSH), co następnie doprowadziło do nowotworowego uszkodzenia wątroby, potwierdzonego przez wzrost aktywności transaminaz wątrobowych (AST i ALT),  $\alpha$ -fetoproteiny oraz wzrost masy wątroby. Podawanie melatoniny (5 mg/kg masy ciała przez 20 tygodni) spowodowało zmniejszenie stresu oksydacyjnego i zlikwidowało te zmiany (Subramanian i in. 2007).

Kancerogeneza jest procesem wieloetapowym, zwykle promowanym przez zaburzoną i niekontrolowaną proliferację komórek, z rozregulowaniem cyklu komórkowego, związanym ze wzrostem żywotności komórek nowotworowych. Ekspozycja komórek HCC linii HepG2 na melatoninę w dawce 1mM indukuje spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 i wzrost komórek w fazie S, potwierdzając antyproliferacyjne działanie hormonu (Ozdemir i in. 2009). Wyniki te zostały udowodnione przez innych autorów, nie tylko w komórkach HepG2. W komórkach linii Hep3B HCC stwierdzono zmniejszenie ekspresji cykliny D1, a co za tym idzie, indukcję zatrzymania cyklu komórkowego przez 1 i 2 mM melatoniny (Mi i Kuang 2020).

Interesującą możliwością dla nowych terapii przeciwnowotworowych stała się indukcja apoptozy w komórkach rakowych. W wątrobie sygnalizacja apoptotyczna jest przekazywana głównie przez dwa szlaki molekularne: zewnętrzny (za pośrednictwem receptora śmierci) i wewnętrzny (zależny od mitochondriów). Eksperymenty *in vitro* z użyciem ludzkich komórek HepG2 wykazały, że podawanie melatoniny (0,1–10 mM przez 10 dni) jest w stanie indukować zarówno zewnętrzne, jak i wewnętrzne szlaki apoptozy, poprzez indukcję kaspazy 8 i 9, uwalnianie cytochromu C z mitochondriów



do cytozolu oraz regulację w górę Bax. Mechanizmy te prowadzą do śmierci komórek guza poprzez apoptozę (Martín-Renedo i in. 2008). Dodatkowo melatonina blokuje ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) i hamuje aktywujący czynnik transkrypcyjny 6 (ATF-6), powodując wzrost apoptozy komórek raka wątroby w warunkach stresu retikulum endoplazmatycznego (ER) (Bu i in. 2017).

Angiogeneza - proces wzrostu nowych naczyń krwionośnych - odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu, ponieważ nowa sieć naczyń dostarcza do guza substancje odżywcze i czynniki wzrostowe. Jest szeroko powiązana z inwazją i przerzutowaniem raka wątroby, dlatego też w leczeniu HCC testowane są terapie antyangiogenne. Metaloproteiny macierzy (MMP) to rodzina endopeptydaz, degradujących macierz zewnątrzkomórkową, a ich nadekspresja przyczynia się do progresji i przerzutów HCC poprzez indukcję angiogenezy. Stwierdzono, że 1 mM melatoniny zmniejsza indukowaną przez IL-1 $\beta$  aktywność MMP-9, zaburzając inwazję i ruchliwość komórek HepG2. Efekt ten był powiązany z hamowaniem translokacji NF- $\kappa$ B indukowanej przez IL-1 $\beta$  i aktywności transkrypcyjnej, co prowadziło do obniżenia ekspresji genu MMP-9 (Ordoñez i in. 2014). Dodatkowo, niektóre mikro-RNA są zaangażowane w działanie przeciwinwazyjne i przeciwprzerutowe melatoniny w HCC. W ten sposób w liniach komórkowych HepG2 i HuH7 podanie 1 i 2 mM melatoniny indukowało aktywację miRNA let7i-p, co z kolei obniżało poziom protoonkogenu RAF-1 i upośledzało inwazję i migrację komórek HCC (Wang i in. 2018). Co ważniejsze, melatonina jest w stanie przewyciężyć lekooporność komórek raka wątroby i zwiększa ich wrażliwość na klasyczne leki chemioterapeutyczne. Melatonina (1 i 2mM) zwiększa podatność linii komórkowych HCC Hep3B, HuH7 i HepG2 na sorafenib (Prieto-Domínguez i in. 2017). Melatonina zmniejsza również oporność HCC na dokсорubicynę (Fan i in. 2013a).

## PODSUMOWANIE

Na całym świecie wciąż rośnie zachorowalność i śmiertelność z powodu nowotworów wątroby, z których najczęstszym jest rak wątrobowokomórkowy. Stanowi to poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, a także problem społeczny i ekonomiczny. Dlatego konieczne jest podjęcie działań, których celem będzie profilaktyka, wczesna diagnoza oraz opracowanie nowych, skutecznych i bezpiecznych metod leczenia HCC.

Melatonina jest jedną z substancji, które wykazują obiecujący potencjał w terapii HCC. Różne badania *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że substancja ta ma właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne i antykancerogenne. Dotychczas potwierdzono różnorodny mechanizm jej działania, wpływający na wiele szlaków sygnalizacyjnych w komórkach HCC. Świadczy to o jej potencjale do wzmacniania działania przeciwnowotworowego konwencjonalnego leczenia i niwelowania jego działań niepożądanych.

Powyższe ustalenia jasno wskazują, że użycie melatoniny w terapii raka wątrobowokomórkowego ma rozsądną i naukową podstawę. Jednak większość publikacji na ten temat opiera się na wynikach badań przeprowadzonych z użyciem modeli komórkowych i zwierzęcych, natomiast istnieje niewiele danych na temat jej wykorzystania klinicznego. W związku z tym, dalsze badania powinny koncentrować się na ocenie zastosowania klinicznego melatoniny, połączenia z innymi konwencjonalnymi lekami oraz bezpieczeństwa jej długotrwałego stosowania.

## BIBLIOGRAFIA

Acuña-Castroviejo D. i in.

2014 *Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions*, "Cell Mol Life Sci", 71: 2997–3025

Bu LJ. i in.

2017 *Melatonin, a novel selective ATF-6 inhibitor, induces human hepatoma cell apoptosis through COX-2 downregulation*, "World J. Gastroenterol", 23:986–998.

Claustrat B. i in.

2005 *The basic physiology and pathophysiology of melatonin*, "Sleep Med Rev", 9:11-24.

Claustrat B. i in.

2015 *Melatonin: Physiological effects in humans*, "Neurochirurgie", 61(2- 3):77-84.

Comai S. i in.

2014 *Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology*, "J Psychiatry Neurosci", 39,1: 6–21

Emet M. i in.

2016 *A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs*, “Eurasian J Med”, 48,2: 135–141

Fan L. i in.

2013 *Melatonin reverses tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells and improves cytotoxic response to doxorubicin by increasing CHOP and decreasing Survivin*, “Pineal Research”, 55 Pages 184-194

Fernández-Palanca P. i in.

2021 *Melatonin as an Antitumor Agent against Liver Cancer: An Updated Systematic Review*, “Antioxidants (Basel)”, Jan; 10(1): 103.

Ghouri YA. i in.

2017 *Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis*, “J Carcinog”, 16:1.

Jemal A. i in.

2008 *Cancer statistics, 2008*, “CA Cancer J. Clin”, 58: 71–96.

Krawczyk M. i in.

2016 *Rozpoznawanie i leczenie raka wątrobowokomórkowego — rekomendacje Sekcji Hepatologicznej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii*, “Gastroenterologia Praktyczna”, tom VIII, 1 (30).

Lerner AB. i in.

1958 *Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes*, “J Am Chem Soc”, 80 (1958), p. 2587

Li Y. i in.

2017 *Melatonin for the prevention and treatment of cancer*, “Oncotarget”, 8,24: 39896-39921.

Lu A. i in.

2020 *Transcriptomic analysis on the effects of melatonin in gastrointestinal carcinomas*, “BMC Gastroenterol”, Jul 20;20(1):233

Martín-Renedo J. i in.

2008 *Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line*, “J. Pineal Res”, 2008;45:532–540.

- Mauriz JL. i in.  
2013 *A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: Recent insights and new perspectives*, "J. Pineal Res", 54:1–14.
- Mi L. i in.  
2020 *Melatonin regulates cisplatin resistance and glucose metabolism through hippo signaling in hepatocellular carcinoma cells*, "Cancer Manag. Res", 12:1863–1874.
- Ordoñez R. i in.  
2014 *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells*, "J. Pineal Res", 56:20–30.
- Ozdemir F. i in.  
2009 *The effects of melatonin on human hepatoma (Hep G2) cell line*, "Bratislava Med. J", 110:276–279
- Pourhanifeh MH. i in.  
2020 *Melatonin and gastrointestinal cancers: Current evidence based on underlying signaling pathways*, "European Journal of Pharmacology", 886;173471
- Prieto-Domínguez N. i in.  
2017 *Melatonin enhances sorafenib actions in human hepatocarcinoma cells by inhibiting mTORC1/p70S6K/HIF-1 $\alpha$  and hypoxia-mediated mitophagy*, "Oncotarget", 8:91402–91414.  
2016 *Melatonin-induced increase in sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib is associated with reactive oxygen species production and mitophagy*, "Pineal Research", 61. 396-407.
- Reiter RJ. i in.  
2017 *Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis*, "Int. J. Mol. Sci", 18:843.
- Sánchez-Hidalgo M. i in.  
2012 *Melatonin, a natural programmed cell death inducer in cancer*, "Curr. Med. Chem", 19:3805–3821.
- Singal A. i in.  
2009 *Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis*, "Aliment. Pharmacol. Ther". 30: 37–47.

Slominski RM. i in.

2012 *Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions*, "Mol Cell Endocrinol", 351,2: 152–166

Subramanian P. i in.

2007 *Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine*, "J. Pineal Res", 43:305–312

Szczeklik A.

2021 *Interna Szczeklika. Mały podręcznik*.

Wamidh HT. i in.

2021 *Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities*, "Molecules", May; 26(9): 2506.

Wang TH. i in.

2018 *Melatonin inhibits the progression of hepatocellular carcinoma through microRNA let7i-3p mediated RAF1 reduction*, "Int. J. Mol. Sci", 19:2687.

Verma D. i in.

2014 *Effect of melatonin on antioxidant status and circadian activity rhythm during hepatocarcinogenesis in mice*, "Journal of Cancer Research and Therapeutics Open Access", Volume 10, Issue 4, Pages 1040 - 10441 October

ADRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>, MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>,  
MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>, AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>,  
NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>, MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>,  
EMILIA NOWAK<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘŚNA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

<sup>(2)</sup> KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII I METODOLOGII BADAŃ  
KLINICZNYCH, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

## OPERACJE BARIATRYCZNE JAKO METODA LECZENIA OTYŁOŚCI

### ABSTRAKT

Otyłość jest chorobą, która dotyka obecnie 25% dorosłych Polaków. Występowanie otyłości na świecie wzrosło ponad dwukrotnie w przeciągu ostatnich 40 lat. Otyłość zwiększa ryzyko innych chorób m.in. cukrzycy typu II czy schorzeń układu sercowo-naczyniowego, a co za tym idzie – negatywnie wpływa na jakość życia oraz zwiększa ryzyko zgonu. Jej zapobieganie i leczenie stanowi zatem istotny aspekt ochrony zdrowia. Jedną z metod leczenia są operacje bariatryczne, uznawane za bardzo efektywne, gdyż powodują duży spadek wagi, a skutki leczenia są długofalowe. Celem pracy jest przegląd najnowszej literatury medycznej na temat skuteczności operacji bariatrycznych. Badania dowodzą, że jakość życia pacjentów poddanych chirurgicznemu leczeniu otyłości jest istotnie wyższa, zarówno w porównaniu do stanu przed zabiegiem, ale również do innych pacjentów, leczonych farmakologicznie czy dietetycznie. Pacjenci z grup badawczych osiągają znacznie większy spadek wagi, który utrzymuje się przez kilkuletni okres obserwacji. Poziom hemoglobiny glikowanej u pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 istotnie się zmniejsza, podobnie jak poziom lipidów. Zaobserwowano zmniejszenie przyjmowania insuliny, statyn czy leków na nadciśnienie. Bardzo ważny jest również aspekt stygmatyzacji społecznej osób z otyłością. Znaczna utrata wagi po operacji dodatnio koreluje z poprawą postrzegania pacjentów przez społeczeństwo. Wiąże się to z istotnym statystycznie zmniejszeniem depresji i zaburzeń lękowych u skutecznie leczonych pacjentów. Badania ukazują, że jakość życia pacjentów po operacjach bariatrycznych poprawia się zarówno w aspektach medycznych, jak również ekonomicznych czy społecznych. Nie należy jednak zapominać, że zabiegi te to operacje chirurgiczne, które mogą powodować powikłania. Z tego powodu należy bardzo uważnie rozważyć wskazania do chirurgicznego leczenia otyłości, takie jak BMI, występowanie chorób współistniejących czy skuteczność dotychczasowej farmakoterapii.

**Słowa kluczowe:** Otyłość, BMI, bariatria, operacje bariatryczne

## ABSTRACT

Obesity is a disease, which affects 25% of adult Polish people. Its world prevalence has doubled within the last 40 years. Obesity increases the risk of other illnesses such as diabetes type II or cardiovascular problems, which has a negative impact on life quality and increases the risk of death. Prevention and treatment of obesity is therefore an essential aspect of healthcare. One of the treatment methods are bariatric surgeries considered to be effective, as they cause weight loss, and the treatment effects are long-term. The aim of the study was evaluation of the newest medical literature regarding efficiency of bariatric surgeries. Research proves that the life quality of patients that underwent a surgical operation to treat obesity is substantially higher compared to both the pre-surgery state and patients treated pharmacologically or dietarily. Patients from treatment groups achieve significantly greater weight loss, which lasts within a few-year follow-up. Level of glycated haemoglobin in patients with type II diabetes decreases, same as lipid levels. A decrease in insulin, statins and antihypertensives intake was observed. A social stigma of obese people is also worth a remark. A significant weight loss after a surgery positively correlates with an improved social perception of those patients. It is related to statistically significant decrease of depression and anxiety disorders in efficiently treated patients. Research shows that the life quality in patients after bariatric surgeries improves not only in medical aspects but also in economic and social ones. It should not be forgotten that those procedures are surgical interventions, which can cause complications. Therefore, the indications to surgical treatment of obesity, such as BMI, presence of comorbidities and the effectiveness of current pharmacotherapy, must be taken into proper consideration.

**Keywords:** Obesity, BMI, bariatry, bariatric surgeries

## WSTĘP

Otyłość to choroba o złożonej etiologii, charakteryzująca się nadmiernym odkładaniem tkanki tłuszczowej w organizmie. Do określania występowania nadwagi i otyłości oraz klasyfikacji stopnia otyłości powszechnie używa się wskaźnika BMI (ang. Body Mass Index), który stanowi wynik dzielenia masy ciała w kilogramach przez kwadrat wysokości w metrach. Według Światowej Organizacji Zdrowia wskaźnik BMI dla prawidłowej masy ciała wynosi 18,5-24,99; 25-29,99 to nadwaga, 30-34,99 – otyłość I stopnia, 35-39,99 – otyłość II stopnia,  $40 \geq$  - otyłość III stopnia. Występowanie otyłości na świecie wzrosło ponad dwukrotnie w przeciągu ostatnich 40 lat (Kolb, Sutterwala i Zhang 2017). Liczba chorych zwiększa się z roku na rok bez względu na wiek, płeć, pochodzenie, miejsce zamieszkania czy status socjoekonomiczny, z tym że obecnie największy trend wzrostowy nadmiernej masy ciała obserwuje

się u kobiet i osób starszych (Kolb, Sutterwala i Zhang 2017). Według wyliczeń Narodowego Funduszu Zdrowia jedynie 15% dorosłych Polaków ma masę prawidłową lub niedowagę (BMI<25). Sześćdziesiąt procent Polaków choruje na nadwagę, a co czwarty ma otyłość. Coraz częściej problem ten dotyka dzieci. Według WHO w 2025 r. w Polsce otyłych będzie aż 26% dorosłych kobiet i 30% mężczyzn.

Otyłość, oprócz defektów kosmetycznych, utrudnia oddychanie oraz wpływa negatywnie na układ ruchu. Zwiększa również ryzyko innych chorób m.in. cukrzycy typu II, schorzeń układu sercowo-naczyniowego, zaburzeń układu kostno-stawowego, szczególnie choroby zwyrodnieniowej stawów, obturacyjnego bezdechu sennego (Dixon i in. 2012), niektórych nowotworów (np. piersi, jajnika, wątroby, okrężnicy) (Kolb, Sutterwala i Zhang 2017). Ponadto nadmierna masa ciała u kobiet w okresie reprodukcyjnym sprawia, że mają one zmniejszoną płodność, prawdopodobieństwo powodzenia zapłodnienia in vitro również jest statystycznie mniejsze niż u kobiet o prawidłowej masie ciała (Broughton i Moley 2017). Otyłość matki może również negatywnie oddziaływać na rozwijający się płód (Broughton i Moley 2017), a co za tym idzie – negatywnie wpływać na jakość życia oraz zwiększać ryzyko zgonu. Zapobieganie i leczenie otyłości stanowi zatem istotny aspekt ochrony zdrowia. Powszechnie chorobę tą leczy się dietą niskokaloryczną i aktywnością fizyczną, dostosowaną do potrzeb i możliwości pacjenta. Rzadziej stosowane jest leczenie farmakologiczne. Niezwykle istotne w postępowaniu z osobą z otyłością jest również wsparcie psychologiczne. Kolejną z metod leczenia są operacje bariatryczne, czyli chirurgiczne metody leczenia otyłości. Uznawane są one za efektywne, gdyż powodują duży spadek wagi, a skutki leczenia są długofalowe.

Celem pracy był przegląd najnowszej literatury medycznej opublikowanej w bazie PubMed, dotyczącej wskazań, metod operacji bariatrycznych, ich efektywności oraz obecności i nasilenia ewentualnych powikłań. Szczególną uwagę zwrócono na prace dotyczące jakości życia pacjentów po poszczególnych rodzajach zabiegu. Użyto słów-kluczy: otyłość, BMI, bariatria, operacje bariatryczne.

## WSKAZANIA DO CHIRURGICZNEGO LECZENIA OTYŁOŚCI I METODY OPERACJI

Operacje bariatryczne nie są podstawową metodą leczenia otyłości. Stanowią one jednak szansę dla pacjentów, u których leczenie za pomocą metod niechirurgicznych (leczenie dietetyczne, aktywność fizyczna, leczenie



farmakologiczne oraz leczenie psychologiczne) nie przyniosło rezultatów (Wolfe, Kvach i Eckel 2016). Obecnie stosowane kryteria kwalifikacji pacjentów do operacji to: BMI>40 lub BMI>35, gdy obecne są choroby współistniejące, lub BMI>30, gdy pacjent choruje dodatkowo na cukrzycę typu II (Wolfe, Kvach i Eckel 2016).

Istnieje kilka metod operacji bariatrycznych. Do najczęściej stosowanych sposobów chirurgicznego leczenia otyłości należy laparoskopowe przewiązanie żołądka opaską regulowaną (ang. LAGB – laparoscopic adjustable gastric banding). Operacja ta polega na laparoskopowym założeniu na proksymalną część żołądka opaski, która powoduje zmniejszenie objętości narządu. Szybkość opróżniania żołądka można regulować za pomocą balonu podłączonego do portu podskórnego, który reguluje objętość opaski (Wolfe, Kvach i Eckel 2016). Kolejną z metod jest wyłączenie żołądkowe z zespoleniem na pętli Roux-en-Y (ang. RYGB -Roux-en-Y gastric bypass). Istotą zabiegu jest zmniejszenie pojemności trawiennej układu pokarmowego poprzez odcięcie większej części żołądka, całej dwunastnicy oraz początkowych odcinków jelita cienkiego, co znacząco zmniejsza powierzchnię trawienia i wchłaniania przewodu pokarmowego. Pozostałą niewielką część żołądka łączy się z dalszą częścią jelita cienkiego (Pędziwiatr 2012). Trzecią z najczęściej stosowanych metod jest laparoskopowa rękawowa resekcja żołądka (ang. LSG – laparoscopic sleeve gastrectomy), podczas której usuwane jest ok. 85% żołądka, tak że pozostała część kształtem zbliżona jest do jelita. Efekt tej operacji jest podobny do efektu metody Roux-en-Y. Nieco bardziej skomplikowanym zabiegiem jest wyłączenie żółciowo-trzustkowe (ang. BPD – biliopancreatic diversion). Wykonuje się zespolenie między bliższą częścią dwunastnicy a jelitem cienkim, co znacząco upośledza wchłanianie składników pokarmowych. Zabieg ten wykonywany jest rzadko, gdyż ze względu na swoją obszerność wpływa na częstsze występowanie powikłań krótko- i długoterminowych (Wolfe, Kvach i Eckel 2016).

Efektem i celem operacji bariatrycznych jest to, że przez zmniejszenie objętości przewodu pokarmowego, chory nie jest w stanie przyjmować jednorazowo tak dużych objętości pokarmu jak przed zabiegiem operacyjnym. Mniejsza ilość spożytego pożywienia oraz ograniczona powierzchnia układu pokarmowego skutkuje upośledzeniem trawienia. Również wchłonięciu ulega mniejsza ilość składników pokarmowych, co przyczynia się do dostarczenia organizmowi mniejszej ilości kilokalorii i do utraty masy ciała.

## OPERACJE BARIATRYCZNE W BADANIACH NAUKOWYCH

W australijskim badaniu Dixona (2012) wzięło udział 60 otyłych pacjentów z BMI >35 i <55 z obturacyjnym bezdechem sennym zdiagnozowanym min. 6 miesięcy wcześniej. Połowa pacjentów, która stanowiła grupę kontrolną, została zakwalifikowana do leczenia za pomocą odpowiednio dobranej diety oraz aktywności fizycznej, natomiast druga połowa – do operacji bariatrycznej metodą LAGB. Po dwuletnim okresie badania spadek wagi u pacjentów poddanych operacji bariatrycznej wynosił średnio 27,8kg w porównaniu do 5,1kg u pacjentów z grupy kontrolnej. Wskaźnik bezdechu do słyconego oddechu w grupie kontrolnej i badawczej zmniejszył się odpowiednio o 14 i 25,5 incydentów na godzinę. U pacjentów z cukrzycą typu II zaobserwowano spadek poziomu hemoglobiny glikowanej średnio o 1,26% i 0,3%, odpowiednio w grupie badawczej i kontrolnej. Zaobserwowano również większą poprawę wydolności (6-minutowy test marszowy) w grupie poddanej LAGB. U jednego z pacjentów konieczna była reoperacja, która nie wiązała się jednak ze skutkami ubocznymi.

Kolejne badanie (O'Brien i in. 2006) obejmowało 80 pacjentów z otyłością I stopnia (BMI 30-34,99) . Pacjentów podzielono na dwie grupy, analogiczne jak w badaniu poprzednim (Dixon i in. 2012); okres obserwacji trwał 24 miesiące. Zarówno pacjenci poddani operacji LAGB jak i pacjenci z grupy kontrolnej po 6 miesiącach uzyskali porównywalny stopień utraty wagi, jednak u pacjentów z grupy badawczej obserwowano kontynuację spadku masy ciała w przeciągu kolejnych 6, 12 i 18 miesięcy, natomiast reprezentanci grupy kontrolnej po pierwszych 6 miesiącach zaczęli przybierać na wadze. Po 2-letnim okresie obserwacji pacjenci bariatryczni stracili średnio 87,2% nadmiernej masy ciała, a 98% z nich osiągnęło oczekiwaną wagę (w grupie nieoperacyjnej odpowiednio 21,8% i 35%). U jednego z pacjentów poddanych LAGB rozwinęła się infekcja, która wymagała antybiotykoterapii, a u 4 kolejnych opaska zmieniła swoje położenie - konieczna była reoperacja.

Taki sam podział pacjentów na grupę leczoną metodami konwencjonalnymi oraz grupę poddaną operacji bariatrycznej metodą LAGB jak w (Dixon i in. 2012,5) przyjęto w badaniu (Dixon i in. 2008). Do udziału w badaniu włączono 55 pacjentów z BMI 30-40, chorujących na cukrzycę typu II.

Po okresie 4 lat od rozpoczęcia badania u 73% z nich zaobserwowano remisję cukrzycy typu II, co skutkowało zmniejszeniem przyjmowania insuliny. Zaobserwowano również istotne statystycznie zmniejszenie przyjmowania leków na nadciśnienie oraz leków antylipidemicznych, co, oprócz korzyści medycznych, pozwoliło ograniczyć wydatki pacjenta. U jednego pacjenta konieczne było usunięcie opaski, u kolejnego rozwinęła się infekcja wymagająca antybiotykoterapii, a dwóch wymagało reoperacji w celu zmiany położenia opaski.

Randomizowane badanie kontrolne (Mingrone i in. 2015) przeprowadzono we Włoszech. Zakwalifikowano do niego pacjentów w wieku 30-60 lat z BMI minimum 35 i cukrzycą typu II trwającą od min. 5 lat. Pacjentów podzielono na 3 grupy: leczoną farmakologicznie, leczoną za pomocą wyłączenia żołądkowe typu Roux en-Y (RYGB) i leczoną za pomocą wyłączenia żółciowo-trzustkowe (BPD). W czasie 5 lat po zabiegu zaobserwowano remisję cukrzycy typu II u 53% pacjentów poddanych RYGB i 37% - BPD. Spadek HbA1c do wartości <6,5% wystąpił odpowiednio u 42% i 68% pacjentów poddanych operacji BPD i RYGB. W trzech grupach obniżył się poziom lipidów, ryzyko sercowo- naczyniowe oraz zażycie leków.

W badaniu chińskich naukowców z 2020 r. (Ding i in. 2020) porównano efektywność poszczególnych rodzajów operacji bariatrycznych u pacjentów z otyłością i cukrzycą typu II, ich wpływ na remisję cukrzycy oraz efekty kardiometaboliczne. Metaanaliza objęła 1108 pacjentów. Porównano m.in. LAGB, LSG, RYGB, BPD oraz metody niechirurgiczne. Wykazano, że wymienione metody chirurgicznego leczenia otyłości – w porównaniu z metodami nieoperacyjnymi - miały statystycznie istotny pozytywny wpływ na remisję cukrzycy typu II, z czego najlepsze efekty dla długotrwałej remisji cukrzycy wykazała metoda BPD. W ogólnej ocenie, na którą składał się poziom glukozy, masa ciała, ciśnienie skurczowe i rozkurczowe, poziom cholesterolu całkowitego, HDL i LDL oraz poziom triglicerydów, najlepsze efekty uzyskano w przypadku kolejno: RYGB, BPD, LSG, LAGB. RYGB wydaje się najlepszą metodą dla pacjentów ze schorzeniami kardiometabolicznymi.

Warte wyszczególnienia w terapii osób z otyłością są również aspekty społeczno- psychologiczne. Według badań (Mazer, Azagury i Morton 2017) pacjenci poddani operacji bariatrycznej osiągnęli wyższe wyniki niż przed zabiegiem w kwestionariuszu badającym wpływ zdrowia psychicznego i fizycznego na jakość ich życia (SF-36, HRQL) - dotyczy metod LAGB, RYGB, LSG. Wykazano również dodatnią korelację pomiędzy spadkiem masy ciała a wzrostem pewności siebie oraz zmniejszeniem zaburzeń lękowych i depresyjnych. W badaniu przeglądowym (Jumbe, Hamlet i Meyrick 2017)

widnieje, że u pacjentów poddanych operacji poprawił się stan psychosocjalny w zakresie relacji międzyludzkich oraz perspektyw zawodowych oraz zwiększyła się jakość życia. Należy jednak zauważyć, że wywyższe wyniki obejmują obserwację jedynie 2-3 lata po zabiegu.

Zauważono, że skutkiem operacji RYGB może być upośledzenie metabolizmu alkoholu - "pacjenci poddani operacji odczuwają działanie alkoholu po spożyciu znacznie mniejszych dawek, a odczuwane przez nich objawy to mniejsza potliwość, zaczerwienienie i większe pobudzenie" (Roering i Steffen 2015).

## NIEDOBORY ŻYWIENIOWE W OTYŁOŚCI ORAZ PO OPERACJACH BARIATRYCZNYCH

Otyłość, zazwyczaj będąca konsekwencją spożywania nadmiernej ilości jedzenia, paradoksalnie wiąże się z niedoborami żywieniowymi (Mohapatra, Gangadharan i Pitchumon i2020). Spowodowane jest to m.in. tym, że dieta osób z otyłością nie jest zbilansowana, zawiera wysoko przetworzone pokarmy, składające się z dużej ilości węglowodanów, cukrów prostych, tłuszczów nasyconych i sodu, a niewielkich – retinolu, beta-karotenu, witaminy D, E, C, folianów, żelaza i wapnia (Damms-Machado, Weser i Bischoff 2012). Wpływ na niedobory żywieniowe może być również skutkiem ograniczających diet często stosowanych przez pacjentów w celu walki z otyłością.

Niedobory składników żywieniowych są również związane z operacjami bariatrycznymi. Najczęściej występującymi deficytami charakteryzuje się żelazo, witamina B12, wapń, foliany, miedź i cynk (Mohapatra, Gangadharan i Pitchumoni 2020). Mechanizmy złego wchłaniania zależne są od typu operacji. W ciągu kilku miesięcy po LAGB wymagana jest niska podaż pokarmów o wysokiej zawartości składników odżywczych. Ponadto niedobory pokarmowe występują również w późniejszym okresie jako skutek złej tolerancji mięsa czy owoców i warzyw bogatych w błonnik. BPD prowadzi do złego wchłaniania makroskładników (wchłaniane jest 25% białek i 75% tłuszczów) i mikroskładników. Nie bez znaczenia jest również znaczne skrócenie czasu pasażu żołądkowo-jelitowego. Niedobory w przypadku operacji RYGB mogą wynikać zarówno z pierwotnych jak i wtórnych zaburzeń wchłaniania lub z niewystarczającej podaży w diecie (Mohapatra, Gangadharan i Pitchumoni 2020).

## PODSUMOWANIE

Problem otyłości stanowi istotne wyzwanie XXI wieku. Jedną z metod leczenia ciężkich postaci otyłości są operacje bariatryczne. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury można stwierdzić, że jakość życia pacjentów po zabiegach bariatrycznych poprawia się zarówno w aspektach medycznych, jak również psychologicznych czy społecznych. Nie bez znaczenia jest również kwestia ekonomiczna – konieczność przyjmowania mniejszych niż przed zabiegiem i utratą wagi dawek leków zmniejsza wydatki pacjentów. Nie należy jednak zapominać, że interwencje bariatryczne to zabiegi chirurgiczne, które nie pozostają bez wpływu na nasz organizm oraz mogą powodować powikłania. Zabiegi te wpływają również negatywnie na wchłanianie niezbędnych składników odżywczych i często prowadzą do niedoborów. Z tego powodu należy bardzo uważnie rozważyć wskazania do chirurgicznego leczenia otyłości, takie jak wielkość BMI, występowanie chorób współistniejących czy skuteczność dotychczasowej farmakoterapii.

## BIBLIOGRAFIA

Broughton D. i Moley K.

2017 *Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact*, "Fertil Steril", Apr;107(4):840-847.

Damms-Machado A., Weser G. i Bischoff SC.

2012 *Micronutrient deficiency in obese subjects undergoing low calorie diet*, "Nutr J", 11:34.

Ding L. i in.

2020 *Comparative effectiveness of bariatric surgeries in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: A network meta-analysis of randomized controlled trials*, "Obes Rev", Aug;21(8):e13030.

Dixon J. i in.

2008 *Adjustable Gastric Banding and Conventional Therapy for Type 2 Diabetes A Randomized Controlled Trial*, "JAMA", Jan 23;299(3):316-23.

2012 *Surgical vs conventional therapy for weight loss treatment of obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial*, "JAMA" Sep 19;308(11):1142-9.

Jumbe S., Hamlet C. i Meyrick J.

2017 *Psychological Aspects of Bariatric Surgery as a Treatment for Obesity*, "Curr Obes Rep", Mar;6(1):71-78.

- Kolb R., Sutterwala F. i Zhang W.  
2016 *Obesity and cancer: inflammation bridges the two*, "Curr Opin Pharmacol", Aug; 29: 77–89.
- Mazer M., Azagury D. i Morton J.  
2017 *Quality of Life After Bariatric Surgery*, "Curr Obes Rep", Jun;6(2):204-210.
- Mingrone G. i in.  
2015 *Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial*, "Lancet", Sep 5;386(9997):964-73.
- Mohaptra S., Gangadharan K. i Pitchumoni C.  
2020 *Malnutrition in obesity before and after bariatric surgery*, "Dis Mon", 66(2):100866.
- O'Brien P. i in.  
2006 *Treatment of Mild to Moderate Obesity with Laparoscopic Adjustable Gastric Banding or an Intensive Medical Program A Randomized Trial*, "Ann Intern Med", May 2;144(9):625-33.
- Pędziwiatr M.  
2012 *Wylączenie żołądkowe*, <https://www.mp.pl/pacjent/dieta/odchudzanie/leczeniechirurgiczne/63454,wylaczenie-zoladkowe> (dostęp 2.11.2021).
- Roering J. i Steffen K.  
2015 *Psychopharmacology and Bariatric Surgery*, "Eur Eat Disord Rev", Nov;23(6):463-9
- Wolfe B., Kvach E. i Eckel R.  
2016 *Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery*, "Circ Res", May 27;118(11):1844-55.



EMILIA NOWAK <sup>(1)</sup>, ADRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>,  
MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>, MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>,  
AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>, NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>,  
MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA<sup>(2)</sup>

(1) STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

(2) KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII I METODOLOGII BADAŃ  
KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

## ZESPÓŁ WAGR – RZADKI ZESPÓŁ DELECJI 11P

### ABSTRAKT

Zespół WAGR jest rzadkim zespołem genetycznym spowodowanym ciągłą spontaniczną delecją genów na chromosomie 11. Jest definiowany jako zespół z predyspozycją do rozwoju guza Wilmsa, przebiegający z aniridią, wadami układu moczowo-płciowego oraz zaburzeniami neurologicznymi. Inne nieklasyczne manifestacje choroby dotyczą wielu układów i narządów, a fenotyp danego pacjenta zależy od rozległości delecji. Celem tego przeglądu jest opis mechanizmów genetycznych, manifestacji klinicznych, diagnostyki oraz leczenia, a także popularyzacja wiedzy na temat tego rzadkiego zespołu.

**Słowa kluczowe:** zespół WAGR, zespół delecji 11p, aniridia, guz Wilmsa

### ABSTRACT

WAGR syndrome is a rare genetic disorder caused by a continuous, spontaneous gene deletion on chromosome 11. It is defined as a syndrome, which predisposes to Wilms tumor development and is associated with aniridia, urogenital defects and neurological disorders. Other non-classical manifestations of the disease involve many systems and organs, and the phenotype depends on the extent of the deletion. The aim of this review is to describe the genetic mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment, and to disseminate knowledge about this rare syndrome.

**Keywords:** WAGR syndrome, 11p deletion syndrome, aniridia, Wilms tumor



## WPROWADZENIE

Zespół WAGR jest rzadkim zespołem genetycznym cechującym się predyspozycją do rozwoju nowotworu złośliwego nerek, wadami wzroku i chorobami oczu oraz niepełnosprawnością intelektualną, opisanym po raz pierwszy w 1964 r. przez Millera (Miller, Fraumeni i Manning 1964). Podłoże genetyczne zespołu opisali Riccardi i Francke (Riccardi i in. 1978, Francke i in. 1979). Częstość występowania zespołu wynosi od 1:500 000 do 1:1 000 000, z jednakową częstością występowania u kobiet i mężczyzn. W rejestrze pacjentów z zespołem WAGR prowadzonym przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Pacjentów z zespołem WAGR od 2015 roku, zarejestrowane są 142 przypadki na całym świecie. Nazwa „WAGR” jest akronimem charakterystycznych nieprawidłowości, będących składowymi zespołu: W (Wilms tumor) – guz Wilmsa, A (Aniridia) – częściowy lub całkowity brak tęczówki, G (Genitourinary abnormalities) – wady układu moczowo-płciowego, R (Mental Retardation) – niepełnosprawność intelektualna (International WAGR Syndrome Association).

## ASPEKT GENETYCZNY

Zespół WAGR jest spowodowany mutacjami wielu sąsiadujących genów w obrębie chromosomu 11. Najczęstszą mutacją jest delecja krótkiego ramienia chromosomu 11 w prążku 13 (11p13). W większości przypadków są to mutacje spontaniczne, zachodzące podczas wczesnego rozwoju embrionalnego (*de novo*). Zakres usuniętych genów wynosi od 1 do 26,5 mln par zasad. Wszystkie osoby z zespołem WAGR mają wspólny segment usuniętych genów, który obejmuje gen *WT1* oraz *PAX6*, a także geny znajdujące się pomiędzy nimi. Istnienie tego wspólnego segmentu delecji wyjaśnia występowanie u większości pacjentów cech kardynalnych zespołu - guza Wilmsa (gen *WT1*), aniridii (gen *PAX6*) i opóźnienia umysłowego. Dokładny mechanizm powstawania wad układu moczowo-płciowego nie został nadal wytłumaczony. Niektórzy badacze sugerują, że odpowiadają za nie mutacje genu *GUD* zlokalizowanego w pobliżu genu *WT1*, a inni sugerują, że wynikają one bezpośrednio z defektu *WT1*. Ponadto dysfunkcja wielu genów, do usunięcia których dochodzi w zespole WAGR, nadal pozostaje nieznana. Jednak oprócz genu *WT1* i *PAX6* wymienia się także gen: *BDNF* - związany z otyłością, zwiększonym progmem bólu, problemami z pamięcią i zdolnością uczenia; *EXT2* - związany z łagodnym nowotworem kości - osteochondroma; *ALX4*

– związany z powstawaniem nieprawidłowych otworów kościach ciemieniowych czaszki; *ELP4* – związany z padaczką. Różnice w wielkości i pozycji usuniętego segmentu genów na chromosomie 11 tłumaczą, dlaczego istnieje wiele różnych dodatkowych schorzeń towarzyszących zespołowi (International WAGR Syndrome Association). W bardzo rzadkich przypadkach mutacje doprowadzające do rozwoju zespołu WAGR mogą wynikać ze złożonych rearanżacji chromosomalnych. Istnieje kilka potwierdzonych przypadków dziedzicznego zespołu WAGR, gdy u jednego z rodziców stwierdzono translokację zrównoważoną. Istnienie tych zrównoważonych translokacji zwykle nie jest związane z występowaniem objawów klinicznych u rodziców. Jednak w następnym pokoleniu mogą ujawnić się one jako translokacje niezrównoważone z utratą fragmentu materiału genetycznego, co skutkuje wystąpieniem objawów klinicznych zespołu WAGR u dzieci zdrowych rodziców z translokacją zrównoważoną. Ponadto odnotowano także przypadki delecji mozaikowej (MedlinePlus.gov). Obecnie termin „zespół WAGR” jest zastępowany przez „zespół delecji 11p”, aby dokładniej odzwierciedlić aktualną wiedzę na temat zaburzenia i umożliwić spójną diagnozę kliniczną i klasyfikację genetyczną.

## MANIFESTACJE KLINICZNE

### Guz Wilmsa

Guz Wilmsa, inaczej nephroblastoma, nerczak zarodkowy, jest najczęstszą postacią raka nerki we wczesnym dzieciństwie. Występuje w około połowie wszystkich przypadków zespołu WAGR. Nierzadko występuje obustronnie. Dotyczy pacjentów, u których delecja 11p obejmuje gen *WT1*. W większości przypadków guz wykrywany jest w ciągu pierwszych lat życia. Już od momentu postawienia rozpoznania zespołu WAGR powinno się przeprowadzać kontrolne USG jamy brzusznej co 3 miesiące do co najmniej 8. roku życia. Po skończeniu 8. roku życia co pół roku należy wykonywać badanie fizykalne jamy brzusznej. Nawet u dorosłych pacjentów powinno się zachować niepokój onkologiczny. Odnotowywane są bowiem przypadki rozwoju guza Wilmsa nawet po 20. roku życia (Fischbach i in. 2005). We wczesnych stadiach guza Wilmsa zwykle nie występują żadne objawy, a pierwsze manifestacje choroby mogą obejmować krwimocz, stany podgorączkowe, utratę apetytu, błądź, utratę masy ciała, zmęczenie i ospałość oraz powiększenie obwodu brzucha. W późniejszym stadium może dołączyć się ból, niewielki i ciągły lub nagły i ostry. Przetrwale, nieprawidłowe pozostałości nefrogenne (nefroblastomatoza)

nie są rzadkością u dzieci z zespołem WAGR. Tkanka ta jest widoczna w badaniu ultrasonograficznym i czasami trudna do odróżnienia od guza Wilmsa. Ze względu na częstość jej występowania u dzieci z guzem Wilmsa, także towarzyszącym zespołom wad wrodzonych oraz obustronnym guzom Wilmsa, uważana jest za stan przedrakowy i także wymaga nadzoru onkologicznego (National Organization for Rare Disorders).

### **Aniridia**

W zespole WAGR dochodzi do nieprawidłowego rozwoju tęczówki w okresie prenatalnym, co skutkuje jej częściowym lub całkowitym brakiem. Aniridia jest obserwowana u znacznej większości dzieci z zespołem WAGR. Najczęściej jest pierwszym objawem zespołu WAGR stwierdzanym po urodzeniu. Wiąże się z pogorszeniem ostrości widzenia i światłowstrętem (MedlinePlus.gov). Zazwyczaj wada ta towarzyszy innym zaburzeniom narządu wzroku, m.in.: zaćmie, jaskrze, keratopatii rogówkowej czy oczopląsowi (Trout i in. 2020).

### **Wady układu moczowo-płciowego**

Wady te mogą mieć postać podwójnych moczowodów, nerki hipoplastycznej lub podkowiastej, jednostronnej agenezji nerki, torbieli nerek, a dodatkowo u mężczyzn - niezstąpionych jąder, wnetrostwa, spodziectwa, mikropenis, hipoplazji moszny, natomiast u kobiet – jajników smugowych (ang. streak ovaries), wad macicy, jajowodów lub pochwy (Trout i in. 2020). Kolejnym zaburzeniem mogą być zaburzenia rozwoju płci i ryzyko rozwoju gonadoblastoma (Miura i in. 2016, Caignec i in. 2007).

### **Niepełnosprawność intelektualna**

Niepełnosprawność intelektualna jest powszechna u dzieci z zespołem WAGR. Jednak nasilenie może znacznie się różnić, od ciężkiej do łagodnej niepełnosprawności intelektualnej. Niektóre dzieci mogą mieć normalną inteligencję (IQ 100 lub więcej). Większość dzieci z zespołem WAGR mieści się jednak w zakresie od łagodnej do umiarkowanej niepełnosprawności intelektualnej (IQ od 50 do 70) (National Organization for Rare Disorders).

## Inne

Bardzo często występującym objawem jest nadwaga lub otyłość z towarzyszącą hiperlipidemią. Część dzieci prezentuje cechy zespołu metabolicznego, przebiegającego z insulinoopornością, nadciśnieniem tętniczym oraz hipercholesterolemią, co znacznie zwiększa ryzyko rozwinięcia cukrzycy typu 2, choroby wieńcowej oraz wystąpienia udarów w młodym wieku. Kiedy zespół WAGR obejmuje także otyłość rozpoznaną w okresie dzieciństwa, określany jest jako zespół WAGRO (O – obesity – otyłość) (National Organization for Rare Disorders).

U około 60% chorych, najczęściej po ukończeniu 12. roku życia, dochodzi do rozwinięcia przewlekłej choroby nerek, będącej skutkiem ogniskowego segmentowego stwardnienia kłębuszków nerkowych. Początkowo sądzono, że do przewlekłej choroby nerek dochodzi w mechanizmie związanym z nefrektomią. Zmniejszenie masy nerek po nefrektomii guza Wilmsa może skutkować hiperfiltracją kłębuszkową, która z kolei jest powodem rozwoju białkomoczu i ogniskowego segmentowego stwardnienia kłębuszków nerkowych. Badania wykazują jednak, że do niewydolności nerek dochodzi niezależnie od występowania guza Wilmsa (Fischbach i in. 2005).

Inne objawy choroby mogą dotyczyć sfery psychicznej. Odnotowano zaburzenia behawioralne i psychiatryczne towarzyszące zespołowi WAGR. Należą do nich zaburzenia ze spektrum autyzmu, zaburzenia z deficytem uwagi (z nadpobudliwością lub bez), zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne, zaburzenia lękowe i depresja (National Organization for Rare Disorders).

Z zaburzeń neurologicznych na uwagę zasługuje padaczka oraz zaburzenia przetwarzania słuchowego występujące u około 90% chorych. Zwykle słuch pozostaje prawidłowy, a problem dotyczy rozpoznawania i interpretowania dźwięków związanych z mową. W okresie niemowlęcym i wczesnym dzieciństwie obserwowane są też nieprawidłowości w zakresie siły i napięcia mięśni – hipertonia lub hipotonia (National Organization for Rare Disorders).

Do rzadkich wrodzonych manifestacji zespołu WAGR należą: wady serca pod postacią przetrwałego otworu owalnego, defektów przegrody międzyprzedsionkowej i międzykomorowej, hipoplazji zastawek, przetrwałego przewodu tętniczego, tetralogii Fallota, kardiomiopatia, wady nerek, atrezja dróg żółciowych, przepuklina pachwinowa, przepuklina przeponowa, tracheomalacja, polidaktylia lub syndaktylia, stopa końsko-szpotaowa, mikrocefalia, agenezja ciała modzelowatego, hipoplastyczna szyszynka, upośledzenie słuchu. Natomiast wśród objawów ujawniających się w ciągu życia dziecka zalicza się:

opóźnienie wzrastania, zaburzenia odżywiania, zaburzenia połykania, refluks żołądkowo-przełykowy, ostre lub przewlekłe zapalenie trzustki, kamice pęcherzyka żółciowego, skoliozę, liczne wyrośla kostne, zaburzenia integracji sensorycznej (National Organization for Rare Disorders; International WAGR Syndrome Association).

## DIAGNOSTYKA

Zespół WAGR można rozpoznać po urodzeniu na podstawie oceny klinicznej i badania fizykalnego, podczas którego obserwuje się aniridię i wady układu moczowo-płciowego, oraz badań genetycznych: kariotypowania, fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (metody FISH), porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) i multipleksowej amplifikacji zależnej od ligacji (MLPA), które umożliwiają zlokalizowanie regionów delecji (International WAGR Syndrome Association). Wszystkie noworodki z aniridią stwierdzoną po urodzeniu powinny mieć wykonane badania chromosomalne kierunku delecji 11p. Badania wykazują, że jedna trzecia noworodków z aniridią faktycznie otrzymuje później diagnozę zespołu WAGR. W rzadkich przypadkach aniria może nie występować, dlatego niemowlęta i dzieci z guzem Wilmsa z towarzyszącymi wadami układu moczowo-płciowego także powinny zostać poddane badaniom genetycznym. Z badań wynika, że około 7 na 1000 przypadków guzów Wilmsa można przypisać zespołowi WAGR (Bissonnette, Luginbuehl i Engelhardt 2019).

Istnieją także opisane przypadki prenatalnej diagnostyki zespołu WAGR w oparciu o badanie ultrasonograficzne płodu, rezonans magnetyczny i badania cytogenetyczne płynu owodniowego (Tezcan, Rich i Bhide 2015).

Zespół WAGR wymaga różnicowania z innymi chorobami i zespołami genetycznymi przebiegającymi z guzem Wilmsa, nefropatią, przewlekłą chorobą nerek, wadami układu moczowo-płciowego, zaburzeniami rozwoju płci i aniridią, m.in. z: zespołem Drasha, zespołem Frasiera, zespołem Beckwitha Wiedemanna (National Organization for Rare Disorders).

## LECZENIE

Leczenie zespołu WAGR jest ukierunkowane na określone objawy występujące się u pacjenta. U tych dzieci powinno się wykonywać kontrolne badania i aktywnie poszukiwać nowotworów w jamie brzusznej – guza Wilmsa oraz gonadoblastoma, który może rozwinąć się z nieprawidłowo rozwiniętych gonad.

Obecnie w Polsce w leczeniu guzów Wilmsa stosuje się protokół UMBRELLA 2016, który opiera się na 4-tygodniowej chemioterapii przedoperacyjnej (2 dawki daktynomycyny i 1 dawka winkrystyna/tydzień), obniżającej stadium zaawansowania guza, po której następuje radykalne wycięcie. Następnie w zależności od grupy ryzyka, wyjściowego stopnia zaawansowania guza i jego objętości stosuje się obserwację, chemioterapię dwulekową, trójlekową (z doksorubicyną) lub wielolekową, a w guzach o większym stadium zaawansowania i większym ryzyku histologicznym dodatkowo radioterapię (Pietras 2021).

Z kolei leczenie aniridii skoncentrowane jest na zachowaniu wzroku. W przypadku towarzyszącej jaskry lub zaćmy pomocne mogą okazać się zabiegi chirurgiczne. Sztuczne implanty tęczówki są obecnie w fazie badań klinicznych (National Organization for Rare Disorders).

W przypadku nieprawidłowego rozwoju jajników lub jąder zalecana jest gonadektomia. Pacjenci, którym usunięto obie gonady, otrzymują leczenie hormonalne, umożliwiające rozwinięcie cech płciowych w okresie dojrzewania. Jednak działaniem niepożądanym takiej terapii w przypadku dziewcząt jest zwiększone ryzyko rozwoju wtórnego raka macicy, dlatego proponuje się wykonanie histerektomii już podczas gonadektomii. W przypadku wnętrstwa u chłopców do 1. roku życia można zastosować leczenie hormonalne, a po nieskuteczności tej terapii - orchidopeksję. Ponadto pacjenci z zespołem WAGR często cierpią z powodu zaburzeń różnicowania płci. Mogą mieć gonady zgodne z płcią chromosomalną, a narządy płciowe zewnętrzne przypominające narządy płci przeciwnej, co często sprawia, że ich identyfikacja płciowa jest niepewna i w przyszłości mogą wymagać chirurgicznej korekcji narządów płciowych zewnętrznych (Le Caignec i in. 2007, Miura i in. 2005, National Organization for Rare Disorders).

Leczenie niewydolności nerek powinno opierać się na inhibitorach konwertazy angiotensyny lub blokerach receptora angiotensyny II. Leki te wprowadzone w początkowym stadium przewlekłej choroby nerek mogą pomóc w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi, zmniejszeniu białkomoczu i przedłużeniu czynności nerek (National Organization for Rare Disorders).

## KLINICZNA CHARAKTERYSTYKA PACJENTÓW Z ZESPOŁEM WAGR W BADANIACH NAUKOWYCH

Ze względu na fakt, że zespół WAGR jest rzadką jednostką chorobową, nie jest on szeroko opisywany w piśmiennictwie naukowym. W 2020 roku

natomiast opublikowano jedną z największych analiz charakterystyki klinicznej pacjentów z zespołem WAGR, powstałą na podstawie danych zbieranych przez 30 ostatnich lat przez International Society of Pediatric Oncology Renal Tumor Study Group. W analizie uwzględniono 43 pacjentów z rozpoznaniem zespołem WAGR i guzem Wilmsa. U 38 pacjentów rozpoznanie zespołu WAGR postawiono po uzyskaniu wyniku badania genetycznego, w większości przypadków z wykorzystaniem metody FISH, a pozostałych 5 pacjentów zdiagnozowano na podstawie samych objawów klinicznych. Mediana wieku w momencie rozpoznania choroby wynosiła 2 miesiące, natomiast mediana wieku w momencie rozpoznania guza Wilmsa - 22 miesiące. 70% guzów było bezobjawowych i zostało wykrytych podczas rutynowej kontroli onkologicznej, natomiast u pozostałych osób, u których objętość guza przekroczyła 500 ml, występowały objawy w postaci wyczuwalnego lub widocznego guza w jamie brzusznej oraz krwiomoczu. 38% pacjentów w momencie rozpoznania guza miało zmiany przednowotworowe lub nowotwór w obu nerkach, ale żaden z pacjentów nie miał choroby przerzutowej. U 93% pacjentów zastosowano chemioterapię przedoperacyjną złożoną z aktynomycyny D, winkrystyny i sporadycznie doksorubicyny. Następnie w ramach leczenia chirurgicznego u większości pacjentów z obustronnym guzem Wilmsa zastosowano operację oszczędzającą nerek, a u większości pacjentów z guzem jednostronnym – jednostronną nefrektomię całkowitą. Po zastosowanym leczeniu wskaźnik 5-letniego przeżycia wolnego od zdarzeń wyniósł 84,3%, a całkowity wskaźnik przeżycia 91,2%. Ponadto u 43% badanych pacjentów stwierdzono obecność wad wrodzonych towarzyszących zespołowi, a wśród nich m.in.: polidaktylii, makrocefalii, sekwencji Pierre-Robbin, ubytków przegrody międzyprzedsionkowej. Najczęściej występującymi zaburzeniami narządu wzroku towarzyszącymi aniridii były zaćma i oczopląs, a wśród wad układu moczowo-płciowego przeważało wnetrostwo. 25% pacjentów dodatkowo miało przewlekłą chorobę nerek, 13 % otyłość, a u 23% stwierdzono zespół nadpobudliwości ruchowej z deficytem uwagi i zaburzenia ze spektrum autyzmu (Hol i in. 2021).

## WNIOSKI

Zespół WAGR jest rzadką chorobą genetyczną, jednakże lekarze podstawowej opieki zdrowotnej oraz lekarze specjaliści powinni wykazywać się znajomością jego klasycznych składowych i metod diagnostycznych umożliwiającą postawienie diagnozy i wdrożenie leczenia. Wszystkie dostępne badania podkreślają znaczenie wczesnego rozpoznania zespołu WAGR. Niewykryte



i nieleczone właściwie objawy zespołu i jego groźne powikłania narządowe doprowadzają do śmierci pacjentów w okresie dzieciństwa, dojrzewania lub wczesnej dorosłości. Potrzebne są dalsze badania nad podłożem genetycznym choroby i znowelizowane wytyczne efektywnego leczenia pacjentów, ponieważ obecne zalecenia dotyczące nadzoru i leczenia są oparte na ograniczonych dowodach.

## BIBLIOGRAFIA

- Bissonnette B., Luginbuehl I. i Engelhardt T.  
2019 *WAGR Syndrome. Syndromes: Rapid Recognition and Perioperative Implications*, 2e.
- Fischbach BV. i in.  
2005 *WAGR Syndrome: A Clinical Review of 54 Cases*, "Pediatrics", 116(4), 984–988.
- Francke U. i in.  
1979 *Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13*, "Cytogenet Cell Genet", 24(3):185-192.
- Hol JA. i in.  
2021 *Clinical characteristics and outcomes of children with WAGR syndrome and Wilms tumor and/or nephroblastomatosis: The 30-year SIOP-RT-SG experience*, "Cancer", 127(4):628-638.
- International WAGR Syndrome Association  
<https://wagr.org/>
- Le Caignec C. i in.  
2007 *Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient*, "American journal of medical genetics.", Part A, 143A(22), 2692–2695.
- MedlinePlus  
*WAGR Syndrome* <https://medlineplus.gov/genetics/condition/wagr-syndrome/> Miller RW., Fraumeni JF. i Manning MD.  
1964 *Association of Wilms's tumor with aniridia hemihypertrophy and other congenital malformations*, "The New England journal of medicine vol. 270", 922-7.



Miura R. i in.

2005 *Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report*, "Mol Clin Oncol", 5(5):503-506.

National Organization for Rare Disorders

<https://rarediseases.org/rare-diseases/wagr-syndrome11p-deletion-syndrome/> Pietras W.

2021 *Nerczak płodowy*. Medycyna Praktyczna dla lekarzy.

Riccardi VM. i in.

1978 *Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion*, "Pediatrics", ;61(4):604-610.

Tezcan B., Rich P. i Bhide A.

2015 *Prenatal Diagnosis of WAGR Syndrome*, "Case reports in obstetrics and gynecology", 928585.

Trout K., International WAGR Syndrome Association

2020 *WAGR syndrome: clinical features and guidelines for management*.

MARIA GROMEK<sup>(1)</sup>, MARTYNA KŁOSIŃSKA<sup>(1)</sup>,  
AGNIESZKA KACZYŃSKA<sup>(1)</sup>, NATALIA OSIAŁ<sup>(1)</sup>,  
MAGDALENA OSTOJSKA<sup>(1)</sup>, EMILIA NOWAK<sup>(1)</sup>, A  
DRIANNA GORECKA<sup>(1)</sup>, HALINA PIECEWICZ-SZCZĘSNA<sup>(2)</sup>

(1) STUDENCKIE KOŁO NAUKOWE PRZY KATEDRZE EPIDEMIOLOGII  
I METODOLOGII BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

(2) KATEDRA I ZAKŁAD EPIDEMIOLOGII I METODOLOGII  
BADAŃ KLINICZNYCH, UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

# WPŁYW DIETY KETOGENICZNEJ NA WYBRANE CHOROBY NEURODEGENERACYJNE (CHOROBA ALZHEIMERA I CHOROBA PARKINSONA)

## ABSTRAKT

Wstęp: Dieta ketogeniczna jest dietą niskowęglowodanową, a bogatą w tłuszcze, przez co wprowadza organizm w stan ketozy, mobilizując mózg do wykorzystywania ketonów jako główne źródło energii zamiast glukozy. Powstałe, w wyniku zmniejszonej podaży węglowodanów oraz pod wpływem przemian kwasów tłuszczowych, zmiany metaboliczne, sygnalizacyjne i epigenetyczne mogą odgrywać znaczącą rolę w neuroprotekcji schorzeń neurologicznych. Wśród nich wyróżniamy choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona, które prowadzą do stopniowej degeneracji komórek nerwowych, powodując m.in., demencję. Charakteryzuje je zaburzony metabolizm glukozy w mózgu nasilający objawy choroby, a także inne patomechanizmy, na które zdaje się wpływać dieta ketogeniczna. Metoda: Praca opiera się na przeglądzie artykułów i badań, opisujących wpływ diety ketogenicznej na patomechanizmy i przebieg wybranych chorób neurodegeneracyjnych. Materiał: Jednostki chorobowe, które wzięliśmy pod uwagę w naszej pracy to: choroba Alzheimera i choroba Parkinsona. Wnioski: Dieta ketogeniczna może przyczynić się do poprawy przebiegu chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera i choroba Parkinsona.

**Słowa kluczowe:** dieta ketogeniczna, choroby neurodegeneracyjne, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona

## ABSTRACT

**Introduction:** The ketogenic diet is low in carbohydrate and high in fat, what can easily induce a state of ketosis, mobilizing the brain to use ketone bodies as its primary source of energy instead of glucose. The metabolic, signaling and epigenetic changes resulting from the reduced supply of carbohydrates and the metabolism of fatty acids may play a significant role in the neuroprotection of neurological diseases. Among them we can point out neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, which lead to the gradual degeneration of nerve cells causing i.a. dementia. They are characterized by disturbed glucose metabolism in the brain, which exacerbates the symptoms of the disease and also other pathomechanisms that appear to be influenced by the ketogenic diet. **Method:** Our work is based on a research and articles review that show the influence of the ketogenic diet on pathomechanisms and the course of selected neurodegenerative diseases. **Material:** The diseases we included in our work are: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Conclusions:** Ketogenic diet can have a positive impact on the course of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's.

**Keywords:** Ketogenic diet, Neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease

## WSTĘP

Powszechnie wiadomo, że zmiana nawyków żywieniowych może pomóc w leczeniu wielu chorób, łagodzeniu ich objawów, a także poprawie jakości życia pacjenta. Zwłaszcza dużym zainteresowaniem cieszy się dieta ketogeniczna (KD) jako potencjalna terapia niektórych schorzeń. Po raz pierwszy KD została zastosowana już w XX wieku u pacjentów z epilepsją w celu zmniejszenia częstości napadów padaczkowych (Conklin 1922).

Dieta ketogeniczna zdobywa również coraz większe znaczenie w leczeniu chorób związanych z opornością na insulinę. W terapii otyłości czy cukrzycy KD wykazuje większą skuteczność niż dieta uboga w tłuszcze (Jansen i Walach 2016, Ludwig 2020). Niskie wartości węglowodanów obecne w KD przyczyniają się do szeregu zmian metabolicznych, powodując zwiększone stężenie ciał ketonowych we krwi, większe utlenowanie tłuszczów, czy zmienność w zakresie metabolizmu białek i ekspresji genów. Działania te mają charakter ochronny dla zachowania prawidłowego funkcjonowania organizmu (Van der Auwera i in. 2005). Przypuszcza się, że długotrwała ketoza może mieć również istotny udział w poprawie zaburzonych procesów metabolicznych obecnych w chorobach nowotworowych i neurodegeneracyjnych (Jansen i Walach 2016, Ludwig 2020).

Choroby neurodegeneracyjne stanowią jeden z istotnych problemów zdrowotnych wśród osób starszych oraz są coraz częstszą przyczyną zachorowalności i śmiertelności w tej grupie wiekowej. Schorzenia charakteryzują się postępującą degeneracją neuronów, co może wiązać się z ryzykiem demencji oraz obniżeniem funkcji poznawczych (Dugger i Dickson 2017). Patogeneza chorób neurodegeneracyjnych jest wieloczynnikowa i zróżnicowana (Erkkinen i in. 2018). Wynika m.in., z zaburzonego metabolizmu glukozy w mózgu i funkcji mitochondriów oraz licznych procesów zapalnych, co sprzyja degeneracji komórek nerwowych. Nieprawidłowe procesy biochemiczne prowadzą do nasilenia objawów chorobowych, utrudniających codzienne funkcjonowanie pacjenta (Rusek i in. 2019).

W poniższym przeglądzie postaramy się przybliżyć specyfikę diety ketogenicznej, istotę jej działania neuroprotekcyjnego oraz wpływ na przebieg wybranych chorób neurodegeneracyjnych, tj. chorobę Alzheimera i chorobę Parkinsona.

## DIETA KETOGENICZNA

Dieta ketogeniczna to rodzaj diety, który opiera się na spożywaniu produktów bogatych w tłuszcze i niskowęglowodanowych, ograniczając węglowodany do  $\leq 10\%$  spożywanej energii. Taki podział przyczynia się do zwiększonego metabolizowania kwasów tłuszczowych zamiast glukozy i powstania ciał ketonowych: acetooctanu i  $\beta$ -hydroksymaślanu, które stają się głównym źródłem energii (Taylor i in. 2019). Oprócz wykorzystania tłuszczu dostarczanego w diecie, KD mobilizuje organizm do korzystania z zapasów energetycznych zgromadzonych w tkance tłuszczowej (Gasior, Rogawski, Hartman 2006).

Wyróżniamy różne postaci KD. Najczęstsza z nich zawiera głównie długołańcuchowe kwasy tłuszczowe i polega na zastępowaniu węglowodanów tłuszczami, co może być trudne w długoterminowym utrzymaniu diety. Do diet ketogenicznych klasyfikujemy również dietę Atkinsa, w której węglowodany stanowią do 5% energii w diecie (Włodarek 2019). Kolejną, coraz bardziej popularną KD staje się dieta ketogeniczna polegająca na zastosowaniu trójglicerydów średniołańcuchowych (MCT). Jest ona wygodniejsza dla pacjentów, gdyż nie wymaga znacznych restrykcji węglowodanów w diecie, a mimo to zwiększa stężenie ciał ketonowych we krwi (Henderson i in. 2009).

Działanie diet ketogenicznych opiera się na zmianach stężenia ciał ketonowych, a także glukozy, insuliny, glukagonu i kwasów tłuszczowych (Bough

i Rho 2007). Zmniejsza się stosunek ilości insuliny do glukagonu, co aktywuje procesy wątrobowe uwalniania glukozy. Po pewnym czasie, rezerwy glukozy nie są w stanie efektywnie uczestniczyć w procesie utleniania tłuszczów (Włodarek 2019). Ograniczony metabolizm glukozy sprzyja wykorzystywaniu kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej do pozyskiwania energii. Jednak ze względu na zmniejszoną zdolność mózgu do metabolizowania kwasów tłuszczowych, korzysta on z ciał ketonowych. Po przekroczeniu stężenia 4mM, ciała ketonowe są wykorzystywane przez OUN jako źródło energii (Rusek i in. 2019).

Ciała ketonowe powstają w wyniku przemian kwasów tłuszczowych, ulegających  $\beta$ -oksydacji w wątrobie. W wyniku tego procesu powstaje acetylo-CoA, który bierze udział w wytworzeniu acetyloacetonu, będącego substratem do uzyskania acetonu lub  $\beta$ -OHB (Newman i Verdin 2014). Powstałe ciała ketonowe mogą stanowić alternatywne źródło energii dla mózgu, a w czasie długiego okresu głodu zapewniać nawet do 70% zapotrzebowania energetycznego tego narządu (Rusek i in. 2019).

## DZIAŁANIE NEUROPROTEKCYJNE DIETY KETOGENICZNEJ

Dokładny mechanizm działania neuroprotekcijnego KD nie jest jeszcze w pełni poznany. W literaturze możemy znaleźć przykłady badań sugerujących możliwy wpływ ciał ketonowych na degenerację neuronów poprzez różne mechanizmy, m.in., metaboliczne, sygnalizacyjne oraz epigenetyczne (Rusek i in. 2019).

Badania sugerują, iż dieta ketogeniczna poprzez wykorzystanie ketonów jako dodatkowego źródła energii, może pomóc w złagodzeniu objawów chorób, które wynikają z hipometabolizmu glukozy w mózgu (Broom i in. 2019). Główną rolę w terapii KD odgrywa obniżony poziom glukozy we krwi i zwiększone stężenie ciał ketonowych. Hamowanie glikolizy i tworzenie ciał ketonowych, zmienia biochemię ustroju, zapewniając działanie neuroprotekcyjne dla mózgu (Rusek i in. 2019).

Protekcja wynikająca z wysokiej zawartości kwasów tłuszczowych w diecie ketogenicznej, wiąże się również z ograniczeniem odpowiedzi zapalnej (Gasior, Rogawski, Hartman 2006). KD wpływa m.in., na podwyższoną ekspresję cytokiny interferonu- $\gamma$ , chroniąc komórki przed ekscytotoksycznością oraz pośrednio hamując prozapalne cytokiny, takie jak IL-6 i TNF $\alpha$ . (Veyrat-Durebex i in. 2018).

Badania wykazały, że przewlekła ketoza zwiększa wydajność metaboliczną poprzez udział w zwiększeniu stężenia ATP i fosfokreatyny w mózgu, a także pobudzanie biogenezy mitochondriów. Dzięki tym zmianom biochemicznym neurony są lepiej przystosowane i bardziej odporne na działanie czynników stresowych, jak i zaburzonych szlaków metabolicznych (Bough i in. 2006). Ketoza metaboliczna może redukować produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), co prowadzi do poprawy funkcji mitochondriów i ograniczenia uszkodzeń oksydacyjnych (McDonald i Cervenka 2018).

Ponadto, dieta ketogeniczna pośrednio wpływa na zwiększenie stosunku GABA do glutaminianu oraz inicjuje aktywację kanałów potasowych wrażliwych na ATP, co stabilizuje aktywność synaptyczną między neuronami (Rusek i in. 2019). Badania dowodzą, że ketoza, poprzez udział w hamowaniu glutaminergicznej transmisji synaptycznej, może odgrywać ważną rolę w pośrednim toksycznym działaniu glutaminianu na uszkodzenie komórek nerwowych (Veyrat-Durebex i in. 2018).

## CHOROBA ALZHEMIERA

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą postacią demencji i stanowi 60%-80% wszystkich przypadków demencji, dotykając około 24 milionów ludzi na całym świecie (Erkkinen i in. 2018). Przepuszcza się, że całkowita liczba osób cierpiących na demencję wzrośnie 4-krotnie w 2050 r. AD definiuje się jako postępującą, wieloczynnikową chorobę, powodującą degenerację neuronów w mózgu. Do charakterystycznych objawów AD możemy zaliczyć osłabienie zdolności poznawczych z progresywną utratą pamięci i samodzielności w radzeniu sobie z codziennymi czynnościami (Breijyeh i Karaman 2020).

U pacjentów z AD obserwuje się upośledzony metabolizm glukozy w mózgu i dysfunkcję mitochondrialną, które wraz ze stresem oksydacyjnym odgrywają istotną rolę w neurodegeneracji i zaburzeniu funkcji poznawczych (Castellano i in. 2015). Zauważono, że dieta ketogeniczna może stanowić potencjalną terapię w tym schorzeniu, poprzez wpływ na szereg zaburzonych procesów metabolicznych biorących udział w rozwoju AD (Augustin i in. 2018).

Ponadto, KD wycisza procesy zapalne, wpływając na aktywność makrofagów, przez co łagodzi uszkodzenia neuronów powstałe u pacjentów z AD (Rahman i in. 2014). Natomiast w mechanizmie hamowania deacetylaz histonowych, dieta ketogeniczna przyczynia się do polepszenia funkcjonowania pamięci i plastyczności synaptycznej (Pinto i in. 2018). Badania przeprowadzone

przez Ota i in. na grupie 20 pacjentów ze średnio lub łagodnie zaawansowaną AD wykazały znaczną poprawę pamięci werbalnej i szybkości przetwarzania po 12 tygodniach stosowania KD (Ota i in. 2019).

W badaniu przeprowadzonym przez Taylor i in. oceniono efekty poznawcze u pacjentów z AD po zastosowaniu diety ketogenicznej MCT. Wykazano, że uczestnicy badania osiągnęli lepsze wyniki w podskali poznawczej Skali Oceny Choroby Alzheimera (ADAS-Cog) po 3 miesiącach stosowania KD i osiągnięciu ketozy w porównaniu ze stanem przed wdrożeniem KD (Taylor i in. 2017, s. 28-36).

## CHOROBA PARKINSONA

Choroba Parkinsona (PD) klasyfikuje się tuż za AD jako najczęściej występujące zaburzenie neurodegeneracyjne. Zachorowalność na PD szacuje się na 0,3% w populacji ogólnej, a częstość jej występowania wzrasta wraz z wiekiem i stanowi 1% u osób powyżej 60 roku życia oraz około 3% u osób w wieku 80 lat lub starszych (Erkkinen, Kim i Geschwind 2018).

Do charakterystycznych objawów PD zaliczamy spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe oraz sztywność. Wraz z postępem choroby mogą pojawić się również zaburzenia równowagi, zaburzenia funkcji poznawczych i demencja. Objawom towarzyszą zmiany zwyrodnieniowe w centralnym i obwodowym układzie nerwowym. W mózgu możemy zaobserwować pojawienie się ciała Lewy'ego, a także rozległą degenerację wielu struktur, w tym degenerację neuronów dopaminergicznych istoty czarnej (Hirsch i Standaert 2021).

Badacze Cheng i in. wykazali na szczurzym modelu choroby Parkinsona, że KD zapewnia działanie protekcyjne neuronom dopaminergicznym przed toksycznością 6-hydroksydopaminy poprzez zwiększenie aktywności glutatioinu (Cheng i in. 2009, s. 25–31).

Ponadto, w badaniu przeprowadzonym przez VanItallie i in. oceniono wpływ KD na objawy choroby Parkinsona. Po 28 dniach stosowania KD u większości pacjentów z PD, odnotowano średnio 43% zmniejszenie wyników w Ujednoliconej Skali Oceny Przebiegu Choroby Parkinsona (UPDRS) w stosunku do wyników wyjściowych. Natomiast u wszystkich pacjentów zaobserwowano poprawę objawów choroby (VanItallie i in. 2005).

Do interesujących wniosków doszli również badacze Phillips i in. W randomizowanym badaniu kontrolnym przeprowadzonym na dwóch grupach pacjentów z PD zastosowano dietę niskotłuszczową lub ketogeniczną przez okres 8 tygodni. Wykazano, że po tym czasie w obu grupach niezależnie od

diety nastąpiła znaczna poprawa w zakresie objawów motorycznych jak i niezwiązanych z motoryką. Co ciekawe, grupa ketogeniczna osiągnęła większą poprawę objawów niemotorycznych, takich jak senność w ciągu dnia, czy zaburzenia poznawcze (Phillips i in. 2018).

## DYSKUSJA

Zastosowanie diety ketogenicznej jako potencjalnej terapii różnych schorzeń, w tym neurodegeneracyjnych, zyskuje na popularności. Skłania do tego coraz lepiej poznawany wpływ przewlekłej ketozy oraz ograniczonej podaży węglowodanów na szereg przemian biochemicznych, takich jak metabolizm glukozy, kwasów tłuszczowych, metabolizm mitochondrialny oraz procesy sygnalizacyjne i zapalne. Mechanizmy te odgrywają istotną rolę w patofizjologii zaburzeń neurodegeneracyjnych. Jednak niezbędne są dokładniejsze badania, zwłaszcza w aspekcie działania KD na procesy będące potencjalną przyczyną tych schorzeń. Mimo iż na podstawie badań przeprowadzonych na zwierzętach oraz prób klinicznych można stwierdzić, że KD ma korzystne działanie neuroprotektoryjne, wpływając na poprawę przebiegu choroby Alzheimera i choroby Parkinsona zwłaszcza w zakresie sprawności poznawczej, wymaga to dalszej oceny na liczniejszej grupie badawczej. Wymagane jest również przeprowadzenie badań, oceniających odległe skutki stosowania KD u pacjentów cierpiących na te choroby. Ciekawa staje się jednak perspektywa terapii, a możliwe, że nawet zapobiegania rozwojowi tych schorzeń za pomocą diety ketogenicznej.

## WNIOSKI

1. Dieta ketogeniczna może mieć realny wpływ na przebieg chorób neurodegeneracyjnych takich jak AD i PD.
2. Dieta ketogeniczna wykazuje działanie neuroprotektoryjne, co ma pozytywne znaczenie w łagodzeniu objawów i postępu chorób neurodegeneracyjnych tj. choroby Alzheimera i choroby Parkinsona oraz prawdopodobnie w ich leczeniu.



## BIBLIOGRAFIA

Augustin K. i in.

2018 *Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders*, "The Lancet. Neurology", Jan;17(1):84-93.

Bough K.J. i in.

2006 *Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet*, "Annals of Neurology", Aug;60(2):223-235.

Bough K.J. i in.

2007 *Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet*, "Epilepsia", 48(1): 43–58.

Breijyeh Z. i in.

2020 *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*, "Molecules", 25(24):5789.

Broom GM. i in.

2018 *The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease*, "Nutrition", 60:118-121.

Castellano CA. i in.

2015 *Lower brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake but normal 11C-acetate metabolism in mild Alzheimer's disease dementia*, "Journal of Alzheimer's Disease : JAD". 43(4):1343-1353.

Cheng B. i in.

2009 *Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease*, "Brain Res", 1286, 25– 31.

Conklin H.W.

1922 *Cause and treatment of epilepsy*, "J Am. Osteopatic. Assoc", 26, 11–14

Dugger BN. i in.

2017 *Pathology of Neurodegenerative Diseases*, "Cold Spring Harb Perspect Biol", 9(7):a028035.

Erkkinen MG. i in.

2018 *Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases*, "Cold Spring Harb Perspect Biol", 10(4):a033118.

Gasior M. i in.

2006 *Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet*, "Behav.Pharm", 17:431–439.

Henderson S.T. i in.

2009 *Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial*, "Nutr. Metab.", (Lond.) 6, 31

Hirsch EC. i in.

2021 *Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease*, "Mov Disord", 36(1):16-24.

Jansen N. i in.

2016 *The development of tumours under a ketogenic diet in association with the novel tumour marker TKTL1: A case series in general practice*, "Oncol Lett", 11(1): 584-92.

Jensen NJ. i in.

2020 *Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases*, "International Journal of Molecular Sciences", 21(22).

Ludwig DS.

2020 *The Ketogenic Diet: Evidence for Optimism but High-Quality Research Needed*, "J Nutr", 150(6):1354-1359.

McDonald TJW. i in.

2018 *The Expanding Role of Ketogenic Diets in Adult Neurological Disorders*, "Brain Sciences", 8(8).

Newman JC. i in.

2014 *Ketone bodies as signaling metabolites*, "Trends Endocrinol Metab", 25(1):42-52.

Ota M. i in.

2019 *Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease*, "Neurosci Lett", 690:232-236.

Phillips MCL. i in.

2018 *Low-fat versus ketogenic diet in Parkinson's disease: A pilot randomized controlled trial*, "Mov Disord", 33, 1306–1314

Pinto A. i in.

2018 *Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activity of Ketogenic Diet: New Perspectives for Neuroprotection in Alzheimer's Disease*, "Antioxidants (Basel)", 7(5):63.

Rahman M. i in.

2014 *The  $\beta$ -hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages*, "Nature Communications", 5:3944.

Rusek M. i in.

2019 *Ketogenic Diet in Alzheimer's Disease*, "International Journal of Molecular Sciences", 20(16).

Taylor MK. i in.

2017 *Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease*, "Alzheimers Dement", (N Y). 4:28-36.

2019 *An Experimental Ketogenic Diet for Alzheimer Disease Was Nutritionally Dense and Rich in Vegetables and Avocado*, "Curr Dev Nutr", 3(4):nzz003.

Van der Auwera I. i in.

2005 *A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease*, "Nutrition & Metabolism", 2:28.

Vanitallie TB. i in.

2005 *Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study*, "Neurology", 64(4):728-730.

Veyrat-Durebex C. i in.

2018 *How Can a Ketogenic Diet Improve Motor Function?*, "Frontiers in Molecular Neuroscience", 11:15.

Włodarek D.

2019 *Role of ketogenic diets in neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease)*, "Nutrients", 11:169.

*ISBN: 978-83-67074-43-8*