NAUKA, BADANIA I DONIESIENIA NAUKOWE 2020

NAUKI PRZYRODNICZE I MEDYCZNE

Część I

ISBN 978-83-953882-6-2

Nauka, Badania i Doniesienia Naukowe
2020

Nauki przyrodnicze i medyczne
Część I

Idea Knowledge Future
Świebodzice, 2020

Redakcja
mgr inż. Tobiasz Wysoczański

Opracowanie materiałów
dr inż. Katarzyna Dereń

ISBN 978-83-953882-6-2
ISBN (całośc kolekcji) 978-83-953882-4-8

Wydawca: Idea Knowledge Future

Spis treści

Konopie indyjskie jako broń w walce z chorobą Leśniowskiego-Crohna
Brzdęk Michał [(1)] 6
Sady jabłoniowe jako lokalne źródło biomasy do ogrzewania gospodarstw domowych w województwie lubelskim
Dworecka Weronika [(1)], Noszczyk Tomasz [(2)], Dyjakon Arkadiusz [(2)] 15
Język niebinarny: *Sphinx* Anne Garréta i możliwości bezpłciowej narracji w języku francuskim
Dziurzyńska Magdalena [(1)] 26
Wpływ suplementacji kofeiną na wykorzystanie efektu wzmocnienia poaktywacyjnego (PAP) podczas wyciskania sztangi leżąc
Filip Aleksandra [(1)], Królikowska Paulina [(1)], Błażejewski Kamil [(1)], Krzysztofik Michał [(2)] 35
Różnice w kształtowaniu siły mięśniowej górnej części ciała między kobietami, a mężczyznami
Gepfert Mariola [(1)], Rawska Magdalena [(2)], Krzysztofik Michał [(1)] 44
Challenges in sample preparation for HPLC determination of diclofenac in microalgae cells
Harshkova Darya [(1)], Aksmann Anna [(1)], Wielgomas Bartosz [(2)] 52
Związek pomiędzy występowaniem depresji poporodowej a stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku kobiet karmiących
Jamrozik Natalia [(1)], Ziomkiewicz-Wichary Anna [(2)] 62
Rola acetylacji i deacetylacji histonów w regulacji ekspresji genów
Kopytko Patrycja [(1)], Bujak Joanna [(1)], Łączna Małgorzata [(1)], Tkacz Marta [(1)] 71
Rola czynnika indukowanego hipoksją w metabolizmie nowotworów i jego inhibitory w terapii przeciwnowotworowej
Kozal Karolina [(1)] 79
Reprogramming of lipid metabolism in colorectal cancer cell
Liakh Ivan [(1)], Mika Adriana [(1,2)] 88
Udział tkanki tłuszczowej w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów
Łączna Małgorzata [(1)], Kopytko Patrycja [(1)], Piotrowska Katarzyna [(1)] 97
Postrzeganie jakości certyfikowanych produktów spożywczych przez konsumenta
Kępczyńska Izabela [(1)], Młoda-Brylewska Klaudia [(2)] 105
Postrzeganie zjawiska greenwashingu przez konsumentów
Gralak Weronika [(1)], Młoda-Brylewska Klaudia [(2)] 116

Protekcyjny wpływ melatoniny na rozwój hormonozależnych nowotworów u kobiet
Osial Natalia [(1)], Nowak Emilia [(1)], Ostojska Magdalena [(1)] 125
Comparison of the most important expression systems for the production of recombinant proteins
Tułodziecki Szymon [(1)], Pokora Wojciech [(1)] 136
Układ glimfatyczny i jego rola w patogenezie wybranych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego
Tyliszczak Michał [(1)] 145
Ocena preferencji konsumenckich osób po 60-tym roku życia, ze szczególnym uwzględnieniem mleka i produktów mlecznych, w kontekście weryfikacji konieczności stosowania doustnych suplementów pokarmowych w ich żywieniu
Wajs Joanna [(1)], Stobiecka Magdalena [(1)] 155
Ocena jakościowa i ilościowa wpływu hormonów steroidowych na otrzymywanie i produktywność podwojonych haploidów rzepaku
Woźny Joanna [(1)] Rojek Joanna [(1)] 166
Narzędzia Lean Management i ich zastosowanie w sektorze ochrony zdrowia
Zdęba-Mozoła Agnieszka [(1)], Zastawna Beata [(1)] 176

Konopie indyjskie jako broń w walce z chorobą Leśniowskiego-Crohna

Brzdęk Michał [(1)]

[1] Collegium Medicum UJK
Michał Brzdęk: michal.brzdek@gmail.com

Streszczenie
Choroba Leśniowskiego-Crohna jest zapalną, nawracającą chorobą przewodu pokarmowego. Istnieje kilka grup leków, które wykorzystuje się w terapii. Celem leczenia jest uzyskanie jak najdłuższej remisji. Niestety, choroba jest nieuleczalna i często kończy się interwencją chirurgiczną. Czy istnieje sposób, aby remisja była trwała? Istnieją przesłanki, że taki efekt można uzyskać stosując konopie indyjskie. Znajdują się w nich substancje, nazywane kannabinoidami. Mogą one pomóc w walce z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Jest to wynik interakcji tych związków chemicznych z układem endokannabinoidowym. Przeprowadzono badania na zwierzętach oraz ludziach, które wykazały wpływ kannabinoidów na tę chorobę. Celem tego artykułu jest przegląd aktualnej wiedzy na temat możliwości wykorzystania konopi indyjskiej w leczeniu tej choroby.

Słowa kluczowe: Choroba Leśniowskiego-Crohna, konopie indyjskie, układ endokannabinoidowy

Cannabis as a weapon in the fight against Crohn's disease

Summary
Crohn's disease is an inflammatory, recurrent food disease. There are several groups of drugs that are used in therapy. The goal of treatment is to include as long as possible. Unfortunately, the disease is incurable and often ends with surgical intervention. And if there is a way to make remission permanent? Available uploaded that such an effect can be obtained from cannabis. They contain substances that are called cannabinoids. Combine one help in the fight against Crohn's disease. This is the result among these chemical drugs with an endocannabinoid system. Studies conducted on humans and people that affect the effect of cannabinoids on this disease. The purpose of this article is to review current knowledge about the possibilities of using cannabis in choosing this disease.

Keywords: Crohn's disease, cannabis, endocannabinoid system

1. Wstęp

Choroba Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) jest to pełnościenne zapalenie przewodu pokarmowego, może dotyczyć każdego jego odcinka. Największa liczba chorych występuje w krajach wysoko rozwiniętych, dotyczy ona najczęściej młodych osób w wieku 15-25 lat (Gajewski i in., 2019). Częstość występowania ChL-C wynosi 3-20 przypadków na 10000 ludzi (Feuerstein i in., 2017). Jest wiele czynników ryzyka, które mogą doprowadzić do rozwoju choroby. Jednym z najważniejszym są predyspozycje genetyczne. Udowodniono powiązania rodzinne w występowaniu schorzenia. Ponadto warto zauważyć, że częstość występowania jest największa u Żydów aszkenazyjskich. Ważne są także czynniki środowiskowe. Przemawia za tym wzrost zachorowalności w grupach etnicznych, w których osoby rzadko zapadały na chorobę (np. Azjaci czy Latynosi). Istotnym czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu czy niezdrowy tryb życia (Baumgart i in., 2012). Zachorowalność wydaje się być coraz większa, co może być związane z faktem, że żywność jest coraz mniej

zanieczyszczona drobnoustrojami. A co za tym idzie, procesy które powinny regulować odpowiedź immunologiczną w błonie śluzowej układu pokarmowego nie są wystarczająco rozwinięte (Kumar i in., 2019). Istnieje wiele sposobów terapii ChL-C, które wydają się być skuteczne. Umożliwiają wywołanie i utrzymanie stanu remisji choroby. Niestety aż 30% pacjentów po pięciu latach od postawienia diagnozy będzie wymagało leczenia operacyjnego. Istnieje grupa pacjentów, dla której znane metody leczenia zawodzą (Feuerstein i in., 2017). Trwają, więc poszukiwania nowych skutecznych metod terapii. Nadzieją dla takich osób mogą być związki chemiczne występujące w konopiach indyjskich-kannabinoidy (Leinwand i in., 2017).

2. Charakterystyka kannabinoidów konopi indyjskich

Konopie indyjskie są potocznie nazywane marihuaną (Ahmed i in., 2016). Jest to roślina, którą zaczęto uprawiać jako jedną z pierwszych. Istnieją dowody na to, że starożytni Chińczycy 4000 lat p.n.e. zajmowali się hodowlą tej rośliny. Wykorzystywali ją między innymi do celów leczniczych, np. zwalczano dzięki niej zaparcia (Zuardi, 2006). Obecnie wykorzystanie konopi w celach leczniczych zwiększa się, jest to skutek jej legalizacji w niektórych państwach (Picardo i in., 2019). W konopiach indyjskich odkryto ponad 560 składników (El Sohly, 2017). Znajdują się w nich: kannabinoidy, związki fenolowe i terpeny (Andre i in., 2016). Najważniejsza grupa związków pod względem medycznym to kannabinoidy. Do nich zalicza się Δ9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC), kanabidiol (CBD), kannabigerol (CBG), kanabichromen (CBC) (ElSohly, 2017). Substancje te mają niezwykle szerokie działanie farmaceutyczne (Andre i in., 2016). Kannabinoidy wykorzystuje się w leczeniu przewlekłego bólu, bezsenności, zespołu stresu pourazowego (Slawek i in., 2019). Konopie indyjskie znalazły zastosowanie także w terapii AIDS, stwardnienia rozsianego, stwardnienia zanikowego bocznego, wirusowego zapalenia wątroby typu C, padaczki (Ahmed i in., 2016). Ponadto kannabinoidy są modulatorami immunologicznymi, mogą działać przeciwzapalnie (Nallathambi i in., 2017). Obecnie wciąż są badane możliwości lecznicze wszystkich związków zawartych w konopiach indyjskich (Andre i in., 2016). Lekarze są często nieświadomi możliwości wykorzystania tej rośliny w leczeniu chorób przewodu pokarmowego (Ahmed i in., 2016).

3. Mechanizm działania kannabinoidów

W organizmach ludzi znajduje się układ, endokannabinoidowy. Odgrywa on ważną rolę w regulacji: apetytu, bólu, pamięci, płodności czy układu odpornościowego (Battista i in., 2012). Układ ten jest wciąż badany i wiedza na temat jego budowy, zadań i sposobu funkcjonowania zwiększa się (Sharkey i in., 2016). Okazuje się, że układ

endokannabinoidowy odgrywa szczególnie ważną rolę w regulacji funkcjonowania przewodu pokarmowego. Ma wpływ na jego motorykę, funkcje wydzielnicze, regenerację błony śluzowej, a także na odpowiedź immunologiczną (Leinwand i in., 2017). Jest to system, który składa się z receptorów kannabinoidowych typu 1 (CB1R), receptorów kannabinoidowych typu 2 (CB2R), kannabinoidów endogennych i enzymów, które regulują ten układ (Basavarajappa i in., 2017). CB1R występują głównie w synapsach ośrodkowego i odwodowego układu nerwowego (Woodhams i in., 2015). Z kolei CB2R znajduje się na komórkach odpornościowych: neutrofilach, makrofagach, limfocytach B, a także limfocytach T CD4+, które odgrywają istotną rolę w ograniczaniu błędnych odpowiedzi immunologicznych (Leinwand i in., 2017). Oba typy receptorów są sprężone z białkiem G. Kannabinoidy endogenne to np.: anandamid i 2-arachidonyloglicerol, są one ligandami receptorów CB1R i CB2R (Andre i in., 2016). Są syntetyzowane z fosfolipidów, mają więc charakter lipofilny. Dzięki temu z łatwością mogą przenikać przez błony komórkowe. Po ich połączeniu z tymi receptorami następuje zmiana aktywności biologicznej komórek, na których umiejscowione są CB1R i CB2R (Woodhams i in., 2015). Enzymy zaliczane do układu endokannabinoidowego to N-acylo-fosfatydyloetanoloaminy (NAPE-PLD), lipazy diacyloglicerolowe (DAGL) α i β, hydrolaza amidowa kwasu tłuszczowego (FAAH) i lipaza monoacyloglicerolu (MAGL) (Di Marzo i in., 2015). Ligandy, po aktywowaniu receptorów są wychwytywane, a następnie rozkładane przez enzymy. Anandamid jest degradowany do kwasu arachidonowego przez FAAH. Z kolei 2-arachidonyloglicerol jest rozkładany na kwas arachidonowy i glicerol, dzięki aktywności MAGL (Leinwand i in., 2017). Zaburzenia w funkcjonowaniu układu endokannabinoidowego prowadzą do wielu zaburzeń. Na szczęście istnieją sposoby, aby modulować działanie receptorów tego układu. Wiedza na temat układu endokannabinoidowego jest coraz większa, co umożliwia tworzenie nowych sposobów terapeutycznych (Battista i in., 2012). Istnieje możliwość modulacji tego układu kannabinoidami roślinnymi (nazywanymi fitokannabinoidami) lub kannabinoidami syntetycznymi (Ahmed i in., 2016). Kannabinoidy roślinne mogą aktywować lub antagonizować receptory CB1R i CB2R (Di Marzo i in., 2015). Uważa się, że agoniści tych receptorów mogą redukować zapalenia jelit (Hasenoehrl i in., 2017). Jest to fakt, że kannabinoidy ograniczają wydzielanie histaminy, prostaglandyn, czynnika martwicy nowotworów (TNF-α), interferonu-γ, interleukiny-1 (Naftali i in., 2013).

4. Efekty wykorzystania kannabinoidów w terapii ChL-C

- Modulacja układu, kannabinoidowego, jako sposób na zwalczenie stanu zapalnego u myszy

Udowodniono, że aktywacja receptorów CB2R powoduje zmniejszenie zapalenia jelita krętego u myszy (Leinwand i in., 2017). Aktywowany receptor CB2R powoduje apoptozę limfocytów T, zmniejszenie ich proliferacji, zmniejsza się także ilość makrofagów, neutrofili w miejscu stanu zapalnego okrężnicy (Schicho i in., 2014). Po przeprowadzonych badaniach na myszach, okazuje się, że układ endokannabinoidowy odgrywa ważną rolę w regulacji stanu zapalenia w jelicie grubym. Istnieją możliwości wpływania na ten system i dzięki temu modulowania stanu zapalnego (Massa i in., 2004). Kannabinoidy wykazują również właściwości immunosupresyjne (Katchan i in., 2016).

- Sposób porównywania aktywności ChL-C

Do porównania aktywności ChL-C wykorzystuje się współczynnik CDAI (Crohn's disease activity index) (Best i in., 1976). Został od opracowany na początku lat 70-tych XX-go wieku. Jest określany między innymi na podstawie subiektywnych odczuć pacjenta, badania fizykalnego czy wartości hematokrytu (Kim i in., 2017). Jeśli jego wielkość u pacjenta jest mniejsza od 150 to oznacza to całkowitą remisję choroby. W przypadku, gdy CDAI znajduje się w przedziale 150-220 mówi się o łagodnej aktywności choroby, gdy CDAI jest między 220, a 450, to oznacza to umiarkowanie ciężką formę choroby. Natomiast CDAI powyżej 450 cechuje poważne nasilenie choroby. Za lek, który wykazuje aktywność kliniczną w walce z chorobą uznaje się taki lek, które powoduje spadek CDAI o co najmniej 70, z tym że coraz częściej mówi się, że ta wartość powinna wynosić minimum 100 (Lahiff i in., 2013). Współczynnik CDAI, jest trudny do określenia, dlatego wykorzystuje się także inny współczynnik-HBI (Harvey – Bradshaw Index). Jeśli pacjent ma HBI mniejsze lub równe 4 to oznacza to całkowitą remisje, gdy HBI jest między 5, a 7 mówi się o łagodnej aktywności choroby, w przypadku, gdy HBI znajduje się w przedziale 8-16 to oznacza to umiarkowanie ciężką chorobę. Natomiast HBI powyżej 16 cechuje poważnie nasilenie choroby (Kim i in., 2017).

- Pacjenci wierzą, że konopie indyjskie mogą im pomóc w walce z chorobą ChL-C

Wiadomo, że często pacjenci chorzy na ChL-C stosują we własnym zakresie marihuanę medyczną w celu zwalczenia przykrych objawów tej choroby jak np.: bóle brzucha, biegunki czy obniżenia apetytu. Potwierdza to badanie przeprowadzone w Ontario w 2011 r, którego wyniki są zaskakujące. Aż 50% pacjentów z ChL-C stosowało konopie indyjskich jedynie w celu zmniejszenia dolegliwości wywołanych swoim schorzeniem. To potwierdza, że

pacjenci głęboko wierzą, że marihuana medyczna może im pomóc przezwyciężyć ich chorobę (Ahmed i in., 2016). Jednak istnieją dowody na to, że długotrwałe jej wykorzystywanie zwiększa ryzyko koniecznej operacji w przyszłości. Można to być spowodowane rozwojem choroby, mimo ustąpienia lub redukcji jej objawów. Pacjenci, którzy nie odczuwają oznaków swojego schorzenia, zaniedbują kontrole u lekarzy. W konsekwencji może dochodzić do zaostrzenia choroby (Storr i in., 2014). ChL-C wraz z inną chorobą-wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego są zaliczane do chorób zapalnych jelit. Dokładny mechanizm powstawania tej choroby nie jest znany, ale przebieg ChL-C jest podobny. Polega na nawracającym zapaleniach przewodu pokarmowego. W 2015 roku przeprowadzono badania dotyczące stosowania marihuany medycznej wśród pacjentów z chorobą zapalną jelit. Wzięło w niej udział dwa miliony osób chorych. W grupie kontrolnej znajdowały się osoby, które używały podobną ilość konopii indyjskiej, co społeczeństwo. Wyniki potwierdziły przypuszczenia, że osoby z chorobą zapalną jelit częściej sięgają po marihuanę (w grupie badawczej częstość stosowania była o 6,3% większa niż w grupie kontrolnej). Pacjenci, często bez konsultacji z lekarzem, próbowali wykorzystać konopie indyjskie, w celu złagodzenia objawów choroby. Co ciekawe osoby, które tak zrobiły, były przekonane, co do pozytywnego działania tej rośliny na ich chorobę (Ahmed i in., 2016).

- Badania skuteczności marihuany medycznej w terapii ChL-C

Pierwsze badania u ludzi chorych na ChL-C, dotyczące wykorzystania konopi indyjskich przeprowadzono na grupie 30 osób. Pacjentom podawano doustnie konopie indyjskie. U 21 badanych, zaobserwowano redukcję aktywności choroby, co spowodowało zmniejszenie ryzyka konieczności poddawania się operacji oraz dzięki temu pojawiła się możliwość redukcji stosowania innych leków. Średnia wartość HBI spadła z 14 ± 6,7 do 7 ± 4,7 (Naftali i in., 2011).

Spośród kannabinoidów najbardziej znanym z właściwości medycznych jest THC (tetrahydrokannabinol) (Woodhams i in., 2015). Badano wpływ THC na ChL-C. W doświadczeniu wzięły udział osoby, u których CDAI było większe niż 200 i nie reagowały na terapię innymi sposobami (leczono ich, co najmniej jedną z wymienionych substancji aktywnych: mesalamina, kortykosteroidy, tiopuryny, metotreksat lub anty-TNF-α). Pacjentów podzielono na dwie grupy. Pierwszej grupie podawano codziennie 2 dawki THC w postaci papierosów. W każdym papierosie znajdowało się jedna dawka, czyli 115 mg THC. Drugiej grupie podawano papierosy, w których znajdowały się kwiaty konopi, ale bez THC i innych kannabinoidów. Terapia trwała 8 tygodni, po czym obserwowano pacjentów jeszcze dwa tygodnie. Po tym czasie, okazało się, że u ponad 90% badanych (10/11 pacjentów w grupie

badawczej) zaobserwowano znaczną poprawę (spadek o minimum 100 CDAI), z czego u 45% chorych stwierdzono całkowitą remisję (spadek CDAI poniżej 150). Dla porównania, w grupie placebo całkowitą remisję uzyskano u 1 osoby na 10, a odpowiedź kliniczną u 4 pacjentów. U wszystkich badanych nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych terapii. Pacjenci nie zgłaszali zmian w zachowaniu, nie mieli problemów z koncentracją czy pamięcią. Nie wystąpiły objawy uzależnienia się od palenia konopi (uważa się, że czas stosowania był zbyt krótki, aby to nastąpiło) (Naftali i in., 2013).

Przeprowadzono także badania mające na celu określić skuteczność leczenia ChL-C przy użyciu CBD. W doświadczeniu wzięło udział dwudziestu pacjentów, (z czego 19 ukończyło). Wybrano osoby, u których CDAI wynosił ponad 200 i nie reagowały na terapię innymi sposobami (leczono ich, co najmniej jedną z wymienionych substancji: steroidy, tiopuryna, antagoniści TNF). Chorym w grupie badawczej podawano dwa razy na dobę dawkę CBD lub placebo. Dawka CBD zawierała 10 mg tej substancji i była podawana przez osiem tygodni. Po tym czasie jeszcze przez dwa tygodnie obserwowano aktywność choroby u pacjentów. Niestety nie zauważono korzystnych efektów terapii. Co prawda CDAI spadło w grupie badawczej z poziomu 337 ± 108 do 220 ± 122, lecz podobny spadek wystąpił w grupie placebo: z 308 ± 96 do 216 ± 121. Był to skutek przeprowadzania doświadczenia przy nie przerywaniu innych sposobów terapii. W badaniu nie wystąpiły żadne skutki uboczne (Naftali i in., 2017).

Na uwagę zasługuje doświadczenie, które przeprowadzono na szczurach.. Dotyczyło wpływu THC i CBD na zapalenie okrężnicy. Wykorzystano 85 gryzoni. Podano im dootrzewnowo kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy (TNBS), aby wywołać zapalenie w jelicie grubym (taki stan można uznać za szczurzy model ChL-C). Następnie szczury podzielono na grupę kontrolną, której nie podawano żadnego leku oraz grupę badawczą. W obrębie, której wyznaczono podgrupy, w zależności od leku i dawki jaki jest im podawany. Szczurom aplikowano THC, CBD, mieszankę THC i CBD lub sulfasalazynę (jest to lek stosowany w chorobach zapalnych jelit). Po trzech dniach od podania TNBS, szczury zabito. Zbadano próbki okrężnicy zwierząt pod kątem obecności i intensywności stanu zapalnego. Okazało się, że wszystkie zastosowane leki wykazały skuteczność. Zmniejszyły one stan zapalny. Największymi efektami wykazał się THC. Badanie to potwierdza, że kannabinoidy mogą być opcją terapeutyczną w leczeniu ChL-C (Jamontt i in., 2010).

5. Wnioski

Kannabinoidy mają korzystny wpływ na terapię ChL-C. Działanie to polega na zmienianiu funkcjonowania układu immunologicznego za pośrednictwem modulacji układu endokannabinoidowego. Badania przedkliniczne i kliniczne potwierdzają, że składniki konopi indyjskich mogą być opcją terapeutyczną w leczeniu ChL-C. Należy jednak zauważyć, że nie wszystkie kannabinoidy okazują się być skuteczne. Potrzeba więcej badań, aby określić, jakie konkretne kannabinoidy i w jakich dawkach należy stosować, aby uzyskać optymalny efekt. Do rozstrzygnięcia pozostaje także kwestia, jaka droga podania przyniesie najlepsze wyniki w leczeniu i czy interakcja miedzy kannabinoidami korzystnie wpływa na terapię. Należy również odpowiedzieć na pytanie czy konopie indyjskie powodują prawdziwe ustąpienie choroby, czy tylko maskują jej objawy. Niezbędne jest także badanie skutków ubocznych stosowania marihuany medycznej u pacjentów z ChL-C.

6. Literatura

Ahmed W., Katz S., 2016. Therapeutic Use of Cannabis in Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Hepatol (N Y); 12: 668-679

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G' 2016. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. Front Plant Sci.;7:19

Basavarajappa BS. (i in.) 2017. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. J Neurochem 142: 624-648

Battista N. (i in.), 2012. The endocannabinoid system: an overview. Front Behav Neurosci.;6:9

Baumgart DC., Sandborn WJ., 2012. Crohn's disease. Lancet 380:1590-605

Best WR. (i in.), 1976. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. Gastroenterology; 70: 439-44

Di Marzo V., Piscitelli F., 2015. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. Neurotherapeutics; 12: 692-8

ElSohly MA (i in.) 2017. Phytochemistry of Cannabis sativa L.. Prog Chem Org Nat Prod. 103: 1-36

Feuerstein JD, Cheifetz AS., 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. Mayo Clin Proc. 92: 1088-1103

Gajewski P., Szczeklik A., 2019. Interna Szczeklika 2019. Medycyna Praktyczna, Kraków 2019; 1054-1060

Hasenoehrl C., Storr M., Schicho R., 2017. Cannabinoids for treating inflammatory bowel diseases: where are we and where do we go? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 11: 329-337

Jamontt JM. (i in.), 2010. The effects of Δ9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis. Br J Pharmacol.; 160: 712–723

Katchan V., David P., Shoenfeld Y., 2016. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. Autoimmun Rev.;15: 513-28

Kim ES. (i in.), 2017. Development of a Web-based, self-reporting symptom diary for Crohn's Disease, and its correlation with the Crohn's Disease Activity Index. J Crohns Colitis. 4;11: 1449-1455

Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C., 2019. Patologia Robbins. Edra Urban & Partner; 730-734

Lahiff C. (i in.), 2013. The Crohn's disease activity index (CDAI) is similarly elevated in patients with Crohn's disease and in patients with irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. ;37: 786-94

Leinwand KL. (i in.), 2017. Cannabinoid Receptor-2 Ameliorates Inflammation in Murine Model of Crohn's Disease. J Crohns Colitis. 11: 1369-1380

Leinwand KL. (i in.), 2017. Manipulation of the Endocannabinoid System in Colitis: A Comprehensive Review. Inflamm Bowel Dis.;23: 192-199

Massa F. (i in.), 2004. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. J Clin Invest.;113: 1202-9.

Naftali T. (i in.), 2011. Treatment of Crohn's disease with cannabis: an observational study. Isr Med Assoc J. 13: 455-8

Naftali T. (i in.), 2013. Cannabis induces a clinical response in patients with Crohn's disease: a prospective placebo-controlled study. Clin Gastroenterol Hepatol. 11: 1276-1280.e1

Naftali T. (i in.), 2017. Low-Dose Cannabidiol Is Safe but Not Effective in the Treatment for Crohn's Disease, a Randomized Controlled Trial. Dig Dis Sci. 62: 1615-1620

Nallathambi R. (i in.), 2017. Anti-Inflammatory Activity in Colon Models Is Derived from Δ9-Tetrahydrocannabinolic Acid That Interacts with Additional Compounds in Cannabis Extracts. Cannabis Cannabinoid Res. 2: 167-182

Picardo S. (I in.) 2019. Insights into the role of cannabis in the management of inflammatory bowel disease. Therap Adv Gastroenterol. 12:1756284819870977

Schicho R., Storr M., 2014. Cannabis finds its way into treatment of Crohn's disease. Pharmacology. 2014;93: 1-3

Sharkey KA., Wiley JW., 2016. The Role of the Endocannabinoid System in the Brain-Gut Axis. Gastroenterology. 151: 252-66

Slawek D (i in.) 2019. Medical Cannabis for the Primary Care Physician. J Prim Care Community Health. 10:2150132719884838

Storr M. (i in.), 2014. Cannabis use provides symptom relief in patients with inflammatory bowel disease but is associated with worse disease prognosis in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis.;20: 472-80

Woodhams SG. (i in.) 2015. The role of the endocannabinoid system in pain. Handb Exp Pharmacol. 227: 119-43

Zuardi AW, 2006. History of cannabis as a medicine: a review. Braz J Psychiatry. 153-7

Sady jabłoniowe jako lokalne źródło biomasy do ogrzewania gospodarstw domowych w województwie lubelskim

Dworecka Weronika [(1)], Noszczyk Tomasz [(2)], Dyjakon Arkadiusz [(2)]

[1] Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Przyrodniczo-Technologiczny, Studenckie Koło Naukowe „BioEnergia"
[2] Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Inżynierii Rolniczej, Zakład Niskoemisyjnych Źródeł Energii i Gospodarki Odpadami
Weronika Dworecka: dworeckaweronika@gmail.com,

Streszczenie
Biomasa jest jednym ze stałych nośników energii, który posiada duży potencjał energetyczny w Polsce. Wykorzystanie biomasy w sektorze elektroenergetycznym zmniejsza emisję dwutlenku węgla do atmosfery oraz zwiększa udział odnawialnych źródeł energii w ogólnym bilansie energetycznym kraju. Biomasa z uwagi na swoje właściwości, powinna być wykorzystywana, jako jedno z lokalnych źródeł energii. Jednym z rodzajów biomasy o istotnym potencjale energetycznym są gałęzie z przycinki drzew w sadach jabłoniowych. W Polsce sady zajmują prawie 331 tys. ha. Województwo lubelskie jest drugim obszarem o najwyższym potencjale energetycznym biomasy z sadownictwa. Sady w województwie lubelskim zajmują ponad 30 tys. ha, z czego ponad 22 tys. ha to sady jabłoniowe. Wykorzystanie biomasy z sadów jabłoniowych po uwzględnieniu potencjału teoretycznego, technicznego oraz ekonomicznego biomasy pozwala na wyprodukowanie ciepła potrzebnego do ogrzania około 12 000 gospodarstw domowych.

Słowa kluczowe: biomasa odpadowa, sady jabłoniowe, ogrzewanie gospodarstw domowych, potencjał energetyczny

Apple orchards as a source of local biomass for households heating in the Lubelskie Voivodeship

Summary
Biomass is one of the solid energy carriers, which has a significant energetic potential in Poland. The use of biomass in the energy sector reduces carbon dioxide emissions to the atmosphere and increases the share of renewable energy sources in the country's overall energy balance. Due to its properties, biomass should be used as one of the local energy sources. One of the types of biomass with significant noticeable energy potential are branches from pruning of trees in apple orchards. The total area of all orchards in Poland is more than 331 thousand hectares. The Lubelskie Voivodeship is the second area in Poland, which has the largest energy potential from orchards biomass. The area of orchards in this region is more than 30 thousand hectares, of which over 22 thousand hectares are apple orchards. After assessing the theoretical, technical and economical biomass potential from apple orchards in the Lubelskie Voivodeship region is possible to provide the energy for heating purposes to ca. 12 thousand households.

Keywords: pruned biomass, apple orchards, household heating, energy potential

1. Wstęp

Polska, jako kraj starający się stosować do zasad zrównoważonego rozwoju nakłada wymagania na każdy z sektorów gospodarki. Priorytetem sektora wytwarzania energii i ciepła jest zapewnienie bezpieczeństwa energetycznego każdemu z obywateli przy jak najmniejszym negatywnym oddziaływaniu na środowisko naturalne. Wiąże się z tym zmniejszenie zużycia

paliw kopalnych, a także zwiększenie wykorzystania potencjału lokalnych, odnawialnych źródeł energii.

Paliwa kopalne należy stopniowo zastępować odnawialnymi źródłami energii. Według Głównego Urzędu Statystycznego energia pozyskiwana ze źródeł odnawialnych w Polsce w 2018 r. pochodziła głównie z biopaliw stałych (68,88%). Kolejnymi źródłami energii był elektrownie wiatrowe (12,55%) oraz biopaliwa ciekłe (10,33%). Wyniki te wskazują na wysoki potencjał biomasy, która charakteryzuje się również niskimi kosztami przetwarzania, podobnie jak w Rumunii, Bułgarii, na Ukrainie i w innych krajach bałtyckich. Szacuje się, że polski potencjał biomasy do 2030 r. wyniesie około 1,5 $EJ \cdot r^{-1}$, zajmując czwarte miejsce w Europie (UE) (Wit, Faaji 2010). W całej Unii Europejskiej 92% biomasy wykorzystywane jest do produkcji ciepła, 7% do produkcji energii elektrycznej, a tylko 1% do wytwarzania paliw transportowych (Stolarski i in., 2008).

Duży potencjał biomasy stałej w Polsce stanowi drewno odpadowe z lasów, odpady z przemysłu drzewnego, odpady drewniane poużytkowe, drewno z sadów oraz drewno z pielęgnacji i wycinek drzew przydrożnych (Jasiulewicz i Janiszewska, 2012).

Duży potencjał lokalnej biomasy zwiększa możliwości energetycznego jej wykorzystania. W krajach o znacznym udziale rolnictwa w strukturze gospodarczej, a co się z tym wiąże wysokim udziałem gruntów rolnych w całkowitym areale państwa, ekonomicznie uzasadnione jest zastosowanie biomasy na cele energetyczne, w tym ciepłownicze (grzewcze). Na uwagę zasługują odpady z przemysłu rolno-spożywczego, takie jak gałęzie drzew jabłoni, pochodzące z regularnych przycinek pielęgnacyjnych w sadach jabłoniowych. W zależności od wieku drzewa, odmiany, liczby nasadzeń oraz sposobu prowadzenia sadu, z jednego hektara sadu jabłoniowego można uzyskać średnio 3,5 $Mg \cdot rok^{-1}$ biomasy odpadowej o wilgotności 40-45% (Habiera i in., 2018).

Cięcie pielęgnacyjne to niezbędny zabieg towarzyszący uprawom sadowniczym, zwłaszcza takim, jak drzewa jabłoni, czereśni czy wiśni. Cięcie to wykonywane jest zarówno na młodych, nowych nasadzeniach, jak również na starszych drzewach. Zasadniczym celem cięcia jabłoni jest zapewnienie i utrzymanie równowagi między wzrostem i rozwojem wegetatywnym drzew, a ich owocowaniem. Ponadto, zabieg ten formuje kształt (formę) korony, reguluje jej rozmiar i zagęszczenie. Prawidłowo wykonany zabieg pielęgnacyjny umożliwia swobodny ruch powietrza i przenikanie promieni słonecznych w obrębie korony drzewa. Cięcie jest również bardzo ważnym zabiegiem fitosanitarnym, gdyż usuwane są pędy porażone przez patogeny, przez co eliminuje się źródła możliwych infekcji drzew (Meszka, 2013).

Gałęzie pochodzące z przycinek sadów jabłoniowych można wykorzystać, jako źródło energii do ogrzewania gospodarstw domowych. Jednak wysoka wilgotność biomasy nawet do 60% oraz niska koncentracja energii w jednostce objętości powoduje utrudnienia w dystrybucji i jej użytkowaniu w postaci pierwotnej, szczególnie w kotłach stosowanych w ogrzewnictwie komunalnym i indywidualnym (Stolarski, 2005). Należy, więc przeprowadzić proces przystosowania surowca do wymogów potencjalnego odbiorcy. Poprzez proces suszenia oraz kompaktowania biomasy zmniejsza się i ustala na stałym poziomie zawartość wody, zwiększa się koncentracja masy i energii w jednostce objętości oraz znacznie podnosi się komfort dystrybucji i użytkowania tego granulowanego paliwa (Thek i Obernberger 2004; Grzybek, 2004; Kowalik, 2003). W efekcie końcowym powstają: pellet, baloty, zrębki lub brykiety.

Powierzchnia sadów w Polsce w roku 2018 wynosiła prawie 331 tys. ha. Województwo lubelskie, zaraz po województwie mazowieckim, ma największy potencjał sadowniczy w Polsce. W 2018 roku powierzchnia sadów zajmowała ponad 30 tys. ha., z czego prawie 23 tys. ha stanowiły sady jabłoniowe, co jest równe ponad 76% całkowitego areału sadów w województwie lubelskim (GUS, 2019).

Celem pracy była analiza możliwości wykorzystania lokalnego potencjału biomasy sadowniczej, pochodzącej z sadów jabłoniowych województwa lubelskiego do celów grzewczych w gospodarstwach domowych.

2. Materiały i metodyka

W celu określenia stopnia wykorzystania biomasy z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim niezbędne było oszacowanie jej zasobów oraz późniejsze oznaczenie potencjału teoretycznego, technicznego oraz ekonomicznego.

Zasoby biomasy zostały oszacowane na podstawie wyników przeprowadzonych badań terenowych w sadach jabłoniowych. Badania zostały wykonane w sadach o różnej odmianie drzew jabłoniowych. Dokonano przycinki zimowo-wiosennej na wybranych losowo drzewach, aby uzyskać masę gałęzi (traktowanych, jako biomasa odpadowa), którą można uzyskać z jednego drzewa jabłoniowego.

Podstawą do oszacowania ilości biomasy sadowniczej były gałęzie ścięte z pięciu losowo wybranych drzew w danym sadzie jabłoniowym. W celu zważenia gałęzi została wykorzystana przenośna waga Lutron FG-5100 z dokładnością pomiaru ± 0,05 kg. Następnie, otrzymane wyniki ze wszystkich drzew uśredniono oraz uwzględniono gęstość nasadzenia, co pozwoliło na otrzymanie średniej ilości pozyskanej biomasy z jednego drzewa z powierzchni uprawy jednego hektara. Otrzymaną wartość odniesiono do całkowitej powierzchni sadów

jabłoniowych w województwie lubelskim. Badania przeprowadzono na 10 różnych odmianach jabłoni.

Teoretyczną masę biomasy odpadowej pozyskanej z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim oszacowano na podstawie wzoru:

$$M_{BO} = m_j \cdot n \cdot A_S \quad (1)$$

gdzie:

M_{BO} – całkowita masa biomasy odpadowej pozyskana z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim, kg·rok^{-1},

m_j – średnia masa biomasy odpadowej pozyskana z jednego drzewa owocowego kg·szt^{-1}·rok^{-1},

n – ilość nasadzonych drzew na jednym hektarze plantacji, szt·ha^{-1},

A_S – powierzchnia sadów jabłoniowych w województwie lubelskim, ha.

Potencjał techniczny to wartość odzwierciedlająca ilość biomasy, która może być przeznaczona na cele energetyczne po uwzględnieniu technicznych możliwości jej pozyskania (Gajewski, 2011). Z tego powodu potencjał biomasy odpadowej z sadów w województwie lubelskim został oszacowany przy uwzględnieniu strat, jakie występują przy zbiorze gałęzi. Przyjęto, że są to straty na poziomie ok. 9% (Magagnotti i in., 2013). Dodatkowo, w potencjale technicznym wykluczono sady o areale mniejszym niż 1 ha, ich udział stanowił 15% (Urząd Statystyczny w Lublinie, 2012). W sadach o tak małej powierzchni nie wykonuje się często regularnych i precyzyjnych cięć pielęgnacyjnych.

Potencjał ekonomiczny, czyli technicznie dostępny w warunkach ekonomicznej opłacalności przedsięwzięcia, zależny od cen paliw i energii, podatków, struktury finansowej i wskaźników ekonomicznych (Zbytek i Adamczyk, 2017). Potencjał ten został oszacowany przy pominięciu sadów o powierzchni mniejszej niż 5 ha, które stanowiły udział w wysokości 46% (Urząd Statystyczny w Lublinie, 2012) przez wzgląd na nieopłacalność zakupu drogich, profesjonalnych maszyn do zbioru gałęzi.

Jako ostatni wyznaczono potencjał energetyczny biomasy odpadowej z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim. Uwzględniono w nim zawartość wilgoci w świeżej biomasie, która wynosiła około 45%. Spalanie takiego surowca jest nieefektywne oraz powoduje straty ciepła. Jednak, po zastosowaniu odpowiedniego procesu mechanicznego przetwarzania biomasy otrzymać można pellet lub brykiet, który będzie charakteryzował się znacznie niższą zawartością wilgoci wynoszącą od 6 do 10% oraz wysoką wartością energetyczną do 19.MJ·kg^{-1}, a także niską zawartością popiołu (4-5% masy) (Gąsiorski i Posyłek, 2014). Paliwo biomasowe w takiej postaci zalecane jest do spalania

w indywidualnych kotłach grzewczych o małej mocy z zachowaniem standardów emisyjnych. Na podstawie powyższych danych, masa biomasy z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim nadającej się do energetycznego wykorzystania wynosi:

$$M_{CK} = \frac{M_{CP} \cdot (1 - X_P)}{(1 - X_K)} \quad (2)$$

gdzie:

M_{CK} - całkowita masa biomasy odpadowej przy wilgotności 10%, Mg·rok^{-1},

M_{CP} – całkowita masa biomasy odpadowej (potencjał ekonomiczny) przy wilgotności ok. 45%, Mg·rok^{-1},

X_P – wilgotność świeżej biomasy odpadowej (przyjęto X_P =0,45), -,

X_K – wilgotność podsuszonej biomasy (przyjęto X_K =0,1), -.

Teoretyczna ilość energii, którą można pozyskać w wyniku spalania biomasy odpadowej z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim wynosi:

$$E = M_{CK(W=10\%)} \cdot W_0^B \cdot \eta \quad (3)$$

gdzie:

E – teoretyczna ilość energii zawarta w biomasie odpadowej z sadów jabłoniowych, MJ·rok^{-1},

$M_{CK(W=10\%)}$ – całkowita masa biomasy odpadowej przy wilgotności 10%, kg·rok^{-1},

W_O^B – wartość opałowa biomasy sadowniczej (przyjęto W_O^B= 18 MJ·kg^{-1} dla W=10% (Telmo, Lousada 2011)), MJ·kg$^{-1,}$

η – sprawność spalania paliwa w kotłach automatycznych (przyjęto = 0,91 (www 1)), -.

Sumaryczną roczną ilość energii niezbędnej do ogrzania gospodarstwa domowego określono z równania:

$$E_{JGD} = W_E \cdot A_{GD} \quad (4)$$

gdzie:

E_{JGD} – ilość energii zużywana przez gospodarstwo domowe, kWh·rok^{-1},

W_E – wskaźnik średniego zapotrzebowania na energię dla gospodarstwa domowego (przyjęto W_E =70 kWh·m^{-2}·rok^{-1} (Dz.U. 2015 poz. 1422)), kWh·m^{-2}·rok^{-1},

A_{GD} – średnia powierzchnia gospodarstwa domowego w Polsce (przyjęto A_{GD} = 135,1 m^2 (GUS 2017)), m^2.

Liczbę gospodarstw domowych, które można ogrzać energią pochodzącą ze spalania biomasy sadowniczej w województwie lubelskim obliczono z równania:

$$N_{GD} = \frac{E}{E_{JGD}} \quad (5)$$

gdzie:

N_{GD} – liczba gospodarstw, które można ogrzać energią pochodzącą ze spalania biomasy

odpadowej z sadów jabłoniowych, szt.,

E – teoretyczna ilość energii uzyskanej z energetycznego wykorzystania biomasy odpadowej z sadów jabłoniowych, MJ·rok^{-1},

E_{JGD} – ilość energii zużywana przez gospodarstwo domowe, MJ·rok^{-1}.

3. Wyniki

W tabeli 1 zestawiono wyniki pomiarów masy zebranych gałęzi z sadów jabłoniowych po wykonanym cięciu pielęgnacyjnym.

Tabela 1. Wyniki obliczeń wielkości biomasy z przycinki zimowo-wiosennej sadu jabłoniowego (opracowanie własne)

Gatunek	Średnia masa gałęzi	Ilość nasadzeń	Masa gałęzi	Wilgotność biomasy (stan roboczy)	Średnia
	kg·szt^{-1}	szt·ha^{-1}	Mg·ha^{-1}	%	Mg·ha^{-1}
Ambas	2,85	1666	4,75	41,68	3,7
Sunrise	1,25	1666	2,08	48,37	
Early Genewa	2,9	1666	4,83	47,67	
Idared	4,25	833	3,54	43,82	
Boscob Red	2,1	1315	2,76	45,42	
Gala	2,5	1754	4,39	48,51	
Champion 1	2,3	1666	3,83	46,81	
Sunrise	1,25	1250	1,56	48,37	
Lobo	4,75	1250	5,94	42,65	
Champion 2	3,35	1250	4,19	45,33	

Z danych zamieszczonych w tabeli 1 wynika, że w zależności od gatunku jabłoni, masa zebranych gałęzi zmienia się. Do dalszych obliczeń i wyznaczenia potencjałów biomasy sadowniczej przyjęto zatem wartość średnią wynoszącą 3,7 Mg·ha^{-1} (przy wilgotności średniej W=45%).

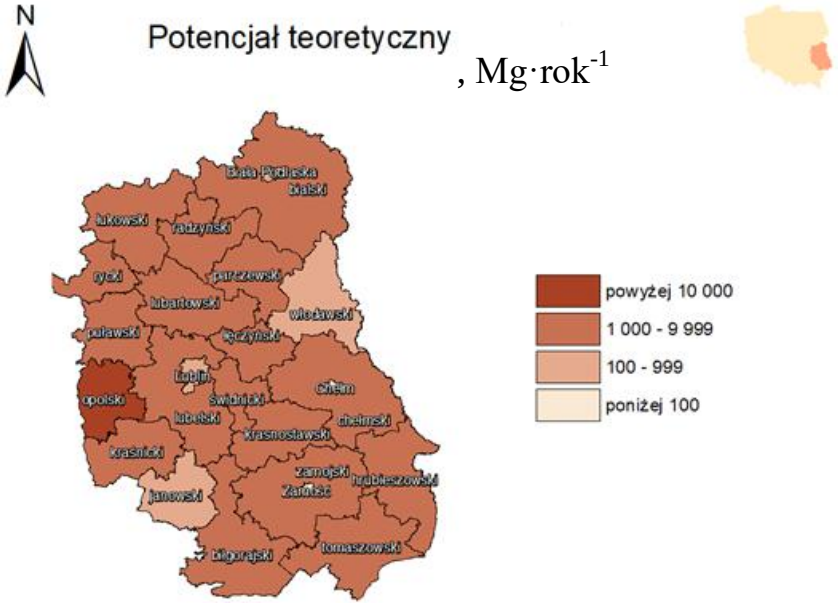
Wyniki obliczeń potencjału teoretycznego, technicznego i ekonomicznego oraz liczby ogrzanych gospodarstw domowych w całym województwie lubelskim oraz w poszczególnych powiatach zostały zestawione w tabeli 2.

Największy potencjał teoretyczny ma powiat opolski i jest to powiat o największym areale sadów jabłoniowych wśród powiatów z województwa lubelskiego. Analiza wykazała, że z zebranych w tych sadach gałęzi rocznie pozyskać można ponad 6600 Mg·rok^{-1} biomasy sadowniczej. Kolejne powiaty o dużym potencjale biomasy sadowniczej to powiat lubelski, bialski i puławski, wartość pozyskanej biomasy waha się w granicach 1500-2500 Mg·rok^{-1}. Najmniejszy potencjał teoretyczny wyznaczono dla miast na prawie powiatów oraz dla powiatów janowskiego i włodawskiego. Całkowita wielkość potencjału teoretycznego dla województwa lubelskiego wyniosła ponad 84 000 Mg·rok^{-1}. Graficzne przedstawienie

wielkości potencjału teoretycznego w poszczególnych powiatach województwa lubelskiego zostało przedstawione na rysunku 1.

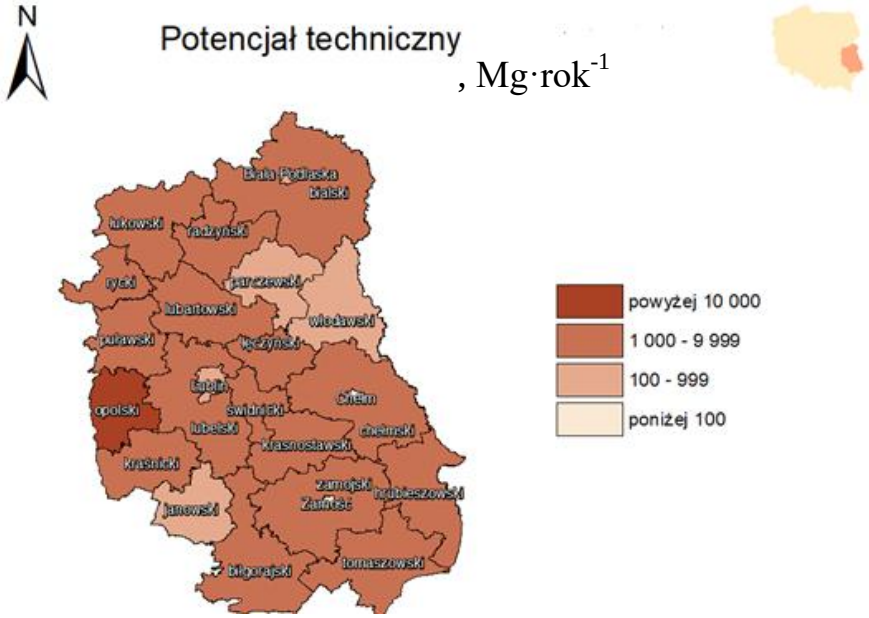
Tabela 2. Wyniki obliczeń potencjału teoretycznego, technicznego, ekonomicznego oraz liczby ogrzanych gospodarstw domowych na terenie województwa lubelskiego (opracowanie własne na podstawie danych statystycznych z GUS)

Powiat	Powierzchnia sadów	Potencjał teoretyczny	Potencjał techniczny	Potencjał ekonomiczny	Potencjał ekonomiczny (10% wilgotności)	Energia ze spalenia biomasy	Zapotrzebowanie na energię przeciętnego gospodarstwa domowego	Ilość ogrzanych gospodarstw domowych
-	ha	$Mg \cdot rok^{-1}$	$Mg \cdot rok^{-1}$	$Mg \cdot rok^{-1}$	$Mg \cdot rok^{-1}$	$GJ \cdot rok^{-1}$	$GJ \cdot rok^{-1}$	szt.
bialski	1733,6	6414,5	4961,6	3152,1	1926,3	31552,3		928
parczewski	302,1	1117,8	864,7	549,3	335,7	5498,6		161
radzyński	890,8	3296,0	2549,5	1619,7	989,8	16212,9		476
włodawski	221,0	817,8	632,5	401,8	245,6	4022,5		118
m. Biała Podlaska	64,9	240,1	185,7	118,0	72,1	1180,9		34
biłgorajski	382,6	1415,4	1094,8	695,5	425,1	6962,4		204
chełmski	1039,5	3846,2	2975,0	1890,0	1155,0	18919,1		556
hrubieszowski	843,5	3121,0	2414,1	1533,6	937,2	15351,8		451
krasnostawski	863,1	3193,5	2470,2	1569,3	959,0	15708,5		462
tomaszowski	491,4	1818,1	1406,3	893,4	546,0	8942,9		263
zamojski	1052,4	3893,7	3011,8	1913,4	1169,3	19152,8		563
m. Chełm	26,4	97,5	75,4	47,9	29,3	479,7		14
m. Zamość	10,1	37,5	29,0	18,4	11,3	184,5	34	5
lubartowski	867,8	3211,0	2483,7	1577,9	964,3	15794,6		464
lubelski	2220,3	8215,1	6354,3	4036,9	2467,0	40409,1		1188
łęczyński	548,8	2030,6	1570,7	997,9	609,8	9988,5		293
świdnicki	1250,4	4626,4	3578,6	2273,4	1389,3	22757,1		669
m. Lublin	81,8	302,6	234,1	148,7	90,9	1488,4		43
janowski	234,5	867,8	671,2	426,4	260,6	4268,5		125
kraśnicki	1156,4	4278,8	3309,7	2102,6	1284,9	21047,2		619
łukowski	457,6	1693,0	1309,6	832,0	508,4	8327,9		244
opolski	5989,7	22161,9	17142,2	10890,4	6655,2	109012,4		3206
puławski	1549,8	5734,3	4435,5	2817,8	1722,0	28206,4		829
rycki	497,5	1840,6	1423,7	904,5	552,7	9053,6		266
SUMA	22776	84271,2	65183,8	41410,9	25306,6	414522,8		12181



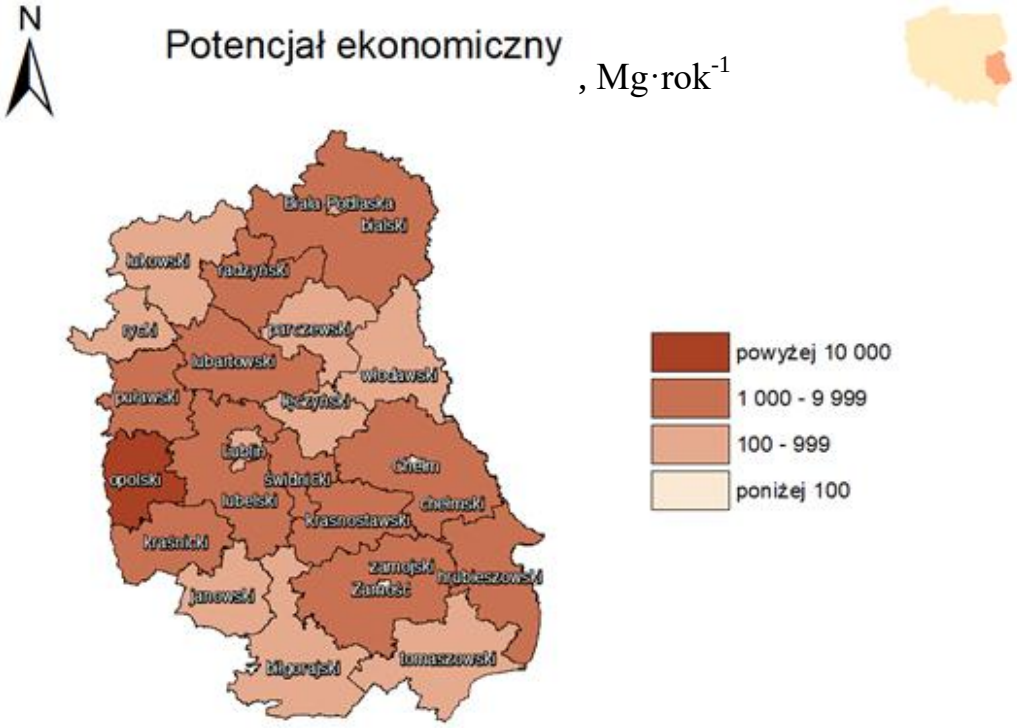
Rys. 1. Potencjał teoretyczny wykorzystania biomasy sadowniczej na cele grzewcze (opracowanie własne)

W przypadku potencjału technicznego pominięto sady o powierzchni poniżej 1 ha, które stanowiły 15% udziału w całej strukturze upraw sadowniczych (GUS, 2010) oraz uwzględniono straty generowane podczas zbioru gałęzi przez maszyny. Największy potencjał techniczny występuje w powiecie opolskim. Najmniejszy zaś występuje w miastach na prawach powiatu oraz w powiecie parczewskim, włodawskim i janowskim. Jak zauważyć można na mapie (Rys. 2) w powiecie parczewskim i włodawskim, ze względu na ich sąsiedztwo wykorzystanie tego potencjału w praktyce będzie możliwe, gdy zostanie stworzona spółdzielnia, zrzeszająca małych sadowników, której założenie umożliwi wspólne wykorzystanie wyspecjalizowanych, ale także kosztownych maszyn zbierających.



Rys. 2. Potencjał techniczny wykorzystania biomasy sadowniczej na cele grzewcze (opracowanie własne)

Potencjał ekonomiczny (Rys. 3) wyznaczono pomijając sady o powierzchni poniżej 5 ha. W sadach o takiej powierzchni nieopłacalny jest zakup maszyn zbierających gałęzie. W województwie lubelskim sady takie stanowią 46% (GUS, 2010). Największy potencjał ekonomiczny występuje w powiecie opolskim i wynosi ponad 10890 Mg·rok^{-1}. Dla tego regionu najbardziej opłacalny jest zakup maszyn do zbioru biomasy. Najmniejszy potencjał ekonomiczny występuje w północno-wschodniej oraz południowej części województwa. Z powodu mniejszej liczby sadów jabłoniowych w niektórych powiatach, wykorzystanie potencjału ekonomicznego, tak jak w przypadku potencjału technicznego, w zasadzie jest możliwe tylko po zrzeszeniu się właścicieli małych, pojedynczych sadów i dokładnej analizie kosztów dodatkowych np. transportu maszyny zbierającej do sadownika.



Rys. 3. Potencjał ekonomiczny wykorzystania biomasy sadowniczej na cele grzewcze (opracowanie własne)

Sumaryczną ilość energii jaką można pozyskać ze spalenia biomasy odpadowej z sadów jabłoniowych w województwie lubelskim (Tab. 2) wynosi ponad 414 000 GJ·rok^{-1}. Jest to ilość energii wystarczająca do ogrzania ok. 12 100 gospodarstw domowych, przy założeniu, że przeciętne gospodarstwo domowe na cele użytkowo-bytowe zużywa ok. 34 GJ rocznie (gospodarstwo energooszczędne).

4. Dyskusja wyników i podsumowanie

Sady jabłoniowe w województwie lubelskim są bardzo cennym źródłem biomasy odpadowej. Wykorzystanie ich potencjału to dobry krok w stronę rozwoju lokalnego rozproszonego systemu energetycznego. Poprzez duży areał, jaki zajmują sady, zwiększa się

ilość generowanych odpadów w postaci gałęzi pochodzących z regularnych przycinek pielęgnacyjno-prześwietlających. Z przeprowadzonej analizy wynika, że w powiecie opolskim wartość ta jest największa. Uzyskana z nich biomasa sadownicza pozwala na ogrzanie 3206 gospodarstw domowych rocznie, co stanowi 15% procent wszystkich gospodarstw powiatu opolskiego. Zagospodarowując biomasę sadowniczą z całego województwa lubelskiego (z sadów o powierzchni powyżej 5 ha) można wytworzyć ok. 414 000 GJ energii, która powinna zaspokoić roczne zapotrzebowanie na ciepło ponad 12 000 tys. gospodarstw domowych.

Ważne jest jednak, aby zwiększać świadomość techniczno-technologiczną sadowników, by zmieniała się obecna tendencja do rozdrabniania i pozostawiania gałęzi w sadach. Jest to praktyka częsta, mimo że w pewnym stopniu niebezpieczna poprzez narażenie roślin na przenoszenie się chorób. W województwie lubelskim przeważają sady mniejsze, co nie oznacza nieopłacalności zbierania z nich gałęzi po przycinkach. Zakłada się, że zrzeszonym sadownikom łatwiej będzie ponieść koszty zakupu i utrzymania wyspecjalizowanych maszyn, a także prowadzić działania na rynku sprzedaży surowca. Dobra praktyka połączenia cięć pielęgnacyjnych w sadach jabłoniowych z energetycznym zagospodarowaniem odpadów, biomasowych przez wszystkich sadowników może przyczynić się do poprawienia jakości środowiska naturalnego. Biomasa jest alternatywnym nośnikiem energii dla spalania wysokoemisyjnego węgla.

5. Literatura

Wit M., Faaij A., 2010, European Biomass Resource Potential and Costs. Biomass Bioenergy, 34, 188-202, doi:10,1016/j.biombioe.2009.07.011.

Gajewski R., 2011, Potencjał rynkowy biomasy z przeznaczeniem na cele energetyczne, Szanuj energię, Polska Izba Biomasy, Warszawa

Gąsiorski A., Posyłek Z., 2014, Wpływ wilgotności biomasy na straty mocy w torze falowodowym na pasmo X z wyciętym przelotowo otworem, Przegląd elektrotechniczny, ISSN 0033-2097, R. 90 NR 12/2014

Grzybek A. 2004. Potencjał biomasy możliwej do wykorzystania na produkcję peletu. Czysta Energia, 6: 24-25

Główny Urząd Statystyczny. 2017. Budownictwo mieszkaniowe I KWARTAŁ 2017r., Warszawa, ISSN: 0239-2178

Główny Urząd Statystyczny. 2018. Energia ze źródeł odnawialnych w 2017r., Warszawa, ISSN: 1898-43479

Główny Urząd Statystyczny. 2018. Tablica 9 (221) Powierzchnia i zbiory owoców z drzew w 2017r., Warszawa

Główny Urząd Statystyczny. 2019. Produkcja upraw rolnych i ogrodniczych w 2018 r., Warszawa, ISNN: 2353-5180

Habiera K., Lach A., Dyjakon A. 2018. Metody zagospodarowania biomasy z sadów jabłoniowych w Polsce. XII, 138-152, ISBN 978-83-950719-2-8

Jasiulewicz M., Janiszewska A., 2012, Potencjał biomasy województwa zachodniopomorskiego w aspekcie wykorzystania do celów energetycznych, Zeszyty naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 12 (27), 83-93

Kowalik P. 2003. Pelety z biomasy - paliwo przyszłości. Agroenergetyka, 1: 36-37

Magagnotti N., Pari L., Picchi G., Spinelli R., 2013, Technology alternatives for tapping the pruning residue resource, Bioresource Technology, Vol. 128, 697-702

Meszka B. 2013, Metodyka integrowanej ochrony wiśni, Instytut ogrodnictwa, Skierniewice, ISBN 978-83-60573-72-3

Stolarski M. 2005. Charakterystyka zrębków oraz peletów (granulatów) z biomasy wierzby i ślazowca jako paliwa. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 13 (1), 13-22

Stolarski M., Szczukowski S., Tworkowski J. 2008. Biopaliwa z biomasy wieloletnich roślin energetycznych. Energetyka i ekologia, 77-80

Telmo C., Lousada J. 2011. Heating values of wood pellets from different species. Biomass and Bioenergy, 35, 2634-2639

Thek G., Obernberger I. 2004. Wood pellet production costs under Austrian and in comparison to Swedish framework conditions. Biomass and Bioenergy, 27: 671-693

Urząd Statystyczny w Lublinie. 2012. Charakterystyka gospodarstw rolnych w województwie lubelskim, Powszechny Spis Rolny 2010. Lublin, ISBN: 978-83-7402-199-9

Zbytek Z., Adamczyk F., 2017, Możliwości wykorzystywania biomasy stałej. Część 2. Sposoby określenia potencjału biomasy stałej i doboru maszyn do jej zbioru, …

Źródła internetowe:

www 1 - http://www.ekspertbudowlany.pl/artykul/id3307 (data dostępu: 28.01.2020)

Język niebinarny: *Sphinx* Anne Garréta i możliwości bezpłciowej narracji w języku francuskim

Dziurzyńska Magdalena [(1)]

[1] Uniwersytet Wrocławski
Magdalena Dziurzyńska: ma.dziurzynska@gmail.com

Streszczenie
Narracja bezpłciowa, to typ narracji, w której, dzięki unikaniu form męskich i żeńskich, płeć narratora, bądź innych postaci nie zostaje ujawniona. Efekt ten jest najczęściej osiągany poprzez użycie formy pierwszoosobowej, która w wielu przypadkach pozwala na pominięcie konstrukcji wyrażających płeć. Możliwość skonstruowania tego typu narracji, zależy od charakterystyki danego języka. Największą popularnością cieszy się język angielski, ze względu na swoją neutralność w aspekcie płci. Stworzenie narracji „bezpłciowej" w języku francuskim, wydaje się być praktycznie niemożliwe, ze względu na jego nasycenie formami żeńskimi i męskimi. Udało się to jednak Anne Garréta, która w swojej powieści *Sphinx,* przedstawia romans pomiędzy narratorem i jedną z postaci, lecz ich płeć nigdy nie zostaje określona. Artykuł ma na celu odnalezienie i przeanalizowanie środków, którymi posłużyła się autorka by osiągnąć narracje neutralną płciowo w języku francuskim, a także zbadanie, w jaki sposób wpływa to na całość tekstu i jego odbiór.

Słowa kluczowe: niebinarność, narracja, j. francuski, gender, OuliPo.

Nonbinary language: Anne Garréta's *Sphinx* and the possibilities of genderless narration in the French language

Summary
The idea of nonbinary narration rests upon the story in which the sex of the protagonists or the narrator is not revealed. It usually requires the use of first-person narrator which allows genderless constructions. The possibilities of applying such a narration depends on the language among which English is the most common. Genderless narration in the French language seems to be extremely difficult to achieve as gender in French is conveyed not only by the pronouns, but also by other lexical constructions and parts of speech. Anne Garréta was the first one to achieve genderless narration. She found the loopholes in the French language which allowed her to create the story of two lovers in which their gender is never revealed. This article analyses the means used by the author to create genderless narration and how it influenced the text and its' reception.

Keywords: non-binary, narration, French language, gender, OuliPo.

1. Wstęp

Językiem niebinarnym można określić wszystkie struktury i elementy języka, które wychodzą poza tradycyjny podział na formy męskie i żeńskie. Poprzez taki język możliwe jest stworzenie narracji bezpłciowej, czyli neutralnej płciowo, w której płeć samego narratora, podmiotu mówiącego, bądź bohaterów powieści, nie zostaje określona poprzez żadne struktury językowe. Efekt ten, najczęściej uzyskiwany jest poprzez narrację pierwszoosobową i w większości przypadków to właśnie płeć narratora pozostaje niesprecyzowana. Ten typ narracji autorzy osiągają poprzez sprawne ominięcie zaimków osobowych *on, ona* i skupienie się na zaimku *ja*, który pozostaje neutralny w aspekcie płci. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że powieści bazujące na narracji bezpłciowej są to dzieła anglojęzyczne. Język angielski,

ze względu na swoją neutralność w aspekcie płci, umożliwia sprawne utworzenie takiej narracji poprzez narratora pierwszoosobowego, lub rzadziej, drugoosobowego. Mimo wyzwań, jakie towarzyszą tworzeniu takich dzieł, można naliczyć kilkanaście pozycji tego typu, a najbardziej znaną jest powieść *Written on the Body* (1992), autorstwa Jeanette Winterson. Jest to książka uznawana za największe osiągnięcie w realizacji narracji neutralnej płciowo. Opowiada ona o romansie narratora, o nieokreślonej płci, z kobietą o imieniu Louise. Jest to jednocześnie jedyna powieść tego typu, która została przetłumaczona na język polski. Ze względu na specyfikę języka polskiego i mocne nacechowanie aspektami płci, uniknięcie używania form męskich i żeńskich okazało się niemożliwe. W związku z tym w przekładzie tłumaczka decyduje się nadać narratorowi płeć żeńską, zmieniając tym samym zamysł powieści i tworząc dzieło opowiadające o miłości homoseksualnej. Jednak sytuacja jest jeszcze trudniejsza w języku francuskim, który również mocno opiera się na elementach językowych określających płeć, a uniknięcie tych form z wielu względów, szczególnie w języku pisanym, może wydawać się zadaniem niezwykle trudnym, wręcz niemożliwym.

2. Aspekt płci w języku francuskim

Zanim możliwa będzie analiza ewentualnych sposobów osiągnięcia narracji bezpłciowej w języku francuskim, należy skupić się na tym, jakie elementy językowe określają w języku płeć. W języku francuskim formy męskie i żeńskie są wyrażane nie tylko poprzez zaimki, lecz również poprzez części mowy, elementy leksykalne i niektóre kategorie językowe (czas lub aspekt). Język francuski posiada dwa rodzaje gramatyczne, jeśli chodzi o rozróżnienie rzeczowników: rodzaj męski i żeński (przykładowo: *un étudiant* (uczeń), *une étudiante* (uczennica)). Rodzaj może być, więc wyrażany zarówno poprzez sam rzeczownik, jak i poprzez poprzedzający go rodzajnik. Aspekt płciowy posiada również większość przymiotników, które różnią się formą w zależności od osoby lub obiektu, które określają, na przykład: *heureux* (szczęśliwy), *heureuse* (szczęśliwa). Oczywiste jest, że płeć określają również zaimki osobowe zarówno te akcentowane jak i nieakcentowane: *Elle* (ona) *Elles* (One) *Il* (on) *Ils* (oni), *Lui, Eux*. Poza zaimkami osobowymi, formę żeńską i męską posiadają również zaimki dopełnienia bliższego, czyli odpowiadające na pytanie, „kogo, co?": *le* (jego) i *la* (ją). Podział na formę męską i żeńską pojawia się również w czasach złożonych np. w czasie przeszłym *passé composé* lub zaprzeszłym *plus-que-parfait*. W tych czasach imiesłów czasu przeszłego musi zostać uzgodniony z podmiotem, w przypadku czasowników odmienianych z czasownikiem posiłkowym *être*, na przykład: *Je suis allé* (poszedłem), *Je suis allé**e*** (poszłam). Uzgadniane zostają również czasowniki odmieniane z czasownikiem *avoir*, gdy dopełnienie bliższe występuję przed czasownikiem.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione zasady językowe, można zauważyć, że język francuski jest dość mocno nacechowany strukturami językowymi wyrażającymi płeć. W związku z tym, można sobie wyobrazić, jak trudne może być skonstruowanie narracji neutralnej płciowo. Ta sztuka udała się jednak francuskiej pisarce Anne Garréta w jej pierwszej powieści zatytułowanej *Sphinx.*

3. Anne F. Garréta i *Sphinx*

Anne Garréta jest francuską pisarką urodzoną w 1962. Sukces literacki przyniosła jej już pierwsza powieść *Sphinx,* wydana, w 1986, która okrzyknięta została innowacyjnym eksperymentem i wielkim osiągnięciem literatury francuskiej. W 2000 roku, Garréta, jako jedna z pierwszych kobiet, została przyjęta do literackiego stowarzyszenia OuLiPo[1] (Duncan, 2019). Członkowie tej grupy literackiej pracują nad tworzeniem literatury eksperymentalnej, opartej na różnorodnych wzorach i prawach matematycznych, a także grach słów. Są to często dzieła przekraczające granice tradycji literackich, zarówno w formie jak i w treści (Duncan, 2019). Uznano, że jej powieść *Sphinx* idealnie wpisuję się w eksperymentalne koncepcje lat 60tych i 70tych, praktykowanych w OuLiPo. Sukces, jakim było stworzenie narracji bezpłciowej w języku francuskim porównano do tego, co osiągnął Georges Perec w powieści *La Disparition*, w której stworzył lipogram z samogłoską *e* (Duncan, 2019).

Sphinx jest to opowieść o miłości pomiędzy narratorem *Je* (Ja) i obiektem jej/jego westchnień: A***. Narracja prowadzona jest w formie pierwszoosobowej, historię poznajemy więc z perspektywy *Je*. Przez całą powieść nie poznajemy jednak ani imion tych dwóch postaci, ani ich płci. Jedyne, czego dowiadujemy się o bohaterach, to ogólne fakty, jak to, że *Je* jest osobą, która studiowała teologię, pochodzi z rodziny mieszczańskiej, i pracuje, jako DJ. A*** natomiast jest postacią czarnoskórą, o korzeniach afroamerykańskich, pochodzącą z Harlemu i tańczącą w paryskich kabaretach na placu Pigalle. Jest to historia o stopniowym poznawaniu się narratora/ki i A*** i o uczuciu, które stopniowo rodzi się między nimi. Jednak, dzięki temu, że ich płeć nie jest sprecyzowana ani językowo, ani nie jest wskazana w żaden sposób w tekście, nie wiadomo, jakiego typu jest to relacja.

4. Narracja „bezpłciowa” w języku francuskim

Stworzenie niebinarnej narracji wymagało od autorki przedsięwzięcia konkretnych środków. Można by pokusić się o stwierdzenie, że Garréta wykorzystała możliwe luki w języku francuskim, dotyczące aspektu płci w strukturach językowych, tak by swoim postaciom płci nie nadać. Poniżej przeanalizowane zostaną sposoby, dzięki którym osiągnęła

[1] OUvroir de LIttérature POtentielle – Warsztat literatury potencjalnej

zamierzony efekt. Zostaną one przedstawione na podstawie wybranych przykładów z książki, wraz z podanym autorskim tłumaczeniem na język polski. Uwaga zwrócona będzie również na to, jak użyte przez autorkę chwyty wpływają na sam tekst i jego odbiór.

Pierwszym elementem jest całkowity brak dialogów w powieści. Autorka ani razu nie przedstawia żadnej z rozmów pomiędzy bohaterami. Cała narracja odbywa się w sposób opisowy, z perspektywy narratora/ki, w stylu przypominającym pamiętnik. Uniknięcie dialogów sprawia, że sprawnie można pominąć używanie form osobowych i zaimków, które mogłyby w jakikolwiek sposób zdradzić płeć bohaterów. Sprawia to jednak, że tekst może wydać się odbiorcy statyczny i po pewnym czasie wręcz nużący, jako że brak dialogów dla niektórych oznacza brak akcji i tempa w narracji.

Kolejnym aspektem widocznym w tekście jest częste, wręcz nagminne powtarzanie nazw własnych, szczególnie imienia A***. Powtórzenie imienia pozwala autorce uniknąć użycia zaimków osobowych, które musiałyby wskazać płeć danej postaci. Dostrzec można wiele wyrażeń czy zdań, w których naturalne byłoby użycie zaimka osobowego, zamiast tego pojawia się po prostu imię postaci. Widać to na poniższych przykładach:

1. A*** m'entretint longtemps de choses diverses. Nous étions ivres et A*** plus que moi (Garréta, 111).

   A*** długo opowiadał/a mi o różnych rzeczach. Byliśmy pijani/ne i A*** bardziej niż ja.
2. Cette affection que j'éprouvais pour A*** réclamait son incarnation, ce plaisir que je ressentais en sa compagnie exigeait sa plénitude. Je voulais A*** (81).

   To co czułem/am do A*** wymagało swojego wcielenia, ta przyjemność którą odczuwałem/am w jego/jej towarzystwie domagała się spełnienia. Chciałam/em A***.

W obydwu powyższych przypadkach, widzimy powtórzenie imienia A***, które pojawia się w zdaniach następujących po sobie. Jako że podmiot pozostaje już określony, naturalne byłoby posłużenie się w drugim zdaniu zaimkiem osobowym, co jednak musiałoby przybrać formę męską lub żeńską. Zamiast tego, otrzymujemy, więc powtórzenie. Warto przyjrzeć się jeszcze jednemu przykładowi:

3. Tout, ce que j'appris, de la bouche de A***, fut qu'elle[2] était sensible à ma réserve, aux attentions que j'avais pour elle. De tous les gens qu'elle avait l'occasion de voir en

[2] Zaimki *elle* w cytacie odnoszą się do słowa *la bouche* (ż) - usta; nie określają one płci postaci.

compagne de A***, c'est pour moi, semble-t-il, qu'elle avait le plus d'estime. Ma jeunesse l'étonna (j'avais dix ans de moins que A***)

Wszystko, czego dowiedziałem/am się z ust A ***, to to, że były wrażliwe na moją powściągliwość, na uwagę którą miałem dla nich. Spośród wszystkich ludzi, których widziały w towarzystwie A ***, wydawało mi się, że miały dla mnie największy szacunek. Moja młodość go/ją zadziwiła (byłam/em 10 lat młodszy/a od A***)

W powyższym fragmencie dostrzec można nietypowo częste powtórzenie nazwy własnej. W przeciągu czterech krótkich zdań, odbiorca otrzymuje trzy powtórzenia imienia A***, mimo że zarówno naturalne jak i poprawne gramatycznie byłoby użycie zaimków osobowych. Należy, więc zastanowić się, jaki efekt wywiera to na czytelniku. Ze względu na powtórzenia imienia, można odczuć odnieść wrażenie, że postać zostaje ciągle od nowa wprowadzana do tekstu. Użycie zaimków osobowych umożliwiłoby oswojenie czy zaznajomienie się z postacią. Ich brak powoduje, że czytelnik nie jest w stanie do końca poznać danego bohatera i jednocześnie nie jest w stanie w żaden sposób się z nim utożsamić, jako że jest dla niego postacią obcą, nową. Wyniknąć może z tego zarówno brak empatii wobec bohatera, jak i jakichkolwiek uczuć względem niego.

Następną ważną kwestią jest użycie zaimków dzierżawczych i zaimków dopełnienia bliższego. Jeśli chodzi o te drugie to, jak zostało już wcześniej wspomniane, przyjmują one formę żeńską *la* i męską *le*. Zastępują rzeczownik lub osobę stojące zaraz po czasowniku, określając jego płeć. Pamiętać należy jednak, że zaimki dopełnienia bliższego, przed czasownikami zaczynającymi się na samogłoskę, muszą zostać skrócone do formy *l*, jako że dwie samogłoski nie mogą znajdować się obok siebie. Jednocześnie, forma skrócona nie zdradzi czy jest to forma męska czy żeńska, w związku z tym płeć dopełnienia pozostanie nieznana. Tę lukę języka wykorzystuje właśnie Garréta. Używając zaimków dopełnienia bliższego, stosuje je w zdaniach wraz z czasownikami zaczynającymi się od samogłosek, co można zauważyć na poniższych przykładach:

1. Je l'accusai en vrac d'indifférence et de narcissisme. A***me reprocha en retour (147)

   Oskarżałam/em go/ją o obojętność i narcyzm. A *** obwiniał/ała mnie również.

2. Ma jeunesse l'étonna j'avais dix ans de moins que A*** (123)

   Moja młodość go/ją zadziwiła. Byłam/em 10 lat młodszy/a od A***

Jak widać w powyższych zdaniach, dzięki użyciu formy skróconej, nie znamy formy płciowej dopełnienia, przez co nie wiemy czy osoba, o której mowa jest kobietą czy mężczyzną. Przykładów takich jest w tekście bardzo dużo, jako że autorka bardzo sprawnie wykorzystuje tę zasadę w swojej narracji.

Jeżeli chodzi o zaimki dzierżawcze, to istotny jest fakt, że w języku francuskim zaimki co prawda mają formę męską *son* i żeńską *sa* (zaimki 3 osoby liczby pojedynczej jego/jej), ale uzgadniają one swoją formę z rzeczą posiadaną, a nie z posiadaczem, na przykład: *son père*, gdzie *son* może zarówno oznaczać *jego* jak i *jej*, a forma męska wynika z tego, że *père* (ojciec) ma formę męską. Ten aspekt językowy, jako że nie wyraża płci posiadacza, również został szeroko wykorzystany przez pisarkę, co widoczne jest w poniższych zdaniach:

1. (…) j'écoutais les détails de sa journée, les anecdotes de son dîner (24) słuchałem/am szczegółów jej/jego dnia, anegdot z jego/jej kolacji.
2. J'entrais dans sa loge peu après son arrivée, apportant souvent une marque de mon attachement: des fleurs, une photo prise à la dérobée au moment de son entrée en scène (24)

   Przychodziłem/am do jego/jej garderoby krótko po jego/jej przybyciu, często przynosząc dowód mojego przywiązania: kwiaty, zdjęcie zrobione ukradkiem w momencie jego/jej pojawienia się na scenie.

W pierwszym przykładzie, zarówno zaimek *sa* jak i zaimek *son* nie zdradzają płci osoby, o której jest mowa, a zdanie zostało skonstruowane tak, by umożliwić użycie właśnie tych zaimków dzierżawczych. W przykładzie drugim również widoczne jest nasycenie wypowiedzi zaimkami dzierżawczymi. Pozwala to na przekazanie wielu informacji zarówno o samych postaciach jak i o czynnościach przez niewykonywanych, bez określenia płci.

Powyższy zabieg językowy prowadzi bezpośrednio do kolejnej, ważnej kwestii, jaką jest użycie synekdoch. Synekdocha to figura stylistyczna, która zastępuje przedmiot nazwą jego części. Figura ta jest dla autorki niezwykle użyteczna, można wręcz powiedzieć, że tekst jest przepełniony synekdochami. Opisanie osoby, jako całości, wiązałoby się w dużej mierze z użyciem zaimka osobowego i, w związku z tym, z określeniem płci podmiotu czy dopełnienia. Jednak poprzez stworzenie opisu osoby na podstawie części ciała, można sprawnie temu zapobiec, używając neutralnych zaimków dzierżawczych i synekdoch, co widać w jednym z powyższych cytatów (patrz strona 5, cytat 3). We fragmencie można dostrzec, że jest to opis osoby, opis A***, jednak jest on przekazany nie poprzez przedstawienie całości, lecz poprzez przedstawienie części, a mianowicie ust. Według tego opisu to usta mają szacunek i to one są wrażliwe i czułe, jednak można jednoznacznie wywnioskować, że chodzi tutaj oczywiście o A*** jako całościową osobę. Podobną sytuację zaobserwować można w poniższych przykładach:

1. J'avais la sensation dans ma chair du contact de ses membres; alors qu'ils n'étaient plus là. (83)

Czułam/em na ciele dotyk jego/jej kończyn, mimo że nie było ich już przy mnie.

2. Me retournant, je me heurtai contre son corps (98)

Odwracając się, natrafiłam/em na jego/jej ciało.

Drugie zdanie ponownie przedstawia osobę A***, ale tym razem poprzez *kończyny*. Narrator/ka opisuje że nie ma już przy nim/niej kończyn A***, i oczywistym jest, że chodzi tutaj o całą osobę. W zdaniu trzecim osoba A*** jest przedstawiona natomiast po prostu, jako ciało. Cała narracja przepełniona jest różnego rodzaju synekdochami, odwołującymi się do części ciała, które mają symbolizować całości postaci, co donosi się zarówno do *Je* jak i A***. Opis postaci poprzez jej części ciała umożliwia użycie zaimków dzierżawczych i synekdoch oraz unikanie zaimków osobowych, przez co w żaden sposób płeć nie zostanie określona. Zabieg ten z jednej strony wprowadza do tekstu pewnego rodzaju namiętność czy erotyzm: narracja staje się bardzo delikatna i subtelna, poprzez ciągłe odwołania do ciała. Z drugiej strony jednak, powoduje to bardzo silną fragmentację postaci. Dla czytelnika trudne może okazać się wyobrażenie sobie postaci, jako całości, kiedy przez całą powieść A*** przedstawiony/a zostaje jest, jako części.

W celu uniknięcia nadmiernego użycia czasowników, które wymagałyby określonego płciowo podmiotu, autorka decyduje się na częste użycie odsłowników, czyli rzeczowników odczasownikowych:

1. Sa présence et sa conversation m'étaient tin agrément tout comme la contemplation de son corps ou de sa danse (74)

   Jej/jego obecność i rozmowa były dla mnie bardzo przyjemne, podobnie jak kontemplacja jej/jego ciała lub tańca.

Zamiast użycia czasowników mamy do czynienia z rzeczownikami: *obecność, rozmowa, kontemplacja, tańca.* Wyrażenia te można umieścić w tekście zamiast czasowników, co sprzyja ukryciu jakichkolwiek językowych form płciowych. Jednak nadużywanie tego elementu w narracji sprawia, że nabiera statycznego charakteru. Można odnieść wrażenie, że akcja stoi w miejscu, że bohaterowie nie wykonują żadnych czynności.

Ostatnią kwestią, do pewnego stopnia dominującą tekst, jest użycie czasu przeszłego ciągłego *imparfait*. Czas ten nie wymaga żadnego uzgodnienia ze względu na płeć i zachowuje tą samą formę niezależnie od osoby. Jest to jednak czas służący zazwyczaj do opisu czynności trwających przez jakiś czas, bez określonego początku ani końca. Użycie czasu *imparfait* powoduje, że w wielu przypadkach czasowniki zyskują aspekt niedokonany, co wpływa na odbiór akcji. Odnieść można wrażenie, że bohaterowie ciągle wykonują czynności, które nigdy nie doczekają się zakończenia lub że niektóre czynności są przez nich

wykonywane regularnie. Jednak użycie czasu przeszłego prostego, wymagałoby od autorki uzgadniania czasowników z płcią podmiotu, w związku z tym decyduje się ona na użycie czasu ciągłego. W tekście napotkać można również formy archaiczne, nieużywane już obecnie w języku francuskim, zarówno mówionym, jak i w dziełach literackich. Autorka decyduje się jednak na użycie takich struktur jak tryb łączący czasu przeszłego *imparfait,* czy czasu zaprzeszłego (*plus-que-parfait*). Tryb ten nie wymaga uzgadniania płci, w związku z tym autorka posługuje się nim w narracji, pomimo tego, że obecnie jest już niezwykle rzadko spotykany:

1. J'*eusse voulu* pouvoir écarter [subjonctif plus-que-parfait] (…) (82)
2. J'*eusse désiré* [subjonctif plus-que-parfait] qu'à cette heure la tragédie me *livrât* [subjonctif imparfait] au moins un confident (…) (166).

Użycie tych form pozwala uniknąć określenia form płciowych, jednocześnie nadając opisowi dość archaiczny i starodawny charakter. Może się to niestety przełożyć na problemy ze zrozumieniem niektórych fragmentów tekstu, ze względu na fakt, że te formy, nawet dla osób francuskojęzycznych, mogą okazać się nieznane.

5. Podsumowanie

Przeprowadzona analiza pozwala na dostrzeżenie środków, jakimi należy posłużyć się przy tworzeniu narracji bezpłciowej w języku francuskim. Może to być zarówno dobór odpowiedniego czasu, który nie wymaga uzgodnienia formy płciowej, jak i wykorzystanie figur stylistycznych, czy wszelkich luk i możliwości, które daje język. Wymagało to od autorki wykorzystania interesujących strategii językowych, które pozwoliły jej na niebinarną narrację w języku dość mocno nacechowanym formami płciowymi. Pomimo tego, że wybory dokonane przez pisarkę sprawić mogą pewne problemy w odbiorze tekstu, były one konieczne, aby osiągnąć zamierzony efekt. Stworzenie tej powieści było ogromnym osiągnięciem literatury francuskiej, jak również studiów genderowych. Okazuje się, bowiem, że kategoria płci może pozostać neutralna, nie tylko językowo, ale również poprzez kreację świata i postaci. Pomimo opisów bohaterów i wykonywanych przez nich czynności, czytelnik nie jest w stanie określić ich płci. Zamiast skupiać się na aspektach związanych z płcią, odbiorca powieści może skoncentrować się na innych elementach. Podkreślona zostaje problematyka różnic rasowych i klasowych, wszelkie aspekty płciowe całkowicie zanikają. Przedstawiona zostaje historia uniwersalna, ponadczasowej miłości, w której płeć dwóch osób, między którymi rodzi się relacja, nie odgrywa żadnego znaczenia.

6. Literatura

Cairns L., 2002. Lesbian Desire in Post-1968 French Literature. Mellen Press.

Duncan D., 2019. The Oulipo and Modern Thought. Oxford University Press.

Ehrlich S, Meyerhoff M, (red.), 2014. The Handbook of Language, Gender, and Sexuality.

Garréta A., 1986. Sphinx. Bernard Grasset.

Gill Rye (red.), 2013. Women's Writing in Twenty-First-Century France: Life As Literature. University of Wales Press.

Wpływ suplementacji kofeiną na wykorzystanie efektu wzmocnienia poaktywacyjnego (PAP) podczas wyciskania sztangi leżąc

Filip Aleksandra [(1)], Królikowska Paulina [(1)], Błażejewski Kamil [(1)], Krzysztofik Michał [(2)]

[1] Katedra Teorii i Praktyki Sportu, Akademia Wychowania Fizycznego w Katowicach
[2] Instytut Nauk o Sporcie, Akademia Wychowania Fizycznego w Katowicach
Aleksandra Filip: a.filip@awf.katowice.pl

Streszczenie
Celem badania była ocena wpływu kofeiny (KOF) (3 mg/kg/m.c) na wykorzystanie efektu wzmocnienia poaktywacyjnego (PAP) poprzez ocenę wartości generowanej średniej (MP) i szczytowej (PP) mocy mięśniowej oraz średniej (MV) i szczytowej (PV) prędkości sztangi w wyciskaniu sztangi leżąc (WL). Wzięło w nim udział 12 mężczyzn (wiek: 25,1 ± 1,9 lat, masa ciała: 78,5 ± 8,5 kg, 1RM: 127.3 ± 14.5 kg), którzy byli konsumentami KOF (3,8 ± 0,8 mg/kg/m.c. KOF dziennie). W podwójnie zaślepionym, randomizowanym badaniu, w trakcie dwóch sesji eksperymentalnych każdy z nich otrzymał placebo (PLAC) lub 3 mg/kg/m.c. KOF. Uczestnicy wykonali trzy serie WL, wykonując 3 powtórzenia z obciążeniem zewnętrznym 50% 1 powtórzenia maksymalnego. Anova z powtarzalnymi pomiarami nie wykazała istotnych różnic w wartościach MP, PP, MV, PV między poszczególnymi seriami z zastosowaniem zarówno KOF jak i PLAC. Suplementacja KOF-w dawce 3mg/kg/m.c. nie wykazuje istotnego wpływu na wykorzystanie efektu PAP podczas WL.

Słowa kluczowe: PAP, moc mięśniowa, prędkość, trening oporowy, kofeina.

The acute effects of caffeine on post-activation potentiation (PAP) during the bench press exercise

Summary
The main goal of this study was to examine the combined effects of PAP and acute CAF intake on power output and bar velocity during successive sets of the bench press exercise.Using a randomized, double-blind, crossover design, 12 resistance trained individuals (age: 25,1 ± 1,9 year, body mass: 78,5 ± 8,5 kg, 1RM: 127.3 ± 14.5 kg) performed 2 identical experimental sessions 60 min after the intake of a placebo, or 3 mg/kg/b.m. of caffeine. In each experimental session, participants performed 3 sets of 3 repetitions of the bench press exercise at 50%1RM. The repeated measures ANOVA between PLAC and CAF-3 revealed no statistically significant differences in power output and velocity of the bar between successive sets of bench press exercise. The results of the present study indicate that acute doses of CAF before exercise does not have a significant effect on PAP effect.

Key words: PAP, power output, bar velocity, resistance exercise, caffeine.

1. Wprowadzenie

Zdolność do generowania wysokich wartości mocy mięśniowej jest jednym z najważniejszych czynników determinujących sukces w wielu dyscyplinach sportowych. Uzyskiwane wartości mocy mięśniowej zależne są zarówno od siły jak i prędkości wytwarzanej przez mięśnie (Argus i wsp., 2014), dlatego też istotne wydaje się być poszukiwanie rozwiązań treningowych i suplementacyjnych wpływających na poprawę tych składowych. Dotychczasowe badania wykazały istotny wzrost generowanych wartości mocy mięśniowej w następujących po sobie kolejnych seriach ćwiczenia oporowego (Tillin

i Bishop, 2009; Wilk i wsp., 2019), a także korzystny wpływ ćwiczenia aktywacyjnego na efektywność później wykonywanych ćwiczeń eksplozywnych jak rzuty, skoki czy uderzenia (Sale, 2002; Marques i wsp., 2007; Golas i wsp., 2016). Wzrost generowanych wartości mocy mięśniowej obserwowany między poszczególnymi seriami ćwiczeń oporowych, a także bezpośrednio po nich określa się jako efekt wzmocnienia poaktywacyjnego (PAP).

Chociaż już samo wykorzystanie PAP może być skutecznym i praktycznym rozwiązaniem dla zwiększenia siły i mocy mięśniowej to w sporcie powszechną praktyką jest stosowanie środków ergogennych, których efekt działania może działać synergistycznie z PAP. Jednym z suplementów stosowanych w treningu oporowym jest kofeina (KOF) i dotychczasowe badania potwierdzają wpływ KOF na poprawę generowanych wartości mocy mięśniowej podczas ćwiczeń oporowych (Mora-Rodríguez i wsp., 2012; Pallarés i wsp., 2013; Diaz-Lara i wsp., 2016; Grgic i wsp., 2018). Najczęściej stosowane protokoły suplementacje obejmują dawki wynoszące od 3 do 9 mg/kg/masy ciała (m.c.) ale dobór optymalnej ilości KOF może się jednak różnić i być zależny od rodzaju stosowanego ćwiczenia, objętości i intensywności wysiłku, a także rodzaju skurczu mięśniowego przeważającego w wysiłku (Pallarés i wsp., 2013; Grgic i wsp., 2018; Sabol i wsp., 2019).

Biorąc pod uwagę powszechne stosowanie KOF, jak i skuteczność PAP w poprawie wydajności ćwiczeń istotna wydaje się być ocena czy PAP może ulec poprawie po spożyciu KOF. Zgodnie z wiedzą autorów, tylko jedno dotychczasowe badanie dotyczyło efektywności PAP po suplementacji KOF (Guerra i wsp., 2018) i wykazało ono synergiczne działanie PAP i KOF, które skutkowało istotną poprawą wyniku wyskoku dosiężnego w grupie profesjonalnych piłkarzy. Biorąc pod uwagę fakt, że wyciskanie sztangi na ławce leżąc (WL) jest jednym z najpopularniejszych ćwiczeń oporowych stosowanych w celu zwiększenia siły i mocy kończyn górnych to uzasadniona wydaje się być ocena czy efektywność PAP możne zostać zwiększona podczas kolejnych serii WL po przyjęciu różnych dawek KOF.

Dlatego głównym celem tego badania było sprawdzenie wpływu spożycia KOF (3mg/kg/m.c.) na wykorzystanie PAP poprzez ocenę generowanych wartości mocy mięśniowej i prędkości sztangi podczas wykonywania kolejnych serii WL. Postawiono hipotezę, że natychmiastowe spożycie KOF wpływa na wystąpienie PAP podczas kolejnych serii WL w porównaniu z placebo (PLAC).

2. Materiały i metody

Uczestnicy badania

Dwunastu zdrowych mężczyzn, doświadczonych w treningu siły mięśniowej (wiek: 25,1 ± 1,9 lat, masa ciała: 78,5 ± 8,5 kg, 1RM: 127.3 ± 14.5 kg; średnia ± odchylenie

standardowe) po podpisaniu pisemnej zgodę na uczestnictwo w badaniach dobrowolnie wzięło w nich udział. Uczestnicy mieli co najmniej roczne doświadczenie w treningu siłowym (2,7 ± 0,9 roku). Wszyscy uczestnicy byli konsumentami KOF, a ich dzienne spożycie KOF wynosiło średnio 3,8 ± 0,8 mg/kg/m.c. (298 ± 40 mg KOF dziennie). Kryteria przystąpienia do badania były następujące: (a) brak zaburzeń układu nerwowo- mięśniowego, (b) wartość 1RM w wyciskaniu sztangi leżąc na ławce płaskiej wynosząca, co najmniej 120 % m. c. (c) średnie spożycie kofeiny powyżej 3 mg/ kg.m.c/dzień (~250 mg dziennie). Badani byli zobowiązani do powstrzymania się od spożywania alkoholu i tytoniu, leków i suplementów diety, w trakcie trwania eksperymentu, jak i na dwa tygodnie przed jego rozpoczęciem. Protokół badania został zatwierdzony przez Uczelnianą Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach, Polska, zgodnie ze standardami etycznymi Deklaracji Helsińskiej, 2013.

Ocena nawykowego spożycia kofeiny

Nawykowe spożycie KOF oceniono przy pomocy zaadaptowanego na potrzeby badań kwestionariusza dotyczącego częstotliwości spożycia żywności (FFQ) (Bühler i wsp., 2014). Porcje, w miarach domowych, zostały wykorzystane do oszacowania ilości spożywanej żywności zgodnie z następującą częstotliwością konsumpcji podczas dnia, tygodnia i miesiąca. Informacje na temat zawartości KOF zaczerpnięto z uprzednio opublikowanych informacji żywieniowych i tabeli wartości odżywczych (Burke, 2008; Frankowski i wsp., 2008). Na podstawie odpowiedzi w FFQ, wykwalifikowany dietetyk oszacował nawykowe spożycie kofeiny dla każdego uczestnika.

Projekt eksperymentalny

W trakcie trwania badań każdy z uczestników otrzymał w kolejności losowej PLAC i KOF z zachowaniem zasady podwójnego zaślepienia. Czas przerwy pomiędzy sesjami laboratoryjnymi wynosił 7 dni tak, aby umożliwić pełną regenerację i eliminację aktywnych metabolitów KOF z osocza.

Podczas dwóch sesji eksperymentalnych, uczestnicy przyjmowali placebo (PLAC) lub KOF w dawce 3 mg/kg/m.c. (KOF-3). Czas odstępu pomiędzy podaniem suplementu i próbą testową wynosił 60 minut. Następnie wykonywano 3 serie po 3 powtórzenia wyciskania sztangi leżąc (WL) przy zastosowaniu obciążenia zewnętrznego 50%1RM. Badani zobowiązani byli do powstrzymywania się od treningów na dzień przed sesjami laboratoryjnymi, ale jednocześnie zachowanie zwyczajowej aktywności na czas trwania badań. Uczestników poproszono również o powstrzymanie się od spożywania KOF na 12

godzin przed każdym badaniem. Wszystkie testy przeprowadzono w Laboratorium Siły i Mocy Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach.

Protokół badań

Przed sesją zapoznawczą uczestnicy przybyli do laboratorium o tej samej porze dnia, co w nadchodzących sesjach eksperymentalnych (między 9:00, a 11:00). Badani wykonali standaryzowaną rozgrzewkę (Wilk i wsp., 2019), a następnie oceniono 1RM w WL testem zgodnym z protokołem Saeterbakken'a (2011).

Próby eksperymentalne składały się z 2 sesji testowych. Pora badania oraz rozgrzewka przed sesjami eksperymentalnymi była identyczna z zastosowaną podczas sesji zapoznawczej. Po rozgrzewce uczestnicy wykonali trzy serie WL, wykonując 3 powtórzenia w każdej serii z obciążeniem zewnętrznym 50% 1RM z zachowaniem 5 minutowego okresu wypoczynkowego między seriami. Faza koncentryczna oraz ekscentryczna ruchu była wykonywana w maksymalnym możliwym tempie. Do oceny badanych parametrów użyto transduktora liniowego Tendo TM Power Analyzer (Tendo Sport Machines, Trencin, Słowacja). Pomiaru dokonano niezależnie dla każdego powtórzenia i uzyskano wartości szczytowej mocy mięśniowej (PP), średniej mocy mięśniowej (MP), prędkości szczytowej (PV), średniej prędkości (MV).

Analiza statystyczna

Testy Shapiro-Wilk, Levene i Mauchly´s zastosowano w celu zweryfikowania normalności, jednorodności oraz sferyczności danych wejściowych do analiz. Weryfikację różnic pomiędzy seriami 1,2 i 3 w aspekcie wartości generowanej mocy mięśniowej i prędkości po zastosowaniu KOF-3 i PLAC, przeprowadzono przy użyciu analizy wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami. Obliczono również procentowe przyrosty względne z założeniem 95% przedziałów ufności. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica 9.1 i przedstawiono, jako średnie i odchylenia standardowe.

3. Wyniki

Nie zaobserwowano istotnych różnic w analizowanych zmiennych (MP, PP, MV, PV) między poszczególnymi seriami z zastosowaniem PLAC i KOF-3 (Tabela 1).

Tabela 1. Wyniki zmian generowanych wartości mocy mięśniowej i prędkości pomiędzy trzema kolejnymi seriami WL po podaniu PLAC i KOF-3 (opracowanie własne)

	Seria 1	Seria 2	Seria 3	F	*P*
PP [W]					
PLAC (95% CI)	886 ± 153 (789 ; 984)	868 ±156 (769; 968)	891 ±144 (799 ; 982)	0.55	0.58
KOF-3 (95% CI)	928 ± 200 (778 ; 989)	919 ± 200 (814 ; 1031)	888 ± 170 (851 ; 1019)	0.57	0.57
MP[W]					
PLAC (95% CI)	474 ± 100 (409 ; 538)	475 ± 93 (416 ; 534)	482 ± 94 (422 ; 542)	1.22	0.31
KOF-3 (95% CI)	474 ± 95 (413 ; 535)	480 ± 97 (418 ;542)	466 ± 97 (405 ; 528)	1.35	0.27
PV [m/s]					
PLAC (95% CI)	1.45 ± 0.15 (1.35 ; 1.55)	1.42 ± 0.15 (1.32 ; 1.52)	1.44 ± 0.15 (1.35 ; 1.54)	0.85	0.44
KOF-3 (95% CI)	1.45 ± 0.16 (1.34 ; 1.55)	1.46 ± 0.16 (1.35 ; 1.57)	1.44 ± 0.22 (1.30 ; 1.58)	0.13	0.87
MV [m/s]					
PLAC (95% CI)	0.95 ± 0.08 (0.90 ; 1.00)	0.95 ± 0.08 (0.90 ; 1.00)	0.96 ± 0.07 (0.91; 1.01)	0.15	0.85
KOF-3 (95% CI)	0.92 ± 0.08 (0.87 ; 0.97)	0.94 ± 0.10 (0.88 ; 1.01)	0.92 ± 0.10 (0.85 ; 0.99)	1.48	0.25

4. Dyskusja

Wyniki badania nie wykazały istotnych różnic w następujących po sobie seriach WL w żadnej analizowanej zmiennej między suplementacją PLAC, a KOF-3. Uzyskane rezultaty wskazują, że zastosowanie KOF-3 nie miało wpływu na wystąpienie efektu PAP podczas WL w badanej grupie osób.

Prezentowane badanie jest pierwszym, które uwzględnia dwa ważne czynniki wpływające na poziom generowanych wartości mocy mięśniowej i prędkości sztangi w ćwiczeniach oporowych. Sam PAP bez przyjmowania KOF może, co prawda poprawić wartości mocy mięśniowej i prędkości sztangi w ćwiczeniach oporowych (Tillin i Bishop, 2009; Gołaś i wsp., 2016; Wilk i wsp., 2019), jednak wpływ PAP zależy od wielu zmiennych treningowych, w tym szczególnie od wartości zastosowanego obciążenia zewnętrznego (Hrysomallis i Kindgell, 2001; Farup i Sørensen, 2010; Liossis i wsp., 2013; Bogdanis, 2019). Pomimo faktu, że wcześniejsze badania potwierdziły, że niskie lub umiarkowane obciążenia (40-65% 1RM) mogą poprawić późniejsze wartości mocy mięśniowej i prędkości sztangi (Baker, 2003; Liossis i wsp., 2013; Bogdanis, 2019) to w badaniu własnym nie wykazano istotnych zmian w trakcie następujących po sobie serii WL z obciążeniem zewnętrznym 50% 1RM po podaniu PLAC. Należy jednak zauważyć, że w dotychczasowych publikacjach (Baker, 2003; Liossis i wsp., 2013; Bogdanis i wsp., 2019) wartości generowanej mocy mięśniowej i prędkości sztangi oceniano podczas wyrzutu sztangi leżąc, a nie w klasycznym

WL, które zastosowano w protokole badań własnych. Różnice w ćwiczeniach wykorzystywanych do oceny generowanych wartości mocy mięśniowej i prędkości sztangi mogą tłumaczyć uzyskanie sprzecznych wyników.

Innym ważnym aspektem rozważanym w niniejszym badaniu był wpływ przyjmowania KOF na PAP podczas ćwiczeń WL. Dotychczasowe badania wykazały, że suplementacja KOF zwiększa generowane wartości mocy mięśniowej (Pallarés i wsp., 2013; Grgic i Mikulic, 2017). Guerra i wsp. (2018) wykazali istotną poprawę wyników wyskoku dosiężnego po 1, 3 i 5 minucie po ćwiczeniu aktywacyjnym i spożyciu KOF (5 mg/kg/m.c.) w porównaniu z PLAC. Jest to jednak wyższa dawka suplementu od zastosowanej we własnej procedurze testowej (5mg/kg/m.c. vs 3mg/kg/m.c.) i być może, dlatego wyniki naszych badań nie potwierdzają istotnego wpływu spożycia KOF na PAP. Brak istotnych zmian po przyjęciu KOF-3 we wszystkich analizowanych zmiennych (PP, MP, PV, MV) między kolejnymi seriami WL może być także związany ze średnim dziennym spożyciem KOF przez uczestników. Według badań (Svenningsson i wsp., 1999; Fredholm i wsp., 1999) nawykowe spożycie KOF może modyfikować reakcje fizjologiczne poprzez regulację wrażliwości receptorów adenozynowych oraz wpływać na metabolizm KOF poprzez przyspieszoną jej konwersję do innych metabolitów przez cytochrom P450. Dlatego też, wcześniejsze badania wykorzystujące stosowanie KOF pokazują, że jej nawykowe przyjmowanie może zmniejszać efekt ergogenny w przypadku doraźnej suplementacji (Beaumont i wsp., 2017; Lara i wsp., 2019). Do tej pory nie ma jednak dostępnych danych naukowych na temat wpływu spożycia KOF na PAP u nawykowych konsumentów KOF, co ogranicza możliwość porównania naszych wyników z innymi badaniami.

Ponadto, skuteczność wpływu spożywanej KOF na generowane wartość i mocy mięśniowej kończyn górnych zależy również od wartości obciążenia zewnętrznego zastosowanego w procedurach testowych. Poprzednie badania wykazały, że spożycie KOF w dawce 3 mg/kg/m.c. zwiększa prędkość sztangi i generowanych wartości mocy mięśniowej podczas wyciskania na ławce leżąc przy obciążeniach 25–50% 1RM, podczas gdy wymagana była wyższa dawka KOF (9mg/kg/m.c.), gdy zastosowano submaksymalne obciążenia (90% 1RM) (Pallarés i wsp., 2013). Wilk i wsp. (2019) nie wykazali żadnych istotnych zmian mocy mięśniowej i prędkości sztangi przy 50% 1RM po zastosowaniu 3, 6 lub 9 mg/kg.m.c KOF w porównaniu z PLAC. Wyniki tych badań wskazują, że nie tylko dawka KOF, ale także wartość zastosowanego obciążenia zewnętrznego może być istotną zmienną podczas analizy wpływu spożycia KOF na PAP. Dlatego wyniki naszego badania nie mogą przekładać się na

innego rodzaju ćwiczenia z innym obciążeniem zewnętrznym, inną objętością lub intensywnością ćwiczeń.

Niniejsze badanie ma kilka ograniczeń, które należy uwzględnić. U badanych sportowców nie przeprowadzono oceny zmienności genetycznej związanej z metabolizmem KOF. Jednak prawdopodobieństwo posiadania genotypu ADORA2A 1083TT związanego z odczuwaniem niepokoju wywołanego KOF zmniejsza się wraz ze wzrostem dziennego spożycia KOF i osoby z tym genotypem częściej ograniczają jej spożycie (Cornelis i wsp., 2007). Procedura badania zakładała, że wszyscy uczestnicy byli przyzwyczajeni do działania KOF w podobnym stopniu, pomimo, że ich dzienne spożycie KOF wykazywało pewne różnice międzyosobnicze.

5. Podsumowanie

Wyniki niniejszego badania pokazują, że suplementacja KOF-3 nie wykazała żadnych istotnych zmian mocy mięśniowej i prędkości sztangi podczas WL z obciążeniem zewnętrznym 50% 1RM u mężczyzn nawykowo stosujących KOF w porównaniu do PLAC. Ponadto, zastosowanie KOF-3 nie przyczyniło się do wystąpienia efektu PAP w badanej grupie. Z racji faktu, że nie ma wystarczających danych naukowych na temat wpływu spożycia KOF i PAP, przyszłe badania powinny porównać tę zależność, jednakże przy użyciu innych dawek KOF, innego rodzaj ćwiczeń i różnych wartości obciążenia zewnętrznego.

6. Literatura

Argus CK, Gill ND, Keogh JWL, Hopkins WG. Assessing the variation in the load that produces maximal upper-body power. J Strength Cond Res. 2014;28:240–4.

Baker D. Acute effect of alternating heavy and light resistances on power output during upper-body complex power training. J Strength Cond Res. 2003;17:493–7.

Beaumont R, Cordery P, Funnell M, Mears S, James L, Watson P. 2017.Chronic ingestion of a low dose of cafeine induces tolerance to the performance benefits of Caffeine". J of Sports Sci 35 (1 9):1 920–27.

Bogdanis G.C. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. Front. Physiol. 2012;3:142. doi: 10.3389/fphys.2012.00142

Bühler E, Lachenmeier DW, Winkler G. Development of a tool to assess Caffeine intake among teenagers and young adults. Ernahrungs Umschau. 2014;58–63.

Burke LM. Caffeine and sports performance. Appl Physiol Nutr Metab. 2008;33:1319 34.

Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H. Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual Caffeine consumption. Am J Clin Nutr. 2007;86:240–4.

Del Coso J, Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero J. Challenging the myth of non-response to the ergogenic effects of Caffeine ingestion on exercise performance. Nutrients. 2019;11:732.

Diaz-Lara FJ, Del Coso J, García JM, Portillo LJ, Areces F, Abián-Vicén J. Caffeine improves muscular performance in elite Brazilian Jiu-jitsu athletes. Eur J Sport Sci. 2016;16:1079–86.

Dodd SL, Brooks E, Powers SK, Tulley R. The effects of Caffeine on graded exercise performance in Caffeine naive versus habituated subjects. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1991;62:424–9.

Farup J, Sørensen H. Postactivation potentiation: upper body force development changes after maximal force intervention: J Strength Cond Res. 2010;24:1874–9.

Frankowski, M.; Kowalski, A.; Ociepa, A.; Siepak, J.; Niedzielski, P. Caffeine levels in various Caffeine-rich and deCAFfeinated coffee grades and coffee extracts marketed in Poland. Bromat. Chem. Toksykol. 2008, 1,21–27.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of Caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacol Rev. 1999;51:83–133.

Gołaś A, Maszczyk A, Zajac A, Mikołajec K, Stastny P. Optimizing post activation potentiation for explosive activities in competitive sports. J Hum Kinet. 2016;52:95–106.

Gonçalves L de S, Painelli V de S, Yamaguchi G, Oliveira LF de, Saunders B, da Silva RP, et al. Dispelling the myth that habitual Caffeine consumption influences the performance response to acute Caffeine supplementation. J Appl Physiol. 2017;123:213–20.

Grgic J, Grgic I, Pickering C, Schoenfeld BJ, Bishop DJ, Pedisic Z. Wake up and smell the coffee: Caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. Br. J. Sports Med. 2019.

Grgic J, Mikulic P. Caffeine ingestion acutely enhances muscular strength and power but not muscular endurance in resistance-trained men. Eur J Sport Sci. 2017;17:1029–36.

Guerra Jr MA, Caldas LC, De Souza HL, Vitzel KF, Cholewa JM, Duncan MJ, et al. The acute effects of plyometric and sled towing stimuli with and without Caffeine ingestion on vertical jump performance in professional soccer players. J Int Soc Sports Nutr. 2018;15:51.

Hrysomallis C, Kidgell D. Effect of heavy dynamic resistive exercise on acute upper-body power. J Strength Cond Res. 2001;15:426–30.

Liossis LD, Forsyth J, Liossis C, Tsolakis C. The acute effect of upper-body complex training on power output of martial art athletes as measured by the bench press throw exercise. J Hum Kinet. 2013;39:167–75.

Marques MC, van den Tilaar R, Vescovi JD, Gonzalez-Badillo JJ. Relationship between throwing velocity, muscle power, and bar velocity during bench press in elite handball players. Int J Sports Physiol Perform. 2007;2:414–22.

Mora-Rodríguez R, García Pallarés J, López-Samanes Á, Ortega JF, Fernández-Elías VE. Caffeine ingestion reverses the circadian rhythm effects on neuromuscular performance in highly resistance-trained men. PLoS ONE. 2012;7:e33807.

Pallarés JG, Fernández-Elías VE, Ortega JF, Muñoz G, Muñoz-Guerra J, Mora-Rodríguez R. Neuromuscular responses to incremental Caffeine doses: performance and side effects. Med Sci Sports Exerc. 2013;45:2184–92.

Sabol F, Grgic J, Mikulic P. The effects of three different doses of Caffeine on jumping and throwing performance: a randomized, double-blind, crossover study. Int J Sports Physiol Perform. 2019;1–25.

Saeterbakken AH, van den Tillaar R, Fimland MS. J Sports Sci. 2011 Mar;29(5):533-8

Sale DG. Postactivation potentiation: role in human performance. Exerc Sport Sci Rev. 2002;30:138–43.

Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to Caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. J Neurosci. 1999;19:4011–22.

Tillin NA, Bishop D. Factors modulating post-activation potentiation and its effect on performance of subsequent explosive activities: Sports Medicine. 2009;39:147–6

Wilk M, Krzysztofik M, Drozd M, Zajac A. Changes of power output and velocity during successive sets of the bench press with different duration of eccentric movement. Int J Sports Physiol Perform. 2019; 1–19

Różnice w kształtowaniu siły mięśniowej górnej części ciała między kobietami, a mężczyznami

Gepfert Mariola [(1)], Rawska Magdalena [(2)], Krzysztofik Michał [(1)]

[1] Instytut Nauk o Sporcie, Akademia Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach
[2] Zespół Szkolno-Przedszkolny nr 1 w Żorach
Mariola Gepfert: m.gepfert@awf.katowice.pl

Streszczenie
Ćwiczenia oporowe należą do powszechnych metod treningowych wśród mężczyzn i kobiet w różnym wieku i o różnym poziomie sprawności fizycznej. Różnice w czynnikach somatycznych, hormonalnych oraz anatomicznych między płciami wskazują na odmienny rodzaj i metody treningu oporowego. Kobiety charakteryzują się wyższym poziomem włókien wolnokurczliwych oraz wyższą odpornością na zmęczenie mięśni w porównaniu do mężczyzn, szczególnie podczas ćwiczeń o niskiej lub umiarkowanej intensywności. Natomiast mężczyzn cechuje większa masa mięśni szkieletowych, większy przekrój poprzeczny mięśni, przewaga włókien szybkokurczliwych oraz wykorzystanie glikolitycznych szlaków metabolizmu. Mężczyźni ze względu na wyższy poziom hormonów anabolicznych posiadają większe zdolności rozwoju hipertrofii mięśniowej. Ponadto mężczyźni posiadają wyższy poziom siły mięśniowej bezwzględnej, jak i względnej. Prawidłowo zaplanowany program treningowy powinien, zatem uwzględnić zdolności charakterystyczne dla danej płci.

Słowa kluczowe: trening oporowy, różnice anatomiczne i biochemiczne, płeć

Differences in the development of muscular strength of the upper body between men and women

Summary
Resistance exercises are common training methods among men and women of different ages and with different levels of physical skills. Differences in somatic, hormonal and anatomical factors between the gender indicate a different type and methods of resistance training. Women are characterized by a higher level of type I fibers and higher resistance to muscle fatigue compared to men, especially during exercises of low or moderate intensity. In contrast, men are characterized by higher skeletal muscle mass, larger muscle cross-sectional area, predominance of type II fibers and the use of glycolytic metabolism pathways. Men, due to higher levels of anabolic hormones, have greater abilities to develop muscle hypertrophy. In addition, men have a higher level of absolute and relative muscle strength. A properly planned training program should therefore take into account gender specific abilities.

Keywords: resistance training, anatomical and biochemical differences, gender

1. Różnice anatomiczne i biochemiczne

Różnice anatomiczne między płciami przejawiają się przede wszystkim w budowie ciała, jego proporcjach, a także w składzie masy ciała. Budowa ciała kobiet charakteryzuje m.in. szersze biodra w stosunku do talii i ramion, niżej położony środek ciężkości ciała oraz krótsze dźwignie. Natomiast mężczyzn charakteryzują szersze ramion, dłuższe dźwignie oraz wyżej położony środek ciężkości ciała. Janessen i in. (2000) badali wpływ wieku, płci, składu masy ciała oraz wysokości ciała na masę i rozkład mięśni szkieletowych między mężczyznami i kobietami w wieku 18-88 lat. Autorzy wskazali, że mężczyźni mieli znacznie

wyższy poziom masy mięśni szkieletowych, w przeciwieństwie do kobiet zarówno w wartościach bezwzględnych (33.0 vs. 21.0 kg), jak i w stosunku do masy ciała (38.4 vs. 30.6%). Co więcej, w niniejszym badaniu różnice między płciami były wyższe w górnej części ciała (40%), podczas gdy różnice w dolnej części ciała wynosiły zaledwie 33%. Ponad to, płeć ma duży wpływ na morfologię i funkcję mięśni szkieletowych, wykorzystanie substratów energetycznych i aktywację nerwowo-mięśniową (Hicks i in., 2001). Dotychczasowe badania sugerują, że skład typu włókien mięśni szkieletowych zależy od płci. Mężczyźni charakteryzują się wyższym poziomem beztłuszczowej masy ciała, a wszystkie włókna mięśniowe mają znacznie większy przekrój poprzeczny, w porównaniu z kobietami (Miller i in., 1993), przez co mają zdolność do generowania wyższej wartości siły mięśniowej. Mniejsza siła mięśniowa kobiet wynika z mniejszej objętości włókien mięśniowych (Miller, 1993) oraz przewagi włókien o charakterze tlenowym- typu I (włókna wolnokurczliwe) (Staron i in., 2000; Welle i in., 2008). Ponadto kobiety wykazują mniejsze różnice w proporcjach między włóknami typu I i II (beztlenowe, szybkokurczliwe), co może wpływać na wydłużenie pracy przez zwiększenie zdolności do wytrzymałości (Salvador, 2005). Badania Dreyer i in. (2010) dowodzą, że mężczyźni charakteryzują się wyższą wartością siły mięśniowej przez większy przekrój poprzeczny mięśnia, wyższy poziom hormonów anabolicznych, a różnica między płciami w masie mięśniowej zależy od niższego poziomu testosteronu wśród kobiet. Układ endokrynny jest szczególnie wrażliwy na ćwiczenia oporowe, a zmiany stężenia hormonów anabolicznych i katabolicznych są związane z procesem odbudowy uszkodzonych komórek mięśniowych po wysiłku fizycznym, a tym samym mają wpływ na wielkość i tempo adaptacji w następstwie wysiłku oporowego (Kraemer i Ratamess, 2005). Hormony, szczególnie testosteron, mają znaczący wpływ na szybkość syntezy białek oraz rodzaj substratów metabolizowanych podczas ćwiczeń i bezpośrednio po nich. Badania wykazały, że blokowanie działania hormonów anabolicznych zmniejsza tempo zmian adaptacyjnych i skuteczność programów treningu siły mięśniowej, dlatego testosteron odgrywa znaczącą rolę w pośredniczeniu i rozwoju hipertrofii siły mięśniowej (Kadi, 2008). Kobiety dysponują niższym poziomem androgenów we krwi i wyższym stężeniem estrogenu, co pośrednio ma wpływ na niższy względny przyrost mięśni w odpowiedzi na ćwiczenia oporowe, w porównaniu z mężczyznami. Dodatkowo według badań Kadi i in. (2000), mięśnie górnej części ciała mogą mieć więcej receptorów androgenowych, niż mięśnie dolnej części ciała. Wpływ różnic hormonalnych w rozkładzie masy mięśniowej między mężczyznami i kobietami zależy od większej ilości receptorów androgenowych w mięśniach górnej części ciała, a takie interakcje mogą mieć wpływ na

przyrost siły mięśniowej w odpowiedzi na ćwiczenia oporowe (Gentil i in., 2016). Zatem jest możliwe, że omawiana różnica hormonalna może pozwolić na większy rozwój mięśni kończyn górnych u mężczyzn w porównaniu z kobietami (Gentil i in., 2016), a wpływ testosteronu na przyrosty siły mięśniowej może być większy, niż jego wpływ na przyrost masy mięśniowej. Co więcej, badania (Hunter i in., 2006) sugerują, że kobiety mają wyższą odporność na zmęczenie mięśni szkieletowych niż mężczyźni, szczególnie podczas ćwiczeń o niskiej lub umiarkowanej intensywności. Autorzy wskazali, że kobiety są bardziej odporne na zmęczenie podczas skurczów izometrycznych oraz podczas ćwiczeń z seriami wykonywanymi do niewydolności mięśniowej (Fulco i in., 1999; Miller i in., 1993; Maughan i in., 1986; Wilk i in., 2019).

Badania sugerują, że istnieją różnice między kobietami, a mężczyznami w aktywacji nerwowo-mięśniowej oraz w reakcjach fizjologicznych, w tym w wykorzystaniu substratów energetycznych podczas wysiłku fizycznego (Hicks i in., 2001). Russ i in. (2005) wykazali różnice między płciami w resyntezie ATP podczas aktywności fizycznej. Dowiedziono, że wysiłek fizyczny realizowany przez mężczyzn opiera się na szlakach glikolitycznych, podczas gdy kobiety mają wyższy poziom wykorzystania procesów oksydacyjnych do metabolizmu energetycznego (Russ i in., 2005). Dane dotyczące biopsji mięśni z zawartością glikogenu mięśniowego wykazały niższe aktywności enzymów glikolitycznych (kinaza pirogronianowa, fosfofruktokinaza i dehydrogenaza mleczanowa) u kobiet, co zmniejszyło ich potencjał do glikolizy beztlenowej (Tarnopolsky, 2000). W następnych badaniach wykazano, że kobiety mają większą zdolność oksydacyjną i polegają bardziej na fosforylacji oksydacyjnej (tłuszcz i węglowodany) produkcji ATP (Russ i in., 2005; Tarnopolsky i in., 1990), zmniejszając w ten sposób poleganie na szlakach glikolitycznych, które pozwalają im na wykorzystanie dostępnego tlenu w bardziej wydajny sposób (Fulco i in., 1999), w przeciwieństwie do mężczyzn. Osłabione poziomy glikogenu w szlaku glikolitycznym mogą powodować niższe stężenie mleczanu u kobiet, w porównaniu do mężczyzn. Co więcej kobiety mogą osłabiać poziomy katecholamin w osoczu podczas aktywności o wysokiej intensywności, a estrogen wpływa na wykorzystanie w większym stopniu lipidów oraz w mniejszym węglowodanów i białek, jako źródła energii podczas długotrwałych ćwiczeń, w porównaniu z mężczyznami (Tarnopolsky, 2008). To odkrycie doprowadziło do przekonania, że estrogen ma właściwości oszczędzające glikogen (Tarnopolsky, 2008). Natomiast mężczyźni wykazują większą aktywność kilku enzymów glikolitycznych, niż kobiety (Simoneau i in., 1989) oraz wykorzystują glikolityczne szlaki metabolizmu. Różnice między płciami w zdolnościach metabolicznych wykazały, że większe zapotrzebowanie metaboliczne i zmniejszona

dostępność tlenu zwiększy zależność od beztlenowych szlaków metabolicznych u mężczyzn i produktów ubocznych tych szlaków (H, Pi, H_2PO_4), które zostały skorelowane ze zmęczeniem (Caiozzo i Haddad, 1996). Poniżej (tab. 1.) wykonano zestawienie najważniejszych cech charakterystycznych dla danej płci w planowaniu treningu oporowego.

Tab. 1. Różnice anatomiczne i biochemiczne między kobietami, a mężczyznami w kształtowaniu siły mięśniowej

	Kobiety	Mężczyźni
Mięśnie szkieletowe	• Wyższy odsetek włókien tlenowych-typu I • Mniejsze różnice w proporcjach między włóknami typu I i II • Wyższa odporność na zmęczenie mięśni podczas ćwiczeń o niskim lub umiarkowanym natężeniu wysiłku • Wyższa odporność na zmęczenie podczas skurczów izometrycznych oraz podczas ćwiczeń z seriami wykonywanymi do niewydolności mięśniowej • Niska wartość siły skurczu mięśniowego • Wyższa odporność na wysiłkowe zmęczenie	• Większa masa mięśni szkieletowych szczególnie w górnej części ciała • Większy przekrój poprzeczny mięśni • Wyższym poziomem beztłuszczowej masy ciała • Wyższą wartość siły mięśniowej przez większe wymiary ciała • Przewagę ilości włókien typu II, które przez dużą liczbę miofibryli oraz większą siłą skurczu mięśniowego podatne są hipertrofii, generują istotnie wyższe wartości mocy, lecz ich odporność na zmęczenie jest mniejsza
Hormony	• Niższy poziom androgenów we krwi, który powoduje powodują mniejszy względny przerost mięśni w odpowiedzi na ćwiczenia oporowe • Wyższe stężenie estrogenu	• Wyższy poziom hormonów anabolicznych • 10 razy więcej krążącego testosteronu, który ma znaczący wpływ na szybkość syntezy białek
Źródła energetyczne	• Zdolność oksydacyjna polegająca na fosforylacji oksydacyjnej (tłuszcz i węglowodany) produkcji ATP • Niższe aktywności enzymów glikolitycznych tj. kinaza pirogronianowa, fosfofruktokinaza i dehydrogenazy mleczanowej • Wykorzystanie w znacznej części lipidów oraz mniej węglowodanów i białek, jako źródła energii	• Wykorzystanie glikolitycznych szlaków metabolizmu • Zmniejszona dostępność tlenu zwiększa zależność od beztlenowych szlaków metabolicznych i produktów ubocznych tych szlaków (H, Pi, H_2PO_4)

2. Kształtowanie siły mięśniowej górnej części ciała

Różnice anatomiczne i somatyczne oraz mechanizmy fizjologiczne wpływają na kształtowanie siły mięśniowej wśród kobiet i mężczyzn. Badania w kierunku zrozumienia różnic między płciami w zakresie treningu oporowego mogą kreować bardziej dostosowane i skuteczne strategie adaptacji układu nerwowo-mięśniowego. Dotychczasowe doniesienia naukowe potwierdzają istnienie znaczących różnic we względnej i bezwzględnej sile mięśniowej między kobietami i mężczyznami. Thomas i in. (2004) porównywali siłę maksymalną (test 1RM) górnej części ciała kobiet i mężczyzn w odniesieniu do masy ciała. Test 1RM w wyciskaniu sztangi leżąc wykazał, że mężczyźni uzyskali 109% do 140% masy

ciała, gdy wśród kobiet odnotowano wyniki na poziomie 56% do 71% (Thomas i in., 2004). Salvador i in. (2005) zidentyfikowali różnice w poziomie siły mięśniowej między płciami zarówno w wartościach bezwzględnych, jak i względnych w ćwiczeniach górnej części ciała, tułowia i dolnej części ciała. Mężczyźni prezentowali wyższe wartości w porównaniu z kobietami w testach 1RM, jednak, kiedy porównano wyniki w oparciu o masę ciała, różnice uległy zmniejszeniu, mimo to zachowały istotność statystyczną. Wartości istotne statystycznie siły względnej u kobiet w wyciskaniu sztangi leżąc wynosiły ~58% wartości osiągniętych przez mężczyzn. Wyniki te sugerują, że różnice między płciami mogą wpływać na tempo rozwoju siły mięśniowej (Bishop i in., 1987). Badania Lovell i in. (2011) potwierdzają te zależność wśród osób aktywnych fizycznie. Ponownie mężczyźni osiągnęli wyższe wyniki (81±19 vs. 37±8), w przeciwieństwie do kobiet (Lovell i in., 2011). Monteiero i in. (2016) przeanalizowali różnice względnej siły mięśniowej w grupie osób trenujących rekreacyjnie. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami siła względna mężczyzn była wyższa zarówno w wyciskaniu sztangi leżąc (157.1%), jak i w przysiadzie (67.1%). Dodatkowo Amasay i in. (2016) analizowali wartości bezwzględne w wyciskaniu sztangi leżąc dowodząc, że mężczyźni uzyskali 77.7 kg więcej od kobiet (114.8±18.9 kg vs. 37.1±7.8 kg), a siła bezwzględna kobiet wynosiła zaledwie 32% siły mięśniowej mężczyzn. Jednak w odniesieniu do masy ciała (którą obliczono jako masę beztłuszczową) mężczyźni podnosili 2.4 razy więcej masy, niż kobiety (141±20.7 % vs. 59.5±8.7 %) (Amasay i in., 2016). Co więcej, badania Gołaś i in. (2018) wykazały, że różnice fizjologiczne między płciami wpływają na wzorzec aktywności mięśniowej (tab. 2.). Podczas wyciskania sztangi leżąc na płaskiej ławce, wzrost obciążenia zewnętrznego z wartości 55% do 100%RM w grupie kobiet zwiększa aktywność mięśnia naramiennego o 67,8%, a mięśnia piersiowego większego o 46,2%. Natomiast u mężczyzn wzrost obciążenia zewnętrznego wpływa na wzrost aktywności mięśnia naramiennego o 74,6%, a piersiowego większego o 27,1%. Największą uwagę należy zwrócić na zmianę aktywności głowy długiej mięśnia trójgłowego ramienia, który u mężczyzn wzrasta o 73,7%, zaś u kobiet niemalże o 36,4%. Co więcej, różnice somatyczne oraz fizjologiczne między kobietami, a mężczyznami mogą istotnie wpływać na wartości czasu napięcia mięśniowego (TUT) oraz ilości powtórzeń (REP). Badania Wilk i in. (2018) (tab. 2.) przeprowadzone w grupie mężczyzn (70%RM, tempo 2/0/2/0), wykazały że całkowity czas napięcia mięśniowego (TTUT) uzyskany podczas 5 serii wyciskania sztangi leżąc wynosi 124.65±33s. Natomiast w grupie kobiet całkowite wyczerpanie mięśniowe po wykonaniu 5 serii wyciskania sztangi leżąc wystąpiło później zarówno stosując szeroki uchwyt sztangi (WGBP) 218.35±24s, jak i wąski uchwyt sztangi (CGBP) 197.19±28s

(Gepfert i in., 2019). Objętość wysiłku liczona przez liczbę wykonanych powtórzeń (REP) również była wyższa w grupie kobiet i wynosiła odpowiednio 54±6 i 49±5 dla WGBP oraz CGBP (tab. 2.), natomiast w grupie mężczyzn wynosiła zaledwie 28±7 REP (Wilk i in., 2018).

Tab. 2. Porównanie wybranych wartości między kobietami, a mężczyznami w wyciskaniu sztangi leżąc

	Kobiety	Mężczyźni
Siła mięśniowa	• Siła górnej części ciała u kobiet jest o 50% do 60% mniejsza niż siła górnej części ciała u mężczyzn • Różnica procentowa w kończynach górnych kobiet w porównaniu do mężczyzn wynosi od 44% do 79%	• W odniesieniu do beztłuszczowej masy ciała masę mężczyźni podnosili 2.4 razy więcej masy, niż kobiety • Wyższa wartość 1RM (siła bezwzględna) • Wyższy poziom siły względnej
REP (Repetition)	• TREP w tempie 2/0/2/0 i 70%RM w WGBP 54±6 i CGBP 49±5 • TREP w CGBP w tempie 70%RM w tempie 2/0/X/0: 41.5 ± 12.9 i WGBP: 46.5 ± 15.9 • TREP w tempie 6/0/X/0 CGBP 70%RM: 34.3 ± 8.9 i WGBP 38.8 ± 11.2	• REP w tempie 2/0/2/0 i 70%RM wynosił 28±7 • TREP w tempie 5/0/3/0 i 70%RM: 18.75 ± 4.14 • TREP w tempie 6/0/4/0 i 70%RM: 15.71 ± 4.03
TUT (Time Under Tension) TTUT (Total Time Under Tension)	• TTUT w tempie 2/0/2/0 i 70%RM WGBP: 218.35±24s i CGBP: (197,19±28s) • TTUT w tempie 2/0/X/0 w CGBP 169.1 ± 43.3 w WGBP 182.1 ± 39.6 • TTUT w tempie 6/0/X/0 CGBP 230.3 ± 63.9 i WGBP 182.1 ± 39.6	• TTUT w tempie 2/0/2/0 i 70%RM: 124.65±33s (Wilk et al., 2018) • TTUT w tempie 5/0/3/0 i 70%RM: 166.6 ± 29.27 • TTUT w tempie 6/0/4/0 i 70%RM: 178.89 ± 33.69
Aktywność mięśniowa (EMG)	• Wzrost obciążenia zewnętrznego z wartości 55% do 100%RM w grupie kobiet zwiększa aktywność mięśnia naramiennego o 67,8%, a mięśnia piersiowego większego o 46,2% oraz głowy długiej mięśnia trójgłowego ramienia wzrasta o 36,4%.	• Wzrost obciążenia zewnętrznego wpływa na wzrost aktywności mięśnia naramiennego o 74,6%, a piersiowego większego o 27,1% oraz głowy długiej mięśnia trójgłowego ramienia wzrasta o 73,7%

3. Wnioski

Badania dowodzą, że istniejące różnice anatomiczne i biochemiczne między kobietami i mężczyznami odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu siły mięśniowej. Poziom reakcji adaptacyjnych na trening oporowy u obu płci jest inny przez różnice w budowie mięśni, składzie ciała, rodzaju włókien mięśniowych, hormonów oraz wykorzystania źródeł energetycznych. Dlatego prawidłowo zaplanowany program treningu oporowego powinien uwzględniać płeć.

4. Literatura

Amasay T., Mier C.M., Foley K.K., Carswell T.L., 2016. Gender differences in performance of equivalently loaded push-up and bench press exercises. J Sport, 5(1)4..

Bishop P., Cureton K., Collins M.,1987. Sex difference in muscular strength in equally-trained men and women. Ergonomics 30,4: 675-87.

Caiozzo V.J., Baker M.J., Huang K. i in., 2003. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 285: R570-80.

Dreyer H.C., Fujita S., Glynn E.L., Drummond M.J. i in., 2010. Resistance exercise increases leg muscle protein synthesis and mTOR signalling independent of sex. Acta Physiologica, 199: 71-81.

Fulco C.S., Rock P.B., Muza S.R., Lammi E. i in., 1999. Slower fatigue and faster recovery of the adductor pollicis muscle in women matched for strength with men. Acta Physiol Scand, 167: 233-9.

Gentil P., Steele J., Pereira M.C., Castanheira R.P. i in., 2016. Comparison of upper body strength gains between men and women after 10 weeks of resistance training. PeerJ, 4: e1627.

Gepfert M., Krzysztofik M., Filip A., Mostowik A. i in., 2019. Effect of grip width on exercise volume in bench press with a controlled movement tempo in women. Baltic Journal of Health and Physical Activity, 11(3): 10-7.

Golas A., Maszczyk A., Stastny P. i in., 2018. A new approach to EMG analysis of closed-circuit movements such as the flat bench press. Sports, 6.

Haizlip K.M. Harrison B.C., Leinwand L.A., 2015. Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. Physiology (Bethesda), 30(1): 30-9.

Hicks A.L., Kent-Braun J., Ditor D.S., 2001. Sex differences in human skeletal muscle fatigue. Exercise and Sport Sciences Reviews, 29(3): 109-12.

Hunter G.R., Seelhorst D., Snyder S., 2003. Comparison of metabolic and heart rate responses to super slow vs. traditional resistance training. J Strength Cond Res, 17(1): 76-81.

Janessen I., Heymsfield S.B., Wang Z.M., Ross R., 2000. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. J Appl Physiol, 89(1): 81-8.

Kadi F., Bonnerud P., Eriksson A., Thornell L., 2000. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. Histochem Cell Biol, 113: 25-9.

Kawamori N., Haff G., 2004. The optimal training load for development of muscular power. J Strength Cond Res, 18(3): 675–84.

Kraemer W.J., Ratamess N.A., 2005. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med, 35(4): 339-61.

Maughan R.J., Harmon M., Leiper J.B., Sale D., Delman A., 1986. Endurance capacity of untrained males and females in isometric and dynamic muscular contractions. Eur J Appl Physiol, 55: 395-400.

Miller A.E.J., MacDougall J.D., Tarnopolsky M.A., Sale D.G., 1993. Gender differences in strength and muscle fiber characteristics. Eur J Appl Physiol, 66(3): 254-62.

Russ D.W., Lanza I.R., Rothman D., Kent-Braun J.A., 2005. Sex differences in glycolysis during brief, intense isometric contractions. Muscle Nerve, 32: 647-55.

Salvador E.P., Cyrino E.S., Gurjão A.L.D., Dias R.M.R. i in., 2005. Nakamura FY, Oliveira AR. A comparison of motor performance between men and women in multiple sets of weight exercises. Rev Bras Med Esporte, 11(5): 242-5.

Simoneau J.A., Bouchard C., 1989. Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. Am J Physiol, 257: E567–2.

Staron R.S., Hagerman F.C., Hikida R.S., Murray T.F. i in., 2000. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. J Histochem Cytochem,48(5): 623-9.

Tarnopolsky M.A., 2008. Sex differences in exercise metabolism and the role of 17-beta estradiol. Med Sci Sports Exerc, 40: 648-54.

Thomas G.A., Kraemer W.J., Spiering B.A., Volek J.S. i in., 2007. Maximal power at different percentages of one repetition maximum: Influence of resistance and gender. J Strength Cond Res, 21(2): 336-42.

Torrejón A., Balsalobre-Fernández C., Haff G.G., García-Ramos A., 2018. The load-velocity profile differs more between men and women than between individuals with different strength levels. Sports Biomechan, 18(3): 245-55.

Wilk M., Golas A., Stastny P., Nawrocka M. i in., 2018. Does tempo of resistance exercise impact training volume? J Hum Kinet, 62: 241-50.

Wilk M., Stastny P., Golas A., Nawrocka M. i in., 2018. Physiological responses to different neuromuscular movement task during eccentric bench press. Neuro Endocrinol Lett 39(1): 101-7.

Wilk M., Gepfert M., Krzysztofik M., Golas A., i in. 2019. The Influence of Grip Width on Training Volume During the Bench Press with Different Movement Tempos. J Hum Kinet, 68 (1), 131-40.

Welle S., Tawil R., Thornton C.A., 2008. Sex-related differences in gene expression in human skeletal muscle. PLoS One, 3(1): e1385.

Challenges in sample preparation for HPLC determination of diclofenac in microalgae cells

Harshkova Darya [(1)], Aksmann Anna [(1)], Wielgomas Bartosz [(2)]

[1] Department of Plant Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Gdansk, ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk.
[2] Department of Toxicology, Medical University of Gdańsk, al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk.
Darya Harshkova: darya.harshkova@phdstud.ug.edu.pl

Summary
Diclofenac (non-steroidal anti-inflammatory drug), has potential to accumulate in non-target organisms, like plants and algae. The main problem with analysis of diclofenac content in plant/algae matrices is the presence of a set of photosynthetic pigments: chlorophylls and carotenoids, that need to be removed from cells extract. The aim of our study is to find the best way of sample purification for the determination of diclofenac concentration in plant material, using green alga *Chlamydomonas reinhardtii* cells as a matrix. Our results showed, that QuEChERS using PSA, GCB, Florisil® and Chlorofiltr® as sorbents results in significant loss of diclofenac or in insufficient sample purification. In opposite, LLE was satisfactory as regards DF recovery, but did not remove the cell-derived impurities efficiently. Thus, further attempts will be made to find method for purification of algae matrix fortified with DF, to obtain both good analyte recovery and HPLC-acceptable extract purity.

Keywords: plant sample purification, Quechers, liquid–liquid extraction, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Wyzwania w przygotowaniu próbek do oznaczania diklofenaku w komórkach mikroglonów za pomocą HPLC

Streszczenie
Diklofenak (niesteroidowy lek przeciwzapalny) z łatwością akumuluje się w organizmach „niedocelowych", takich jak rośliny i glony. Głównym problemem związanym z analizą zawartości diklofenaku w matrycach roślinnych/glonowych jest obecność barwników fotosyntetycznych: chlorofili i karotenoidów, które należy usunąć z ekstraktów komórkowych. Celem naszych badań jest znalezienie najlepszego sposobu oczyszczania próbek do oznaczania stężenia diklofenaku w materiale roślinnym. Jako matryca służą nam komórki zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. Nasze wyniki wskazują, że zastosowanie metody QuEChERS z PSA, GCB, Florisilem® i Chlorofiltrem® w roli sorbentów powoduje znaczną utratę diklofenaku lub niewystarczające oczyszczenie próbki. Przeciwnie, metoda ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) daje zadowalające efekty pod względem wielkości odzysku diklofenaku, ale nie jest wystarczająco skuteczna w usuwaniu zanieczyszczeń pochodzących z komórek. Dlatego też podejmowane będą dalsze próby znalezienia metody oczyszczania matrycy glonowej fortyfikowanej diklofenakiem, gwarantującej zarówno dobry odzysk analitu, jak i czystość ekstraktu akceptowalną w analizach HPLC.

Słowa kluczowe: oczyszczanie prób roślinnych, Quechers, ekstrakcja ciecz-ciecz, *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. Introduction

Pharmaceuticals and personal care products became important class of environmental contaminants. Sources of these substances are e.g. landfills, municipal sewage, wastewater from hospitals and veterinary clinics (Brain at al., 2008). The example of pharmaceutical contaminant is non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac (DF), commonly found in seas and freshwater reservoirs (Lonappan et al., 2016). The detection of DF in some sources of drinking water (Gros et al.,, 2010) caused that in 2013 diclofenac was added by the

European Commission to the list of substances subjected to monitoring (EU Water Framework Directive 2008/105/EC, Lonappan et al., 2016). This contaminant is also on the list of priority environmental threats (Naidoo and Swan, 2009) because of its ability to accumulate in non-target organisms inhabiting the water environment. So far, it has been shown that DF cause abnormality in functioning of animals, plants and algae exposed to this drug (Feito et al., 2012; Majewska et al., 2018; Harshkova et al., 2019). It is also known, that DF can be taken up and accumulated by aquatic and terrestrial plants, with bioaccumulation factors (BAFs) ranging from about 0.2 to about 70 in the shoots and roots, respectively (Zhang et al., 2012; Dodgen et al., 2015).

Unquestionably, for reliable estimation of bioaccumulation potential and environmental hazard of DF, information about its real concentrations in tissues/cells of aquatic biota is necessary. Regarding DF accumulation in different trophic levels, algae, as the basis of food chains, should be investigated in the first place, but most of papers are focused on invertebrates and fish (Puckowski et al., 2016). One of the reasons could be existence of unresolved analytical challenges associated with the complexity of algae-based matrices, which require laborious, multi-steps extraction and purification procedures before one of sensitive and selective detection techniques is applied. The main problem in the analysis of DF concentration in algae (and plant) samples is the presence of a set of photosynthetic pigments: chlorophylls and carotenoids, that need to be removed from cells extract. Usually, the isolation of pharmaceuticals from biological matrices are performed using solvent extraction, microwave-assisted extraction, ultrasonic solvent extraction, liquid-liquid extraction followed by a clean-up step with solid-phase extraction or QuEChERS-procedure (Bruzzoniti et al., 2014; Kumirska at al., 2015). Some sorbents are dedicated to plant samples, e.g. Florisil® is commonly used as a polar adsorbent for pigments removal (Sakurai at al., 2015) and Chlorofiltr® is used in modified QuEChERS methods (Łozowicka at al., 2017).

Unfortunately, physicochemical properties of DF and other pharmaceuticals cause their co-extraction with chlorophylls and carotenoids and most of sample cleanup methods led to the loss of the analyte (Wu et al., 2012). Further, there is a threat of DF adsorption on the surface of plastic containers during sample preparation (Palmgre´n et al., 2006). Thus, the aim of our current works is to find the best way of sample cleanup for the determination of DF concentrations in plant material, using green alga *Chlamydomonas reinhardtii* cells as a matrix.

2. Materials and methods

- Algal cultures

Chlamydomonas reinhardtii cc-1690 (wild type; http://www.chlamy.org/) was cultured under conditions: liquid mineral medium (HSM; Harris 2009), continuous white fluorescence light (≈125 μmol photons/m^2 s^1), 30°C, aeration with sterilized air enriched with 2.5% CO_2. Before the experiment, algae cells were harvested by centrifugation in such a way that equal biomass was obtained in each sample, the samples were then frozen and stored at -24°C.

- Chemicals

Diclofenac sodium salt (DF; 2-[(2,6-dichlorophenyl) amino]benzeneacetic acid sodium salt; 98% purity, ABRC) was disolved in acetonitrile (ACN; HPLC-grade, VWR) to obtain a stock solution of the final concentration of 1 mg/mL. All chromatographic solvents were of HPLC grade (VWR) and all other chemicals were of analytical grade (above 95% purity) purchased in Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

- Sample preparation.

To investigate diclofenac stability in different potential working solutions, DF solutions of concentration 1 mg/mL were prepared in 100% ACN or in 0.1% formic acid (FA) in H_2O (v/v). Samples were analyzed using HPLC immediately after preparation and after 24 h storage at -24°C.

To compare different methods of sample preparation for HPLC, frozen cells pellet was thawed, mixed with ACN in the ratio of 3:10 (v/v) and disrupted by ultrasounds homogenization. The homogenate was then fortified with DF stock solution in 100% ACN to obtain required concentrations of the analyte. The fortified homogenate was aliquoted (1 mL volume each sample) and processed as described below.

(1) *Water removal.* The samples were subjected to salting out by shaking 1 mL of homogenate with 200 mg $MgSO_4$ and 50 mg NaCl for 5 min. Then, sample was spun down (2500 g for 5 min.) The pellet was discarded, and the supernatant was frozen at -24°C overnight. It was checked that salting and freezing steps did not cause loss of DF (results not shown).

(2) *QuEChERS-based purification.* Frozen samples were thawed at room temperature and cleaned up using QuEChERS methodology (Bruzzoniti et al. 2014), which is one of the most popular methods for cleanup plant samples (Łozowicka et al. 2017). In this step, four different sorbents were tested: PSA (primary secondary amine, Scharlab), GCB (graphitized carbon black, Agilent Technologies), Florisil® (Merck) and ChloroFiltr® (United Chemical).

For sample purification, 1 mL of sample was shaken for 5 min. with following adsorbents:

(a) PSA: 10, 20 or 50 mg,

(b) GCB: 10, 30 or 50 mg,

(c) Florisil®: 50 or 100 mg,

(d) Chlorofiltr®: 50 or 100 mg.

Then, samples were centrifuged (2500 g, 5 min) and the supernatant was taken for HPLC analysis.

(3) *LLE-based purification.* For liquid-liquid extraction (LLE) method, 100 μL of the supernatant obtained in (1) was diluted to the final volume of 1 mL with 0.1 M NaOH and then 2 mL of $CHCl_3$ was added. After shaking, emulsion was spun down (2500 g, 5 min) and left for a few minutes to complete phases separation. The upper phase was taken for HPLC analysis.

(4) *HPLC analysis*. HPLC analysis was performed in the conditions: column C18-PFP, 4.6 × 75 mm, 3 μm (Advanced Chromatography Technologies); mobile phase: A: 0.1% formic acid/H_2O; B: 0.1% formic acid/ acetonitrile; isocratic conditions: A (%) 30 B (%) 70; flow rate: 1 mL/min; injection volume: 10 μL; detection wavelength: 275 nm.

(5) *Statistical analysis.* Statistical analysis was performed using MS Excel (Microsoft), Origin program (Origin Lab Corporation, USA) and Statistica programs. Significant differences between control and treatment groups (data from at least three independent experiments) was defined using Mann-Whitney test.

3. Results and discussion

Because of increasing contamination of the water environment with pharmaceuticals, an estimation of their concentration in cells of algae and aquatic plants is necessary. Although many procedures of drugs extraction from biological matrices have been described (Roškar and Kmetec, 2003; Huerta et al., 2012), few of them are suitable for plant/algae samples, that are a difficult material to obtain clean samples for HPLC, GC or mass spectrometry analyses.

The first step of our work was to estimate diclofenac stability in 100% ACN as well as in aqueous solution of formic acid (FA; 0.1% v/v). It was found, that diclofenac in pure ACN was very stable, in contrast to acidic aqueous solution (Fig. 1). Probably due to the strong adsorption, DF concentration decreased to 55% of initial value. Moreover, after one day of storage, recovery of the analyte from 0.1% FA was three times lower than in freshly prepared acidic aqueous solution. Thus, all stocks and working solutions were made and stored in 100% ACN.

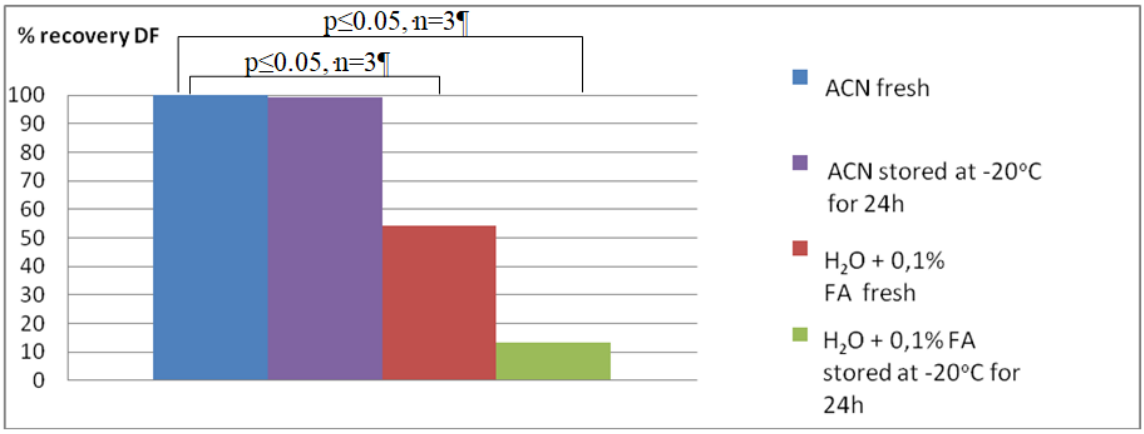


Fig. 1. The stability of DF in two different solvents, freshly prepared and stored at -20^{O}C for 24 h. ACN – acetonitrile, FA – formic acid; statistically significant differences between experimental variants were estimated using Mann-Whitney test.

To analyse pharmaceuticals content in plant or algal matrices by HPLC, sample purification is necessary to remove cell-derived interfering substances, that can mask target analytes and/or can cause damage to the chromatographic column. Photosynthetic pigments are especially difficult to remove, because of their high concentration in the cells and their physical and chemical properties similar to those of analysed pharmaceuticals. Despite the fact, that there are different methods of samples purification before chromatographic or mass spectrometry analyses (Huerta at al., 2012), none of them is universal for purification of plant/algae matrices (Vannini at al., 2011) and many of them cause significant loss of analytes (Wu et al., 2012). From different methods of samples purification, liquid-liquid extraction (LLE) and modified QuEChERS methods were chosen in this work to cleanup DF-fortified algae matrix (Fig. 2). As a control, sample subjected to water removal step only (without further purification), diluted further with ACN in the ratio of 1:1 (v/v), was used.

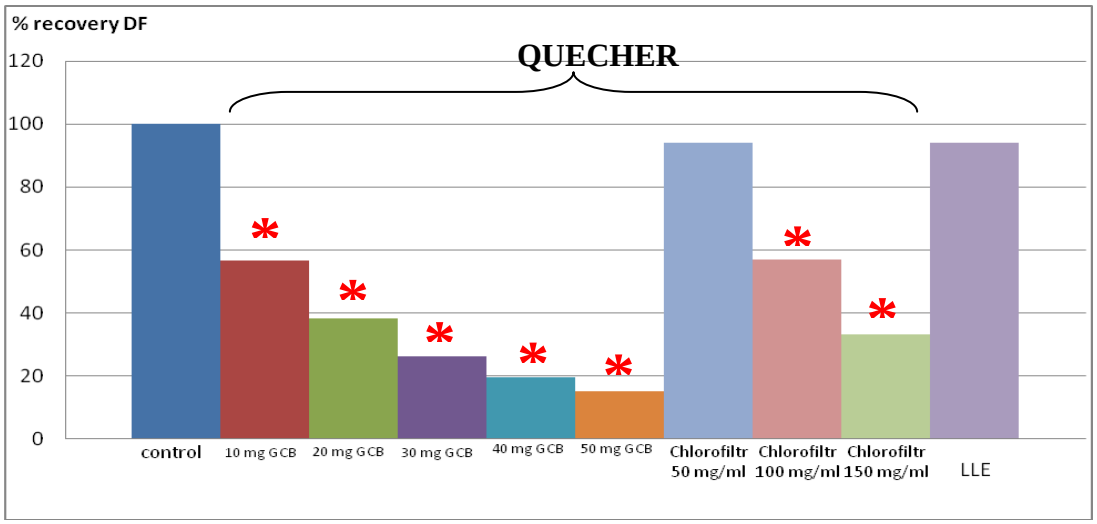


Fig. 2. Comparison of different methods of sample purification. Control - sample subjected to water removal step only; GCB – graphitized carbon black; LLE - liquid-liquid extraction; *- statistically significant differences as compared to control, p≤0.05; n=6, Mann-Whitney test.

We have found, that increased GCB content in the QuEChERS system resulted in higher sample purity (data not shown) but also in a corresponding decrease in the analyte recovery (Fig. 2). Unfortunately, even 10 mg of GCB per 1 mL of sample caused almost 50% of DF loss. Our results are consistent with work by Aznar et al. (2017) who developed a multi-residue method for the simultaneous determination of pharmaceutical compounds, hormones, personal care products, biocides, and flame retardants in aquatic plants. The authors reported that for four aquatic and semiaquatic plants (*Typha angustifolia*, *Arundo donax*, *Lemna minor*, *Oryza sativa*) used as plant matrices, GCB was the best in removing chlorophylls completely, but it showed the lowest recoveries. In opposite, this method of sample cleanup was successfully applied during pesticides and their derivatives analysis in plant samples by Łozowicka et al. (2017). Some works (Rejczak and Tuzimski 2015; Łozowicka et al., 2017) recommend sorbents dedicated to plant material, such as Florisil® and Chlorofiltr®, to purify plant and environmental samples for further analysis. However, in our experiments they did not give satisfactory results. On the one hand, 50 mg Chlorofiltr® per 1 mL of sample gave high DF recovery (Fig. 2), but on the other hand the resulting extract was not pure enough to be suitable for routine HPLC analysis (data not shown), which is consistent with work by Aznar et al. (2017), who stated that in plant matrices recoveries of different analytes using Chlorofiltr® were quite high, but the extracts remained slightly green, meaning that chlorophylls were not completely eliminated. In our work, higher amount of Chlorofiltr® (100-150 mg per 1 mL of the sample) gave cleaner extracts but significant DF loss was observed (Fig. 2).

Very weak cleanup efficiency was noted for Florisil®, since extracts were not suitable for routine HPLC analysis due to impurities (Fig 3a). Such results are opposite to the work by Rashid et al. (2019), where Florisil® was reported to give both high sample purity and satisfactory DF recovery from sediment samples. In opposite to Florisil®, PSA exhibited extreme matrix removal (Fig. 3b), but complete binding of DF was also observed (no DF-peak detected). Such result was in agreement with results described by Aznar et al. (2017) and Paya et al. (2007), who reported that PSA efficiently purify plant samples, but the acidic compounds studied by them were not recovered at all, probably because of the amine group of the PSA. However, different results were shown in the work by Daniele et al. (2016) where 100% of DF recovery from zebra mussels' matrix were reported after PSA-based purification.

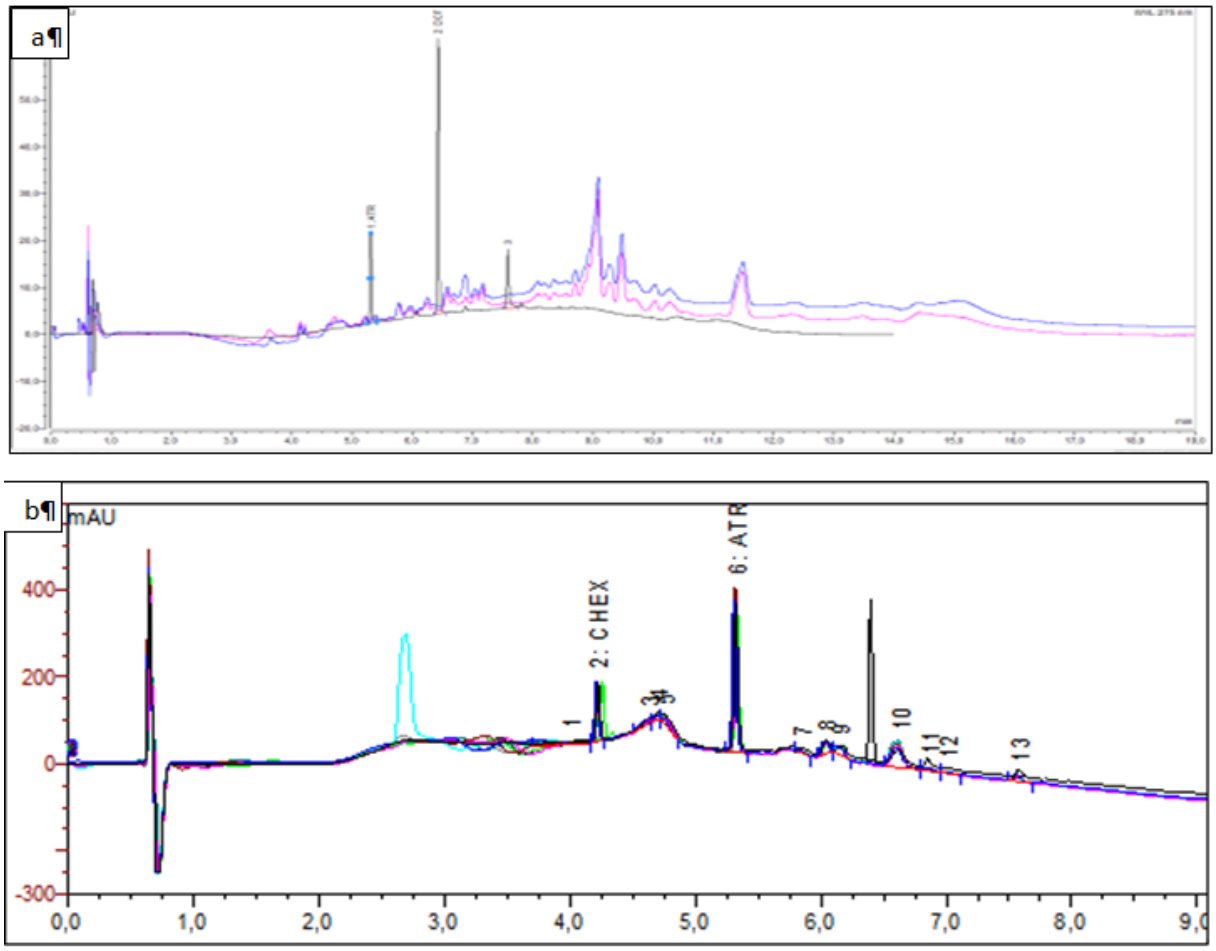


Fig. 3. Representative chromatograms of the sample after purification with Florisil® (100 mg/mL) (a) or PSA (10 mg/mL) (b).

To compare QuEChERS method with different procedure of samples cleaning, LLE method was chosen, because it was recommended as an efficient and simple way of plant matrices processing before HPLC analysis (Aydin et al., 2018). In fact, LLE turned out to be satisfactory as regards DF recovery (Fig. 2). Although purification of the sample by this method did not cause significant losses of the analyzed compound and we were able to get reproducible results, unfortunately it did not solve the problem of removal of cell-derived impurities. Especially, high concentration of chlorophylls remained in the DF-containing chloroform phase because of lipophilicity of the photosynthetic pigments.

4. Conclusions

The described results showed, that the main problem during DF extraction from algae cells matrix for HPLC analysis is the sample purification from cell-derived impurities, mainly photosynthetic pigments. In QuEChERS method, the use of PSA, GCB, Florisil® and Chlorofiltr® as sorbents resulted in significant loss of DF or in insufficient extract purification. Further, LLE was satisfactory as regards DF recovery, but did not remove the cell-derived impurities efficiently. Thus, in our next works, attempts will be made to find

other method for purification of algae matrix fortified with DF, to obtain both good recovery of the analyte and HPLC-acceptable extract purity.

Acknowledgements. This work was supported by the National Science Centre, Poland [grant UMO-2016/23/B/NZ9/00963].

5. References

Aydin Funda, Erkan Yilmaz, and Mustafa Soylak., 2018. "Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples." Food chemistry 243: 442-447.

Aznar R., Albero B., Sánchez-Brunete C., Miguel E., Martín-Girela I., Tadeo J. L., 2017. Simultaneous determination of multiclass emerging contaminants in aquatic plants by ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion and GC-MS. Environmental Science and Pollution Research, 24(9), 7911-7920.

Brain R. A., Hanson M. L., Solomon K. R., Brooks B. W., 2008. Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. In: Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer, 67-115.

Bruzzoniti M.C., Checchini L., De Carlo R.M., Orlandini S., Rivoira L., Del Bubba M., 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. Anal. Bioanal. Chem. 406 (17): 4089–4116. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7798-4.

Daniele G., Fieu M., Joachim S., James-Casas A., Andres S., Baudoin P., Vulliet E., 2016. Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies. Talanta, 155, 1-7.

Dodgen L. K., Ueda A., Wu X., Parker D. R., Gan J., 2015. Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs. Environmental pollution, 198, 144-153.

EU Water Framework Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008.

Feito R., Valcárcel Y., Catalá M., 2012. Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. Ecotoxicology, 21(1), 289-296.

Gros M., Petrovic M., Ginebreda A., Barcelo D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. Environ. Int. 36, 15–26.

Harris E.H., 2009. The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. Academic Press, New York.

Harshkova D., Aksmann A., 2019. Zanieczyszczenie środowiska niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na przykładzie diklofenaku–przyczyny, skutki, bioindykacja. Kosmos, 68(1), 185-194.

Huerta B., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. Anal Bioanal Chem 404, 2611–2624. doi:10.1007/s00216-012-6144-y.

Kumirska J., Migowska N., Caban M., Łukaszewicz P., Stepnowski P., 2015. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples. Science of the Total Environment, 508, 498-505.

Lonappan L., Brar S. K., Das R. K., Verma M., Surampalli R. Y., 2016. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity-A review. Environ. Int. 96, 127-138.

Łozowicka B., Mojsak P., Kaczyński P., Konecki R., Borusiewicz A., 2017. The fate of spirotetramat and dissipation metabolites in Apiaceae and Brassicaceae leaf-root and soil system under greenhouse conditions estimated by modified QuEChERS/LC–MS/MS. Science of The Total Environment, 603, 178-184.

Majewska M., Harshkova D., Guściora M., Aksmann A., 2018. Phytotoxic activity of diclofenac: Evaluation using a model green alga Chlamydomonas reinhardtii with atrazine as a reference substance. Chemosphere, 209, 989-997.

Naidoo V., Swan G.E., 2009. Diclofenac toxicity in Gyps vulture is associated with decreased uric acid excretion and not renal portal vasoconstriction. Comp. Biochem. Physiol. 149, 269–274.

Palmgrén J. J., Mönkkönen J., Korjamo T., Hassinen A., Auriola S., 2006. Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 64(3), 369-378.

Puckowski A., Mioduszewska K., Łukaszewicz P., Borecka M., Caban M., Maszkowska J., Stepnowski P., 2016. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 127, 232-255.

Rashid A., Wang Y., Li Y., Yu C. P., Sun Q., 2019. Simultaneous analysis of multiclass contaminants of emerging concern in sediments by liquid chromatography with tandem quadrupole mass spectrometry. Environmental toxicology and chemistry, 38(7), 1409-1422.

Rejczak T., Tuzimski T., 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. Open Chemistry, 13(1).

Roškar, Robert, and Vojko Kmetec., 2003. "Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid." Journal of Chromatography B 788.1: 57-64.

Sakurai T., Kurata S., Ogino K., 2015. Development of a novel optical sensing method for acid solution using Oil Red O supported by florisil. Analytical Sciences, 31(1), 51-54.

Vannini C., Domingo G., Marsoni M., De Mattia, F., Labra M., Castiglioni S., Bracale M., 2011. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae Pseudokirchneriella subcapitata. Aquatic toxicology, 101(2), 459-465.

Wu X., Conkle J. L., Gan J., 2012. Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. Journal of chromatography A, 1254, 78-86.

Zhang D. Q., Hua T., Gersberg R. M., Zhu J., Ng W. J., Tan S. K., 2012. Fate of diclofenac in wetland mesocosms planted with Scirpus validus. Ecological engineering, 49, 59-64.

Związek pomiędzy występowaniem depresji poporodowej a stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku kobiet karmiących

Jamrozik Natalia [(1)], Ziomkiewicz-Wichary Anna [(2)]

[1] Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
[2] Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Polska Akademia Nauk
Natalia Jamrozik: natalia.jamrozik@student.umed.wroc.pl

Streszczenie
Szacuje się, że depresja poporodowa może dotyczyć od 7 do 30% kobiet na całym świecie. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na jej związek ze zmianą gospodarki hormonalnej po okresie ciąży. Celem pracy było zbadanie związku pomiędzy występowaniem depresji poporodowej a stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku kobiet karmiących, wykorzystując kwestionariusz Edynburskiej Skali Depresji Poporodowej. Materiał badawczy stanowiło 137 ankiet oraz prób mleka pobranych od kobiet w wieku od 20 do 45 lat, karmiących wyłącznie piersią dzieci w wieku do około 6 miesiąca życia. Do oznaczenia poziomów hormonów w mleku wykorzystano metody immunoenzymatyczne. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku a występowaniem depresji poporodowej u kobiet karmiących piersią. Zaobserwowano korelację pomiędzy stężeniem oksytocyny a wartością wskaźnika BMI, natomiast masa ciała wykazała zależność ze stężeniem dla obu hormonów. Potwierdzono związek depresji z lękiem, jako cechą, statusem społeczno-ekonomicznym matek oraz nasileniem zmian życiowych ocenionych przy pomocy Kwestionariusza Zmian Życiowych.

Słowa kluczowe: oksytocyna, wazopresyna, Edynburska Skala Depresji Poporodowej, depresja poporodowa

The association between postpartum depression and the level of oxytocin and vasopressin in human milk

Summary
It is estimated that postpartum depression can affect from seven to even 30% of women worldwide. The results of previous studies indicate its significant relationship with the change in hormonal balance after pregnancy. The aim of the research was to check the association between postpartum depression and the level of oxytocin and vasopressin in human milk of lactating women, using the Edinburgh Postnatal Depression Scale questionnaire. The research material consisted of 137 questionnaires and milk samples taken from women between 20 – 45 years old and breastfeeding children up to 6 months old. To determine the levels of hormones in milk enzyme-linked immunosorbent assay was used. No relationship was found between oxytocin and vasopressin levels in milk and the postpartum depression of breast-feeding women. There was a correlation between oxytocin level and mothers` BMI, while body weight showed a relationship with both hormones. Regression analysis confirmed the association between postpartum depression and anxiety as a trait, the socio-economic status of mothers and the life changes intensity measured using a Recent Life Changes Questionnaire.

Key words: oxytocin, vasopressin, Edinburgh Postpartum Depression Scale, postpartum depression

1. Wstęp

Depresja występująca po narodzinach dziecka określana jest, jako przypadek dużej depresji (major depressive disorder - MDD). Szacuje się, że może dotyczyć od 7 do 30% kobiet na całym świecie. Według systemu klasyfikacji chorób psychicznych ICD-10 powikłanie to występuje w okresie sześciu tygodni od narodzin dziecka. Autorzy

najnowszych badań przyjmują dłuższy czas na pojawienie się choroby, nawet do 12 miesięcy od narodzin dziecka (O'Hara i in., 2009).

Typowe objawy depresji poporodowej obejmują problemy ze snem, zmiany nastroju oraz apetytu, a także lęk, poczucie skrajnego niepokoju o dziecko, smutek, nadmierne rozgoryczenie, poczucie winy i bezsilności oraz myśli samobójcze (Patel i in., 2012).

Do czynników zwiększających ryzyko depresji poporodowej u matek należą między innymi nieprawidłowa masa ciała (Green i in., 2006), zdiagnozowana uprzednio depresja przedporodowa (Gaillard i in., 2014) oraz lęk przedporodowy (Lee i in., 2007).

Depresja poporodowa matki wiąże się również z licznymi następstwami dla rozwoju dziecka (Pope i in., 2014). Zaobserwowano negatywne, długoterminowe konsekwencje dla rozwoju społecznego, emocjonalnego, poznawczego i fizycznego niemowlęcia, w tym zaburzenia interakcji więzi między matką a niemowlęciem, które mogą mieć pośredni wpływ na dynamikę rozwoju dziecka (Field, 2010).

W składzie mleka matek karmiących występują dwa hormony peptydowe o bardzo podobnej strukturze pierwszorzędowej – wazopresyna i oksytocyna. Jedną z głównych ról przypisanych oksytocynie jest stymulowanie wyrzutu mleka z gruczołu sutkowego. W warunkach naturalnych oksytocyna powoduje skurcz komórek mioepitelialnych gruczołu mlecznego w celu wypływu mleka (Ontsouka, 1998). Wyrzut mleka, odruch neuroendokrynny, jest procesem zapoczątkowanym poprzez uwolnienie hormonu z przysadki mózgowej w odpowiedzi na stymulację sutków. Oksytocyna znana jest, jako czynnik ułatwiający interakcje społeczne, takie jak więź rodzicielska i partnerska, budowanie zaufania oraz odczuwanie empatii. U ssaków neuropeptyd ten uwalniany jest bezpośrednio do układu krążenia, trafia również do mózgu, gdzie działa, jako neuroprzekaźnik.

Zakłada się, że ze względu na mały rozmiar oksytocyny (1 kD) istnieje możliwość, że może ona przekroczyć barierę krew-mleko i dotrzeć do mleka. Dzięki badaniom Nguyen i Neville (1998) wiadomo, że hormon ten jest obecny w gruczole sutkowym i powoduje zwiększenie przepuszczalności jego ciasnych połączeń. Badania Takeda i in. (1986) potwierdziły, że oksytocyna jest trawiona przez peptydazy jelitowe, ale stabilna w kwasie żołądkowym, dzięki czemu może być wchłaniania bezpośrednio z przewodu pokarmowego do krwi noworodka. Radioaktywna oksytocyna podawana dootrzewnowo samicy szczura siedem dni po porodzie wykryta została w osoczu noworodka, co potwierdziło potencjalne przeniesienie hormonu do mleka (Takeda i in., 1986).

Ssanie indukuje uwalnianie zarówno oksytocyny, jak i wazopresyny, a dożylne infuzje tego hormonu zwiększają wyrzut mleka u szczurów i kóz, podobnie jak w przypadku

oksytocyny (Högberg i in., 2014). Badania sugerują, że wazopresyna zwiększa retencję wody niezbędną do produkcji mleka (Olsson i Högberg, 2009). Ponieważ mleko składa się głównie z wody, zwiększenie jej retencji przez nerki może powodować wzrost produkcji mleka (Högberg i in., 2014).

Oba omawiane hormony biorą udział w procesach emocjonalnych. Hamowanie lęku odbywa się poprzez oksytocynę, która działając na neurony okolicy zewnętrznej i bocznej jądra migdałowatego (Dębiec, 2005). W przeciwieństwie do oksytocyny wazopresyna jest hormonem zwiększającym stres i agresywność (Roper i in., 2011).

Badania związku pomiędzy stężeniami hormonów a występowaniem depresji nie dają jednoznacznych wyników. Wykazano między innymi, że obwodowe stężenie oksytocyny jest niższe u pacjentów ze zdiagnozowaną depresją (Ozsoy i in., 2009). Inne doniesienia nie potwierdzają jednak obniżonego stężenia tego hormonu u chorych (Cyranowski i in., 2008).

Przeprowadzone dotychczas badania opierają się zwykle na pomiarach stężenia hormonów dokonywanych w krwi obwodowej. Celem poniższej analizy jest ustalenie związku pomiędzy występowaniem depresji a stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku matek karmiących piersią.

2. Materiał i Metody

W badaniu analizowano dane 137 matek 5-miesięcznych niemowląt, karmiących wyłącznie piersią, w wieku od 20 do 45 lat. Matki włączono do badania na podstawie następujących kryteriów: a) dziecko urodzone w wyniku ciąży pojedynczej, o czasie; b) bez stwierdzonych chorób przewlekłych ani wad wrodzonych oraz o prawidłowej masie urodzeniowej; c) matka nieprzyjmująca leków steroidowych; d) niecierpiąca na choroby przewlekłe w tym przede wszystkim na choroby o podłożu endokrynologicznym.

Pojedynczą próbkę mleka pobrano przy pomocy laktatora elektrycznego pomiędzy 2 a 3 epizodem karmienia dziennego (w przedziale godzinowym 8:30-11:30); przy czym za pierwsze karmienie dzienne przyjmowano takie, po którym matka i dziecko podejmowało normalną aktywność.

Do oznaczenia stężenia oksytocyny w mleku wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), opierając się na teście kompetycyjnym (Competitive ELISA), stosując zestaw Oxytocin ELISA Kit (nr kat. ADI-901-153A) firmy Enzo Life Sciences (Szwajcaria). Współczynnik zmienności (Inter-Assay CV) dla przeprowadzonych testów wynosił CV%= 7,2. Co sugeruje wysoką precyzję i niską zmienność przeprowadzonych pomiarów.

Do oznaczenia stężenia ADH w mleku wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA, opierając się na teście podwójnego wiązania (Sandwich ELISA), stosując zestaw Human (ADH/VP/AVP) ELISA Kit (nr kat. 201-12-1049) firmy Shanghai SunRed Biological Technology Co. Współczynnik zmienności dla stężenia wazopresyny w badaniu wynosił CV%= 10,5.

Podczas analizy oksytocyny i wazopresyny oznaczeń dokonano według załączonych instrukcji, każdą z prób badano w dwóch powtórzeniach, wyniki następnie uśredniono.

Standardowe badania antropometryczne przeprowadzono na spotkaniu poprzedzającym pobranie próbki mleka o około 7 dni. Dokonano pomiarów antropometrycznych wysokości i masy ciała. Na podstawie uzyskanych danych obliczono wskaźnik względnej masy ciała BMI (Body Mass Index: masa ciała [kg]/wysokość ciała [m^2]).

Do identyfikacji depresji poporodowej użyto Edynburskiej Skali Depresji Poporodowej (Edinburgh Postnatal Depression Scale – EPDS) (Cox i in. 1987, polskie tłumaczenie: Bnińska, 1999). Kwestionariusz zawiera 10 pytań, na które kobieta odpowiada samodzielnie. Odpowiedzi powinny charakteryzować samopoczucie matki występujące w przeciągu ostatnich 7 dni. Występowanie zaburzeń depresyjnych określa się poprzez przekroczenie ustalonego progu 9 (Jadresic i in., 1995) lub 12/13 (Leung i in., 2005) punktów z 30 możliwych skali EPDS. Współczynnik alfa-Cronbacha w badaniach oryginalnych dla całego kwestionariusza wyniósł 0,88, wskazując tym samym na wysoką rzetelność narzędzia (Cox i in., 1987).

W analizie uwzględniono również wyniki Inwentarzu Stanu i Cechy Lęku (State Traite Anxiety Inventory – STAI) autorstwa Spielberger i in. (1970) w adaptacji Wrześniewskiego i in. (2002), który podzielony jest na dwie skale do pomiaru lęku, jako przemijającego uczucia oraz jako stałej cechy osobowości. W badaniach oryginalnych współczynnik rzetelności alfa-Cronbacha wynosi 0,92.

Użyto również Kwestionariusza Zmian Życiowych (KZŻ) (Sobolewski i in., 1999) jako polskiej adaptacji kwestionariusza „Recent Life Changes Questionnaire" autorstwa Rahe'a (1967), który jest narzędziem badającym liczbę zmian życiowych, których doświadczyła osoba badana w określonym interwale czasowym oraz to, jaką wagę przypisuje tym zmianom. Rzetelność pomiaru KZŻ uznaje się za zadowalającą.

Przeprowadzono analizę statystyczną przyjmując istotność testowanych hipotez na poziomie 0,05. Obliczono współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy stężeniami hormonów a czynniki antropometrycznymi matek. Związek pomiędzy badanymi czynnikami a występowaniem depresji analizowano używając testu t-Studenta. Następnie

przeprowadzono analizę regresji wieloczynnikowej, w której zmienną zależną było występowanie depresji. Określono także współczynnik determinacji R określający, jaki procent zmienności w wyniku z kwestionariusza EPDS jest wyjaśniany za pomocą zmiennych niezależnych.

3. Wyniki

Zanotowano istotne różnice u matek zdrowych i chorych dla zadowolenia z sytuacji finansowej, nasilenia zmian życiowych w przeciągu roku, lęku jako stanu oraz jako cechy (p<0,05). Pozostałe czynniki nie osiągnęły istotności statystycznej (Tab. 1).

Tabela 1. Różnice czynników u matek chorych i zdrowych z uwzględnieniem wyniku skali EPDS (opracowanie własne)

	Depresja EPDS≥9pkt		Depresja EPDS≥13pkt	
	Depresja N = 44	Bez depresji N = 93	Depresja N = 20	Bez depresji N = 117
	M (SD)	*M (SD)*	*M (SD)*	*M (SD)*
Wiek matki	31.29 (3,61)	31,21 (4,26)	32,26 (4,21)	31,06 (4,02)
BMI matki	23,08 (4,6)	23,37 (3,68)	23,91 (4,45)	23,17 (3,91)
Zadowolenie z sytuacji finansowej	5,22 (1,09)	5,51 (1,03)	4,75 (1,07)*	5,53 (1,02)*
Nasilenie zmian życiowych (1 rok)	118,6 (183,20)*	7,95 (202,52)*	153,9 (208,14)*	24,57 (196,38)*
Lęk stan	40,86 (7,69)*	34,32 (6,12)*	44,1 (7,5)*	35,12 (6,45)*
Lęk cecha	45,17 (7,46)*	37,48 (6,28)*	49,05 (7,6)*	38,41 (6,4)*
Oksytocyna	206,51 (75,32)	205,64 (50,59)	207,7 (44,61)	205,91 (71,572)
Wazopresyna	42,91(24,71)	48.13 (23,71)	46,84 (22,78)	46,28 (24,37)

Zanotowano słabą dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami oksytocyny i wazopresyny a masą ciała matki (r= 0,21, p= 0,45 dla oksytocyny; r= 0,16, p= 0,05 dla wazopresyny) oraz pomiędzy stężeniem oksytocyny a wskaźnikiem BMI matek (r= 0,24, p= 0,01). Korelacje pozostałych zmiennych nie osiągnęły istotności statystycznej.

Analiza regresji wykazała istotny związek pomiędzy nasileniem objawów związanych z depresją (suma punktów skali EPDS) a lękiem, jako cechą, poziom zadowolenia z sytuacji finansowej oraz wynikiem z kwestionariusza zmian życiowych. Pozostałe predyktory regresji w tym oksytocyna i wazopresyna straciły znamienność statystyczna w analizie. Model regresji uwzględniający zmienne predykcyjne wyjaśnia 41% (R^2= 0,413, p<0.001) zmienności wyniku w skali EPDS (Tab. 2).

Tabela 2. Współczynniki regresji dla poszczególnych zmiennych niezależnych w modelu przewidującym wynik w skali EPDS (opracowanie własne)

	B	p
Oksytocyna	-0,001	0,828
Wazopresyna	-0,022	0,124
Lęk-cecha	0,349	0,001
KZŻ (1 rok)	0,004	0,023
Wiek matki	-0,009	0,915
Zadowolenie z sytuacji finansowej	-0,918	0,004

4. Dyskusja

W badaniu nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem depresji poporodowej a stężeniem oksytocyny i wazopresyny w mleku matek karmiących. Uzyskana przez karmiące matki suma punktów w kwestionariuszu EPDS nie korelowała ze zbadanymi stężeniami hormonów. Nie zaobserwowano również różnic w stężeniach tych dwóch hormonów pomiędzy matkami zdrowymi a tymi, u których zdiagnozowano depresję na podstawie kwestionariusza EPDS. Brak zależności zademonstrowano zarówno przy diagnostycznym progu punktowym ustalonym na poziomie 9 jak i 13 punktów.

Przeprowadzone dotychczas badania wskazujące na związek pomiędzy depresją a stężeniem oksytocyny i wazopresyny, opierały się na pomiarach dokonywanych w krwi obwodowej badanych. Trudno, więc wnioskować na ich podstawie o wynikach uzyskanych w niniejszym badaniu. Można natomiast przypuszczać, że stężenie hormonów w osoczu korelować będzie dodatnio ze stężeniem w mleku kobiecym.

W niniejszym badaniu zademonstrowano liniowy związek pomiędzy stężeniem oksytocyny a masą ciała i BMI matki. Podobne rezultaty otrzymali Pataky i in. (2019), którzy zaobserwowali znacznie wyższy poziom oksytocyny u osób otyłych w porównaniu do osób szczupłych, w badaniu wykazano zależność pomiędzy stężeniami hormonów a masą ciała matki.

Nie wykazano zależności pomiędzy lękiem mierzonym przy pomocy kwestionariusza STAI a stężeniem wazopresyny i oksytocyny w mleku. W badaniu Scantamburlo i in. (2007) zademonstrowano ujemną korelację pomiędzy stężeniem oksytocyny w osoczu a wynikiem STAI. Stuebe i in. (2013) udowodnili, że u kobiet karmiących piersią w 8 tygodniu po porodzie, stężenie oksytocyny było odwrotnie skorelowane z wynikami skali EPDS oraz kwestionariusza STAI. Bardzo szczupła literatura na temat efektu wazopresyny na odczuwanie lęku potwierdza pozytywny wpływ wlewów wazopresyny na nasilenie lęku wśród zwierząt (Griebel i in., 2005). Wykazano, że jej stężenie w osoczu jest podwyższone u pacjentów z dużą depresją (Londen i in., 1997).

Spośród wszystkich analizowanych czynników związanych z występowaniem depresji, cecha lęku okazała się być najmocniej połączona z chorobą. Jest czynnikiem objaśniającym pojawienie się choroby. Możliwe, że wynika to z faktu, że lęk jest jednym z objawów depresji a sam kwestionariusz EPDS służy między innymi do jego pomiaru poprzez uwzględnienie podskali lęku. Badania Mattheya i in. (2003) potwierdziły, że nie wszystkie kobiety cierpiące na lęk poporodowy miały depresję. Przeprowadzona w niniejszym badaniu analiza regresji potwierdziła, że zadowolenie z sytuacji finansowej oraz nasilenie zmian życiowych

zmierzonych przy pomocy Kwestionariusza Zmian Życiowych są istotnie powiązane z występowaniem depresji. Czynniki te łącznie z nasileniem lęku wyjaśniają około 41% zmienności wyniku w skali EPDS.

Głównymi ograniczeniami niniejszego badania jest brak danych na temat stężeń wazopresyny i oksytocyny w osoczu lub ślinie karmiących matek. Takie dane pozwoliłyby na bezpośrednie porównanie otrzymanych wyników z tymi, które opublikowano w literaturze. Nie badano również występowania u matek depresji w okresach poprzedzających ciążę, co jak wykazano wcześniej jest jednym z czynników ryzyka zachorowania na depresję poporodową. Z drugiej strony, nowatorskie podejście do oznaczania hormonów w mleku pozwala na badanie dodatkowych związków pomiędzy depresją poporodową a stężeniem hormonów i poszerza wiedzę na temat hormonów obecnych w mleku kobiecym. Dane na temat stężeń hormonów w osoczu lub ślinie pozwoliłyby również na ustalenie i opisanie związku pomiędzy stężeniem obwodowym oksytocyny i wazopresyny a ich stężeniem w mleku.

5. Wnioski

Podsumowując, przeprowadzone w niniejszym badaniu analizy nie potwierdzają związku między stężeniami hormonów wazopresyny i oksytocyny a wystąpieniem depresji. Opierając się na wcześniejszych analizach spodziewano się, że matki o wysokim stężeniu oksytocyny oraz niskim wazopresyny w mleku nie będą wykazywały objawów depresyjnych. Cytowane raporty mierzyły poziomy hormonów w osoczu, mleko może wykazywać inną zależność. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy - pośród ogólnodostępnej literatury wazopresyna jest mało zbadanym hormonem pod względem występowania depresji i jej znaczeniu dla kobiet karmiących piersią, natomiast badania dotyczące oksytocyny najczęściej skupiają się na kobietach będących w ciąży lub w trakcie połogu.

5. Literatura

Cox J., Holden J., Sagovsky R. 1987. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale, Br J Psychiatry, 150: 782-6.

Cyranowski J., Hofkens T., Frank E., Seltman H., Cai H., Amico J. 2008. Evidence of dysregulated peripheral oxytocin release among depressed women, Psychosom Med, 70(9): 967-75.

Dębiec J. 2005. Peptides of love and fear; vasopressin and oxytocin modulate the integration of information in the amygdala, Bioessays, 27(9): 869–873.

Field T. 2010. Postpartum depression effects on early interactions, parenting, and safety practices: a review, Infant Behavior & Development, 33(1): 1–6.

Gaillard A., Le Strat Y., Mandelbrot L., Keïta H., Dubertret C. 2014. Predictors of postpartum depression: prospective study of 264 women followed during pregnancy and postpartum, Psychiatry Res, 215(2): 341-6.

Green K., Broome H., Mirabella J. 2006. Postnatal depression among mothers in the United Arab Emirates: socio-cultural and physical factors, Psychol Health Med, 11(4): 425-31.

Griebel G., Stemmelin J., Gal C., Soubrie P. 2005. Non-Peptide Vasopressin V1b Receptor Antagonists as Potential Drugs for the Treatment of Stress-Related Disorders, Current Pharmaceutical Design, 11(12): 1549–1559.

Högberg M., Olsson K., Dahlborn K. 2014. Can vasopressin induce milk ejection in dairy goat? Sm. Rum. Res, 121(1): 111-115.

Lee A., Lam S., Sze Mun Lau S., Chong C., Chui H., Fong D. 2007. Prevalence, Course, and Risk Factors for Antenatal, Anxiety and Depression, Obstet Gynecol, 110(5): 1102-12.

Londen L., Goekoop J., Van Kempen G., Frankhuijzen-Sierevogel A., Wiegant V., Velde E., Wied D. 1997. Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression, Neuropsychopharmacology, 17(4): 284-92.

Matthey S., Barnett B., Howie P., Kavanagh D. 2003. Diagnosing postpartum depression in mother and fathers: Whatever happened to anxiety? J Affect. Disord, 74(2): 139–147.

Nguyen D., Neville M. 1998. Tight Junction Regulation in the Mammary Gland, J Mammary Gland Biol Neoplasia. 3(3): 233-46.

O'Hara M., Swain A. 2009. Rates and risk of postpartum depression—a meta-analysis. International Review of Psychiatry, 8(1): 37–54.

Olsson K., Högberg M. 2009. Plasma vasopressin and oxytocin concentrations increase simultaneously during suckling in goats, J. Dairy. Res., 76(1): 1-5.

Ontsouka C., Bruckmaier R., Blum J. 2003. Fractionized Milk Composition During Removal of Colostrum and Mature Milk, Journal of Dairy Science, 88(6).

Ozsoy S., Esel E., Kula M. 2009. Serum oxytocin levels in patients with depression and the effects of gender and antidepressant treatment. Psychiatry Res, 169: 249–252.

Pataky Z., Guessous I., Caillon A., Golay A., Rohner-Jeanrenaud F., Altirriba J. 2019. Variable oxytocin levels in humans with different degrees of obesity and impact of gastric bypass surgery. International Journal of Obesity, 43: 1120–1124.

Patel M., Bailey R., Jabeen S., Ali S., Barker N., Osiezagha K. 2012. Postpartum Depression: A Review, J Health Care Poor Underserved, 23(2): 534-42.

Pope C. J., Sharma V., Mazmanian D. 2014. Recognition, diagnosis and treatment of postpartum bipolar depression, Expert Review of Neurotherapeutics, 14 (1): 19–28.

Roper J., O'Carroll A., Young W., Lolait S. 2011. The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies, Stress, 14 (1): 98-115.

Scantamburlo G., Hansenne M., Fuchs S., Pitchot W., Maréchal P., Pequeux C., Ansseau M., Legros JJ. 2007. Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression, 32 (4): 407-10.

Sobolewski A., Strelau J., Zawadzki B. 1999. Kwestionariusz Zmian Życiowych (KZŻ): Polska adaptacja kwestionariusza "Recent Life Changes Questionnaire" (RLCQ) R. H. Rahe'a, Przegl Psychol, 42: 27–49.

Stuebe A., Grewen K., Meltzer-Brody S. 2013. Association between maternal mood and oxytocin response to breastfeeding, J Womens Health (Larchmt), 22 (4):352-61.

Takeda S., Kuwabara Y., Mizuno M. 1986. Concentrations and origin of oxytocin in breast milk. Endocrinol Jpn, 33 (6): 821-6.

Wrześniewski K., Sosnowski T., Matusik D. 2002. Inwentarz Stanu i Cechy Lęku: Polska adaptacja STAI.

Rola acetylacji i deacetylacji histonów w regulacji ekspresji genów

Kopytko Patrycja [(1)], Bujak Joanna [(1)], Łączna Małgorzata [(1)], Tkacz Marta [(1)]

[1] Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Patrycja Kopytko: patrycja.kopytko@op.pl

Streszczenie
Materiał genetyczny w komórce upakowany jest w chromatynie, która swoją budową przypomina koraliki na sznurku. Struktura ta ma charakter dynamiczny, wyróżnia się dwa stopie organizacji chromatyny: euchromatynę („luźną") oraz heterochromatynę („skondensowaną"). Chromatyna ulega wielu modyfikacjom poprzez dołączanie różnych grup funkcyjnych, m.in.: metylacji, fosforylacji, acetylacji, ubikwitylacji oraz sumoilacji. Acetylacja histonów jest bardzo ważnym procesem, który reguluje dostępność chromatyny, a enzymami odpowiedzialnymi za katalizowanie procesu acetylacji histonów są acetylotransferazy (HAT). Przeciwstawnie działającymi enzymami są deacetylazy histonów (HDAC), które prowadzą do skondensowania struktur chromatyny, powodując zahamowanie procesu transkrypcji. Zaburzenie równowagi pomiędzy acetylacją oraz deacetylacją może leżeć u podłoża wielu stanów patologicznych, w tym: chorób serca oraz schorzeń onkologicznych. W przeciwieństwie do mutacji zmiany te są odwracalne, dlatego też stosowanie inhibitorów HDAC oraz HAT może być nadzieją w terapii wielu chorób.

Słowa kluczowe: HDAC, HAT, chromatyna, DNA

The role of histone acetylation and deacetylation in the regulation of gene expression

Summary
The genetic material in the cell is packed in chromatin, which resembles beads on a string. This structure is dynamic, there are two types of chromatin: euchromatin ("loose") and heterochromatin ("condensed"). Chromatin undergoes many modifications by attaching various functional groups, among others: methylation, phosphorylation, acetylation, ubiquitylation and sumoylation. Histone acetylation is a very important process that regulates the availability of chromatin, and the enzymes responsible for catalyzing the process of histone acetylation are acetyl transferases (HAT). Opposingly acting enzymes are histone deacetylases (HDAC), which lead to condensation of chromatin structures, causing inhibition of the transcription process. The imbalance between acetylation and deacetylation may underlie many pathological conditions, including heart disease and oncological diseases. Unlike mutations, these changes are reversible, which is why the use of HDAC and HAT inhibitors can be a hope in the treatment of many diseases.

Keywords: HDAC, HAT, chromatin, DNA

1. Wstęp

Informacja genetyczna komórek eukariotycznych upakowana jest w jądrze komórkowym pod postacią nukleoproteidowego kompleksu-chromatyny (Ruiz-Velasco i in., 2017). Fundamentalną jednostką chromatyny jest nukleosom, składający się z histonowego oktameru, na który nawinięta jest podwójna helisa DNA o długości 146-147 par zasad. Oktamer histonowy zbudowany jest z czterech par histonów rdzeniowych: H2A, H2B, H3 oraz H4. W skład histonów rdzeniowych wchodzą domeny globularne (tzw. zawinięcie histonowe), które tworzą rdzeń nuleosomu oraz nieustrukturyzowane odcinki N-końcowe, stanowiące tak zwane „ogony histonowe" (są one bogate w aminokwasy zasadowe- głównie

w reszty argininy oraz lizyny). Pomiędzy nukleosomami znajdują się fragmenty linkerowego DNA, które przyłączają się do histonu łącznikowego H1.DNA łącznikowe ma długość od 0 do 70 par zasad. Dodatkowymi elementami chromatyny są białka kwaśne, inaczej nazywane histonowymi lub resztkowymi (Sacharowski i in., 2019). Chromatyna jest strukturą dynamiczną, wysoki stopień upakowania DNA w chromatynie wymusza konieczność reorganizacji jej struktury, a także zachowania balansu pomiędzy jej różnymi stanami. Wyróżnia się dwa rodzaje organizacji chromatyny: euchromatynę oraz heterochromatynę. Euchromatyna to inaczej chromatyna „luźna", wykazuje ona aktywność transkrypcyjną. Heterochromatyna w przeciwieństwie do euchromatyny posiada skondensowaną strukturę i nie jest aktywna transkrypcyjnie (Gräff i in., 2008). Zachowanie równowagi pomiędzy heterochromatyną a euchromatyną jest możliwe dzięki modulacji oddziaływań histon-histon i histon-DNA oraz wiązanie, bądź oddysocjowanie białek niehistonowych efektorowych, które regulują strukturę chromatyny (Frischle i in., 2003). Ogony histonowe, białka niehistonowe oraz ich globularne domeny mogą ulegać potranslacyjnym modyfikacjom. Remodeling chromatyny bezpośrednio oddziałuje na zmiany ekspresji genów, stymulując procesy prawidłowego rozwoju organizmu, a także jego odpowiedź na zmienne warunki środowiska (Gary i in., 1998). Modyfikacje chromatyny polegają na przyłączaniu różnych grup funkcyjnych do cząsteczek białka, można do nich zaliczyć między innymi: metylację, fosforylację, acetylację, ubikwitylację oraz sumoilacji, ADP-rybozylacji, biotynylacji oraz propionylacji (Portela i in., 2010). Zmiany te mają charakter odwracalny i zaliczane są do grupy modyfikacji epigenetycznych. Epigenetyka jest działem biologii molekularnej, który zajmuje się badaniem dziedziczenia pozagenowego. Modyfikacje epigenetyczne są nabytymi i dziedzicznymi zmianami materiału genetycznego, które powstają w efekcie biochemicznej obróbki białek histonowych albo nici DNA. Pełnią one istotną rolę w regulacji licznych procesów komórkowych, tj. różnicowaniu komórek, naprawie uszkodzeń nici DNA, a także przebudowanie chromatyny. Jedną z ważniejszych modyfikacji potranslacyjnych, która wpływa na strukturę chromatyny jest acetylacja histonów. Reakcja ta katalizowana jest przez dwa przeciwstawnie działające enzymy: acetylotransferazy histonowe (HAT, ang. histoneacetylotransferase) i deacetylazy histonowe (HDAC, ang. histonedeacetylase) (Gatla i in., 2017).

2. Acetylacja histonów

Proces acetylacji histonów został po raz pierwszy opisany przez Allfrey i współpracowników w 1964 roku, wysnuto wtedy hipotezę, iż odgrywa on istotną rolę w regulacji ekspresji genów (Alfrey i in., 1964). Identyfikacja acetylotransferaz histonów jako

transkrypcyjnych koaktywatorów było przełomowym wydarzeniem w zrozumieniu związku przyczynowego między acetylacją histonów a ekspresją genów. Acetylacja histonów jest bardzo ważnym procesem, który reguluje dostępność chromatyny. Dotyczy ona ε-aminowych grup lizyny, które występują na N-końcach histonów rdzeniowych, dochodzi do zmian konformacyjnych nukleosomu i w efekcie do aktywacji transkrypcji genów. U podłoża tych zmian leży proces neutralizacji jonowych oddziaływań pomiędzy resztami lizyny o ładunku dodatnim a resztami fosforanowymi DNA o ładunku ujemnym. Rozluźnienie chromatyny następuje w momencie osłabienia powyższej interakcji, co skutkuje zwiększeniem dostępności DNA dla czynników transkrypcyjnych. Enzymy odpowiedzialne za katalizowanie procesu acetylacji histonów noszą nazwę acetylotransferaz histonowych. Występują one licznie w komórkach eukariotycznych różnych gatunków, zaczynając od drożdży, a kończąc na człowieku. Grupa enzymów HATs jest bardzo zróżnicowana, ze względu na obecne domeny katalityczne można ją podzielić na trzy rodziny: GNAT, MYST oraz sieroce HAT (nazywane również: rodziną białek p300/CBP oraz innymi HAT) (Shahbazian i in., 2007).

Najliczniejszą grupą acetylotransferaz histonów jest rodzina MYST, zalicza się do niej: TIP60, MOF, HBO1, MOZ, MORF, SAS2 oraz SAS3. Cechą typową dla członków enzymów MYST jest obecność w ich strukturze palców cynkowych oraz chromodomen. Wykryto, iż katalizują one reakcje acetylacji reszt lizyny w histonach H2A, H3 i H4. Do HAT z grupy GNAT należą: GCN5, PCAF, HAT1, ELP3, NUT1. Z reguły enzymy te charakteryzują się obecnością bromodomeny, stwierdzono również, iż acetylują one reszty lizyny na histonach H2B, H3 i H4. Sieroce HAT nie zawierają precyzyjnej konsensusowej domeny HAT (nie wykazuje ona homologii sekwencji z innymi znanymi HAT), dlatego też nazywa się je „klasą osieroconą". Pomimo tego powyższe enzymy wykazują wewnętrzną aktywność HAT. Do przedstawicieli tej grupy zalicza się: P300/CBP, TAF1 oraz koaktywatory receptora jądrowego, tj. SRC-1, ACTR, and TIF-2 (Yang i in., 2005; Lafon-Huges i in., 2008)

Oprócz acetylacji histonów, HAT mogą katalizować reakcje przyłączania grupy acetylowej do niehistonowych substratów (np. p53, c-MYC oraz NF-κB) (Gordon i in., 2015).

3. Deacetylacja histonów

Procesem przeciwstawnym do acetylacji histonów, jest ich deacetylacja. Prowadzi ona do skondensowania struktur chromatyny, zmniejszając przestrzenie znajdujące się między chromatosomami. W efekcie dochodzi do ściślejszego zwinięcia nici DNA, co utrudnia dostęp do czynników transkrypcyjnych, powodując zahamowanie procesu transkrypcji (De Ruijter i in., 2003). Za reakcję usunięcia grupy acetylowej z N-końca ogona histonowego

odpowiedzialne są enzymy z grupy deacetylaz histonowych. Do tej pory w komórkach ssaczych opisanych zostało 18 deacetylaz histonów, które podzielone zostały ze względu na ich podobieństwo do struktury pierwszorzędowej białka na cztery grupy: I-IV. HDAC klasy I wykrywane są w jądrze komórkowym, a do jej członków zalicza się: HDAC1, HDAC2, HDAC3 oraz HDAC8. Deacetylazy histonów klasy drugiej podzielone są na dwie podklasy: IIA oraz IIB. Do grupy HDAC klasy IIA należą: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9. Natomiast do podklasy HDAC IIB zalicza się: HDAC6 oraz HDAC10. Enzymy te mają zdolność przemieszczania się pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą. W skład klasy III wchodzą sirtuiny (SIRT od 1 do 7). Klasę IV tworzy HDAC11, który lokalizuje się w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym (Schleithoff i in., 2012; Poczęta i in., 2018). Dokonano również podziału deacetylaz histonów na klasyczne oraz sirtuiny. Do grupy klasycznych HDAC zaliczane są HDAC klasy I, II oraz czwartej, rodzinę sirtuin stanowią HDAC klasy III. Cechą charakterystyczną klasycznych HDAC jest obecność Zn^{2+} w centrum katalitycznym, a jony chelatujące cynk determinują ich prawidłowe funkcjonowanie. Dodatkowo istnieje możliwość hamowania aktywności deacetylaz histonów przy użyciu inhibitorów HDAC o szerokim spektrum działania (np. trichostatyna A oraz kwas suberanilohydroksamowy). Enzymy należące do grupy sirtuin do spełniania swoich funkcji wymagają obecności NAD^{+}, czyli dinukleotydunikotynoamidoadeninowego. Wartym podkreślenia jest fakt, iż enzymatyczna aktywność nie wymaga regulacji z użyciem inhibitorów deacetylaz histonów (Eckschlager i in., 2017; Chen i in., 2015).

4. Dysregulacja HAT oraz HDAC

Zmiany w acetylacji oraz deacetylacji histonów mają duże znaczenie w procesach różnicowania oraz rozwoju komórek. Prawidłowy rozwój organizmu zapewniony jest poprzez zachowanie równowagi pomiędzy poziomami acetylaz oraz deacetylaz histonowych.

Zaburzenia wzorca epigenomu mogą leżeć u podłoża wielu stanów patologicznych. Zbadano, iż zwiększony poziom acetylacji białek histonowych skutkuje zmianą konformacji chromatyny z nieaktywnej formy w euchromatynę, w konsekwencji dochodzi do zwiększonej transkrypcji genów. W sytuacji gdy w organizmie doszło także do mutacji protoonkogenu i jego transformacji w onkogen, dochodzi do akumulacji nieprawidłowej ekspresji genów i rozwoju choroby nowotworowej (Hou i in., 2017). Podwyższony poziom ekspresji HAT wykryto w przypadku: nowotworu jelita grubego, prostaty oraz sutka, a także w nowotworach hematologicznych (Sawicki i in 2015). Translokacja chromosomowa genów kodujących p300 lub CBP z genami innych białek HAT (MOZ, MORF, MLL) indukuje białaczkę poprzez tworzenie białek fuzyjnych MOZ-, MORF- i MLL-p300/CBP. Takie białka fuzyjne

pochodzące z translokacji mogą powodować utratę funkcji lub zwiększenie ekspresji genów, co skutkuje nieprawidłową regulacją cyklu komórkowego i onkogenezą (Iyer i in., 2004). Dysregulacja epigenomu może powodować również rozwój chorób związanych z układem krążenia. Ostatnie badania wykazały, że acetylacja histonu rdzeniowego jest prawdopodobnie związana z wieloma chorobami sercowo-naczyniowymi, w tym nadciśnieniem (Pfister i in., 2017), kardiomiopatią cukrzycową (Constantinides i in., 1978), zawałem mięśnia sercowego (Sorm i in., 1968), tętniczym nadciśnieniem płucnym (Mohammad i in., 2019).

Zwiększone poziomy różnych rodzajów deacetylaz histonowych związane są z rozwojem nowotworów. Wykryto wzrost poziomu HDAC1 w przypadku: raku żołądka (Choi i in., 2001), prostaty (Halkidou i in., 2004), okrężnicy (Wilson i in., 2006) i raku piersi (Zhang i in. 2005). Odnotowano nadekspresję HDAC2 w raku szyjki macicy (Huang i in., 2005), żołądka (Song i in., 2005), a także w raku jelita grubego z utratą ekspresji APC (Zhu i in., 2004) oraz HDAC3 i HDAC6 w raku jelita grubego (Zhang i in., 2004) i piersi (Bourassa i in., 2014).

Ponadto zaburzenia aktywności HAT wiążą się z rozwojem ostrej białaczki promielocytarnej, a wynika to z translokacji genu RARα i powstania fuzji powyższego genu z genem: PML, PLZF, NPM lub NuMA. Dochodzi do wiązania HDAC z produktami genów, które uległy połączeniu i utrzymaniu heterochromatyny, a w efekcie do hamowania ekspresji genów, koniecznych do procesu różnicowania się promielocytu (Stepulak i in., 2005). W związku z powyższym uważa się, iż deacetylazy histonów są obiecującymi celami terapii przeciwnowotworowej.

5. Inhibitory HAT oraz HDAC jako przykłady leków epigenetycznych

Lekiem epigenetycznym nazywany jest każdy związek posiadający zdolność do wzbudzenia lub obniżania aktywności enzymów oddziałujących na epigenom (Gajer i in., 2015). Inhibitory acetylotransferaz histonowych można podzielić na trzy grupy: inhibitory bisubstratowe, substancje pochodzenia naturalnego oraz małe syntetyczne cząsteczki. Najbardziej selektywnymi inhibitorami HAT są inhibitory z rodziny bisubstratowych. W swojej budowie wykazują one obecność acylo-CoA oraz peptydu bardzo podobnego do substratu lizyny. Charakteryzują się one niską stabilnością oraz ograniczonym przechodzeniem przez błonę komórkową, co uniemożliwia ich stosowanie w terapii antynowotworowej (Liu i in., 2008). Do substancji pochodzenia naturalnego posiadających zdolność hamowania aktywności HAT należą m.in.: kurkumina, garcinol oraz kwas anakardowy. Przedstawicielami małych syntetycznych cząsteczek są np.: Γ-butyrolakton MB-3 i pochodne chinoliny (Manzo i in., 2009).

Inhibitory HDAC oddziałują z katalityczną domeną deacetylaz histonów, blokując ich aktywność. Następuje zwiększenie poziomu acetylacji histonów, chromatyna rozluźnia się i dochodzi do wznowienia prawidłowej ekspresji genów. Jako przykłady inhibitorów HDAC można podać: SAHA, TSA, Panobinostat, Belinostat, Dacinostat, Maślan, Romidepsyna, Entinostat oraz Mocetinostat (Grabarska i in., 2013).

6. Podsumowanie

Epigenetyka stanowi prężnie działającą gałąź biologii molekularnej. Modyfikacje epigenetyczne wpływają na zmiany struktury chromatyny, modulując tym samym ekspresję genów. Do grupy modyfikacji epigenetycznych zalicza się m.in.: acetylację, metylację, fosforylację sumoilację, ubikwitylację, ADP-rybozylację oraz biotynylację. Acetylacja prowadzi do rozluźnienia struktur chromatyny, a co za tym idzie zwiększa transkrypcje genów. W przypadku deacetylacji dochodzi do skondensowania chromatyny i zahamowania transkrypcji. Zachwianie równowagi pomiędzy procesami acetylacji i deacetylacji, może być przyczyną wielu stanów patologicznych, m.in. nowotworów oraz schorzeń sercowo-naczyniowych. Nadzieją w terapii epigenetycznej mogą okazać się substancje hamujące aktywność acetylotransferaz oraz deacetylaz histonów.

7. Literatura

Allfrey VG., Faulkner R., Mirsky AE., 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 51, 786–794.

Bourassa MW., Ratan RR., 2014. The interplay between microRNAs and histone deacetylases in neurological diseases. NeurochemInt 77: 33-9.

Chen HP., Zhao YT., Zhao TC., 2015. Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression (Histone deacety-lases in cancer). Crit Rev Oncog. 20: 35-47.

Choi JH., Kwon HJ., Yoon BI., 2001. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. Jpn J Cancer Res 92: 1300-4.

Constantinides, P. G., Taylor, S. M. & Jones, P. A. Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides. Dev. Biol.66, 57–71 (1978).

De Ruijter AJ., Van Gennip AH., Caron HN., 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J 370: 737-749.

Eckshlager T., Plch J., Stiboro-Va M., Hrabeta J., 2017. Histone Deacety-lase Inhibitors as Anticancer Drugs. Int J Mol Sci 7:1414-1438.

Fischle W., Wang Y., Allis CD., 2003. Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol 15: 172-183.

Gajer JM., Furdass SD., Grunder A., Gothwal M., Heinicke U., 2015. Histone acetyltransferase inhibitors block neuroblastoma cell growth in vivo. Oncogenesis. 4: 137-146.

Gary JD., Clarke S., 1998. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 61: 65-131.

Gatla HR., Zou Y., Uddin MM., Vancurova I., 2017. Epigenetic regulation of interleukin-8 expression by class I HDAC and CBP in ovarian cancer cells. Oncotarget. 8, 41, 70798-70810.

Gordon JA., Stein JL., Westen-Dorf JJ., Van Wijnen AJ., 2015. Chromatin modifiers and histone modifications in bone formation, regeneration, and therapeutic intervention for bone-related disease. Bone 81: 739-745.

Grabarska A., Dmoszyńska-Graniczka M., 2013. Nowosadzka E., Stepulak A., Inhibitory deacetylaz histonów – mechanizmy działania na poziomie molekularnym i zastosowania kliniczne. Postepy Hig Med. Dosw (online) 67: 722-735.

Gräff J., Mansuy IM., 2008. Epigenetic codes in cognition and behav-iour. Behav Brain Res 192: 70-87.

Halkidou K., Gaughan L., Cook S., Leung HY., Neal DE., Robson CN., 2004. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. The Prostate 59: 177-89.

Hou H., Zheng X., Zhang H., Yue M., Hu Y., 2017. Histone Deacety-lase Is Required for GA-Induced Programmed Cell Death in Maize Aleurone Layers. Plant Physiol 175, 3: 1484–1496.

Huang B., Laban M., Leung CH., 2005. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. Cell Death Differ 12: 395-404.

Iyer NG., Ozdag H., Caldas C., 2004. p300/CBP and cancer. Oncogene 23, 24: 4225-31.

Lafon-Hughes L., Di Tomaso MV., Mendez-Acuna L., 2008. Chromatin –remodeling mechanisms in cancer. Mutation Research 2008; 658: 191-214.

Liu X., Wang L., Zhao K., 2008. The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. Nature 451,7180:846-50.

Manzo F., Tambaro FP., Mail A., Altucci L., 2009. Histone acetyltransferase inhibitors and preclinical studies. Expert Opinion on Therapeutic Patents 6, 19: 761-774.

Mohammad HP., Barbash O., Creasy C., 2019. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer 25: 403–418.

Pfister SX., Ashworth A., 2017. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. Nat. Rev. Drug Discov 16: 241–263.

Poczęta M., Nowak E., Bieg D., Bednarek I., 2018. Modyfikacje epigenetyczne a ekspresja genów w nowotworzeniu. Ann Acad Med Siles (online) 72: 80–89.

Portela A., Esteller M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol 10:1057-1068.

Ruiz-Velasco M., Zaugg JB., 2017. Structure meets function: How chromatin organisation conveys functionality. Curr Opin Syst Biol 1: 129-136.

Sacharowski SP., Sarnowski TJ., 2019. Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. Post Biochem 65,1: 9-20.

Sawicki W., Malejczyk J., Wróblewska M., 2015. Ujarzmianie starzenia: sirtuiny, NFκB, mTOR, GH/IGF1 i ograniczenie kaloryczne. Gerontol Pol 23, 4: 200-205.

Schleithoff C., Voelter-Mahlknecht S., Dahmke IN., Mahlknecht U., 2012. On the epigenetics of vascular regulation and disease. Clin. Epigenetics 4(1): 7-9.

Shahbazian MD., Grunstein M., 2007. Functions of site-spesific histone acetylation and deacetylation. Annu Rev Biochem. 76: 75-100.

Song J., Noh JH., Lee JH., 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. APMIS 113: 264-8.

Sorm F., Veselý J., 1968. Effect of 5-aza-2′-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. Neoplasma 15: 339–343.

Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Kupisz K., 2005. Histone deacetylase inhibitors as a new generation of anti-cancer agents. Postępy Hig Med Dosw 59: 68-74.

Wilson AJ., Byun DS., Popova N., 2006. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. J Biol Chem 281: 13548-58.

Yang XJ., Grégoire J., 2005. Class II Histone Deacetylases: from Sequence to Function, Regulation, and Clinical Implication. Molecul Cell Biol 25: 2873-84.

Zhang Z., Yamashita H., Toyama T., 2004. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. Clin Cancer Res 10: 6962-8.

Zhang Z., Yamashita H., Toyama T., 2005. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. Breast Cancer Res Treat 94: 11-6.

Zhu P., Martin E., Mengwasser J., Schlag P., Janssen KP., Göttlicher M., 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. Cancer Cell 5: 455-63.

Rola czynnika indukowanego hipoksją w metabolizmie nowotworów i jego inhibitory w terapii przeciwnowotworowej

Kozal Karolina [(1)]

[1] Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki
Karolina Kozal: karolina@kozal.eu

Streszczenie
Czynnik indukowany hipoksją jest czynnikiem transkrypcyjnym biorącym udział w ochronie komórek przed stresem wywołanym warunkami hipoksji. Jest on ważnym elementem utrzymania homeostazy w prawidłowo funkcjonujących komórkach, jednak w przeciągu ostatnich dekad odkryto, że odgrywa on również istotną rolę w przypadku komórek nowotworowych. Czynnik indukowany hipoksją bierze udział w metabolizmie glukozy komórek nowotworowych, w regulowaniu pH mikrośrodowiska guza, uczestniczy w przerzutowaniu oraz wpływa na oporność na radioterapię. Odkrycie korzystnego wpływu czynnika indukowanego hipoksją na metabolizm komórek nowotworowych sprawiło, że stał się on celem poszukiwania związku o działaniu przeciwnowotworowym. W pracy omówiono rolę czynnika indukowanego hipoksją w metabolizmie nowotworów oraz współczesne perspektywy wykorzystania jego inhibitorów w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe: czynnik indukowany hipoksją, nowotwór, terapia przeciwnowotworowa

Role of the hypoxia-inducible factor in the metabolism of cancers and its inhibitors in anticancer therapy

Summary
The hypoxia-inducible factor is a transcriptional factor participating in the protection of cells in hypoxia conditions. It is a key element required to maintain homeostasis, but in recent decades an important role in the metabolism of cancer cells has also been discovered. The hypoxia-inducible factor plays a role in the glucose metabolism of cancer cells, maintains pH in the microenvironment of tumors, participates in metastasis and induces resistance to radiotherapy. Discovery of the role of HIF in cancer cell metabolism resulted in an interest in it as a target for anticancer therapy. This paper discusses the role of the hypoxia-inducible factor in the metabolism of cancers and contemporary perspectives of its inhibitors in anticancer therapy.

Keywords: hypoxia-inducible factor, cancer, anticancer therapy

1. Wstęp

Hipoksja w najogólniejszym ujęciu dotyczy stanu niedoboru tlenu w stosunku do fizjologicznego zapotrzebowania komórki lub tkanki. Procentowe ujęcie hipoksji jest kwestią znacznie bardziej skomplikowaną ze względu na brak jednolitej klasyfikacji warunków tlenowych. W literaturze można się spotkać z określeniem normoksji, czyli prawidłowego stężenia tlenu, która wynosi około 20%. Wartość ta dotyczy zawartości tlenu w powietrzu atmosferycznym na poziomie morza i można zastosować ją do opisu warunków hodowli kultur komórkowych, jednak nie obserwuje się jej w organizmie człowieka. W związku z tym zaczęto korzystać z pojęcia fizoksji lub fizjoksji odnoszącej się do wartości stężenia tlenu obserwowanego w tkankach przy zachowaniu homeostazy. Wartość ta jest różna w zależności od typu tkanki, jej funkcji oraz umiejscowienia w organizmie. Średnia

wartość fizjoksji dla komórek ludzkiego organizmu wynosi około 5% a zakres mieści się w wartościach od 3 do 7.4%. Natlenienie komórek nowotworowych, których metabolizm znacznie różni się od komórek prawidłowo funkcjonujących, wynosi znacznie mniej i mieści się w zakresie od 0.3% do 7.4% (McKeown, 2014). Oznacza to, że wartości hipoksji w przypadku komórek nowotworowych nie tylko wykazują przesunięcie w stosunku do wartości dla komórek zdrowych, ale również obejmują dość szeroki zakres. Ostateczna granica hipoksji będzie zależna od typu nowotworu oraz tkanki, z której powstał.

Do pojawienia się zjawiska hipoksji może dojść w sytuacjach fizjologicznych: podczas rozwoju embrionalnego, w trakcie gojenia się ran, podczas dużego wysiłku fizycznego lub w sytuacjach znajdowania się poniżej poziomu morza (np. w trakcie nurkowania) lub znacznie powyżej. Niedobór tlenu może jednak towarzyszyć również stanom patologicznym i może pojawić się w stanach zapalnych czy przebiegu chorób układu oddechowego czy krwionośnego (Kumar i in., 2015).

Kluczowym elementem wykrywania i reagowania komórki na zmiany stężenia tlenu jest czynnik indukowany hipoksją (HIF - *hypoxia-inducible factor*). HIF jest czynnikiem transkrypcyjnym, który składa się z dwóch podjednostek: HIFα oraz HIFβ. Obie podjednostki posiadają w swojej budowie domeny HLH (*helix-loop-helix*) oraz PAS (*per-arnt-sim*), natomiast tylko w podjednostce HIFα występuje dodatkowa domena ODD (*oxygen-dependent degradation*). W warunkach fizjoksji dochodzi do wytwarzania obu jednostek jednak podjednostka HIFα zostaje zdegradowana. W warunkach prawidłowego stężenia tlenu dochodzi do hydroksylacji reszt proliny w pozycjach 402 oraz 564 w domenie ODD, co sprawia, że podjednostka jest rozpoznawana przez białko von Hippel-Lindau (VHL). Związanie podjednostki z białkiem VHL doprowadza do rekrutacji ligazy ubikwitynowej, która znakuje HIFα resztą ubikwityny. Wyznakowana podjednostka czynnika zostaje następnie skierowana na drogę degradacji proteolitycznej. W warunkach hipoksji nie dochodzi do degradacji HIFα, co skutkuje kumulowaniem się podjednostek w cytoplazmie. W jądrze podjednostki te łączą się z podjednostkami HIFβ tworząc aktywny heterodimer. Czynnik transkrypcyjny łączy się wtedy z DNA w regionie HRE (*hypoxia-response element*), który znajduje w obrębie wielu promotorów genów kodujących kluczowe elementy metabolizmu komórki, zwłaszcza metabolizmu glukozy (Semenza, 2012).

2. Rola czynnika indukowanego hipoksją w metabolizmie komórek nowotworowych

Hipoksja jest nieodłącznym zjawiskiem obserwowanym w przypadku guzów litych. Jest to spowodowane odległością powstawania komórek od naczyń krwionośnych, tworzeniem nowych naczyń krwionośnych o niskiej efektywności, ale również gorszym

dyfundowaniem tlenu w głąb guza. Dodatkowym powodem hipoksji w komórkach nowotworowych może być zmiana ich metabolizmu. Przez wiele lat sądzono, że zmiany metaboliczne obserwowane w komórkach nowotworowych są dziełem przypadku, losowych mutacji czy uszkodzeń. Dziesiątki lat badań ukierunkowanych na analizę reprogramingu metabolizmu nowotworów pozwoliły jednak na wyciągnięcie następujących wniosków: zmiany te nie tylko nie są przypadkowe, ale wpływają też korzystnie na przeżycie komórek oraz uzyskiwanie przez nich cech mogących uczynić je nowotworami złośliwymi (De Berardinis i in., 2008). Do aktywacji czynnika indukowanego hipoksją w komórkach nowotworowych może dojść na kilka sposobów. Poza niedoborem tlenu charakterystycznym dla guzów litych może również dojść do mutacji w obrębie genu *VHL*, który koduje białko von Hippel-Lindau. Nie dochodzi wtedy do wyznakowania podjednostki HIFα ubikwityną, tym samym nie zostaje ona skierowana na drogę degradacji proteolitycznej. Kolejnym powodem aktywacji HIF może być obserwowana w niektórych typach nowotworów zwiększona aktywacja kinazy Akt. Kinaza ta jest główną kinazą efektorową w szlaku sygnałowym Akt/PI3K/mTOR, którego zwiększona aktywność może wpływać na aktywację czynnika indukowanego hipoksją (Elstorm i in., 2004). Kolejnym powodem zwiększonej aktywności czynnika indukowanego hipoksją może być obecność izoformy M2 kinazy pirogronianowej (PKM2). Jest to charakterystyczna izoforma kinazy pirogronianowej obserwowana w wielu typach nowotworów. Odkryto, że PKM2 oddziałuje z domeną transaktywacyjną podjednostki HIFα przez co działa jako koaktywator transkrypcji zwiększając wiązanie czynnika indukowanego hipoksją z regionem HRE DNA, prowadząc do zwiększonej rekrutacji koaktywatora p300 oraz wpływając na zwiększoną acetylację histonów, co prowadzi do rozluźnienia włókna nukleosomowego i zwiększenia dostępności DNA dla czynników transkrypcyjnych (Luo i in., 2011).

Aktywacja czynnika indukowanego hipoksją obserwowana powszechnie w różnych typach nowotworu wydaje się być częścią korzystnego dla komórek nowotworowych reprogramingu metabolicznego. Zwiększenie ekspresji podjednostki HIFα wiąże się ze zwiększeniem wzrostu guza natomiast utrata aktywności czynnika indukowanego hipoksją powoduje zmniejszenie wzrostu (Semenza, 2010). Skoro aktywność HIF ma korzystny wpływ na komórki nowotworowe należy przyjrzeć się procesom i szlakom metabolicznym, na które wpływa ekspresja genów indukowana aktywacją tego czynnika.

HIF odgrywa ważną rolę w utrzymaniu tak zwanego efektu Warburga. Zjawisko to jest związane z metabolizowaniem glukozy do kwasu mlekowego niezależnie od dostępności tlenu i jest ono elementem niezbędny między innymi do tworzenia biomasy potrzebnej

szybko rosnącym i proliferującym komórkom nowotworowym (De Berardinis i in., 2008). Czynnik indukowany hipoksją wpływa na zwiększoną ekspresję genów kodujących kluczowe elementy szlaku glikolitycznego, w tym:

- transportery glukozy GLUT - zwiększona liczba pozwala na zwiększony pobór glukozy (Soni i in., 2017)
- enzymy szlaku glikolitycznego takie jak heksokinaza, fosfofruktokinaza, aldolaza, kinaza fosfoglicerynianowa czy enolaza - zwiększona liczba pozwala na efektywniejsze metabolizowanie glukozy (Soni i in., 2017)
- dehydrogenazę mleczanową LDH - zwiększona liczba pozwala na efektywniejszą przemianę powstającego pirogronianu w mleczan, co sprzyja regeneracji cząsteczek NAD+ niezbędnych w procesie glikolizy (Feng i in., 2018)

Zwiększona aktywność czynnika indukowanego hipoksją sprzyja pojawieniu się złośliwych cech komórek nowotworowych. HIF wpływa na zwiększoną ekspresję represorów ekspresji takich jak ZFHX1A oraz ZFHX1B, których aktywność wpływa na zmniejszenie ekspresji genu kodującego E-kadherynę (Garcia, 2006). Białko to odpowiada za integralność tkanki poprzez adhezję komórek, a spadek jego ekspresji wpływa na zmianę fenotypu komórek z epitelialnego na mezenchylmalny, co jest pierwszym elementem procesu metastazy. Czynnik indukowany hipoksją wpływa również na zwiększoną aktywność TGFα (transforming growth factor), który po połączeniu się z odpowiednimi receptorami prowadzi do zwiększonego wzrostu i proliferacji komórek. Działanie czynnika indukowanego hipoksją na metabolizm komórek nowotworowych sugeruje, więc, że nie tylko uczestniczy on w utrzymaniu komórek w pierwotnym ognisku nowotworu, ale również bierze udział w procesie przerzutowania.

Czynnik indukowany hipoksją wpływa również na ekspresję genów, których produkty biorą udział w angiogenezie. Powstanie nowych naczyń krwionośnych jest niezbędne dla wzrostu guza, którego komórki wymagają zaopatrzenia w tlen i składniki odżywcze. Do czynników proangiogennych, na które wpływa HIF należą między innymi czynniki wzrostu, takie jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF, angiopoetyny czy płytkopochodny czynnik wzrostu PDGF, ale też metaloproteinazy macierzowe czy syntaza tlenku azotu NOS. Liczba genów zaangażowanych w angiogenezę, która znajduje się pod kontrolą czynnika indukowanego hipoksją, sugeruje zaawansowany poziom złożoności wpływu HIF nie tylko na powstawanie nowych naczyń, ale również na modulowanie przepływu krwi przez nowo powstałe naczynia (Soni i in., 2017). Zaobserwowano również, że nowotwory o wysokiej zawartości czynnika indukowanego hipoksją wykazują zwiększoną

oporność na radioterapię względem komórek, u których zablokowano ekspresję HIF. Może to być związane ze zwiększeniem ekspresji czynników wzrostu, takich jak VEGF, pod wpływem działania czynnika indukowanego hipoksją (Rankin i in., 2008).

3. Inhibitory czynnika indukowanego hipoksją

Złożone działanie czynnika indukowanego hipoksją w metabolizmie komórek nowotworowych sprawiło, że stał się on celem w poszukiwaniu związku mogącego znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Do zahamowania aktywności HIF można doprowadzić na kilka sposobów:

- poprzez inhibicję ekspresji podjednostki HIFα

Do inhibicji ekspresji podjednostki HIFα można doprowadzić zarówno na etapie transkrypcji jak i na etapie translacji. Związkiem działającym, jako inhibitor mRNA jest EZN-2960. Związek ten jest oligonukleotydem, który w badaniach przedklinicznych wykazał specyficzność działania na czynnik indukowany hipoksją. Jego zastosowanie poskutkowało zmniejszeniem aktywności genów znajdujących się pod kontrolą HIF (Greenberger i in., 2008). EZN-2960 przeszedł do pierwszej fazy badań klinicznych. Kolejnym mechanizmem zablokowania transkrypcji jest inaktywacja topoizomerazy I przy wykorzystaniu analogów kamptotecyny. Przedstawicielem tej grupy inhibitorów jest CPT-11, którego skuteczność działania sprawiła, że związek ten przeszedł do drugiej fazy badań klinicznych w przypadkach raka trzustki, raka jajników, guzów litych, glejaków oraz nerwiaków.

Inhibicja translacji podjednostki HIFα może obejmować kilka mechanizmów. Jednym z nich jest blokowanie translacji poprzez inhibicję kinazy mTOR, która uczestniczy w procesie inicjacji tego etapu syntezy białek (Ma i in., 2009). Inhibitorami o takim mechanizmie działania są temsirolimus, sirolimus oraz ewerolimus (Masound i in., 2015). Sirolimus oraz everolimus znalazły zastosowanie w leczeniu immunosupresyjnym, natomiast temsirolimus oraz ewerolimus zostały zatwierdzone w leczeniu raka nerkowokomórkowego, raka piersi, chłoniaków oraz guzów trzustki. Do zablokowania translacji można również doprowadzić poprzez inhibicję innej kinazy będącej elementem szlaku transdukcji sygnału. LY294002 jest inhibitorem kinazy PI3K. W komórkach raka prostaty traktowanych tym inhibitorem doprowadził on do zahamowania ekspresji podjednostki HIFα (Jiang i in., 2001). LY294002 przeszedł do pierwszej fazy badań klinicznych z udziałem pacjentów chorujących na nerwiaki.

Do nowych związków testowanych w badaniach przedklinicznych wykazujących hamujące działanie na ekspresję czynnika indukowanego hipoksją należą melittin, aktynolaktomycyna oraz zebularin.

- poprzez inhibicję białka Hsp90

Białka opiekuńcze z klasy Hsp90 uczestniczą w osiąganiu odpowiedniej konformacji przez podjednostki czynnika indukowanego hipoksją. Zablokowanie interakcji pomiędzy HIFα a Hsp90 może doprowadzić do przekierowania podjednostki na drogę degradacji proteolitycznej. Mechanizm działania oparty na inhibicji białka opiekuńczego wykazuje geldanamycyna. Związek ten jest benzochinonowym antybiotykiem, którego syntetyczne pochodne (17-AAG, 17-DMAG, IPI-504) przeszły do fazy drugiej badań klinicznych z białaczkami, guzami litymi oraz rakiem płuca (Masound i in., 2015). Kolejnym inhibitorem Hsp90 jest ganetespib. Jest on małym, syntetycznym związkiem, którego działanie było oceniane w badaniach przedklinicznych na komórkach gruczolakoraka przewodu trzustkowego. Jego zastosowanie poskutkowało zahamowaniem efektów spowodowanych zwiększoną aktywnością HIF i doprowadziło do zwiększenia podatności komórek na związki antynowotworowe (Nagaraju i in., 2019). Kolejnym związkiem blokującym interakcję pomiędzy Hsp90 i HIF jest tymochinon. Jest to naturalny związek pochodzenia roślinnego, którego zastosowanie w badaniach z komórkami raka nerkowokomórkowego poskutkowało zmniejszeniem ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą czynnika indukowanego hipoksją a ostatecznie doprowadziło do śmierci komórek (Lee i in., 2019).

- poprzez inhibicję dimeryzacji podjednostki HIFα z podjednostką HIFβ

Pierwszymi związkami wykazującymi mechanizm działania na zasadzie inhibicji dimeryzacji podjednostek czynnika indukowanego hipoksją są PT2385 oraz PT2399. Związki te są małymi, syntetycznymi cząsteczkami, które w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych z rakiem nerkowokomórkowym wykazały działanie hamujące na wzrost i proliferację komórek nowotworowych (Martínez-Sáez i in., 2017).

- poprzez wzmocnienie interakcji HIF z FIH (*factor inhibiting HIF*)

Możliwym mechanizmem zablokowania aktywności czynnika indukowanego hipoksją jest wzmocnienie jego interakcji z naturalnie występującym w organizmie inhibitorem FIH. Taki mechanizm działania wykazuje Bortezomib wykorzystywany obecnie w leczeniu szpiczaka mnogiego. Innym związkiem o takim działaniu jest YC-1, który w połączeniu z CPT-11 pozwolił uzyskać ponad pięciokrotnie silniejszy efekt przeciwnowotworowy (Zhan i in., 2019).

4. Podsumowanie

By odpowiedzieć sobie na pytanie, czy czynnik indukowany hipoksją jest dobrym celem terapii przeciwnowotworowej należy rozpatrzyć kilka aspektów. Po pierwsze - fizjologiczną rolę pełnioną w organizmie przez HIF. Czynnik indukowany hipoksją jest czynnikiem transkrypcyjnym obecnym u wszystkich obecnie żyjących i zbadanych przedstawicieli królestwa zwierząt. Jego powszechność sugeruje istotną rolę w mechanizmach zapewniających przetrwanie warunków niedoboru tlenu. Hipoksja, chociaż kojarzy się głównie ze stanami patologicznymi, towarzyszy również procesom fizjologicznym, takim jak rozwój embrionalny czy gojenie ran. Zapewnia prawidłową homeostazę organizmu w sytuacjach niebędących bezpośrednim zagrożeniem dla zdrowia: podczas intensywnych ćwiczeń, nurkowania czy wspinaczki górskiej. Celując w czynnik indukowany hipoksją pozbawiamy element ochrony przed niedoborem tlenu nie tylko komórki nowotworowe, ale również te prawidłowo funkcjonujące, co może prowadzić do pojawienia się efektów ubocznych. Kolejnym aspektem jest niska specyficzność niektórych z wymienionych inhibitorów, dotyczy to zwłaszcza inhibitorów wpływających na szlak transdukcji sygnału (np. Temsirolimus, LY294002). Niska specyfika mechanizmu działania danego związku zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia niepożądanych skutków. Wiąże się to również z różnicą w efektach obserwowanych w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych. Związek cechujący się wysoką skutecznością w badaniach na liniach komórkowych może wykazywać w badaniach na organizmach, czy to na modelach zwierzęcych czy w badaniach klinicznych z udziałem ludzi, skutki uboczne o stopniu wykluczającym go z dalszego rozwoju.

Z drugiej strony należy jednak zwrócić uwagę na to, że obecnie stosowane, konwencjonalne metody terapii przeciwnowotworowej również nie są pozbawione wad. Stosowane współcześnie związki często prowadzą do wystąpienia efektów ubocznych wpływając na pogorszenie zdrowia i samopoczucia pacjentów. Wykorzystanie nowych metod aplikacji związków, takich jak formowanie ich w liposomy lub sprzęgania z nanonośnikami, pozwoliłoby na skierowanie danego związku, w tym też inhibitora czynnika indukowanego hipoksją, w konkretny obszar organizmu, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych. Nawet, jeżeli rozwinięcie nowych inhibitorów czynnika indukowanego hipoksją nie pozwoli na zupełne zrezygnowanie z terapii konwencjonalnej to samo zmniejszenie jej dawki byłoby sukcesem, dla którego warto rozpatrywać HIF, jako cel terapii przeciwnowotworowej.

5. Literatura

DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B., 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. Jan;7(1):11-20.

Elstrom R. L., Bauer D. E., Buzzai M., Karnauskas R., Harris M. H., Plas D. R., Zhuang H., Cinalli R. M., Alavi A., Rudin C. M., Thompson C. B., 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res. Jun 1;64(11): 3892-9.

Feng Y., Xiong Y., Qiao T., Li X., Jia L., Han Y., 2018. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. Cancer medicine, 7(12): 6124–6136.

Garcia J. A., 2006 HIFing the Brakes: Therapeutic Opportunities for Treatment of Human Malignancies. Science Signaling, 2006(337), pp. pe25.

Greenberger L. M., Horak I. D., Filpula D., Sapra P., Westergaard M., Frydenlund H.F., 2008. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1α, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. W:Mol Cancer Ther., vol.7:3598–3608.

Jiang B.H., Jiang G., Zheng J.Z., Lu Z., Hunter T., Vogt P.K., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. W:Cell Growth Differ., vol.12:363–369.

Kumar H., Choi D.K., 2015. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway?. Mediators Inflamm. 2015:584758.

Lee Y.M., Kim G.H., Park E.J., Oh T.I., Lee S., Kan S.Y., Kang H., Kim B.M., Kim J.H., Lim J.H., 2019. Thymoquinone Selectively Kills Hypoxic Renal Cancer Cells by Suppressing HIF-1α-Mediated Glycolysis. Int J Mol Sci. Mar 3;20(5).pii:E1092.

Luo W., Semenza G. L., 2011. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. Oncotarget, 2(7): 551–556.

Ma X.M., Blenis J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat Rev Mol Cell Biol. May;10(5):307-318.

Martínez-Sáez O., Gajate Borau P., Alonso-Gordoa T., Molina-Cerrillo J., Grande E., 2017. Targeting HIF-2 α in clear cell renal cell carcinoma: A promising therapeutic strategy. Crit Rev Oncol Hematol. Mar;111:117-123.

Masoud G. N., Li W., 2015. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta pharmaceutica Sinica. B, 5(5), 378–389.

McKeown S. R., 2014. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. The British journal of radiology, 87(1035), 20130676.

Nagaraju G.P., Zakka K.M., Landry J.C., Shaib W.L., Lesinski G.B., El-Rayes B.F., 2019 Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. Int J Cancer. 2019 Sep 15;145(6):1529-1537.

Onnis B., Rapisarda A., Melillo G.. 2009. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. W:J Cell Mol Med., vol.13:2780–2786.

Rankin E. B., Giaccia A. J., 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. Cell death and differentiation, 15(4), 678–685.

Semenza G.L., 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene. 29:625–634.

Semenza G. L., 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell, 148(3): 399–408.

Soni S., Padwad Y. S., 2017. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. Acta Oncol. Apr;56(4):503-515.

Zhang B., Huang X., Wang H., Gou S., 2019 Promoting antitumor efficacy by suppressing hypoxia via nano self-assembly of two irinotecan-based dual drug conjugates having a HIF-1α inhibitor. J Mater Chem B. Sep 11;7(35):5352-5362.

Reprogramming of lipid metabolism in colorectal cancer cell

Liakh Ivan [(1)], Mika Adriana [(1,2)]

[1] Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Gdansk
[2] Department of Environmental Analysis, Faculty of Chemistry, University of Gdansk,
Ivan Liakh: liakh_ivan@mail.ru

Summary
It is known that carcinogenesis is associated with reprograming of cellular catabolic and anabolic metabolism for enhanced energy and biomass synthesis to support cancer cells growth, proliferation and to maintain their transformed state to survive in a difficult microenvironment. Until recently, the role of mitochondrial β-oxidation of fatty acids in various aspects of oncogenesis has not been clearly defined, but recent evidence suggests that key enzymes or regulators of β-oxidation can be promising targets for cancer therapy. The aim of the review is to analyze changes in lipid metabolism in colorectal cancer tissue, not only from the standpoint of lipid profiling, but also changes in the processes of β-oxidation and energy production in cancer cells. A detailed explanation and knowledge of the mechanisms of such metabolic changes in cancer open up great potential for therapeutic actions that can be performed using dietary and pharmacological interventions on lipid metabolism.

Keywords: cancer, lipid metabolism, fatty acid oxidation

Przeprogramowanie metabolizmu lipidów w komórkach raka jelita grubego

Streszczenie
Wiadomo, że nowotworzenie wiąże się z przeprogramowaniem komórkowego metabolizmu katabolicznego i anabolicznego w celu zwiększenia syntezy energii i biomasy dla wsparcia wzrostu, proliferacji komórek rakowych i utrzymania ich stanu transformacji, aby przetrwać w trudnym mikrośrodowisku. Do niedawna rola mitochondrialnej β-oksydacji kwasów tłuszczowych w różnych aspektach onkogenezy nie była jasno zdefiniowana, ale ostatnie dowody sugerują, że kluczowe enzymy lub regulatory β-oksydacji mogą być obiecującymi celami w terapii przeciwnowotworowej. Celem przeglądu jest analiza zmian metabolizmu lipidów w tkance raka jelita grubego, nie tylko z punktu widzenia profilowania lipidów, ale także zmian w procesach β-oksydacji i produkcji energii w komórkach rakowych. Szczegółowe wyjaśnienie i wiedza na temat mechanizmów takich zmian metabolicznych w nowotworze otwierają ogromny potencjał działań terapeutycznych, które można przeprowadzić za pomocą dietetycznych i farmakologicznych interwencji dotyczących metabolizmu lipidów.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, metabolizm lipidów, utlenianie kwasów tłuszczowych

1. Introduction

It is historically known that in cancer cells the control over the cell cycle is changed, therefore they are more sensitive to violations of its critical stages. Development of new innovative cancer treatments is based on the difference in metabolism between cancer and normal cells. Therefore, the mechanisms of action of the first conventional cancer drugs were aimed at universal targets necessary to maintain a normal cell cycle (DNA replication, nucleotide synthesis enzymes, cell cytoskeleton, etc.). However, recently, new cancer drugs acting on specific targets, which are primarily needed for tumor cells to survive or maintain the cell cycle. Such targeted drugs can be monoclonal antibodies, hormone antagonists,

inhibitors of various enzymes, receptors, etc. Since targeted drugs act only on certain tumors that carry targets for these drugs, such treatment requires personalized medicine, that is, careful selection of patients.

2. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer

The Warburg effect is a phenomenon when cancer cells produce energy mainly through very active glycolysis followed by the formation of lactate, despite the presence of oxygen for the complete oxidation of glucose (Sun et al. 2018). Passing to incomplete glucose oxidation, cancer cells protect themselves from reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, and can also actively use glycolytic intermediates for the synthesis of nucleotides, cell membrane lipids and the synthesis of serine and glycine necessary to maintain rapid proliferation (Levine and Puzio-Kuter, 2010). Higher glucose uptake by primary and metastatic colorectal cancer (CRC) tumors and increased intratumoral lactate indicate that most CRC cells exhibit the Warburg metabolic phenotype. In addition, this is evidenced by the activation of numerous genes and proteins, which are important for glycolysis and glucose uptake (Brown et al., 2018).

3. Changes in lipid metabolism

Evidence of the relationship between CRC and changes in lipid metabolism were provided by the studies of the effect of diet lipid composition and blood lipid composition on the risk of this cancer (Rashid et al., 1997; Song et al., 2014). A feature of CRC cells is a high level of lipid droplets which are the site of prostaglandin E2 synthesis stimulating the growth and spread of the tumor (Hagland et al., 2013), in addition, there is evidence of the participation of these inclusions in the development of drug resistance of cancer (Cotte et al., 2018). Moreover, through transforming growth factor beta activation, changes in genes associated with lipid metabolism may contribute to the migration and invasion of the primary tumor (Aguirre-Portolés et al., 2017).

3.1. Changes in fatty acid synthesis

Fatty acids (FAs) in cancer tissue are necessary for the synthesis of cell membranes, post-translational modification of proteins, and the synthesis of triacylglycerols in lipid droplets for energy storage. They can also be used for cell signaling, neutralization of ROS and as an energy source after direct oxidation of FAs (FAO) (Brown et al., 2018). So cancer proliferation requires enhanced *de novo* lipid biogenesis pathways because the use of circulating FAs cannot satisfy the need of cancer cells for lipid metabolites. In contrast to normal cells, the synthesis of FAs in cancer cells occur independently of the presence of circulating lipids (Zaytseva et al., 2015). Butyrate produced by intestinal bacteria also

contributes to lipid biosynthesis by colorectal cancer cells. Oxidation of butyrate reduces glucose dependence and leads to an increase in the level of nucleocytoplasmic acetyl-CoA, a substrate for the synthesis of FAs and histone acetylation (Wellen et al., 2009).

FAs are synthesized in the cytoplasm by FAs synthase (FASN) using malonyl-CoA and citrate, which are generated from acetyl-CoA. The resulting 16-carbon saturated FA - palmitate after desaturation and elongation reactions produces a large amount of FAs. In this case, intermediate metabolites of these processes can have an activating effect on the processes of glycolysis and mitochondrial FAO under conditions of metabolic stress (Zaytseva et al. 2015). Upregulated in CRC tissue Acyl-CoA synthetase (ACSL) enzyme is also associated with carcinogenesis, catalyzing the activation of long chain FAs to acyl-CoA, a process necessary for the synthesis of phospholipids and triglycerides, lipid modification of proteins, as well as FAO (Sánchez-Martínez et al., 2015). In CRC, the synthesis of FAs can be supported by one-carbon metabolism, a process in which amino acids serine and methionine can serve as a donor of carbon atoms (Brown et al., 2018). In addition to significant changes in the composition of FAs in the cancerous tissue of patients with CRC, due to increased (4-10 times) expression of fatty acid elongases, cancer tissue contains much higher levels of saturated and monounsaturated FAs with a very long chain (22-26 carbon atoms) (Pakiet et al., 2019).

3.2. Fatty acid oxidation alterations

While the pathways of glycolysis and fatty acid synthesis are well described, there is still no complete mechanism describing the features of FAO in cancer cells. In recent years, there have been changes in the views on the contribution of mitochondrial β-oxidation of FAs to the metabolic profile of cancer. Studies of the relevance of the FAO pathway in cancer have provided an opportunity to talk about the “lipolytic phenotype” of cancer (Ma et al., 2018).

So for breast cancer, cancer progression is promoted by energy production through mitochondrial β-oxidation of FAs that are released during adipocyte lipolysis and are intensely transferred to cancer cells (Choi et al. 2018). FAO is also of interest because of its involvement in drug resistance through mitochondrial uncoupling, since FAO activity increases in cancer cells in response to treatment with many therapeutic reagents (Ma et al., 2018). Also in CRC, there is a relationship between abnormal oxidation of FAs and abnormal biosynthesis of phospholipids (the most important components of biological membranes), which may be associated with accelerated cell proliferation (Zhang et al., 2017).

The pathway for the oxidation of FAs take place in mitochondria, and can also occur in peroxisomes, as well as in an autophagous way in the cytoplasm (Fillmore et al., 2011). The main difference in the oxidation of FAs in peroxisomes from mitochondria is acyl-CoA oxidase, which instead of $FADH_2$ produces H_2O_2 which is neutralized by catalase. In addition, the α-oxidation necessary for the oxidation of FAs with methyl branches can occur in peroxisomes (Fillmore et al., 2011). Despite the fact that peroxisomal β-oxidation does not directly contribute to energy production, it can play an important role in carcinogenesis, for example, the activation of branched chain fatty acid β-oxidation in peroxisomes may contribute to transformation in prostate cancer (Liu, 2006).

Beta-oxidation is preceded by the conversion of FAs to acyl-CoA using Acyl-CoA synthetase (long chain fatty acyl-CoA ligase). In accordance with the length of the carbon chain of the FAs that they catalyze there are several types of acyl-CoA synthases, of which acyl-CoA synthase with long chain (ACSL) is of interest because the levels of expression of ACSL4 were noticeably higher in breast cancer cells and in cancerous tissues of the liver of patients with hepatocellular carcinoma (Li and Zhang, 2016), another isozyme ACSL1 together with stearoyl-CoA desaturase-1 both increases energy efficiency in CRC cells, and also promotes migration and invasive ability (Aguirre-Portolés et al., 2017).

Further acyl-CoA is transported through the double membrane of mitochondria via carnitine/acylcarnitine translocase (transmembrane transfer) with help of carnitine-palmitoyltransferase-1 (CPT1) (Fillmore et al., 2011). At this stage, FAO activation through overexpression of the CPT1A enzyme can occur (La Vecchia and Sebastián, 2019). FAs are oxidized in the mitochondrial matrix with the participation of four enzymes that sequentially act on acyl-CoA through numerous enzymatic catalytic reactions of dehydrogenation, hydration, dehydrogenation, and thiolysis. Final FAO metabolite - acetyl-CoA enters the tricarboxylic acid cycle to generate NADH and $FADH_2$ which further enter the electron transfer chain to produce ATP (Fillmore et al., 2011). As a result of the oxidation of FAs with an odd number of carbon atoms, not only acetyl-CoA, $FADH_2$ and NADH are formed, but also one propionyl-CoA molecule (Fillmore et al., 2011).

Decrease in glucose consumption and a subsequent decrease in ATP levels may be one of the triggers restructuring of the metabolism in a cancer cell. Low ATP level activate AMP-activated protein kinase (AMPK) which inhibits acetyl CoA-carboxylase-1 (ACC1) and ACC2, and leads to FA synthesis inhibition and, as a result, reduces the consumption of NADPH (Hay, 2016). Also, AMPK simultaneously activates FAO, which leads to the increase of NADPH (by increasing the flow from malate to pyruvate and promoting the

conversion of isocitrate to α-ketoglutarate). Obtained NADPH is used for prevention against increase in intracellular ROS thereby protecting cancer cells (Hay, 2016).

Proteins involved in β-oxidation of FAs are regulated by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Among the transcription factors that regulate the expression of these proteins, the best known are the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the PPARs gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) (Fillmore et al., 2011). Increased expression of PPARs are correlated with poor prognosis in CRC and stimulated cell proliferation in breast cancer (Fernández et al., 2018) (Okumura et al., 2002). The importance of PGC-1α expression is indicated for the development of Renal Cell Carcinoma (LaGory et al., 2015).

4. Current achievements and future prospects

Many substances are considered chemoprophylactic and therapeutic agents for CRC. For example, non-steroidal anti-inflammatory drugs such as Ibuprofen, but their use is limited by a strong influence on other organs (Yan et al., 2016). Aspirin has been shown to be effective in preventing colon cancer associated with high expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH). A cyclooxygenase (COX) inhibitor Sulindac as an effective agent for the prevention of colon cancer with a low level of 15-PGDH (Yan et al., 2016). Also such substances as polyketides and their derivatives used as anti-cancer agents in clinics, but also natural polyketides from red wine and green tea can be used. Changing the diet to increase the intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can inhibit the synthesis of COX-2 derivative from n-6 PUFA - prostaglandin E2, which is involved in carcinogenesis of CRC (Cai et al., 2012). Also the effectiveness of chemotherapy and glucide restrictions caused by the ketogenic diet of stage IV colon cancer patients was shown (Furukawa et al., 2018). Changing diet can affect the levels of end products of peroxidation of PUFAs like malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-nonenal. These are quite toxic products that in small doses can initiate the tumor process, however, in high concentrations they have an inhibitory effect on tumor growth (Cai et al., 2012).

Currently, the main efforts in therapy affecting lipid metabolism are directed both to the synthesis and to oxidation of FAs. One of the CRC phenotypes associated with overexpression by cancer cells of lipid metabolism-related axis Acyl-CoA synthetases/stearoyl-CoA desaturase (ACSLs/SCD) stimulates colon cancer progression. The antidiabetic drug Metformin showed good efficiency in reduction in de novo FA synthesis by decreasing of acetyl-CoA and oxaloacetate in the cytoplasm (Cruz-Gil et al., 2019). In the

phase of clinical trials there are new FASN inhibitors aimed at the synthesis of palmitate (Brown et al., 2018).

The use of FAO inhibitors in medicine is not new, such drugs are successfully used for the treatment of heart diseases (CPT1 inhibitors) (La Vecchia and Sebastián, 2019) or for the treatment of angina (3-ketoacylthiolase inhibitors). To suppress the oxidation of FAs in cancer cells, a FAO inhibitor Trimetazidine was used, also the effectiveness of the malonyl-CoA decarboxylase inhibitor was shown for the human breast cancers (Ma et al., 2018). Based on the fact that FAO is involved in supporting cellular DNA synthesis in the endothelium, FAO blockade can prevent vascular growth and tumor angiogenesis by targeting tumor endothelial cells (Ma et al., 2018).

On the other hand, studies are underway regarding the activation of FAO in cancer cells. Activation of FAO is achieved by PPAR activators, AMPK activators, or ACC1 inhibitors, as well as exposure to high concentrations of carnitine and FAs (Carracedo et al., 2013), while compounds targeting ACC2 can instead stimulate tumor growth by stimulating FAO (Corbet and Feron, 2017).

A potential target is the transport of FAs from circulation to cancer cells, for example FA carrier inhibitor (BMS 309403), FA binding protein (FABP4)(Choi et al., 2018) and FA transporter (FAT/CD36) (Corbet and Feron, 2017). Promising targets in CRC therapy are ceramidase and sphingosine kinase inhibitors, which also play an important role in cancerogenesis (Camp et al., 2017). In addition, the target may be allosteric ratios of the $NADH/NAD^+$ level and the acetyl-CoA/CoA level, the increase of which leads to the inhibition of β-oxidation (Fillmore et al., 2011).

5. Conclusions

Recent research of FAO in the context of cancer metabolism has opened up new and exciting therapeutic possibilities. Approaches to combination therapy directed at the catabolism of FAs with glycolysis or glutaminolysis can be a more effective strategy for cancer treatment, however, targeting individual enzymes or pathways should be combined with chemotherapy or other targeting agents for better results.

Founding

This research was funded by National Science Centre of Poland, grant number 2016/22/E/NZ4/00665

7. References

Aguirre-Portolés C, Fernández L, Ramírez de Molina A (2017) Precision Nutrition for Targeting Lipid Metabolism in Colorectal Cancer. Nutrients 9:1076 .

Brown RE, Short SP, Williams CS (2018) Colorectal Cancer and Metabolism. Curr Colorectal Cancer Rep 14:226–241.

Cai F, Dupertuis YM, Pichard C (2012) Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 15:99–106.

Choi J, Cha YJ, Koo JS (2018) Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. Prog Lipid Res 69:11–20.

Corbet C, Feron O (2017) Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 20:254–260.

Cotte AK, Aires V, Fredon M, Limagne E, Derangère V, Thibaudin M, Humblin E, Scagliarini A, De Barros JPP, Hillon P, Ghiringhelli F, Delmas D (2018) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. Nat Commun 9: 322.

Cruz-Gil S, Sánchez-Martínez R, Wagner-Reguero S, Stange D, Schölch S, Pape K, de Molina AR (2019) A more physiological approach to lipid metabolism alterations in cancer: CRC-like organoids assessment. PLoS One 14: e0219944.

Fernández LP, Ramos-Ruiz R, Herranz J, Martín-Hernández R, Vargas T, Mendiola M, Guerra L, Reglero G, Feliu J, de Molina AR (2018) The transcriptional and mutational landscapes of lipid metabolism-related genes in colon cancer. Oncotarget 9:5919-5930.

Fillmore N, Abo Alrob O, Lopaschuk GD (2011) Fatty Acid beta-Oxidation 1-10.

Furukawa K, Shigematus K, Iwase Y, Mikami W, Hoshi H, Nishiyama T, Ohtuka A, Abe H (2018) Clinical effects of one year of chemotherapy with a modified medium-chain triglyceride ketogenic diet on the recurrence of stage IV colon cancer. J Clin Oncol 36:e15709–e15709.

Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Søreide K (2013) Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. Dig Surg 30:12–25.

Hay N (2016) Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? Nat Rev Cancer 16:635–649.

La Vecchia S, Sebastián C (2019) Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. Semin Cell Dev Biol 9:1–8.

LaGory EL, Wu C, Taniguchi CM, Ding C-KC, Chi J-T, von Eyben R, Scott DA, Richardson AD, Giaccia AJ (2015) Suppression of PGC-1α Is Critical for Reprogramming Oxidative Metabolism in Renal Cell Carcinoma. Cell Rep 12:116–127.

Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010) The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Science 330:1340–1344.

Li Z, Zhang H (2016) Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. Cell Mol Life Sci 73:377–392.

Liu Y (2006) Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis 9:230–234.

Ma Y, Temkin SM, Hawkridge AM, Guo C, Wang W, Wang XY, Fang X (2018) Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. Cancer Lett. 435:92–100.

Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, Kojima T, Maruyama T, Jamali M, Cooper DR, Yasuda K (2002) Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: Reciprocal involvement of PKC-α and PPAR expression. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 1592:107–116.

Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A (2019) Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. Lipids Health Dis 18:29.

Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. Am J Pathol 150:201–208.

Sánchez-Martínez R, Cruz-Gil S, de Cedrón MG, Álvarez-Fernández M, Vargas T, Molina S, García B, Herranz J, Moreno-Rubio J, Reglero G, Pérez-Moreno M, Feliu J, Malumbres M, de Molina AR (2015) A link between lipid metabolism and epithelial-mesenchymal transition provides a target for colon cancer therapy. Oncotarget 6:38719–38736.

Song M, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Hu FB, Mozaffarian D, Ma J, Willett WC, Giovannucci EL, Wu K (2014) Dietary intake of fish, ω-3 and ω-6 fatty acids and risk of colorectal cancer: A prospective study in U.S. men and women. Int J Cancer 135:2413–2423.

Sun L, Suo C, Li S, Zhang H, Gao P (2018) Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer 1870:51–66.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui T V., Cross JR, Thompson CB (2009) ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. Science 324:1076–1080.

Yan G, Li L, Zhu B, Li Y (2016) Lipidome in colorectal cancer. Oncotarget 7:33429–33439.

Zaytseva YY, Harris JW, Mitov MI, Kim JT, Allan Butterfield D, Lee EY, Weiss HL, Gao T, Mark Evers B (2015) Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration. Oncotarget 6:18891–18904.

Zhang F, Zhang Y, Zhao W, Deng K, Wang Z, Yang C, Ma L, Openkova MS, Hou Y, Li K (2017) Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. Oncotarget 8:35460–35472.

Udział tkanki tłuszczowej w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów

Łączna Małgorzata [(1)], Kopytko Patrycja [(1)], Piotrowska Katarzyna [(1)]

[1] Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Małgorzata Łączna: mlubecka90@wp.pl

Streczczenie

Wiele lat temu przyjęty model patogenezy reumatoidalnego zapalenia stawów zakładał, że obecne w płynie stawowym chorych czynniki o charakterze prozapalnym produkowane są jedynie przez synowiocyty i chondrocyty. Wyniki badań z ostatnich paru lat wskazują jednak, że model ten jest niewłaściwy. Źródłem cytokin prozapalnych i czynników wzrostu może być także tkanka tłuszczowa, której nieprawidłowy obraz skorelowany został z występowaniem lokalnej odpowiedzi zapalnej, co potwierdza jej patologiczną aktywność w obrębie stawów. Co więcej, nieprawidłowe funkcjonowanie komórek tłuszczowych znacząco wpływa na metabolizm zarówno komórek chrząstki jak i tkanki podchrzęstnej wpływając tym samym na postęp choroby. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia, należy uznać obecność kolejnego po błonie maziowej i chrząstce miejsca, odpowiedzialnego za wystąpienie i podtrzymanie chronicznego stanu zapalnego, będącego bezpośrednią przyczyną pojawienia się objawów chorobowych charakterystycznych dla reumatoidalnego zapalenia stawów.

Słowa kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, tkanka tłuszczowa, zapalenie tkanki tłuszczowej, patogeneza

Role of adipose tissue in pathogenesis of rheumatoid arthritis

Summary
For many years, the accepted model of rheumatoid arthritis pathogenesis assumed that pro-inflammatory factors present in the synovial fluid of the patients are produced only by synoviocytes and chondrocytes. However, new evidences indicate that this model is incorrect. The important source of pro-inflammatory cytokines and growth factors may also be adipose tissue, whose abnormal presentation has been correlated with the occurrence of a local inflammatory response. These findings confirm pathological activity of adipose tissue within the joints. Moreover, the pathogenic activity of adipose tissue significantly affects the metabolism of both the cartilage and subchondral osseous tissue, thereby affecting the progression of the disease. Considering this findings, it is necessary to recognize the presence of another site of inflammation next to synovium and cartilage, responsible for the initiation and maintenance of chronic inflammation, which is the main characteristic of rheumatoid arthritis.

Keywords: rheumatoid arthritis, adipose tissue, inflammation of adipose tissue, pathogenesis

1. Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), ang.: rheumatoid arthritis, łac.: *arthritis rheumatoidea, polyarthritis chronica evolutiva,* nazywane w przeszłości gośćcem przewlekle postępującym należy do jednej z najczęściej występujących chorób autoimmunologicznych tkanki łącznej o charakterze zapalnym (Puszczewicz, 2011). Szacuje się, że na RZS choruje 0,5-1% społeczeństwa, przy czym aż 75% tej grupy stanowią kobiety (Zimmermann-Górska, 2014). Powszechnie przyjęty model choroby opisuje reumatoidalne zapalenie stawów, jako przewlekłe, nieswoiste zapalenie błony maziowej stawów z współwystępowaniem nacieków złożonych z aktywowanych komórek, głównie limfocytów T, plazmocytów i makrofagów, które uczestniczą w procesach immunologicznych prowadzących do powstania stanu

zapalnego. Chroniczny stan zapalny zapoczątkowany i rozwijający się w błonie maziowej prowadzi do degradacji chrząstki stawowej i nasad kości, a także do występowania zmian pozastawowych, jak i powikłań o charakterze układowym. Dalszy postęp choroby prowadzi do zaburzeń wydolności funkcjonalnej, niepełnosprawności znacznego stopnia i przedwczesnej śmierci chorych (Zimmermann-Górska, 2008; Puszczewicz, 2011). Model ten, choć w swych pierwotnych założeniach jak najbardziej poprawny, w świetle wyników badań uzyskanych w ostatnich latach okazał się niepełny. Wiele doniesień wskazuje na to, że oprócz błony maziowej i chrząstki, uznawanych dotychczas za jedyne źródła cytokin prozapalnych i czynników wzrostu, także stawowa tkanka tłuszczowa odgrywa znaczącą rolę w zapoczątkowaniu i podtrzymaniu stanu zapalnego toczącego się w stawach chorych na RZS (Kontny i in., 2011).

2. Źródła chronicznego stanu zapalnego w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów

Etiopatogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów wciąż nie jest w pełni poznana. Wiadomo, że do wystąpienia chronicznego procesu zapalnego mogą przyczyniać się zarówno czynniki środowiskowe, zakażenia o podłożu bakteryjnym lub wirusowym jak i zaburzenia immunologiczne oraz predyspozycje genetyczne (Alamanos i in., 2005). Mimo tego, że wciąż nie potrafimy dokładnie wyjaśnić, co jest pierwotnym czynnikiem indukującym stan chorobowy, następstwa działania tego czynnika etiologicznego (bądź czynników) są już doskonale poznane (Jura-Półtorak i in., 2001).

Wiele lat badań nad RZS pozwala ponad wszelką wątpliwość stwierdzić, że stawowa błona maziowa chorych na RZS jest źródłem aktywowanych limfocytów T, które stymulują syntezę szeregu cytokin prozapalnych takich jak m.in. czynnik martwicy nowotworu α (TNFα), interleukina 1 (IL-1) interleukina 2 (IL-2), interferon γ (IFN-γ) oraz metaloproteinaz macierzy (Kunz i in., 2009; Goldring, 2003). Aktywowane limfocyty T inicjują także proliferację limfocytów B, synowiocytów oraz fibroblastów, w wyniku czego zwiększa się wydzielanie przeciwciał (Kontny i in., 2006; Wisłowska i in., 2006). Ponadto, w błonie maziowej, płynie stawowym i surowicy krwi chorych na RZS wykrywa się inne mediatory stanu zapalnego takie jak m. in. interleukinę 1β (IL-1β), interleukinę 6 (IL-6), interleukinę 15 (IL-15) interleukinę 17 (IL-17) i interleukinę 23 (IL-23). Czynniki te, stanowiąc grupę cytokin prozapalnych znacząco wpływają na stymulację procesów prowadzących do degradacji chrząstki (Sudoł-Szopińska i in., 2013; Toussirot i in., 2008).

Kolejną tkanką, którą obejmuje toczący się stan zapalny w przebiegu RZS okazuje się być szpik kostny. Szpik kostny, uważany przez wiele lat jedynie za narząd krwiotwórczy oraz centralny narząd limfatyczny, okazał się także spełniać funkcje wtórnego narządu

limfatycznego gdzie może zostać zainicjowana i podtrzymana odpowiedź immunologiczna organizmu. Szpik kostny chorych na RZS znacznie różni się od tkanki osób zdrowych zarówno pod względem obrazowym, co widoczne jest w badaniach za pomocą rezonansu magnetycznego, jako obrzęk szpiku, jak również pod względem zawartości cytokin prozapalnych czy wielkością populacji poszczególnych komórek (Kurowska i in., 2010; Tomita i in., 1994).

Coraz więcej dowodów wskazuje na fakt, iż tkanka tłuszczowa obok błony maziowej i szpiku kostnego jest kolejnym źródłem chronicznego stanu zapalnego obserwowanego w RZS. Tkanka tłuszczowa jest aktywnym endokrynnie organem, który w zależności od jej embrionalnego pochodzenia i umiejscowienia w organizmie, pełni odmienne funkcje. Poza utrzymaniem energetycznej homeostazy organizmu, odżywianiem i udziale w procesie termogenezy, tkanka tłuszczowa jest mocno zaangażowana w procesy związane ze wzrostem masy kostnej, a także modulacją odpowiedzi immunologicznej (Schäffler i in., 2010; Galic i in., 2010). Modelem tkanki tłuszczowej wykorzystywanym do badań nad RZS jest tkanka tłuszczowa ciała Hoffy (ang.: Hoffa body, infrapatellar fat pad), nazywana inaczej tkanką tłuszczową podrzepkową. W ciele Hoffy w przebiegu RZS wykryto obecność licznych nacieków złożonych z komórek odpornościowych takich jak m.in. monocyty/makrofagi, bazofile, eozynofile, neutrofile i limfocyty. Komórki naciekające tkankę produkują i wydzielają liczne cytokiny prozapalne oraz składowe układu dopełniacza. Poza naciekami złożonymi z komórek immunologicznych, ciało Hoffy samo w sobie wykazuje czynność wydzielniczą, produkując czynniki wzrostu i klasyczne adipokiny takie jak leptyna, adiponektyna i rezystyna, będące produktem metabolizmu adipocytów. Wszystkie te czynniki znacząco wpływają na czynność błony maziowej i chrząstki, powodując zaostrzenie się i podtrzymanie stanu zapalnego toczącego się w stawach (Neumann i in., 2011)

3. Reumatoidalna tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa jest rodzajem wyspecjalizowanej tkanki łącznej będącą aktywnym organem endokrynnym, heterogenicznym w kontekście pochodzenia embrionalnego, budowy, rozmieszczenia w ciele i funkcji, jakie spełnia. Podstawowy podział tkanki tłuszczowej dzieli ją na tkankę tłuszczową białą (ang.: white adipose tissue, WAT) i tkankę tłuszczową brunatną. Tkanka tłuszczowa brunatna pojawia się w ostatnich dwóch miesiącach życia płodowego człowieka i dominuje w rozwiniętej postaci w okresie niemowlęcym. Jej podstawową funkcją jest indukcja termogenezy. Dzięki obecności białka- termogeniny (UCP1) występującej po wewnętrznej stronie mitochondriów tkanki tłuszczowej, brązowe adipocyty przekształcają energię bezpośrednio w ciepło. Wraz z rozwojem organizmu tkanka

brunatna powoli zanika, a jej miejsce zajmuje tkanka tłuszczowa biała. Tkanka brunatna obecna jest u osobników dorosłych jedynie w okolicy szyi, dużych tętnic, nerek i śródpiersia.

Tkanka tłuszczowa biała (czasem nazywana żółtą) jest luźną tkanką łączną charakteryzującą się małą masą istoty międzykomórkowej, której większość wnętrza komórek wypełnia jedna, duża kropla tłuszczu potoczona cienką warstwą cytoplazmy. Główną funkcją WAT jest gospodarka tłuszczowa: magazynowanie, wytwarzanie (lipogeneza) i rozkładanie (lipoliza) tłuszczu. Tkanka tłuszczowa biała może być zlokalizowana podskórnie (podskórna tkanka tłuszczowa, ang.: subcutaneous adipose tissue, ScAT) bądź wewnątrzstawowo (stawowa tkanka tłuszczowa ang.: articular adipose tissue, AAT). W kontekście badań nad RZS to właśnie tkanka tłuszczowa wewnątrzstawowa jest podstawowym obiektem zainteresowania naukowców, ponieważ sąsiaduje ona bezpośrednio z błoną maziową i chrząstką (Sanchez i in., 2005). Głównym modelem AAT wykorzystywanym do badań nad rolą tkanki tłuszczowej w przebiegu RZS jest ciało tłuszczowe Hoffy zlokalizowane w stawie kolanowym (Jacobson i in., 1997). Ciało Hoffy jest jedną z czterech poduszeczek tłuszczowych umiejscowionych w stawie kolanowym. Anatomicznie ciało Hoffy znajduje się między błoną włóknistą torebki stawowej utworzonej przez ścięgno mięśnia czworogłowego a błoną maziową (Ozkur i in., 2005; Patel i in., 1988). Fizjologicznie, AAT/WAT poza komórkami tłuszczowymi zawiera również inne typy komórek takie jak m.in. fibroblasty, komórki zrębowe naczyń, mezenchymalne komórki pnia, a także naciekające makrofagi, przy czym stopień nacieku makrofagów zależy od stopnia otyłości. W stanach patologii, obraz nacieków zmienia się i AAT/WAT może zawierać także komórki NK (ang.: natural killers), limfocyty T i B i komórki tuczne. Dotychczas wykazano, że WAT syntetyzuje kilkadziesiąt różnych, aktywnych biologicznie czynników należących do grupy adipokin (również nazywane adipocytokinami). Do tej licznej grupy zalicza się m.in. interleukiny: IL-1, IL-6, IL-8, inne cytokiny prozapalne: TNFα, MIF-czynnik zahamowania migracji makrofagów, mediatory zapalenia: CRP-białko C-reaktywne, SAA-amyloid surowicy, prostaglandynę E2, tlenek azotu, różne chemokiny (np. MCP1), składowe układu dołeniacza, czynniki wzrostu: VEGF, TGF-β, FGF), cytokiny przeciwzapalne: IL10, IL-1Ra, liczne enzymy wraz z inhibitorami tych enzymów, hormony steroidowe, oraz specyficzne dla WAT tzw. klasyczne adipokiny: m. in. leptynę, adiponektynę i wisfatynę (Clockaerts i in., 2010; Sudoł-Szopińska i in., 2013).

Ciało Hoffy wydzielając olbrzymią ilość aktywnych biologicznie związków do płynu stawowego wpływa na metabolizm sąsiadujących tkanek, czyli błony maziowej i chrząstki. Uważa się, że cytokiny i czynniki wzrostu wydzielane przez ciało Hoffy modulują

metabolizm chondrocytów indukując wytwarzanie metaloproteinaz macierzy komórkowej (MMP). MMP mają zdolność enzymatycznego degradowania wszystkich składowych tkanki łącznej, tym samym powodując degradację tkanek budujących staw (Ushiyama i in., 2003). Adipokiny wydzielane lokalnie przez ciało Hoffy także wykazują działanie prozapalne. W badaniach na myszach wykazano, że rezystywna podana myszom dostawowo wywołała objawy zapalenia stawów. Rezystyna wydzielana jest także w przypadkach urazu stawu kolanowego, a w odpowiedzi na jej działanie zapoczątkowana zostaje produkcja cytokin prozapalnych przy jednoczesnej utracie proteoglikanów chrząstki, co destabilizuje jej strukturę (Clockaerts i in., 2010). Adiponektyna początkowo uznawana za związek wpływający pozytywnie na organizm ludzki, zapobiegający występowaniu miażdżycy i otyłości, z czasem została opisana także jako czynnik wykazujący działanie prozapalne. Adiponektyna jest w stanie wpływać na metabolizm synowiocytów o fenotypie fibroblastów (ang.: fibroblast-like synoviocytes) będących składową patologicznej błony maziowej oraz chondrocytów, indukując syntezę IL-6 i MMP-1, dla których zarówno FLS jak i chondrocyty posiadają odpowiednie receptory (Sudoł-Szopińska i in., 2013). Kolejną adipocytokiną wydzielaną przez ciało Hoffy i biorącą aktywny udział w podtrzymaniu stanu zapalnego w stawie kolanowym jest leptyna. Z uwagi na fakt, że leptyna wykazuje działanie dwukierunkowe: pro- i przeciwzapalne, przez długi czas była stosowana, jako czynnik modulujący produkcję proteoglikanów i czynników wzrostu. Podawano ją dostawowo w nadziei na poprawę struktury i funkcjonalności stawów. Niestety, badania z ostatnich lat ponad wszelką wątpliwość udowodniły silne działanie prozapalne leptyny i jej niekorzystny wpływ na funkcjonowanie stawów. Działanie to polega przede wszystkim na stymulacji syntezy klasycznej cytokiny prozapalnej: IL-1β, jak również na zwiększeniu efektów działania innych cytokin o charakterze prozapalnym (Kontny i in., 2011). Ponadto wykazano, że leptyna jest w stanie indukować ekspresję MMP w chrząstce stawowej, które jak już wspomniano wcześniej mają zdolność enzymatycznego degradowania wszystkich składowych tkanki łącznej. Adipocytokina ta, jest także odpowiedzialna za aktywację komórek immunologicznych takich jak makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne, czy komórki NK, co zwiększa ich zdolność do naciekania na tkanki stawu. U pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów zaobserwowano znaczny wzrost stężenia leptyny w płynie stawowym stawu kolanowego, co korelowało z progresją zmian destrukcyjnych. Z kolei w badaniach na zwierzętach stwierdzono, że leptyna powoduje zmianę metabolizmu chondrocytów, wpływając niezwykle silnie na ich funkcje anaboliczne, jednocześnie indukując proliferację osteoblastów, syntezę kolagenu i mineralizację kości. (Dumond i in.,

2003; Clockaerts i in., 2010). Co więcej, leptyna wydzielana jest nie tylko przez stawową tkankę tłuszczową ale także przez FLS i chondrocyty, zaś adiponektyna przez FLS i osteoblasty. Fakt ten jest dowodem na istnienie skomplikowanej, wzajemnie się stymulującej sieci immunologicznej, którą tworzą razem błona maziowa, chrząstka i stawowa tkanka tłuszczowa.

4. Podsumowanie

Pomimo wielu dekad badań nad tym schorzeniem temat patogenezy reumatoidalnego zapalenia stawów wciąż pozostawia wiele niejasności. Pierwotnie przyjęty model, zakładający, że jedynym źródłem stanu zapalnego jest błona maziowa i chrząstka stawowa, okazał się błędny. Dopiero kompleksowe zbadanie wszystkich tkanek tworzących zarówno staw jak i kość pozawala na lepsze zrozumienie, co może być pierwotnym źródłem toczącego się stanu zapalnego, a także, dlaczego stan ten jest podtrzymywany. Coraz więcej dowodów wskazuje na fakt, że istnieje szereg powiązań pomiędzy procesami patologicznymi zachodzącymi w błonie maziowej, szpiku kostnym, chrząstce i stawowej tkance tłuszczowej. Choć wciąż nie można określić, co jest pierwotnym źródłem stanu zapalnego w przebiegu RZS, udowodnienie istnienia sieci cytokinowej prowadzącej do destrukcji stawu i powikłań pozastawowych, w którą zaangażowane są wszystkie tkanki stawu jest milowym krokiem na przód w kierunku pełnego wyjaśnienia patogenezy RZS.

5. Literatura

Alamanos Y., Drosos A.A., 2005. Epidemiology of adult rheumatoid artritis. Autoimmunity Reviews, 4: 130-136.

Clockaerts S., Bastiaansen-Jenniskens YM., Runhaar J., Van Osch GJVM., Van Offel JF., Verhaar JAN., De Clerck LS., Somville J., 2010. The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review. Osteoarthritis Cartilage 18: 876–882.

Dumond H., Presle N., Terlain B., Mainard D., Loeuille D., Netter P., Pottie P., 2003: Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. Arthritis Rheum 48: 3118–3129.

Galic S., Oakhill JS., Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. M ol Cell Endocrinol 2010 ; 316 : 129 – 39 .

Goldring S.R, 2003. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. Rheumatology: 42 (2):11–16.

Jacobson JA., Lenchik L., Ruhoy MK., Schweitzer ME., Resnick D., 1997. MR imaging of the infrapatellar fat pad of Hoffa. Radiographic 17: 675–691.

Jura-Półtorak A., Olczyk K., 2001. Aktualne poglądy na etiopatogenezę reumatoidalnego zapalenia stawów. Annales Academiae Medicae Silesiensis, 65: 51-57.

Kontny E., Maśliński W., 2006. Limfocyty B – funkcje i udział w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Reumatologia 44 (3): 150–161.

Kontny E., Plebanczyk M., Lisowska B., Olszewska M., Maldyk P., Maslinski W., 2011. Comparison of rheumatoid articular adipose and synovial tissue reactivity to proinflammatory stimuli: contribution to adipocytokine network.Ann Rheum Dis 71:262–267. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200123.

Kunz M., Ibrahim S.M., 2009, Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. Mediators Infl amm. 979258: 1–20.

Kurowska W., Kuca-Warnawin E., Maśliński W. 2010. Szpik kostny – funkcje fizjologiczne i udział w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Reumatologia 48: 247–256.

Neumann E., Frommer KW., Vasile M., Müller-Ladner U., 2011. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? Arthritis Rheum 2011; 63: 1159– 69.

Ozkur A., Adaletli I., Sirikci A., Kervancioglu R., Bayram M., 2005. Hoffa's recess in the infrapatellar fat pad of the knee on MR imaging. Surg Radiol Anat 27: 61–63.

Patel SJ., Kaplan PA., Dussault RG., Kahler DM., 1988. Anatomy and clinical significance of the horizontal cleft in the infrapatellar fat pad of the knee: MR imaging. AJR Am J Roentgenol 170: 1551–1555.

Puszczewicz M., 2011. Wielka Interna. Reumatologia. Tom 9: 78-88.

Sanchez C., Deberg MA., Piccardi N., Msika P., Reginster JY., Henrotin YE., 2005. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 13: 988–997.

Schäffler A., Schölmerich J., 2010. Innate immunity and adipose tissue biology. Trends Immunol: 31 : 228 – 35.

Sudoł-Szopińska I., Kontny E., Maśliński W., Prochorec-Sobieszek M., Kwiatkowska B., Zaniewicz-Kaniewska K., Warczyńska A., 2012. The pathogenesis of rheumatoid arthitis in radiological studies. Part I: Formation of inflammatory infiltrates within the synovial membrane. Journal of Ultrasonography 12: 202-213**.**

Sudoł-Szopińska I., Kontny E., Zaniewicz-Kaniewska K., Prohorec-Sobieszek M., Saied F., & Maśliński W., 2013. Role of inflammatory factors and adipose tissue in pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Part I: Rheumatoid adipose tissue. Journal of Ultrasonography, 13(53), 192–201.

Tomita T., Kashiwagi N., Shimaoka Y., Ikawa T., Tanabe M., Nakagawa S., Kawamura S., Denno K., Owaki H., Ochi T. 1994. Phenotypic characteristics of bone marrow cells in patients with rheumatoid arthritis. The Journal of Rheumatology 21: 1608-1614).

Toussirot E., Roudier J., 2008. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 22 (5): 883–896.

Ushiyama T., Chano T., Inoue K., Matsusue Y., 2003. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. Ann Rheum Dis 62: 108–112.

Wisłowska M., 2006. Spojrzenie na reumatoidalne zapalenie stawów w XXI wieku. Probl. Lek. 45 (2): 43–45.

Zimmermann-Górska I., 2008. Reumatologia kliniczna, Tom 1: 134-136.

Zimmermann-Górska I., 2014. Postępy Reumatologii Klinicznej: 43-45.

Postrzeganie jakości certyfikowanych produktów spożywczych przez konsumenta

Kępczyńska Izabela [(1)], Młoda-Brylewska Klaudia [(2)]

[1] SKN Qualitas, Instytut Nauk o Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
[2] SKN Qualitas, Instytut Nauk o Jakości, Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
Klaudia Młoda-Brylewska: klaudia.mloda-brylewska@ue.poznan.pl

Streszczenie
Produkty z napisem "bio" czy "eko" coraz częściej pojawiają się na sklepowych półkach. Konsumenci chcą spożywać zdrowe posiłki, bez konserwantów, sztucznych barwników i innych zbędnych dodatków. W artykule zaprezentowano wyniki badań kwestionariuszowych, których celem było porównanie opinii konsumentów na temat produktów określanych mianem „bio", z produktami marki narodowej i marki własnej. Zebrane dane pozwoliły na zdefiniowanie preferencji konsumentów w zakresie wyboru certyfikowanych produktów spożywczych oraz analizę oceny poszczególnych grup produktów na podstawie wybranych parametrów, takich jak: cena, jakość, atrakcyjność i chęć zakupu.

Słowa kluczowe: produkty bio, zdrowa żywność, certyfikat ekologiczny

Consumer perception of the quality of certified food products

Summary
Products with the words "bio" or "eco" are increasingly appearing on store shelves. Consumers want to eat healthy meals, without preservatives, artificial colors and other unnecessary additives. The article presents the results of research aimed at comparing, on the basis of consumer research, products referred to as "bio" with national and private label products. The collected data allowed defining consumer preferences regarding the selection of certified food products and analysis of the assessment of individual product groups based on selected parameters such as price, quality, attractiveness and willingness to buy.

Key words: bio products, healthy food, ecological certificate

1. Wstęp

Definicja „jakości" zmieniała się wraz z upływem czasu i nawet dzisiaj istnieje pewna rozbieżność w jej opisie. Wspólnym elementem różnych definicji biznesowych jest to, że jakość produktu lub usługi odnosi się do postrzegania stopnia, w jakim produkt lub usługa spełnia oczekiwania klienta. Jakość nie ma określonego znaczenia, chyba że jest związana z określoną funkcją i / lub przedmiotem (Boone i in., 2006). W biznesie, inżynierii i produkcji jakość ma pragmatyczną interpretację jako nie-niższość lub wyższość czegoś. Jakość jest, zatem atrybutem percepcyjnym, warunkowym, lecz nieco subiektywnym i może być różnie rozumiana przez różnych ludzi (Nanda, 2016). Konsumenci mogą skoncentrować się, na jakości specyfikacji produktu bądź usługi lub na porównaniu z konkurencją na rynku. Natomiast producenci mają możliwość pomiaru jakości jako poziomu zgodności lub stopnia, w jakim produkt lub usługa spełnia wymagania (Gitlow, 2010).

Według Ustawy z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, żywność to każda substancja spożywana w celu zapewnienia wsparcia żywieniowego dla organizmu (Dz.U.2019.0.1252). Żywność jest zwykle pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego i zawiera niezbędne składniki odżywcze takie jak: węglowodany, tłuszcze, białka, witaminy lub minerały (Soroka, 2002). Natomiast certyfikowane, ekologiczne produkty powinny być wyprodukowane przy użyciu metod gwarantujących przestrzeganie określonych w Ustawie zasad produkcji ekologicznej na wszystkich etapach produkcji i użytkowania przez konsumenta (www.ncez.pl). Podstawowe zasady do spełnienia przez producenta żywności ekologicznej zostały szczegółowo określone w Rozporządzeniu Rady (WE) NR 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych. Spośród wielu obostrzeń, wytwórca jest zobowiązany m.in. do:

- ograniczenia stosowania syntetycznych dodatków do żywności, konserwantów i składników wpływających na jakość sensoryczną produktów,
- niestosowania metod i substancji, które mogą wprowadzić w błąd nabywcę, w kwestii natury danego towaru,
- niestosowania GMO i promieniowania jonizującego,
- przygotowywania i pakowania certyfikowanej żywności ekologicznej w innym czasie i miejscu niż żywność konwencjonalna, pochodząca od tego samego producenta,
- oznaczenie certyfikowanej żywności logiem rolnictwa ekologicznego (euroliść).

Rys. 1. Logo rolnictwa ekologicznego (www.ec.europa.eu)

Reasumując żywność może być oznaczona, jako ekologiczna, tylko wtedy, gdy wszystkie lub niemal wszystkie (minimum 95 % udziału masowego) składniki pochodzą z ekologicznych upraw i gospodarstw. Z badania agencji badawczej Nielsen na temat rynku żywności wynika, że coraz więcej Polaków, jest skłonna zapłacić więcej za produkt, wiedząc, iż nie posiada on sztucznych składników i dodatków. Ponad 60 % ankietowanych deklaruje dokładne czytanie informacji zawartych na etykietach (Nielsen, 2019). W efekcie Polacy coraz częściej sięgają po żywność z symbolem listka na zielonym tle. Z kolei według raportu agencji marketingowej IMAS „Żywność ekologiczna w Polsce 2017" krajowy rynek

rolnictwa ekologicznego rośnie średnio o 10–20 % w skali roku, a jego wartość szacuje się na 1,1 mld zł, co stanowi 1-3 % udziału w całym rynku żywnościowym w Polsce. Dla porównania udział sprzedaży żywności certyfikowanej w Niemczech wynosi 10 %, a w Danii ponad 20 % (www.imas.pl). Jednak jak wynika z danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, wielkość powierzchni upraw ekologicznych w Polsce szacuje się na około 500 tys. Hektarów, a ich wielkość systematycznie maleje. W efekcie w sklepach w Polsce można spotkać niemal wyłącznie produkty ekologiczne, które zostały wyprodukowane w innych krajach Unii Europejskiej (www.wprost.pl).

2. Rynek wybranych opakowań produktów spożywczych

Sokiem bezpośrednim NFC (Not From Concentrate) nazywamy naturalny sok owocowy pozyskany ze zdrowych, świeżych lub mrożonych owoców, posiadający naturalny, typowy dla tych owoców kolor, smaki aromat. Dozwolone jest wprowadzenie do takiego soku naturalny aromat, miazgę lub przecier owocowy otrzymany metodami fizycznymi. Dodatkowo soki te można wzbogacić o składniki mineralne, witaminy oraz sok z cytryn i limonek, których szczegółową ilość określają rozporządzenia Unii Europejskiej (WE1925/2006 i WE1333/2008) (www.pfiow.pl).

Szacuje się że rynek soków i nektarów w 2017 roku wynosił 820 mln litrów wykazując 2,5 % wzrost w stosunku do 2016 roku. Wzrost spożycia soków nastąpił o 4,8%, w przypadku nektarów natomiast wystąpił spadek o 2,2%. Spożycie soków wynosiło w ten sposób 14,8 l na osobę na rok (co daje ok. 40 ml na osobę na dzień). Warto przyjrzeć się preferencjom smakowym Polaków, którzy w 2017 roku najczęściej sięgali po soki i nektary jabłkowe (27,2%), pomarańczowe (24,7%), warzywne (w tym marchwiowe i pomidorowe) (14%), wieloowocowe (12,7%) oraz grejpfrutowe (6,4%) (www.pwc.pl)

Herbatnikiem nazywamy pieczony produkt konsumpcyjny, posiadający formę małych ciasteczek na bazie mąki, tłuszczu, środków spulchniających i czasami cukru (www.pwc.pl). Ciastka są jedną z piętnastu największych kategorii na polskim rynku FMCG. Zgodnie z wynikami raportu PwC w 2015 roku Polacy wydali niemal 3 mld złotych na konsumpcję około 145 mln kilogramów ciastek. Największą grupę sprzedawaną w sklepach detalicznych stanowią produkty markowe - 68 mln kilogramów. Marki własne niewiele ustępują produktom markowym - ich konsumpcja wynosi ok. 64 mln kilogramów. Pozostałe kategorie łącznie wynoszą mniej niż 13,2 mln kilogramów. Wśród Polskiego społeczeństwa konsumpcja wyrobów czekoladowo – cukierniczych jest na bardzo wysokim poziomie. Pod tym kątem prześcigamy aż trzykrotnie kraje, takie jak: Wielka Brytania, Szwajcaria czy Belgia. Ma to znaczący wpływ na tempo rozwoju produkcji słodyczy w Polsce. Szacuje się,

że Polacy na słodycze przeznaczają średnio 81 zł miesięcznie. Najbardziej decydujący wpływ na wybór konsumentów mają: smak, recepturę oraz markę (www.eladex.pl).

Według przewidywań PwC konsumpcja ciastek na osobę w Polsce będzie rosła w przyszłości na skutek poprawy sytuacji gospodarczej w kraju i całej UE, a także dzięki rozwojowi nowych produktów będących odpowiedzią na preferencje konsumentów. Przewidywany jest średnioroczny wzrost konsumpcji w tempie ok. 1,8% do ponad ok. 4,1 kg na osobę w 2020 roku względem roku 2015. Razem ze wzrostem konsumpcji przewidywany jest także wzrost poziomu cen ciastek i ogółu wyrobów cukierniczych. Głównym motorem podwyższenia cen może być wzrost cen surowców i czynników produkcji (www.pwc.pl).

Bulion definiuje się, jako wywar z kości, mięsa lub warzyw, służący do gotowania lub duszenia potraw. Bulion w kostkach (zwany również kostkami rosołowymi) to koncentrat z mięsa wołowego lub kurzego i różnych przypraw i często warzyw w postaci kostki, służący przede wszystkim do mieszania z wodą w celu uzyskania wywaru. Istnieją również wersje wegetariańskie, bez dodatku mięsa. Polski rynek kostek rosołowych i bulionów jest wart 233 mln zł. Taką kwotę podaje Nestlé (kategoria bulionów, Panel Handlu Detalicznego, cała Polska, czerwiec 2015 – maj 2016). W ciągu ostatnich 12 miesięcy wartość rynku zmniejszyła się o niemal 2,5%. Po kostki rosołowe sięga przynajmniej raz w roku 73,3% polskich gospodarstw domowych (Nestlé za GfK, buliony, Panel Gospodarstw Domowych, cała Polska, styczeń-grudzień, 2015). Według statystyk każda rodzina rocznie zużywa około 78 kostek rosołowych (www.glosbe.pl).

Konsumenci wybierając produkt spożywczy często porównują go z innymi dostępnymi na rynku. Głównym źródłem informacji o produkcie jest etykieta zamieszczona przez producenta na opakowaniu. Etykiety naklejone na żywność muszą zawierać dużo bardziej szczegółowe dane niż etykiety naklejane na nie spożywcze artykuły. Powinny zawierać wyraźną nazwę produktu, nazwę i adres firmy, która go wyprodukowała lub też adres importera. Informacje zawarte na etykiecie muszą być czytelne i łatwe do znalezienia dla kupującego oraz jasne i zrozumiałe. Klient nie może zostać wprowadzony w błąd poprzez błędne lub niejasne oznakowanie produktu (www.biznes.gov.pl). Dodatkowo etykiety samoprzylepne umieszczone na produktach muszą być przede wszystkim trwałe. Dotyczy to zarówno materiału jak i wykonanego na etykiecie nadruku. Polskie prawo określa dodatkowo, że wszystkie etykiety muszą być napisane w języku polskim. Każda etykieta naklejona na produkt spożywczy musi informować klienta o wadze produktu zawartego w opakowaniu oraz posiadać wszystkie dane na temat składu i zawartości składników odżywczych takich jak cukry, tłuszcze czy węglowodany. Ważna jest również lista alergenów, które są zawarte

w produkcie. Miejsce składnika w liście ma znaczenie, na pierwszych miejscach muszą znajdować się kolejno składniki, których w produkcie jest najwięcej. Artykuły jednoskładnikowe nie muszą mieć wykazu składników. Kolejnym ważnym elementem jest data przydatności produktu do spożycia. Najczęściej jest to informacja „najlepiej spożyć przed" lub „należy spożyć do". Istotny jest również sposób przechowywania (np. temperatura, kontakt z wilgocią czy światłem słonecznym) (www.labelexpress.eu).

3. Przedmiot badań

Przedmiotem badań są trzy rodzaje produktów: sok jabłkowy NFC, herbatniki maślane oraz bulion warzywny.

Tabela 1. Opis opakowań soków tłoczonych NFC (opracowanie własne)

Opakowanie			
Producent	Auchan Polska	Składy Wincenta	Tłocznia Maurera
Cena[3]	10,68 zł/5 l 2,14 zł/1 l	11,99 zł/5 l 2 zł/1l	45,19 zł 9,04 zł/1l

Tabela 2. Opis opakowań herbatników maślanych (opracowanie własne)

Opakowanie			
Producent	Auchan Polska	Krakuski	Ania
Cena[1]	0,99 zł/100 g	1,37 zł/100 g	2,85 zł/100 g

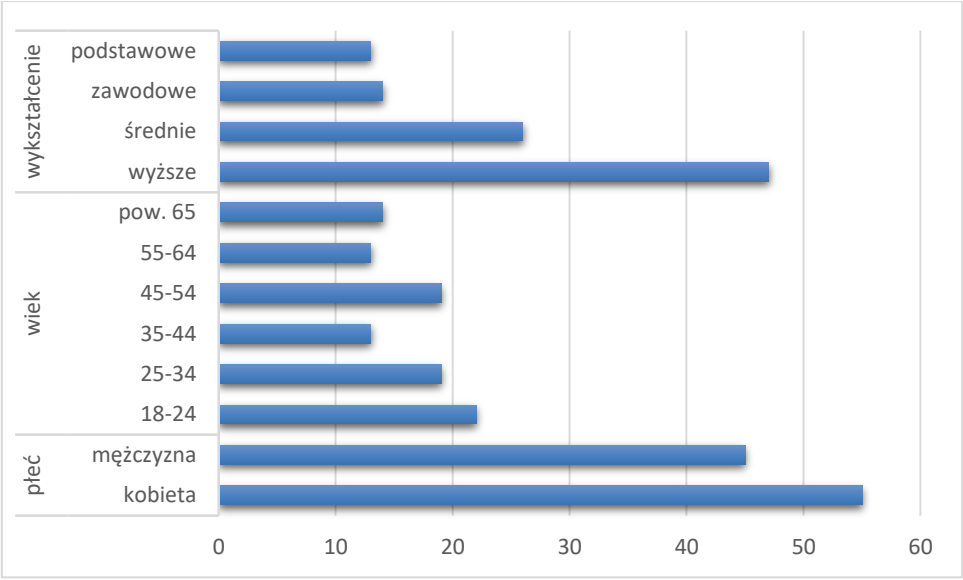
[3] Najniższa sugerowana cena poszczególnych produktów spożywczych pochodząca ze sklepów internetowych

Tabela 3. Opis opakowań bulionów warzywnych (opracowanie własne)

Opakowanie			
Producent	Mikado (Lidl Polska)	Winiary	EkoWital
Cena[1]	1,99z zł/12 kostek	2,49 zł/ 12 kostek	5,49 zł/12 kostek

4. Metodyka i wyniki badań

Badania opinii nabywców i konsumentów wybranych produktów spożywczych, dotyczące ich zwyczajów oraz zachowań na rynku zostały przeprowadzone w lutym 2020 roku. Przeprowadzono je za pomocą standaryzowanego kwestionariusza wywiadu indywidualnego Badanie odbyło się na próbie 300 respondentów powyżej 18. roku życia, przy pomocy formularza ankiety internetowej składającego się z 10 pytań zamkniętych i 5 pytań otwartych. Analizie zagadnień dotyczących zwyczajów i zachowań konsumentów produktów spożywczych poddano typy produktów przedstawionych w rozdziale 3. Strukturę przebadanej grupy przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 2. Struktura badanej próby (opracowanie własne)

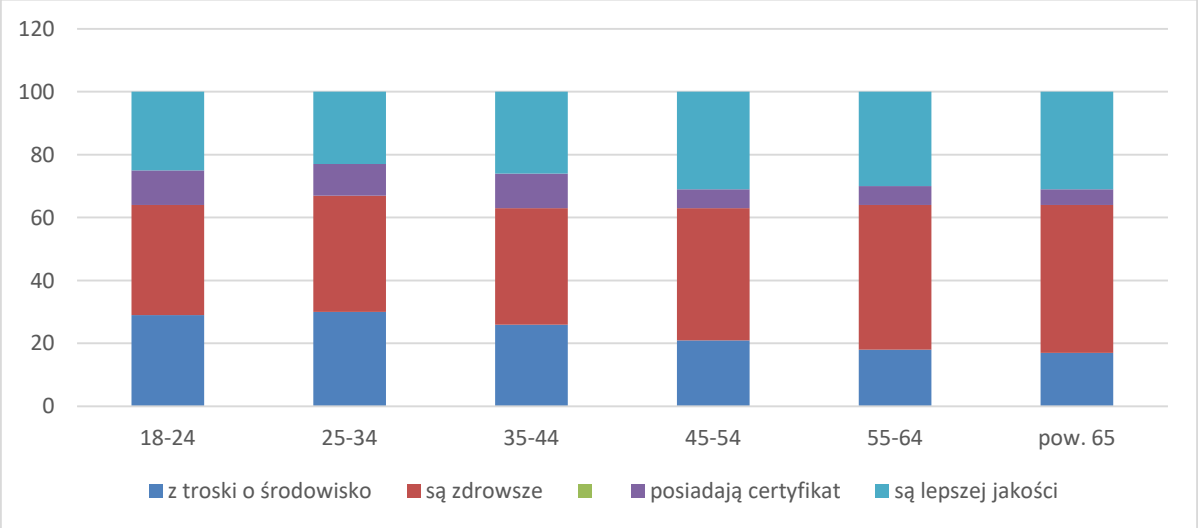
Pierwszym zagadnieniem, o ocenę, którego poproszono respondentów był zakup produktów opatrzonych znakiem ekologicznym.

Tabela 4. Częstotliwość zakupu produktów ekologicznych przez respondentów, w % (opracowanie własne)

odpowiedzi	kobiety	mężczyźni	ogółem
Tak, zawsze	8	6	7
Tak, często	21	14	18
Tak, czasami	26	21	23
Nie, rzadko	23	27	25
Nie, nigdy	22	32	27

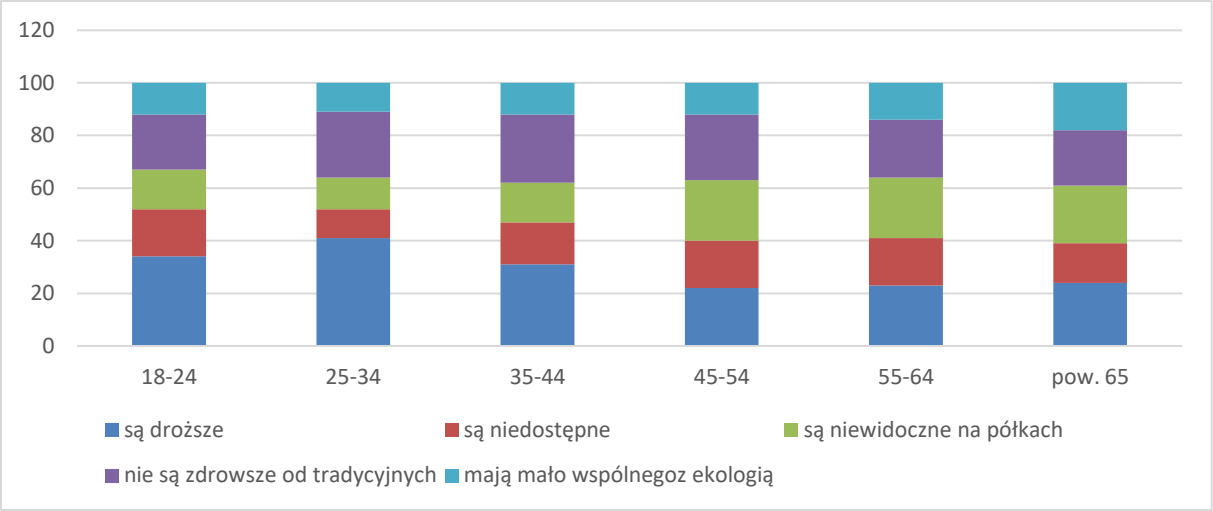
Jak widać, 25 % ankietowanych deklaruje każdorazowe lub częste zakupy produktów ekologicznych. Ponadto 52 % respondentów twierdzi, że nie kupuje ich w ogóle lub rzadko. Analiza wyników wskazuje, że czynniki socjodemograficzne różnicują sposób uzyskiwanych na to pytanie odpowiedzi. Kobiety są bardziej skłonne kupować produkty ekologiczne.

Następnie zapytano respondentów o przyczyny kupowania lub niekupowania produktów ekologicznych.



Rys. 3. Powody kupowanie produktów ekologicznych przez respondentów, w % (opracowanie własne)

Największą liczbę odpowiedzi dotyczących certyfikowanych produktów spożywczych wśród respondentów uzyskało twierdzenie „są zdrowsze". Wśród respondentów z przedziału wiekowego 18-44 lata duże znaczenie miała troska o środowisko. Tę opcję wybrało ponad 20 % ankietowanych w wymienionych grupach wiekowych. Z kolei dla ankietowanych ze starszych grup wiekowych większe znaczenie miała wyższa jakość kupowanych produktów ekologicznych.



Rys. 4. Powody niekupowania produktów ekologicznych przez respondentów, w % (opracowanie własne)

Główną przyczyną niekupowania certyfikowanych produktów ekologicznych jest zbyt wykoska cena, która jest istotna dla niemal 30% ankietowanych. Ponadto 23% respondentów jest przekonanych, że, mimo jakości potwierdzonej stosownym certyfikatem, produkty te nie są zdrowsze od produktów marek producenckich. Najniższy odsetek ankietowanych wskazał dostępność tych produktów, jako powód ich niekupowania.

Kolejna część kwestionariusza ankiety dotyczyła konkretnych cech badanych grup produktów spożywczych.

a) Soki tłoczone

Tabela 5. Ocena poszczególnych opakowań soków tłoczonych, w wartościach średnich (opracowanie własne)

Cechy	marka własna	marka krajowa	produkt certyfikowany	opis
atrakcyjność opakowania	3,4	4,4	4,6	1-bardzo nieatrakcyjne, 5-bardzo atrakcyjne
cena produktu	3,1	4,1	4,6	1-bardzo niska cena, 5-bardzo wysoka cena
jakość produktu	3,0	4,0	4,3	1-bardzo niska jakość, 5-bardzo wysoka jakość
chęć zakupu	3,2	3,9	3,7	1-bardzo nie zachęca do zakupu, 5- bardzo zachęca do zakupu

W kategorii soków tłoczonych produkt certyfikowany został oceniony, jako ten najbardziej atrakcyjny oraz najwyższej jakości. Ponadto zdaniem respondentów ekologiczny sok tłoczony jest najdroższy. Z kolei sok tłoczony marki krajowej najmniej zachęca do zakupu (średnia 3,2). Produkt ten posiada bardziej stonowaną kolorystykę oraz duży symbol z logo sieci handlowej, co może sugerować konsumentowi niższą jakość.

b) Herbatniki maślane

Tabela 6. Ocena poszczególnych opakowań herbatników maślanych, w wartościach średnich (opracowanie własne)

cechy	marka własna	marka krajowa	produkt certyfikowany	opis
atrakcyjność opakowania	2,9	3,3	4,6	1-bardzo nieatrakcyjne, 5-bardzo atrakcyjne
cena produktu	2,5	4,0	4,5	1-bardzo niska cena, 5-bardzo wysoka cena
jakość produktu	2,5	4,0	4,3	1-bardzo niska jakość, 5-bardzo wysoka jakość
chęć zakupu	2,4	4,0	3,9	1-bardzo nie zachęca do zakupu, 5- bardzo zachęca do zakupu

Według respondentów najbardziej atrakcyjnym opakowaniem herbatników maślanych jest opakowanie opatrzone certyfikatem ekologicznym. Opakowanie wyróżnia się zdecydowanie wielobarwną grafiką i jasnymi komunikatami. Opakowanie produktu marki własnej utrzymane jest w beżowo-zielonej kolorystyce i zwiera logo sieci handlowej. Produkt ten został uznany przez ankietowanych, jako ten najniższej jakości i sprzedawany po najniższej cenie.

c) Bulion warzywny

Tabela 7. Ocena poszczególnych opakowań bulionów warzywnych, w wartościach średnich (opracowanie własne)

cechy	marka własna	marka krajowa	produkt certyfikowany	opis
atrakcyjność opakowania	4,1	4,0	3,5	1-bardzo nieatrakcyjne, 5-bardzo atrakcyjne
cena produktu	3,7	4,1	3,9	1-bardzo niska cena, 5-bardzo wysoka cena
jakość produktu	3,5	4,2	4,1	1-bardzo niska jakość, 5-bardzo wysoka jakość
chęć zakupu	3,5	4,0	3,5	1-bardzo nie zachęca do zakupu, 5- bardzo zachęca do zakupu

Spośród opakowań bulionów warzywnych, respondenci, jako najbardziej atrakcyjne wskazali opakowanie marki własnej. Opakowanie to wyróżnia się na tle pozostałych bogatszą gamą kolorystyczną. Ponadto respondenci wskazali opakowani marki Winiary, jako najdroższe i jednocześnie posiadające najwyższą jakość. Respondenci częściej deklarowali również chęć zakupu tego produktu w porównaniu z pozostałymi. Być może ma to związek z ugruntowaną już pozycją marki na polskim rynku (od 1947 roku) oraz dużą dostępnością produktów w sklepach (www.winiary.pl). Z kolei produkt certyfikowany jest klasycznym przykładem tzw. clean label, czyli trendu mającego na celu umieszczania na etykiecie tylko niezbędnych informacji.

5. Wnioski

Polacy dopiero się do eko żywności przekonują. Dziś przeciętny Kowalski wydaje rocznie na eko żywność 4 euro, podczas gdy przeciętny Niemiec 100 euro, Duńczyk 200 euro, a średnia europejska wynosi 44 euro. Jesteśmy nawet poniżej średniej światowej - 11 euro (www.wprost.pl).

Celem przeprowadzonego badania było porównanie opinii konsumentów na temat produktów określanych mianem „bio", z produktami marki narodowej i marki własnej. Produkty ekologiczne są postrzegane przez większość konsumentów, jako te wyższej jakości oraz jednocześnie droższe. W odniesieniu do chęci zakupu poszczególnych grup produktów, respondenci zazwyczaj wybierali produkt marki narodowej. Zdeterminowany nabywca sięgnie po produkt ze znakiem ekologicznym nie zważając na cenę, ponieważ będzie przekonany o jego wysokiej jakości i pozytywnym wpływie na zdrowie

6. Literatura

Nanda, V., 2016, Podręcznik systemu zarządzania jakością dla firm opracowujących produkty, CRC Press, s. 352,

Boone, L. E., Kurtz, D. L., 2006, Contemporary Business 2006, Thomson South-Western, s. 19-22,

Gitlow, H.S., 2000, Systemy zarządzania jakością. Praktyczny przewodnik, CRC Press, s. 296,

Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności

Soroka, P., 2002, Podstawy technologii pakowania , Institute of Packaging Professionals, s. 14

Netografia

https://www.biznes.gov.pl/pl/firma/sprzedaz-i-marketing/chce-wprowadzic-produkt-usluge-na-rynek/bezpieczenstwo-i-oznakowanie-produktow-podstawowe-informacje (dostęp: 12.02.2020)

https://biznes.wprost.pl/handel/10250557/ponad-80-proc-zywnosci-bio-i-eko-w-polskich-sklepach-pochodzi-z zagranicy.html?utm_source=Wprost.pl&utm_medium=button&utm_campaignn=Biznes (dostęp: 23.01.2020)

https://www.cobico.pl/przetworstwo_ekologiczne (dostęp: 21.01.2020)

http://ec.europa.eu/agriculture/organic/home_fr (dostęp: 11.02.2020)

https://www.eladex.com.pl/Przeglad-rynku-cukierniczego-w-Polsce-Co-warto-wiedziec-blog-pol-1569592353.html (dostęp: 22.01.2020)
https://handelextra.pl/artykuly/191979,do-szpiku-kostki(dostęp: 23.01.2020)
http://imas.pl/blog/zywnosc-ekologiczna-w-polsce-w-opiniach-konsumentow-i-firm-2018-najnowszy-raport-o-rynku-zywnosci-ekologicznej-w-polsce/ (dostęp: 23.01.2020)
https://labelexpress.eu/pl/blog/post/co-powinna-zawierac-etykieta-produktu (dostęp: 24.01.2020)
http://www.kups.org.pl/index/?id=0266e33d3f546cb5436a10798e657d97 (dostęp: 04.02.2020)
https://ncez.pl/abc-zywienia-/co-kryje-etykieta/zywnosc-ekologiczna (dostęp: 04.02.2020)
https://www.nielsen.com/pl/pl/insights/article/2019/nowy-raport-syndykatowy-nielsen-home-beauty-loves-eco/ (dostęp: 11.02.2020)
https://www.pfiow.pl/images/publikacje/Dynamiczny_rozwoj_rynku_sok%C3%B3w_NFC_w_Polsce.pdf (dostęp: 04.02.2020)
https://pl.glosbe.com/pl/pl/kostka%20roso%C5%82owa (dostęp: 22.01.2020)
https://www.polskasmakuje.pl/jakich-certyfikatow-szukac/(dostęp: 21.01.2020)
https://www.pwc.pl/pl/pdf/rynek-ciastek-w-polsce-raport-pwc.pdf (dostęp: 21.01.2020)
https://www.pwc.pl/pl/pdf/rynek-ciastek-w-polsce-raport-pwc.pdf (dostęp: 22.01.2020)
https://www.uokik.gov.pl/aktualnosci.php?news_id=11355 (dostęp: 23.01.2020)
https://www.winiary.pl/dbamy/(dostęp: 21.01.2020)

Postrzeganie zjawiska greenwashingu przez konsumentów

Gralak Weronika [(1)], Młoda-Brylewska Klaudia [(2)]

[1] SKN Qualitas, Instytut Nauk o Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
[2] SKN Qualitas, Instytut Nauk o Jakości, Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
Klaudia Młoda-Brylewska: klaudia.mloda-brylewska@ue.poznan.pl

Streszczenie
Na przestrzeni ostatnich lat kwestie dotyczące ochrony klimatu i środowiska stały się bardzo widoczne w przestrzeni publicznej. Wiele przedsiębiorstw wykorzystując społeczną i ekologiczną wrażliwość konsumentów oraz trend na bycie „eko", pragnie - za pośrednictwem fałszywych komunikatów - poprawić swój wizerunek i tym samym zwiększyć przychody. Celem niniejszego artykułu jest rozpoznanie poziomu wiedzy konsumentów na temat zjawiska greenwashingu oraz nieuczciwych praktyk przedsiębiorstw związanych z promowaniem produktów typu „bio" i „eko". Na podstawie wyników badań kwestionariuszowych scharakteryzowano zachowania konsumentów w zakresie stosowania produktów bio/eko oraz świadomości praktyk greenwashingu stosowanych przez przedsiębiorców.

Słowa kluczowe: greenwasching, zielone mydlenie oczu, ekologia, postrzeganie konsumentów

Consumer perception of greenwashing

Summary
In recent months, issues concerning climate protection and the environment have become very visible in public space. Many companies, taking advantage of the social and ecological sensitivity of consumers and the trend of being "eco", want to improve their image and thus increase revenues through false messages. The purpose of this article was to verify consumer knowledge about the phenomenon of greenwashing and unfair business practices related to the promotion of "bio" and "eco" products. Based on the results of questionnaire surveys, it was possible to obtain data to characterize consumer behavior in the use of bio / eco products and awareness of greenwashing practices used by entrepreneurs.

Keywords: greenwasching, ecology, consumer perception

1. Wstęp

Greenwashing zwany potocznie „ekościemą", „zielonym mydleniem oczu" lub „zielonym kłamstwem" jest formą marketingu, polegającą na wywoływaniu u potencjalnych nabywców wrażenia, że produkty, cele i zasady organizacji są przyjazne dla środowiska (Kahle, 2014). Pojęcie „greenwashing" wywodzi się od angielskich słów „green" oznaczającego kolor zielony (naturalny, ekologiczny) i „washing", czyli pranie, wybielanie lub tuszowanie. Po raz pierwszy pojęcia greenwashingu użyto w 1986 roku, przez Jay'a Westerveld'a, w eseju opisującym praktyki jednego z hoteli. Właściciele podjęli decyzję o umieszczeniu etykiet, na których prosili gości o oszczędne używanie ręczników. Takie zachowanie miało zmniejszyć ilość zużywanej wody, czego efektem miała być poprawa kondycji środowiska. Jednak pod ekologiczną maską krył się większy zysk spowodowany redukcją rzeczy do prania (https://biznes.ekologia.pl).

Wysiłki związane z greenwaschingiem mogą obejmować zmianę nazwy lub etykiety produktu w celu złudzenia braku szkodliwości produktu dla środowiska, ale również prowadzenie szeroko zakrojonych kampanii marketingowych, przedstawiających wysoce zanieczyszczające firmy energetyczne, jako przyjazne dla środowiska. Greenwashing jest zatem „maską" używaną do ukrywania niezrównoważonych praktyk korporacyjnych (Czaja, 2011). Wysoce publiczne oskarżenia o „zielone kłamstwa" przyczyniły się do coraz częstszego używania tego terminu. Problem komplikuje brak odrębnej regulacji, która kompleksowo regulowałaby stosowanie tego typu praktyk przez przedsiębiorców. Mogą one jednak stanowić czyny nieuczciwej konkurencji w rozumieniu ustawy z dnia 16 kwietnia 1993 r. o zwalczaniu nieuczciwej konkurencji (UZNK), jeśli są sprzeczne z prawem lub dobrymi obyczajami, a jednocześnie zagrażają lub naruszają interes innego przedsiębiorcy lub nabywcy (www.uclp.com.pl).

Krytycy tej praktyki sugerują, że wzrost greenwaschingu, w połączeniu z nieskutecznymi przepisami, przyczynia się do sceptycyzmu konsumentów wobec wszystkich produktów ekologicznych i zmniejsza zaufanie klientów do rozwiązań mających na celu mniejszą ingerencję w środowisko (Karliner 2018). Wiele struktur korporacyjnych stosuje greenwashing, jako sposób na poprawienie publicznego postrzegania swojej marki. Jednak na podstawie coraz większej liczby badań rachunków społecznych i środowiskowych można stwierdzić, że przy braku zewnętrznego monitorowania i weryfikacji strategie greenwashingu sprowadzają się do nieetycznej postawy korporacyjnej i oszustwa (Seele, 2015).

Chociaż greenwasching nie jest niczym nowym, to jego wykorzystanie wzrosło w ostatnich latach w celu zaspokojenia popytu konsumentów na przyjazne dla środowiska towary i usługi. W ostatnich latach niewątpliwie na popularności zyskały produkty typu „bio" i „eko". W odczuciu konsumentów produkty te muszą powstawać na skutek najlepszych pod względem środowiskowym praktyk wytwórczych. Nie mogą, zatem zakłócać, czy wręcz niszczyć żadnego ekosystemu. Oprócz tego wyrób „eko" zgodnie z założeniami składa się w jak największym stopniu z naturalnych zasobów ziemi. Produkt, aby uzyskał certyfikat „eko" musi spełniać szereg zrównoważonych założeń pod względem ekonomicznym, ekologicznym i społecznym.

Według danych GUS wartość rynku produktów ekologicznych w Polsce w 2018 roku przekroczyła miliard złotych (http://www.portalspozywczy.pl). Produkty certyfikowane kupuje cyklicznie nieco ponad 7% polskich konsumentów, zarówno w specjalistycznych sklepach, ale również tego typu produkty coraz częściej pojawiają się na półkach

zlokalizowanych w ekologicznych wyspach w supermarketach (https://www.wiadomosci handlowe.pl/).

Powierzchnia polskich upraw ekologicznych rośnie dynamicznie. Według aktualnych danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych (stan na koniec 2016 r.) w Polsce działa czynnie ponad 23 tysiące producentów ekologicznych. Z kolei kontrola przeprowadzona przez Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów w 2013 roku wykazała, że co czwarty badany produkt został zakwestionowany, a w niemal 60 % placówkach dystrybuujących produkty bio i eko stwierdzono nieprawidłowości (UOKiK, 2013).

Mimo to popularność tych produktów wzrasta w błyskawicznym tempie. Dla niektórych nabywców produkty te mogą kojarzyć się z domowym, wiejskim jedzeniem. Inni konsumenci decydują się na produkty ekologiczne ze względu na choroby, takie jak alergia czy nadwaga. Są też tacy, którzy idąc z biegiem czasu oraz aktualną modą i trendami, chcą być „bio" czy też „eko", w mniejszym lub większym stopniu.

2. Przykłady Greenwashingu

Koncern BP jest uznawany za pioniera greenwashingu. BP stworzyło kampanię reklamową w 2000 roku pod hasłem „ Beyond Petroleum''. Miało to na celu przekonanie odbiorców, że koncern zmierza w kierunku czystszych paliw odnawialnych. Jednak okazało się, że firma wydawała więcej na reklamę niż na prawdziwą ekologiczną postawę. Po rozprzestrzenieniu się reklam koncernu, firma zakupiła piaski bitumiczne (inaczej piaski roponośne, czyli mieszanka piasku, gliny, wody i ropy zgromadzonej na wielkich przestrzeniach kilka do kilkunastu metrów pod powierzchnią ziemi) o wartości trzech miliardów dolarów z prowincji Alberty znajdującej się w zachodniej Kanadzie. Skutkiem produkcji ropy z piasków bitumicznych jest emitowanie 3 razy większej ilości gazów cieplarnianych niż przy wydobywaniu zwyczajnej ropy. Pozyskiwanie ropy w tej prowincji generuje ponad 40 mln ton CO_2 rocznie. Aby uzyskać jedną baryłkę ropy z piasków (czyli objętość równą mniej więcej wannie wypełnionej w 2/3) trzeba przetworzyć od 2 do 4 ton ziemi. Pozyskiwana w ten sposób ropa uznawana jest za 5 największe zagrożenie klimatyczne na świecie. Porównując standardową ropę, a tą pochodzącą z piasków bitumicznych różnią się przede wszystkim składem chemicznym i tym, że ta druga jest cięższa i bardziej zanieczyszczona. Jej spalanie uwalnia do atmosfery o ¼ więcej CO2 niż w przypadku zwykłej ropy naftowej. Zużycie wszystkich dostępnych w Kanadzie zasobów (ok. 178 miliardów baryłek) wyzwoliłoby ok. 54 gigatony CO_2, czyli ponad dwukrotność wszystkich emisji w historii ludzkości i całkowicie przekreśliłoby szanse na ograniczenie zmian klimatu. (http://surowce.igo.org.pl/)

Kolejnym przykładem jest Allegro, czyli największy portal aukcyjny w Polsce należący do przedsiębiorstwa Allegro.pl. Dokładnie jest to strona internetowa, gdzie można kupić wszystko, począwszy od elektroniki po ubrania. Dodatkowo każdy z nas może wystawić zbędną rzecz na sprzedaż. Portal ten umożliwił sprzedawcom zarejestrowanie się, jako eko-sprzedawcy. Ten status ma na celu jedynie przyciąganie klientów do produktów, ponieważ sprzedawcy nie przechodzą żadnej weryfikacji, czy faktycznie sprzedają ekologiczne produkty. Aby zarejestrować się jako potencjalny eko-sprzedawca wystarczy pokryć koszty tej opcji (http://demo.planergia.pl/)

Enea to polskie przedsiębiorstwo zajmujące się branżą energetyczną. W przypadku tego przedsiębiorstwa greenwashing rozpoczął się od hasła reklamowego „Potęga wiatru. Siła wody. Czysta energia. Czysty biznes.'' Na to hasło niezwłocznie zareagowała Komisja Etyki Reklamy, która szczegółowo je zweryfikowała i uznała, że przedsiębiorstwo wprowadza swoich klientów w błąd. Te elementy przekazu informowały o przyjazności dla środowiska. Natomiast rzekomy biznes miał się tworzyć, dzięki czystej energii wytwarzanej z wody i wiatru. Podczas sprawdzania prawidłowości tego spotu reklamowego okazało się, że tylko 5% energii jest wytwarzanej ze źródeł odnawialnych (1% to wiatraki).W dodatku aż 92% to węgiel kamienny i brunatny, którego spalanie wiąże się z zanieczyszczaniem środowiska. W związku z tym „ zielonym mydleniem oczu'' Komisja Etyki reklamy nałożyła na firmę stosowną karę. Niestety w praktyce gospodarczej przykładów greenwashingu jest zdecydowanie więcej (https://innpoland.pl/).

3. Wpływ Greenwashing na postrzeganie konsumentów

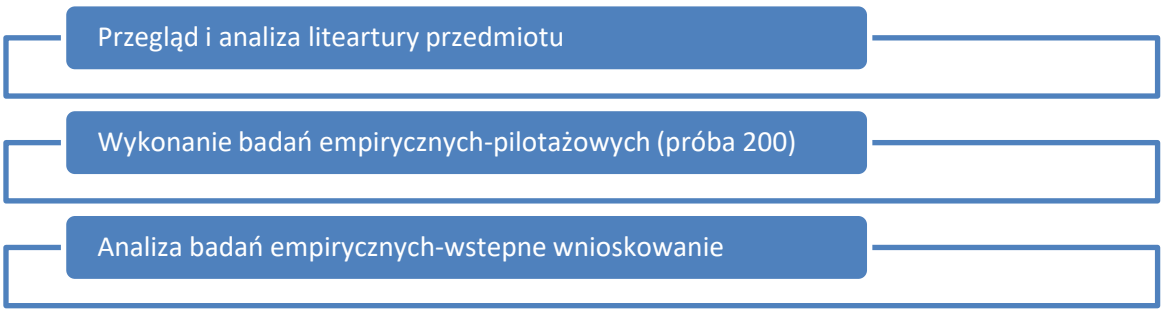
Greenwashing jest stosunkowo nowym obszarem badań w psychologii i zachowań rynkowych konsumentów, dlatego istnieje niewielki konsensus między badaniami, w jaki sposób greenwashing wpływa na konsumentów i interesariuszy. Naukowcy odkryli, że produkty, które są naprawdę przyjazne dla środowiska, są postrzegane znacznie bardziej korzystnie niż ich odpowiedniki promowane przez praktykę greenwashingu (Markiz, 2014). Inne badania sugerują, że niewielu konsumentów faktycznie zauważa „eko ściemę", szczególnie, gdy postrzegają przedsiębiortwo lub markę, jako renomowaną i długo funkcjonującą na rynku. Kiedy konsumenci postrzegają zieloną reklamę, jako wiarygodną, rozwijają bardziej pozytywne nastawienie do marki, nawet, gdy reklama jest de facto greenwashingiem (Karliner, 2001). Jeszcze inne badania sugerują, że konsumenci bardziej zaniepokojeni ekologią wyraźniej dostrzegają różnicę między uczciwym ekologicznym marketingiem a reklamą ekologiczną; im wyższa troska o środowisko, tym silniejsza będzie

intencja, aby nie robić zakupów od firm, od których podejrzewają zachowania reklamowe związane z greenwashingiem (Seele, 2015).

Badania sugerują, że gotowość konsumentów do zakupu „zielonych produktów" zmniejsza się, gdy zauważą, że zielone atrybuty pogarszają jakość produktu, co sprawia, że greenwashing jest potencjalnie ryzykowny, nawet jeśli konsument lub interesariusz nie jest sceptyczny wobec zielonego przekazu. Słowa i wyrażenia często używane w przekazach podsycanych greenwashingiem, takie jak „delikatne", mogą skłonić konsumentów do przekonania, że zielony produkt jest mniej skuteczny niż opcja nie-zielona (Hegerman, 2010).

4. Materiały i metody

W niniejszym artykule zaprezentowano wyniki jednego z etapów badania mającego na celu ocenę postrzegania zjawiska greenwashingu przez konsumentów. Badanie przeprowadzono w lutym 2019 roku, za pomocą metody CATI. Narzędziem badawczym był kwestionariusz ankiety umieszczony na platformie google. Autorki zadecydowały o skorzystaniu z tej metody ze względu na fakt zwiększającej się systematycznie liczby użytkowników internetu. Według raportu GUS w 2018 roku w Polsce dostęp do Internetu posiadało 86,7% obywateli (GUS, 2018). Próba badawcza obejmuje 200 losowych respondentów do 35 roku życia. Poniżej przedstawiono schemat procedury badawczej.



Schemat: Procedura badawcza i kolejność etapów w badaniu kwestionariuszowym (opracowanie własne)

Kolejnym etapem badań będzie przeprowadzenie wywiadów kwestionariuszowych na próbie badawczej wytypowanej na podstawie doboru kwotowego, w celu dokonania analizy przekrojowej społeczeństwa.

Kwestionariusz ankiety składa się z 18 pytań zamkniętych oraz 3 pytań otwartych. Formularz zawierał również 5 pytań na temat metryki ankietowanych. Po zgromadzeniu danych, dokonano analizy statystycznej na podstawie, których możliwe było sformułowanie wniosków na temat postrzegania konsumentów praktyki greenwashingu. W badaniu wzięło udział 23% mężczyzn i 77% kobiet, z przedziału wiekowego od 18 do 35 roku życia.

Najwięcej ankietowanych posiadało wykształcenie wyższe (42%) oraz średnie (26%). Dominującym miejscem zamieszkania było miasto powyżej 100 tys. mieszkańców, które wskazało ponad połowa ankietowanych (58%). 20% osób ankietowanych zaznaczyło, że zamieszkuje wieś.

5. Wybrane wyniki badań

Ponad połowa respondentów (54%) deklaruje, że zna to pojęcie i potrafi je opisać. W kolejnym pytaniu poproszono respondentów o wskazanie definicji tego zjawiska. Odpowiedzi przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Odpowiedzi respondentów na pytanie: „Jak rozumie Pani/Pan pojęcie Greenwashing", - odpowiedzi przedstawiono w wartościach procentowych (opracowanie własne)

	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem
"zielone mydlenie oczu"	55,3	51,4	53,4
postawa zgodna z zasadami ekologii	40,4	39	39,7
ekologiczna metoda prania odzieży	4,3	9,6	7,0

Ponadto ankietowani mieli możliwość dopisania własnej definicji rozumienia słowa „greenwashing". Poniżej zaprezentowano wybrane określenia:

- „wprowadzanie rozwiązań, które wydają się ekologiczne lub też są takie w małym stopniu" „chęć bycia postrzeganym przez klientów, jako "przyjaźni środowisku" przy jednoczesnym popieraniu rozwiązań całkowicie, nieekologicznych", „używanie ekologicznych sposobów do czyszczenia/prania/mycia"
- „promowanie się korporacji na aktualnym trendzie"

Następnie zapytano respondentów o ich wiedzę na temat produktów ekologicznych. Niemal połowa (48%) respondentów deklaruje, że posiada przeciętną wiedzę na temat produktów ekologicznych. Z kolei aż 19% ankietowanych twierdzi, że posiada niewielką wiedzę na ten temat lub nie posiada żadnej (8%). W dalszej kolejności zapytano respondentów o opinię na temat produktów promowanych przez producentów jako „bio" lub „eko". Wyniki przedstawiono poniżej.

Tabela 2. Odpowiedzi respondentów na pytania dotyczące produktów „bio/eko"- odpowiedzi przedstawiono w wartościach bezwzględnych (opracowanie własne)

Twierdzenie	Zdecydowanie tak	Raczej tak	Nie wiem/trudno powiedzieć	Raczej nie	Zdecydowanie nie
Produkty bio/eko są łatwo dostępne	7	9	57	26	1
Produkty bio/eko są zgodne z opisem	4	26	48	17	5
Produkty bio/eko przyciągają moją uwagę	15	39	16	26	4

Większość konsumentów nie ma zdania na temat dostępności produktów „bio/eko" (57%). Natomiast 27% ankietowanych jest zdania, że produkty te są słabo lub w ogóle niedostępne. 30% badanych osób jest zdania, że produkty „bio/eko" są z godne z opisem. Warto zaznaczyć, że ponad połowa ankietowanych osób (55%) deklaruje, że produkty „bio/eko" przyciągają jego uwagę, z kolei 30 % ankietowanych nie zwraca na nie uwagi.
Następnie zapytano ankietowanych o doświadczenia związane z użytkowaniem produktów ekologicznych. 23% ankietowanych jest zdania, że zawiodło się na produktach promowanych jako „bio/eko". Jako przykład najczęściej wymieniano produkty z kategorii: chemia gospodarcza, kosmetyk oraz nabiał. Respondenci często zwracali uwagę na fakt, że warzywa i owoce posiadające oznaczenie „BIO" są często pakowane w folię.

6. Podsumowanie

W ostatnich latach nasycenie polskiego rynku produktami sygnowanymi, jako „bio" lub „eko" stało się tak duże, że w istocie trudno rozróżnić produkty faktycznie ekologiczne od tych kreowanych „na zielone" przez producentów. Konsumenci cały czas i z różnych stron są atakowani ekologicznymi, często nieprawdziwymi komunikatami, ponieważ ekologia niewątpliwie wpływa na decyzje zakupowe. Celem niniejszego artykułu była weryfikacja wiedzy konsumentów na temat zjawiska greenwashingu oraz nieuczciwych praktyk przedsiębiorstw związanych z promowaniem produktów typu „bio" i „eko". Okazuje się, że ponad połowa respondentów rozumie i potrafi zdefiniować pojęcie greenwashingu. Na podstawie przeprowadzonych badań można również wysnuć wniosek, że produkty „bio" lub „eko" posiadają ogromną perspektywę rozwoju. Zdecydowana większość respondentów deklarowała, że posiada jakąkolwiek wiedzę na temat „zielonych produktów", a część z nich regularnie ją kupuje, zastępując nimi produkty nieposiadające na opakowaniu zielonego listka.

Nie każde „zielone" przedsięwzięcie przedsiębiorstw jest godne potępienia. Negatywną stroną niewątpliwie jest fakt, że koncerny traktują ekologicznie reklamy, jako źródło dochodu i odwracają uwagę odbiorcy od rzeczywistych problemów. Wciąż brakuje długofalowych kampanii, które przyniosłyby realne korzyści dla środowiska. Póki kwestie prawne związane z greenwashingiem nie będą uregulowane prawnie, a świadomość ekologiczna społeczeństwa będzie nadal na przeciętnym poziomie, z ekologiczną ściemą będziemy mieć do czynienia jeszcze długo.

7. Literatura

Czaja M., 2011, Greenwash w Polsce, czyli „zielone kłamstwo" w reklamie, Wirtualne Media, s. 13-17,

Dahl R., 2010, Greenwashing: Czy wiesz, co kupujesz?, Perspektywy zdrowia środowiskowego. 118 (6), s. 22-23.

Hagerman E., 2008, Małe zielone kłamstwa - jak firmy budują ekofasadę, Wydawnictwo Zielone Fasady, s. 14-19.

Kahle L. R., Gurel-Atay, E., 2014, Informowanie o zrównoważonym rozwoju dla zielonej gospodarki. ME Sharpe, s. 11.

Karliner J., 2011, CorpWatch: krótka historia Greenwash. Corpwatch.org

Laufer W. S., 2003, Odpowiedzialność społeczna i zielone pranie korporacyjne, w: Journal of Business Ethics. 43 (3): s. 253–261.

Markiz Ch., Qian C., 2014, Raportowanie społecznej odpowiedzialności biznesu w Chinach: symbol czy substancja?, w: Nauka o organizacji. 25 (1): s. 127–148,

Mielczarek A., 2011, *Ekologiczne pranie mózgu, czyli greenwashing w reklamach.* Cz. 1 (pol.), Ulica Ekologiczna, s. 11-18.

Rahman I., Park J., Geng-qing Chi Ch., 2015, Konsekwencje „prania ekologicznego", w: *International Journal of Contemporary Hospitality Management*, 27 (6), s.27.

Seele P., Gatti L., 2015, Weryfikacja Greenwashing: w poszukiwaniu definicji opartej na typologii i oskarżeniach, uwzględniającej strategie legalności, Strategia biznesowa i środowisko. 26 (2): s. 239–252.

UOKiK: Informacja z kontroli jakości i prawidłowości oznakowania produktów rolnictwa ekologicznego (pol.). lipiec 2014.

Netografia

https://www.apella.com.pl/2014/09/24/greenwashing-czyli-zielona-marketingowa-sciema-169/(dostęp: 04.02.2020)

https://biznes.ekologia.pl/swiat/greenwashing-czyli-jak-ustrzec-sie-przed-zielonymi-oszustami,20384.html (dostęp: 04.02.2020)

http://demo.planergia.pl/post/zmylka-na-zielono-czyli-90 (dostęp: 04.02.2020)

http://greenwash.wikidot.com/greenwashing-na-swiecie (dostęp: 03.02.2020)

https://innpoland.pl/blogi/martaromanow/116527,greenwashing-czyli-ekosciema (dostęp: 03.02.2020)

http://www.portalspozywczy.pl/owoce-warzywa/wiadomosci/wartosc-rynku-produktow-ekologicznych-w-polsce-przekroczy-miliard-zlotych,157467.html (dostęp: 04.02.2020)

http://surowce.igo.org.pl/mapa/183/kanadyjski-mordor-wydobycie-ropy-z-piaskow-roponosnych-najbardziej-niszczacy-projekt-na-ziemi (dostęp: 03.02.2020)

https://tvs.pl/informacje/pij-z-glowa-ranking-wod-pitnych/ (dostęp: 03.02.2020)

https://uclp.com.pl/greenwashing-w-swietle-przepisow-ustawy-o-zwalczaniu-nieuczciwej-konkurencji/ (dostęp: 03.02.2019)
https://www.wiadomoscihandlowe.pl/artykuly/swietne-perspektywy-dla-rynku-produktow-ekologiczn,47276 (dostęp: 04.02.2020)
https://www.wirtualnemedia.pl/artykul/greenwash-w-polsce-czyli-zielone-klamstwo-w-reklamie (dostęp: 04.02.2020)

Protekcyjny wpływ melatoniny na rozwój hormonozależnych nowotworów u kobiet

Osial Natalia [(1)], Nowak Emilia [(1)], Ostojska Magdalena [(1)]

[1] Katedra i Zakład Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Natalia Osial: natalia.osial@gmail.com

Streszczenie
Melatonina jest neurohormonem produkowanym przez szyszynkę, wykazującym działanie plejotropowe na organizm człowieka, głównie wpływającym na regulację rytmów dobowych. W ostatnim czasie rośnie zainteresowanie jej działaniem onkostatycznym. Istnieją dowody, że hamuje ona inicjację, progresję i przerzutowanie w wielu typach nowotworów. W związku ze stale rosnącą zachorowalnością kobiet na hormonozależne raki piersi, jajnika i endometrium w tej pracy omówiono wyniki badań eksperymentalnych i obserwacyjnych potwierdzających jej protekcyjny wpływ na rozwój tych nowotworów. Przegląd literatury dowodzi, że melatonina wykazuje działanie antyproliferacyjne, stymulujące apoptozę, hamujące angiogenezę oraz antymetastatyczne na tkankę nowotworową, co daje nadzieję na włączenie jej, jako adiuwant w terapię nowotworów hormonozależnych u kobiet.

Słowa kluczowe: melatonina, rak piersi, rak jajnika, rak endometrium, rak hormonozależny

Protective impact of melatonin on hormone-dependent cancers in women

Summary
The melatonin is a neurohormone produced by the pineal gland. It has a pleiotropic effect on the human organism and mainly affects the regulation of circadian rhythms. Recently, there is a growing interest in its oncostatic effect. There is evidence, that melatonin inhibits the initiation, progression and metastases formation in many types of cancer. In connection with constantly growing women's morbidity on hormone-dependent breast, ovarian and endometrial cancers, in this article we discuss the results of experimental and observational studies confirming its protective effect on the development of these cancers. The literature review shows that melatonin acts by inhibition of tumor formation, among others, by reducing cell proliferation, it has proapoptotic, antiangiogenic and antimetastatic effects. Therefore, the use of melatonin as an adjuvant could offer hope in antitumor therapy of hormone-dependent cancers in women.

Key words: melatonin, breast cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, hormone-dependent cancers

1. Wstęp

Melatonina (MLT) jest neurohormonem, wydzielanym głównie przez szyszynkę, niewielkie ilości syntetyzowane są także w innych tkankach: w siatkówce, soczewce, komórkach układu immunologicznego, nabłonku dróg oddechowych, skórze czy w układzie pokarmowym (Acuña-Castroviejo i in., 2014). MLT jest substancją wykazującą działanie plejotropowe. Jej główną funkcją jest regulacja okołodobowego rytmu snu i czuwania oraz rytmu sezonowego, związanego ze zmianami pór roku, poprzez oddziaływanie na jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza, które nadrzędnie kontrolują funkcjonowanie zegara biologicznego. Światło silnie hamuje syntezę i wydzielanie melatoniny przez szyszynkę, natomiast produkcja melatoniny zachodzi, kiedy do siatkówki nie docierają promienie świetlne. Warunkuje to okołodobowe i sezonowe wahania stężenia melatoniny, decydujące

o fazie rytmu biologicznego (Reiter,1991; Zisapel, 2018). Poza tym MLT wykazuje działanie hipotensyjne, przeciwbólowe, przeciwdepresyjne, przeciwlękowe, neuroprotekcyjne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne. Ma ochronny wpływ na układ pokarmowy oraz moduluje działanie innych układów organizmu człowieka (Comai i in., 2014; Emet i in., 2016, Slominski i in., 2012). W ostatnich latach rośnie zainteresowanie protekcyjnym wpływem melatoniny na kancerogenezę. Istnieją dowody, że hamuje ona inicjację, progresję i rozwój przerzutów w wielu typach nowotworów. Podstawowe mechanizmy przeciwnowotworowe obejmują aktywność przeciwutleniającą, modulację receptorów melatoniny MT1 i MT2, stymulację apoptozy, regulację cyklu komórkowego i metabolizmu komórek nowotworowych, hamowanie angiogenezy, metastazy i indukcję zmian epigenetycznych (Li i in., 2017).

W związku ze stałym wzrostem zachorowalności kobiet na nowotwory hormonozależne, w tej pracy skupiono się na omówieniu protekcyjnego wpływu melatoniny na rozwój raka piersi, jajnika i endometrium.

2. Materiał i metody

W badaniu poddano analizie artykuły wyszukane na platformie PubMed. Zostały użyte słowa-klucze: melatonin, breast cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, hormone-dependent cancers. Analiza zawierała badania dotyczące różnych mechanizmów działania melatoniny na poziomie komórkowym oraz ogólnoustrojowym w terapii nowotworów hormonozależnych u kobiet.

3. Wyniki

- Rak piersi

Rak piersi (RP) jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet, powodującym największą liczbę zgonów, spowodowanych nowotworem wśród kobiet (wg Światowej Organizacji Zdrowia). Około 70% nowotworów piersi stanowią raki hormonozależne (wg *American Cancer Society*), co oznacza, że komórki rakowe wykazują ekspresję receptorów dla estrogenu (ER+) i/lub progesteronu (PR+) oraz są stymulowane przez te hormony.

Wpływ melatoniny na rozwój RP i jej związek z receptorami ER i PR zaobserwowano już w latach 80-tych XX wieku. W 1985r. Danforth i in. oznaczyli 24-godzinny profil MLT w osoczu u osób zdrowych oraz kobiet z RP. Kobiety z hormonozależnym RP miały znacznie niższą średnią dobową różnicę MLT w osoczu niż te z RP ujemnym pod względem ER i PR. Zauważono też silną odwrotną korelację między stężeniem MLT w osoczu a ilościami ER i PR w guzie. W celu ustalenia zależności między szlakiem odpowiedzi estrogenowej

a hamującym wpływem melatoniny na RP, w 2002 r. Kiefer i in. poddali komórki MCF-7 transfekcji konstruktem reporterowym lucyferazy z elementem odpowiedzi estrogenowej (ERE), a następnie traktowali je MLT (10^{-9}-10^{-6} M) przez 30 minut, a potem 10^{-9} M 17-β-estradiolem (E2) lub każdym związkiem osobno. Leczenie MLT znacznie zmniejszyło indukowaną przez E2 transaktywację ER i aktywność wiązania ER-ERE. Ustalono też, że MLT hamowała indukowane przez E2 podwyższenie poziomów cAMP o 45%. Dane te wskazują, że MLT wpływa na estogenozależne szlaki przekazywania sygnału, co ma kluczowe znaczenie w hamowaniu rozwoju hormonozależnego RP. Poza tym MLT, działając na komórki RP oraz otaczające je fibroblasty, zmniejsza w nich aktywność aromatazy – kluczowego enzymu w syntezie estrogenów, co z kolei zmniejsza ich stymulujący wpływ na RP (Chottanapund i in., 2014).

Badano również wpływ MLT na komórki raka piersi ER+ linii MDA-MB-361 pod kątem jej działania proapoptotycznego. Wykazano, że MLT (10^{-3} M) znacząco hamowała proliferację komórek RP i indukowała ich apoptozę, poprzez zwiększenie ekspresji Apaf-1, wyzwalanie uwalniania cytochromu C oraz stymulację aktywności kaspazy-3 i kaspazy-9 (Wang i in., 2012). Działanie antymetastatyczne MLT zostało potwierdzone w badaniu *in vivo* z użyciem samic bezgrasiczych myszy, u których obserwowano przerzuty raka piersi do płuc. MLT okazała się skuteczna w kontrolowaniu przerzutowego RP poprzez bezpośredni antagonizm mechanizmu przerzutowego komórek wywołanego przez hamowanie ROCK-1 - białka regulującego inwazję i migrację komórek (Borin i in., 2016). Poza tym udowodniono, że MLT poprawia skuteczność niektórych leków przeciwnowotworowych oraz może zmniejszać ich działania niepożądane. Koniugaty melatoniny z tamoksyfenem wykazały większą skuteczność w hamowaniu żywotności i migracji komórek RP w czterech fenotypowo zróżnicowanych liniach komórkowych. Hamowały też oporne na tamoksyfen komórki MCF-7 i pochodzącą od pacjenta heteroprzeszczepową linię komórek RP (Hasan i in., 2019). MLT zapobiega kardiotoksyczności indukowanej doksorubicyną (Liu i in., 2018), a podawanie MLT i doksorubicyny szczurom z RP powodowało większy spadek masy guza i wyższy wskaźnik przeżycia (Ma i in., 2015).

- Rak jajnika

Rak jajnika (RJ) w skali międzynarodowej jest 7. wiodącą diagnozą raka i 8. przyczyną umieralności na raka wśród kobiet. Predyspozycje genetyczne (mutacje: TP53, BRCA1 i 2, protoonkogenu B-Raf, GTPazy Kras) i późna menopauza stanowią czynniki ryzyka, natomiast ciąża, laktacja i doustne leki antykoncepcyjne zmniejszają ryzyko (Chuffa i in., 2017).

Pęcherzyki przedowulacyjne zawierają dużo MLT. Wywiera ona bezpośredni wpływ na prawidłowe funkcje jajnika, łagodzi rakotwórcze działanie reaktywnych form tlenu w płynie pęcherzykowym, steruje wzrostem pęcherzyków, owulacją i luteinizacją (Tamura i in., 2009). Badanie retrospektywne wykazało, że poziomy MLT są niższe u kobiet z RJ niż u zdrowych (Zhao i in., 2016). Badano działanie onkostatyczne MLT *in vitro* w estrogenozależnej linii komórkowej BG1 gruczolakoraka jajnika i dowiedziono, że w fizjologicznych stężeniach powoduje ona redukcję liczby komórek nowotworowych (Petranka i in., 1999). Podawanie MLT powodowało redukcję masy guza u szczurów z RJ wyindukowanym etanolem, a u szczurów nieobciążonych etanolem zmniejszało częstość występowania gruczolakoraka (Chuffa i in., 2013).

Leczenie melatoniną prowadzi do zmniejszenia ekspresji białek zaangażowanych w szlaki sygnalizacji RJ - stres oksydacyjny, zapalenie, apoptozę i proliferację. Na poziomie molekularnym podanie MLT hamuje wzrost poziomu czynników, których stężenie jest zwiększone w przebiegu RJ: Her-2, p38, fosfo-AKT i mTOR, receptora TLR4 związanego z opornością na chemioterapię i złym rokowaniem, MyD88, TRIF, NF-*κ*B, IkBα, IKK-α, TRAF6, IRF3, IFN-β, TNF-α, TGF-β i IL-6 (Chuffa i in., 2015). NF-kB zwiększa wytwarzanie ROS, prowadząc do uszkodzenia DNA, a w etiologii RJ jest znaczącym markerem stanu zapalnego. MLT hamuje fosfo-aktywację NF-kB, a także zmniejsza stres oksydacyjny indukowany H_2O_2 poprzez regulację szlaku Erk/Akt/NF-kB (Zare i in., 2019).

MLT promuje apoptozę komórek RJ poprzez regulację w górę ekspresji białek proapoptotycznych: p53, BAX i kaspazy-3 i w dół antyapoptotycznych: Bcl-2 i surwiwiny (Chuffa i in., 2016). Przez regulację w dół angiopoetyn i VEGF hamuje angiogenezę (Zonta i in., 2017). W zwierzęcym modelu RJ długotrwałe podawanie melatoniny obniża poziom VEGF, TGFβ-1, VEGFR2 i czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1α), stanowiącego zły czynnik prognostyczny (Chuffa i in., 2017).

MLT w komórkach RJ zwiększa ekspresję kadheryny-E, cząsteczki podtrzymującej połączenia na powierzchni komórki (Zare i in., 2019). Dodatkowo w nowotworowych komórkach macierzystych uzyskanych z linii komórkowej ER*α*(−) SK-OV-3 hamuje proliferację, co potwierdził spadek wartości markera proliferacji Ki67. Powoduje także zmniejszenie ekspresji genów związanych z przechodzeniem między nabłonkiem a mezenchymą - ZEB1, ZEB2, wimentyny i SNAIL, a w stężeniu 3,4 mM hamuje migrację komórek rakowych. Wnioski z tych badań podkreślają ważną rolę MLT jako leku wspomagającego w zapobieganiu inwazji i przerzutom RJ (Akbarzadeh i in., 2017).

MLT jest specjalnym supresorem Erα. Długotrwała ekspozycja na estrogeny powoduje progresję RJ, a leczenie antyestrogenami zwiększa ekspresję receptorów MT1 w linii komórkowej OVCAR-3 (ER +) i ma wpływ na linie ER SK-OV-3. Ponadto egzogenne nanomolarne stężenia MLT regulują w górę ekspresję receptorów MT1 (Treeck i in., 2006). W surowiczym RJ ekspresja MT1 jest obniżona, a terapia MLT powoduje jej wzrost (Chuffa i in., 2016). Jednak ocena prognostycznej i predykcyjnej roli MT1 w RJ wskazuje na jego ograniczony udział w tym typie guza. Nie stwierdzono istotnej zależności między ekspresją MT1 a stopniem złośliwości guza jajnika, stadium zaawansowania klinicznego, obecnością choroby resztkowej po cytoredukcji lub przeżywalnością pacjenta (Jabłońska i in., 2014).

Zastosowanie terapii łączonej MLT z cisplatyną, dowiodło działania MLT jako leku wzmacniającego antyproliferacyjny efekt chemioterapii (Menedez-Menedez i in., 2018). W komórkach RJ HTOA i OVCAR-3, MLT podawana samodzielnie, nie wywierała na komórki działania antyproliferacyjnego, ale w leczeniu skojarzonym uwrażliwiała komórki na cisplatynę. Ponadto podawanie MLT spowodowało zmniejszenie aktywności telomerazy w linii komórkowej OVCAR-3 (Futagami i in., 2001). W skojarzeniu z cisplatyną, MLT wykazuje synergistyczne do niej działanie, zmniejszające żywotność komórek linii SK-OV-3. W tym procesie dochodzi do wzrostu rozszczepienia PARP i kaspazy-3, zahamowania fosforylacji ERK i defosforylacji p90RSK i HSP27, co przywraca to mechanizmy apoptotyczne komórek nowotworowych. Istotne jest także działanie przeciw toksyczności cisplatyny na nienowotworowe komórki nabłonka jajnika (Kim i in., 2011). U myszy farmakologiczne dawki MLT zapobiegały utracie rezerwy pęcherzykowej indukowanej cisplatyną poprzez inhibicję szlaku sygnałowego PTEN/AKT/FOXO3a (Jang i in., 2016).

- Rak endometrium

Rak endometrium (RE) jest czwartym najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w Europie i jednocześnie najczęstszym nowotworem żeńskich narządów płciowych (Amant i in., 2005). Wg *American Cancer Society* około 80% przypadków stanowi postać hormonozależna.

W jednym z pierwszych badań potwierdzających protekcyjny wpływ MLT na rozwój hormonozależnego RE kryterium branym pod uwagę było średnie stężenie hormonu mierzone w osoczu. U kobiet chorujących na RE wynosiło ono 6,1 pg/ml, co jest wartością sześciokrotnie niższą w porównaniu z grupą kontrolną kobiet zdrowych. Dodatkowo, w związku ze spadkiem poziomu MLT z wiekiem, zaobserwowano równoczesny wzrost

częstości zachorowań na RE (Grin i in., 1998). W 2014 r. Dznelashvili i in. dowiedli, że w prostym lub złożonym przeroście endometrium, charakteryzującym się brakiem obecności atypowych komórek, średnie stężenie MLT w osoczu krwi jest znacząco wyższe od jej stężenia przy współistniejącym RE o wysokim stopniu zaawansowania. Przeprowadzono badanie mające na celu określenie obecności i ewentualnych podtypów receptorów melatoninowych występujących w komórkach RE. Wykorzystano w nim antagonistę receptora MT1 i MT2 – luzindol oraz selektywnego antagonistę receptora MT2 – 4-fenylo-2-propionamidotetralinę (4-P-PDOT). W komórkach Ishikawa dowiedziono obecności receptorów MT1, co dodatkowo potwierdzono badaniem immunohistochemicznym. Wykazano również, że w obecności MLT w stężeniu fizjologicznym (10^{-9} mol/dm^3) dochodzi do tłumienia ekspresji mRNA w ERα znajdujących się w komórkach Ishikawa (Watanabe i in., 2008). W 2019 r. Abdel-Hamid i wsp. przeprowadzili badanie na samicach szczurów albinosów. Zwierzęta podzielono na 3 grupy: pierwsza z nich otrzymywała domięśniowo benzoesan estradiolu, druga - benzoesan estradiolu oraz preparat MLT; grupie kontrolnej podawano wyłącznie zaróbkę farmaceutyczną leku. Po upływie 4 tygodni wyniki badania wykazały, że podawanie MLT zapobiega indukowanemu estrogenami przerostowi endometrium oraz chroni komórki przed atypią. W innym badaniu samice szczurów Wistar wprowadzono w stan menopauzy poprzez chirurgiczne wycięcie jajników. Następnie stosowano wobec nich estrogenową terapię zastępczą lub terapię skojarzoną estrogenów z MLT. Wyniki zweryfikowano na postawie badania ultrasonograficznego oceniającego grubość endometrium samic przed i po leczeniu. W grupie badawczej szczurów, u których nie stosowano dodatkowej suplementacji MLT, przyrost endometrium był stosunkowo wyższy, a całkowita grubość endometrium na koniec badania wynosiła 0,133±0,0009 mm. Natomiast w drugiej grupie uzupełniające stosowanie MLT zmniejszyło proliferację komórek endometrium, a grubość po leczeniu wyniosła 0,122±0,010mm (Ciortea i in., 2011). Wpływ pracy nocnej na rozwój RE oceniano w prospektywnym badaniu kohortowym przeprowadzonym wśród pielęgniarek zatrudnionych w systemie zmianowym w Stanach Zjednoczonych. Kryterium branym pod uwagę była suma lat przepracowanych w ten sposób z minimum trzema nocami pracy w miesiącu. W badaniu nie brano pod uwagę zmian dziennych i wieczornych. Znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia RE dotyczyło pielęgniarek pracujących w systemie zmianowym 20 lat i więcej. Zauważono, że wzrost tego ryzyka był aż dwukrotny w grupie kobiet ze współczynnikiem masy ciała o wartości powyżej 30 kg/m^2 (Viswanathan i in., 2007). W 2008r. Watanabe i in. wykazali, że MLT może potęgować działanie leków stosowanych w chemioterapii hormonozależnego RE,

m.in. paklitakselu. U pacjentów stosujących jednocześnie chemioterapię i doustnie MLT częściej odnotowywano całkowitą lub częściową odpowiedź na leczenie w porównaniu ze stosowaniem wyłącznie chemioterapii.

4. Podsumowanie

Protekcyjny wpływ MLT na rozwój hormonozależnych nowotworów został udowodniony w wielu badaniach analitycznych i eksperymentalnych prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Dotychczas potwierdzono różnorodne mechanizmy jej działania onkostatycznego wpływające na wiele szlaków sygnalizacyjnych biorących udział w kancerogenezie. Szeroki zakres plejotropowych korzystnych efektów MLT w komórce oraz fakt, że jest ona naturalną cząsteczką produkowaną w ludzkim organizmie, świadczy o jej potencjale do wzmacniania działania przeciwnowotworowego konwencjonalnego leczenia i niwelowania jego działań niepożądanych. Daje to duże nadzieje na włączenie jej, jako adiuwant w terapię nowotworów hormonozależnych u kobiet. Dalsze badania wymagają oceny zastosowania MLT w sytuacjach klinicznych ze szczególnym uwzględnieniem analizy długoterminowej.

5. Literatura

Abdel-Hamid H, Zenhom N, Dm Toni N, 2019. Melatonin reduced endometrial hyperplasia induced by estradiol in female albino rats. Gen Physiol Biophys 38,1: 63-71.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales -Corral S, Tan DX, Reiter RJ, 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cell Mol Life Sci. 71: 2997–3025.

Akbarzadeh M, Movassaghpour AA, Ghanbari H, Kheirandish M, Fathi MaroufiN, Rahbarghazi R, Nouri M, Samadi N, 2017. The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. Sci Rep. 6;7(1):17062.

Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I, 2005. Endometrial cancer. Lancet 366,9484: 491-505.

Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, Ferreira LC,Moschetta MG, Jardim-Perassi BV, Iskander A, Varma NR, Shankar A, Coimbra VB, Fabri VA, Oliveira JG, Zuccari DA, 2016. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. Journal of pineal research 60,1: 3-15.

Chottanapund S, Van Duursen MBM, Navasumrit P, Hunsonti P, Timtavorn S, Ruchirawat M, Van den Berg M, 2014. Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal

positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. Toxicology in Vitro 28,7: 1215–1221.

Ciortea R, Costin N, Braicu I, Haragas D, Hudacsko A, Bondor C, Mihu D, Mihu C, 2011. Effect of melatonin on intra-abdominal fat in correlation with endometrial proliferation in ovariectomized rats. Anticancer res 31,8: 2637-43.

Comai S, Gobbi G, 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.

Chuffa LG, Alves MS, Martinez M, Camargo IC, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Júnior LA, Martinez FE, 216. Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. Endocr Relat Cancer. ;23(2):65-76.

Chuffa LG, Fioruci-Fontanelli BA, Mendes LO, Fávaro WJ, Pinheiro PF, Martinez M, Martinez FE, 2013. Characterization of chemically induced ovarian carcinomas in an ethanol-preferring rat model: influence of long-term melatonin treatment. PLoS One. 18;8(12): 81676.

Chuffa LG, Fioruci-Fontanelli BA, Mendes LO, Ferreira Seiva FR, Martinez M, Fávaro WJ, Domeniconi RF, Pinheiro PF, Delazari Dos Santos L, Martinez FE, 2015. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. BMC Cancer. 6;15: 34.

Chuffa LG, Lupi Júnior LA, Costa AB, Amorim JP, Seiva FR, 2017. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. Steroids. 118:93-108.

Chuffa LG, Lupi Júnior LA, Seiva FR, Martinez M, Domeniconi RF, Pinheiro PF, Dos Santos LD, Martinez FE, 2016. Quantitative Proteomic Profiling Reveals That Diverse Metabolic Pathways Are Influenced by Melatonin in an in Vivo Model of Ovarian Carcinoma. J Proteome Res. 7;15(10):3872-3882.

Chuffa LGA, Reiter RJ, Lupi LA, 2017. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. Carcinogenesis 1;38(10):945-952.

Danforth DN, Tamarkin L, Mulvihill JJ, Bagley CS, Lippman ME, 1985. Plasma melatonin and the hormone-dependency of human breast cancer. J Clin Oncol. 3,7: 941-8.

Dznelashvili N, Kasradze D, Tavartkiladze A, 2014. Expression of epidermal growth factor receptor and concentrations of epidermal growth factor and melatonin in endometrial carcinoma. Georgian Med News 235: 17-24.

Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A, 2016. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. Eurasian J Med. 48,2: 135–141.

Futagami M, Sato S, Sakamoto T, Yokoyama Y, Saito , 2001. Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells. Gynecol Oncol. 82(3):544-9.

Grin W, Grünberger W, 1998. A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer. Gynecol Obstet Invest 45,1: 62-65.

Hansen MV, Andersen LT, Madsen MT, Hageman I, Rasmussen LS, Bokmand S, Rosenberg J, Gögenur I, 2014. Effect of melatonin on depressive symptoms and anxiety in patients undergoing breast cancer surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Breast Cancer Res Treat. 145, 3: 683-95.

Hasan M, Marzouk MA, Adhikari S, Wright TD, Miller BP, Matossian MD, Elliott S, Wright M, Alzoubi M, Collins-Burow BM, Burow ME, Holzgrabe U, Zlotos DP, Stratford RE, Witt-Enderby PA, 2019. Pharmacological, Mechanistic, and Pharmacokinetic Assessment of Novel Melatonin-Tamoxifen Drug Conjugates as Breast Cancer Drugs. Mol Pharmacol. 96,2: 272-296.

Jablonska K, Pula B, Zemla A, Kobierzycki C, Kedzia W, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Zabel M, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, 2014. Expression of the MT1 melatonin receptor in ovarian cancer cells. Int J Mol Sci. 12;15(12):23074-89.

Jang H, Lee OH, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M, Lee JW, Hong K, Kim JO, Kim NK, Ko JJ, Lee DR, Yoon TK, Lee WS, Choi , 2016. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. J Pineal Res. 60(3):336-47.

Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM, 2002. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 71,1: 37-45.

Kim JH, Jeong SJ, Kim B, Yun SM, Choi DY, Kim SH, 2012. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. J Pineal Res. 52(2):244-52.

Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, Opatrilova R, Gazdikova K, Caprnda M, Rodrigo L, Danko J, Kruzliak P, 2018. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. Crit Rev Oncol Hematol. 122: 133-143.

Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, XuDP, Li HB, 2017. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. Oncotarget. 8,24: 39896-39921.

Liu D, Ma Z, Di S, Yang Y, Yang J, Xu L, Reiter RJ, Qiao S, Yuan J, 2018. AMPK/PGC1α activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis. Free Radic Biol Med. 129: 59-72.

Ma C, Li LX, Zhang Y, Xiang C, Ma T, Ma ZQ, Zhang ZP, 2015. Protective and sensitive effects of melatonin combined with Adriamycin on ER+ (estrogen receptor) breast cancer. Eur J Gynaecol Oncol 36: 197-202.

Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C, 2018. Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone-Dependent Cancers. Int J Enocrinol. 2;2018:3271948.

Petranka J, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barrett JC, Murphy E, 1999. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. J Pineal Res. 26(3):129-36.

Reiter RJ, 1991. Melatonin: The chemical expression of darkness. Mol Cell Endocrinol. 79: 153–158.

Schwimmer H, Metzer A, Pilosof Y, Szyf M, Machnes ZM, Fares F, Harel O, Haim A, 2013. Light at night and melatonin have opposite effects on breast cancer tumors in mice assessed by growth rates and global DNA methylation. Chronobiology International 31,1: 144–150.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostom RS, Slominski AT, 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. Mol Cell Endocrinol. 351,2: 152–166.

Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ, 2009. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. Fertil Steril. 92(1):328-43.

Treeck O, Haldar C, Ortmann O, 2006. Antiestrogens modulate MT1 melatonin receptor expression in breast and ovarian cancer cell lines. Oncol Rep. 15(1):231-5.

Viswanathan A, Hankinson S, Schernhammer E, 2007. Night shift work and the risk of endometrial cancer. Cancer Res 67,21: 10618-22.

Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, Liu L, Xie F, Kang T, Huang W, Deng W, 2012. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. J Pineal Res. 53,1: 77-90.

Watanabe M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kiguchi K, Ishizuka B, 2008. Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line. J Obstet Gynaecol Res 34,4: 567-73.

Zare H, Shafabakhsh R, Reiter RJ, Asemi Z, 2019. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. J Ovarian Res. 26;12(1):26.

Zisapel N, 2018. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. Br J Pharmacol. 175,16: 3190–3199.

Zhao M, Wan J, Zeng K, Tong M, Lee AC, Ding J, Chen Q, 2016. The Reduction in Circulating Melatonin Level May Contribute to the Pathogenesis of Ovarian Cancer: A Retrospective Study. J Cancer. 27;7(7):831-6.

Zonta YR, Martinez M, Camargo IC, Domeniconi RF, Lupi Júnior LA, Pinheiro PF, Reiter RJ, Martinez FE, Chuffa LG, 2017. Melatonin Reduces Angiogenesis in Serous Papillary Ovarian Carcinoma of Ethanol-Preferring Rats. Int J Mol Sci. 11;18(4).

Comparison of the most important expression systems for the production of recombinant proteins

Tułodziecki Szymon [(1)], Pokora Wojciech [(1)]

[1] Department of Plant Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Gdańsk
Wojciech Pokora: wojciech.pokora@ug.edu.pl

Summary
Therapeutic use of recombinant proteins is their most important application. Despite many different expression systems for their production being developed, to date, creating the one that would meet the worldwide demand in an effective, economic and safe way is still to be achieved. Years of research have brought a lot of data, however comparisons between the systems are hampered by their extensive and descriptive nature. We analyzed 7 expression systems with their most common features. For this, we utilized our own model of classification and parametrization which is based on an ordinal scale. We added up the values assigned to each feature and the result obtained is a qualitative assessment of the suitability of a given system for production of recombinant proteins by biopharming. Positive score was observed only in plant expression systems, which suggests their proper optimization will most likely result in a system that will economically meet the need of the industry.

Key words: recombinant proteins, expression systems, molecular farming, ordinal scale model, GMO

Porównanie najważniejszych systemów ekspresji do produkcji białek rekombinowanych

Streszczenie
Najważniejszym zastosowaniem białek rekombinowanych jest ich terapeutyczne wykorzystanie w farmacji i medycynie. Mimo szeregu opracowanych systemów ekspresyjnych do produkcji tych białek dotychczas nie uzyskano systemu, który w efektywny, opłacalny i bezpieczny sposób zaspokoiłby ogólnoświatowy popyt na tego typu biopolimery. Lata badań przyniosły wiele szczegółowych danych, jednak krytyczne porównania systemów między sobą są utrudnione przez obszerny oraz opisowy charakter informacji na temat każdego z nich. Postanowiliśmy więc porównać 19 najczęściej uwzględnianych cech 7 najważniejszych systemów ekspresyjnych. W tym celu wykorzystaliśmy oparty o skalę porządkową autorski model klasyfikacji i parametryzacji tych właściwości. Przypisane każdej cesze wartości zsumowaliśmy, a wynik stanowi jakościową ocenę przydatności danego systemu do produkcji białek rekombinowanych na drodze biofarmingu. Pozytywne oceny uzyskały jedynie systemy roślinne, co każe sądzić, że ich odpowiednia optymalizacja z największym prawdopodobieństwem pozwoli otrzymać system ekspresyjny, który w ekonomiczny sposób zaspokoi potrzeby różnych gałęzi przemysłu.

Słowa kluczowe: białka rekombinowane, systemy ekspresyjne, uprawy molekularne, klasyfikacja porządkowa, GMO

1. Introduction

Recombinant proteins, also referred as heterologous, are produced in the cells of a living organism which does not contain sequences encoding these proteins in its natural, wild type (WT) genome. Genes required for the synthesis of recombinant proteins originate from species other than host and are incorporated into the target (transgenic) organism with methods of genetic engineering, especially recombinant DNA (rDNA) techniques and recognized as transgenes or heterologous genes (Ma et al., 2003; Ratledge and Kristiansen, 2007; Desai et al., 2010; Gomes et al., 2016). The demand for recombinant proteins is

constantly increasing. The market of heterologous protein accounts for about 10% of the entire pharmaceutical industry and its value is estimated to increase by over 1 billion US$ from year 2017 to 2022 (Markets and Markets, 2017; Usmani et al., 2017). Recombinant proteins are being used in various branches of commerce including cosmetic (e.g. epithelial growth factor, collagen), technical (e.g. trypsin, avidin) or diagnostic (e.g. antibodies) industries and academic research (e.g. aprotinin, cytokines). One of the most important application of these heterologous products is their therapeutic use in medicine and pharmacy (Łucka et al., 2015; Park and Wi, 2016; Tschofen et al., 2016; Schillberg et al., 2019). Today the main strategy for production of recombinant proteins involves the use of expression systems, i.e. living organisms or parts thereof (e.g. cells, tissues), genetically modified with appropriate expression cassettes as a way to support the production of foreign, heterologous proteins (Desai et al., 2010; Gomes et al., 2016).

Since the successful transformation of a living organism with recombinant DNA molecules (Cohen et al., 1973) and Food and Drug Administration's (FDA) approval for the first usage of recombinant protein for therapeutic purposes in 1982 (Usmani et al., 2017; Owczarek et al., 2019), a number of expression systems based on organisms from many different taxonomic units have been developed. As of today, heterologous proteins are obtained mainly by biopharming, with cultures of bacteria and fungi, as well as animals and plants (Schillberg et al., 2003; Yin et al., 2007; Gomes et al., 2016; Owczarek et al., 2019). One of the major breakthroughs in research on the development of new expression systems was the successful, stable transformation of Tex-Mex tobacco (*Nicotiana plumbaginifolia*) callus cells with functional *Escherichia coli* chimeric neomycin phosphotransferase II (EC 2.7.1.95) gene responsible for kanamycin resistance. Plants regenerated from transformed cells were able to grow on a medium with a high antibiotic concentration, as well as inherit the transgene for subsequent generations (Horsch et al., 1984). Two years later, a plant expression system was developed as one of the last methods for production of recombinant therapeutic proteins (Ma et al., 2003).

To date, no expression platform has been developed that would meet all the features of an effective, economic and secure expression system (Desai et al., 2010). Despite availability of numerous methods and expression systems, each of them has its own advantages and disadvantages. Low quality of products, high risk of contamination with endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) and lack of post-translational modifications are the main drawbacks of typical bacterial expression systems such as genetically modified (GM) *E. coli*. For mammalian cell culture systems (e.g. Chinese hamster ovary, CHO) these are very high

costs of production, possible contamination with hazardous prions, viruses and oncogenic DNA as well as low scalability (Gomes et al., 2010; Owczarek et al., 2019).

Years of research on the production of recombinant proteins has provided extensive, comparative data on existing expression systems. The main problem in this case is the fact that all data are published in the form of multi-page scientific articles or descriptive tables which effectively prevent simple and reliable system comparisons. To face the problem of the multisets and a "holistic" choice of optimal recombinant protein expression platform, we aimed to conduct a critical comparison between different traits of known systems which in the end would result in choosing the best candidate to create the "gold standard" i.e. expression system characterized by low production costs, high quality of expressed proteins, efficiency and speed of production as well as high availability and safety. Therefore, on the basis of data available in scientific papers, we propose the ordinal scale-based model for classification and parametrization of known expression systems dedicated to compare their distinctive features.

2. Comparison of expression systems

Seven expression systems were compared, using their most important and most frequently appearing features. Each of these traits have been grouped into four parametric categories. For the purpose of the analysis we have distinguished financial, manufacturing, technical and safety parameters. Numeric values in the range [-2, +2] have been assigned to each of the considered feature depending on how given property affects the use of an expression system to obtain heterologous proteins in such quantities as to economically meet the demand of various branches of industry (Stevens, 1946). Negative values characterize properties that impede the use of a given expression system to obtain heterologous proteins in such quantities as to economically meet the demand of the industry. Positive values describe features that favor the use of a given expression system for this purpose. Zero values have been assigned to properties that are neither a disadvantage nor an advantage in this context. In summary, the features described by:

- -2 are very big drawbacks,
- -1 are big drawbacks,
- 0 are neutral,
- +1 are big advantages,
- +2 are very big advantages.

Due to data discrepancy, some of the parameters were described in the form of a range of features. Numerical values assigned in these cases are the arithmetic mean of the results in each of the traits covered by this range (Medhi, 1992) e.g. range of features "low-high"

describing protein production yield by transgenic plants is characterized by the value of 0, which is the average of the results -1 in the case of “low” trait, 0 of “medium” trait and +1 of “high” trait (Tab. 1.).

Table 1. Comparison of the most important expression systems for recombinant protein production. The compared features were grouped into appropriate parameter categories.

	Bacteria	Yeast	Insect cell culture	Mammalian cell culture	Transgenic animals	Plant cell culture	Transgenic plants
FINANCIAL PARAMETERS							
Capital cost	medium	medium	high	very high	high - very high	high - very high	low
	0	0	-1	-2	-1,5	-1,5	+1
Operating cost	low	medium	high	very high	medium - high	high - very high	low
	+1	0	-1	-2	-0,5	-1,5	+1
Storage cost	medium	medium	high	high - very high	high	low - medium	very low - low
	0	0	-1	-1,5	-1	+0,5	+1,5
Scale-up cost	high	high	very high	high - very high	high	high	very low - medium
	-1	-1	-2	-1,5	-1	-1	+1
Overall production cost	low - medium	medium	medium - high	high	high	low - medium	very low - low
	+0,5	0	-0,5	-1	-1	+0,5	+1,5
MANUFATIRUNG PARAMETERS							
Production scale	limited	limited	limited	limited	limited	limited	worldwide
	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+2
Scale-up capacity	high	high	medium - high	very low	low	medium - high	very high
	+1	+1	+0,5	-2	-1	+0,5	+2
Speed of production	high	medium - high	medium	low	very low - low	medium - high	low
	+1	+0,5	0	-1	-1,5	+0,5	-1
Propagation ability	high	high	low	low	medium	high	high
	+1	+1	-1	-1	0	+1	+1
	Bacteria	Yeast	Insect cell culture	Mammalian cell culture	Transgenic animals	Plant cell culture	Transgenic plants

Table 1. (continued)

TECHNICAL PARAMETERS							
Multigene engineering	yes	no	no	no	no	yes	yes
	+2	-2	-2	-2	-2	+2	+2
Protein production yield	medium - high	medium - high	medium - high	medium - high	high	high	low - high
	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+1	+1	0
Protein folding accuracy	low	medium	high	high	high	high	high
	-1	0	+1	+1	+1	+1	+1
Multimeric assembly	no	no	no	no	yes	yes	yes
	-2	-2	-2	-2	+2	+2	+2
Glycosylation	no	yes[a]	yes[b]	yes	yes	yes[c]	yes[c]
	-2	-2	+1	+2	+2	+1	+1
Product quality	low	medium	medium - high	high - very high	high - very high	high	high
	-1	0	+0,5	+1,5	+1,5	+1	+1
SAFETY PARAMETERS							
Contamination risk	high	low - medium	low - high	high	high	low	low
	-1	+0,5	0	-1	-1	+1	+1
Safety	low	unknown	medium	low - high	high	nonspecific	high
	-1	-2	0	0	+1	0	+1
GMP[d] conformity	possible	possible	possible	possible	possible	possible	difficult
	+2	+2	+2	+2	+2	+2	-2
Ease of distribution	medium	medium	low	low	low	low	high
	0	0	-1	-1	-1	-1	+1

Footnotes: a) incorrect (i.a. hyperglycolysation, higher mannosylation), b) minor differences (i.a. higher mannosylation), c) minor differences (i.a. α-1,3-fucose and β-1,4-xylose sugar residues), glycosylation absent in chloroplasts [the possibility of glycosylation determined in relation to that occurring in human body], d) Good Manufacturing Practice.

Based on and modified from: Ma et al. 2003, Schillberg et al. 2003, Spök and Karner 2008, Desai et al. 2010, Ahmad and Mukhtar 2013, Łucka et al. 2015, Yao et al. 2015, Corbin et al. 2016, Gomes et al. 2016, Yan et al. 2016, Owczarek et al. 2019, Siddiqui et al. 2019.

3. Results of numerical analysis

The values of the features in table 1. have been added up for each system (Tab. 2.). The sum is therefore a qualitative assessment of the suitability of a given expression system and determines its potential for use in recombinant protein biopharming.

Table 2. Results of comparison of expression systems for recombinant protein production, using authors' model of classification and parametrization of their features.

	Bacteria	Yeast	Insect cell culture	Mammalian cell culture	Transgenic animals	Plant cell culture	Transgenic plants
Result (sum)	-1	-4,5	-7	-12	-2	+8	+18

Expression systems based on bacteria, yeasts and animals show negative qualitative rates. Mammalian cell culture received the lowest score of all, with -12 points in our classification. Features grouped in the financial and manufacturing parameter categories had the highest impact on our results. This situation is in accordance with general characteristics of production of recombinant products in this system. Due to similarities of anatomy and physiology with human cells, mammalian cultures produce proteins of very high quality which can be approved much easier for general use as therapeutics (technical and safety parameters) (Ratledge and Kristiansen, 2007; Owczarek et al., 2019). On the other hand, the production of these proteins is both complicated and costly with no ease of scaling up GM cultures which is caused by i.a. expensive media supporting the unnatural suspension growth of these cells and their slow proliferation (Schillberg et al., 2003; Gomes et al., 2016).

Bacteria and transgenic animals received negative, but higher than mammalian cell cultures score (-1 and -2 points respectively). In the case of bacterial expression systems financial factors are not as limiting as in the previous expression method. Technical parameters seem beneficial for their usage in biopharming of proteins. Serious disadvantages are grouped mainly in the category of manufacturing parameters, where factors determining quality of heterologous products remain the biggest weakness of this system (Yin et al., 2007; Spök and Karner, 2008). Transgenic animals share with mammalian cell cultures some characteristics, but limiting factors are not as severe. In this system the production of proteins is carried out in cells and tissues of fully functioning organisms, predominantly farm animals, leading to facilitation of overall production and improvement of some technical parameters such as multimeric protein assembly (Schillberg et al., 2003; Owczarek et al., 2019).

Rates of yeast with -4,5 points and insect cell cultures with -7 points place in the middle of the results of expression systems mentioned above. In both instances, features negatively and positively affecting optimal production of recombinant proteins are spread throughout all

four parametric categories. One exception being financial traits of an insect cell system, that contribute to the increase in spending (Łucka et al., 2015; Owczarek et al., 2019; Siddiqui et al., 2019). Costs of yeast cultures are lower, however incorrect glycosylation of proteins, impossible multigene engineering and unknown safety of the products are main disadvantages (Spök and Karner, 2008; Ahmad and Mukhtar, 2013; Yan et al., 2016). Safety is a major concern when recombinant proteins are to be used as therapeutics, especially when people are their target consumers (Gomes et al., 2016).

On the contrary to others, the systems based on plant cell cultures and transgenic plants have positive qualitative results for both of these expression systems. Limitations of GM plant cell cultures can be observed only in financial parameters which are typical for all suspension systems dependent on cells of multicellular species showing high organization of tissues and organs (Spök and Karner, 2008; Corbin et al., 2016; Schillberg et al., 2019). Nevertheless, other factors of this system are highly favorable for its use as an optimal platform for expression of recombinant proteins as evidenced by sum of +8 points received. However, among all analyzed systems, transgenic plants earned the highest score in our classification of +18 points. Among considered parameters there is none that would have definitely worked against this system. Most of considered traits characterizing GM plants as bioreactors for heterologous protein production are beneficial.

4. Summary and future perspectives

Study of available scientific data as well as results of comparative numerical analysis presented in this article leads to the conclusion that after proper optimization, systems based on plants, mainly whole, transgenic specimens may become an optimal expression platform to sustainably, economically and safely meet worldwide demand for recombinant proteins. Plant potential is also noticeable in recent advancements in this system. Differences in glycosylation pattern, often brought up in discussion on the safety of recombinant products from plants are being slowly dealt with thanks to the development of CRISPR/Cas9 technology (Jansing et al., 2019). Additionally, production of ZMapp™ in transgenic tobacco led to a successful treatment of patients infected with the Ebola virus during the African epidemic in 2014. This helped pushing the efforts to overcome drawbacks of GM plants, which are low production speed, variable product yield and difficulties with meeting the demands of Good Manufacturing Practices (Yao et al., 2015; Park and Wi, 2016).

Again, it is worth mentioning that the above comparison includes only the most important features and most popular systems of expression. To obtain even more authoritative data, other expression systems (e.g. those based on filamentous fungi, other species of

bacteria or even cell-free expression platforms) (Yin et al., 2007; Schillberg et al., 2019) and features (e.g. possible threats towards biodiversity or codon bias) should be included (Łucka et al., 2015; Yin et al., 2007). However, this basic analysis suggests it is worth redirecting research on the production of recombinant proteins on industrial scale towards plants, because these systems most likely will bring the best results.

5. References

Ahmad N., Mukhtar Z. 2013. Green factories: plastids for the production of foreign proteins at high levels. Gene Therapy and Molecular Biology 15: 14-29.

Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. 1973. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 70, 11: 3240-3244.

Corbin J.M., Hashimoto B.I., Karuppanan K., Kyser Z.R., Wu L., Roberts B.A., Noe A.R., Rodriguez R.L., McDonald K.A., Nandi S. 2016. Semicontinuous Bioreactor Production of Recombinant Butyrylcholinesterase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. Frontiers in Plant Science 7: 412.

Desai P.N., Shrivastava N., Padh H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. Biotechnology Advances 28, 4: 427-435.

Gomes A.R., Byregowda S.M., Veeregowda B.M., Balamurugan V. 2016. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. Advances in Animal and Veterinary Sciences 4, 7: 346-356.

Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. 1984. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. Science 223: 496-498.

Jansing J., Sack M., Augustine S.M., Fisher R., Bortesi L. 2019. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β-1,2-xylose and core α-1,3-fucose. Plant Biotechnology Journal 17: 350-361.

Łucka M., Kowalczyk T., Szemraj J., Sakowicz T. 2015. Plants as an alternative source of therapeutic proteins. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 69: 362-373.

Ma J. K-C., Drake P.M. W., Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews, Genetics 4: 794-805.

Markets and Markets 2017. Protein expression market by type (*E. coli*, mammalian, yeast, Pichia, insect, baculovirus, cell-free), products (competent cells, reagents, instruments, services), application (therapeutic, research, industrial) & end user – global forecast to 2022. Report Code BT 2435.

Medhi J. 1992. Statistical Methods: An Introductory Text. New Age International Publishers: 53-58.

Owczarek B., Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K. 2019. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. BioMed Research International 2019: ID 4216060.

Park K.Y., Wi S.J. 2016. Potential of Plants to Produce Recombinant Protein Products. Journal of Plant Biology 59: 559-568.

Ratledge C., Kristiansen B. (eds.) 2006. Basic Biotechnology: Third Edition. Cambridge University Press: 82-105, 349-371.

Schillberg S., Fisher R., Emans N. 2003. "Molecular farming" of antibodies in plants. Naturwissenschaften 90: 145-155.

Schillberg S., Raven N., Spiegel H., Rasche S., Buntru M. 2019. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. Frontiers in Plant Science 10: 720.

Siddiqui A., Wei Z., Boehm M, Ahmad N. 2019. Engineering microalgae through chloroplast transformation tu produce high-value industrial products. Biotechnology and Applied Biochemistry DOI: 10.1002/bab.1823.

Spök A., Karner S. 2008. Plant molecular farming: opportunities and challenges. JRC Technical and Scientific Reports (eds. Stein A.J., Rodríguez-Cerezo E.), EUR 23383.

Stevens S.S. 1946. On the Theory of Scales of Measurement. Science, New Series 103, 2684: 677-680.

Tschofen M., Knopp D., Hood E., Stöger E. 2016. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. Annual Review of Analytical Chemistry 9: 271-294.

Usmani S.S., Bedi G., Samuel J.S., Singh S., Kalra S., Kumar P., Ahuja A.A., Sharma M., Gautam A., Raghava G.P.S. 2017. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. PLoS ONE 12, 7: e0181748.

Yao J., Weng Y., Dickey A., Wang K.Y. 2015. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. Internationa Journal of Molecular Sciences 16: 28549-28565.

Yan N., Fan C., Chen Y., Hu Z. 2016. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. International Journal of Molecular Sciences 17: 962

Yin J., Li G., Ren X., Herrler G. 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. Journal of Biotechnology 127, 3: 335-347.

Układ glimfatyczny i jego rola w patogenezie wybranych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego

Tyliszczak Michał [(1)]

[1] SKN Neurologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Michał Tyliszka: michtyl@tlen.pl

Streszczenie
W organach ludzkich i zwierzęcych produkty uboczne przemiany materii komórek są usuwane z przestrzeni międzykomórkowej przez sieć naczyń limfatycznych. Wyjątkiem od tej reguły jest ośrodkowy układ nerwowy, który nie ma tak działających sieci naczyń limfatycznych, a rolę oczyszczania tkanki nerwowej przypisuje się niedawno poznanemu układowi glimfatycznemu. Układ glimfatyczny nie tylko usuwa zbędne metabolity, ale również dostarcza substancje odżywcze. Pomimo że większość prac badających układ glimfatyczny oparta jest na doświadczeniach na zwierzętach, to jednak istnieją prace potwierdzające istnienie układu glimfatycznego u ludzi. Niniejszy artykuł stanowi przegląd aktualnych prac na temat badań poświęconych budowie i działaniu układu glimfatycznego oraz opisuje rolę, jaką pełni on w fizjologii i patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego.

Słowa kluczowe: układ glimfatyczny, szlak glimfatyczny, oczyszczanie

Glymphatic system and its role in the background of selected diseases of the central nervous system

Summary
In humans and animals organs, cell metabolism by-products are removed from the intercellular space through a network of lymphatic vessels. The exception to this rule is the central nervous system, which does not have such a functioning lymphatic network, and the role of cleansing the nerve tissue is attributed to the newly known glymphatic system. The glymphatic system not only removes unnecessary metabolites, but also provides nutrients. Although most of the studies examining the glymphatic system are based on animal experiments, there are works confirming the existence of the glymphatic system in humans. This article constitutes a review of recent works on research devoted to the structure and operation of the glymphatic system and describes the role it plays in the physiology and pathophysiology of the central nervous system.

Keywords: glymphatic system, glymphatic pathway, by-products cleaning

1. Wprowadzenie

Dla każdego organu oczyszczanie jego tkanek z produktów przemiany materii jest kluczowe, by zachować homeostazę. Układ nerwowy cechuje się wyjątkowo wysokim metabolizmem, a neurony, z których jest zbudowany, charakteryzuje duża wrażliwość na zmiany warunków ich otoczenia. Mimo to mózg nie posiada typowych naczyń limfatycznych charakterystycznych dla innych organów, które to w założeniu mają oczyszczać tkanki z produktów przemiany materii i dbać o zachowanie homeostazy. Niedawne odkrycie układu glimfatycznego rzuca nowe światło na sposób, w jaki mózg oczyszcza się z własnych metabolitów (Iliff i in., 2012). Swą nazwę układ glimfatyczny (ang. „glymphatic system") zawdzięcza komórkom glejowym (glia), które w dużej mierze warunkują jego

funkcjonowanie oraz układowi limfatycznemu (lymphatic system), którego oczyszczającą funkcję zastępuje.

2. Materiał i metody

Tworząc tę pracę przeglądową posługiwano się wyszukiwarkami artykułów naukowych: Pubmed oraz Google Scholar. Wyszukiwanie artykułów było oparte o następujące słowa kluczowe: glymphatic system, glymphaticpathway, patophysiology, sleep, clearance, central nervous system. Wybrane zostały doniesienia w języku angielskim oraz Polskim, opublikowane w latach 2012-2019, przy czym priorytetowo traktowano ich aktualność. Ilustracje zamieszczone w artykule zostały sporządzone przez autora, w oparciu o cytowane w tekście źródła, przy użyciu programów komputerowych Gimp, Inkscape, LibreOffice Impress.

3. Budowa i funkcjonowanie układu glimfatycznego

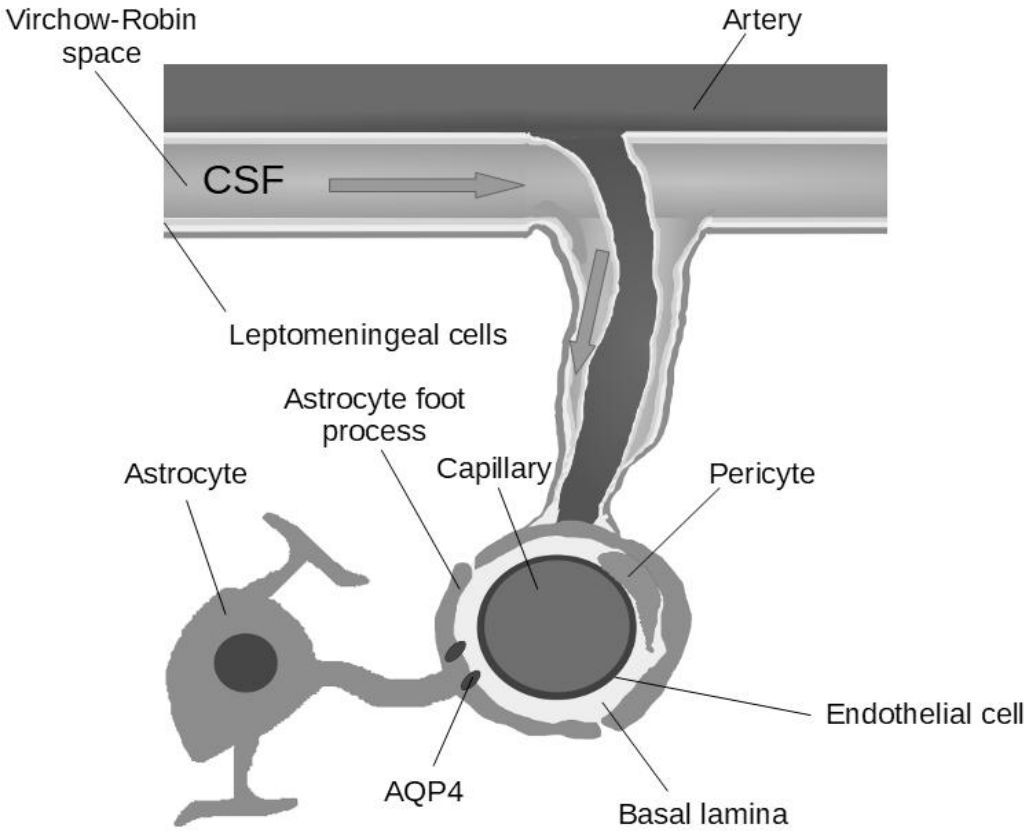
Płyn mózgowo-rdzeniowy

W strukturach mózgowia można wyróżnić cztery rodzaje płynów: płyn wewnątrzkomórkowy, którego jest najwięcej i stanowi od 60% do 86% wszystkich płynów; płyn międzykomórkowy stanowiący od 12% do 20%; krew zawartą w naczyniach mózgu i płyn mózgowo-rdzeniowy, których to zawartości wynoszą 10% każda (Jessen, i in., 2015). Tradycyjnie uważa się, że płyn mózgowo-rdzeniowy krąży w przestrzeni ośrodkowego układu nerwowego, począwszy od jego produkcji przez splot naczyniówkowy, a kończąc na reabsorbsorcji przez ziarnistości pajęczynówki, skąd trafia do zatok opony twardej. Jednakże niedawne odkrycia oponowych naczyń limfatycznych oraz układu glimfatycznego sugerują, że nie jest to jedyna droga, jaką może obrać płyn mózgowo-rdzeniowy (Iliff i in., 2012; Louveau i in., 2015).

Układ glimfatyczny

W budowie układu glimfatycznego należy wyróżnić trzy strefy: przestrzeń okołonaczyniową naczyń tętniczych penetrujących mózg (periarterial space), przestrzeń okołonaczyniową dużych naczyń żylnych (perivenous space) oraz miąższ mózgu (brain parenchyma) znajdujący się pomiędzy nimi (Louveau i in., 2017; Rasmussen i in., 2018). Na miąższ mózgu, prócz komórek nerwowych i glejowych składa się również przestrzeń śródmiąższowa (interstitial space; ISS), która jest kluczowa dla funkcjonowania układu glimfatycznego. W niej, poza substancją międzykomórkową, znajdują się produkty przemiany materii okolicznych komórek, które są usuwane przez układ glimfatyczny (patrz niżej – szlak glimfatyczny, Plog i in., 2018; Rasmussen i in., 2018). Przestrzenie okołonaczyniowe naczyń żylnych i tętniczych, zwane też przestrzenią Virchowa-Robina (Virchow-Robin space),

zawierają płyn mózgowo-rdzeniowy i biegną wzdłuż naczyń krwionośnych mózgu. Od tych naczyń, a także od miąższu mózgu, są oddzielone blaszką podstawną (basal lamina) oraz warstwą komórek opon miękkiej i pajęczej (leptomeningeal cells), a dodatkowo, od strony miąższu mózgu pokryte są warstwą wypustek astrocytarnych (patrz rys. 1). Wraz z przechodzeniem naczyń w kapilary, przestrzeń Virchowa-Robina zmniejsza się, by w końcu płynnie przejść w blaszkę podstawną, która wraz z komórkami śródbłonka (endothelial cell), pericytami (pericyte) oraz astrocytami (astrocyte) składa się na barierę krew-mózg (Jessen i in., 2015; Koper-Lenkiewicz i in., 2018). Wypustki astrocytów, zwane też stopkami końcowymi (astrocyte foot process) posiadają dużą liczbę kanałów akwaporynowych AQP4, które są kluczowe dla działania układu glimfatycznego (patrz niżej – szlak glimfatyczny).



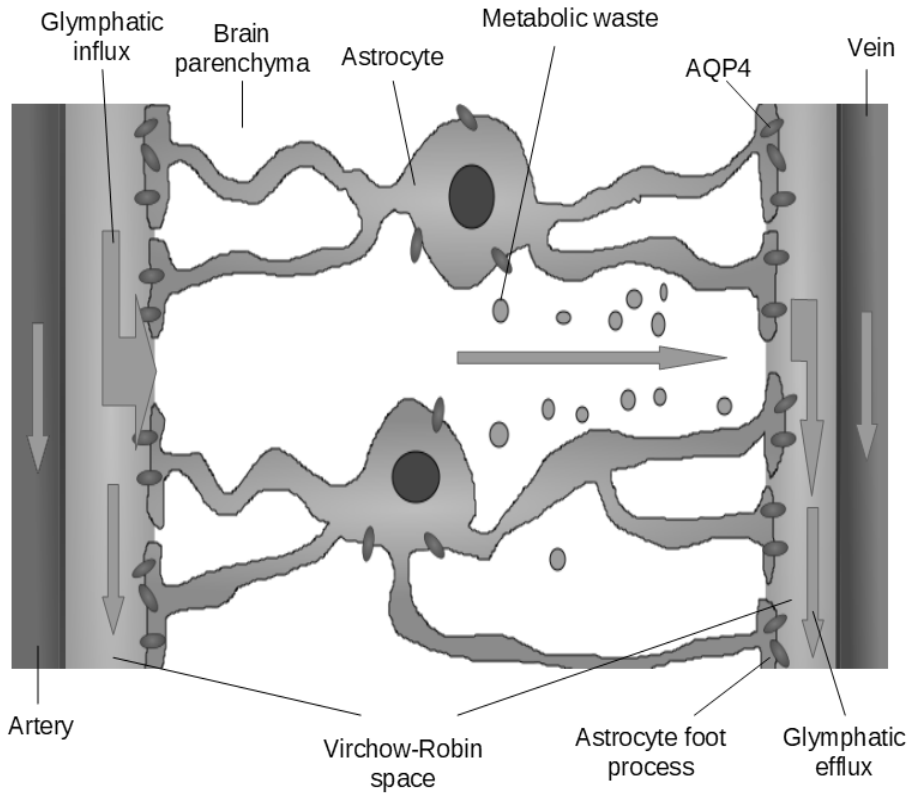
Rys. 1. Naczynia penetrujące mózg oraz towarzyszące im przestrzenie Virchowa-Robina. Na podstawie (Jessen i in., 2015)

Szlak glimfatyczny

Szlak glimfatyczny określa struktury anatomiczne składające się na układ glimfatyczny oraz związaną z tym układem dynamikę płynów. Działanie szlaku zapewniają płyn mózgowo-rdzeniowy (Cerebrospinal fluid; CSF) oraz płyn śródmiąższowy (interstital fluid; ISF). Płyn mózgowo-rdzeniowy wnika z przestrzeni podpajęczynówkowej do przestrzeni okołonaczyniowych tętnic, skąd następnie przenika do przestrzeni śródmiąższowej mózgu.

W przestrzeni śródmiąższowej zachodzi wymiana pomiędzy napływającym płynem mózgowo-rdzeniowym a płynem śródmiąższowym (CSF-ISF exchange), w wyniku której mieszanina płynu mózgowo-rdzeniowego i śródmiąższowego przenika do żylnej przestrzeni okołonaczyniowej, a następnie do przestrzeni podpajęczynówkowej (Louveau i in., 2017; Plog i in., 2018). Napływ glimfatyczny (glymphatic influx) jest to wydajność, z jaką CSF dostarcza substancje do przestrzeni śródmiąższowej, natomiast odpływ glimfatyczny (glymphatic efflux) jest to wydajność, z jaką metabolity są usuwane z tej przestrzeni poprzez wcześniej wspomnianą mieszaninę (Rasmussen i in., 2018). Prace doświadczalne na gryzoniach (Iliff i in., 2012) wykazały, że przepływ między przestrzenią Virchowa-Robina, a przestrzenią śródmiąższową, zależy w dużej mierze od kanałów akwaporynowych AQP4 znajdujących się na astrocytach. W badaniach tych mierzono napływ i odpływ glimfatycznych specjalnie znakowanych fluorescencyjnie substancji w zależności od tego, czy kanały AQP4 działały normalnie lub czy ich aktywność została wyciszona. Gdy kanały AQP4 uległy wyciszeniu napływ glimfatyczny zmniejszył się o 65%, natomiast odpływ glimfatyczny o 55%. Zauważono też, że znakowane substancje, które były usuwane przez układ glimfatyczny z przestrzeni śródmiąższowej do żylnej przestrzeni okołonaczyniowej trafiały następnie do przestrzeni podpajęczynówkowej. Stamtąd część z nich wnikała do naczyń limfatycznych opony twardej, skąd następnie były transportowane do węzłów chłonnych poza jamą czaszki (Louveau i in., 2015). Wprawdzie konkretne mechanizmy odpowiedzialne za przepływ substancji przez szlak glimfatyczny nie zostały w pełni poznane, to jednak istnieją prace, które pozwalają zdefiniować część z transportowanych substancji (Jessen i in., 2015; Plog i in., 2018). Wynika z nich, że płyn mózgowo-rdzeniowy dostarcza glukozę i apolipoproteinę E, natomiast mieszanina płynów mózgowo-rdzeniowego i śródmiąższowego usuwa mleczany oraz Aβ-amyloid. Zmniejszenie napływu lub odpływu glimfatycznego obserwuje się często w wielu schorzeniach dotyczących ośrodkowego układu nerwowego (Rasmussen i in., 2018). Jednym z lepiej poznanych czynników wpływających na wydajność szlaku glimfatycznego, jest sen głęboki, podczas którego wydajność ta wzrasta (Benveniste i in., 2019; Hauglund i in., 2019). W badaniach przeprowadzanych na gryzoniach zauważono, że w czasie stanu czuwania przepływ znaczonych substancji przez układ glimfatyczny był minimalny , natomiast w stanie snu przepływ ten rósł gwałtownie już od momentu zaśnięcia (Hauglund i in., 2019). Co więcej, największą aktywność układu glimfatycznego zauważono w czasie trwania snu głębokiego odpowiadającemu III i IV stadium snu NREM, co związane jest z obecnością w tych stadiach wolnych fal delta. Wolnym falom delta towarzyszy zwiększenie przestrzeni śródmiąższowej mózgu, co może

zmniejszać opór dla przepływu glimfatycznego (Hauglund i in., 2019; Mendelsohn i in, 2013; Szelenberger, 2007). Zwiększone działanie układu glimfatycznego zostało również zauważone w czasie działania niektórych leków anestetycznych, takich jak ketamina lub ksylazyna (Benveniste i in., 2019). Nie zaobserwowano go natomiast pod wpływem izofluranu, co według niektórych badaczy jest związane ze zbyt małą aktywnością fal delta w czasie działania tego leku (Abbott i in., 2018; Hauglund i in., 2019). Warto uwzględnić fakt, że pozycja snu także wpływa na efektywność szlaku glimfatycznego. Wykazano, że największy przepływ substancji przez układ glimfatyczny odbywa się w pozycji bocznej, a najmniejszy w pozycji leżącej na brzuchu (Benveniste i in., 2019; Plog i in., 2018). Udowodniono również, że deprywacja snu powodowała, że w przestrzeni śródmiąższowej dochodziło do akumulacji substancji, które usuwa układ glimfatyczny, co otwiera drogę rozważaniom łączącym układ glimfatyczny i schorzenia, którym towarzyszą problemy ze snem.



Rys. 2. Działanie szlaku glimfatycznego. Na podstawie (Louveau i in., 2017)

4. Układ glimfatyczny a patofizjologia ośrodkowego układu nerwowego

Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimiera (Alzheimer disease) jest chorobą neurodegeneracyjną, a jej patogeneza nie jest wciąż jednoznacznie ustalona. Jednakże wiadome jest, że u jej podłoża leży m.in. odkładanie się złogów wewnątrzkomórkowych białka Tau oraz

zewnątrzkomórkowych β-amyloidu, co powoduje śmierć neuronów (Gajewski, 2018). Doświadczenia na modelach zwierzęcych dostarczają coraz więcej faktów łączących chorobę Alzheimera i układ glimfatyczny (Rasmussen i in., 2018). Jak wcześniej wspomniano, wyciszenie kluczowych kanałów AQP4 dla układu glimfatycznego zmniejszyło o 55% odpływ znakowanych substancji z przestrzeni śródmiąższowej. W kontekście choroby Alzheimera, zwraca uwagę fakt, iż jedną ze znakowanych substancją był β-amyloid (Iliff i in., 2012; Rasmussen i in., 2018). Co więcej, w tych samych badaniach stwierdzono również, że β-amyloid nie opuszcza jamy czaszki poprzez oponowe naczynia limfatyczne jak inne znakowane substancje, natomiast wnika on do przestrzeni okołonaczyniowej tętnic, skąd ponownie trafia do przestrzeni śródmiąższowej mózgu. Sugeruje się, że zaburzenia przepływu szlaku glimfatycznego mogą się w ten sposób przyczyniać do odkładania złogów β-amyloidu. Ponadto według niektórych badań już sama obecność licznych złogów β-amyloid dodatkowo pogarsza funkcjonowanie układu glimfatycznego przyczyniając się tym do powstania schematu błędnego koła (Louveau i in., 2017; Rasmussen i in., 2018). Osobom z chorobą Alzheimera towarzyszą liczne problemy ze snem w tym bezsenność (Siemiński, 2017). Niektórzy wiążą występowanie zaburzeń snu u tych osób z niedostatecznym funkcjonowaniem układu glimfatycznego i odkładaniem się złogów β-amyloidu (Rasmussen i in., 2018). Badania pośmiertne metodami immunohistochemicznymi mózgów osób będących w zaawansowanych stadiach choroby Alzheimera wykazały liczne nieprawidłowości w rozmieszczeniu kanałów AQP4 na astrocytach, lecz nie udało się jednoznacznie określić, czy zmiany te były skutkiem czy przyczyną złogów β-amyloidu (Rasmussen i in., 2018).

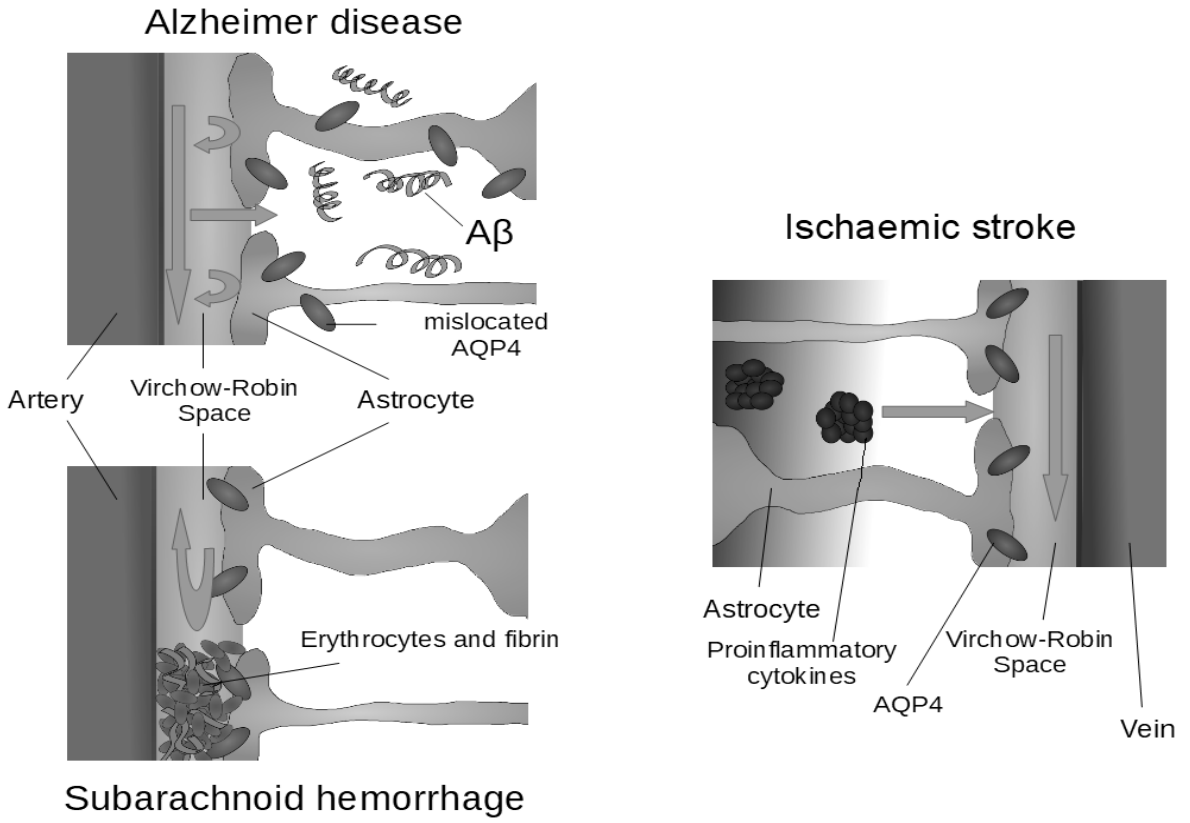
Urazowe uszkodzenie mózgu

W badaniach dotyczących urazowego uszkodzenia mózgu dowiedziono, że układ glimfatyczny w dużej mierze pośredniczy w transporcie biomarkerów uszkodzenia z tkanki mózgowej do surowicy krwi (Plog i in., 2015). W doświadczeniach tych gryzoniom z urazowym uszkodzeniem mózgu blokowano funkcjonowanie układu glimfatycznego poprzez wytłumienie aktywności kanałów AQP4, deprywacje snu lub poprzez zabiegi chirurgiczne i środki farmakologiczne mające na celu obniżenie ilości płynu mózgowo-rdzeniowego. W trakcie tego badania mierzono przepływ glimfatyczny za pomocą znakowanych substancji oraz stężenie biomarkerów urazowego uszkodzenia mózgu. We wszystkich przypadkach zaobserwowano drastyczne obniżenie stężeń biomarkerów urazowego uszkodzenia mózgu w surowicy krwi w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano, że już samo urazowe uszkodzenie mózgu negatywnie wpływa na wydajność

układu glimfatycznego (Plog i in., 2015). Zależności między opisywanymi metodami badawczymi (deprywacja snu, działania chirurgiczne bądź farmakologiczne skutkujące obniżeniem ilości płynu mózgowo-rdzeniowego) a wiarygodnością pomiarów stężeń biomarkerów urazowego uszkodzenia mózgu wymagają jednak dalszych pogłębionych analiz.(Plog i in., 2015; Rasmussen i in., 2018).

Krwotok podpajęczynówkowy

W modelach zwierzęcych krwawienia podpajęczynówkowego (Subarachnoid hemorrhage) stwierdzano upośledzenie funkcjonowania układu glimfatycznego. Przyczyną tego jest nagromadzenie się w przestrzeniach okołonaczyniowych składników krwi, przede wszystkim fibryny. Po podaniu dokomorowym środka fibrynolitycznego w postaci tkankowego aktywatora plazminogenu został przywrócony przepływ glimfatyczny, co może stwarzać ciekawą perspektywę w terapii powikłań krwawienia podpajęczynówkowego (Rasmussen i in., 2018).



Rys. 3. Udział układu glimfatycznego w przebiegu wybranych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego. Na podstawie (Rasmussen i in., 2018)

Udar niedokrwienny mózgu

Badając udar niedokrwienny (Ischaemic stroke) na modelach zwierzęcych odkryto, że w ciągu 3 godzin od wystąpienia udaru następuje znaczne upośledzenie w funkcjonowaniu układu glimfatycznego (Rasmussen i in., 2018). Następuje zamknięcie przestrzeni Virchowa-

Robina, które ustępuje dopiero po 24 godzinach od przywrócenia prawidłowego przepływu krwi w niedokrwionych obszarach. Układ glimfatyczny wznawia wtedy swoje funkcjonowanie, jednakże jest ono częściowo upośledzone, ponieważ ponownie otwarte przestrzenie Virchowa-Robina posiadają mniejsze światło niż przed zamknięciem. Najważniejszy jest jednak pozytywny efekt działania układu glimfatycznego, jaki został zasugerowany przez badaczy podczas obserwacji przebiegu udaru (Rasmussen i in., 2018). Poprzez układ glimfatyczny usuwane są cytokiny prozapalne z uszkodzonych rejonów, w których występują one w dużych stężeniach i są jednocześnie toksyczne dla nieuszkodzonych komórek nerwowych. Poza lepszym poznaniem przebiegu procesów związanych z ostrym niedokrwieniem mózgu, obserwacje te mogą w przyszłości mieć pewne implikacje terapeutyczne.

Cukrzyca

Choć cukrzyca nie należy do pierwotnych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, jej powikłania często dotyczą tego układu. Cukrzyca m.in. zwiększa ryzyko zaburzeń poznawczych z demencją włącznie, zwłaszcza w wieku podeszłym (Zhang i in., 2019). Na modelach zwierzęcych z farmakologicznie indukowaną cukrzycą zaobserwowano zmiany w obrębie hipokampu, który jest ściśle powiązany z procesami uczenia się. Zmiany obejmowały zaburzenia mikronaczyniowe oraz utratę immunoreaktywności kanałów APQ4. Dodatkowo funkcjonowanie układu glimfatycznego było również zaburzone w rejonie hipokampu, co pozwala podejrzewać, że istnieje związek pomiędzy pogorszeniem zdolności poznawczych w przebiegu cukrzycy a upośledzeniem szlaku glimfatycznego (Zhang i in., 2019).

5. Wnioski

Znajomość fizjologii i znaczenia niedawno odkrytego układu glimfatycznego wciąż pozostaje niepełna i opiera się głównie na badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych. Badania te dostarczają jednak szeregu interesujących obserwacji i pozwalają dostrzec w tej tematyce potencjał nie tylko poznawczy, ale także obiecujący w kontekście rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego.

6. Literatura

Abbott, N. J., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D., & Thorne, R. G. (2018). The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a ‘glymphatic’ system? Acta Neuropathologica, 135(3), 387–407. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4

Benveniste, H., Heerdt, P. M., Fontes, M., Rothman, D. L., & Volkow, N. D. (2019). Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States. Anesthesia and analgesia, 128(4), 747–758. https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004069

Hauglund, N. L., Pavan, C., & Nedergaard, M. (2019). Cleaning the sleeping brain – The potential restorative function of the glymphatic system. Current Opinion in Physiology. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.10.020

Gajewski P. (red.): Interna Szczeklika. Medycyna Praktyczna, Kraków 2018

Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. Science Translational Medicine, 4(147). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748

Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. Neurochemical Research, 40(12), 2583–2599. https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6

Koper-lenkiewicz, O. M., Kamińska, J., Lewoniewska, S., & Wilińska, E. (2018). Rola bariery krew–płyn mózgowo- -rdzeniowy i bariery krew–mózg w utrzymaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego. Polski Przegląd Neurologiczny, 14(4), 200–208.

Louveau, A., Plog, B. A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., & Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. Journal of Clinical Investigation, 127(9), 3210–3219. https://doi.org/10.1172/JCI90603

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature, 523(7560), 337–341. https://doi.org/10.1038/nature14432

Mendelsohn, A. R., & Larrick, J. W. (2013). Sleep Facilitates Clearance of Metabolites from the Brain: Glymphatic Function in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Rejuvenation Research*, *16*(6), 518–523. https://doi.org/10.1089/rej.2013.1530

Plog, B. A., Dashnaw, M. L., Hitomi, E., Peng, W., Liao, Y., Lou, N., Nedergaard, M. (2015). Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. Journal of Neuroscience, 35(2), 518–526. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3742-14.2015

Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 13(1), 379–394. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-051217-111018

Rasmussen, M. K., Mestre, H., & Nedergaard, M. (2018). The glymphatic pathway in neurological disorders. The Lancet Neurology, 17(11), 1016–1024. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1

Siemiński, M. (2017). Zaburzenia snu w chorobie Alzheimera. Polski Przegląd Neurologiczny, 13(4), 173–185.

Szelenberger, W. (2007). Neurobiologia snu Neurobiology of sleep. 3–8.

Zhang, L., Chopp, M., Jiang, Q., & Zhang, Z. (2019). Role of the glymphatic system in ageing and diabetes mellitus impaired cognitive function. Stroke and Vascular Neurology, 4(2), 90–92. https://doi.org/10.1136/svn-2018-000203.

Ocena preferencji konsumenckich osób po 60-tym roku życia, ze szczególnym uwzględnieniem mleka i produktów mlecznych, w kontekście weryfikacji konieczności stosowania doustnych suplementów pokarmowych w ich żywieniu

Wajs Joanna [(1)], Stobiecka Magdalena [(1)]

[1] Instytut Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Joanna Wajs: joanna.gebala95@gmail.com

Streszczenie
Od wielu lat mleko oraz produkty z niego pozyskiwane stanowią podstawowy składnik diety. Dzięki właściwościom prozdrowotnym, mleko ugruntowało swoją pozycję w codziennym jadłospisie zwłaszcza osób po 60-tym roku życia. Wiek podeszły jest bardzo specyficzny, w szczególności dotyczy to aspektu zdrowotnego. W tym okresie życia zachodzi wiele niepożądanych zmian, a są nimi nowotwory, zespół metaboliczny czy cukrzyca typu 2. Celem niniejszej pracy była ocena preferencji konsumenckich osób w wieku podeszłym, ze szczególnym uwzględnieniem mleka oraz produktów mlecznych, w kontekście weryfikacji konieczności stosowania doustnych suplementów pokarmowych. Grupą badawczą były 23 osoby, które ukończyły 60-ty rok życia. Przeprowadzono badanie ankietowe, które dotyczyło spożywania nabiału. Z przeprowadzonych badań wynika, że 48% respondentów spożywało mleko i produkty mleczne kilka razy w tygodniu, a 42% stosowało je w swoje diecie codziennie. 2 osoby na 23 ankietowanych wybierały je rzadziej niż raz w tygodniu. Uwzględniając zawartość tłuszczu w mleku, wykazano, że osoby geriatryczne wybierały następująco: 0,5% tłuszczu – 1 osoba, 1,5% tłuszczu – 4 osoby, 2% tłuszczu – 13 osób i 3,2% tłuszczu – 5 osób. Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że większość respondentów regularnie spożywała mleko i produkty mleczne, a najczęściej wybieranym asortymentem przez osoby starsze było mleko spożywcze zawierające 1,5% tłuszczu.

Słowa kluczowe: mleko, osoby starsze, doustne suplementy pokarmowe

Assessment of consumer preferences of people over 60 years of age, with specific dairy and dairy products, in the context of the use of oral dietary supplements in their nutrition

Summary
For many years, milk and products obtained from it have been a basic component of the human diet. Thanks to its excellent health-promoting properties, milk has strengthened its position in the daily menu of people over 60 years of age. Old age is very specific, in particular it concerns the health aspect. Many undesirable changes occur during this period of life, including cancer, metabolic syndrome or type 2 diabetes. The aim of this study was to assess consumer preferences of the elderly, with particular emphasis on milk and dairy products, in the context of verifying the need for oral food supplements. The research group was 23 people over 60 years of age. It was a survey which mainly concerned the consumption of dairy products and milk as well as the general health condition. The most important observation was the frequency of milk consumption by the elderly. The research showed that 48% of respondents consumed them several times a week, and 42% used it in their diet every day. 2 out of 23 respondents used it less than once a week. For the most frequently chosen percentage of fat in milk, geriatric people chose as follows: 0.5% fat - 1 person, 1.5% fat - 4 people, 2% fat - 13 people, 3.2% fat - 5 people. After the research, it can be concluded that the majority of respondents regularly consumed milk and dairy products, and the most frequently chosen assortment by the elderly was drinking milk containing 1.5% fat.

Keywords: milk, elder people, oral nutrition support

1. Wstęp

Wraz z upływem lat w Polsce postępuje spowolnienie rozwoju demograficznego a w konsekwencji dochodzi do zmian w wieku populacji. Takie zmiany wywołane są wydłużeniem życia obywateli po 60-tym roku życia, spadkiem zgonów osób młodszych (poniżej 60-tego roku życia) oraz zahamowaniem przyrostu naturalnego ludności. Od kilku lat w kraju odnotowuje się wzrost liczby ludności po 60-tym roku życia. Potwierdza to m.in. Główny Urząd Statystyczny, który podaje, że w 2017 roku ponad 9 mln osób (24% całej populacji) stanowiły osoby w wieku 60 lat i więcej. Na przestrzeni 20 lat udział tych osób wzrósł prawie o 10%, tj. z 14,7% w 1989 r. do 24,2% w 2017 r. (w tym czasie odsetek dzieci i młodzieży zmniejszył się o ok. 12 %) (GUS, 2018). Narodowy Fundusz Zdrowia w 2018 roku wydał sprawozdanie, w którym wyraźnie zaznacza, iż kolejki do poradni specjalistycznych uległy wydłużeniu [www1]. Jako najszybciej rozwijająca się populacja ostatnich lat, osoby w wieku podeszłym spożywają jedną trzecią wszystkich leków przyjmowanych przez globalne społeczeństwo (Shenoy i Harugeri, 2015).

Wiek podeszły to stan, który warunkuje wiele zmian fizycznych, psychicznych, społecznych oraz fizjologicznych organizmu. Starzenie się jest nieodwracalnym, stale postępujący procesem, którego cechami charakterystycznymi są patologie ustroju. Można w nim wyróżnić dysfunkcje przewodu pokarmowego, zaburzenie wypróżniania, utrudnione połykanie czy żucie, obniżenie apetytu lub nasilające się choroby cywilizacyjne takie, jak zespół metaboliczny, nadciśnienie tętnicze czy nowotwór (Cichero, 2018; Dumic i in., 2019). Kluczem warunkującym prawidłowy stan emocjonalny oraz fizyczny zdrowia osób geriatrycznych jest dieta, której nieodzownym elementem powinno być mleko oraz jego pochodne (Leslie i Hankey, 2015).

Człowiek jest istotą, której podstawą bytu jest pokarm. Przyglądając się ewolucji ludzkości, jej rozwojowi i postępowi urbanizacji, pokarm odzwierzęcy, a dokładniej mleko, należał do podstawowego składnika diety. Na przestrzeni lat sposób pozyskiwania żywności uległ zmianie. Początkowo dominował system zbieracko-łowiecki, który wynikał z koczowniczego trybu życia. Sukcesywnie przekształcał się on w tryb osiadły, co dało początek rozwoju własnych upraw roślinnych oraz hodowli zwierząt, w tym bydła.

Wzbogacenie diety w mleczne składniki odżywcze zostało utożsamione z udomowieniem bydła oraz wieloma superlatywami, jakie niesie za sobą spożywanie ich mlecznej wydzieliny. Jako cenne źródło protein, związków bioaktywnych, witamin, minerałów oraz znakomitego profilu tłuszczowego, mleko posiada wiele prozdrowotnych właściwości (Guetouache i in., 2014). Peptydy pochodzenia mlecznego, nie tylko krowiego,

ale również od innych gatunków, tj. kóz, bawołów czy owiec, cechuje wielofunkcyjność. Ten odzwierzęcy surowiec wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe, stymuluje odpowiedź immunologiczną, dzięki obecności kwasu mlekowego czy zmniejsza ryzyko wystąpienia zmian osteoporotycznych, z którymi często boryka się starzejąca populacja (Bian i in., 2018). Dzięki obecności kluczowego dla ustroju wapnia oraz witaminy D w mleku, jego spożycie może zmniejszyć ryzyko pojawienia się kolejnych złamań lub stanowić czynnik niwelujący rozwój osteoporozy (Xu, 2015). Odgrywa również profilaktyczną rolę w rozwoju cukrzycy typu 2, otyłości czy zespołu metabolicznego. Może stać się promotorem zmniejszenia rozwoju zaburzeń poznawczych, dzięki modyfikacji układu nerwowo-naczyniowego (Demontiero i in., 2012; Knopfler, 2016; Mohanty i in., 2016; Wu i Sun, 2016; Zemel, 2004). Co więcej, urozmaicenie procesem fermentacji produktów mlecznych wpłynęło na wzrost ich spożycia wśród osób po 60-tym roku życia, które to często uznają je za podstawowy składnik codziennej diety. Z licznych doniesień naukowych wynika, że obecność bakterii probiotycznych może być czynnikiem prewencyjnym z schorzeniach, z którymi zmagają się osoby starsze (Gasmalla i in., 2017; Wachholz i in., 2018). Ponadto, mleczne produkty fermentowane wykazują właściwości usprawniające pracę pasażu jelitowego, kontrolują stężenie glukozy czy działają przeciwzapalnie (Rosa i in., 2017). Aby sprostać pokryciu dziennego zapotrzebowania na wapń, istotny pierwiastek osób starszych, zaleca się spożywanie 3 porcji mleka, w tym produktów fermentowanych, które są tanie i łatwo dostępne, o doskonałej wchłanialności (Rozenberg i in., 2016).

Żywienie osób w podeszłym wieku znacząco różni się od racji pokarmowych chociażby dzieci. Ich zapotrzebowanie na makro- i mikroskładniki ulega zmianie na tyle, aby dzienna racja pokarmowa była odpowiednio zbilansowana i dostosowana do istniejących jednostek chorobowych. Utrzymanie kondycji zdrowotnej jest bardzo ważne, szczególnie w starzejącej się populacji. Połączenie wielu nieprawidłowości utożsamiane jest z współistnieniem chorób, procesem hospitalizacji, niedostatecznym żywieniem, zmianą preferencji smakowych, odizolowaniem społecznym lub problemami natury finansowej, co może doprowadzić do stanów niedoborowych w organizmie. Na skutek starzenia się proporcje ciała ulegają zmianom. Wpływają one na niekorzyść ustroju ze względu na wzrost tłuszczowej masy ciała, a spadek masy mięśniowej (Nowson i O'Connell, 2015; Schneider i in, 2002).

Deficyty poszczególnych składników, w szczególności podaży białka, niekorzystnie oddziałuje na pracę ustroju, a odzwierciedleniem tych nieprawidłowości mogą być zaburzenia odżywiania, a dokładniej niedożywienie białkowo-kaloryczne osób po 60-tym roku życia (Bauer i in., 2013; Helieh, 2017; Wagner i in., 2016). Z najnowszych doniesień literaturowych

(Moschke i in., 2017; Volkert i in., 2019) wynika, że niedożywienie osób dorosłych w starszym wieku sięga 50% w zależności od populacji, przeprowadzonego testu MNA (ang. Mini Nutritional Assessment) czy stanu i warunków opieki zdrowotnej. Rozwój niedożywienia u osób geriatrycznych jest wieloczynnikowy i bez wątpienia, negatywnie wpływający na ich stan zdrowia lub samopoczucie. W celu niwelacji niedożywienia stosuje się doustne suplementy pokarmowe, które stanowią jeden z elementów wsparcia żywieniowego (Volkert i in., 2018). Preparaty ONS (ang. oral nutrition support) należą do grupy suplementów, których głównym zadaniem jest uzupełnienie niedoborów powstałych w wyniku niedożywienia organizmu lub w stanie zagrożenia. Osobom wymagającym uzupełnienia niedoborów podaje się gotowy płyn, z niezbędnymi makroskładnikami (białko, węglowodany, tłuszcze) oraz witaminami i minerałami, którego skład może być kompletny lub nie, w zależności od współistniejącej jednostki chorobowej lub stanu wycieńczenia organizmu (Stratton i Elia, 2007).

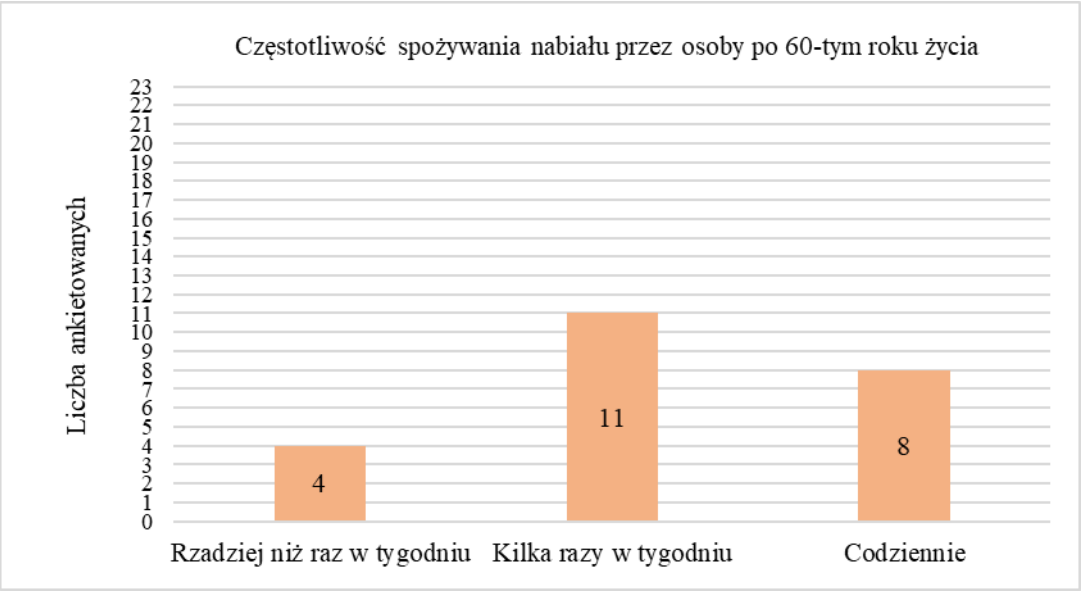
Celem pracy było dokonanie oceny preferencji żywieniowych osób po 60-tym roku życia, ze szczególnym uwzględnieniem mleka i produktów mlecznych. Przeprowadzono to w kontekście weryfikacji konieczności stosowania doustnych suplementów pokarmowych w ich żywieniu.

2. Materiał i metody

Badaniu poddane zostały dobrowolnie 23 osoby a głównym kryterium było ukończenie 60-tego roku życia. Ankieta była anonimowa i zawierała 18 pytań jednokrotnego wyboru oraz 2 pytania wielokrotnego wyboru. Została przeprowadzona przez jeden z portali społecznościowych, gdzie czas na odpowiedzi był nieograniczony. Ankieta w głównej mierze dotyczyła spożywania nabiału, a także ogólnej kondycji zdrowotnej.

3. Wyniki

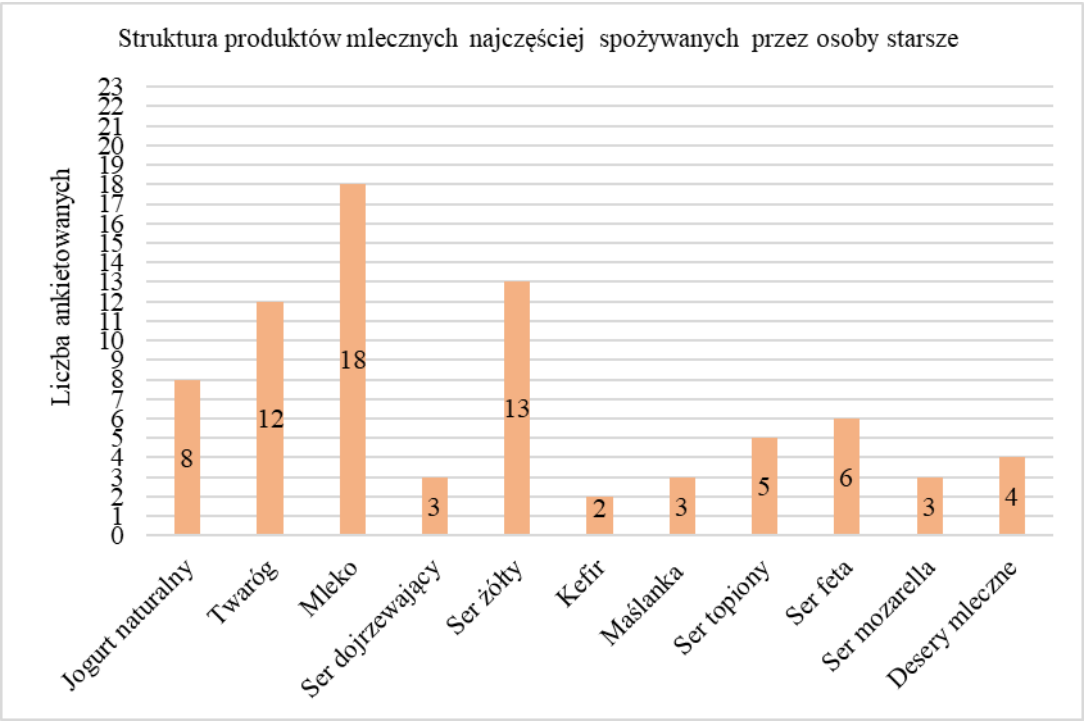
Po dokonaniu wnikliwej analizy ankiety, stwierdzono, że dla niespełna 35% ankietowanych nabiał stanowił podstawowy składnik codziennej diety. Dla prawie połowy ankietowanych (47%), nabiał również był bardzo istotny, ponieważ był spożywany kilkukrotnie w ciągu tygodnia. Tylko 4 osoby (17%) spożywały nabiał rzadziej niż raz w tygodniu (wyk. 1).



Wykres 1. Częstotliwość spożywania nabiału przez osoby po 60-tym roku życia

Wybierając nabiał, osoby starsze preferowały nabiał półtłusty (82%), którego ilość porcji wahała się w zależności od rodzaju spożywanego nabiału. W przypadku nabiału chudego i tłustego odpowiedzi respondowanych kształtowały się na tym samym poziomie i wynosiły po dwie odpowiedzi (9%) na produkty chude i tłuste.

Obecnie wybór produktów mlecznych na rynku jest bardzo szeroki. Wykres 2 przedstawia strukturę nabiału, który najczęściej włączały do swojej diety osoby po 60-tym roku życia.



Wykres 2. Struktura najczęściej spożywanych przez osoby starsze produktów mlecznych

Pytanie dotyczące najczęściej wybieranego nabiału było pytaniem wielokrotnego wyboru. Odpowiedzi kształtowały się następująco: mleko (18 osób), ser żółty (13 osób), twaróg (12 osób), jogurt naturalny (8 osób), ser feta (6 osób), ser topiony (5 osób) i desery mleczne (4 osoby). Taką samą ilość odpowiedzi otrzymano dla sera mozzarella, maślanki oraz sera dojrzewającego – 3 osoby. Kefir był najrzadziej wybieranym produktem, bowiem tylko 2 osoby wskazały na jego spożywanie.

Rozpatrując odpowiedzi udzielone na pytanie dotyczące częstotliwości spożywania mleka przez osoby starsze, stwierdzono, że 48% respondentów spożywało je kilka razy w tygodniu, a 42% stosowało go w swoje diecie codziennie. 2 osoby na 23 ankietowanych używało je rzadziej niż raz w tygodniu (wyk. 3).

Wykres 3. Częstotliwość spożywania mleka na przestrzeni jednego tygodnia przez osoby ankietowane

W przypadku procentowej zawartości tłuszczu w mleku, osoby geriatryczne wybierały następująco: 0,5% tłuszczu – 1 osoba, 1,5% tłuszczu – 4 osoby, 2% tłuszczu – 13 osób i 3,2% tłuszczu – 5 osób.

Na pytanie dotyczące przeciwskazań do spożywania mleka oraz nabiału, 18 respondentów (72%) nie wskazywało potrzeby wykluczenia tych produktów z diety.

W ankiecie mieściło się również pytanie dotyczące istotności spożywanego mleka oraz produktów mlecznych dla osób po 60-tym roku życia. Większość ankietowanych (70%) uznało tą grupę produktów za kluczową w codziennej diecie. Siedmioro ankietowanych (30%) nie traktowało nabiału za ważny element swojego żywienia.

Analizując odpowiedzi na pytanie suplementacji wapniem i witaminą D_3, tylko troje ankietowanych (13%) wymagało dodatkowego wsparcia żywieniowego w postaci suplementu diety. 20 respondowanych (87%) nie wymagało przyjmowania wapnia oraz witaminy D_3.

W ankiecie zawarto również pytanie o dzienną aktywność fizyczną. Za wyznacznik oceny aktywności został przyjęty czas dziennego spaceru. Za małą aktywność uznany został spacer do godziny czasu (6 osób), średnią aktywność – spacer do 2 godzin (15 osób), natomiast wysoką aktywność spacer powyżej 2 godzin w ciągu dnia (2 osoby).

Ankieta zawierała także pytania odnoszące się do zaburzeń odżywiania. Wynikało z faktu, że u 4 ankietowanych zostało stwierdzone niedożywienie – po wykonaniu testu MNA (z ang. Mini Nutritional Assessment) w szpitalu. Łącznie 10 respondentów predysponowało do rozwoju niedożywienia, w powodu zaburzeń połykania oraz niedostatecznej masy ciała. U 9 osób starszych nie było konieczności stosowania doustnych suplementów pokarmowych.

4. Dyskusja

Dokonując analizy porównawczej otrzymanych wyników z pokrewnymi doniesieniami literaturowymi, należy stwierdzić, że u starzejącej się populacji w zachowaniu odpowiedniej ilości białek mięśniowych, kondycji fizycznej oraz witalności ustroju kluczową rolę odgrywa odpowiednia podaż białka (Franzke i in., 2018). Według Europejskiego Stowarzyszenia Żywienia Klinicznego i Metabolizmu (ESPEN) dzienne zapotrzebowanie na białko u osób po 65-tym roku życia wynosi 1,0-1,2 g białka/kg masy ciała. Ilość zwiększa się wraz z występowaniem chorób przewlekłych do 1,5 g białka/kg masy ciała oraz do 2,0 g białka/kg masy ciała w przypadku występowanie niedożywienia lub podczas rekonwalescencji po zabiegach operacyjnych (Deutz i in., 2014). Porównując zalecenia WHO, Wielkiej Brytanii i Stanów Zjednoczonych, wartości referencyjne dla ilości przyjmowanego białka są na podobnym poziomie, tj. 1,0-1,2 g białka/kg masy ciała. W celu zapobiegania rozwojowi sarkopenii w wieku podeszłym, rozważając zalecenia Society for Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disease (SCWD), podejmowanie aktywności fizycznej przez osoby starsze przypisano zwiększonej ilości przyjmowania białka, którego wartość wzrosła do 1,5 g/ kg mc/ dobę (Morley i in., 2010).

Mleko i jego produkty, stanowią nieodzowny element diety osób starszych, co potwierdziły przeprowadzone badania. W 2016 roku zostały opublikowane badania przeprowadzone przez Agencję ds. Standardów Żywności i National Heath England National Diet and Nutrition Survey (NDSN), w których z kolei wykazano, że na przełomie 2013 i 2014 roku w Wielkiej Brytanii mleko oraz nabiał stanowiły 15% udziału w diecie osób po 65-tym roku życia (www 2).

Wiek podeszły jest charakterystycznym stanem, w którym dochodzi również do niedoborów makroelementów, głównie witaminy D_3 oraz wapnia, których doskonałym źródłem jest mleko oraz produkty z niego pozyskiwane. Potwierdzili to Kostecka i in. (2015), wykazując jak ważne znaczenie mają te składniki, zwłaszcza w przypadku osób starszych. Boucher (2012) wykazał, że fortyfikacja żywność, w tym mleka, minimalizuje ryzyko wystąpienia niedoborów witaminy D_3 w starzejącej się populacji.

5. Wnioski

Mleko wykazuje wiele prozdrowotnych właściwości, a jego regularne spożywanie przyczynia się do zaopatrywania organizmu w niezbędne składniki, w tym w białko. Jest jednym z podstawowych elementów codziennej, prawidłowo zbilansowanej diety osób starszych. Nie tylko mleko, ale również jego produkty uznawane są za bogactwo makro- i mikroskładników, które korzystnie wpływają na stan zdrowia. Niedostateczna podaż kaloryczno-białkowa wynikająca z okresu starzenia się organizmu oraz patologii funkcjonowania ustroju wskazuje na potrzebę uwzględnienia dodatkowej suplementacji doustnymi suplementami pokarmowymi.

Jak wykazano, większość respondentów regularnie spożywała mleko i produkty mleczne, a najczęściej wybieranym asortymentem przez osoby starsze było mleko spożywcze zawierające 1,5% tłuszczu. Ponad połowa respondentów nie wymagała suplementacji wapniem lub witaminami, w tym D_3, które naturalnie występują w surowcu, bowiem są dostarczane w zalecanych ilościach. Zarówno mleko, jak i produkty od niego pochodzące należą do grupy produktów, które zawsze były, są i będą nieodzownym elementem podstawowej diety całej populacji, ze szczególnym uwzględnieniem osób po 60-tym roku życia.

6. Literatura

Bauer J., Gianni Cederholm T., Cesari M., Cruz-Jentoft A.J., Morley J.E., Phillips S., Sieber C., StEhle P., Teta D., Visvanathan R., Volpi E., Boirie Y., 2013. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: A position paper from the PROT-AGE study group. Journal of the American Medical Directors Association 14(8): 542-559.

Bian S., Hu J., Zhang K., Wang Y., Yu M., Ma J., 2018. Dairy product consumption and risk of hip fracture: a systematic review and meta-analysis. BMC Publin Health 18(1): 165.

Boucher B.J., 2012. The problems of vitamin D insufficiency in older people. Anging and Disease 3(4): 313-329.

Cichero J.A.Y., 2018. Age-related changes to eating and swallowing impact frailty: Aspiration, choking risk, modified food texture and autonomy of choice. Geriatrics 3(69):1-10.

Deutz N.E., Bauer J.M., Barazzoni R., Biolo G., Boirie Y., Bosy-Westphal A., Cederholm T., Cruz-Jentoft A., Krznariç Z., Nair K.S., et al. Protein intake and exercise for optimal muscle function with ageing: Recommendations from the ESPEN Expert Group. Clinical Nutrition 33: 929–936.

Domontiero O., Vidal Ch., Duque G., 2012. Aging and bone loss: new insights for the clinician. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease 4(2): 61–76.

Dumic I., Nordin T., Jecmenica M., Stojkovic Lalosevic M., Milosavljevic T., Milovanovic T., 2019. Gastrointestinal Tract Disorders in Older Age. Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology 2019: 6757524.

Franzke B., Neubauer O., Cameron-Smith D., Wagner K.H., 2018. Dietary Protein, Muscle and Physical Function in the Very Old. Nutrients 10(7): 935.

Gasmalla M.A.A., Tessema H.A., Salaheldin A., Alahmad K., Hassanin H.AM., Aboshora W., 2017. Health benefits of milk and functional dairy products. MOJ Food Processing & Technology 4(4):108–111.

Guetouache M., Guessas B., Medjekal S., 2014. Composition and nutritional value of raw milk. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research 2(10): 115-122.

GUS: Informacja o stanie osób starszych na podstawie badań Głównego Urzędu Statystycznego. Warszawa, 2018.

Helieh S.Oz., 2017. Nutrients, infectious and inflammatory diseases. Nutrients 9(10): 1085.

Knopfler M., 2016. How compatible is cow's milk with the human immune system? The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences 2(11): 181-190.

Leslie W., Hankey C., 2015. Aging, nutritional status and health. Healthcare 3: 648-658.

Mohanty D.P., Mohapatra S., Misra S., Sahu PS., 2016. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. Saudi Journal of Biological Sciences 23(5): 577-583.

Morley J.E., Argiles J.M., Evans W.J., Bhasin S., Cella D., Deutz N.E., Doehner W., Fearon K.C., Ferrucci L., Hellerstein M.K., Kalantar-Zedah K., Lochs H., MacDonald N., Mulligan K., Muscaritoli M., Ponikowski P., Posthauer M.E., Fanelli F.R., Morrie Schambelan M., Schols A., Schuster M.W., Anker S.D., 2010. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. Journal of the American Medical Directors Association 11(6): 391–396.

Moschke J., Kruk U., Kastrati K., Kleeberg J., Buchholz D., Erickson N., Huebner J., 2017. Nutritional care of cancer patients: a survey on patients' needs and medical care in reality. International Journal of Clinical Oncology 22(1): 200-206.

Nowson C., O'Connell S., 2015. Protein requirements and recommendations for older people: A review. Nutrients 7: 6874-6899.

Rosa D.D., Dias M.M.S., Grześkowiak Ł.M., Reis S.A., Conceição L.L., Peluzio M.D.C.G., 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. Nutrition Research Reviews 30(1):82-96.

Rozenberg S., Body J.J., Bruyère O., Bergmann P., Brandi M.L., Cooper C., Devogelaer J.P., Gielen E., Goemaere S., Kaufman J.M., Rizzoli R., Reginster J.Y., 2016. Effects of dairy products consumption on health: benefits and beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases. Calcified Tissue International 98: 1–17.

Schneider S.M., Al-Jaouni R., Pivot X., Braulio V.B., Rampal P., Hebuterne X. Lack of adaptation to severe malnutrition in elderly patients. Journal of Clinical Nutrition 21:499–504.

Shenoy P., Harugeri A., 2015. Elderly patients' participation in clinical trials. Perspectives in Clinical Research 6(4): 184–189.

Stratton R.J., Elia M., 2007. Who benefits from nutritional support: what is the evidence? European Journal of Gastroenterology & Hepatology 19(5): 353-358.

www 1. www.nfz.gov.pl/gfx/nfz/userfiles/_public/zarzadzenia_prezesa/uchwaly_rady_nfz/2019/zal._do_uchwaly_nr_12_sprawozdanie_z_dzialanosci_nfz_za_2018_rok.pdf (dostęp: 7.10.2019).

www 2. Agencja ds. Standardów Żywności i National Heath England National Diet and Nutrition Survey (NDSN): Wyniki z lat 5 i 6 łącznie. www.gov.uk/government/statistics/ndns-results-from-years-5-and-6-combined/ (dostęp: 09.12.2019).

Wachholz P.A., Nunes V., Do Valle A., Jacinto A.F., 2018. Effectiveness of probiotics on the occurrence of infections in older people: Systematic review and meta-analysis. Age and Aging 0: 1-9.

Wagner K.H., Cameron-Smith D., Wessner B., Franzke B. Biomarkers of aging: From function to molecular biology. Nutrients 8: 338.

Wu L., Sun D., 2016. Meta-analysis of milk consumption and the risk of cognitive disorders. Nutrients 8(12): 824.

Volkert D., Beck A.M., Cederholm T., Cereda E., Cruz-Jentoft A., Goisser S., de Groot L., Großhauser F., Kiesswetter E., Norman K., Pourhassan M., Reinders I., Roberts H.C.,

Rolland Y., Schneider S.M., Sieber C.S., Thiem U., Visser M., Wijnhoven H.AH., Wirth R., 2019. Management of malnutrition in older patients – current approaches, evidence and open questions. Journal of Clinical Medicine 8(7): 974.

Volkert D., Beck A.M., Cederholm T., Cruz-Jentoft A., Goisser S., Hooper L., Kiesswetter E., Maggio M., Raynaud-Simon A., Sieber C.C., Sobotka L., van Asselt D., Wirth R., Bischoff S.C., 2018. ESPEN guideline on clinical nutrition and hydration in geriatrics. Clinical Nutrition XXX: 1-38.

Xu X., 2015. Drinking milk behavior and bone health among the elderly. Journal of Food Science and Nutrition Therapy 1(1): 001-001.

Zemel M.B., 2004. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. The American Journal of Clinical Nutrition 79(5): 907S–912S.

Ocena jakościowa i ilościowa wpływu hormonów steroidowych na otrzymywanie i produktywność podwojonych haploidów rzepaku

Woźny Joanna [(1)] Rojek Joanna [(1)]

[1] Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
Joanna Woźny: joawozny@gmail.com

Streszczenie
Rzepak jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych w Polsce i na świecie. Poprawa plonowania oraz odporności na patogeny to główny cel współczesnych badań nad rzepakiem. Obiektem przestawianych badań były linie rzepaku (*Brassica napus* L.) otrzymane na drodze androgenezy *in vitro.* Celem pracy było sprawdzenie różnic anatomicznych, morfologicznych i cytologicznych pomiędzy roślinami poszczególnych linii: otrzymanych w wyniku indukcji haploidów na standardowej pożywce NLN13 oraz z dodatkiem steroidowych hormonów zwierzęcych: androsteronu i progesteronu. Linią wyjściową (kontrola) była jara odmiana populacyjna rzepaku - Feliks. Wykazano istotne różnice w wielkości łuszczyn, liści, kwiatów, aparatów szparkowych oraz liczbie nasion w łuszczynach. Analiza cytologiczna wykazała podwojoną lub zbliżoną do podwojonej liczbę chromosomów. Największy wigor oraz produktywność wykazano dla linii indukowanej androsteronem. Przeprowadzone badania stanowią nowe i cenne źródło informacji o wpływie hormonów steroidowych na rozwój wegetatywny i generatywny rzepaku.

Słowa kluczowe: rzepak, hormony steroidowe, podwojone haploidy

Qualitative and quantitative assessment of the impact of steroid hormones on the rapeseed double haploids production and yielding

Summary
Rapeseed is one of the most important crops in Poland and in the world. Improving the yield and resistance to pathogens are the main goals of current research on this species. The objects of this research were rapeseed lines (*Brassica napus* L.) obtained by *in vitro* androgenesis. The main aim was to determine the anatomical, morphological and cytological differences between plants of individual lines: obtained by *in vitro* haploid? induction on the standard NLN13 medium and with the addition of steroid animal hormones: androsterone and progesterone. The size of pods, leaves, flowers, stomata and the number of seeds in pods differed between lines. Cytological analysis showed doubled or near doubled the number of chromosomes. The highest vigor and productivity were demonstrated for the androsterone-induced line. The obtained data bring new and valuable information about the impact of steroid hormones on the vegetative and generative development of rapeseed.

Keywords: rapeseed, steroid hormones, double haploids

1. Wstęp

334 r. p.n.e. Damian z Persji przed rozpoczęciem wojny podarował Aleksandrowi Wielkiemu mieszek z nasionami sezamu, jako „symbol ogromnej liczebności armii". Aleksander Wielki odpowiedział, przekazując mieszek z nasionami rzepaku, jako symbol „nie tylko liczebności, ale i siły armii" (Szała, 2002).

Kapusta rzepak *Brassica napus* L. jest rośliną jednoroczną lub dwuletnią, powstał przez skrzyżowanie *B. oleracea* i *B. campestris* (Hasterok i Małuszyńska, 2000). Dzikie formy *B. napus* prawdopodobnie występują w Europie i w Nowej Zelandii, gdzie zarówno diploidalne gatunki *B. oleracea,* jak i *B. rapa* rosną dziko (Shahzadi i in., 2015). Rzepak ma silny i dobrze

rozwinięty system korzeniowy, o charakterze palowym, z licznymi rozgałęzieniami. Liście właściwe rozwijają się z pąka wierzchołkowego, tworząc rozetę w kolorze sinozielonym (Dubas i Gładysiak, 1994). Łodyga osiąga wysokość do 1,5 m. Kwiatostan tworzy luźne grono, kwitnienie rozpoczyna się od dolnej części i kontynuuje ku górze. Kielich i korona są wyraźnie zróżnicowane. Organy generatywne to słupek zbudowany z dwóch owocolistków oraz 6 czterosilnych pręcików. Owocem jest gładka lub guzkowata łuszczyna, zawierająca okrągłe nasiona (Dubas i Gładysiak, 1994).

Rzepak obecnie jest na drugiej pozycji w światowej produkcji nasion oleistych, z 65 Mt wyprodukowanymi w 2012 r. Największym producentem rzepaku jest Kanada z 15,4 Mt rocznie co stanowi 24% światowej produkcji (Mailer, 2016). Dla człowieka potencjał wytwarzania większej/mniejszej ilości nasion, przez rośliny użytkowe, stanowi podstawę do wyboru odmiany. Sama ilość wytwarzanych przez roślinę nasion, jest jedną z najważniejszych cech ewolucyjnych. Proporcja określana w procesie zapłodnienia jest zależna od wielu czynników, takich jak płodność zalążków, bezpłodność pyłku, interakcja między ziarnem pyłku a sporofitycznymi tkankami matki, a także komórkami gametofitu żeńskiego (Yang, 2017).

Hormony steroidowe występują u roślin naturalnie, ich mechanizmy i działanie są jednak inne niż u ssaków. Hormony roślin pod względem budowy chemicznej nie różnią się od hormonów steroidowych zwierząt (Czerpak, 1993). Steroidy wprowadzane egzogennie działać będą analogicznie do tych wytwarzanych przez roślinę, a ich dodawanie egzogennie może stymulować rozwój roślin (Iino i in., 2007). Wpływają one na wszystkie etapy rozwoju roślin , jednak największe stężenie hormonów znajduje się w organach generatywnych roślin, (Kopcewicz, 1969).

Rozwój rośliny z gametofitu męskiego nazywamy androgenezą (Malepszy, 2009). Rośliny uzyskane w wyniku androgenezy *in vitro* posiadają gametyczną liczbę chromosomów, której podwojenie umożliwia produkcję osobników DH (double haploid) i stworzenie upraw homozygotycznych (Dunwell, 2010; Rahman i Michalak, 2016). Stworzenie roślin haploidalnych na drodze embriogenezy z mikrospor możliwe jest dla nielicznych gatunków. Dla rodzaju *Brassica* technika ta została opracowana w 1982 roku (Lichter, 1982).

Celem badań było określenie różnic morfologicznych, anatomicznych oraz cytologicznych roślin uzyskanych drogą androgenezy *in vitro*. Porównywano 2 pokolenia czterech linii DH z linią kontrolną - KK *B. napus* cv. Feliks.

2. Materiały i metody

Materiałem do badań były androgenetyczne linie rzepaku otrzymane *in vitro* w kulturach izolowanych mikrospor populacyjnej odmiany rzepaku jarego - *Brassica napus* cv. Feliks (Wilk, 2015). Dokonano analizy roślin o genotypach: KK- rzepak *B. napus* cv. Feliks, kontrola; uzyskane *in vitro* androgenetyczne linie: DH K – indukowany na pożywce NLN-13; DH PROG -NLN-13+progesteron 0,1μM; DH A - NLN-13+androsteron 0,1μM.

Androgenetyczne młode rośliny (DH1) przeniesiono do warunków *ex vitro,* a hodowlę utrzymywano w stałych warunkach w fitotronie ziemnym (21/18 °C dzień/noc, fotoperiod 16-h, oświetlenie 100-150 μmol m^{-2} s^{-1}, wilgotność 50 -70%).

Analizy prowadzono na 2 pokoleniach roślin (DH1 i DH2), co 2 tygodnie oceniano ich pokrój. Po pojawieniu się kwiatostanów dokonano pomiaru wielkości kwiatów. Dokumentację fotograficzną wykonano pod mikroskopem stereoskopowym Nikon SMZ 1500 wyposażonym w kamerę cyfrową. Zebrano po 50 łuszczyn z obu pokoleń, celem ich pomiaru oraz zbadania pod względem ilości i jakości nasion. Każdą łuszczynę zmierzono, policzono liczbę nasion oraz dokonano ważenia 100 nasion w 6 próbach i porównano ich masę. Wykorzystując metodę kiełkowania *in vitro*, dokonano oceny żywotności nasion (50 nasion dla każdej linii).

Jednym z pomocniczych kryteriów oceny i określenia ploidalności roślin jest porównanie wielkości aparatów szparkowych (Dunwell, 2010). Analizę przeprowadzono w oparciu o fotografie wykonane za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse E800 wyposażonego w system wizualizacji i analizy obrazu Lucia G. Pomiary wielkości aparatów szparkowych przeprowadzono dla 10 prób każdego analizowanego wariantu. Preparaty pochodziły z minimum 3 roślin, a wyboru poszczególnych aparatów dokonano losowo.

Do analiz cytologicznych wykorzystano 7- i 14-dniowe siewki wyhodowane *in vitro*. Siewki inkubowano w temperaturze pokojowej w 2 mM 8-hydroksychinolinie (Sigma), przez 8 godzin. Materiał utrwalono w mieszaninie lodowatego kwasu octowego i czystego metanolu w stosunku 3:1 (kwas octowy: metanol). Po 24 godzinach siewki inkubowano w acetoorceinie przez 2 dni. Rozgnioty do analiz wykonano metodą standardową w 45% kwasie octowym (Jensen, 1962). Liczbę chromosomów policzono na 10 płytkach prometafazowych i metafazowych, dla każdego genotypu (z wyjątkiem DH PROG, ze względu na niewystarczającą ilość materiału do badań/ brak kiełkujących siewek).

Ogólnej oceny roślin dokonano poprzez obserwację oraz stworzenie indywidualnej skali, w której oceniano rozwinięcie i uformowanie rozety każdej z roślin, w jednakowym etapie rozwoju, w przedziale od +2 do -2. +2 oznacza bardzo dobrze rozwiniętą rozetę (8 lub

więcej liści, duże; łodyga powyżej 25 cm), +1 dobrą (6-8 liści, duże; łodyga 20-25 cm), 0 dostateczną (4-6 liści, średnie; łodyga 15-20 cm), -1 niedorozwiniętą (2-4 liście łodyga 10-15 cm), a -2 źle rozwiniętą rozetę (1-2 liście; łodyga poniżej 10 cm).

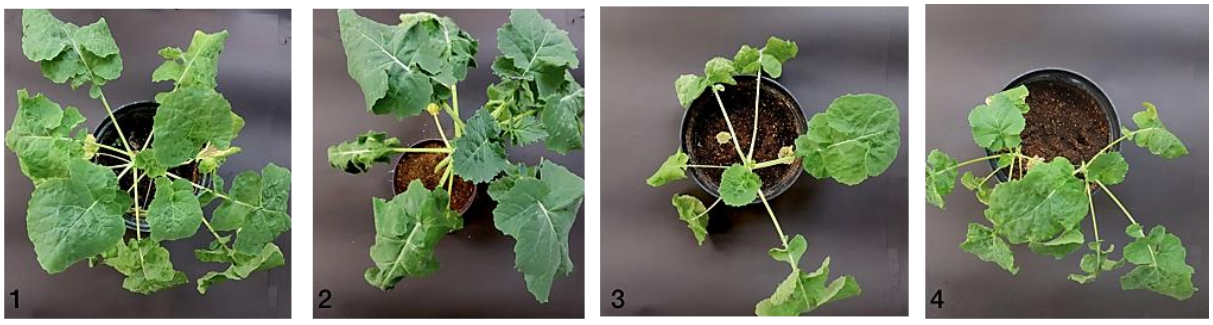
3. Wyniki

Obserwacje wykazały zauważalne morfologicznie i ilościowo różnice między liniami. Rośliny DH K były mniejsze, rozwijały się wolniej, a całościowy pokrój roślin był wątlejszy od pozostałych linii. Rośliny DH PROG miały niewielkie liście i wykazywały tendencję do licznych rozgałęzień pędu. Wariant ten często tworzył krzaczasty pokrój, nietypowy dla rzepaku. Utrzymanie linii DH PROG sprawiało największe trudności, ze względu na jej prawie całkowitą sterylność. Rośliny o genotypie DH A wykazywały się wybujałością cech. Pomimo nieznacznie dłuższego czasu kiełkowania, prawie wszystkie rośliny DH A charakteryzowała lepsza kondycja w porównaniu do roślin kontrolnych i innych linii, a ich rozwój po okresie kiełkowania był zauważalnie szybszy. Rośliny DHK i DH PROG były wyraźnie zróżnicowane pod względem rozwoju i uformowania rozety. Ocenę rozwinięcia i uformowania rozety w stworzonej na tą potrzebę skali zestawiono w tabeli 1.

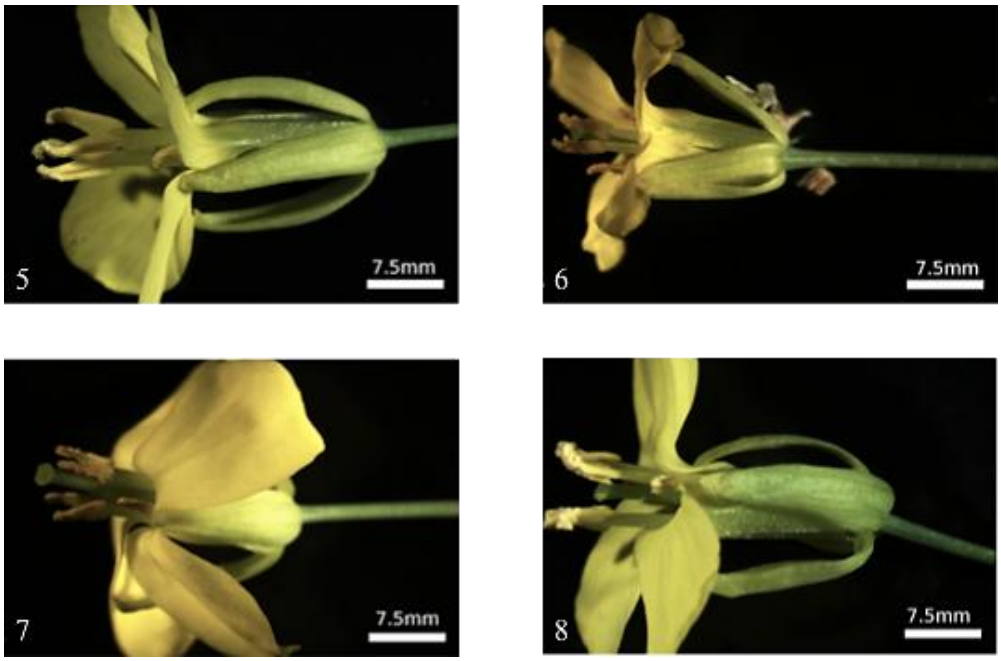
Tab.1 Średnia ocena rozwoju roślin i uformowania rozety w 12 tygodniu hodowli ±SD. Skala od +2 do -2. Szczegółowy opis skali w materiałach i metodach.

	KK	DH K	DH PROG	DH A
Jednostki	+0,32 ±0,49	+0,5 ±0,73	-0,5 ±1,5	+1,1 ±0,73

Kwiaty roślin kontrolnych oraz DH K były mniejsze, w porównaniu z DH A oraz DH PROG. Rośliny DH PROG nie zawiązywały łuszczyn w wyniku samoistnego samozapylenia. Do wytworzenia owocu zachodziło jedynie wskutek indukcji zapylenia krzyżowego pyłkiem rośliny KK. Pylniki linii DH PROG nie niosły żywotnego pyłku. Poglądowy pokrój roślin F2 oraz różnice w wielkości wybranych kwiatów pokolenia F1 przedstawiono na fotografiach 1-8.



Fot 1-4. Pokrój roślin DH2 w 12 tygodniu po wysadzeniu. 1- KK, 2- DH2 A, 3- roślina o mieszańcowym genotypie otrzymana po zapyleniu krzyżowym DH1 PROG pyłkiem rośliny KK , 4- DH2 K (zdjęcia J. Woźny).



Fot 5-8. Kwiaty rzepaku, pokolenie DH1. 5- KK, 6- DH K, 7- DH PROG, 8- DH A (zdjęcia J. Woźny).

Łuszczyny linii DH K były mniejsze niż łuszczyny roślin kontrolnych i zawierały mniej nasion. Rośliny linii DH PROG (po indukowanym krzyżowym zapyleniu) zawiązywały niewiele łuszczyn, średnio 6 owoców na roślinę, ze średnią ilością nasion/łuszczynę równą 5. Łuszczyny roślin DH A były długie oraz zawierały więcej nasion, w porównaniu z którymkolwiek genotypem, również KK. Wyniki pomiarów długości łuszczyn oraz średnią liczbę nasion w łuszczynach przedstawiono w tabelach 2-3.

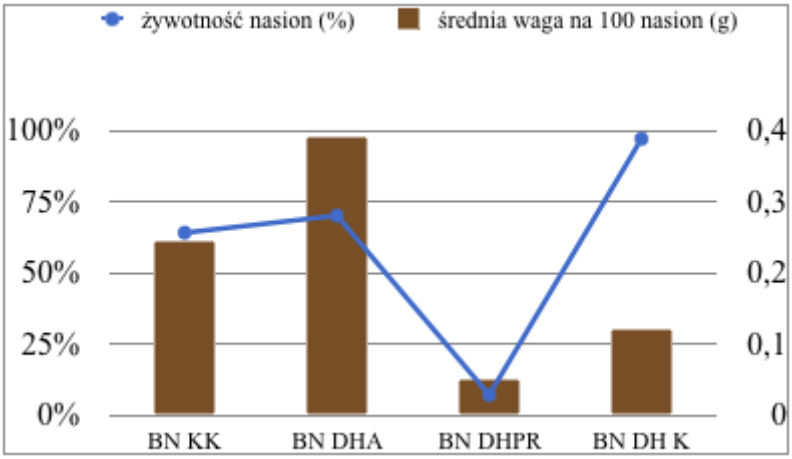
Tab.2 Średnia długość łuszczyny ± SD.

	KK	DH K	DH PROG	DH A
Długość łuszczyny (cm)	4,67 ± 0,71	4,15 ± 0,60	2,89 ± 1,11	5,60 ± 0,81

Tab. 3. Średnia ilość nasion w łuszczynie ± SD.

	KK	DH K	DH PROG	DH A
Ilość nasion w łuszczynie	16 ± 4	15 ± 5	5 ± 4	18± 5

Analiza zdolności kiełkowania nasion wykazała skrajne różnice pomiędzy genotypami. Najlepszą żywotnością (zdolnością do kiełkowania) wykazywały się rośliny DH K (97% kiełkujących nasion), najgorszą - DH PROG (nasiona uzyskane po indukowanym zapyleniu - do 7%). Wyniki zestawiono na wykresie 1 razem ze średnią wagą nasion w celu wizualizacji różnic pomiędzy liniami.



Wykres 1. Zestawienie zdolności kiełkowania nasion ze średnią wagą nasion.

Porównanie wielkości aparatów szparkowych wykazało znaczne różnice. Struktury te w linii DH PROG oraz DH A były powiększone względem obu genotypów kontrolnych. Dane przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4- Średnia wielkość aparatów szparkowych ± SD.

	KK	DH K	DH PROG	DH A
Długość aparatu szparkowego (µm)	22,23±2,00	17,86±2,19	26,30±1,39	26,11±1,29
Szerokość aparatu szparkowego (µm)	19,90±1,73	13,81±1,55	22,28±2,39	20,29±2,31

W komórkach merystemu wierzchołkowego korzenia siewek diploidalna liczba chromosomów wynosiła 2n = 4x = 38 dla KK oraz 2n = 36 - 38 dla testowanych linii DH.

4. Dyskusja

Obserwacja oraz wykonane analizy dla dwóch pokoleń roślin androgenetycznych pozwoliły na ocenę ilościową i jakościową badanych linii rzepaku jarego. Rośliny kontrolne KK posiadające tetraploidalną liczbę chromosomów były łatwe do utrzymania w hodowli i dobrze przystosowały się do panujących w fitotronie ziemnym warunków. W większości przypadków charakteryzowały się prawidłowym rozwojem rozety i poszczególnych organów. Stworzona specjalnie do prowadzonych badań skala oceny prawidłowego rozwoju rozety pozwoliła w jednoznaczny sposób określić różnice między odmianami. Najlepiej rozwiniętą rozetą charakteryzowały się rośliny o genotypie DH A. Skrajnie niedorozwiniętą rozetą, w 12 tygodniu wzrostu, odznaczała się większość roślin linii DH PROG. Linia DH K wykazywała typowe dla haploidów cechy. Mimo, że cechy morfologiczne nie są wystarczające do określenia ploidalności, rośliny haploidalne lub o zmniejszonej liczbie

chromosomów są mniejsze w porównaniu z diploidalnymi/ poliploidalnymi przedstawicielami tych samych gatunków (Niemirowicz-Szczytt, 1995; Malepszy, 2009). Różnice pomiędzy podwojonym haploidem DH K a populacyjną odmianą rzepaku cv. Feliks zaobserwowano we wszystkich przeprowadzonych analizach. Linia DH PROG była prawie całkowicie sterylna, łuszczyny, które udało się uzyskać w wyniku indukowanego zapylenia krzyżowego były małe, silnie zdeformowane, z niewielką liczbą nasion. Tak wysoka sterylność tej linii wskazuje na silne zaburzenia w rozwoju generatywnym (powstawaniu spor, gametofitów, zapyleniu i zapłodnieniu, rozwoju zarodka i bielma). Pęd wykazywał się dużą tendencją do rozgałęzień. Roślina była krzaczasta, a jej początkowy rozwój był zauważalnie wolniejszy od innych linii. Co ciekawe, po osiągnięciu dojrzałości rośliny wykazywały się dobrą kondycją i stabilnością. Wynikać to może z faktu, że progesteron u roślin występuje naturalnie, jego działanie jest jednak inne niż u ssaków. Dodawanie go egzogennie, w odpowiednich stężeniach stymulować może wzrost roślin oraz odporność na zmienne czynniki środowiskowe (Janeczko i in., 2015, 2019; Rojek i in., 2015). Silną wybujałością cech wykazywały się rośliny o genotypie DH A. Ich kondycja oraz zdolność do produkcji nasion znacznie przewyższała wartości u innych linii. Androsteron stymuluje kwitnienie u *Arabidopsis* w warunkach *in vitro* oraz rozwój generatywny u pszenicy ozimej (Janeczko i in., 2003 i cyt. tam lit.). Działanie androsteronu prawdopodobnie wzrasta, jeśli zastosuje się metodę *in vitro* (Janeczko i in., 2003; Rojek i in., 2015).

Badania różnic wielkości aparatów szparkowych wykazały największe odstępstwa u linii DH PROG oraz DH A. Odmiany te miały największe względem rośliny kontrolnej struktury. Linię DH K cechują typowe dla roślin androgenetycznych mniejsze aparaty szparkowe (Niemirowicz-Szczytt, 2009). Pojedyncze skrajne różnice zaobserwowane w wielkości struktur w obrębie jednej linii wynikać mogą z różnicy poziomów ułożenia się aparatów szparkowych na preparacie.

Chromosomy rzepaku charakteryzują się małym rozmiarem oraz zbliżonym do siebie kształtem. W naturalnych warunkach niezmieniona liczba chromosomów wynosi 2n = 38 (Hasterok i Maluszynska, 2000). Analiza kariotypu roślin o niewielkich i podobnych do siebie chromosomach jest szczególnie utrudniona (Niemirowicz-Szczytt, 1995). Linie badane w pracy posiadały od 36 do 38 chromosomów. Nieznana pozostaje liczba chromosomów u roślin o genotypie DH PROG ze względu prawie całkowitą sterylność, bardzo niską zdolność do kiełkowania nasion i nieuzyskanie siewek niezbędnych do wykonania badania. Linie wyhodowane za pomocą androgenezy *in vitro* z reguły mają haploidalną liczbę chromosomów. Do podwojenia chromosomów zachodzi wskutek zastosowania

m.in. kolchicyny (Rahman i Michalak, 2016) czy innych substancji zatrzymujących mitozę (Möllers, 1994). Analiza liczby chromosomów udowodniła spontaniczne podwojenie liczby chromosomów, co jest nierzadkim i opisywanym w literaturze zjawiskiem notowanym podczas androgenezy *in vitro* rzepaku i kapusty (Michalik, 2009). W przedstawianych badaniach niemożliwe jest ustalenie, w którym etapie doszło do podwojenia się liczby chromosomów. Ponieważ zarówno rośliny androgenetyczne z pożywek kontrolnych jak i wzbogaconych steroidowymi hormonami miały liczbę chromosomów podwojoną lub aneuploidalną, kolejnym ważnym etapem badań powinno być sprawdzenie czy aneuploidalność/ całkowite podwojenie liczby chromosomów jest cechą zależną od składu pożywki indukcyjnej (obecność lub brak hormonu steroidowego). O ile badanie linii haploidalnych dla nauki i rolnictwa jest niezwykle interesujące, w przypadku wykorzystania takich linii w rolnictwie niezbędne jest podwojenie liczby chromosomów (Niemirowicz-Szczytt, 1995). Tym bardziej, obserwowane zjawisko spontanicznego podwajania liczby chromosomów jest istotne i w przyszłości przydatne dla tworzenia nowych odmian rzepaku.

5. Wnioski

Badane linie DH są spontanicznie podwojonymi haploidami; do podwojenia liczby chromosomów doszło najprawdopodobniej w trakcie indukcji lub hodowli *in vitro*. Rośliny o genotypie DH A cechuje wybujałość morfologiczna, co jest typowe dla linii mieszańcowych (heterozja F1 mieszańców po skrzyżowaniu linii wsobnych) i poliploidów. Wysoka sterylność linii DH PROG to cecha typowa na haploidów, DH po mutagenezie oraz niezbalansowanych mieszańców, która świadczy o zaburzeniach w rozwoju generatywnym. Genotyp DH A jest najlepszym i najbardziej interesującym obiektem dla kontynuacji badań. Wybujałość cech morfologicznych, nadprodukcja prawidłowo zawiązanych łuszczyn i nasion oraz ich wielkość i waga wskazują na promujące działanie androsteronu – zarówno dla indukcji androgenezy i spontanicznego podwojenia liczby chromosomów, jak i poprawy jakości oraz wigoru otrzymywanych linii.

6. Literatura

Czerpak R., 1993. Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin. Kosmos 1993, 42 (3/4): 613-636.

Dubas A., Gładysiak S., 1994. Szczegółowa uprawa roślin rolniczych. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu: 175-189.

Dunwell J., 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010, 8: 377–424.

Hasterok R., Maluszynska J., 2000. Cytogenetic markers of *Brassica napus* L. chromosomes. J. Appl. Genet. 2000, 41(1): 1-9.

Janeczko A., Filek W., Biesaga-Kościelniak J. i in., 2003. The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-*epi*brassinolide. Plant Cell Tiss. Org. 72: 147.

Janeczko A., Pociecha E., Dziurka M., i in., 2019. Changes in content of steroid regulators during cold hardening of winter wheat - Steroid physiological/biochemical activity and impact on frost tolerance. Plant Physiol. Biochem 139: 215–228.

Janeczko A., Oklestkova J., Novak O., i in., 2015. Disturbances in production of progesterone and their implications in plant studies. Steroids 96: 153-163.

Jensen WA., 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco, W.H. Freeman &amp: 1–408

Kopcewicz J., 1969. Influence of steroids on the growth of the dwarf pea. Naturwissenschaften 56: 287.

Krzymański J., 2000. Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszonego o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Rośliny Oleiste XXI: 7-14.

Iino M., Nomura N., Tamaki Y., i in., 2007. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth. Phytochemistry 2007, 68: 1664-1673.

Lichter R,. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pfanzenphysiol. 105:427–434.

Malepszy S., 2009. Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa: 43-54.

Mailer R.J., 2016. Oilseeds, Overview. W:Reference Module in Food Science. Elsevier.

Michalik B., 2009. Hodowla roślin z elementami genetyki i biotechnologii. PWRiL. Poznań

Möllers C., Iqbal MCM,. Röbbelen G., 1994. Efficient production of double haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspores. Euphytica 75: 95-104.

Niemirowicz-Szczytt K., 1995. Haploidy roślin w biotechnologii. Kosmos 1995, 44 (3- 4): 703-708.

Prem D., Solís MT., Bárány I., i in., 2012. A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. BMC Plant Biol. 12:127.

Rahman M., Michalak de Jiménez M., 2016. Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus*: A review. J. Plant Sci. Mol. Bree. 5: 1-9.

Rojek J., Pawełko Ł., Kapusta M., i in., 2015. Exogenous steroid hormones stimulate full development of autonomous endosperm in *Arabidopsis thaliana*. Acta Soc. Bot. Pol. 84: 287–

301.
Shahzadi T., Khan FA., Zafar F., i in., 2015. An overview of *Brassica species* for crop improvement. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 15:1568–1573.
Szała L., 2002. Charakterystyka podwojonych haploidów rzepaku ozimego uzyskanych z odmiany Bor. Rośliny Oleiste XXIII: 244-254.
Wilk A,. 2015. Wpływ wybranych hormonów steroidowych na indukcję androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor populacyjnej odmiany rzepaku jarego *Brassica napus* var. Feliks. Praca magisterska, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
Yang Y., Wang Y., Zhan J., i in., 2017. Genetic and Cytological Analyses of the Natural Variation of Seed Number per Pod in Rapeseed (*Brassica napus* L.). Front. Plant Sci. 2017 Nov 2,8:1890

Narzędzia Lean Management i ich zastosowanie w sektorze ochrony zdrowia

Zdęba-Mozoła Agnieszka [(1)], Zastawna Beata [(1)]

[1] Interdoktormen, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Agnieszka Zdęba-Mozoła: agnieszka.zdeba-mozola@stud.umed.lodz.pl

Streszczenie
W artykule podjęto próbę zaprezentowania efektów stosowania koncepcji szczupłego zarządzania – Lean Management. Scharakteryzowano wybrane narzędzia Lean Management oraz na podstawie przeglądu literatury przedstawiono możliwości zaimplementowania rozwiązań w jednostkach sektora ochrony zdrowia. Przedstawiono również wyniki przeprowadzonego badania dotyczącego stosowania narzędzi zarządzania wizualnego.

Słowa kluczowe: lean management, lean healthcare, 5S, zarządzanie wizualne, ochrona zdrowia

Lean management tools and their application in health care system

Summary
The article submits the concept and efficiency of Lean Management. The description of selected instruments of Lean Management, based on overview of literature, is followed by possibilities of implementation of LM solutions in healthcare. Authors submitted also the results of survey exploring the use of visual management instruments.

Keywords: lean management, lean healthcare, 5S, visual management, healthcare

1. Wstęp

Lean Management (LM) jest koncepcją zarządzania, która wywodzi się z obszarów produkcyjnych. Po rozwiązania z zakresu Lean Management coraz częściej sięgają inne sektory gospodarki, takie jak szeroko pojęte usługi czy administracja publiczna. Obserwowany jest również wzrost zainteresowania zastosowaniem metod LM w sektorze ochrony zdrowia.

Celem artykułu jest omówienie głównych narzędzi szczupłego zarządzania Lean Management oraz wskazanie możliwości ich zastosowania w jednostkach ochrony zdrowia. W podmiotach leczniczych zaimplementowane i odpowiednio wdrożone zasady LM przynoszą wymierne korzyści w postaci poprawy jakości obsługi pacjenta, eliminacji strat w procesie udzielania świadczeń oraz obniżenia kosztów. W artykule przedstawiono również wyniki badania ankietowego przeprowadzonego wśród personelu lekarskiego szpitala w województwie dolnośląskim dotyczącego zarządzania informacją na oddziałach.

2. Charakterystyka i historyczne podłoże koncepcji Lean Management

Współcześnie zarządzanie organizacją jest bardzo złożonym procesem. Przyczyn występowania tego zjawiska należy upatrywać w nieustannych zmianach otoczenia, które następują coraz bardziej dynamicznie. Znaczny wpływ na tą dynamikę ma między innymi rozwój technologiczny, ale również coraz częściej obserwowany deficyt wysoko wykwalifikowanych pracowników na rynku pracy.

Przełom XIX i XX wieku był czasem rewolucji przemysłowej, która tradycyjny sposób wytwarzania dóbr i usług zastąpiła nowym, zdominowanym przez maszyny, linie montażowe i taśmy produkcyjne. Niezbędne stało się wprowadzenie nowych rozwiązań organizacyjnych, umożliwiających optymalne wykorzystanie zdobyczy technologicznych oraz czasu i umiejętności wyszkolonych pracowników.

Jednym ze stworzonych i usystematyzowanych zbiorów takich rozwiązań, wprowadzających jednocześnie unikalne metody zarządzania oraz kulturę organizacyjną, był Toyota Production System (TPS). System ten dał podwaliny dla obecnie szeroko stosowanego podejścia do zarządzania – Lean Management (LM), zwanego również szczupłym zarządzaniem (Parkes, 2017). Pojęcie „lean" zostało pierwszy raz użyte w 1988 roku przez J. Krafcika (Triumph of Lean Production System) jako określenie japońskiego systemu zarządzania produkcją TPS (Parkes, 2017).

Termin *lean* czyli szczupły odnosi się do podstawowych założeń systemu eliminującego marnotrawstwo (z japońskiego *muda*) poprzez ograniczanie zbędnych kosztów i procedur na każdym poziomie działania oraz wprowadzenie innowacji organizacyjnych, ekonomicznych i technicznych. LM umożliwia poprawę produktywności oraz zwiększenie efektywności i jakości, poprzez wprowadzenie innowacji organizacyjnych, ekonomicznych i technicznych (Stoler, 2015).

3. Lean Management – założenia, techniki i narzędzia

Koncepcja Lean opiera się na dwóch założeniach – stabilności (powtarzalności) i ciągłym doskonaleniu. Stabilność w LM oznacza spójny i przewidywalny proces, który umożliwia osiągnięcie idealnego przepływu poprzez organizację pracy i ciągły ruch. Nieustanne doskonalenie (*jap. Kaizen)* odnosi się do ciągłej pracy nad usprawnianiem poszczególnych elementów procesu. Celem omawianej koncepcji zarządzania jest osiągnięcie najniższego kosztu, przy najwyższej jakości i w najkrótszym czasie (Parkes, 2017). Koncepcja wprowadzając powyższe założenia odnosi się również do szacunku dla pracowników wyrażanego poprzez postawę kadry zarządzającej, która nie tylko dba o dobre wykorzystanie potencjału każdego pracownika, ale też jest otwarta na innowacje

i usprawnienia zgłaszane przez załogę. W literaturze można spotkać kilka definicji szczupłego systemu zarządzania. Mark Graban określił szczupły system, jako „zestaw narzędzi i system zarządzania, metoda ciągłego doskonalenia i zaangażowania pracowników, sposób rozwiązywania problemów, które są istotne z punktu widzenia liderów i wszystkich szczebli organizacji" (Graban, 2011). Inne definicje szczególną rolę szczupłego systemu upatrują w eliminacji marnotrawstwa, ciągłym rozwoju i szacunku dla pracowników.

Lean Management jest odpowiedzią na potrzebę zmiany w standardowych, statycznych sposobach zarządzania w organizacjach. Stanowi nową formę dynamicznego zarządzania, pozwalającą na przeprowadzanie zmian w przedsiębiorstwie. Polega na zdiagnozowaniu dotychczasowego stanu organizacji, zaprojektowaniu i wdrożeniu zmian, których zadaniem jest usprawnianie istniejących procesów (Głowacka i in., 2013). Głównym celem *LM* jest „odchudzenie" organizacji ze zbędnych procedur i cykli, poprawa produktywności i efektywności. Koncepcja zakłada eliminację marnotrawstwa (*jap. Muda)* na wszystkich poziomach organizacji, identyfikację problemów, zbędnych czynności i zakłóceń w procesie wytwarzania produktu lub usługi i ich skuteczne usuwanie w sposób zapewniający wysoką jakość (Rydlewska-Liszkowska I., 2013). Rodzaje marnotrawstwa według koncepcji LM przedstawione zostały w Tabeli 1.

Tab. 1 Źródła marnotrawstwa.

Typy marnotrawstwa	Przykłady
Nadprodukcja	Zbyt dużo szczegółów, niepotrzebne informacje, nadmierny rozwój, „pchanie" zamiast „ssania" informacji.
Transport	Błędy w komunikacji, wiele źródeł informacji, transport dokumentów do akceptacji.
Oczekiwanie	Informacja tworzona za wcześnie lub niedostępna, późno dostarczona, podejrzana jakość informacji.
Zbędne przetwarzanie	Zbyt dużo iteracji, niepotrzebne przekształcenie informacji, niejasne kryteria.
Zapas	Zbyt dużo informacji, skomplikowane odzyskiwanie informacji.
Zbędny ruch	Wymagana interwencja „ręczna", brak bezpośredniego dostępu, informacja przekazana do nieodpowiedniego źródła, ponowne sformułowanie.
Błędny produkt	Brak jakości, niepełna, niejednoznaczna, niedokładna informacja, brak wymaganego testu/weryfikacji.

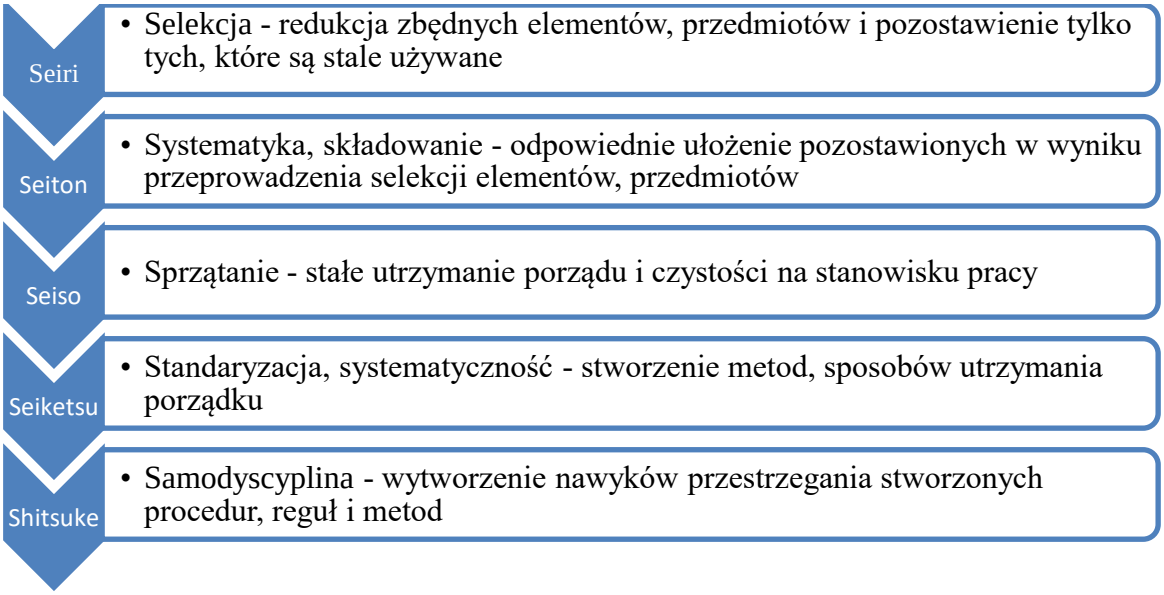
Źródło: T. Koch, R. Horbal, T. Sobczyk, R. Kagan, A. Bielewski, M. Eisler, T. Kanikuła, A. Hojka, B. Misiurek, Lean w obszarach pozaprodukcyjnych, https://www.researchgate.net/publication/279751372.

Lean Management stosuje wiele narzędzi, dzięki którym możliwe jest osiągnięcie oczekiwanych rezultatów i ograniczenie trwonienia zasobów. Jednymi z najistotniejszych są: Value Stream Mapping (VSM), 5xwhy, 5S i Kanaban

VSM - Mapowanie Strumienia Wartości to instrument systemu zarządzania służący do zbierania danych na temat rzeczywistego przepływu elementów w procesach występujących w organizacji. VSM pozwala na wizualizację przebiegu procesów. Zebrane dane przedstawiane są w postaci graficznej za pomocą diagramów (Koch i in.). Strumieniem wartości określa się czynności niezbędne do wykonania w celu przeprowadzenia produktu, usługi przez kolejne etapy cyklu (tzw. główne przepływy wartości).

Opisanie strumienia (przepływu) wartości wraz z wyodrębnieniem wszystkich komórek biorących udział w opisywanym procesie stanowi kolejny element mapowania. Parametrami, których się używa do mapowania strumienia wartości są: czas przebywania sprawy w organizacji (lead time), czas faktycznie poświęcony na załatwienie sprawy (processing time), czas wykonywania czynności dodających wartości z punktu widzenia klienta (value added time), liczba spraw, jaka powinna wychodzić z systemu w jednostce czasu (takt), liczba spraw wychodzących ze stanowiska w jednostce czasu (cykl pracy stanowiska), wielkości zapasu, a także ilości spraw w toku. Zmapowane procesy można usprawniać stosując inne metody z zakresu Lean Management np. 5S, 5W, kanban, dzięki którym możliwe będzie zoptymalizowanie pracy, efektywne wykorzystanie zasobów, ograniczenie biurokracji oraz poprawa jakości usługi świadczonej dla klienta (Nogalski i in.). Mapa strumienia, nazywana jest również fotografią stanu systemu, która w sposób statyczny pokazuje składowe struktury przepływu oraz nieciągłości spowodowane zakłóceniami w toku realizacji i niepotrzebnym trwonieniem zasobów. VSM pozwala na uchwycenie stanu obecnego procesu, ale również na zidentyfikowanie możliwych do wystąpienia przyszłych scenariuszy (Pieloch i in., 2019).

Kolejne narzędzie, 5S umożliwia skuteczną i trwałą organizację miejsca pracy, dzięki czemu uzyskujemy efekt redukcji marnotrawstwa. Nazwa narzędzia pochodzi od pierwszych liter 5 wyrazów w języku japońskim, oznaczających odpowiednio 5 kolejnych etapów stosowanych w metodzie. Przedstawione zostały one na poniższym rysunku *Narzędzie 5S – etapy i definicje.*



Rys. 1 Narzędzie 5S – etapy i definicje. Źródło: opracowanie własne na podstawie M. Graban, Lean Hospitals. Doskonalenie szpitali.

Metoda 5S polega na uporządkowaniu miejsca pracy, wyeliminowaniu zbędnych przedmiotów, które nie są potrzebne do realizacji zadań oraz ułożeniu pozostawionych rzeczy w sposób ergonomiczny, aby zapewnić optymalne wykorzystanie przestrzeni, ekonomię ruchów i usprawnić oraz skrócić czas wykonywania obowiązków. 5S zakłada również stworzenie zestawu reguł, procedur, instrukcji, które pozwolą na utrzymanie raz wprowadzonego porządku i będą wspomagać pracowników w przyzwyczajeniu się do stałego monitorowania stanowiska pracy i utrzymania go w pożądanym stanie (Podobiński, 2014).

Poszczególne narzędzia Lean Management stosują wizualizację, która pozwala na przedstawienie w sposób czytelny etapów procesu, statusu, standardów pracy. Zarządzanie wizualne jest kluczowe w szczupłej kulturze zarządzania, gdyż formy graficzne szybko i prosto, bez zbędnej straty czasu, pokazują wszystkim uczestnikom procesu zidentyfikowane problemy, istniejącą organizację pracy, strukturę i sposób postępowania czy stany nieakceptowane, w tym również nieprzestrzeganie „szczupłych" zasad (Koch i in.).

4. Charakterystyka sektora ochrony zdrowia i przykłady zastosowania narzędzi Lean Management

Poszczególne sektory gospodarki sięgają coraz częściej po najnowsze zdobycze z zakresu zarządzania. Można również zaobserwować coraz większe zainteresowanie Lean Managementem również w ochronie zdrowia. Szpitale borykają się z licznymi problemami i w zastosowaniu nowych narzędzi upatrują sposobu na ich przezwyciężenie. Problemy finansowe, niepewność prawna, problemy personalne związane z brakiem wykwalifikowanych pracowników, ale także niechęć wśród kadry medycznej do

wprowadzania zmian stanowią główne wyzwania dla menadżerów placówek medycznych. W literaturze często jednostki sektora ochrony zdrowia określa się, jako niepowtarzalne i odmienne, szczególnie w porównaniu do przedsiębiorstw przemysłowych. Cechami, które powodują ową odmienność są m.in:

1. bardzo zróżnicowana i kompleksowa praca,
2. konieczne do wykonania zadania bardzo często mają charakter natychmiastowy,
3. niewielka tolerancja błędu;
4. czynności wymagają dużego stopnia koordynacji między różnymi grupami specjalistów;
5. pracownicy są wysoko wyspecjalizowani, zgrupowani w organizacjach zawodowych wobec których często wykazują większą lojalności niż wobec pracodawcy;
6. często podwójne podporządkowanie służbowe (kliniczne i organizacyjne);
7. szczególny profil działalności – produkcja usług zdrowotnych (Kautsch i in., 2015).

W Stanach Zjednoczonych z narzędzi LM korzysta coraz więcej szpitali. Mark Graban w swojej książce *Lean hospitals* podaje kilka przykładów jednostek, w których wdrożenie narzędzi LM przyniosło pozytywne efekty – np. skrócenie czasu oczekiwania pacjentów na zabiegi z zakresu ortopedii w Szpitalu ThedaCare w Wisconsin (z 14 tygodni do 31 godzin od momentu odbycia pierwszej wizyty do wykonania zabiegu) czy zmniejszenie o 95% liczby zgonów pacjentów spowodowanych zakażaniem krwi w związku z wykonanym wkłuciem centralnym w Allegheny Hospitals w Pensylwanii (Graban, 2011). System Lean Management Healthcare ma stosunkowo krótką historię wdrożenia. Pierwsze projekty z zakresu LM realizowane były 14 lat temu. Wiele szpitali w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Japonii, Anglii, Włoszech, Danii czy Szwecji już z sukcesami je realizuje, osiągając sukcesy zarówno w sferze ekonomicznej (obniżając koszty procedur), jak i poprawy jakości. Efekty ekonomiczne, organizacyjne, jakościowe czy poprawa satysfakcji pacjentów uzależnione są od wielu czynników.

W Polsce zainteresowanie nowymi metodami zarządzania jest niewielkie. Tabela 2, będąca wynikiem badań prowadzonych przez A. Tylek w 2009 roku, wśród osób zarządzających w jednostkach sektora ochrony zdrowia przedstawia modele zarządzania stosowane w placówkach medycznych.

Tab. 2 Koncepcje zarządzania wykorzystywane w placówkach medycznych.

Lp.	Wyszczególnienie	A		B		Razem	
		liczba	%	liczba	%	liczba	%
1	Reengineering	2	1,2	0	0,0	2	0,8
2	Outsourcing	59	34,1	23	32,4	82	33,6
3	Lean management	1	0,6	2	2,8	3	1,2
4	Benchmarking	7	4,1	2	2,8	9	3,7
5	Zarządzanie jakością	58	33,5	25	35,2	83	34,0
6	Organizacja ucząca się	15	8,7	7	9,9	22	9,0
7	Zarządzanie projektami	24	13,9	9	12,7	33	13,5
8	Zrównoważona strategiczna karta wyników	7	4,1	2	2,8	9	3,7
9	Inne	0	0,0	1	1,4	1	0,4
	Razem	173	100,0	71	100,0	244	100,0

A – szpital B – ZOZ

Źródło: B. Kożuch, A. Tylek, Współczesne koncepcje w zarządzaniu publicznymi organizacjami ochrony zdrowia w: Przekształcenia strukturalne i społeczne w ochronie zdrowia, red. R. Lewandowski, M. Kautsch, Wyd. Społecznej Akademii Nauk, Łódź 2012.

Niektóre z wymienionych w tabeli koncepcji są od kilku lat stosowane przez zarządzających podmiotami leczniczymi. Są to outsourcing i zarządzanie jakością, które wiążą się z określonymi korzyściami (najczęściej o charakterze finansowym – niższe koszty i/lub wyższy przychód) (Kożuch i in., 2012).

Stopniowo pojawia się zainteresowanie różnymi dotąd niestosowanymi w Polsce koncepcjami zarządzania w placówkach medycznych. Pierwsze podmioty zainteresowane koncepcją Lean Management wdrożyły niektóre rozwiązania szczupłego zarządzania z dobrym skutkiem. Jednym z przykładów jest Centrum Usług Medycznych DIALIZA Sp. z o.o., wktórym zastosowane narzędzia zakresu Lean Management przyniosły wyjątkowo pozytywne rezultaty. Stworzono tam mapy procesów realizowanych w organizacji i dokonano wyboru procesów niezbędnych do usprawniania w kolejnych etapach. Spośród narzędzi *LM* wybrano aż 9: 5S, Kanban, A3, 5why, PFD – flowchart, VSM, POKA YOKE, FMEA, JIDOKA.

Pozytywne efekty uzyskano w wielu zakresach działalności Centrum. Przede wszystkim w organizacji pracy i efektywności procesów. Jednocześnie zaobserwowano wzrost satysfakcji pacjentów. Zwiększono bezpieczeństwo- ryzyko kliniczne zostało zredukowane o prawie 90% w porównaniu ze stanem początkowym. Zmniejszono o 30% poziom zapasów, a także ograniczono o 50% nadprocesowość w jednostce zmniejszając liczbę czynności koniecznych do wykonania w poszczególnych procedurach. Zaobserwowano

również pozytywne efekty finansowe, w postaci zmniejszenia o 40% wydatków na środki czyszczące.

5. Zastosowanie narzędzi zarządzania wizualnego w procesie przekazywania informacji.

Wdrożenie metod szczupłego zarządzania w jednostkach sektora ochrony zdrowia ukierunkowane jest na poprawę jakości opieki (wzrost wartości produktu, jakim jest świadczenie zdrowotne, dla pacjenta) i zmniejszenie niepotrzebnych kosztów. (Preś i in.). Jedną z metod Lean Management opisywaną w artykule, której zadaniem jest uwypuklenie marnotrawstwa, ale jednocześnie problemów i nieprawidłowości występujących w procesie, jest zarządzanie wizualne, które przyczynia się do zmniejszenia deficytu informacji w organizacji, umożliwiając poprawę organizacji pracy i usprawniając procesy. Może być ono również narzędziem zwiększającym efektywność zarządzania poprzez stałe dostarczanie kierownikom i pracownikom poszczególnych działów kluczowych informacji (Graban, 2011).

W szpitalach sposobem na przekazywanie bieżących danych jest między innymi tzw. odprawa na oddziałach. Jest to zebranie kadry, najczęściej wyłącznie medycznej, pracującej na danym oddziale, podczas którego komunikowane są różnego rodzaju informacje. Sposób, forma oraz zakres informacji najczęściej nie jest tożsamy dla wszystkich komórek lub jednostek, chociaż zawiera wspólne elementy.

W jednym z wielospecjalistycznych szpitali na Dolnym Śląsku zostało przeprowadzone badanie ankietowe, którego celem było przeanalizowanie sposobu przeprowadzania codziennych odpraw i stosowania w ich trakcie narzędzi ułatwiających organizację pracy. W badaniu wzięło udział 51 osób z personelu lekarskiego, co stanowi 40% pracującej kadry lekarskiej szpitala. Odprawa na badanych oddziałach odbywa się prawie wyłącznie w dni robocze (65% odpowiedzi) i bierze w nich udział cały obecny w danym dniu personel lekarski (96% wyników). 45% odpowiedzi wskazywało, że dodatkową osobą poza lekarzami podczas codziennych spotkań jest również pielęgniarka oddziałowa. Sporadycznie w odprawach biorą udział inne osoby (np. stażyści, fizjoterapeuci). Podczas spotkań omawiane są najczęściej sprawy organizacyjne (80% odpowiedzi), związane z bieżącym procesem leczenia (60%), stan zdrowia nowo przyjętych pacjentów (78%), ilość wolnych łóżek (43%). Omawiany jest również raport z dyżuru z dnia poprzedniego (28%). W trakcie odpraw omawiane są również wskaźniki. Respondenci wskazali jednak na niewielką ich liczbę. Najczęściej omawiane wskaźniki przedstawione są w tab. 3

Tab. 3 Wskaźniki prezentowane na odprawach.

Ilość wypisanych pacjentów	88%
Ilość wolnych łóżek	80%
Długość pobytu	73%
Wynik finansowy oddziału	70%

Źródło: opracowanie własne.

Prezentowanie informacji przekazywanych w trakcie odpraw oraz omawianie wskaźników odbywa się w formie wystąpień pojedynczych pracowników, którzy referują przygotowany temat. Czasami przekazywane są papierowe wydruki z danymi. Nowoczesne narzędzia prezentowania wyników nie są prawie w ogóle stosowane.

Wyniki przeprowadzonej ankiety wskazują, iż odprawy lekarskie poświęcone są głównie omówieniu przebiegu procesu leczenia w oddziale i trudnościom organizacyjnym. Jednocześnie do rozwiązania tychże problemów nie są stosowane wystandaryzowane wskaźniki, które mogłyby usprawnić proces udzielania świadczeń na oddziale z jednoczesnym uwzględnieniem zapewnienia wysokiej ich, jakości oraz redukcji kosztów. Wskaźniki mogłyby służyć zarówno kierownikom poszczególnych oddziałów do sprawnego zarządzania, ale jednocześnie dyrektorom podmiotów leczniczych, jako narzędzie do weryfikowania sposobu i zakresu udzielania świadczeń w poszczególnych komórkach oraz nadzorowania kosztów. Uzasadnionym wydaje się być opracowanie jednakowych dla wszystkich oddziałów wskaźników oraz ujednolicenie sposobu ich prezentowania w postaci tablic dziennych i miesięcznych zwierających przedstawienie kluczowych informacji w sposób przejrzysty i czytelny dla wszystkich pracowników.

6. Zakończenie

Zainteresowanie stosowaniem narzędzi z zakresu Lean Management w sektorze ochrony zdrowia jest coraz większe. Podmioty lecznicze działają w turbulentnym otoczeniu i muszą sprostać coraz większym oczekiwaniom zarówno ze strony pacjenta, jak również ze strony płatnika, organów tworzących i własnych pracowników. Dbałość o wysoką jakość

udzielanych świadczeń wpisana jest w ich działalność. Jednocześnie zobowiązane są do utrzymywania dodatniego wyniku finansowego, co przy obecnym poziomie finansowania świadczeń i stale rosnących kosztach jest szczególnie trudnym zadaniem. Stąd poszukiwanie rozwiązań, które pozwolą na zoptymalizowanie pracy, eliminację nadmiarowych czynności i redukcję kosztów. Stosowane w przemyśle od wielu lat z powodzeniem metody Lean Management doskonale wpisują się w potrzeby sektora ochrony zdrowia. Wdrażane w szpitalach na świecie rozwiązania i uzyskiwanie wyniki, potwierdzają słuszność podejmowanych również w Polsce prób implementacji projektów LM w jednostkach medycznych.

Przedstawione w artykule wyniki badania pokazały również niedostateczną wiedzę z zakresu kluczowych obszarów działania podmiotu i/lub oddziału u osób kierujących. Menadżerowie średniego szczebla nieposiadający wiedzy na temat czynników warunkujących sprawną organizację pracy oraz mających znaczny wpływ na koszty komórki organizacyjnej, nie mogą efektywnie nią zarządzać. Wykorzystanie do tego celu narzędzi zarządzania wizualnego umożliwi stałą obserwację wskaźników z jednoczesnym monitorowaniem wpływu ich zmian na procesy lecznicze, satysfakcję pacjenta i wynik finansowy jednostki.

7. Literatura

Głowacka M. D., Galicki J.,Mojs E. (red.), Zarządzanie Podmiotem Leczniczym, Wyd. Wolters Kluwer, Warszawa 2013, s. 76-80.

Graban M., Lean hospitals – doskonalenie szpitali, Wyd. ProdPublishing, Wrocław 2011, s. 7, 23-24, 117-120, 134-137, 183-184.

Kautsch M. (red.), Zarządzanie w opiece zdrowotnej. Nowe wyzwania, Wyd. Wolters Kluwer, Warszwa 2015, 71-78, 88, 96.

Koch T.,Horbal R.,Sobczyk T.,Kagan R.,Bielewski A., Eisler M., Kanikuła T., Hojka A., Misiurek B., Lean w obszarach pozaprodukcyjnych, https://www.researchgate.net/publication /279751372 [dostęp: 04.01.2020].

Kożuch B., Tylek A., Współczesne koncepcje w zarządzaniu publicznymi organizacjami ochrony zdrowia w: Przekształcenia strukturalne i społeczne w ochronie zdrowia, red. R. Lewandowski, M. Kautsch, Wyd. Społecznej Akademii Nauk, Łódź 2012, str. 110.

Nogalski B., Czerska J., Klimek A., Wykorzystanie metod teorii masowej obsługi i lean management w usprawnianiu procesów w zarządzaniu organizacją publiczną, https://lean.info.pl/wp-content/uploads/2015/10/Wsp%C3%B3%C5%82czesne-_zarz%C4%85dzanie_artyku%C5%82.pdf [dostęp: 07.01.2020].

Parkes A., Kulturowe uwarunkowania Lean Management, Wyd. Difin, Warszawa 2017, s. 7, 13-14, 22, 28.

Pieloch A., Baranowska K., Pojaszewska K., Mapowanie strumienia wartości - ujęcie praktyczne w: Nauka, badania i doniesienia naukowe 2019, Wyd. Idea Kowledge Future, Świebodzice 2019, str. 145-146, 183-184.

Podobiński M., Skutki stosowania japońskich koncepcji i metod zarządzania w polskim przedsiębiorstwie produkcyjnym,w: Nauki o Zarządzaniu 1(18) 2014, str.6.

Preś I, Dudek M., Rozwiązania Lean Management w placówkach ochrony zdrowia na świecie. Case study: wdrożenie metod Lean Management w Regionalnym Centrum Nefrologii w Szczecinku, http://dspace.uni.lodz.pl:8080/xmlui/bitstream/handle/11089/26049/33-46-pres.pdf?sequence=1&isAllowed=y; [dostęp: 15.12.2019].

Rydlewska-Liszkowska I., Lean Management – doskonalenie zarządzania w podmiotach leczniczych, w: Przedsiębiorczość i zarządzanie, tom XIV, zeszyt 10, Wyd. Społecznej Akademii Nauk, Łódź 2013, str. 278-279.

Stoler J., Lean CEO. W drodze do doskonałości, Wyd. MT Biznes sp. z o.o., Warszawa 2015, s. 15.

NAUKI PRZYRODNICZE I MEDYCZNE

Część I

ISBN 978-83-953882-6-2