ISSN 1427-440X

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS

ANNALS
OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY

ROCZNIKI

POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ
W SZCZECINIE
TOM LI

WYDAWNICTWO POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE

SZCZECIN NR 1 2005

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie ukazują się od 1951 roku. Są wydawnictwem naukowym, ciągłym, recenzowanym i cytowanym m.in. w Index Medicus (Medline), Biological Abstract, Chemical Abstract. Dostępne w ponad 150 bibliotekach krajowych i zagranicznych.

Do druku przyjmowane są prace oryginalne i poglądowe oraz prezentujące ważną kazuistykę z zakresu nauk podstawowych, klinicznych oraz humanistyki medycznej autorów z Pomorskiej Akademii Medycznej oraz z innych ośrodków w kraju i za granicą.

Zamieszczony materiał publikowany jest i będzie według przyjętego schematu wydawniczego, w języku polskim lub angielskim, z krótkimi streszczeniami odpowiednio dla języka polskiego – po angielsku, a dla języka angielskiego – po polsku. Każdy tom obejmuje 3 części stałe: oryginalne prace naukowe o objętości 1–1,5 arkusza wydawniczego, w tym skondensowane rozprawy doktorskie, doniesienia naukowe itp.; kronikę PAM za poprzedni rok wraz z przemówieniem rektora na inauguracji roku akademickiego i spis jednostek naukowo-dydaktycznych oraz bibliografię dorobku piśmienniczego uczelni.

Od tomu 50 *Roczników PAM* zostały wprowadzone zmiany w edycji, które omówiono w regulaminie publikowania prac.

REGULAMIN PUBLIKOWANIA PRAC*
w *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej*

Redakcja *Annales Academiae Medicae Stetinensis – Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej* przyjmuje oryginalne prace naukowe, w trybie ciągłym. Można publikować materiały ze wszystkich dziedzin nauk medycznych, również te, które są zbyt obszerne na zamieszczenie w czasopismach specjalistycznych.

Materiał powinien mieć nie więcej niż 20–25 stron maszynopisu formatu A-4, łącznie z rycinami, tabelami, podpisami i piśmiennictwem tylko cytowanym w tym dziele (ograniczonymi do minimum) oraz streszczeniami.

Manuskrypt napisany w języku polskim i angielskim, na białym papierze, bez wyróżnień. Zadrukowana może być tylko pierwsza strona kartki, druga pozostaje niezadrukowana (czysta). Używać należy 12-punktowej czcionki, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami. Strony numerować kolejno, zaczynając od tytułowej. Numery stron umieszczać w dolnym, prawym rogu każdej strony. Zachować kolejność układu: strona tytułowa, tekst podstawowy, materiał ilustracyjny, piśmiennictwo.

Strona tytułowa

Imię i nazwisko autora (autorów); tytuł pracy w dwóch językach; miejsce uzyskania stopnia naukowego (dotyczy doktoratów) lub pracy autora (nazwa i adres placówki naukowej, tytuł i stopień naukowy jej kierownika); słowa kluczowe w dwóch językach wymienianych w katalogu MeSH; miejsce i nazwa instytucji, gdzie wykonano pracę; szczegółowe dane dotyczące dysertacji (dotyczy prac doktorskich – promotor, liczba: stron, rycin, tabel i piśmiennictwa).

Tekst podstawowy

S u m m a r y: streszczenie pracy w języku angielskim i/lub innym. Powinno się w nim znaleźć: cel badania lub próby, podstawowe procedury (wybór badanych w doświadczeniu, metody obserwacji lub analizy), główne wyniki (istotne dane i ich statystyczne znaczenie) oraz wnioski. Należy podkreślić nowe i istotne aspekty pracy. W s t ę p: podać cel artykułu i podsumować uzasadnienie wykonanego badania lub obserwacji z możliwością przywołania piśmiennictwa. M e t o d y: opisać w sposób łatwo zrozumiały dobór materiału badawczego oraz zastosowanych metod i statystyki. W y n i k i: przedstawić w tekście w logicznej kolejności. Nie powtarzać danych z tabel i rycin, podkreślić i podsumować tylko ważne obserwacje. D y s k u s j a: podkreślić należy nowe oraz ważne aspekty badania i wynikające z nich wnioski, nie powtarzać szczegółowo danych przedstawionych w rozdziałach Wstęp i Wyniki. Porównać własne obserwacje z innymi autorami, którzy wykonali zbliżone badania. W n i o s k i: powiązać z celami badania i przedstawić w sposób zwięzły. S t r e s z c z e n i e s t r u k t u r a l n e (wstęp, materiał i metody, wyniki, konkluzje): w języku podstawowym pracy, zawierające kwintesencję tego, co jest w tekście, od 200 do 250 słów. S k r ó t y użyte w tekście po raz pierwszy należy podać w pełnym brzmieniu. Nie należy rozpoczynać zdania od skrótu. L i c z b o w e w a r t o ś c i i s y m b o l e wszystkich wielkości winny być podane wg międzynarodowego układu jednostek SI. S ł o w a k l u c z o w e: 3–6 terminów, nie powinny powtarzać słów zawartych w tytule pracy, wymienianych w katalogu MeSH.

Materiał ilustracyjny

Obejmuje ryciny (kreski – wykresy, diagramy oraz siatki – zdjęcia), tabele, tablice, opatrzone tytułami (pod rycinami, nad tabelami). Powinny być dostarczone na oddzielnych kartkach, z oznaczeniem góra–dół i kolejności numeracji wg cytowania w tekście. Osobną numerację posiadają ryciny i osobną tabele. Fotografie mikroskopowe powinny posiadać wewnętrzną skalę, a stosowane symbole, strzałki lub litery – wyraźnie uwidocznione na tle. Kolorów używać tylko wtedy, jeśli barwa czarno-biała nie odda istoty przekazu. Tytuły oraz inne informacje wewnętrzne na rycinach i w tabelach należy podać w języku polskim i angielskim. Na marginesie maszynopisu zaznaczyć numery tabel i rycin w miejscu, gdzie mają być wstawione.

Piśmiennictwo

Numerując, należy podawać w kolejności cytowania. Każdy numer piśmiennictwa należy zapisywać od nowej linii. Pozycji nie należy dublować. Cytowane w tekście piśmiennictwo podać w nawiasach kwadratowych, ze spacją między numerami. Podajemy nazwisko autora/-ów z pierwszymi literami imion. Przytaczamy wszystkich autorów, jeśli jest ich sześciu. Powyżej tej liczby – sześciu z dopiskiem *et al.* Tytuły periodyków powinny być skracane zgodnie ze sposobem przyjętym w Index Medicus (Medline).

Redakcja wymaga przedłożenia pracy w dwóch egzemplarzach wraz z wersją elektroniczną (dyskietka lub CD-ROM) z zaznaczeniem programu zapisu. Tekst powinien być zapisany w programie Word.

---

* Opracowany na podstawie wytycznych Międzynarodowego Komitetu Wydawców Czasopism Medycznych, opublikowanych w *Problemach Medycyny Nuklearnej 1997, 11 (21), 67–87*.

A N N A L E S
A C A D E M I A E M E D I C A E S T E T I N E N S I S

A N N A L S
O F T H E P O M E R A N I A N M E D I C A L U N I V E R S I T Y

R O C Z N I K I

POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ
W SZCZECINIE

TOM LI

WYDAWNICTWO POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE

SZCZECIN NR 1 2005

Redaktor Naczelny
Editor-in-Chief
prof. dr hab. n. med. IRENEUSZ KOJDER

Międzynarodowa Rada Naukowa
International Scientific Council
prof. dr hab. n. med. *Andrzej Cretti*, Prof. Dr. *Niloufer J. Chinoy* (Gujarat, IND), Prof. Dr. *Antonio J.G. Ferreira* (Lizbona, P),
prof. dr hab. n. med. *Janusz Fydryk*, Prof. Dr. *Yücel Kanpolat* (Ankara, TR), prof. dr hab. n. med. *Irena Karłowska*,
Prof. Dr. *Koichi Kono* (Osaka, J), prof. dr hab. n. med. *Ireneusz Kojder*, prof. dr hab. n. med. *Tadeusz Marcinkowski*,
Prof. Dr. *Falk Oppel* (Bielefeld, D), prof. dr hab. n. med. *Andrzej Paradowski*, prof. dr hab. n. med. *Eugeniusz Szmatłoch*

Komitet Redakcyjny
Editorial Committee
prof. dr hab. n. med. *Dariusz Chlubek*, dr hab. n. med. *Andrzej Ciechanowicz*,
prof. dr hab. n. med. *Krystyna Pilarska*, prof. dr hab. n. med. *Elżbieta Ronin-Walknowska*,
mgr *Dagmara Budek*, mgr *Teresa Jasiunas*

Tłumacz redakcji
Editorial translator
dr n. med. *Tomasz Dutkiewicz*

Redakcja techniczna i korekta
Teresa Jasiunas
Mirosław Ogorzałek

© Copyright by Pomorska Akademia Medyczna, 2005

Adres redakcji
Editorial office address
Pomorska Akademia Medyczna
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
www.ams.edu.pl
e-mail: wydawnictwo@pam.szczecin.pl

Wydanie publikacji dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji
This publication was partly financed by the Ministry of Science and Information Society Technologies

WYDAWNICTWO POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
Wydanie I. Nakład 300 egz. Objętość: ark. wyd. 18,5, ark. druk. 17
Skład komputerowy: Agencja Reklamowo-Wydawnicza Mirosław Ogorzałek, Szczecin
Drukarnia ZAPOL, Szczecin, tel./fax 434-10-21

SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA – prof. dr hab. n. med. *Ireneusz Kojder* 5

Przemówienie Rektora Pomorskiej Akademii Medycznej na Inaugurację Roku Akademickiego 2004/2005 – prof. dr hab. n. med. *Wenancjusz Domagała* 7

PRACE ORYGINALNE

1. *Tariq Al-Amawi*
Analiza porównawcza czynników prognostycznych przeżyć chorych operowanych radykalnie z powodu raka odbytnicy w stadium zaawansowania klinicznego T2 i T3 13
2. *Leszek M. Sagan, Marek B. Lickendorf*
Znaczenie stabilizacji szyjnej tylnej kręgosłupa w przypadkach nieskutecznej stabilizacji przedniej 23
3. *Damian Czepita*
Współczesne możliwości oraz perspektywy w leczeniu jaskry 27
4. *Damian Czepita, Wojciech Gosławski, Artur Mojsa*
Występowanie wad refrakcji u uczniów, którzy do drugiego roku życia przebywali w świetle emitowanym przez lampy żarowe lub fluorescencyjne. 33
5. *Ewa Tomasik, Damian Czepita, Maria Żejmo, Florian Czerwiński*
Rozwój gałki ocznej i oczodołu człowieka w życiu płodowym 37
6. *Iwona Krawczyk-Sulisz*
Radioizotopowa ocena wentylacji i perfuzji po późnej dekortykacji płuca z powodu przewlekłego ropniaka 41
7. *Marcin Tutak*
Wybrane parametry śliny mieszanej w rozpoznawaniu wegetatywnej neuropatii cukrzycowej 49
8. *Monika Góra*
Badanie skuteczności wszczepów hydroksyapatytowych w leczeniu zniszczeń wyrostka zębodołowego w obrębie zębów leczonych metodą hemisekcji 57
9. *Piotr Szumin*
Zastosowanie tomografii spiralnej poprzecznej aparatu Cranex–Tome w diagnostyce stawu skroniowo-żuchwowego i implantologii 65
10. *Marzena Bandura, Krystyna Opalko*
Zawartość fluorków i magnezu w zębach stałych u dzieci i młodzieży z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju 75
11. *Magdalena Sroczyk, Franciszek. Bienia, Krystyna Opalko, Marek Lesiakowski*
Ocena w skaningowym mikroskopie elektronowym kształtu i struktury ściany bruzdy w zakresie szkliwa po zastosowaniu abrazji powietrznej MSP (Firmy Art Dent) 79
12. *Wojciech Głąbowski*
Ochronne działanie czynnika wzrostu komórek macierzystych (stem cell factor – SCF) na pozaustrojowy rozwój zarodków mysich w okresie przedimplantacyjnym 83
13. *Anna Nowakowska*
Polimorfizmy I/D genu enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) oraz 4g/5g regionu promotorowego genu inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) a układ hemostazy u pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym 95
14. *Joanna Kabat-Koperska*
Wpływ polimorfizmu genu enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) biorcy i dawcy na czynność nerki przeszczepionej 107
15. *Aldona Siennicka*
Wpływ krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na stymulowaną zmodyfikowanymi oksydacyjnie LDL ekspresję śródbłonkowych cząstek adhezyjnych 117
16. *Katarzyna Górnik*
Badania patogennych właściwości wolno żyjących pełzaków izolowanych z naturalnych i sztucznych kąpielisk województwa zachodniopomorskiego 127

CONTENTS

PREFACE – Prof. *Ireneusz Kojder* M.D., D.M.Sc. Habil. 5

Address by Rector of the Pomeranian Medical University Inaugurating the Academic Year of 2004/2005 – Prof. *Wenancjusz Domagała* M.D., D.M.Sc. Habil. 7

ORIGINAL WORKS

1. *Tariq Al-Amawi*
Comparative study of prognostic factors in patients subjected to radical surgery for rectal cancer at clinical stage T2 or T3 13
2. *Leszek M. Sagan, Marek B. Lickendorf*
Posterior cervical lateral mass fixation for the management of insufficient anterior stabilization 23
3. *Damian Czepita*
Contemporary possibilities and perspectives in the treatment of glaucoma. 27
4. *Damian Czepita, Wojciech Gosławski, Artur Mojsa*
Occurrence of refractive errors among students who before the age of two grew up under the influence of light emitted by incandescent or fluorescent lamps 33
5. *Ewa Tomasik, Damian Czepita, Maria Żejmo, Florian Czerwiński*
Development of the human eyeball and orbit during the fetal life 37
6. *Iwona Krawczyk-Sulisz*
Scintigraphic assessment of ventilation and perfusion after late decortication of the lung due to chronic empyema. 41
7. *Marcin Tutak*
Some properties of mixed saliva in diabetic autonomic neuropathy. 49
8. *Monika Góra*
Usefulness of hydroxyapatite implants for the management of alveolar bone lesions at tooth hemisection sites. . . . 57
9. *Piotr Szumin*
Transverse spiral tomography with the Cranex–Tome apparatus in diseases of the temporomandibular joint and in implantology 65
10. *Marzena Bandura, Krystyna Opalko*
Content of fluoride and magnesium in permanent teeth of children and adolescents with constitutional delay of growth and development 75
11. *Magdalena Sroczyk, Franciszek Bienia, Krystyna Opalko, Marek Lesiakowski*
Scanning electron microscopic examination of the shape and surface of enamel fissures prepared with the MSP air abrasion method of Art-Dent. 79
12. *Wojciech Głąbowski*
The protective effect of stem cell factor (SCF) on in vitro development of preimplantation mouse embryos 83
13. *Anna Nowakowska*
The influence of I/D polymorphism of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene and 4g/5g polymorphism of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene promoter on the haemostatic system in patients with essential hypertension and dyslipidemia 95
14. *Joanna Kabat-Koperska*
The influence of gene polymorphism of the angiotensin-converting enzyme in donor and recipient on the function of renal graft. 107
15. *Aldona Siennicka*
The effect of short-chain fatty acids on expression of endothelial adhesion molecules stimulated by oxidatively modified LDL. 117
16. *Katarzyna Górnik*
Pathogenic properties of free-living amoebae isolated from natural and man-made bathing sites in the province of Western Pomerania 127

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 5
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 5
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

Przedmowa

Preface

Szanowni Czytelnicy!

Komunikacja naukowa jest tą formą aktywności, która pretenduje do bycia wolną od trendów, mód i nastrojów politycznych tak deprymujących jakość życia umysłowego społeczeństw. Tym samym jest ona jednym z nielicznych punktów odniesień i oparcia w nawigacji po współczesności.

Mając na uwadze tę rolę klasycznych form przekazu informacji naukowej, oddajemy do rąk naszych Szanownych Czytelników i pozostajemy w uzasadnionej wyżej nadziei, że nie tylko do rąk, nowy numer *Roczników Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie – Annales Academiae Medicae Stetinensis*. Należą się przy tym słowa podziękowania za sprawność i wydajność pracy wszystkim osobom tworzącym i kreującym numer, w tej liczbie – pleno titulo – państwu recenzentom, poligrafom i wszystkim redakcyjnym współpracownikom, dzięki którym osiągnęliśmy niepowszechną i nie występującą uprzednio aktualność kalendarzową *Roczników PAM – Annales AMS*, bowiem tom 51, który trzymają Państwo w rękach, ukazuje się w połowie 2005 roku.

Niezależnie od tego nieustannie wypełnieni jesteśmy troską o jakość przekazu, dlatego oczekujemy wszelkich uwag dotyczących naszego pisma i zawartych w nim artykułów. Komentarze naukowe będą publikowane w kolejnych numerach.

Redaktor Naczelny
prof. dr hab. n. med. *Ireneusz Kojder*

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 7–11
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 7–11
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

WENANCJUSZ DOMAGAŁA

PRZEMÓWIENIE REKTORA POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ NA INAUGURACJĘ ROKU AKADEMICKIEGO 2004/2005

ADDRESS BY RECTOR OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY INAUGURATING THE ACADEMIC YEAR OF 2004/2005

Wysoki Senacie!
Wysokie Rady Wydziałów!
Ekscelencjo, Księże Arcybiskupie!
Panie Wojewodo!
Panie Marszałku!
Panie Prezydencie Miasta!
Magnificencje, Panowie Rektorzy!
Panie Dyrektorze Narodowego Funduszu Zdrowia!
Panie Komendancie Policji!
Panowie reprezentanci Korpusu NATO!
Panie Konsulu Honorowy Królestwa Norwegii!
Herr Professor Hartmunt Goos!
Drodzy Studenci!
Szanowne Panie i Szanowni Panowie!

Rozpoczynamy dzisiaj 57 rok działalności Pomorskiej Akademii Medycznej. Na wstępie chciałbym poinformować, że w bieżącym roku:(1) w związku z perspektywą uruchomienia nowych kierunków studiów Wydział Pielęgniarski uzyskał nazwę Wydziału Nauk o Zdrowiu, (2) w Szpitalu Klinicznym nr 1 oddany został do użytku nowoczesny Oddział Hematologii i Onkologii Dziecięcej I Kliniki Chorób Dzieci, wybudowany i wyposażony głównie staraniem Stowarzyszenia Dzieci Rodziców Chorych na Białaczkę. W tym miejscu składam serdeczne podziękowania zarządowi i członkom Stowarzyszenia oraz wszystkim sponsorom, którzy umożliwili zaistnienie tego dzieła, (3) Pomorska Akademia Medyczna wraz z Akademią Rolniczą weszła w skład koordynowanego przez Politechnikę Szczecińską Zachodniopomorskiego Centrum Zaawansowanych Technologii zaakceptowanego przez KBN do finansowania. Również Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych prof. dr. hab. Jana Lubińskiego uzyskało status Centrum Doskonałości finansowanego przez KBN, (4) rozpoczęto modernizację budynku przy ul. Żołnierskiej na potrzeby Wydziału Nauk o Zdrowiu. Będzie ona zakończona w roku przyszłym.

Dydaktyka

W minionym roku akademickim w Pomorskiej Akademii Medycznej studiowało łącznie 1959 studentów, w tym na Wydziale Lekarskim 1020, na Wydziale Stomatologii 408 i na Wydziale Pielęgniarskim 531. W programie anglojęzycznym na Wydz. Lekarskim studiowało 128 studentów, głównie z Norwegii.

W bieżącym roku na podstawie wyników ogólnopolskiego egzaminu testowego przyjęto 131 osób na Wydział Lekarski i 80 osób na Wydział Stomatologii. Najlepsze wyniki uzyskali: na Wydziale Lekarskim pan Michał Post

(LO w Łobzie) – 111 pkt /120 możliwych, a na Wydziale Stomatologii pani Anna Krasnoborska (LO w Grajewie) – 98 pkt. Wymienionym studentom i profesorom liceów, z których pochodzą, serdecznie gratuluję! Na Wydziale Nauk o Zdrowiu przyjęto w bieżącym roku 150 osób na licencjackie studia pielęgniarskie, 22 osoby na specjalność ratownictwo medyczne, 54 osoby na zaoczne magisterskie studia pielęgniarskie i 77 osób na tzw. studia pomostowe.

W programie anglojęzycznym na Wydziale Lekarskim naukę rozpocznie na I roku 50 osób. Jest to największa grupa w historii programu anglojęzycznego PAM. Składam podziękowanie panu dr. hab. Markowi Droździkowi – prodziekanowi ds. programu anglojęzycznego za skuteczne zaangażowanie w tym zakresie.

W czasie wakacji zostały wyremontowane i oddane do użytku 3 nowe sale seminaryjne w SPSK nr 1 przy ul. Unii Lubelskiej, co dalej usprawni proces dydaktyczny. Prorektor ds. dydaktyki prof. dr hab. Przemysław Nowacki opracował i nadzorował przeprowadzenie ankiety, w której studenci ocenili proces dydaktyczny i zaangażowanie nauczycieli. Wyniki ankiety są obecnie analizowane. Prof. dr hab. Dariusz Chlubek zorganizował dla studentów medycyny I Ogólnopolski Konkurs Wiedzy Biochemicznej pod nazwą Superhelisa 2004.

W ramach posiadanej przez uczelnię tzw. Karty Erasmusa 5 studentów studiowało na Uniwersytecie w Greifswaldzie w roku akad. 2003/04 (częściowo finansowani byli z Programu Sokrates–Erasmus, a częściowo ze stypendiów Rektora PAM). Po raz pierwszy w ramach wymiany studentów z Uniwersytetem w Greifswaldzie studentka IV roku Wydziału Medycznego tegoż Uniwersytetu studiowała w semestrze letnim 2003/2004 w Pomorskiej Akademii Medycznej.

W bieżącym roku akademickim 2 studentów studiować będzie na Uniwersytecie w Lipsku, a 7 osób na Uniwersytecie w Greifswaldzie (i tym razem kilka tych stypendiów pochodzi z Programu Sokrates–Erasmus, a kilka zostało ufundowanych przez Rektora PAM). Zostały podjęte kroki w kierunku nawiązania wymiany w ramach Programu Socrates–Erasmus z jednym z uniwersytetów w Wielkiej Brytanii. Rozwijającą się systematycznie wymianę studentów w programie Socrates/Erasmus zawdzięczamy zaangażowaniu pani dr hab. Elżbiety Urasińskiej, której składam podziękowanie.

W imieniu Władz Uczelni chciałbym serdecznie podziękować wszystkim nauczycielom akademickim, którzy biorą udział w zajęciach z uczniami Liceum Ogólnokształcącego nr V w Szczecinie w ramach patronatu, jaki PAM objęła nad tą szkołą, oraz panom prof. dr hab. Dariuszowi Chlubkowi, dr hab. Krzysztofowi Borowiakowi i dr n. med. Andrzejowi Brodkiewiczowi za współorganizowanie Zachodniopomorskiego Festiwalu Nauki, a także wszystkim, którzy w tym festiwalu biorą czynny udział.

Zatrudnienie i awanse

W Pomorskiej Akademii Medycznej na pełnych etatach zatrudnione są 863 osoby, w tym 506 nauczycieli akademickich. Spośród nich 42 osoby posiadają tytuł profesora, a 65 osób stopień doktora habilitowanego. Nadal średnia wieku w dniu zatwierdzenia habilitacji wynosi w naszej uczelni ok. 44 lata, co oznacza, że szereg osób uzyskuje ten stopień poniżej 40 roku życia.

W ubiegłym roku akademickim tytuły profesora uzyskali profesorowie: Andrzej Żyluk i Piotr Gutowski. Wymienionym profesorom serdecznie gratuluję! Stopień naukowy doktora habilitowanego uzyskało w ubiegłym roku 12 osób (wszystkie na Wydziale Lekarskim), a stopień doktora nauk medycznych 78 osób (65 na Wydz. Lekarskim i 13 na Wydz. Stomatologii). To bardzo dobrze jak na małą uczelnię.

W dniu dzisiejszym przechodzą na zasłużoną emeryturę profesorowie zwyczajni: Jan Horodnicki, Jan Królewski, Grzegorz Szumiłowicz, a także mgr Ewa Kepel-Matusiewicz. Na emeryturę przeszło również 9 długoletnich pracowników nie będących nauczycielami akademickimi, w tym pan mgr Waldemar Pomorski zastępca dyrektora PAM. Wszystkim wymienionym i niewymienionym składam serdeczne podziękowanie za trud i poświęcenie włożone w rozwój naszej Uczelni.

Zmarli

Szanowni Państwo!

W minionym roku odeszli do wieczności długoletni i zasłużeni nauczyciele akademiccy: profesorowie Zbigniew Marzęcki, Bronisław Olejak, dr hab. Andrzej Szczygielski, doktorzy: Michał Cielecki, Roman Turczynowski, Dorota Samujło, mgr Elżbieta Karpińska – wieloletni kwestor PAM, mgr Violetta Łuczyńska i Henryk Banasiewicz. Dla uczczenia Ich pamięci proszę wszystkich obecnych o powstanie i chwilę milczenia.

Nauka

W minionym roku pracownicy PAM opublikowali 462 prace w czasopismach recenzowanych, w tym 83 w renomowanych czasopismach zagranicznych (w roku 2003 – 86) oraz 117 prac w wydawnictwach zbiorowych (w tym 20 w zagranicznych), a także 19 podręczników, monografii i skryptów.

W Uczelni prowadzone są 33 (w roku 2003 – 41) granty finansowane przez KBN, w tym 5 z ostatniego konkursu. W 5 Programie Ramowym Unii Europejskiej pracownicy PAM biorą udział w 6 projektach naukowych. Prof. dr hab. Jan Lubiński jest koordynatorem jednego projektu i partnerem w dwóch innych, prof. dr hab. Anna Boroń-Kaczmarska,

dr n. med. Magdalena Leszczyszyn-Pynka, prof. dr hab. Janusz Fydryk i dr hab. Bogusław Machaliński są partnerami w 4 innych projektach. W 6 Programie Ramowym UE prof. dr hab. Jan Lubiński jest koordynatorem jednego międzynarodowego projektu.

W algorytmie naukowym Uczelni pierwsze pięć miejsc pod względem liczby uzyskanych punktów w ubiegłym roku zajęły w kolejności: Zakład Genetyki i Patomorfologii, Zakład Patomorfologii, Katedra Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Klinika Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii oraz Zakład Biochemii i Chemii.

W ubiegłym roku akademickim pracownicy naukowi PAM zorganizowali 11 ogólnopolskich konferencji i sympozjów naukowych, w tym 4 konferencje międzynarodowe z dużym udziałem gości zagranicznych. Dział Nauki i Współpracy z Zagranicą był współorganizatorem konferencji naukowej „Szczecin Day"w Greifswaldzie, która umocniła kontakty naukowe z pracownikami Uniwersytetu w Greifswaldzie nawiązane w czasie konferencji „Greifswald Day" zorganizowanej w Szczecinie w 2003 roku. Prof. dr hab. Jan Lubiński wraz z międzynarodowym zespołem redakcyjnym rozpoczął wydawanie nowego czasopisma naukowego pt. „Hereditary cancer in clinical practice". Jest to kwartalnik, który ukazuje się pod auspicjami UICC i PAM jako jedyne czasopismo międzynarodowe wydawane przez uczelnię medyczną w Polsce.

W bieżącym roku mija 10 lat od powołania w PAM Studium Doktoranckiego. Kierownikowi studium panu prof. dr. hab. Zygmuntowi Machoyowi składam podziękowanie za włożony trud w utrzymanie na wysokim poziomie tej kuźni kadr naukowych dla PAM.

Wydawnictwa

Dział Wydawnictw PAM wydał w roku akademickim 2003/2004 18 tytułów naukowych oraz 11 tytułów dydaktycznych i informacyjnych. Panu prof. dr hab. Ireneuszowi Kojderowi – redaktorowi naczelnemu oraz zespołowi wydawnictwa składam serdeczne podziękowanie za wysoki poziom merytoryczny i edytorski wszystkich pozycji.

Nagrody i wyróżnienia

W roku akademickim 2003/2004 stypendium naukowe Ministra Zdrowia otrzymywał student IV roku Wydziału Stomatologii Marcin Post. W konkursie Primus Expert obecnie już absolwentka Wydziału Lekarskiego lek. Anna Potemkowska zajęła I miejsce wśród uczelni medycznych.

Pan prof. dr hab. Krzysztof Marlicz został wybrany w skład Zespołu Nauk Medycznych Komitetu Badań Naukowych, a pan prof. dr hab. Leonidas Samochowiec otrzymał godność członka honorowego Polskiego Towarzystwa Farmakologów. Serdecznie panom profesorom gratuluję!

Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej przedłużyła stypendium dla dra n. med. Tomasza Byrskiego z zespołu prof. dr. hab. Jana Lubińskiego na rok 2004.

Zespołową nagrodę naukową Ministra Zdrowia otrzymali: prof. dr hab. Jan Lubiński, dr n. med. Anna Jakubowska, dr n. med. Jacek Gronwald, dr n. med. Bohdan Górski, dr n. med. Tadeusz Dębniak, dr hab. n. med. Wojciech Lubiński za cykl (8) prac z dziedziny diagnostyki molekularnej i aspektów klinicznych nowotworów dziedzicznych. Zarząd Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej przyznał panu prof. dr. hab. Janowi Lubińskiemu trzyletnie subsydium w edycji konkursu „Subsydia Profesorskie" w dziedzinie nauk przyrodniczych i medycznych. W gronie laureatów znaleźli się reprezentanci 5 uczelni medycznych, 4 uniwersytetów i 4 instytutów PAN oraz dwaj uczeni z innych placówek.

Szczecińskie Towarzystwo Naukowe wyróżniło medalem STN Amicus Scientiae et Veritatis dr. n. med. Grzegorza Kuliga z Kliniki Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii, tzw. Zachodniopomorski Nobel za osiągnięcia w dziedzinie medycyny trafił do dr. n. med. Jerzego Gronwalda z Zakładu Genetyki i Patomorfologii.

Szpital Kliniczny nr 2 oraz Klinika Położnictwa i Perinatologii odznaczone zostały tytułem WHO/UNICEF „Szpital Przyjazny Dziecku". Panu prof. dr. hab. Ryszardowi Czajce i zespołowi kliniki oraz dyrekcji i pracownikom szpitala serdecznie gratuluję!

W artykule pt. „Podstawowy wskaźnik jakości" (Forum Akademickie nr 7–8, 2004, str. 40–43) prof. Andrzej Pilc podał listę najczęściej cytowanych naukowców w Polsce z dziedziny biomedycyny, wykorzystując Science Citation Index i kryterium 1000 cytowań prac danego autora. Spośród 5500 profesorów i doktorów habilitowanych tylko 138 osób opublikowało prace cytowane ponad 1000 razy. W tej elitarnej grupie znalazło się troje profesorów z Pomorskiej Akademii Medycznej. Są to kardiolog i dwóch patomorfologów: prof. dr hab. Zdzisława Kornacewicz-Jach, której 15 prac cytowanych było 2055 razy, kierownik zakładu patomorfologii, którego 81 prac cytowanych było 1302 razy i prof. dr hab. Jan Lubiński, którego 82 prace cytowane były 922 razy. Pani profesor i panu profesorowi serdecznie gratuluję! Zważywszy, że z jednej strony więcej niż 50 cytowań uzyskuje jedynie ok. 1% publikacji, a ponad 100 cytowań – tylko 0,3%, a z drugiej strony w tak dużych uczelniach jak AM we Wrocławiu, Lublinie i Poznaniu znajduje się tylko odpowiednio 1, 2, 4 naukowców, których prace cytowano ponad 1000 razy, ranking ten potwierdza wysoką jakość publikacji naukowych naszej małej uczelni. Warto dodać, że w rankingu tygodnika „Wprost" PAM znalazła się

na 15 miejscu spośród 29 najlepszych polskich uczelni klasy międzynarodowej – jako jedyna szkoła wyższa naszego regionu w tej grupie.

Niestety kolejny rok PAM nie otrzymała żadnej dotacji na inwestycje budowlane, a władze lokalne – miejskie i wojewódzkie – nie wykazały w tym zakresie żadnego zrozumienia dla potrzeb swojej jedynej uczelni wyższej klasy międzynarodowej.

Uczelnia w otaczającej rzeczywistości

Nie sposób nie odnieść się dzisiaj do tragicznej wręcz sytuacji szpitali w ogóle, a szpitali klinicznych w szczególności. Jak wspomniałem w ubiegłym roku, wszyscy widzimy, że system opieki zdrowotnej w Polsce jest ciężko chory, może nawet jest to choroba nieuleczalna, ponieważ system finansowania służby zdrowia ma wszelkie cechy procesu patologicznego.

Wprowadzony przez NFZ system narzuconych szpitalom klinicznym limitów przyjęć jest sprzeczny z samą istotą i celem istnienia tych szpitali, jakim jest m.in. udzielanie wysokospecjalistycznych świadczeń – wszystkim bez wyjątku ich potrzebującym. Z drugiej strony system ten prowadzi bezpośrednio do marnotrawienia publicznego grosza, gdyż ogromny potencjał szpitali klinicznych stoi niewykorzystany. Nowoczesna aparatura zakupiona za miliony złotych, najlepsi lekarze – specjaliści w regionie nie mogą leczyć chorych, bo szpital kliniczny dostał za mały limit punktów, a za leczenie poza limitem NFZ i nikt inny nie zapłaci. Nie chcą również płacić za leczenie w szpitalach klinicznych mieszkańców miasta Szczecina władze miejskie, pomimo iż są zobowiązane do zapewnienia opieki zdrowotnej swoim mieszkańcom. Chorzy więc stoją w kolejce. Pytam, kto jest odpowiedzialny za to, że chorzy muszą oczekiwać tygodniami na operacje kardiochirurgiczne nie dlatego, że nie ma miejsc w klinice – są miejsca, są trzy nowoczesne, znakomicie wyposażone sale operacyjne wykorzystane tylko częściowo. Są też wybitni kardiochirurdzy, ale w sztuczny sposób dławi się funkcjonowanie kliniki zbyt małymi limitami dla szpitala klinicznego. A noworodki! Gdzie mają się rodzić, gdy w klinice, która wyróżniona została przez WHO tytułem „Szpital przyjazny dziecku", właśnie skończyły się limity? Na marginesie, jakie to smutne, gdy człowiek przychodzi na świat „poza limitem", od razu przynosząc dług szpitalowi, w którym się urodził! Trzeba jasno powiedzieć, że system limitów utrudnia lub wręcz uniemożliwia mieszkańcom Szczecina i województwa dostęp do wysokospecjalistycznych klinik w szpitalach klinicznych. Trzeba też jasno powiedzieć, że narzucone w tym roku szpitalom klinicznym limity są swego rodzaju pętlą na szyi, która powoli dociskana przez zmniejszanie tych limitów doprowadzi do ich zadłużenia się i bankructwa. Wraz z upadkiem szpitali klinicznych przestanie istnieć Pomorska Akademia Medyczna, a Szczecin zostanie jeszcze większym niż jest obecnie zaściankiem. Czy do tego dążą władze miejskie, samorządowe i rządowe wraz z wojewódzkim oddziałem NFZ?

Trzeba jeszcze raz powtórzyć, że szpitale kliniczne nie są takie same jak szpitale powiatowe i szpitale marszałkowskie. Mają inne zadania, inny sprzęt i kadrę medyczną, leczą inne grupy pacjentów. W istniejącym systemie są ostatnim ogniwem, do którego szpitale niższych poziomów referencyjnych przesyłają trudnych i drogich diagnostycznie i terapeutycznie pacjentów, chorych z powikłaniami lub z rzadkimi chorobami. W szpitalach klinicznych zdobywa się wiedzę medyczną, a beneficjentami ich działań w dydaktyce przed- i podyplomowej są pozostałe szpitale i przychodnie oraz NFZ. Nie można więc szpitala klinicznego traktować pod względem finansowania tak jak szpital powiatowy, a jednocześnie uważać pod względem merytorycznym za szpital najwyższego poziomu referencyjności (którym jest on w rzeczywistości), gdzie leczy się najtrudniejsze powikłania i pacjentów z chorobami wymagającymi znacznych dodatkowych nakładów finansowych. Takie schizofreniczne podejście może jedynie doprowadzić do powolnego i systematycznego upadku szpitali klinicznych, czego właśnie jesteśmy świadkami. Gdzie wtedy będą się uczyć studenci? Gdzie zdobywać wiedzę i umiejętności lekarze w procesie specjalizacji? Gdzie będą kiełkować nowe pomysły diagnostyczno-lecznicze? W szpitalach powiatowych?

Prezydent Miasta Szczecina zahipnotyzowany Szpitalem Miejskim nie dostrzega w ogóle potrzeb szpitali klinicznych, w których przecież leczy się nie kto inny tylko mieszkańcy Szczecina. Marszałek województwa troszczy się wyłącznie o szpitale, dla których jest organem założycielskim, nie pamiętając o szpitalach klinicznych, w których leczy się nie kto inny tylko mieszkańcy województwa. Wyrażam przekonanie, że Urząd Marszałkowski jako organ założycielski nie dopuści do zapowiedzianego na rok przyszły przez dyrektora Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego wypędzenia Kliniki Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii ze szpitala przy ul. Arkońskiej. Nie muszę dodawać, że jest to klinika o uznanym dorobku profesjonalnym i naukowym, w której pracuje wielu wybitnych specjalistów.

Widać wyraźnie, że w mieście Szczecinie i w województwie nie ma żadnej spójnej strategii dotyczącej leczenia szpitalnego. Za duże pieniądze otwiera się w różnych szpitalach oddziały dublujące pracę istniejących już jednostek, m.in. nie wykorzystanych, ze względu na limity, szpitali klinicznych. Dlatego uważam za konieczne pilne powołanie specjalnego zespołu złożonego z odpowiedzialnych za służbę zdrowia przedstawicieli marszałka, wojewody, prezydenta miasta, NFZ i rektora PAM dla wspólnego opracowania optymalnej strategii rozwoju szpitalnictwa w mieście i województwie.

Słowo do studentów

Na zakończenie chciałbym się zwrócić bezpośrednio do studentów naszej Uczelni, a szczególnie do Koleżanek i Kolegów z pierwszego roku studiów. Teraz jest czas, abyś w sposób poważny i pogłębiony przemyślał sobie podstawowe zagadnienia etyczne. Zwróć uwagę, że lekarz jest z natury rzeczy przyjacielem chorego i to przyjacielem, do którego chory ma wręcz bezgraniczne zaufanie, gdyż to lekarz wszelkimi sposobami zabiega i walczy o jego życie i zdrowie. A więc lekarz jest oczywiście przyjacielem życia, adwokatem życia. Każdego życia i istoty ludzkiej już poczętej, a jeszcze nie narodzonej, i istoty ludzkiej w dzieciństwie, i w wieku dojrzałym, i istoty ludzkiej starej, schorowanej i nieuleczalnie chorej. Na każdym z tych etapów peregrynacji człowieka lekarz idzie ręka w rękę razem z nim i z jednakową energią i zaangażowaniem walczy o zdrowie i życie. Strzeż się wartościowania życia. Każde jest jednakowo cenne i ważne! Życie młodego, prężnego 30-latka jest tak samo cenne, ważne i pożyteczne jak życie poczętego, a jeszcze nie narodzonego dziecka i starego, schorowanego, nieuleczalnie chorego człowieka. Nie daj się zwieść prorokom aborcji i eutanazji, ale spokojnie, wytrwale i z poświęceniem walcz o każde zdrowie i życie tobie powierzone. Wtedy zasłużysz na zaufanie chorego, które jest podstawą sukcesu terapeutycznego. A tego sukcesu można oczekiwać tylko wówczas, gdy chory może liczyć na lekarza w każdych okolicznościach, bez wyjątku. Rozważając problem eutanazji, nie zapomnij, że tak się jakoś składa, że wysuwane przez zdrowych żądanie eutanazji w dziwny sposób łączy się ze wzrostem kosztów na opiekę zdrowotną i z niewystarczającą ilością środków na zdrowie. To wszystko, o czym tu mówimy, musisz sobie dogłębnie przemyśleć. Ale nie martw się, pomożemy Ci w tej refleksji.

Chociaż społeczność akademicka Pomorskiej Akademii Medycznej wchodzi w nowy rok akademicki ze świadomością trudnej i niepewnej sytuacji szpitali klinicznych, to jednak w oparciu o naszkicowane tutaj również sukcesy naszej Uczelni patrzymy w przyszłość z umiarkowanym optymizmem, wierząc, że będziemy w stanie sprostać nowym wyzwaniom.

Witam serdecznie w murach naszej Uczelni studentów I roku studiów, a wszystkim studentom, nauczycielom akademickim i pracownikom Pomorskiej Akademii Medycznej życzę sukcesów, zdrowia i uporu w pokonywaniu czekających nas trudności, a także satysfakcji z dobrze wykonanej pracy.

Rok akademicki 2004/2005 ogłaszam za otwarty.
Quod felix, faustum fortunatumque sit!

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 13–21
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 13–21
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

TARIQ AL-AMAWI

ANALIZA PORÓWNAWCZA CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH PRZEŻYĆ CHORYCH OPEROWANYCH RADYKALNIE Z POWODU RAKA ODBYTNICY W STADIUM ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO T2 I T3*

COMPARATIVE STUDY OF PROGNOSTIC FACTORS IN PATIENTS SUBJECTED TO RADICAL SURGERY FOR RECTAL CANCER AT CLINICAL STAGE T2 OR T3*

Oddział Kliniczny Chirurgii Onkologicznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. n. med. *Józef Kładny*

Summary

Purpose: The aim of the study was to evaluate and compare some prognostic factors for rectal cancer in clinical stage T2 and T3.

Material and methods: Patients and methods: 174 consecutive patients with T3 stage tumors and 112 patients with T2 stage tumors were enrolled. Patients underwent curative resection for rectal cancer between January 1993 and December 1997 in eight hospitals of Szczecin. Kaplan–Meier survival analysis was used to determine survival rates. Significance was checked with the log-rank test. Multivariate analyses were adjusted using Cox proportional hazard models.

Results: No significant differences in morbidity and mortality between the studied groups were observed. Postoperative surgical complications were found in 30 patients with T3 stage tumors (17.2%) and 15 patients (13.4%) with T2 stage tumors. Overall five-year survival was higher in patients with T2 stage tumors (56%) than in patients with T3 stage tumors (40%) and local recurrence was observed in 13.9% and 16.7% of the patients, respectively. Multivariate analysis showed that grade, lymph node involvement, local recurrence, surgeon's experience, postoperative complications, inadvertent perforation of tumor, and adjuvant chemotherapy had a significant effect on survival in T3 stage tumors. In T2 stage tumors, survival was influenced by grade and local recurrence.

Conclusion: Comparative analysis showed that clinical and p athological factors were of great importance for prognostication in the more advanced T3 stage, whereas clinical factors had no value in T2 stage.

K e y w o r d s: rectal cancer − prognostic factors − T2 stage − T3 stage.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena wybranych czynników rokowniczych po operacjach raka odbytnicy w stadiach zaawansowania klinicznego T2 i T3 oraz porównanie wartości tych czynników w dwóch badanych stadiach.

Materiał i metody: Analizowano 174 chorych z rakiem odbytnicy w stadium zaawansowania T3 i 112 chorych w stadium T2 leczonych radykalnie we wszystkich kli-

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Józef Kładny*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 114 stron, 39 rycin, 62 tabele, 301 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Józef Kładny* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 114 pages, 39 figures, 62 tables, 301 references.

nikach i oddziałach chirurgicznych Szczecina w latach 1993−1997.

Wyniki: Analizy wykazały, że wczesne wyniki leczenia RO w obu stadiach zaawansowania nie różniły się istotnie. Porównanie wyników odległych wykazało większą szansę przeżycia chorych w stadium T2 (56% przeżyć 5-letnich) w porównaniu do 40% w stadium T3. Nawrót miejscowy stwierdzono nieznacznie częściej u chorych w stadium T3 (16,7% vs. 13,9%). Analizy statyczne wykazały, że istotne znaczenie rokownicze w stadium T3 miały: stopień złośliwości histologicznej, obecność przerzutów w węzłach chłonnych, nawrót miejscowy, doświadczenie operatora, powikłania w okresie pooperacyjnym, niezamierzona perforacja guza i zastosowanie chemioterapii. W stadium T2 istotny wpływ na przeżycie miały: stopień złośliwości histologicznej i nawrót miejscowy.

Wnioski: Na podstawie analiz można stwierdzić, że wartość czynników prognostycznych jest większa w rakach bardziej zaawansowanych, a niektóre czynniki uznawane za rokownicze nie mają istotnego wpływu na wyniki leczenia w rakach mało zaawansowanych.

H a s ł a: rak odbytnicy − czynniki prognostyczne − stadium T2 − stadium T3.

Wstęp

Rak jelita grubego (RJG) stanowi poważny problem współczesnej medycyny. Jest on najczęstszym nowotworem przewodu pokarmowego i jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u człowieka [1]. Szacuje się, że w 2000 roku na świecie rozpoznano ok. 945 tys. nowych przypadków RJG, stanowiły one 9,4% wszystkich zachorowań i były trzecią co do częstości przyczyną zachorowań na nowotwory złośliwe w skali globu. W tym samym roku odnotowano ok. 492 tys. zgonów z powodu RJG [1]. W Polsce RJG jest drugą co do częstości przyczyną zachorowań i zgonów z powodu nowotworów złośliwych. W 1999 roku do krajowego rejestru nowotworów zgłoszono 10 909 nowych zachorowań na RJG, w tym 4786 przypadków raka odbytnicy i odbytu (RO) (44% wszystkich zachorowań). Zarejestrowano także 7987 zgonów z powodu RJG, w tym 2920 zgonów z powodu RO [2]. Wyniki odległe leczenia raka odbytnicy w Polsce należą do jednych z najgorszych w Europie, gdyż tylko ok. 21% chorych ma szansę przeżyć 5 lat. Dla porównania średni czas przeżycia 5-letniego w Europie wynosi 42% [3]. Jedynym skutecznym sposobem leczenia RO jest leczenie chirurgiczne [5, 6, 7, 8, 9]. Znaczny postęp w chirurgicznym leczeniu RO dokonał się w latach dziewięćdziesiątych minionego wieku dzięki wprowadzeniu przez *Healda* techniki polegającej na całkowitym wycięciu krezki odbytnicy (*total mesorectal excision – TME*) [10, 11]. Resekcja odbytnicy techniką TME poprawia wyniki leczenia RO, gdyż pozwala zmniejszyć ryzyko nawrotów miejscowych z 20−40% do ok. 3−12%, a jednocześnie zwiększa szansę przeżycia [10, 12, 13]. W leczeniu uzupełniającym RO stosuje się zarówno leczenie chemiczne [14, 15, 16], jak i radioterapię. Dane opublikowane w ostatnich latach dostarczyły wiele dowodów wskazujących na szansę poprawy wyników leczenia raka odbytnicy o zaawansowaniu T3 i T4, zlokalizowanego w dolnej i środkowej części, jeżeli leczenie chirurgiczne będzie poprzedzane neoadiuwantowym napromienianiem [17, 18, 19, 20]. Rokowanie w RO zależy od wielu czynników, spośród których można wymienić: czynniki związane z guzem, czynniki kliniczne, chirurgiczne, laboratoryjne, a także inne, jak czynniki onkogenetyczne, immunologiczne oraz molekularne.

Celem niniejszej pracy było:

1. Porównanie wyników wczesnych leczenia RO w badanych stadiach.
2. Ustalenie wpływu wybranych czynników na wyniki leczenia RO w stadium T2.
3. Ustalenie wpływu tych czynników na wyniki leczenia RO w stadium zaawansowania T3.
4. Ocena wpływu stadium zaawansowania na częstość wznów miejscowych RO.
5. Ocena wartości czynników rokowniczych w dwóch stadiach zaawansowania RO.

Materiał i metody

Analizie poddano 120 chorych o zaawansowaniu T2 i 207 o zaawansowaniu T3 leczonych z powodu RO we wszystkich ośrodkach chirurgicznych Szczecina (3 kliniki i 5 oddziałów) w latach 1993−1997. Przedmiotem dalszych analiz byli chorzy, u których udało się wykonać resekcję radykalną. Wykonano ją u 174 chorych, tj. 84% pacjentów z zaawansowaniem klinicznym T3 i 112 (93%) z zaawansowaniem T2. Statystycznej analizie poddano następujące czynniki jak: wiek i płeć pacjenta, ośrodek gdzie wykonano zabieg operacyjny, doświadczenie operatora, niezamierzona perforacja guza, lokalizacja guza, typ zabiegu operacyjnego, margines dalszy, wystąpienie powikłań chirurgicznych w okresie pooperacyjnym, przetoczenie koncentratu krwinek czerwonych, wielkość guza, stopień złośliwości histologicznej guza, obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, zastosowanie chemioterapii uzupełniającej, nawrót lokoregionalny i przerzuty odległe. Do analizy przeżyć zastosowano krzywą Kaplana−Meiera. Różnice w przeżyciach porównano za pomocą testu log-rank. Czynniki prognostyczne istotne w analizie jednoczynnikowej poddano wieloczynnikowej analizie za pomocą regresji proporcjonalnych hazardów Coxa.

Wyniki

Śmiertelność w okresie okołooperacyjnym (do 30 doby po operacji) wynosiła 3,4% w grupie chorych operowanych z powodu RO w stadium T3 i 2,7% wśród chorych w stadium T2. Powikłania chirurgiczne stwierdzono u 30 chorych

w stadium T3 (17,2% operowanych) i u 15 (13,4%) w stadium T2. Analiza przeżyć wykazała, że 40% chorych w stadium zaawansowania T3 i 56% chorych w stadium T2 przeżyło pięć lat. Wznowę miejscową rozpoznano u 28 (16,7%) chorych w stadium T3 i 14 chorych (13,9%) w stadium T2.

Analiza czynników rokowniczych w stadium T3

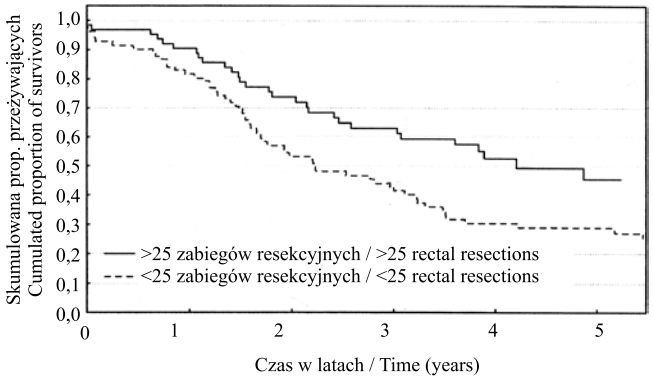
Młodszy wiek pacjenta wiązał się z istotnie większą szansą przeżycia, w najmłodszej grupie wiekowej wskaźnik przeżyć 5-letnich wynosił 53% w porównaniu do 33% w najstarszej grupie. Wykazano duże różnice pomiędzy ośrodkami. Wskaźnik przeżyć 5-letnich wynosił w zależności od ośrodka,

Tabela 1. **Porównanie przeżyć pięcioletnich w stadium T3 w zależności od ośrodka**

Table 1. **Comparison of 5-year survival rates in stage T3 patients in relation to the operating center**

Ośrodek / Center	Wskaźnik przeżyć 5-letnich / 5-year survival	p
1	28%	0,06
2	17%	0,02
3	60%	-
4	47%	0,45
5	29%	0,16
6	27%	0,08
7	43%	0,2
8	14%	0,006

w którym wykonano zabieg operacyjny, od 14% do 60%, co przedstawiono w tabeli 1. Doświadczenie chirurga mierzone liczbą wykonanych zabiegów resekcyjnych odbytnicy miało istotny wpływ na przeżycie chorych. Wskaźnik 5-letnich przeżyć chorych operowanych przez chirurgów wykonujących przynajmniej 25 zabiegów resekcyjnych odbytnicy wyniósł 46%, w porównaniu do 29% wśród chorych operowanych



Ryc. 1. Przeżycia w stadium T3 w zależności od doświadczenia chirurga

Fig. 1. Survival in stage T3 patients in relation to the surgeon's caseload

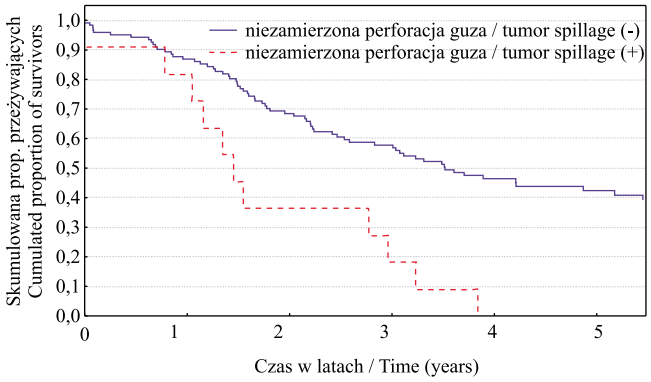
przez chirurgów wykonujących mniej zabiegów, co obrazuje rycina 1. Umiejscowienie guza w środkowej części odbytnicy wiązało się z dłuższym czasem przeżycia. Odsetek przeżyć 5-letnich chorych z RO umiejscowionym w środkowej części odbytnicy był 60%, w porównaniu do 27% u chorych z guzem umiejscowionym w dolnej części (tab. 2). U chorych, u których doszło do śródoperacyjnej perforacji guza, uzyskano krótszy

Tabela 2. **Porównanie przeżyć 5-letnich w stadium T3 w zależności od lokalizacji RO**

Table 2. **Comparison of 5-year survival rates in stage T3 patients with regard to the tumor location**

Umiejscowienie guza / Tumor location	Wskaźnik przeżyć 5-letnich / 5-year survival	Ryzyko zgonu / RR	p
Górna część / Upper part	29%	1,8	0,04
Środkowa część / Middle part	60%	1,0	-
Dolna część / Lower part	27%	2,2	0,017

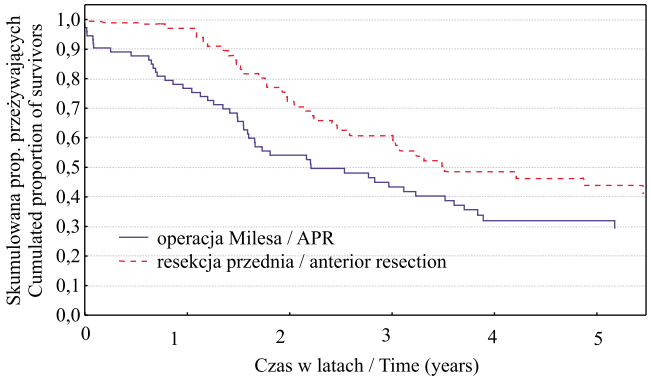
czas przeżycia w porównaniu do pozostałej grupy. Wskaźnik przeżyć 5-letnich dla chorych, u których nie doszło do perforacji guza w trakcie zabiegu, wynosił 42%, nikt natomiast nie przeżył pięć lat spośród chorych, u których doszło do perfora-



Ryc. 2. Przeżycia w stadium T3 w zależności od niezamierzonej perforacji guza

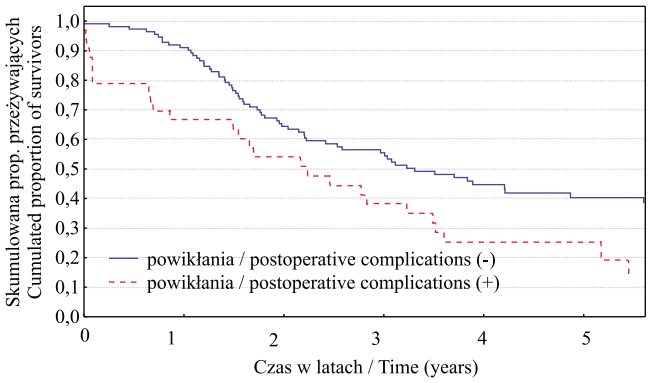
Fig. 2. Survival in stage T3 patients with regard to tumor spillage

cji guza, co przedstawiono na rycinie 2. Porównanie przeżyć chorych po resekcji przedniej i po amputacji brzuszno-krocze wej wykazało większy odsetek przeżyć 5-letnich u tych pierwszych – 45% vs. 32% (ryc. 3). Powikłania chirurgiczne w okresie pooperacyjnym miały istotne znaczenie prognostyczne. Odsetek przeżyć 5-letnich wynosił 26% dla chorych, u których wystąpiły powikłania chirurgiczne i 40% dla chorych bez powikłań (ryc. 4). Stopień dojrzałości histologicznej guza był najbardziej istotnym czynnikiem rokowniczym ze wszystkich badanych. U chorych z guzem wysokozróżnicowanym stwierdzono większy odsetek przeżyć w porównaniu do chorych z guzami średnio- i małozróżnicowanymi: 64%



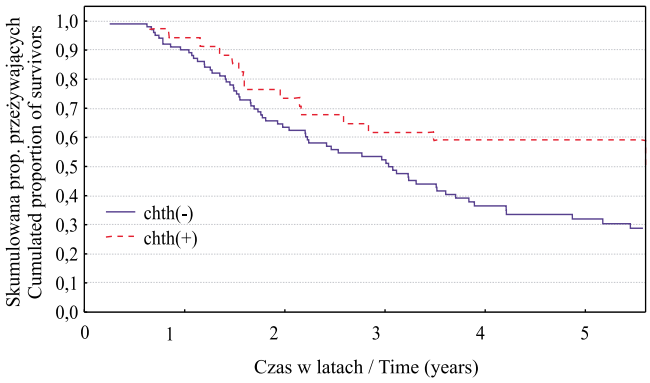
Ryc. 3. Przeżycia w stadium T3 w zależności od rodzaju operacji

Fig. 3. Survival in stage T3 patients with regard to operation type



Ryc. 4. Przeżycia w stadium T3 w zależności od wystąpienia powikłań

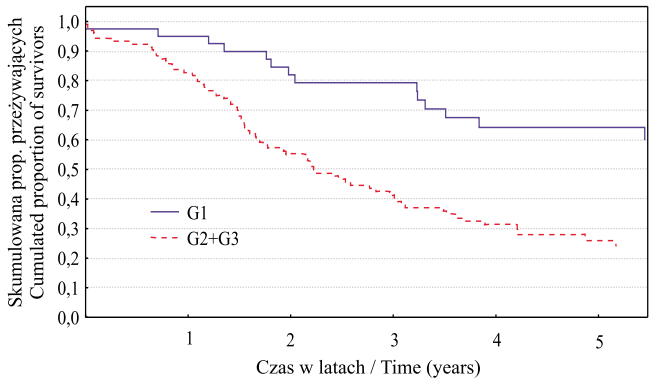
Fig. 4. Survival in stage T3 patients with regard to postoperative complications



Ryc. 7. Przeżycia w stadium T3 w zależności od zastosowania chemioterapii

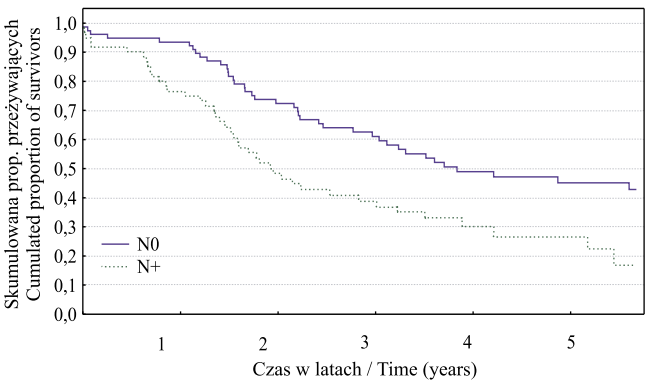
Fig. 7. Survival in stage T3 patients in relation to adjuvant chemotherapy

przeżyć 5-letnich chorych ze stopniem złośliwości G1 w porównaniu do 26% u chorych ze stopniem zaawansowania G2 i G3 (ryc. 5). Wykazano istotny wpływ zajęcia regionalnych węzłów chłonnych na przeżycie. Odsetek przeżyć 5-letnich chorych z zaawansowaniem T3N0 wynosił 45% w porównaniu do 26% przeżyć 5-letnich w stadium T3N+, co obrazuje rycina 6. Zastosowanie chemioterapii wiązało się z większą szansą przeżycia chorego (ryc. 7). U chorych, u których zastosowano chemioterapię, zanotowano 59% przeżyć 5-letnich w porównaniu do 32% chorych, u których nie zastosowano tej metody. Rozpoznanie nawrotu miejscowego wiązało się z krótszymi przeżyciami chorych. Wskaźnik przeżyć 5-letnich wyniósł 47% wśród chorych bez nawrotu miejscowego i tylko 6,4% z nawrotem (ryc. 8). Przerzuty odległe miały istotny wpływ na przeżycie chorych w badanym materiale. Wskaźnik przeżyć 5-letnich wynosił 45% dla chorych bez przerzutów odległych i 18% w grupie chorych, w której rozpoznano po operacji, z zamiarem wyleczenia, przerzuty do narządów odległych (ryc. 9). Pozostałe czynniki badane nie miały istotnego wpływu na odległe wyniki leczenia RO. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że istotny wpływ na przeżycia chorych miały następujące czynniki: stopień złośliwości hi-



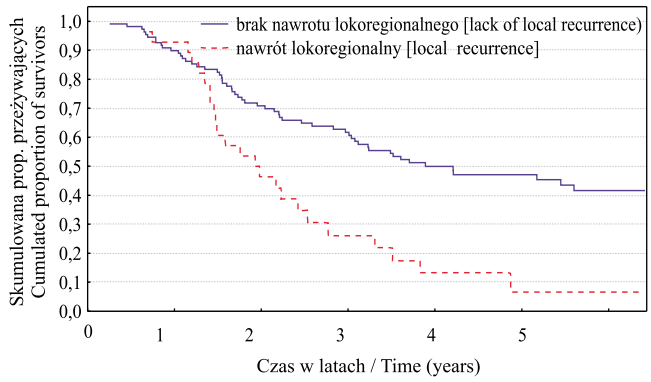
Ryc. 5. Przeżycia w stadium T3 w zależności od stopnia dojrzałości histologicznej

Fig. 5. Survival in stage T3 patients with regard to grade



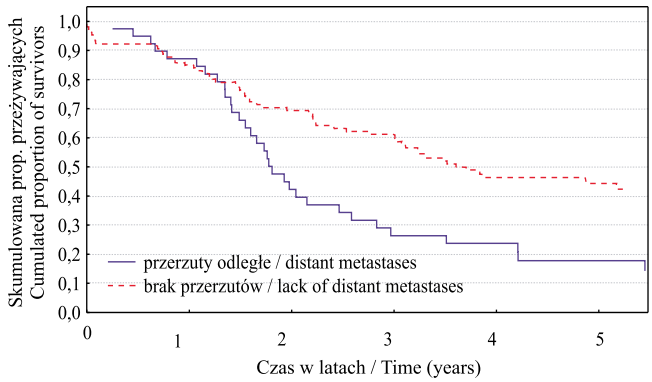
Ryc. 6. Przeżycia w stadium T3 w zależności od zajęcia węzłów chłonnych

Fig. 6. Survival in stage T3 patients with regard to lymph node metastases



Ryc. 8. Przeżycia w stadium T3 w zależności od wystąpienia nawrotu miejscowego

Fig. 8. Survival in stage T3 patients with regard to local recurrence



Ryc. 9. Przeżycia w stadium T3 w zależności od obecności przerzutów odległych

Fig. 9. Survival in stage T3 patients with regard to distant metastases

stologicznej, przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, doświadczenie chirurga wykonującego zabieg operacyjny, powikłania w okresie pooperacyjnym, zastosowanie chemioterapii adiuwantowej, nawrót miejscowy i niezamierzona perforacja guza.

Analiza czynników rokowniczych w stadium T2

Analiza jednoczynnikowa w stadium zaawansowania T2 wykazała istotny wpływ lokalizacji guza na wyniki odległe leczenia (tab. 3), gdyż stwierdzono znaczne różnice w przeżyciach między grupą chorych operowanych z powodu guzów umiejscowionych w górnej części odbytnicy (80% przeżyć 5-letnich) i grupą z guzem zlokalizowanym niżej (w środkowej części uzyskano 64%, a w dolnej części 50% przeżyć 5-letnich). Stopień złośliwości histologicznej guza miał istotny wpływ na czas przeżycia chorych. Zaobserwowano większy odsetek przeżyć 5-letnich wśród chorych, u których rozpoznano guz wysokozróżnicowany w porównaniu z guzami średnio- lub małozróżnicowanymi (75,8% vs. 40%), co przedstawiono na rycinie 10. Wznowa lokoregionalna miała istotny wpływ na przeżycie chorych. Wskaźnik przeżyć pięcioletnich wynosił 65% dla chorych bez wznów miejscowych i 14% dla chorych, u których stwierdzono nawrót miejscowy (ryc. 11). Rozpoznanie przerzutów odległych wiązało się z istotnie mniejszą szansą przeżycia, co przedstawiono w tabeli 4. Wskaźnik przeżyć 5-letnich wynosił 28% dla chorych z przerzutami odległymi i 62% dla chorych bez stwierdzonych przerzutów odległych w trakcie obserwacji. W analizie wieloczynnikowej istotny wpływ na przeżycie chorych miały takie czynniki jak: nawrót miejscowy choroby nowotworowej i stopień złośliwości histologicznej.

Tabela 3. **Porównanie przeżyć 5-letnich w stadium T2 w zależności od umiejscowienia guza**

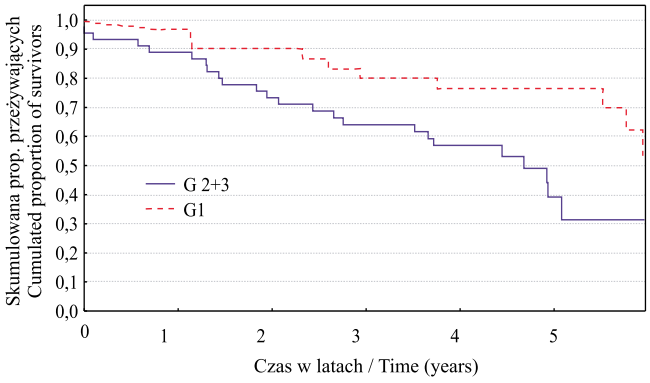
Table 3. **Comparison of 5-year survival rates in stage T2 patients with regard to the tumor location**

Umiejscowienie guza / Tumor location	Wskaźnik przeżyć 5-letnich / 5-year survival	Ryzyko zgonu / RR	P
Górna część / Upper part	80%	1	-
Środkowa część / Middle part	64%	2,7	0,04
Dolna część / Lower part	50%	2,8	0,02

Tabela 4. **Porównanie przeżyć pięcioletnich w stadium T2 w zależności od rozpoznania przerzutów odległych**

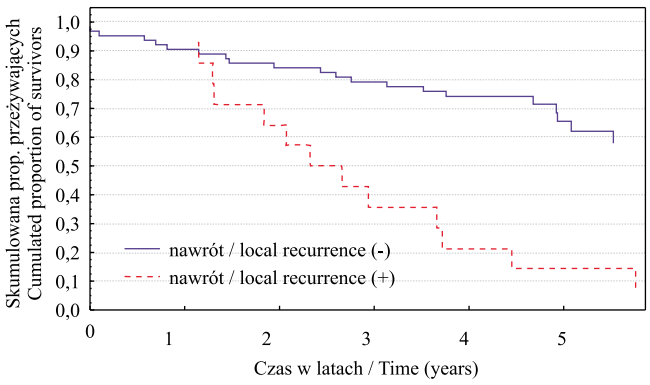
Table 4. **Comparison of 5-year survival rates in stage T2 patients with regard to distatnt metastases**

Przerzuty odległe / Distant metastases	Wskaźnik przeżyć 5-letnich / 5-year survival	Ryzyko zgonu / RR	P
Tak (+)	28%	2,4	0,017
Nie (-)	62%	1	-



Ryc. 10. Przeżycia w stadium T2 w zależności od stopnia dojrzałości histopatologicznej

Fig. 10. Survival in stage T2 patients with regard to grade



Ryc. 11. Przeżycia w stadium T2 w zależności od rozpoznania wznowy miejscowej

Fig. 11. Survival in stage T2 patients with regard to local recurrence

Dyskusja

Wyniki leczenia RO w Polsce nadal odbiegają od wyników leczenia tego schorzenia w krajach zachodniej Europy i USA. Szansę przeżycia 5-letniego w naszym kraju ma 21% chorych, dla porównania średni wskaźnik przeżyć 5-letnich w Europie wynosi 42%, a w USA ok. 57% [3, 21]. Różnice w wynikach odległych leczenia RO są uwarunkowane wieloma czynnikami, przede wszystkim klinicznymi i patologicznymi. Największą wartość prognostyczną przeżycia dla chorych z RO ma stopień zaawansowania nowotworu, co udowodniono w wielu pracach [7, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Wpływ stadium zaawansowania T (głębokość naciekania) na wyniki odległe leczenia RO jest niezaprzeczalny [5, 25, 27, 30]. Dostępne dane wykazują, że szansę przeżycia 5-letniego ma 55−65% chorych w stadium zaawansowania T2 i 40−50% chorych w stadium zaawansowania T3 [5, 7, 27, 30]. Analiza autora wykazała większą szansę wyleczenia chorych w stopniu zaawansowania T2 (56% przeżyć 5-letnich) w porównaniu do 40% wśród chorych w stadium T3. W niewielu doniesieniach analizowano wpływ stadium zaawansowania T na wyniki leczenia RO. W badaniach *Gundersona* zanotowano 69% przeżyć 5-letnich w stadium zaawansowania T1−T2 i 48% w stadium T3 [34]. Nawrót lokoregionalny pozostaje nadal największym problemem po wycięciu odbytnicy z powodu RO [5, 7, 36, 37]. Ostatnie 2 dekady przyniosły duży postęp w leczeniu RO, po pierwsze wielką popularnością cieszy się TME, a po drugie uznaną metodą w leczeniu miejscowo zaawansowanego RO stała się radioterapia przedoperacyjna.

Propagowana przez *Healda* metoda, polegająca na całkowitym wycięciu mezorektum, spowodowała zmniejszenie częstości nawrotów miejscowych do 3−8% [12, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44]. Znaczenie rokownicze wieku i płci pozostaje nadal kontrowersyjne. Wyniki analizy jednoczynnikowej wykazały istotny wpływ wieku na przeżycie chorych w stadium T3, w analizie wieloczynnikowej jednak nie potwierdzono istotności rokowniczej tego czynnika. W stadium T2 zaś wiek nie miał istotnego wpływu na przeżycie. W badaniach własnych mimo że zanotowano większy odsetek przeżyć 5-letnich wśród kobiet w obu grupach badanych, płeć nie miała istotnego wpływu na przeżycie chorych. Wyniki analiz wykazały, że największe znaczenie rokownicze na przeżycie chorych w obu stadiach zaawansowania miał stopień złośliwości histologicznej nowotworu (*grade*). Wyniki te były podobne do uzyskanych przez *Takahashi*, który w swoich badaniach zanotował 75,3% 5-letnich przeżyć w stopniu zaawansowania G1, 64% w G2 i 25% w G3 [45]. Ogromna liczba doniesień w piśmiennictwie dotyczy tego zagadnienia.

Większość badaczy potwierdza prognostyczny wpływ stopnia złośliwości histologicznej nowotworu [14, 36, 46, 47, 48, 49, 50], jednak istnieją doniesienia, w których nie stwierdzono związku między stopniem dojrzałości histologicznej guza a wynikami leczenia RO [10, 37, 51]. W stadium T2 doświadczenie chirurga, jak i ośrodka nie miało istotnego wpływu na przeżycie chorych, ale takie doświadczenie miało znaczenie prognostyczne w stadium zaawansowania T3. Doświadczenie chirurga mierzone liczbą zabiegów resekcyjnych odbytnicy wykonanych w okresie badania zwiększało szansę przeżycia 5-letniego do 46% wśród chorych operowanych przez chirurgów wykonujących co najmniej 25 zabiegów resekcyjnych w porównaniu do 29% dla chorych operowanych przez tych z mniejszym doświadczeniem. Podobne wyniki otrzymał w swoich badaniach *Porter* [52]. Znaczenie rokownicze doświadczenia chirurga opisało wielu autorów [13, 54, 55, 56, 57]. Inne doniesienia nie potwierdzają wpływu doświadczenia chirurga na wyniki leczenia RO [58, 59, 60, 61]. Wyniki leczenia RO są lepsze w ośrodkach wyspecjalizowanych i wykonujących więcej zabiegów [7, 12, 54, 55, 57, 62]. Stwierdzono lepsze wyniki wśród chorych operowanych w szpitalach uniwersyteckich [55] i w ośrodkach specjalizujących się w chirurgii jelita grubego [62]. Nieliczne badania jednak nie potwierdzają istotnego wpływu doświadczenia ośrodka na wyniki leczenia RO [58, 63, 64]. Znaczenie rokownicze zastosowania chemioterapii w leczeniu RO analizowano w wielu pracach. W większości z nich jednak nie wykazano istotnego wpływu na przeżycie chorych [15, 51, 65], choć w randomizowanym prospektywnym badaniu autorów japońskich, przeprowadzonym przez *Sugimachi i wsp*., stwierdzono istotną poprawę przeżyć odległych i mniejszy odsetek nawrotów miejscowych wśród chorych, u których zastosowano chemioterapię systemową, jak i podawaną do tętnicy krezkowej [16]. Lepsze wyniki odległe po zastosowaniu chemioterapii zanotowano ponadto w badaniach innych autorów [28, 66, 67]. W analizowanym materiale własnym zastosowanie chemioterapii wiązało się z istotnie dłuższymi przeżyciami chorych w stadium T3, w tym stadium chory po chemioterapii miał niemalże dwukrotnie większą szansę przeżycia 5-letniego. W stadium T2 natomiast, mimo że zastosowanie chemioterapii przyczyniło się do poprawy przeżyć 5-letnich o 9%, różnice w przeżyciach nie miały cech znamienności statystycznej. Dane z piśmiennictwa wskazują, że rak dolnej części odbytnicy cechuje się najgorszym rokowaniem [25, 37, 51, 68]. Część doniesień jednak nie wykazała związku między umiejscowieniem raka a wynikami odległymi leczenia RO [69, 70]. W badanym materiale RO najczęściej lokalizował się w dolnej części, a umiejscowienie guza w tej części odbytnicy wiązało się z krótszymi przeżyciami, i to zarówno w stadium T3 jak i T2, jednak różnice te uzyskały znamienność statystyczną tylko w analizie jednoczynnikowej.

Wśród wielu chirurgów przeważa opinia o wyższości amputacji brzuszno-kroczowej odbytnicy nad zabiegami oszczędzającymi zwieracze odbytu. Wydaje się, że pogląd ten odgrywa decydującą rolę w tym, że zabiegi oszczędzające zwieracze stanowią mniej niż 50% zabiegów chirurgicznych wykonywanych w leczeniu RO [4, 7, 26, 37, 71, 72, 73]. W badanym materiale odsetek zabiegów oszczędzających zwieracze odbytu wyniósł 49% w stadium T3 i 47% w stadium T2. Jednak odsetek takich zabiegów jest zdecydowanie większy w ośrodkach zajmujących się leczeniem RJG [28]. Rodzaj zabiegu operacyjnego w opinii większości autorów nie ma istotnego wpływu na wyniki leczenia RO [36, 37, 70, 81, 82], jednak w wielu doniesieniach podkreśla się, że amputacja brzuszno-kroczowa odbytnicy wiąże się z większą szansą nawrotu miejscowego i mniejszą szansą przeżycia 5-letniego [68, 74]. W analizowanych grupach w stadium T3 mniejszą szansę przeżycia 5-letniego mieli chorzy po amputacji brzuszno-kroczowej odbytnicy, różnice w przeżyciach jednak nie wykazały cech znamienności statystycznej w analizie wieloczynnikowej. W stadium T2 również zaobserwowano różnice w przeżyciach 5-letnich na niekorzyść amputacji brzuszno-kroczowej, ale te różnice także nie były statystycznie istotne.

Perforacja guza miała istotny wpływ na wyniki odległe leczenia RO w badanym materiale. W stadium T3 nikt spośród chorych, u których doszło do niezamierzonej perforacji guza, nie przeżył pięciu lat. Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że w większości przeprowadzonych badań stwierdzono istotny wpływ perforacji na odległe wyniki leczenia RO [52, 54, 68, 75]. Obecność przerzutów w węzłach chłonnych jest jednym z najważniejszych czynników prognostycznych przeżyć i nawrotu RO. Bogate piśmiennictwo na ten temat zawiera bardzo liczne publikacje potwierdzające istotny wpływ zajęcia węzłów chłonnych na wyniki leczenia RO [28, 29, 35, 36, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82]. Wyniki omawianych analiz potwierdziły duże znaczenie rokownicze zajęcia węzłów chłonnych, jednak tylko w stadium zaawansowania T3 różnice w przeżyciach uzyskały istotność statystyczną i to zarówno w analizie jedno- i wieloczynnikowej. Ustalenie długości marginesu dystalnego od dolnej granicy guza nadal pozostaje ważnym problemem wzbudzającym wiele kontrowersji. Przez wiele lat obowiązywała zasada mówiąca o tym, że margines dystalny powinien wynosić przynajmniej 5 cm, licząc od dolnej krawędzi guza [7]. *Fegiz* stwierdził istotnie gorsze wyniki wśród chorych, u których margines dalszy wynosił mniej niż 2 cm [36]. Wyniki dalszych badań wykazały, że w większości przypadków makroskopowa granica guza jest jego mikroskopową granicą [81, 83, 84]. Wyniki badań

opublikowanych przez *Shirouzu* potwierdzają, że długość marginesu dalszego można bezpiecznie zmniejszyć do 1 cm [85]. Do podobnych wniosków doszedł *Moore* [86].

Wyniki materiału analizowanego przez autora nie wykazały istotnych różnic w przeżyciach chorych, u których udało się uzyskać margines przynajmniej 2 cm i tych z mniejszym marginesem, chociaż stwierdzono większy odsetek przeżyć 5-letnich w grupie chorych z marginesem dalszym wynoszącym przynajmniej 2 cm. Wpływ powikłań okołooperacyjnych na wyniki odległe leczenia RO jest kolejnym czynnikiem rokowniczym wzbudzającym kontrowersje. Wyniki badań przeprowadzonych przez *Mynstera* wykazały istotny wzrost ryzyka nawrotu w przypadku wystąpienia powikłań pooperacyjnych, nie ma jednak istotnych różnic w przeżyciach [87], podobne wyniki uzyskano w badaniach *Petersena* [88]. W badaniach *Nowackiego* stwierdzono istotny wpływ gorączki w okresie pooperacyjnym na odległe wyniki, zanotowano 38% przeżyć 5-letnich w grupie chorych z gorączką w okresie pooperacyjnym w porównaniu do 60% przeżyć w grupie bez gorączki [72], jednak inni autorzy nie potwierdzili znaczenia rokowniczego tego powikłania [89, 90, 91, 92]. *Akyol* stwierdził istotne znaczenie rokownicze nieszczelności zespolenia [93]. Analizując wpływ wystąpienia powikłań chirurgicznych w okresie pooperacyjnym na przeżycie, nie wykazano istotnych różnic w przeżyciach w stadium T2. W stadium T3 natomiast chirurgiczne powikłania pooperacyjne wiązały się z istotnie mniejszą szansą przeżycia.

Wpływ przetaczania krwi na wyniki leczenia RJG jest nadal przedmiotem wielu badań. Liczne badania wskazały niekorzystny wpływ przetaczania krwi w okresie okołooperacyjnym [94, 95], a w badaniach *Mynster* stwierdzono istotne zmniejszenie szansy przeżycia po przetoczeniu krwi i wystąpieniu powikłań septycznych. Autor ten natomiast nie stwierdził rokowniczego znaczenia samej transfuzji krwi [87]. Wielu innych autorów z kolei nie dostrzegło istotnego wpływu leczenia krwią na wyniki leczenia RO [96, 97]. Analiza badanego przez autora materiału nie wykazała istotnego wpływu leczenia krwią w okresie okołooperacyjnym na wyniki leczenia, trzeba jednak zaznaczyć, że wyniki leczenia RO były nieznacznie gorsze w grupie chorych leczonych krwią w obu stadiach. Do chwili obecnej opublikowano wiele prac o znaczeniu rokowniczym wielkości guza [27, 36, 67, 98]. W wielu z nich stwierdzono istotne znacznie rokownicze omawianego czynnika [36, 76, 98, 99]. W innych badaniach jednak nie potwierdzono tych zależności [27, 35, 51, 67, 81, 100]. Wyniki niniejszych analiz nie wykazały istotnego wpływu wielkości guza pierwotnego na wyniki leczenia. Paradoksalnie stwierdzono odwrotny związek między wielkością guza i przeżyciami. Podobne wyniki opublikował *Olson* [100].

Wnioski

1. Wyniki wczesne leczenia RO w dwóch analizowanych stadiach nie różniły się istotnie.

2. Istotny wpływ na rokowanie w RO w stadium zaawansowania T3 miały: stopień złośliwości histologicznej, przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, nawrót miejscowy, przerzuty odległe, doświadczenie chirurga, zastosowanie chemioterapii uzupełniającej, chirurgiczne powikłania pooperacyjne i niezamierzona perforacja guza.

3. Czynniki, które miały istotny wpływ na rokowanie w RO w stadium zaawansowania T2, to stopień złośliwości histologicznej i nawrót miejscowy.

4. Jedynymi czynnikami prognostycznymi w obu badanych stadiach zaawansowania są: stopień złośliwości histologicznej i nawrót lokoregionalny choroby nowotworowej.

5. Czynniki prognostyczne miały większe znaczenie rokownicze w stadium T3.

6. Czynniki kliniczne nie mają znaczenia rokowniczego we wczesnych stadiach.

7. Stadium zaawansowania klinicznego (T) nie miało istotnego wpływu na częstość nawrotów miejscowych w badanym materiale.

Piśmiennictwo

1. *Parkin D.M. et al.*: Estimating the world cancer burden. Int. J. Cancer, 2001, 94, 153−156.
2. *Didowska J. et al.*: Nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku. Warszawa 2002.
3. *Gatta G. et al.*: Eurocare working group. Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978−1989. Eur. J. Cancer, 1998, 14, 2176−2183.
4. *Piekarski J. et al.*: Chirurgia raka odbytnicy w materiale własnym. Onkol. Pol. 2000, 3, 147.
5. *Chaber A., Krasnodębski W.*: Leczenie nowotworów jelita grubego. In: Chirurgia nowotworów. Ed. M. Frączek. Alfa-Medica Press. Bielsko-Biała 2003.
6. *Krasnodębski I.W., Słodkowski M.*: Rak jelita grubego. In: Nowotwory przewodu pokarmowego. Ed. M. Krawczyk. Biblioteka Chirurga i Anestezjologa, PZWL, Warszawa 2001.
7. *Nowacki M.P.*: Nowotwory jelita grubego. Wyd. Wiedza i Życie, Warszawa 1996.
8. *Olędzki J., Nowacki M.P.*: Nowotwory jelita grubego – radykalne leczenie operacyjne. Nowa Med. 1999, 4, 15−18.
9. *Schofield P.F, Jones D.J.*: ABC of colorectal diseases. Colorectal neoplasia – III: Treatment and prevention. BMJ, 1992, 304, 1624−1627.
10. *Heald R.J. et al.*: Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978–1997. Arch. Surg. 1998, 133 (8), 894−899.
11. *Sjodahl R.*: The role of total mesorectal excision in rectal cancer surgery. Eur. J. Surg. Onkol. 2001, 27 (5), 440−441.
12. *Havenga K. et al.*: Improved survival and local control after total mesorectal excision or D3 lymphadenectomy in the treatment of primary rectal cancer: an international analysis of 1411 patients. Eur. J. Surg. Oncol. 1999, 25, 368−374.
13. *Martling A.L. et al.*: Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the county of Stockholm. Stockholm Colorectal Cancer Study Group, Basingstoke Bowel Cancer Research Project. Lancet, 2000, 356, 93−96.
14. *Fisher B., Wolmark N., Rockette H.*: Postoperative adjuvant chemotherapy or adjuvant radiation therapy for rectal cancer. J. Natl. Cancer Inst. 1988, 80, 21−29.
15. *Nowacki M. P.*: Leczenie skojarzone raków jelita grubego. Nowotwory, 1996, 46, 75−93.
16. *Sugimachi K. et al.*: Postoperative chemotherapy for colorectal cancer by combining 5-fluorouracil infusion and 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil administration after curative resection. Cancer, 1996, 77 (1), 36−43.

17. *Bujko K. et al.*: Wczesne wyniki leczenia skojarzonego chorych na raka dolnej części odbytnicy. Pol. Przeg. Chir. 1999,7 (5), 479–486.
18. *Gerard A. et al.*: Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Ann. Surg. 1988, 208 (5), 606–614.
19. *Kapiteijn E. et al.:* Total mesorectal excision (TME) with or without preoperative radiotherapy in the treatment of primary rectal cancer. Prospective randomised trial with standard operative and histopathological techniques. Eur. J. Surg. 1999, 165 (5), 410–420.
20. Swedish Rectal Cancer Trial. Initial report from a Swedish multicenter study examining the role of preoperative irradiation in the treatment of patients with resectable rectal carcinoma. Br. J. Surg. 1993, 80 (10), 1333–1336.
21. *Pawlęga J.:* Eurocare Working Group. Rak jelita grubego w Polsce oraz innych krajach Europy – diagnostyka, metody leczenia i przeżycie. Pol. Przeg. Chir. 1994, 66, 886–893.
22. *Rutkowski A. et al.:* Anastomosis site – a risk factor for anastomotic leakage after elective anterior resection of rectal cancer. Nowotwory, 2002, 52 (4), 295–299.
23. *Chapuis P.H., Dent O.F., Fisher R.:* Multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. Br. J. Surg. 1985, 72, 698–702.
24. *Goudet P. et al.*: Population-based study of the treatment and prognosis of carcinoma of the rectum. Br. J. Surg. 1997, 84 (11), 1546–1550.
25. *Jatzko G.R. et al.:* Long-term results of radical surgery for rectal cancer: multivariate analysis of prognostic factors influencing survival and local recurrence. Eur. J. Surg. Oncol. 1999, 25, 284–291.
26. *Leśniak T. et al.*: Doświadczenie własne w chirurgicznym leczeniu raka jelita grubego ze szczególnym uwzględnieniem raka odbytnicy. Pol. Przeg. Chir. 1999, 71 (1), 19–32.
27. *Park Y.J. et al.*: Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors. Int. J. Colorectal Dis. 1999, 14 (2), 101–106.
28. *Popiela T., Łabza H., Richter P.*: Własne doświadczenie w leczeniu raka jelita grubego i odbytnicy. Acta Endoskop. Pol. 1998, 8 (3), 105–111.
29. *Popiela T., Richter P.*: Badania kliniczne nad czynnikami prognostycznymi w leczeniu operacyjnego raka okrężnicy i odbytnicy. Chirurgia Gastroenterologiczna, Gdańsk, 2003, 26–29.
30. *Steele G.D. Jr.:* The National Cancer Data Base Report on Colorectal Cancer. Cancer, 1994, 74, 1979–1989.
31. *Wagner J.S. et al.*: The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. Ann. Surg. 1984, 199 (5), 502–508.
32. *Wei E.K. et al.:* Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. Int. J. Cancer, 2004, 20, 108, 433–442.
33. *Wibe A. et al.*: Prognostic significance of circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. Br. J. Surg. 2002, 89 (3), 327–334.
34. *Gunderson L. et al.*: Impact of T and N substage on survival and disease relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002, 54, 386–396.
35. *Delaney C.P. et al.*: Preoperative radiotherapy improves survival for patients undergoing total mesorectal excision for stage T3 low rectal cancers. Ann. Surg. 2002, 236, 203–207.
36. *Fegiz G. et al.*: Low rectal cancer – What is the choice? Dis. Colon Rectum, 1994, 37, 35–41.
37. *Kapiteijn E. et al.:* Local recurrence in patients with rectal cancer, diagnosed between 1988 and 1992. Eur. J. Surg. Oncol. 1998, 24 (60), 528–535.
38. *Enker W.E. et al.:* Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. J. Am. Coll. Surg. 1995, 181 (4), 335–246.
39. *Goldberg S., Klas J.V.*: Total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer: a view from the USA. Sem. Surg. Oncol. 1998, 15 (2), 87–90.
40. *Heald R.J.*: Rectal cancer: the surgical options. Eur. J. Cancer, 1995, 31A, 1189–1192.
41. *Heald R.J., Husband E.M., Ryall R.D.*: The mesorecum in rectal cancer surgery – the clue to pelvic recurrence? Br. J. Surg. 1982, 69 (10), 613–616.
42. *Heald R.J., Karanjia N.D.*: Results of radical surgery for rectal cancer. World J. Surg. 1992, 16, 848–857.
43. *Heald R.J., Leicester R.J.:* The low stapled anastomosis. Dis. Colon Rectum, 1981, 24, 437–444.
44. *Wibe A. et al.*: Norwegian Rectal Cancer Group. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer – implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. Dis. Colon Rectum, 2002, 45 (7), 857–866.
45. *Takahashi K., Mori T., Yasuno M.*: Histologic grade of metastatic lymph node and prognosis of rectal cancer. Dis. Colon Rectum, 2000, 43, 40–46.
46. *Fountzilas G. et al.*: Postoperative radiation and concomitant bolus fluorouracil with or without additional chemotherapy with fluorouracil and high-dose leucovorin in patients with high-risk rectal cancer. Ann. Oncol. 1999, 10 (6), 671–676.
47. *Giacchi R. et al.:* Carcinoma of the rectum: factors influencing the prognosis. G. Chir. 1990, 11, 534–538.
48. *Griffin M.P. et al.:* Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. Cancer, 1987, 60 (9), 2318–2324.
49. *Pergolizzi S. et al.*: Prognostic factors in ambulatory patients with inoperable locoregionally recurrent rectal cancer following curative surgery. Anticancer Res. 1999, 19, 1383–1390.
50. *Schild S.E. et al.:* Postoperative adjuvant therapy of rectal cancer: an analysis of disease control, survival, and prognostic factors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1989, 17 (1), 55–62.
51. *Myerson R.J. et al.:* Pretreatment clinical findings predict outcome for patients receiving preoperative radiation for rectal cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001, 50, 665–674.
52. *Porter G.A. et al.:* Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer. Ann. Surg. 1998, 227, 157–167.
53. *Hermanek P., Hermanek P.J.*: Role of the surgeon as a variable in the treatment of rectal cancer. Semin. Surg. Oncol. 2000, 19 (4), 329–335.
54. *Hermanek P. et al.*: Prognostic factors of rectum carcinoma – experience of the German Multicentre Study SGCRC. Tumori, 1995, 81, 60–64.
55. *Holm T. et al.*: Influence of hospital and surgeon-related factors on outcome after treatment of rectal cancer with or without preoperative radiotherapy. Br. J. Surg. 1997, 84, 657–663.
56. *Martling A. et al.:* The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. Br. J. Surg. 2002, 89 (8), 1008–1013.
57. *McArdle C.S., Hole D.*: Impact of variability among surgeons on postoperative morbidity and mortality and ultimate survival. BMJ, 1991, 302, 1501–1505.
58. *Kee F. et al.*: Influence of hospital and clinician workload in survival from colorectal cancer: cohort study. BMJ, 1999, 318, 1381–1386.
59. *Kraemer M. et al.*: Stratifying risk factors for follow-up: a comparison of recurrent and nonrecurrent colorectal cancer. Dis. Colon Rectum, 2001, 44 (6), 815–821.
60. *Secco G.B. et al.*: Prognostic indicators of local recurrence in patients operated for rectal cancer. Hepatogastroenterology, 2001, 48 (41), 1346–1350.
61. *Tytherleigh M. et al.*: Surgical specialist registrars can safely perform resections for carcinoma of the rectum. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 2002, 84 (6), 389–392.
62. *Platell* C. *et al.*: Dose surgical sub-specialization influence survival in patients with colorectal cancer? World J. Gastroenterol. 2003, 9 (5), 961–964.
63. *Finlayson E.V., Goodney P.P., Birkmeyer J.D.:* Hospital volume and operative mortality in cancer surgery: a national study. Arch. Surg. 2003, 138 (7), 721–726.
64. *Meyerhardt J.A. et al.:* Impact of body mass index on outcomes and treatment-related toxicity in patients with stage II and III rectal

cancer: findings from Intergroup Trial 0114. J. Clin. Oncol. 2004, 22, 166−174.
65. *Stelmach A*.: Rak jelita grubego. In: Leczenie nowotworów dla lekarzy praktyków. Ed. M. Pawlicki. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 1996, 42, p. 319–326.
66. *Wolmark N. et al.:* Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. J. Natl. Cancer Inst. 2000, 92 (5), 388−436.
67. *Takahashi T. et al*.: Prognostic factors of colorectal cancer. Results of multivariate analysis of curative resection cases with or without adjuvant chemotherapy. Am. J. Clin. Oncol. 1996, 19, 408−415.
68. *Wibe A. et al*.: Oncological outcomes after total mesorectal excision for cure for cancer of the lower rectum: anterior vs. abdominoperineal resection. Dis. Colon Rectum, 2004, 47, 48−58.
69. *Merchant N.B. et al.:* T3N0 rectal cancer: results following sharp mesorectal excision and no adjuvant therapy. J. Gastrointest. Surg. 1999, 3 (6), 642−647.
70. *Mettlin C. et al.:* Management and survival of adenocarcinoma of the rectum in the United States. Oncology, 1982, 39 (5), 265−273.
71. *Kuśmierski S. et al*.: Rak odbytnicy w materiale kliniki. Wpływ stopnia zaawansowania klinicznego, umiejscowienia guza i sposobu leczenia chirurgicznego na odległe wyniki. Wiad. Lek. 1997, 139−145.
72. *Nowacki M.P., Szymendera J.:* The strongest prognostic factors in colorectal carcinoma: surgico-pathological stage of disease and postoperative fever. Dis. Colon Rectum, 1983, 26, 263−268.
73. *Wajda Z. et al.:* Odległe wyniki leczenia raka odbytnicy. Wybrane zagadnienia z chirurgii, 1995, 89, 289−291.
74. *Heald R.J. et al*.: Abdominoperineal excision of the rectum – an endangered operation. Dis. Colon Rectum, 1997, 40, 747−751.
75. *Zirngibl H., Husemann B., Hermanek P*.: Intraoperative spillage of tumor cells in surgery for rectal cancer. Dis. Colon Rectum, 1990, 33 (7), 610−614.
76. *Berczi C. et al*.: Prognostic value of DNA ploidy status in patients with rectal cancer. Anticancer Res. 2002, 22 (6B), 3737−3741.
77. *Eisenberg S.B., Kraybill W.G., Lopez M.J.:* Long-term results of surgical resection of locally advanced colorectal carcinoma. Surgery, 1990, 108 (4), 779−785.
78. *Hojo K., Koyama Y., Moriya Y.:* Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. Am. J. Surg. 1982, 144 (3), 350−354.
79. *Nogueras J.J., Jagelman D.G.*: Principles of surgical resection. Influence of surgical technique on treatment outcome. Surg. Clin. North. Am. 1993, 73 (1), 103−116.
80. *Szynglarewicz B. et al.:* Assessment of late results of curative surgery of colorectal cancer. Proktologia, 2003, 2 (3), 123−132.
81. *Wolmark N., Fisher B.:* An analysis of survival and treatment failure following abdominoperineal and sphincter-saving resection in Dukes' B and C rectal carcinoma. Ann. Surg. 1986, 204 (4), 480−489.
82. *Zaheer S. et al.:* Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum. Ann. Surg. 1998, 227 (6), 800−811.
83. *Williams N.S., Dixon M.F., Johnston D.*: Reappraisal of the 5 centimeter rule of distal excision for carcinoma of the rectum: A study of distal intramural spread and of patients' survival. Br. J. Surg, 1983, 70 (3), 150−154.
84. *Wilson S.M., Beahrs O.H.:* The curative treatment of carcinoma of the sigmoid, rectosigmoid and rectum. Ann. Surg. 1976, 183 (5), 556−565.
85. *Shirouzu K., Isomoto H., Kakegawa T.*: Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. Cancer, 1995, 76, 388−392.
86. *Moore H.G. et al.:* Adequacy of 1 cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. Ann. Surg. Oncol. 2003, 10 (1), 80−85.
87. *Mynster T. et al.:* For the Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Effects of the combination of blood transfusion and postoperative infectious complications on prognosis after surgery for colorectal cancer. Br. J. Surg. 2000, 87 (11), 1553−1562.
88. *Petersen S. et al*.: Anastomosis leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. Int. J. Colorectal Dis. 1998, 13 (4), 160−163.
89. *Fucini C. et al.:* Are postoperative fever and/or septic complications prognostic factors in colorectal cancer resected for cure? Dis. Colon Rectum, 1985, 28, 94−95.
90. *Varty P.P., Linehan I..P, Boulos P.B.:* Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. Br. J. Surg. 1994, 81 (6), 915−918.
91. *Karanjia N.D. et al.:* Leakage from stapled low anastomosis after total mesorectal excision for carcinoma of the rectum. Br. J. Surg. 1994, 81, 1224−1226.
92. *Kressner U. et al*.: Septic complications and prognosis after surgery for rectal cancer. Dis. Colon Rectum, 2002, 45 (3), 316−321.
93. *Akyol Am. et al*.: Anastomotic leaks in colorectal surgery: a risk factor for recurrence? Int. J. Colorectal Dis. 1991, 6, 179−183.
94. *Edna T.H., Bjerkeset T.:* Perioperative blood transfusions reduce long-term survival following surgery for colorectal cancer. Dis. Colon Rectum, 1998, 41, 451−459.
95. *Leite J.F., Granjo M.E., Martins M.I., Reis R.C., Monteiro J.C., Castro-Sousa F.:* Effect of perioperative blood transfusions on survival of patients after radical surgery for colorectal cancer. Int. J. Colorectal Dis. 1993, 8 (3), 129−133.
96. *Bush O.R. et al.:* Blood transfusion and prognosis in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 1993, 328, 1372−1376 .
97. *van de Watering L.M. et al*.: Perioperative blood transfusions with or without allogenic leucocytes, relate to survival, not to cancer recurrence. Br. J. Surg. 2001, 88 (2), 267−272.
98. *Horiot J.C. et al.:* The Dijon clinical staging system for early rectal carcinomas amenable to intracavitary treatment techniques. Radiother. Oncol. 1990, 18 (4), 329−337.
99. *Ogiwara H., Nakamura T., Baba S.:* Variables related to risk of recurrence in rectal cancer without lymph node metastasis. Ann. Surg. Oncol. 1994, 1 (2), 99−104.
100. *Olson R.M. et al*.: Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. Cancer, 1980, 45 (12), 2969−2974.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 23–26
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 23–26
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

LESZEK M. SAGAN, MAREK B. LICKENDORF

POSTERIOR CERVICAL LATERAL MASS FIXATION FOR THE MANAGEMENT OF INSUFFICIENT ANTERIOR STABILIZATION

ZNACZENIE STABILIZACJI SZYJNEJ TYLNEJ KRĘGOSŁUPA W PRZYPADKACH NIESKUTECZNEJ STABILIZACJI PRZEDNIEJ

Department of Neurosurgery and Pediatric Neurosurgery Pomeranian Medical University
ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin
Head: Prof. *Ireneusz Kojder*, M.D., D.M.Sc. Habil.

Streszczenie

Wstęp: W przypadkach niewydolności stabilizacji przedniej kręgosłupa szyjnego badania nad mechaniką przeprowadzone w warunkach doświadczalnych dostarczyły danych pozwalających przypuszczać zasadność stabilizacji tylnej przez masy boczne kręgów.

Materiał i metody: Przedstawiono wyniki leczenia 15 chorych z zastosowaniem uzupełniającej stabilizacji tylnej. Leczeniu poddano 5 chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów kręgosłupa, 6 z dyskopatią i 3 z niestabilnością pourazową, a jeden po operacji onkologicznej. Z wyjątkiem jednego we wszystkich przypadkach uzyskano trwałą pełną stabilizację i poprawę stanu klinicznego.

Wyniki: Przedstawiając wniosek o skuteczności tej procedury, autorzy postulują konieczność opracowania kryteriów pozwalających na ustalenie postępowania i możliwość przewidywania nieefektywności przedniej stabilizacji jako jedynej procedury w przypadkach wielopoziomowej choroby kręgosłupa szyjnego.

Hasła: kręgosłup szyjny – stabilizacja kręgosłupa – masy boczne kręgów szyjnych.

Summary

Purpose: There are clinical situations when anterior fixation alone is not sufficient to adequately stabilize the cervical spine at the level of operation. In vitro biomechanical studies revealed the substantial role of posterior stabilization in such situations. However, no clinical studies of this problem have been published. The usefulness of posterior cervical lateral mass fixation when anterior stabilization failed to offer sufficient spine stability was assessed in the present study.

Material and methodes: We enrolled 15 patients who underwent additional posterior fixation due to destabilization of the anterior one. There were five patients with rheumatoid arthritis, six with cervical discopathy, three with cervical trauma, and one with spine tumor. Improvement after posterior fixation was noted in all but one patient.

Results: Posterior cervical lateral mass fixation significantly improved cervical spine stability in cases with insufficiency of anterior stabilization. Further investigations on criteria helpful to predict insufficiency of anterior stabilization in cases of multisegmental cervical spine disease are needed.

Key words: cervical spine – spine stabilization – cervical lateral mass.

Introduction

Anterior stabilization plays a major role in modern surgery of spondylotic cervical spine.

However, there are clinical situations when anterior fixation alone is not sufficient to adequately stabilize the operated level of the spine. It has been proven biomechanically that po-

Fig. 1. Dislodgement of the lower part of anterior plate ("kick out") caused by retraction of lower screws from the vertebral body
Ryc. 1. Przemieszczenie dolnej części płyty w wyniku retrakcji dolnych śrub z trzonu

Fig. 2. Compression of C4 vertebral body by the interbody cages (visualized with radiological markers) resulting in anterior plate dislocation
Ryc. 2. Kompresja trzonu C4 wszczepami międzytrzonowymi z przemieszczeniem płyty przedniej

Fig. 3. C4 displaced posteriorly despite interbody C4/C5 stabilization (line marks posterior edges of vertebral bodies)
Ryc. 3. Przemieszczenie tylne C4 mimo stabilizacji C4/C5

sterior stabilization significantly contributes to spinal stability in such instances [1, 2, 3]. Numerous laboratory investigations of this problem have been reported but a thorough clinical analysis is lacking. Therefore, we decided to assess the usefulness of posterior cervical lateral mass fixation in cases when anterior stabilization did not offer sufficient spine stability.

Patients and methods

We enrolled 15 patients who underwent anterior stabilization of the cervical spine and subsequently presented with signs of clinical and radiological instability at the operated level. The group included 7 males and 8 females aged 43 to 58 years (mean 49.5).

Five of them were operated originally due to rheumatoid arthritis leading to cervical spine instability, six due to cervical discopathy, three due to cervical trauma and one due to extradural tumor causing destruction of C3 and C4 vertebral bodies.

There was no neurological improvement after surgery in five cases, deterioration after short improvement in six, and new neurological deficits with signs of vertebrobasilar circulation insufficiency in four.

All patients underwent routine and flexion/extension X-rays and CT or MRI cervical scans. In four of them there were signs of anterior construct destabilization in the form of anterior plate "kick out" (Fig. 1). Vertebral body C4 compression fracture was found in one (Fig. 2) and signs of vertebral body movement of the stabilized segment on flexion/extension X-rays (Fig. 3) in ten.

All patients underwent reoperation of the anterior construct and posterior stabilization during the same surgery

session. For posterior fixation we used poliaxial screws introduced in the lateral masses of cervical vertebras (additionally in occipital bone in four cases), connected subsequently by rods in the longitudinal axis (Summit SI system). The screws were introduced according to the Roy-Camille method.

Post-operative imaging (X-ray and CT scan) was done during first post-operative days and 6 months after surgery (Fig. 4).

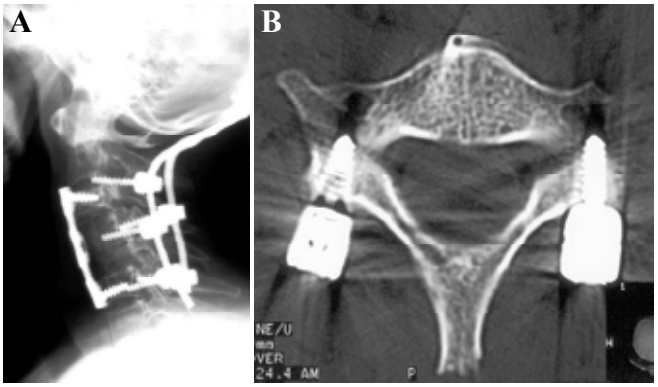


Fig. 4. Postoperative scan in patient from Fig. 2. A – Restabilized anterior construct after C4 vertebrectomy and iliac bone autograft placement. Posterior stabilization involving the occiput, C3, C4 and C5. B – CT showing position of the screws in lateral masses
Ryc. 4. Obraz pooperacyjny chorego z ryciny 2. A – Restabilizacja struktur przednich; wertebrektomia C4 i implant z kości biodrowej. B – Obraz KT-śruby w masach bocznych

Results

Follow-up ranged from 6 to 18 months (mean 13 months). During that period

neurological symptoms resolved completely in 10 patients and in 5 there was substantial improvement. One patient complained of dizziness and shoulder pain which appeared four months after surgery. In this case radiology failed to reveal cervical spine instability or other pathology. No complications were observed during surgery, postoperative period, and ambulatory follow-up.

Discussion

Anterior stabilization is often used after decompression of the cervical spinal canal. However, the pathological process in some situations leads to changes in anterior and posterior spine structures that make this form of stabilization insufficient to stabilize the spine, producing overload of the anterior construct with subsequent pull-out of the anterior plate and screws or even compression fractures of the vertebral bodies. It was shown in laboratory biomechanical investigations that posterior stabilization substantially improves stability when combined with the anterior one [1, 2, 3]. Despite in vivo observations demonstrating the importance of this problem there is lack as to our knowledge of studies on posterior cervical fixation as an adjunct to the anterior one in the clinical setting. It is very difficult to estimate the sufficiency of anterior stabilization before surgery. In the majority of cases, proper anterior decompression supplemented with anterior instrumentation secure appropriate stability of the spine. However, if the posterior column of the spine is substantially compromised, anterior stabilization may not be able to bear loads in the angular and rotatory range of motion. This possibility should be considered especially if three or more levels of the cervical spine are involved [4, 5]. Only one of our patients had one-level discopathy. In this case, additional posterior instrumentation lead to transient improvement with subsequent deterioration after four months. Follow-up revealed no signs of spine instability and confirmed proper position of anterior and posterior construct elements. Three or more levels were involved in the remaining patients and the surgical outcome was satisfactory. Therefore, persistence of one-level instability despite anterior stabilization should be considered in the light of inappropriate anterior surgery or other causes of the neurological problem before posterior stability aspects are dealt with. Still, there are no firm criteria which could be helpful to predict insufficiency of anterior stabilization in cases of multilevel disease.

Posterior stabilization is an extensive procedure causing more immediate postoperative discomfort than anterior surgery due to substantial muscle preparation. There also remains the possibility of serious complications. Screw placement in the lateral masses of the cervical vertebra can lead to spinal cord and nerve root injury as well as vertebral artery injury [6].

Nevertheless, there were no intraoperative complications in our patients who were able to return to normal life after a short post-operative period. Radiological follow-up ascertained that the operated spine segments and constructs elements maintained their proper position during a mean follow-up period of more than one year. Taking under consideration that initial anterior stabilization was lost in these cases, we conclude that additional posterior fixation substantially improved spinal stability.

Conclusions

1.Posterior cervical lateral mass fixation significantly improves cervical spine stability in cases of insufficiency of anterior stabilization.

2. There is a need for further investigations regarding criteria helpful to predict insufficiency of anterior stabilization in cases of multisegmental cervical spine disease.

References

1. *Adams M.S. et al.*: Biomechanical comparison of anterior cervical plating and combined anterior/lateral mass plating. Spine 2003, 15, 2352–2358.

2. *Deen H.G. et al.*: Lateral mass screw-rod fixation of the cervical spine: a prospective clinical series with 1-year follow –up. Spine J. 2003, 3, 489–495.
3. *Singh K. et al.*: Biomechanical comparison of cervical spine reconstructive techniques after a multilevel corpectomy of the cervical spine. Spine, 2003, 15, 2352–2358.
4. *Kirkpatrick J.S. et al.*: Reconstruction after multilevel corpectomy in the cervical spine. A sagital plane biomechanical study. Spine, 1999, 15, 1186–1190.
5. *Swank M.L. et al.*: Rigid internal fixation with lateral mass plates in multilevel anterior and posterior reconstruction of the cervical spine. Spine, 1997, 22, 274–278.
6. *Heller J.G., Silcox D.H., Sutterlin C.E.*: Comlications of posterior cervical plating. Spine, 1995, 15, 2442–2448.

Comments

Sir,

I read with interest "The role of posterior cervical lateral mass fixation in cases of insufficient anterior stabilization" by Sagan L.M. and Lickendorf M. B. The article appears to be important in demonstrating the usefulness of additional posterior stabilization in case of unsuccessful anterior stabilization. I would like to comment on a few aspects of the study.

Cervical spine instability and spine stabilization pose significant problems for the managing surgeon. These include: (1) the risk of treatment failures; (2) the significant multiplanar forces affecting this region causing multidirectional instabilities; and (3) the difficulties associated with the attainment of a solid fusion, when the stability is multisegmental.

Solid arthrodesis is relatively difficult to achieve in craniocervical and cervical region particularly in multisegmental posttraumatic instability and in very devastating pathological processes, for instance metastases. Flexion, extension and rotation are extensive in the upper cervical spine, therefore simply restricting flexion and extension may not be enough. Rotation may interfere with the fusion process enough to render it unsuccessful.

In traumatic fracture-dislocation injuries the posttraumatic instability affects all three vertebral columns. Although biomechanical data indicates that anterior fixation alone in unstable cervical injuries may not provide adequate stability, reports of clinical series indicate general success with this method of treatment.

The specific contribution of posterior column instability to overall cervical sine stability following anterior stabilization has been evaluated in very few studies. Sagan and Lickendorf report about the group of 15 patients who underwent additional posterior fixation due to destabilization of anterior one. Unfortunately no exact evaluation of destabilizing factors in these cases is given in the article. The secondary and definitive operative treatment of presented patients was correct; therefore the results were very good.

I think that the study gives quite new and important information about the usefulness of additional posterior stabilization in case of failed anterior stabilization. The documented insufficient anterior stabilization originates probably from inappropriate operation technique or multidirectional instabilities of cervical spine that should be qualified primarily to combined ventral and dorsal stabilization in one operative procedure. I agree with authors indicating the need for further investigation regarding criteria helpful to predict insufficiency of anterior stabilization.

Ass. Prof. Andrzej Bohatyrewicz, M.D.
July 11th, 2005
Department of Orthopaedics and Traumatology
Pomeranian Medical University

*

We are very thankful to dr Bohatyrewicz for his comment to our paper.

As he noticed no exact evaluation of destabilizing factors had been given. Patients included in the analyzed group were admitted with signs of instability of instrumented anteriorly spine level. In six cases deterioration evolved after short time of improvement and there was no improvement or even immediate deterioration afer initial anterior surgery in nine cases. In all cases initial postoperatiye radiological investigation revelead appropriate decompression and construct position. On that basis we assumed that original operations were performed properly, however majority of this patients were not operated in our institution and we did not have insight in the operative record.

In all but one case original surgery involved several movement units. This implies signifcant role of multidirectional load which could not be sufficiently managed by anterior stabilization alone.

Analysis of appropriateness of preoperative planing and biomechanical conditions unique for presented cases would undoubtedly contribute to answer on question put in point 2 of our concłusions. However, we decided that it would have oversized the scope and aim of presented paper.

Authors

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 27–31
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 27–31
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

DAMIAN CZEPITA

WSPÓŁCZESNE MOŻLIWOŚCI ORAZ PERSPEKTYWY W LECZENIU JASKRY

CONTEMPORARY POSSIBILITIES AND PERSPECTIVES IN THE TREATMENT OF GLAUCOMA

Z Katedry i Kliniki Okulistyki Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Danuta Karczewicz*

Summary

Purpose: The aim of this paper is to present and discuss the contemporary possibilities and perspectives of applying neuroprotective mechanisms in the treatment of glaucoma.

Material and methods: A review of the newest concepts concerning neuroprotective action of antiglaucoma drugs was done.

Results: Not until recently was it believed that glaucoma is caused by an increased intraocular pressure. When it comes to diagnosing glaucoma it is nowadays considered that intraocular pressure is not the most important factor. Glaucoma is presently regarded as a condition in which characteristic changes in the appearance of the optic disc and distinctive progressive changes in the visual field occur because of progressive and irreversible destruction of the retinal ganglion cells. Intraocular pressure may sometimes, but not necessarily, accompany those changes.

Hence, it is thought that neuroprotection in glaucoma is aimed at delaying or blocking the mechanisms of ganglion cell degeneration. Two groups of antiglaucoma drugs with neuroprotective action can be distinguished, depending on whether neuroprotective action is direct or indirect. Drugs with direct neuroprotective action are more effective at preventing changes created by glaucoma. However, the majority of antiglaucoma drugs act indirectly. Sympatholytics, carbonic anhydrase inhibitors, analogs of prostaglandins, parasympathicomimetics, sympathicomimetics as well as hyperosmotic agents lower intraocular pressure and lead to an increase in blood flow through vessels of the retina and optic nerve. Therefore, almost all antiglaucoma drugs in an indirect way delay the process of gradual and irreversible degeneration of retinal ganglion cells. Only a few antiglaucoma drugs show direct neuroprotective action, among them betaxolol, metipranolol, brimonidine and clonidine. Additionally, calcium-channel blockers are generally administered in the treatment of glaucoma.

One may anticipate that newer and more effective antiglaucoma drugs will be available in future. Possibly, mechanisms of direct neuroprotection will be exploited in their design. Glaucoma treatment may be based on NMDA, AMPA, kainate or metabotropic antagonists. Moreover, nitric oxide inhibitors, growth factors, neurotrophins, gangliosides or antioxidants emerge as candidate antiglaucoma drugs.

K e y w o r d s: glaucoma – treatment – neuroprotection.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy jest przedstawienie i omówienie współczesnych możliwości oraz perspektyw wykorzystania mechanizmów neuroprotekcyjnych w leczeniu jaskry.

Materiał i metody: Dokonano przeglądu najnowszych koncepcji na temat neuroprotekcyjnego działania leków przeciwjaskrowych.

Wyniki: Obecnie przyjmuje się, że neuroprotekcja w jaskrze polega na wykorzystywaniu mechanizmów opóźniających lub hamujących postępującą i nieodwracalną destrukcję komórek zwojowych siatkówki. Wyróżniamy

dwie grupy leków przeciwjaskrowych o działaniu neuroprotekcyjnym. Leki, które posiadają pośrednie działanie neuroprotekcyjne, oraz leki, które posiadają bezpośrednie działanie neuroprotekcyjne. Lekami bardziej skutecznymi w zapobieganiu zmianom jaskrowym są leki o bezpośrednim działaniu neuroprotekcyjnym. Zaliczamy do nich betaksolol, metipranolol, brimonidynę i klonidynę. W leczeniu jaskry wykorzystywane są również podawane ogólnie blokery kanałów wapniowych.

Wnioski: Należy spodziewać się, że w przyszłości powstaną nowe, bardziej skuteczne leki przeciwjaskrowe. Prawdopodobnie w ich budowie zostaną wykorzystane mechanizmy neuroprotekcji bezpośredniej. Być może leczenie jaskry będzie opierało się wówczas na stosowaniu antagonistów receptorów NMDA, AMPA, kainowych lub metabotropowych. Lekami przeciwjaskrowymi mogą również zostać inhibitory syntazy tlenku azotu, czynniki wzrostu, neurotrofiny, gangliozydy lub antyoksydanty.

H a s ł a: jaskra – leczenie – neuroprotekcja.

Wstęp

W ostatnich latach opublikowano szereg prac, w których opisano istnienie mechanizmów neuroprotekcyjnych. Wykazano w nich, że mechanizmy neuroprotekcji pośredniej oraz bezpośredniej mogą być wykorzystane w farmakologicznym leczeniu jaskry. Prace dotyczące neuroprotekcji rozbudziły duże nadzieje na bardziej skuteczne leczenie jaskry [1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Jednak ostatnio pojawiały się też głosy sceptyczne. *Profesor Czechowicz-Janicka* [4] w trakcie wykładu inauguracyjnego wygłoszonego 10 października 2002 r. na III Sympozjum Jaskry we Wrocławiu stwierdziła: „Odkryto wprawdzie możliwości protekcji nerwu wzrokowego poprzez np. blokowanie glutaminianu w receptorach NMDA, nie ma jednak zdecydowanych dowodów klinicznych, że substancje te będą miały znaczenie w leczeniu jaskry". W 2000 roku *Haefliger i wsp.* [9] opublikowali pracę pt. „In glaucoma, should enthusiasm about neuroprotection be tempered by the experience obtained in other neurodegenerative disorders?" (Czy entuzjazm z powodu neuroprotekcji w jaskrze powinien być ograniczony w wyniku doświadczeń otrzymanych w innych chorobach neurodegeneracyjnych?).

Dlatego też postanowiono przedstawić i omówić współczesne możliwości oraz perspektywy wykorzystania mechanizmów neuroprotekcyjnych w leczeniu jaskry.

Podstawy patogenezy jaskrowej neuropatii nerwu wzrokowego

Do niedawna uważano, że jaskra spowodowana jest podwyższonym ciśnieniem śródgałkowym. Obecnie przyjmuje się, że ciśnienie śródgałkowe nie jest najważniejszym kryterium służącym do rozpoznania jaskry. Uważa się, że jaskra jest chorobą, w której przebiegu dochodzi do postępującej i nieodwracalnej destrukcji komórek zwojowych siatkówki, przebiegającej z charakterystycznymi zmianami w wyglądzie tarczy nerwu wzrokowego oraz z charakterystycznymi progresywnymi zmianami w zakresie pola widzenia. Zmianom tym może, ale nie musi towarzyszyć podwyższone ciśnienie śródgałkowe [1, 3, 4, 5, 11].

Istnieją pewne czynniki sprzyjające powstawaniu i rozwojowi jaskry. Można je podzielić na cztery grupy: naczyniowe, mechaniczne, genetyczne lub inne. Do naczyniowych czynników ryzyka rozwoju jaskry zaliczamy: niedokrwienie, niskie lub wysokie ciśnienie tętnicze, niedostateczna perfuzja krwi w oku, skurcz naczyń obwodowych, krwotok w okolicy tarczy nerwu wzrokowego, podwyższony poziom α_2-globuliny, miażdżyca. Mechaniczne czynniki ryzyka to: podwyższone ciśnienie śródgałkowe, nabyte uszkodzenie blaszki sitowej, zaburzony przepływ aksoplazmy w komórkach zwojowych siatkówki, nabyte zagłębienie tarczy nerwu wzrokowego, ucisk w okolicy skrzyżowania wzrokowego. Genetyczne czynniki ryzyka to: dziedziczne wady blaszki sitowej, zaburzenia wychwytu zwrotnego aminokwasów pobudzających, mutacje swoistych genów np.: *TIGR*, *CYP1B1*, *PITX2*, *FKHL7*, *LMX1Bc*. Wyróżniamy również następujące inne czynniki ryzyka rozwoju jaskry: obniżenie poziomu czynnika troficznego, obniżenie poziomu cytokin, cukrzyca, zaburzenia gospodarki tłuszczowej (hipercholesterolemia, hiperlipidemia), anemia, stres, niewydolność układu wegetatywnego, depresja, migreny, choroby autoimmunologiczne, wiek (po 35 roku życia), krótkowzroczność (powyżej -4 D sph.), uszkodzenia i zabiegi chirurgiczne na oku, ogólne oraz miejscowe stosowanie kortykosterydów [3, 4, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 20].

Podstawowe zmiany zachodzące w jaskrze odbywają się w obrębie włókien nerwowych siatkówki. Włókna te są aksonami (neurytami) komórek zwojowych siatkówki. Płynie w nich dwukierunkowy prąd aksoplazmy – od ciała komórki do końca neurytu oraz w kierunku przeciwnym. Prąd aksoplazmatyczny biegnący od końca neurytu do ciała komórek zwojowych siatkówki niesie ze sobą neurotrofiny. Zanik komórek zwojowych w przebiegu jaskry może być spowodowany działaniem kilku czynników. Może być on następstwem mechanicznego uszkodzenia neurytów oraz zahamowania krążenia aksoplazmy w trakcie podwyższonego ciśnienia śródgałkowego. Może być również wywołany upośledzeniem krążenia krwi we włośniczkach zaopatrujących nerw wzrokowy oraz może być następstwem toksycznego uszkodzenia komórek zwojowych siatkówki w wyniku działania glutaminianu, kwasu γ-aminomasłowego, wolnych rodników, tlenku azotu lub czynnika martwicy nowotworów (TNF-α). W przebiegu jaskry dochodzi do stopniowego i nieodwracalnego zwyrodnienia aksonów komórek zwojowych siatkówki na poziomie tarczy nerwu wzrokowego. Pierścień nerwowo-siatkówkowy ulega

spłaszczeniu oraz zwężeniu. Zagłębienie tarczy nerwu wzrokowego stopniowo poszerza i pogłębia się. W końcowych stadiach choroby zajmuje ono całą powierzchnię tarczy nerwu wzrokowego [1, 2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 14].

Aktualnie uważa się, że najważniejszymi czynnikami prowadzącymi do neuropatii nerwu wzrokowego w jaskrze są podwyższone ciśnienie śródgałkowe oraz dysfunkcja naczyń krwionośnych.

Podwyższone ciśnienie śródgałkowe prowadzi do niedokrwienia nerwu wzrokowego oraz do zahamowania wstecznego przepływu aksoplazmatycznego w neurytach komórek zwojowych siatkówki. Brak przepływu aksoplazmy hamuje transport neurotrofin do ciał komórek zwojowych siatkówki. Prowadzi to do derepresji genów zaangażowanych w śmierć komórki, fragmentacji DNA oraz apoptozy. Dysfunkcja naczyń krwionośnych, która może być wywołana przez spadek perfuzji, skurcz naczyniowy oraz upośledzenie mechanizmów autoregulacji prowadzi do niedokrwienia nerwu wzrokowego, wzmożonego uwalniania glutaminianu z zakończeń presynaptycznych, aktywacji receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA), napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek zwojowych, fragmentacji DNA oraz apoptozy [5, 8, 9, 10, 14, 15].

Obecnie przyjmuje się, że istotną rolę w patogenezie neuropatii nerwu wzrokowego w przebiegu jaskry pełni mechanizm reperfuzji krwi. Polega on na wzmożonym powstawaniu wolnych rodników tlenowych w następstwie przywrócenia perfuzji po wcześniejszym niedotlenieniu. Prowadzi to do stresu oksydacyjnego, aktywacji astrocytów oraz limfocytów.

Stwierdzono, że wahania ciśnienia śródgałkowego wywołują szybszą destrukcję komórek zwojowych siatkówki niż stałe i wysokie wartości ciśnienia śródgałkowego. Zaobserwowano również, że upośledzenie krążenia krwi będące następstwem dysregulacji naczyniowej prowadzi do większych zmian w obrębie neurytów komórek zwojowych niż obniżenie krążenia krwi spowodowane miażdżycą [2, 3, 7, 9, 11, 14].

Zmiany w obrębie układu glutaminianergicznego

W patogenezie jaskry uczestniczą receptory NMDA, AMPA (α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowe), kainowe oraz metabotropowe. Jednak najważniejszą rolę odgrywają receptory N-metylo-D-asparaginowe. Receptory te zakodowane są w genach *NMDAR1* oraz *NMDAR2*. Umiejscowione są postsynaptycznie. Mają charakter receptorów jonotropowych. Receptory NMDA pełnią ważną funkcję w patogenezie niedowidzenia oraz w kształtowaniu plastyczności kory wzrokowej. Odgrywają dużą rolę w rozwoju plastyczności uczenia się i zapamiętywania, w patogenezie padaczki, amylotroficznego stwardnienia bocznego, choroby Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona, zespołu Downa, depresji, bólu, uzależnienia lekowego i alkoholowego. Receptory N-metylo-D-asparaginowe biorą również udział w powstawaniu zmian w przebiegu niedokrwienia, niedotlenienia, hipoglikemii i urazu [6, 8, 9, 10, 11, 14, 15].

W następstwie aktywacji receptorów NMDA, przez kanał jonowy do wnętrza komórek zwojowych wchodzą jony wapnia oraz sodu, a wychodzą jony potasu. Wnikanie jonów Na^+ do wnętrza komórek zwojowych siatkówki po pobudzeniu kompleksu NMDA wywołuje depolaryzację błony komórkowej, co prowadzi do otwarcia kanałów wapniowych zależnych od potencjału błonowego. Jony Ca^{2+}, przechodząc przez kanały wapniowe, zwiększają stężenie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+}. Wolne jony wapniowe, pełniąc rolę wtórnego przekaźnika, wywołują całą kaskadę przemian wewnątrzkomórkowych. Dochodzi wówczas do aktywacji fosfolipazy C, syntazy tlenku azotu, kinazy białkowej C, kinazy II zależnej od kalmoduliny, szeregu proteaz i fosfataz, indukcji ekspresji genów, a także indukcji przekaźników trzeciorzędowych takich jak tlenek azotu oraz cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP). Procesy te prowadzą do fragmentacji DNA oraz apoptozy komórek zwojowych [6, 9, 10, 11, 14, 15].

Mechanizmy neuroprotekcji pośredniej i bezpośredniej

Neuroprotekcja w jaskrze polega na wykorzystywaniu mechanizmów opóźniających lub hamujących postępującą i nieodwracalną destrukcję komórek zwojowych siatkówki.

Od dłuższego już czasu mówiono o neuroprotekcji pośredniej, która w praktyce sprowadzała się do stosowania leków obniżających ciśnienie śródgałkowe oraz zwiększających przepływ krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego.

Jednak w ostatnich latach opisano wiele mechanizmów neuroprotekcji bezpośredniej. Według *Osborne'a i wsp.* [14] możemy do nich zaliczyć:

- dostarczanie energii siatkówce,
- obniżanie poziomu pozakomórkowego glutaminianu,
- hamowanie aktywacji receptorów NMDA, AMPA, kainowych,
- blokowanie kanałów wapniowych,
- hamowanie przechodzenia jonów chloru do wnętrza komórki,
- zwiększanie rozpadu wewnątrzkomórkowego glutaminianu,
- hamowanie produkcji wolnych rodników tlenowych,
- hamowanie produkcji tlenku azotu,
- zapobieganie utlenianiu tłuszczów,
- zapobieganie apoptozie komórek,
- zapobieganie stanom zapalnym,
- zapobieganie uszkodzeniom oksydacyjnym,
- poprawianie przepływu aksoplazmatycznego neurotrofin,

- podawanie czynników wzrostu,
- wywoływanie szoku termicznego,
- podawanie wazoaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP),
- podawanie proteoglikanów,
- podawanie gangliozydów.

Tak duża różnorodność podanych przez *Osborne'a i wsp.* [14] przemian biochemicznych wskazuje jednoznacznie na duże możliwości wykorzystania mechanizmów neuroprotekcji bezpośreniej w leczeniu jaskry.

Właściwości neuroprotekcyjne współczesnych leków przeciwjaskrowych

Do niedawna uważano, że leki przeciwjaskrowe powinny skutecznie i efektywnie obniżać ciśnienie śródgałkowe. Obecnie przyjmuje się, że leki przeciwjaskrowe oprócz redukcji ciśnienia śródgałkowego powinny zwiększać przepływ krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego oraz wykazywać działanie neuroprotekcyjne tzn. powinny opóźniać lub hamować postępującą i nieodwracalną destrukcję komórek zwojowych siatkówki [1, 2, 5, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20].

Wyróżniamy dwie grupy leków przeciwjaskrowych o działaniu neuroprotekcyjnym. Leki, które wykazują pośrednie działanie neuroprotekcyjne oraz leki, które wykazują bezpośrednie działanie neuroprotekcyjne. Lekami bardziej skutecznymi w zapobieganiu neuropatii nerwu wzrokowego są leki o bezpośrednim działaniu neuroprotekcyjnym [1, 2].

Większość leków przeciwjaskrowych ma pośrednie działanie neuroprotekcyjne. Sympatykolityki, inhibitory anhydrazy węglanowej, analogi prostaglandyn, parasympatykomimetyki, sympatykomimetyki oraz leki o działaniu osmotycznym obniżają ciśnienie śródgałkowe, co prowadzi do wzrostu przepływu krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego. Dlatego też prawie wszystkie leki przeciwjaskrowe w sposób pośredni opóźniają proces stopniowego i nieodwracalnego zwyrodnienia komórek zwojowych siatkówki. Jedynie kilka leków przeciwjaskrowych wykazuje bezpośrednie działanie neuroprotekcyjne [1, 2, 5, 9, 19].

Takie cechy posiada betaksolol, który hamuje napływ jonów Ca^{2+} i Na^{+} do wnętrza komórek zwojowych oraz zwiększa przepływ krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego. Podobne właściwości wykazuje metipranolol, który oprócz wzrostu przepływu krwi w obrębie naczyń siatkówki i nerwu wzrokowego hamuje przechodzenie jonów wapnia i sodu do wnętrza komórek zwojowych, działa antyoksydacyjnie, hamuje peroksydacje lipidów oraz zmniejsza niekorzystny wpływ niedokrwienia na budowę i funkcję siatkówki. Zaobserwowano, że brimonidyna i klonidyna (agoniści receptorów α_2) wykazują również bezpośrednie działanie neuroprotekcyjne. Zwiększają one stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów w siatkówce. Stwierdzono też, że brimonidyna wpływa na ekspresję genów *bcl-2* oraz *bcl-x*. W leczeniu jaskry wykorzystywane są również podawane ogólnie blokery kanałów wapniowych (flunarazyna, nifedypina, nimodypina). Leki te zmniejszają napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek zwojowych siatkówki [1, 2, 10, 11, 19].

Niedawno przeprowadzono szereg badań doświadczalnych i klinicznych nad wykorzystaniem neuroprotekcyjnych właściwości antagonistów receptorów glutaminianergicznych. W leczeniu jaskry stosowano również antyoksydanty (aminoguanidynę, witaminę E, koenzym Q), melatoninę oraz wyciąg z miłorzębu japońskiego [15, 16, 19, 20].

Perspektywy leczenia jaskry

Obecnie przyjmuje się, że idealny lek przeciwjaskrowy powinien spełniać następujące kryteria:

- zapobiegać neuropatii nerwu wzrokowego,
- regenerować uszkodzone komórki zwojowe siatkówki,
- obniżać ciśnienie śródgałkowe,
- zwiększać przepływ krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego,
- być dobrze tolerowany przez pacjenta.

Do tej pory nie wprowadzono na rynek takiego leku. Współczesne leki przeciwjaskrowe obniżają ciśnienie śródgałkowe oraz zwiększają przepływ krwi w naczyniach siatkówki i nerwu wzrokowego. Są to jednak leki o pośrednim działaniu neuroprotekcyjnym. Leki o bezpośrednim działaniu neuroprotekcyjnym bardziej skutecznie chronią przed zmianami degeneracyjnymi zachodzącymi w obrębie komórek zwojowych. Niestety żaden z aktualnie dostępnych leków przeciwjaskrowych nie wywołuje regeneracji uszkodzonych komórek zwojowych siatkówki. Wskazuje to na fakt, iż do tej pory nie wyprodukowano idealnego leku przeciwjaskrowego [1, 2, 5, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 19, 20].

Należy jednak oczekiwać, że w przyszłości powstaną nowe bardziej skuteczne leki przeciwjaskrowe. Wszystko wskazuje na to, że w ich budowie zostaną wykorzystane mechanizmy neuroprotekcji bezpośredniej. Być może leczenie jaskry będzie opierało się wówczas na stosowaniu antagonistów receptorów NMDA, AMPA, kainowych lub metabotropowych. Lekami przeciwjaskrowymi mogą również zostać inhibitory syntazy tlenku azotu, czynniki wzrostu, neurotrofiny, gangliozydy lub antyoksydanty. Nie można również wykluczyć tego, że w przyszłości leczenie jaskry będzie opierało się na osiągnięciach współczesnej immunologii, inżynierii genetycznej lub transplantologii [1, 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20].

Piśmiennictwo

1. *Bron A.*: Neuroprotection in the eye: What's on the horizon? In: Pharmacotherapy in glaucoma. Eds. S. Orgöl, J. Flammer. Verlag Hans Huber, Bern 2000, p. 293–303.
2. *Bron A. J. et al.*: Beta-blockers in the treatment of glaucoma. In: Phar-

macotherapy in glaucoma. Eds. S. Orgöl, J. Flammer. Verlag Hans Huber, Bern 2000, p. 79–113.
3. *Chmielewska K.*: Współczesne koncepcje patogenezy jaskrowej neuropatii nerwu wzrokowego. Klin. Ocz. 2003, 105, 211.
4. *Czechowicz-Janicka K.*: Jaskra – choroba nieznana. Klin. Ocz. 2003, 105, 76.
5. *Czepita D.*: Mechanizmy neuroprotekcyjne w jaskrze. Wydawnictwo Via Medica, Gdańsk (w druku).
6. *Czepita D.*: Rola receptorów NMDA w obrębie drogi wzrokowej. Okulistyka, 2001, 4, Suppl., 48.
7. *Flammer J.*: Die glaukomatöse Optikusneuropathie: Ein Reperfusionsschaden. Klin. Monatsbl. Augenheilkd. 2001, 218, 290.
8. *Girkin C. A.*: Strategies for neuroprotection. J. Glaucoma, 2001, 10, Suppl. 1, S78.
9. *Haefliger I. O., Fleischhauer J. C., Flammer J.*: In glaucoma, should enthusiasm about neuroprotection be tempered by the experience obtained in other neurodegenerative disorders? Eye, 2000, 14, 464.
10. *Hicks D., Sahel J.*: Neuroprotection: The view of a neurobiologist. In: Pharmacotherapy in glaucoma. Eds. S. Orgöl, J. Flammer. Verlag Hans Huber, Bern 2000, p. 277–291.
11. *Kaushik S., Pandav S. S., Ram J.*: Neuroprotection in glaucoma. J. Postgrad. Med. 2003, 49, 90.
12. *Levin L. A.*: Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. Surv. Ophthalmol. 2003, 48, Suppl. 1, S21.
13. *Naskar R., Dreyer E. B.*: New horizons in neuroprotection. Surv. Ophthalmol. 2001, 45, Suppl. 3, S250.
14. *Osborne N. N. et al.*: Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. Surv. Ophthalmol. 1999, 43, Suppl. 1, S102.
15. *Pop E.*: Trends in neuroprotection. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 2002, 77, 295.
16. *Ritch R.*: Neuroprotection: is it already applicable to glaucoma therapy? Curr. Opin. Ophthalmol. 2000, 11, 78.
17. *Schwartz M.*: Neurodegeneration and neuroprotection in glaucoma: development of a therapeutic neuroprotective vaccine. The Friedenwald Lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003, 44, 1407.
18. *Schwartz M.*: Physiological approaches to neuroprotection: boosting of protective autoimmunity. Surv. Ophthalmol. 2001, 45, Suppl. 3, S256.
19. *Schwartz M., Yoles E.*: Neuroprotection: a new treatment midality for glaucoma? Curr. Opin. Ophthalmol. 2000, 11, 107.
20. *Wein F. B., Levin L. A.*: Current understanding of neuroprotection in glaucoma. Curr. Opin. Ophthalmol. 2002, 13, 61.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 33–36
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 33–36
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

DAMIAN CZEPITA, WOJCIECH GOSŁAWSKI, ARTUR MOJSA

OCCURRENCE OF REFRACTIVE ERRORS AMONG STUDENTS WHO BEFORE THE AGE OF TWO GREW UP UNDER THE INFLUENCE OF LIGHT EMITTED BY INCANDESCENT OR FLUORESCENT LAMPS

WYSTĘPOWANIE WAD REFRAKCJI U UCZNIÓW, KTÓRZY DO DRUGIEGO ROKU ŻYCIA PRZEBYWALI W ŚWIETLE EMITOWANYM PRZEZ LAMPY ŻAROWE LUB FLUORESCENCYJNE

Katedra i Klinika Okulistyki Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Head: Prof. Danuta Karczewicz M.D., D.M.Sc. Habil.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy występowaniem wad refrakcji a przebywaniem do drugiego roku życia w świetle emitowanym przez lampy żarowe lub fluorescencyjne.

Materiał i metody: Przebadano 3636 uczniów (1638 chłopców i 1998 dziewcząt w wieku od 6 do 18 roku życia, średni wiek 12,1 lat, SD 3,4). Wykonano skiaskopię po cykloplegii. Przyjęto, że krótkowzrocznością jest wada refrakcji $\leq$ -0,5 D, nadwzrocznością wada refrakcji $\geq$ +1,5 D, astygmatyzmem wada refrakcji > 0,5 DC. Anizometropię rozpoznawano, gdy różnica w refrakcji obu oczu była > 1,0 D. Rodzice badanych uczniów wypełniali ankietę dotyczącą oświetlenia, które było stosowane w domu przed ukończeniem przez dziecko drugiego roku życia. Dane opracowano statystycznie testem χ^2, przyjmując poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki: Zaobserwowano częstsze występowania anizometropii ($p < 0,02$) oraz rzadsze występowanie emetropii ($p < 0,05$) u osób, które do drugiego roku życia spały w pomieszczeniach oświetlonych (tab. 1). Stwierdzono również, że światło emitowane przez lampy fluorescencyjne prowadzi do częstszego występowania astygmatyzmu ($p < 0,01$) (tab. 2).

H a s ł a: lampy żarowe – lampy fluorescencyjne – wady refrakcji.

Summary

Purpose: The aim of the study was to determine whether the development of refractive errors could be associated with exposure to light emitted by incandescent or fluorescent lamps.

Material and methods: 3636 students were examined (1638 boys and 1998 girls, aged 6–18 years, mean age 12.1, SD 3.4). The examination included skiascopy with cycloplegia. Myopia was defined as refractive error $\leq$ -0.5 D, hyperopia as refractive error $\geq$ +1.5 D, astigmatism as refractive error > 0.5 DC. Anisometropia was diagnosed when the difference in the refraction of both eyes was > 1.0 D. The parents of all the students examined completed a questionnaire on the child's light exposure before the age of two. Data were analyzed statistically with the χ^2 test. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: It was observed that sleeping until the age of two in a room with a light turned on is associated with an increase in the occurrence of anisometropia ($p < 0.02$) as well as with a reduction in the prevalence of emmetropia ($p < 0.05$). It was also found that light emitted by fluorescent lamps leads to more frequent occurrence of astigmatism ($p < 0.01$).

K e y w o r d s: incandescent lamps – fluorescent lamps – refractive errors.

Introduction

Light plays an important role in the development of the whole visual system. Recently, a few papers concerning the influence of light on the creation of myopia have been published. Based on parental questionnaires and refractions, *Quinn et al.* [14] have indicated that myopia occurs frequently among children whose parents reported that they slept in lighted rooms before the age of 2 years. These investigations have been carried out on 479 persons ranging from 2 to 16 years of age and have generated considerable interest around the world. In the years following that study a few works have came out concerning the described relationship. However, *Gwiazda et al.* [8] and *Mutti et al.* [13] from the U.S.A., *Guggenheim et al.* [7] from the UK, *Saw et al.* [15, 16] from Singapore as well as *Sugimoto et al.* [7] from Japan - had not observed a frequent occurrence of myopia among people who slept in lighted rooms during their childhood.

Recently, *Czepita et al.* [4] after examining 3377 students aged between 6–19 years, confirmed that sleeping until the age of two in a room with a light turned on is associated with an increase in the occurrence of myopia. Moreover, the authors of the studies demonstrated that light emitted by fluorescent lamps is associated with a higher prevalence of astigmatism. *Chmielewska* [2] and *Czepita et al.* [3] observed that use of fluorescent lamps was associated with an increase in the occurrence of myopia and hyperopia.

Unfortunately, no research has been carried out concerning the influence of different types of artificial lighting on the development of anisometropia among children [5, 6]. That is why this work was dedicated to resolving the matter whether the development of refractive errors might be associated with exposure to light emitted by incandescent or fluorescent lamps.

Material and methods

A total of 1638 boys and 1998 girls (3636 in all) aged 6–18 (mean age 12.1, SD 3.4) were examined. The examined children, students of elementary and secondary schools, were examined in the school's consulting rooms. All the children in the selected schools were asked to participate in the study. The examined students were Caucasian and were residents of Szczecin, Poland and neighboring areas. Most of the children participated in the previous investigations [4] however, in this paper a group of persons with anisometropia was selected.

Participation was voluntary and informed consent was obtained from the school principals and parents of all the students. The studies were approved by the Bioethics Committee of the Pomeranian Medical University.

The examination included skiascopy after cycloplegia. Cycloplegia was administered with two drops of 1% tropicamide instilled 5 minutes apart. Thirty minutes after the last drop, skiascopy was performed.

Myopia was defined as a refractive error $\leq$ -0.5 D, hyperopia as a refractive error $\geq$ +1.5 D, astigmatism as a refractive error > 0.5 DC. Anisometropia was diagnosed when the difference in the refraction of both eyes was > 1.0 D.

The parents of all the students examined completed a questionnaire on the child's light exposure before the age of two. The questionnaire was written in the Polish language. The questions asked whether the child before the age of two slept at night in darkness or with light turned on. Other questions asked what type of artificial light was used in the living room, dining room, child's room, parents' bedroom, kitchen, and bathroom.

The study group involved persons with emmetropia, myopia, hyperopia, astigmatism, and anisometropia. Students with other eye diseases were excluded from statistical analysis. The data were analyzed statistically using χ^2 test. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

It was observed that sleeping until the age of two in a room with a light turned on is associated with an increase in the occurrence of anisometropia ($p < 0.02$) as well as with a reduction in the prevalence of emmetropia ($p < 0.05$) (Tab. 1).

It was also found that the use of fluorescent lamps in the parents' bedroom is associated with an increase in the occurrence of astigmatism ($p < 0.01$), while fluorescent lamp

Table 1. **Prevalence of refractive errors in relation to the type of night lighting used during the first two years of life. Shown are percentages and numbers (in parentheses) of students**

Tabela 1. **Częstość występowania wad refrakcji w zależności od typu używanego w pierwszych dwóch latach życia oświetlenia w nocy. W nawiasach obok procentów podano ilość uczniów**

Type of night lights / Typ oświetlenia w nocy	Patients / Pacjenci				
	emmetropic / emetropijni	myopic / krótkowzroczni	hyperopic / nadwzroczni	astigmatic / z niezbornością	anisometropic / różnowzroczni
No light / Bez światła	66 (1910)	15 (426)	11 (319)	4 (131)	5 (119)
Light / Światło	62 (452) $p < 0.05$	16 (113) $p < 0.58$	12 (91) $p < 0.26$	4 (31) $p < 0.75$	6 (44) $p < 0.02$
incandescent / żarowe	63 (380)	15 (92)	13 (79)	4 (22)	5 (32)
fluorescent / fluorescencyjne	57 (72) $p < 0.23$	17 (21) $p < 0.68$	10 (12) $p < 0.27$	7 (9) $p < 0.07$	9 (12) $p < 0.06$
Total number of patients / Ogółem	65 (2362)	15 (539)	11 (410)	4 (162)	5 (163)

Table 2. **Prevalence of refractive errors in relation to the type of room lighting used during the first two years of life. Shown are percentages and numbers (in parentheses) of students**

Tabela 2. **Częstość występowania wad refrakcji w zależności od typu używanego w pierwszych dwóch latach życia oświetlenia w pomieszczeniu. W nawiasach obok procentów podano ilość uczniów**

Type of room / Typ pokoju	Patients / Pacjenci				
	emmetropic / emetropijni	myopic / krótkowzroczni	hyperopic / nadwzroczni	astigmatic / z niezbornością	anisometropic / różnowzroczni
Living room / Pokój dzienny					
incandescent / żarowe	65 (2332)	15 (536)	11 (406)	4 (160)	5 (162)
fluorescent / fluorescencyjne	75 (30) $p < 0.18$	7.5 (3) $p < 0.18$	10 (4) $p < 0.79$	5 (2) $p < 0.86$	2.5 (1) $p < 0.54$
Dining room / Jadalnia					
incandescent / żarowe	65 (2315)	15 (527)	11 (400)	4 (157)	5 (159)
fluorescent / fluorescencyjne	60 (47) $p < 0.37$	15 (12) $p < 0.88$	13 (10) $p < 0.66$	7 (5) $p < 0.39$	5 (4) $p < 0.78$
Child's room / Pokój dziecięcy					
incandescent / żarowe	65 (2330)	15 (531)	11 (405)	4 (160)	5 (162)
fluorescent / fluorescencyjne	66 (32) $p < 0.80$	17 (8) $p < 0.91$	10 (5) $p < 0.85$	4 (2) $p < 0.92$	3 (1) $p < 0.54$
Parents bedroom / Sypialnia rodziców					
incandescent / żarowe	65 (2340)	15 (532)	11 (405)	4 (157)	5 (162)
fluorescent / fluorescencyjne	55 (22) $p < 0.18$	18 (7)$p < 0.63$	12 (5) $p < 0.80$	12 (5) $p < 0.01$	3 (1) $p < 0.54$
Kitchen / Kuchnia					
incandescent / żarowe	65 (2213)	15 (493)	11 (372)	4 (147)	5 (154)
fluorescent / fluorescencyjne	58 (149) $p < 0.01$	18 (46) $p < 0.15$	15 (38) $p < 0.06$	6 (15) $p < 0.26$	3 (9) $p < 0.43$
Bathroom / Łazienka					
incandescent / żarowe	65 (2281)	15 (520)	11 (398)	4 (157)	5 (159)
fluorescent / fluorescencyjne	67 (81) $p < 0.64$	16 (19) $p < 0.78$	10 (12) $p < 0.63$	4 (5) $p < 0.86$	3 (4) $p < 0.52$
Total number of patients / Ogółem	65 (2362)	15 (539)	11 (410)	4 (162)	5 (163)

lighting in kitchens leads to a reduction in the prevalence of emmetropia ($p < 0.01$) – table 2.

Discussion

In our study it was observed that sleeping until the age of two in a room with a light turned on is associated with an increase in the occurrence of anisometropia. In addition the findings of *Czepita et al.* [4] that light emitted by fluorescent lamps is associated with an increase in the prevalence of astigmatism was confirmed. A higher occurrence of myopia among persons who until the age of two have slept in lighted rooms was not proved. This was probably caused by the use of other criteria in defining refractive errors and selecting group of people with anisometropia.

In experimental research it is known that rearing chicks in light provokes a flattening of the cornea, an enlargement of the eyeball, a decrease of the thickness of the cornea, sclera, retina and choroidea as well as anatomical changes in the retina [5, 6, 9, 11]. *Boelen and Cottriall* [1] have indicated that rearing chicks in continuous light reduces the level of 3,4-dihrodroxiphenylacetic acid in the vitreous. Possibly among humans the process of sleeping with a light turned on can inflict a decrease of dopaminergic activity and what goes along with it, a lower release of dopamine as well as augmentation of eye growth. That is why it seems likely that disturbances of the daily light/dark cycle during the period of time when refraction is developing may disrupt emmetropization and lead to refractive errors.

Recently, *Loman et al.* [12] described a greater progression of myopia among 23–44 year old law school students subjected to a longer exposition of light at night. *Vannas et al.* [18] in the cross-sectional survey of Finnish conscripts found that myopia was not associated with the month of birth. There was a trend towards a higher prevalence of myopia among conscripts living above the Arctic Circle, consistent with the hypothesis that ambient lighting might influence refractive development. Those studies suggest that light association may not be restricted to the first two years of life. The critical period for an influence of the light/dark cycle on refractive development, if it exists at all, is not of a duration measured in months.

In the performed investigations a frequent occurrence of astigmatism was observed among persons who before the age of two lived with light emitted by fluorescent lamps, in comparison to those who lived with light emitted by incandescent lamps. This association has been already described by *Czepita et al.* [4]. The creation of astigmatism must likely be linked with the influence of light emitted by fluorescent lamps on the corneal and anterior chamber development. Perhaps in that process a particular function is also being played by the ciliary ganglion and ciliary muscle [10, 11].

Acknowledgments

We would like to thank Professor R. A. Stone from the Department of Ophthalmology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, U.S.A. for his critical review of the manuscript, Professor C. T. Keaveney from the Department of Modern Languages, Linfield College, McMinnville, OR, U.S.A. for his improvement of the English version of the manuscript, and A. Pechmann for assistance during data collection.

References

1. *Boelen M. K., Cottriall C.L.*: Nightlights affect diurnal cycling of dopamine release and the rate of emmetropisation. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000, Suppl. 41, S134.
2. *Chmielewska I.:* Static perimetry in myopia (in Polish). Doctoral thesis, Pomeranian Medical University, Szczecin 2004.
3. *Czepita D., Gosławski W., Mojsa A.*: Refractive errors among students occupying rooms lighted with incandescent or fluorescent lamps. Ann. Acad. Med. Stetin., 2004, 50, 51.
4. *Czepita D. et al.*: Role of light emitted by incandescent or fluorescent lamps in the development of myopia and astigmatism. Med. Sci. Monit. 2004, 10, 168.
5. *Czepita D.*: Myopia - epidemiology, pathogenesis, present and coming possibilities of treatment. Case Rep. Clin. Pract. Rev. 2002, 3, 294.
6. *Czepita D.*: The role of the light in the refractive errors' pathogenesis (in Polish with English abstract). Klin. Ocz. 2002, 104, 63.
7. *Guggenheim J. A., Hill C., Yam T.-F.*: Myopia, genetics, and ambient lighting at night in a UK sample. Br. J. Ophthalmol. 2003, 87, 580.
8. *Gwiazda J. et al.*: Myopia in children is not associated with night-time lighting in infancy. In: Proceedings of the VIII International Conference on Myopia. Boston 2000. Eds. F. Thorn, D. Troilo, J. Gwiazda. Conference on myopia 2000, Inc., Boston 2000, p. 308–312.
9. *Lauber J. K., Shutze J. V., McGinnis J.*: Effects of exposure to continuous light on the eye of the growing chick. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1961, 106, 871.
10. *Leśnik H., Poborc-Godlewska J.*: The relationship between ciliary muscle fatigue and the type of artificial light used to illuminate the area of visual work. Pol. J. Occup. Med. Env. Health. 1993, 6, 287.
11. *Li T., Howland H. C.:* Modulation of constant light effects on the eye by ciliary ganglionectomy and optic nerve section. Vision Res. 2000, 40, 2249.
12. *Loman J. et al.*: Darkness and nearwork: myopia and its progression in third-year law students. Ophthalmology, 2002, 109, 1032.
13. *Mutti D. O. et al.*: Nursery lighting is not associated with myopia. In: Proceedings of the VIII International Conference on Myopia. Boston 2000. Eds. F. Thorn, D. Troilo, J. Gwiazda. Conference on myopia 2000, Inc., Boston 2000, p. 308–316.
14. *Quinn G. E. et al.*: Myopia and ambient lighting at night. Nature, 1999, 399, 113.
15. *Saw S. M.:* Near-work activity, night-lights, and myopia in the Singapore-China study. Arch. Ophthalmol. 2002, 120, 620.
16. *Saw S. M. al.:* Myopia and night lighting in children in Singapore. Br. J. Ophthalmol. 2001, 85, 527.
17. *Sugimoto R., Kuwayama Y., Stone R. A.*: Myopia and night-time light exposure in Japanese schoolchildren. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001, Suppl. 42, S392.
18. *Vannas A. E. et al.:* Myopia and natural lighting extremes: risk factors in Finnish army conscripts. Acta Ophthalmol. Scand. 2003, 81, 588.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 37–40
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 37–40
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

EWA TOMASIK[1], DAMIAN CZEPITA[2], MARIA ŻEJMO[3], FLORIAN CZERWIŃSKI[1]

DEVELOPMENT OF THE HUMAN EYEBALL AND ORBIT DURING THE FETAL LIFE

ROZWÓJ GAŁKI OCZNEJ I OCZODOŁU CZŁOWIEKA W ŻYCIU PŁODOWYM

[1] Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Head: Prof. *Florian Czerwiński* M.D., D.M.Sc. Habil.

[2] Katedra i Klinika Okulistyki Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Head: Prof. *Danuta Karczewicz* M.D., D.M.Sc. Habil.

[3] Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Head: Prof. *Stefania Giedrys-Kalemba* M.D., D.M.Sc. Habil.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było dokonanie oceny rozwoju gałki ocznej i oczodołu człowieka w życiu płodowym.

Materiał i metody: Przebadano 18 martwych płodów ludzkich (36 oczu i 36 oczodołów) w wieku od 17 do 28 tygodnia ciąży. Badane płody zmarły w pierwszych godzinach życia z powodu wcześniactwa. Nie wykazywały żadnych widocznych wad rozwojowych. Mierzono u nich długość osiową i średnicę równikową gałek ocznych oraz głębokość i szerokość oczodołów. Dane opracowano statystycznie testem t-Studenta oraz współczynnikami korelacji Pearsona.

Wyniki: Wykazano, że wraz z wiekiem rośnie długość osiowa ($p < 0,005$) i średnica równikowa ($p < 0,001$) gałki ocznej (ryc. 1). Stwierdzono, że wraz z wiekiem rośnie głębokość ($p < 0,001$) i szerokość ($p < 0,001$) oczodołu (ryc. 2). Zaobserwowano również, że wraz ze wzrostem długości osiowej oka zwiększa się głębokość oczodołu ($p < 0,001$), a wraz ze wzrostem średnicy równikowej gałki ocznej rośnie szerokość oczodołu ($p < 0,001$) (ryc. 3). W pracy wykazano, że w życiu płodowym człowieka wzrost gałki ocznej koreluje ze wzrostem oczodołu.

H a s ł a: płód – gałka oczna – oczodół – rozwój.

Summary

Purpose: The aim of this paper was to describe the development of the human eyeball and orbit during fetal life.

Material and methods: Eighteen human fetuses (36 eyes and 36 orbits) with gestational age ranging from 17 to 28 weeks were examined. Fetuses died in the first hours of life due to immaturity and did not reveal any developmental anomalies. The axial and equatorial diameters of the eyeballs as well as the depth and width of the orbits were measured. The data was analyzed statistically with Student's t-test and Pearson's correlation coefficients.

Results: It was found that the axial length ($p < 0.005$) and equatorial diameter ($p < 0.001$) of the eyeballs, as well as the depth ($p < 0.001$) and width ($p < 0.001$) of the orbit increase with age. Furthermore, growth of the axial length of the eye is paralleled by increase in orbital depth ($p < 0.001$) while growth of the equatorial diameter coincides with increasing orbital width ($p < 0.001$). It was ascertained that growth of the human eye during fetal life is correlated with growth of the orbit.

K e y w o r d s: fetus – eyeball – orbit − development.

Introduction

Based on clinical and experimental investigations it can be assumed that orbital development depends on growth of the eye [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. However, it has not been established how growth of the eyeball affects the development of the orbit. Due to ethical reasons, experimental studies cannot be performed on human fetuses. Therefore, all observations bringing us closer to elucidation of the problem are scientifically important. We have therefore decided to study the development of the human eye and orbit during fetal life.

Material and methods

Eighteen human fetuses (36 eyeballs and 36 orbits) aged from 17 to 28 weeks, without any signs of developmental anomalies, were examined. All fetuses died in the first hours of life due to immaturity. Fetuses were placed in 10% formalin prior to the study.

Fetal age was calculated on the basis of the crown-rump length (CRL), crown-heel length (CHL), and body mass [21, 22]. Clinical data was also considered in determining the age of the fetuses. The bodies did not display any symptoms of maceration or postmortem autolysis.

Eyeballs followed by orbits were dissected from the fetal body and transferred to 0.9% saline for a few days prior to measurements. The axial and equatorial diameters of the eyes as well as the depth and width of the orbits were measured using vernier calipers.

The axial length was taken as the distance between the peak of the cornea and the peak of the posterior segment of the eyeball. The equatorial diameter was regarded as the width of the eye at the equator. The depth of the orbit was taken as the distance from the supraorbital margin to the optic canal. The width of the orbit was equal to the distance from the frontozygomatic suture to the frontomaxillary suture.

Data was analyzed statistically with Student's t-test and Pearson's correlation (PC) coefficients. P values smaller than 0.05 were considered to be statistically significant. Statistica 99 PL Software was used for analysis.

The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Pomeranian Medical University.

Results

We found that the axial length (PC = 0.509, $p < 0.005$, Fig. 1A) and equatorial diameter (PC = 0.557, $p < 0.001$, Fig. 1B) of the eyeball increase with age.

As a result of ageing, the depth (PC = 0.458, $p < 0.001$, Fig. 2A) and width (PC = 0.536, $p < 0.001$, Fig. 2B) of the orbit increase.

The axial length of the eye and the orbital depth increase in parallel (PC = 0.805, $p < 0.001$, Fig. 3A). The equatorial diameter of the eyeball increased concurrently with orbital width (PC = 0.864, $p < 0.001$, Fig. 3B).

Discussion

The results indicate that the axial length and equatorial diameter of the eye as well as the depth and width of the orbit increase with age. The increase in axial length of the eyeball is associated with increase in the orbital depth, while the increase in equatorial diameter of the eye is associated with the increase in orbital width.

It is widely accepted that the normal shape and size of the orbit result from a balance between a number of genetic and epigenetic factors which may function on a systemic, regional or local scale. The development of the orbital cavity is related to the development of the nasal cavity, paranasal sinuses, temporal fossa and cranial cavity. However, growth of the eyeball in relation to the orbit is not fully understood. Moreover, the role of the nerves, vessels, fat and glands taking part in the orbital development has not been decisively established [2, 5, 19].

In postnatal experiments conducted on animals (frogs, newts, chicks, rabbits, cats, dogs, pigs, sheep, and primates) it was observed that evisceration, enucleation or exentera-

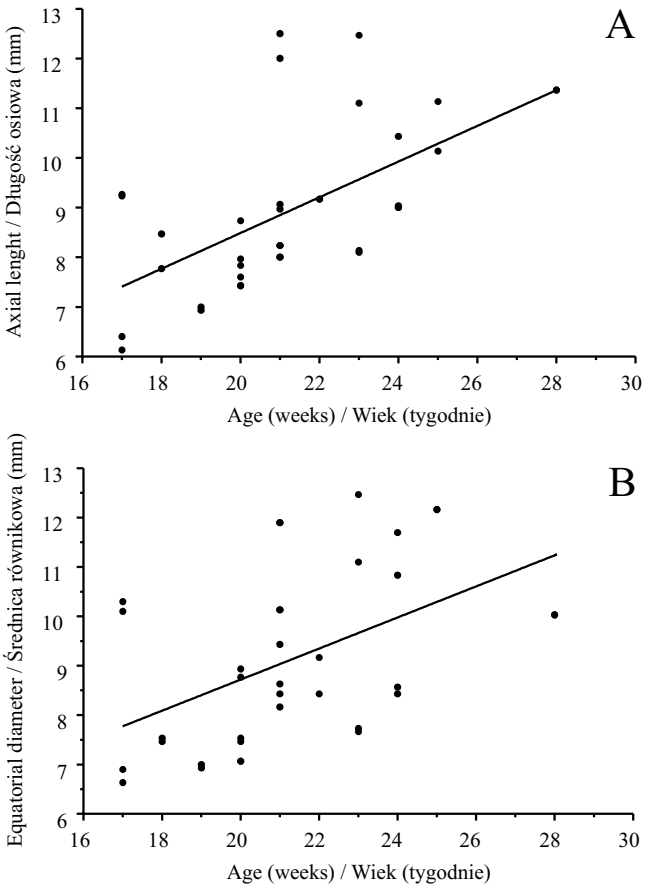


Fig. 1. Changes in axial length (A) and equatorial diameter (B) of the eyeball depending on age of the fetus

Ryc. 1. Zachowanie się długości osiowej (A) i średnicy równikowej gałki ocznej (B) w zależności od wieku płodu

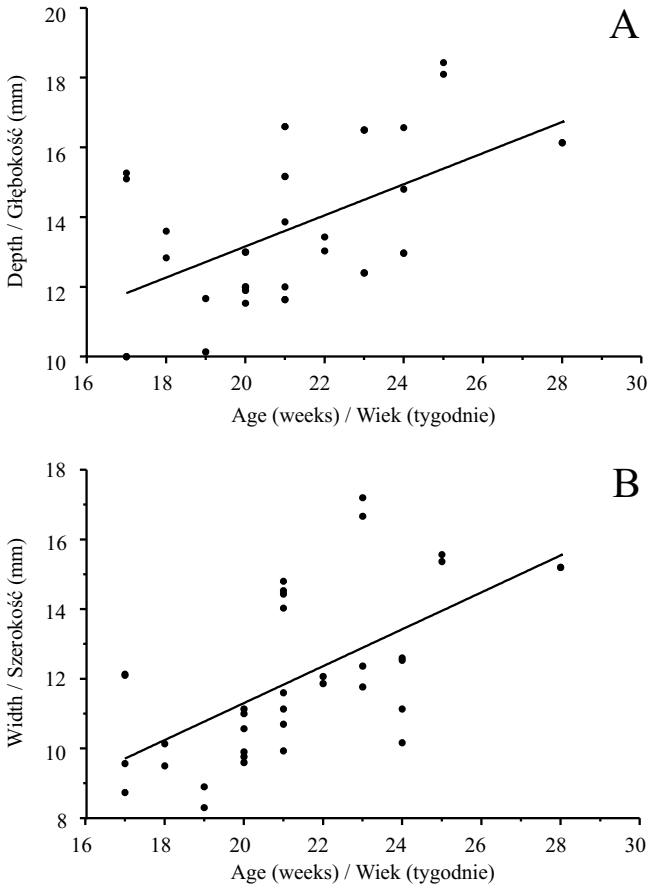


Fig. 2. Changes in the depth (A) and width (B) of the orbit depending on age of the fetus

Ryc. 2. Zachowanie się głębokości (A) i szerokości (B) oczodołu w zależności od wieku płodu

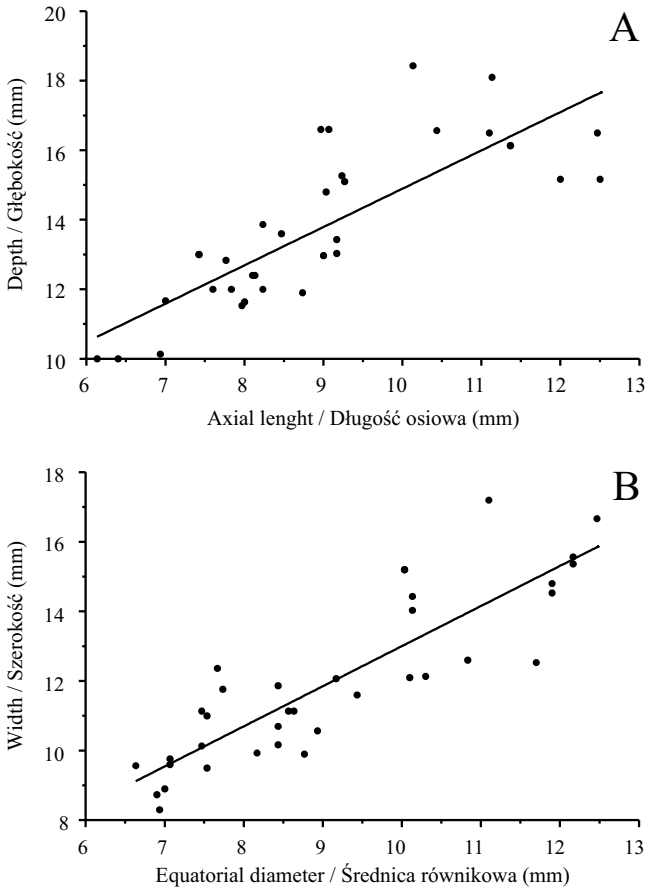


Fig. 3. Changes in the depth of the orbit depending on the axial length of the eyeball (A) as well as changes in the width of the orbit depending on the equatorial diameter of the eyeball (B)

Ryc. 3. Zachowanie się głębokości oczodołu w zależności od długości osiowej gałki ocznej (A) oraz zachowanie się szerokości oczodołu w zależności od średnicy równikowej gałki ocznej (B)

tion of the orbit leads to a reduction and shallowness of the orbit [1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 19]. On the other hand, enlargement of the eye causes an increase in the dimensions and volume of the orbit [2, 6, 7, 8, 9, 10].

It was observed in unilaterally microphthalmic chick embryos that the calvaria, facial skeleton, and orbit on the side of the operation are small. It thus appears that the eyeball as well as other structures play an important role in controlling the growth of the orbit [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20].

In clinical observations performed on humans it was observed that anophthalmia and microphthalmia are associated with smaller orbits and lessened growth of the orbit, depending on the age when the problem arose. It was described that enucleation of one eye before the age of five years could lead to a persisting deficiency of bone growth in the orbital margin by as much as 15 percent on the enucleated side as compared with the other side. Enucleation at 9 years of age and after did not lead to appreciable alteration. It was also observed that removal of orbital contents by the age of two does not result in deceleration of orbital growth [2, 3, 4, 5, 7, 9, 19].

These findings prove that the eyeball as well as the orbital elements play an important role in orbital development. Our present study has shown a simultaneous increase in dimensions of the eye and orbit occurs during fetal life in humans.

References

1. *Apt L., Isenberg S.*: Changes in orbital dimensions following enucleation. Arch. Ophthalmol. 1973, 90, 393.
2. *Hoyte D. A. N.*: Growth of the orbit. In: Fundamentals of craniofacial growth. Eds. A. D. Dixon, D. A. N. Hoyte, O. Rőnning. CRC Press, New York 1997, p. 225–255.
3. *Kennedy R. E.*: The effect of early enucleation on the orbit in animals and humans. Am. J. Ophthalmol. 1965, 60, 277.
4. *Kennedy R. E.*: The effect of early enucleation on the orbit in animals and humans. Trans. Am. Ophth. Soc. 1964, 62, 459.
5. *Lloyd G. A. S.*: Radiology of the orbit. W. B. Saunders, London 1975.
6. *Lo A. K. M. et al.*: The role of tissue expanders in an anophthalmic animal model. Plast. Reconstr. Surg. 1990, 86, 399.
7. *Sarnat B. G.*: Eye and orbital size in the young and adult. Some postnatal experimental and clinical relationships. Ophthalmologica, 1982, 185, 74.
8. *Sarnat B. G.*: The orbit and eye: experiments on volume in young and adult rabbits. Acta Ophthalmol. 1981, Suppl. 147, 1.
9. *Sarnat B. G.*: Experimental and clinical postnatal craniofacial skeletal changes. Surg. Gyn. Obst. 1979, 148, 659.
10. *Sarnat B. G., Shanedling P. D.*: Increased orbital volume after periodic intrabulbar injection of silicone in growing rabbits. Am. J. Anat. 1974, 140, 523.

11. *Sarnat B. G., Shanedling P. D.*: Orbital growth after evisceration or enucleation without and with implants. Acta Anat. 1972, 82, 497.
12. *Sarnat B. G., Shanedling P. D.*: Orbital volume following evisceration, enucleation and exenteration in rabbits. Am. J. Ophthalmol. 1970, 70, 787.
13. *Sarnat B. G., Shanedling P. D.*: Postnatal growth of the orbit and upper face in rabbits after exenteration of the orbit. Arch. Ophth. 1965, 73, 829.
14. *Tonneyck-Müller I.*: Das Wachstum von Augen und Augenhöhlen beim Hühnerembryo. VI. Die Entwicklung der Augen und Schädelanlage bei Embryonen von 7–10 Tagen mit künstlich erzeugter einseitiger Mikrophthalmie. Acta Morphol. Neerl-Scand. 1971/72, 9, 235.
15. *Tonneyck-Müller I.*: Das Wachstum von Augen und Augenhöhlen beim Hühnerembryo. V. Die Entwicklung der Augen und Schädelanlage bei Embryonen mit künstlich erzeugter einseitiger Mikrophthalmie von 3–6 Tagen. Acta Morphol. Neerl-Scand. 1971, 9, 57.
16. *Tonneyck-Müller I.*: Das Wachstum von Augen und Augenhöhlen beim Hühnerembryo. IV. Die Wachstum des Schädels bei Embryonen von 11–19 Tagen mit künstlich erzeugter einseitiger Mikrophthalmie. Acta Morphol. Neerl-Scand. 1970/71, 8, 303.
17. *Tonneyck-Müller I., Van Limborgh J.*: Das Wachstum von Augen und Augenhöhlen beim Hühnerembryo. III. Die quantitativen Verhältnisse der Augenhöhlen und des Kreuzschnabels bei Embryonen von 11–19 Tagen mit künstlich erzeugter einseitiger Mikrophthalmie. Acta Morphol. Neerl-Scand. 1970/71, 8, 293.
18. *Tonneyck-Müller I., Van Limborgh J.*: Das Wachstum von Augen und Augenhöhlen beim Hühnerembryo. II. Die Grössenverhältnisse der Augen und Augenhöhlen bei Embryonen von 11–19 Tagen mit künstlich erzeugter einseitiger Mikrophthalmie. Acta Morphol. Neerl-Scand. 1970/71, 8, 211.
19. *Van Limborgh J.*: Factors controlling skeletal morphogenesis. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Eds. A. D. Dixon, B. G. Sarnat. Alan R. Liss, New York 1982, p. 1–17.
20. *Van Limborgh J., Tonneyck-Müller I.*: Orbital growth pattern in experimental microphthalmia. Mod. Probl. Ophthal. 1975, 14, 1.
21. *Bożiłow W., Sawicki K.*: Investigative methods of studying variable human anatomical traits during prenatal and perinatal development (in Polish). Akad. Med., Wrocław 1980.
22. *Bożiłow W., Sawicki K.*: Methodics of anthropometric investiganions on fetuses (in Polish). Mat. Prac. Antrop. 1972, 83, 185.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 41–47
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 41–47
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

IWONA KRAWCZYK-SULISZ

RADIOIZOTOPOWA OCENA WENTYLACJI I PERFUZJI PO PÓŹNEJ DEKORTYKACJI PŁUCA Z POWODU PRZEWLEKŁEGO ROPNIAKA*

SCINTIGRAPHIC ASSESSMENT OF VENTILATION AND PERFUSION AFTER LATE DECORTICATION OF THE LUNG DUE TO CHRONIC EMPYEMA*

Katedra Pneumonologii Pomorskiej Akademii Medycznej
ul. Sokołowskiego 11, 70-981 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Andrzej M. Sedlaczek*

Summary

Purpose: The purpose of this work was to assess ventilation and perfusion and to determine the ventilation/perfusion ratio in patients managed with decortication due to chronic pleural empyema.

Material and methods: The study group comprised 28 patients, including 22 with left-side and 6 with right-side decortication. The period from onset of disease to surgery ranged from 23 to 290 days. Postoperative follow-up ranged from 9 to 183 months. All patients underwent basic laboratory tests, spirometric measurements, gasometry of arterialised blood at rest and a chest X-ray examination. Lung ventilation was examined with the isotope method using 99m-Tc (Technetium) labeled albumin microspheres. Lung perfusion was examined using 99m-Tc (Technetium) labeled macroaggregates of human albumin given intravenously. Perfusion and ventilation were assessed and the ratio of ventilation to perfusion on the operated and contralateral sides was calculated. Spirometry values (FVC, FEV1, FEV1%FVC) were within normal.

Results: The results show a reduction in ventilation and perfusion on the decorticated side and compensatory increase on the opposite side. Concurrently, a reduction in the ventilation/perfusion ratio on the operated side was found. Decortication of the chronic pleural empyema is supposed to improve ventilation on the operated side. Functional results of surgery have so far been assessed in the literature basing solely on the spirometric test. The present findings suggest that contrary to expectations after this type of surgery, perfusion and ventilation remain considerably impaired on the operated side.

K e y w o r d s: pleural empyema – scintigraphy – decortication – perfusion – ventilation.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena wentylacji, perfuzji oraz oznaczenie współczynnika wentylacja/perfuzja u chorych leczonych dekortykacją z powodu przewlekłego ropniaka opłucnej.

Materiał i metody: Badaniu poddano 28 chorych. Wentylację płucną badano metodą izotopową, podając inhalacyjnie mikrosfery albumin znakowane 99m-Tc (Technetem). Perfuzję płucną badano, podając dożylnie makroagregaty albuminy ludzkiej znakowane 99m-Tc (Technetem).

Wyniki: Wykazano obniżenie wartości średnich wentylacji i perfuzji ze znaczniejszym upośledzeniem wentylacji po stronie przebytej dekortykacji z równoczesnym kompensacyjnym wzrostem tych wartości po stronie przeciwnej.

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Andrzej M. Sedlaczek*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 83 strony, 22 ryciny, 23 tabele, 80 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Andrzej M. Sedlaczek* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 83 pages, 22 figures, 23 tables, 80 references.

Stwierdzono zmniejszenie średnich wartości współczynnika wentylacja/perfuzja po stronie operowanej.

H a s ł a: ropniak opłucnej – scyntygrafia – dekortykacja – perfuzja – wentylacja.

Wstęp

Przewlekły ropniak opłucnej to nagromadzenie treści ropnej w jamie opłucnej, które prowadzi do uciśnięcia płuca, unieruchamia przeponę, ogranicza wentylację i zmienia warunki hemodynamiczne w jego obszarze [9, 10, 17]. Podstawowym sposobem leczenia chirurgicznego przewlekłego ropniaka bez ognisk chorobowych w miąższu płucnym i bez przetoki jest dekortykacja płuca polegająca na usunięciu worka ropniaka bez resekcji tkanki płucnej [1, 4, 13]. Dekortykacja obok podstawowego celu, jakim jest usunięcie ogniska ropnego, ma za zadanie przywrócenie fizjologicznych warunków czynności oddechowej płuca, a przede wszystkim wentylacji i perfuzji. Zagadnieniem zasługującym na szczególną uwagę są odległe następstwa czynnościowe przebytego ropniaka, będące odzwierciedleniem skuteczności leczenia. Wielu autorów w swoich doniesieniach poruszało ten problem, koncentrując się wokół zaburzeń wydolności wentylacyjnej ocenianej metodami spirometrycznymi [21]. Nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie prac oceniających za pomocą badań radioizotopowych równocześnie perfuzji i wentylacji u chorych po dekortykacji płuca z powodu przewlekłego ropniaka oraz przedstawiających zachowanie się stosunku wentylacji do perfuzji u tych osób.

Wobec powyższego wydaje się być celowym przedstawienie wyników badań czynności oddechowej u chorych po późnej dekortykacji płuca z powodu przewlekłego ropniaka za pomocą radioizotopowej oceny wentylacji i perfuzji płuc oraz oceny współczynnika wentylacja/perfuzja.

Materiał i metody

Badaniu poddano 28 chorych leczonych w okresie od 1980 do 1997 roku późną dekortykacją z powodu przewlekłego ropniaka na Oddziale Torakochirurgicznym Specjalistycznego Szpitala w Szczecinie Zdunowie bez resekcji miąższu płucnego i bez zmian w drugim płucu. Jako kryterium kwalifikujące do badań przyjęto obraz radiologiczny przewlekłego ropniaka, to jest zacienienie całkowite lub częściowe odpowiedniego pola płucnego z przeciągnięciem śródpiersia w stronę chorą, podciągnięciem kopuły przepony po stronie chorej i zwężeniem międzyżebrzy (autoplastyka).

Wśród badanych było 20 mężczyzn i 8 kobiet w wieku od 22 do 63 lat (mediana 43,5; średnia 41,5). Okres od operacji do badania kontrolnego wynosił od 9 do 183 miesięcy (mediana 84; średnia 80). Wykonano w 22 przypadkach dekortykację prawostronną i w 6 po stronie lewej.

Przyczyną przewlekłego ropniaka opłucnej u chorych grupy badanej było zakażenie nieswoiste w 18 przypadkach, gruźlica u 4 osób, zakażenie pourazowego krwiaka opłucnej u 6 osób.

U wszystkich badanych wykonano: szczegółowe badanie przedmiotowe, podstawowe badania pracowniane, badanie gazometryczne krwi arterializowanej w spoczynku, elektrokardiogram, radiogram tylno-przedni klatki piersiowej, radiogram boczny w zależności od strony operowanej. Pomiary spirometryczne oznaczano w Pracowni Badań Czynnościowych Specjalistycznego Szpitala w Szczecinie Zdunowie, wyposażonej w spirometr typu Gould Pulmonet III-35 sprzężony z komputerem, zaprogramowany wg norm Morrisa.

W badaniu metodą scyntygrafii perfuzyjnej podawano dożylnie w pozycji leżącej badanego, na 10 minut przed rejestracją, makroagregaty albuminy ludzkiej znakowane 99m-Tc (Technetem), o aktywności około 120 MBq (megabekereli) na jedno badanie. Rozmieszczenie znacznika rejestrowano gammakamerą MB 9200 (Gamma Muvex, Budapest) w pozycji stojącej w typowych rzutach (przednio-tylnym, tylno-przednim, w obu bocznych oraz obu tylnych skośnych). Wyniki badań analizowano programem komputerowym, wyliczając na podstawie pomiarów gammakamery perfuzję w płucu prawym i lewym oraz krzywe rozkładu aktywności (perfuzji) w obu płucach. Zgodnie z metodą badania, według której wielkość całkowitego przepływu przez oba płuca przyjęto za 1,0, wartości przepływów płucnych przedstawiono w postaci odsetkowej. Za wartości prawidłowe przyjęto 0,50–0,55 całkowitego przepływu dla płuca prawego oraz 0,45–0,50 całkowitego przepływu dla płuca lewego [6]. Wyniki przepływów płucnych badanej grupy porównano z ww. normami.

Badanie scyntygraficzne wentylacji płuc (wentylacja aerozolowa) wykonywano w 48 godzin po badaniu perfuzji z zastosowaniem preparatu SolcoVenticoll – mikrosfery albumin, które znakowano 99m-Tc (Technetem) do aktywności 500 MBq na jedno badanie. Przygotowany odczynnik wprowadzano do specjalistycznego zestawu do badań metodą wentylacji aerozolowej Venticis II i Ventibox. Badany inhalował aerozol z nebulizera poprzez ustnik przy zamkniętych zaciskami nozdrzach, w pozycji siedzącej, przez 10 minut do czasu wyrównania stężenia znacznika w nebulizerze i w powietrzu pęcherzykowym. Bezpośrednio po inhalacji rozpoczynano rejestrację aktywności znacznika w drogach oddechowych.

Rozmieszczenie znacznika rejestrowano gammakamerą MB 9200 (Gamma Muvex, Budapest) w pozycji stojącej w typowych rzutach. Wyniki badań analizowano za pomocą programu komputerowego, wyliczając na podstawie pomiarów gammakamery wentylację w płucu prawym i lewym oraz krzywe rozkładu aktywności (wentylacji) w obu płucach. Zgodnie z założeniem badania, według której wielkość całkowitej wentylacji przez oba płuca przyjęto za 1,0, wartości wentylacji płucnych przedstawiono w postaci odsetkowej. Za wartości prawidłowe przyjęto 0,55 całko-

witej wentylacji dla płuca prawego oraz 0,45 całkowitej wentylacji dla płuca lewego [6, 7]. Wyniki wentylacji płuc badanej grupy porównano z ww. normami.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynnik V/Q (wentylacja/perfuzja) po stronie operowanej i przeciwnej, dzieląc uzyskane wyżej przedstawionymi metodami wartości wentylacji przez wartość perfuzji płuc osobno dla strony operowanej i przeciwnej dla każdego badanego oraz średnie wartości dla całej grupy. Prawidłową wielkość współczynnika wentylacja/perfuzja przyjęto za 0,85 [2]. Wartości współczynnika wentylacja/perfuzja płuc badanej grupy porównano z ww. normami.

W analizie statystycznej zastosowano testy umożliwiające obliczenie poziomu istotności dla różnicy pomiędzy średnią z próby a średnią z populacji oraz poziomu istotności dla różnicy pomiędzy dwiema średnimi z dwóch prób. Obliczenia wykonano w programie Statistica [19]. Wyniki przedstawiono w formie rycin i tabel. Numery porządkowe w tabelach przypisane są zawsze tym samym badanym.

Wyniki

Wyniki badania gazometrycznego krwi arterializowanej wykonane w spoczynku u wszystkich chorych przedstawiały się prawidłowo.

Podstawowe dane spirometryczne: nasiloną pojemność życiową (FVC), nasiloną objętość wydechową pierwszosekundową (FEV1) oraz wskaźnik Tiffeneau (FEV1%FVC) przedstawia tabela 1. Zestawienie wyników odsetkowych wartości perfuzji, wentylacji oraz współczynników wentylacja/perfuzja w obu płucach u chorych po prawostronnej dekortykacji po stronie operowanej i przeciwnej wraz z wartościami średnimi przedstawiono w tabeli 2.

Zestawienie wyników odsetkowych wartości perfuzji, wentylacji oraz współczynników wentylacja/perfuzja w obu płucach u chorych po lewostronnej dekortykacji po stronie operowanej i przeciwnej wraz z wartościami średnimi zamieszczono w tabeli 3.

Wykazano, że w grupie chorych poddanych prawostronnej dekortykacji:

- średnia odsetkowa perfuzja płuca po stronie operowanej obniżyła się poniżej dolnego zakresu normy, różnica ta nie była statystycznie istotna,
- średnia odsetkowa perfuzja przez płuco lewe przeciwne do strony operowanej była wyższa niż górny zakres normy, różnica ta nie była statystycznie istotna,
- średnia odsetkowa wentylacja płuca po stronie operowanej obniżyła się poniżej wartości prawidłowej, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,001$),
- średnia odsetkowa wentylacja przez płuco lewe przeciwne do strony operowanej była wyższa niż wartość prawidłowa, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,001$),
- średnia wartość współczynnika wentylacja/perfuzja płuca po stronie operowanej była poniżej przyjętej wartości prawidłowej, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,05$),
- średnia wartość współczynnika wentylacja/perfuzja przez płuco lewe przeciwne do strony operowanej była powyżej przyjętej wartości prawidłowej, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,001$).

Tabela 1. **Pooperacyjne wyniki badań spirometrycznych grupy badanej w wartościach bezwzględnych (litrach) i procentowych w stosunku do norm wg Morrisa**

Table 1. **Postoperative results of spirometric tests in the study group presented in absolute values (litres) and percent values in relation to Morris' norm**

Nr / No.	FVC(l)	FVC(%)	FEV1(l)	FEV1(%)	FEV1%FVC
1	2,72	65	2,20	71	81
2	2,64	91	1,90	88	72
3	4,94	94	3,89	96	79
4	3,99	74	3,45	81	86
5	3,57	82	2,78	89	78
6	3,85	84	3,29	98	85
7	3,09	76	2,77	84	89
8	4,12	87	3,48	95	84
9	4,18	83	3,54	91	84
10	5,17	92	4,52	101	87
11	3,52	76	2,86	79	81
12	4,20	94	2,90	86	69
13	3,52	73	2,66	74	75
14	4,18	86	3,41	94	87
15	3,57	95	3,19	107	89
16	3,80	95	3,30	103	85
17	3,39	85	3,02	90	107
18	2,95	81	2,75	86	110
19	5,91	110	4,74	108	105
20	3,35	113	3,00	119	104
21	2,20	80	1,63	70	87
22	5,72	104	5,00	118	87
23	3,71	89	3,23	89	103
24	3,69	107	2,89	117	78
25	3,78	90	2,55	81	67
26	4,10	80	2,90	76	71
27	3,72	89	2,93	92	79
28	4,05	95	2,89	91	71
Min	2,20	65	1,63	70	67
Max	5,91	113	5,00	119	110
Med.	3,75	88,0	2,96	90,5	84,5
Mean	3,84	88,2	3,13	91,9	85,0

W grupie chorych poddanych lewostronnej dekortykacji wykazano, że:

- średnia odsetkowa perfuzja płuca po stronie operowanej obniżyła się poniżej wartości prawidłowej, różnica ta nie była statystycznie istotna,
- średnia odsetkowa perfuzja przez płuco prawe przeciwne do strony operowanej była wyższa niż wartość prawidłowa, różnica ta nie była statystycznie istotna,
- średnia odsetkowa wentylacja płuca po stronie operowanej obniżyła się poniżej wartości prawidłowej, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,05$),
- średnia odsetkowa wentylacja przez płuco prawe przeciwne do strony operowanej była wyższa niż wartość prawidłowa, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,05$),

Tabela 2. **Wartości perfuzji i wentylacji płucnej oraz współczynnika wentylacja/perfuzja u chorych po prawostronnej dekortykacji po stronie operowanej i przeciwnej**

Table 2. **Lung perfusion and ventilation and the perfusion/ ventilation ratio in patients with right-side decortication**

Nr / No.	Odsetkowa wartość perfuzji płucnej / The percent value of lung perfusion		Odsetkowa wartość wentylacji płucnej / Percent value of lung ventilation		Wartość współczynnika wentylacja/perfuzja płucna / Lung ventilation/ perfusion ratio	
	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side
1	0,5936	0,4065	0,2847	0,7153	0,47962	1,75966
2	0,4339	0,5661	0,3911	0,609	0,90136	1,07578
3	0,4353	0,5647	0,1803	0,8198	0,41420	1,45174
4	0,4718	0,5282	0,2893	0,7107	0,61318	1,34551
5	0,4754	0,5245	0,2652	0,7348	0,55785	1,40095
6	0,4771	0,5229	0,3695	0,6306	0,77447	1,20597
7	0,4421	0,5579	0,3204	0,6797	0,72472	1,21832
8	0,5363	0,4637	0,3221	0,6778	0,60060	1,46172
9	0,4944	0,5057	0,3126	0,6875	0,63228	1,35950
10	0,5036	0,4965	0,4225	0,5775	0,83896	1,16314
11	0,3393	0,6607	0,5188	0,4811	1,52903	0,72817
12	0,4765	0,5235	0,3857	0,6143	0,80944	1,17345
13	0,4963	0,5037	0,3334	0,6665	0,67177	1,32321
14	0,5891	0,4110	0,4372	0,5628	0,74215	1,36934
15	0,5319	0,4682	0,4477	0,5522	0,84170	1,17941
16	0,5239	0,4761	0,4117	0,5884	0,78584	1,23587
17	0,4283	0,5717	0,2895	0,7106	0,67593	1,24296
18	0,4803	0,5197	0,4136	0,5864	0,86113	1,12834
19	0,4870	0,5130	0,4107	0,5893	0,84333	1,14873
20	0,5445	0,4554	0,4328	0,5672	0,79486	1,24550
21	0,4331	0,5668	0,3747	0,6253	0,86516	1,10321
22	0,5056	0,4944	0,3617	0,6383	0,71539	1,29106
Min	0,3393	0,4065	0,1803	0,4811	0,4142	0,7281
Max	0,5936	0,6607	0,5188	0,8198	1,5290	1,7596
Mean	0,4863	0,5137	0,3625	0,6375	0,7578	1,2551
SD	0,0568	0,0568	0,0758	0,0759	0,2157	0,1928

– średnia wartość współczynnika wentylacja/perfuzja płuca po stronie operowanej była poniżej wartości przyjętej za prawidłową, różnica ta nie była statystycznie istotna,
– średnia wartość współczynnika wentylacja/perfuzja przez płuco prawe przeciwne do strony operowanej była powyżej wartości przyjętej za prawidłową, różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,01$).

Dyskusja

Czynność oddechowa jest wypadkową procesów mechaniki, wentylacji, perfuzji, dystrybucji krwi i gazów oraz dyfuzji. Upośledzenie którejkolwiek ze składowych powoduje zaburzenie całego procesu [18].

Czynność układu oddechowego najdokładniej można ocenić skojarzonymi badaniami izotopowymi [11, 12]. Pozwalają one na ocenę regionalnej wentylacji i perfuzji

Tabela 3. **Wartości perfuzji i wentylacji płucnej oraz współczynnika wentylacja/perfuzja u chorych po lewostronnej dekortykacji po stronie operowanej i przeciwnej**

Table 3. **Lung perfusion and ventilation and the ventilation/ perfusion ratio in patients with right-side decortication**

Nr / No.	Odsetkowa wartość perfuzji płucnej / The percent value of lung perfusion		Odsetkowa wartość wentylacji płucnej / Percent value of lung ventilation		Wartość współczynnika wentylacja/perfuzja płucna / Lung ventilation/perfusion ratio	
	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side	Po stronie operowanej prawej / On the operated right side	Po stronie lewej / On the left side
23	0,4962	0,5039	0,6600	0,3400	1,3301	0,6747
24	0,5154	0,4845	0,5404	0,4596	1,0485	0,9486
25	0,5756	0,4243	0,5584	0,4415	0,9701	1,0405
26	0,6017	0,3983	0,6344	0,3657	1,0543	0,9181
27	0,6715	0,3284	0,8326	0,1674	1,2399	0,5097
28	0,5872	0,4127	0,7085	0,2916	1,2066	0,7066
Min	0,4962	0,3284	0,5404	0,1674	0,9701	0,5097
Max	0,6715	0,5039	0,8326	0,4596	1,3301	1,0405
Mean	0,5746	0,4253	0,6557	0,3443	1,1416	0,7997
SD	0,0631	0,0632	0,1071	0,1070	0,1379	0,2013

oraz określenie wartości współczynnika V/Q (wentylacja/perfuzja), którego znajomość umożliwia znalezienie w obszarze płuca regionów „daremnej wentylacji" lub „daremnej perfuzji" [6, 7].

W powszechnie stosowanych badaniach, jakimi są badania spirometryczne, stwierdzono, że w całej grupie 28 chorych średnie wartości FVC, FEV1, FEV1%FVC mieściły się w przedziale powyżej 70% wartości należnych wg *Morrisa* [8, 14, 16]. Jest to zgodne z doniesieniami większości autorów o prawidłowych wartościach uzyskiwanych w badaniu spirometrycznym u chorych po dekortykacji [15, 21].

W uciśniętym przez worek ropniaka miąższu płucnym występują zarówno zaburzenia wentylacji, jak i perfuzji [4, 17]. Ucisk i częściowa niedodma płuca może prowadzić do zgrubienia błony wewnętrznej naczyń tętniczych płuca i zwiększenia oporów w łożysku naczyń włosowatych płuc [15]. Zaburzenia perfuzji płucnej wtórne do pierwotnych zaburzeń wentylacji są wynikiem fizjologicznego mechanizmu pęcherzykowo-włośniczkowego, zwanego mechanizmem Liliestranda i Eulera, powodującego zmniejszenie ukrwienia czynnościowego w obszarze płucnym o zmniejszonej wentylacji [5, 23].

Dla oceny przepływu płucnego posłużono się w omawianym badaniu metodą radioizotopową. Pozwala ona w sposób mało inwazyjny, prosty i szybki ocenić rozkład radioaktywności w obrębie płuc po podaniu dożylnym izotopu. Scyntygraficzna metoda badania przepływu płucnego podaje jedynie odsetkowe wartości perfuzji w danym płucu. Nie określa wartości bezwzględnych perfuzji płucnej.

Worek ropniaka, uciskając miąższ płucny, ogranicza przepływ w swym sąsiedztwie. Można przypuszczać, że zmieniając w ten sposób dystrybucję krwi w płucu, powo-

duje jednocześnie zmiany wielkości przepływu w pozostających poza uciskiem i zrostami partiach płuca.

Wyniki pomiarów perfuzji w całej grupie, zarówno w płucu po stronie operowanej jak i przeciwnej do operowanej, porównywano z wartościami uznawanymi za prawidłowe. Średnie wartości perfuzji po stronie dekortykacji porównywano z dolną granicą normy, podczas gdy średnie wartości perfuzji po stronie przeciwległej porównywano z górną granicą normy. Sposób ten przyjęto, aby uwiarygodnić wyniki analizy statystycznej, jeśli oczekiwano obniżenia wartości obserwowanych, porównywano je z dolnym zakresem normy. Natomiast przy oczekiwanym wzroście wartości obserwowanych porównywano je statystycznie z górnym zakresem normy. Grupę badaną podzielono na chorych poddanych prawostronnej i lewostronnej dekortykacji. W grupie 22 osób poddanych prawostronnej dekortykacji średni przepływ płucny po stronie operowanej był obniżony w stosunku do dolnej granicy normy (0,50), jednakże różnica ta nie miała cech znamienności statystycznej. Średni przepływ płucny po stronie lewej, przeciwnej do operowanej był natomiast wyższy w tych przypadkach od górnego zakresu normy (0,50), choć i ta różnica nie była statystycznie istotna. Obniżenie przepływu w płucu prawym poniżej dolnego zakresu normy zaobserwowano u 14 osób. W każdym z tych przypadków przepływ przez płuco lewe, przeciwległe do strony operowanej był większy od górnego zakresu normy. W grupie 6 osób poddanych lewostronnej dekortykacji wyżej opisywane zmiany przepływu, polegające na jego obniżeniu po stronie operowanej poniżej dolnej granicy normy (0,45) i jednoczasowym podwyższeniu przepływu po stronie przeciwnej do operowanej powyżej górnego zakresu normy (0,55), obserwowano u 4 osób. Zjawisko obniżenia przepływu płucnego po stronie dekortykacji z jego jednoczesnym, kompensacyjnym wzrostem w płucu przeciwległym wykazano łącznie u 18 osób, co stanowiło 64% wszystkich badanych. Brak znamienności statystycznej wyników może wynikać z niejednorodności grupy badanej. Wśród czynników branych pod uwagę należałoby przede wszystkim wymienić wielkość komory ropniaka, warunkującą stopień zaburzeń przepływu. Pogląd ten ma swoje uzasadnienie w ocenie przedoperacyjnych radiogramów klatki piersiowej u tych chorych.

Dla oceny wentylacji płucnej posłużono się badaniem scyntygraficznym wentylacji płuc, tzw. wentylacją aerozolową. Scyntygraficzna metoda badania wentylacji płuc podaje jedynie odsetkowe wartości wentylacji w danym płucu. Nie określa wartości bezwzględnych wentylacji płucnej.

Worek ropniaka, uciskając miąższ płucny oraz ograniczając ruchomość ściany klatki piersiowej i przepony, ogranicza tak wentylację, jak i przepływ w swoim sąsiedztwie. Można przypuszczać, że zmieniając wentylację w płucu uciśniętym powoduje jednocześnie zmiany w wielkości wentylacji w przeciwległym płucu.

Wyniki pomiarów wentylacji w całej grupie, zarówno w płucu po stronie operowanej jak i przeciwnej do operowanej, porównywano z wartościami uznawanymi za prawidłowe.

W grupie 22 osób poddanych prawostronnej dekortykacji średnia wentylacja płucna po stronie operowanej była obniżona w stosunku do przyjętej wartości prawidłowej (0,55), różnica ta była statystycznie istotna. Średnia wentylacja płucna po stronie lewej, przeciwnej do operowanej była natomiast wyższa w tych przypadkach od wartości prawidłowej i różnica ta również była statystycznie istotna. W grupie 6 osób poddanych lewostronnej dekortykacji stwierdzono także wyżej opisywane zmiany wentylacji, polegające na jego obniżeniu po stronie operowanej poniżej wartości prawidłowej (0,45) i podwyższeniu wentylacji po stronie przeciwnej do operowanej powyżej wartości prawidłowej (0,55). Obie te różnice były statystycznie istotne. Zjawisko obniżenia wentylacji po stronie dekortykacji z jej jednoczesnym, kompensacyjnym wzrostem w płucu przeciwległym wykazano łącznie u 26 osób, co stanowiło 93% wszystkich badanych. Wydaje się iż ubytek wentylacji w stosunku do ubytku perfuzji po stronie operowanej był wyraźniejszy. Utrzymujące się pomimo wykonanej dekortykacji upośledzenie wentylacji może być spowodowane mniejszą ruchomością przepony po stronie operowanej, która prawdopodobnie wynika z jej długotrwałego unieruchomienia przez worek ropniaka z pozostawieniem mimo operacji zrostów w kącie przeponowo-żebrowym i zaniku, a więc i osłabienia mięśnia przepony jako następstwo unieruchomienia.

Do utrzymania prawidłowej wymiany gazowej w płucach potrzebna jest nie tylko dostateczna wentylacja pęcherzykowa, lecz i prawidłowy przepływ płucny. Wentylacja płuc, bez względu na jej wielkość, będzie nieskuteczna w wymianie gazowej, gdy upośledzone jest ukrwienie płuc. Do skutecznego utlenowania krwi pożądane jest utrzymanie prawidłowego stosunku wentylacji do perfuzji. Zachwianie tego stosunku zawsze prowadzi do zaburzeń gazowych. W stanach nieprawidłowych w dużej liczbie pęcherzyków płucnych wentylacja może być zbyt mała w stosunku do przepływu krwi, można wówczas mówić o zmniejszeniu stosunku wentylacji do perfuzji („daremnej perfuzji"). Równocześnie w innych pęcherzykach płucnych wentylacja może być zbyt duża w stosunku do przepływu krwi (zwiększenie stosunku wentylacji do perfuzji, „daremna wentylacja"). Duża liczba pęcherzyków nadmiernie ukrwionych w stosunku do wentylacji i nadmiernie wentylowanych w stosunku do ukrwienia prowadzi do stanu zwanego nierównomiernością wentylacji i płucnego przepływu krwi. W obszarach, w których stosunek V/Q jest zmniejszony, krew opuszczająca włośniczki pęcherzyków płucnych nie ulega dostatecznej arterializacji, tj. w stosunku do krwi tętniczej zawiera za mało tlenu i za dużo dwutlenku węgla. Stan ten powoduje zwiększenie domieszki żylnej do krwi tętniczej, a więc daje efekt jak anatomiczny przeciek krwi z prawa na lewo. Zwiększona liczba pęcherzyków wentylowanych, lecz niedokrwionych

lub w ogóle nie otrzymujących krwi powiększa czynnościową przestrzeń martwą [3, 22].

Na podstawie otrzymanych wartości perfuzji i wentylacji podjęto próbę oceny współczynnika wentylacja/perfuzja. W grupie 22 osób poddanych prawostronnej dekortykacji wartość średnia wskaźnika V/Q po stronie operowanej była obniżona w stosunku do przyjętej wartości prawidłowej, różnica ta była statystycznie istotna. Średnia wartość współczynnika wentylacja/perfuzja płucna po stronie lewej, przeciwnej do operowanej była natomiast wyższa w tych przypadkach od wartości prawidłowej i różnica ta również była statystycznie istotna. W grupie 6 osób poddanych lewostronnej dekortykacji stwierdzono także wyżej opisywane zmiany przepływu, polegające na jego obniżeniu po stronie operowanej poniżej wartości przyjętej za prawidłową, jednak bez istotności statystycznej z podwyższeniem wartości współczynnika wentylacja/perfuzja po stronie przeciwnej do operowanej powyżej wartości prawidłowej. Różnica ta była statystycznie istotna.

Jak wynika z powyższego, u wszystkich badanych stwierdzono zmniejszenie współczynnika wentylacja/perfuzja po stronie operowanej, czyli pomimo obniżonej perfuzji jest ona i tak zbyt duża w stosunku do odpowiadającej jej części płuca o większym jeszcze stopniu obniżonej wentylacji. Wyrazem tego zaburzenia jest kompensacyjna daremna wentylacja po stronie przeciwnej, czego efektem jest zwiększony współczynnik wentylacja/perfuzja po stronie przeciwnej do operowanej. Również i z taką oceną w dostępnej literaturze dotychczas się nie spotkano. Ponieważ badania gazometryczne arterializowanej krwi badanych wykonywano w spoczynku, nie można jednoznacznie wypowiedzieć się, na ile fizjologiczne mechanizmy kompensacyjne są w stanie wyrównać powstałe zaburzenia całkowitej czynności oddechowej płuc. Odpowiedź na tak postawione pytanie mogłyby dać badania maksymalnej zdolności wysiłkowej (test spiroergometryczny przeprowadzony przy użyciu cykloergometru i analizatora gazów wydychanych oraz badanie gazometryczne krwi wykonane w czasie wysiłku).

Zabieg odkorowania płuca, usuwający worek ropniaka, uwalnia ścianę klatki piersiowej oraz zwalnia ze zrostów i zlepów kopułę przepony po stronie ropniaka. Przywraca tym samym warunki dla pełnej jej ruchomości [20].

Operacja dekortykacji późnego ropniaka ma w swoim założeniu poprawiać wentylację po stronie operowanej. Czynnościowe wyniki leczenia operacyjnego oceniano dotychczas w piśmiennictwie jedynie na podstawie badania spirometrycznego. Przedstawione powyżej dane wydają się pozwalać na postawienie wysoce uprawnionej hipotezy, że wbrew oczekiwaniom po tego typu zabiegu utrzymują się nie tylko znacznego stopnia upośledzenie perfuzji po stronie operowanej, ale jeszcze bardziej zaznaczone upośledzenie wentylacji.

Z punktu widzenia teoretycznego opisane zjawiska mogą w odległej przyszłości prowadzić do przeciążenia prawej komory serca.

Wnioski

1. W grupie chorych poddanych dekortykacji z powodu przewlekłego ropniaka opłucnej stwierdza się w ocenie odległej obniżenie wentylacji i w mniejszym stopniu przepływu przez płuco po stronie operowanej z jednoczesnym kompensacyjnym ich wzrostem w płucu przeciwległym. Zmiany te powodują znaczące zmniejszenie wartości współczynnika wentylacja/perfuzja po stronie operowanej.

2. Dla ostatecznego wyjaśnienia wpływu stwierdzanych zaburzeń na zdolność wysiłkową badanego wskazane jest wykonanie badania obciążenia wysiłkiem.

3. Zaburzenia czynnościowe u chorych poddanych późnej dekortykacji z powodu przewlekłego ropniaka wydają się przemawiać za wcześniejszym stawianiem wskazań do bardziej inwazyjnego niż nakłucia leczenia.

Piśmiennictwo

1. *Brabletz A., Lorkiewicz Z.*: Ropniaki opłucnej. Pol. Prz. Chir. 1981, 53, 321–326.
2. *Cotes J.E.*: Czynność płuc. PZWL, Warszawa 1969.
3. *Deloff L.*: Fizjologia układu oddechowego. In: Choroby układu oddechowego. Ed. L. Deloff. PZWL, Warszawa 1977, p. 21–100.
4. *Dowgird A., Zalewski J.*: Wczesna dekortykacja w leczeniu przewlekłego ropniaka opłucnej. Pol. Prz. Chir. 1960, 32, 1187–1192.
5. *Dziedzic M. et al.*: Wyniki badań scyntygraficznych płuc u chorych po leczeniu sączkowaniem ropniaka opłucnej. In: Pamiętnik Jubileuszowego XXV Zjazdu Sekcji Chirurgii Klatki Piersiowej, Serca i Naczyń Towarzystwa Chirurgów Polskich 19–21 września 1994. Torakochirurgia, Rozdz.3, Drukarnia Wojsk., Łódź 1994, p. 65–70.
6. *Dziuk E.*: Radioizotopowe metody badania układu oddechowego. PZWL, Warszawa 1978, p. 9–141.
7. *Dziuk E.*: Układ oddechowy. In: Medycyna nuklearna. Ed. Z. Toth, J. Przedlecki. PZWL, Warszawa 1983, p. 296–323.
8. *Grodzki T.*: Ocena wpływu całkowitego wycięcia opłucnej ściennej na czynność wentylacyjną płuc u chorych leczonych z powodu nawracającej odmy samoistnej. Ann. Acad. Med. Stetin. 1994, 40, 237–246.
9. *Karlinsky J.B., Lau J., Goldstein R.H.*: Decision making in pulmonary medicine. D.W. Publishing Co., Cleveland 1993, p. 72.
10. *Krenke R.*: Fizjologia i patofizjologia opłucnej. In: Choroby opłucnej. Ed. W. Droszcz. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1997, p. 19–28.
11. *Kummer F.*: Nuclear medicine in diseases of the lung-present status and future. Introduction-clinical aspects. Eur. J. Nucl. Med. 1987, 13, 2–5.
12. *Miller R.F., O'Doherty M.J.*: Pulmonary nuclear medicine. Eur. J. Nucl. Med. 1992, 19, 355–368.
13. *Mlekodaj S.*: Częstość występowania ropniaków opłucnej, przyczyny i najskuteczniejsze metody ich leczenia. In: Pamiętnik Jubileuszowego XXV Zjazdu Sekcji Chirurgii Klatki Piersiowej, Serca i Naczyń Towarzystwa Chirurgów Polskich 19–21 września 1994. Torakochirurgia, Rozdz. 3, Drukarnia Wojskowa, Łódź 1994, p. 57–65.
14. *Morris J.F., Koski A., Johnson L.C.*: Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. Am. Rev. Respir. Dis. 1971, 103, 57–67.
15. *Patton W.E., Watson R.T., Gaensler E.A.*: Pulmonary function before and intervals after surgical decortication of the lung. Surg. Gynecol. Obstet. 1952, 95, 477–496.
16. *Rulkowska H., Sedlaczek A.*: Aktualne normy spirograficzne dla młodych mężczyzn w Polsce. Pneumon. Alergoz. Pol. 1992, 3–4, 33–36.

17. *Rzepecki W.*: Chirurgiczne leczenie ropniaków opłucnej. In: Ropne choroby klatki piersiowej i ich chirurgiczne leczenie. Eds. W. Rzepecki, J. Langer. PZWL, Warszawa 1972, p. 189–235.
18. *Sedlaczek A.*: Czy rzeczywiście po późnej operacyjnej rekonstrukcji uszkodzonego oskrzela głównego powraca oddechowa czynność płuca? Pol. Prz. Chir. 1984, 6, 635–640.
19. *Stanisz A.*: Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny. StatSoft Polska, Kraków 1998, 171–176.
20. *Wójcik J. et al.*: Ocena ruchomości przepony u chorych poddanych dekortykacji płuca. In: Streszczenia Jubileuszowego XXV Zjazdu Sekcji Chirurgii Klatki Piersiowej, Serca i Naczyń Towarzystwa Chirurgów Polskich 19–21 września 1994. Łódź 1994, p. 319.
21. *Zalewski J., Karkoszka W., Klepacka A.*: Odległe wyniki badań spirometrycznych i bronchospirometrycznych po odłuszczeniu płuca z powodu ropniaka opłucnej. Pol. Prz. Chir. 1968, 40, 215–218.
22. *Zieliński J.*: Badania wysiłkowe w ocenie czynności płuc. PZWL, Warszawa 1992, p. 13–31.
23. *Zieliński J.*: Przewlekłe serce płucne. Wydaw. Lek. PZWL, Warszawa 1996, p. 15–51.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 49–56
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 49–56
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

MARCIN TUTAK

WYBRANE PARAMETRY ŚLINY MIESZANEJ W ROZPOZNAWANIU WEGETATYWNEJ NEUROPATII CUKRZYCOWEJ*

SOME PROPERTIES OF MIXED SALIVA IN DIABETIC AUTONOMIC NEUROPATHY*

Zakład Protetyki Stomatologicznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. n. med. prof. PAM *Bogumiła Anna Frączak*

Summary

Introduction: The purpose of this work was to determine the influence of diabetic autonomic neuropathy on some basic properties of saliva such as volume of stimulated mixed saliva, concentration and secretion rates of sodium, potassium and calcium ions, and of glucose.

Material and methods: The study was carried out in 55 patients (25 females and 30 males). The study group consisted of 19 patients with type 2 diabetes mellitus and autonomic neuropathy affecting the cardiovascular system – DM-N(+). Two control groups were formed. One of them included 18 diabetic patients without any autonomic neuropathy – DM-N(-), the other (K) comprised 18 patients without diabetes. In the latter group there were nine patients on atropine (K-A) due to bradycardia and nine patients on propranolol (K-P) due to tachycardia. In the latter group, saliva samples were collected before and after administration of atropine or propranolol.

Results: A significantly lower ($p < 0.001$) mean volume of stimulated mixed saliva was found in diabetic patients with autonomic neuropathy (1.91 ± 0.34 mL) and control patients on atropine (K-A) (2.24 ± 0.68 mL) as compared to DM-N(-) (5.37 ± 0.78 mL) and K-P patients (5.51 ± 1.05 mL). The volume of saliva did not correlate with glycosylated haemoglobin in either DM-N(-) or DM-N(+) groups. Secretion of glucose, as well as sodium, potassium and calcium ions to saliva was significantly lower in diabetics with autonomic neuropathy DM-N(+) and in non-diabetics after administration of atropine.

Conclusion: Based on these results it was concluded that secretion of stimulated mixed saliva, glucose, as well as sodium, potassium and calcium ions is significantly reduced in autonomic neuropathy. These findings may be associated with lesions to parasympathetic nerve fibers caused by long-lasting diabetes.

K e y w o r d s: diabetes mellitus – diabetic autonomic neurophaty – saliva.

Streszczenie

Cel: W pracy próbowano ustalić, czy objętość stymulowanej śliny mieszanej, jej skład jonowy i zawartość glukozy mogą pomóc w rozpoznaniu wegetatywnej neuropatii cukrzycowej.

Materiał i metody: W grupie badanej pacjentów z cukrzycą i wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) oraz w grupie kontrolnej pacjentów po zablokowaniu atropiną receptorów muskarynowych (K-A) uzyskano odpowiednio istotnie mniejszą ($p < 0{,}001$) średnią objętość śliny mieszanej stymulowanej ($1{,}91 \pm 0{,}34$ mL; $2{,}24 \pm 0{,}68$ mL)

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Bogumiła Anna Frączak*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 57 stron, 1 rycinę, 12 tabel, 82 pozycje piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Bogumiła Anna Frączak* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 57 pages, 1 figures, 12 tables, 82 references.

w porównaniu z grupami kontrolnymi DM-N(-) (5,37 ± 0,78 mL) i K (5,51 ± 1,05 mL).

Wyniki: Stwierdzono, że objętość wydzielonej śliny nie koreluje z poziomem hemoglobiny glikowanej w grupach DM-N(-) i DM-N(+). Uzyskano ujemną korelację pomiędzy objętością wydzielonej śliny a stężeniem fruktozaminy w grupie pacjentów z cukrzycą i bez wegetatywnej neuropatii cukrzycowej DM-N(-). Stwierdzono także istotnie mniejszą całkowitą oraz minutową sekrecję glukozy, jonów sodu, potasu i wapnia do śliny u pacjentów z cukrzycą i wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+), a także w grupie kontrolnej osób bez cukrzycy po zastosowaniu atropiny w celu zablokowania receptorów muskarynowych (K).

H a s ł a: cukrzyca – wegetatywna neuropatia cukrzycowa – ślina.

Wstęp

Wegetatywna neuropatia cukrzycowa jest zespołem objawów i zaburzeń klinicznych, których przyczyną jest uszkodzenie włókien nerwowych. Dotyczy ona około 40% pacjentów chorych na cukrzycę trwającą dłużej niż 10 lat [1]. Objawy neuropatii uzależnione są od umiejscowienia zmian. Najczęściej jako pierwsze pojawiają się zaburzenia w zakresie odruchów sercowo-naczyniowych [2]. U chorych z neuropatią mogą ponadto występować zaparcia, zaburzenia oddawania moczu, biegunki, obrzęki oraz impotencja. Dodatkowo stwierdza się zaburzenia unerwienia źrenic, regulacji oddychania, termoregulacji, wydzielania potu i śliny [3, 4, 5]. U podłoża choroby leżą zaburzenia metaboliczne, rozwijające się najczęściej na skutek podwyższonego poziomu cukru we krwi. Niedobór insuliny powoduje enzymatyczną redukcję glukozy na szlaku kwasu poliolowego. Hiperglikemia wzmaga także indukcję nieenzymatycznej glikozylacji białek strukturalnych włókien nerwowych, doprowadzając do nadmiernego usztywnienia i utrudnienia transportu aksonalnego. Czynnikiem, który może sprzyjać rozwojowi neuropatii, jest niedokrwienie pojawiające się w wyniku zmian w małych tętnicach i włośniczkach. W badaniu histopatologicznym stwierdza się zmiany zwyrodnieniowe komórek zwojowych oraz włókien przed- i zazwojowych [6, 7, 8, 9, 10].

Aktywność wydzielnicza ślinianek zależy w dużym stopniu od ich unerwienia autonomicznego. Część przywspółczulna działa pobudzająco na wydzielanie wody i składników nieorganicznych, zwiększając tym samym objętość śliny. Część współczulna wzmaga sekrecję białek do śliny. Wydzielina staje się bardziej gęsta i lepka. Oba komponenty układu autonomicznego pobudzają metabolizm ślinianek. Ponadto działają troficznie, warunkując wzrost oraz odpowiadają za utrzymanie prawidłowej struktury i adaptacje ślinianek do zmian dietetycznych [11].

W oparciu o nieliczne doniesienia naukowe stwierdzono, że następstwem długotrwałej cukrzycy może być także trwałe zmniejszenie wydzielania śliny i/lub zmiana jej składu, np. sekrecji glukozy, wynikające z uszkodzenia parasympatycznych i sympatycznych włókien wydzielniczych ślinianek [12, 13, 14].

Obiektywne rozpoznanie neuropatii wymaga skomplikowanych, czasochłonnych badań, opartych na monitorowaniu zmian w układzie krążenia, w różnych modelowych sytuacjach. Złożoność testów klinicznych wyklucza możliwość zastosowania ich jako potencjalnych testów przesiewowych wykrywających neuropatię wegetatywną.

W przedkładanej pracy podjęto próby wstępnego rozpoznania cukrzycowej neuropatii wegetatywnej w oparciu o badania parametrów śliny, takich jak: objętość stymulowanej śliny mieszanej, jej skład jonowy oraz zawartość glukozy.

Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytania: Czy i w jakim stopniu cukrzycowa neuropatia wegetatywna wpływa na ilość wydzielanej śliny? Jak zmienia się jakościowo skład śliny u pacjentów z cukrzycową neuropatią wegetatywną? Czy wybrane parametry śliny mogą pomóc w szybkim rozpoznaniu cukrzycowej neuropatii wegetatywnej?

Materiał i metody

Badania objęły łącznie 55 osób (25 kobiet i 30 mężczyzn). Grupa ta składała się z 37 osób chorych na cukrzycę typu 2 oraz 18 osób bez cukrzycy. W pierwszej fazie badań ocenie poddano funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, unerwianego przez układ wegetatywny, u 37 osob chorych na cukrzycę typu 2. Badanie przeprowadzono na podstawie testów Ewinga.

A. Testy dotyczące układu przywspółczulnego – elektrokardiograficzne:

a) próba Valsalvy – na jej podstawie obliczano współczynnik Valsalvy stanowiący stosunek najdłuższego odstępu R-R do najkrótszego w zapisie EKG, w czasie trwającego 15 s wydechu pod ciśnieniem 40 mmHg; wartość prawidłowa > 1,21;
b) reakcja częstości serca na głębokie oddychanie – w czasie 10 min, głębokiego oddychania z częstością 6 oddechów na min, obliczano różnicę między maksymalną i minimalną częstością skurczów serca (średnia 3 oddechów); wartość prawidłowa > 15/min, wartość nieprawidłowa < 10/min;
c) reakcja częstości serca na pionizację – wyznaczono współczynnikiem 30:15, czyli stosunkiem najdłuższego odstępu R-R (ok. 30 ewolucji) do najkrótszego odstępu R-R (ok. 15 ewolucji, licząc od momentu wstawania); wartość prawidłowa > 1,04; wartość nieprawidłowa < 1,0.

B. Testy dotyczące układu współczulnego – kontrola ciśnienia tętniczego:

a) próba pionizacji – mierzono ciśnienie tętnicze w pozycji leżącej i po pionizacji (2 min). Jako wartości prawidłowe przyjmuje się obniżenie ciśnienia skurczowego < 10 mmHg, wartości nieprawidłowe to obniżenie > 30 mmHg;

b) próba wysiłku statycznego – mierzono ciśnienie tętnicze w trakcie ściskania manometru przez 5 min do 30% ustalonej poprzednio wartości maksymalnej; wartości prawidłowe to wzrost ciśnienia rozkurczowego > 16 mmHg, wzrost nieprawidłowy < 10 mmHg.

W przypadku jeśli chociaż w jednym teście otrzymano wartości nieprawidłowe lub w dwóch graniczne, pacjentów kwalifikowano do grupy chorych na cukrzycę i wegetatywną neuropatią cukrzycową – DM-N(+). Te osoby, u których wszystkie testy wypadły prawidłowo, znalazły się w grupie pacjentów z cukrzycą i bez wegetatywnej neuropatii cukrzycowej – DM-N(-).

Pacjenci

Grupa badana

DM-N(+) – stanowiło ją 19 osób chorych na cukrzycę. Osoby badane były w wieku od 48 do 75 lat (średni wiek 64,26 ± 7,69 lat). Czas trwania cukrzycy wynosił u nich od 12 do 29 lat (średni czas trwania 18,63 ± 5,08 lat). U pacjentów tych potwierdzono testami Ewinga wegetatywną neuropatię cukrzycową układu sercowo-naczyniowego.

Grupy kontrolne

DM-N(-) – 18 osób chorych na cukrzycę bez wegetatywnej neuropatii cukrzycowej, w wieku od 49 do 83 lat (średni wiek 64,89 ± 7,69 lat). Czas trwania cukrzycy wahał się od 4 do 22 lat (średni czas trwania choroby 12,06 ± 4,67 lat).

K – 18 osób bez cukrzycy, w wieku od 54 do 75 lat (średni wiek 64,61 ± 5,9 lat), którym pobrano ślinę do badania, przed zastosowaniem blokady atropinowej i propranololowej. W grupie tej wyodrębniono dwie podgrupy:

K-A – 9 osób bez cukrzycy, którym podano atropinę blokującą układ parasympatyczny (średni wiek 64,44 ± 5,22 lat)

K-P – 9 osób bez cukrzycy, którym podano propranolol blokujący układ sympatyczny (średni wiek 64,78 ± 6,83 lat)

Wszyscy chorzy na cukrzycę insulinoniezależną przyjmowali insulinę od 2 do 4 wstrzyknięć dziennie. W przypadku dwukrotnego podawania leku pacjenci otrzymywali mieszanki Mixtard 30 lub M3, natomiast ci z większą liczbą wstrzyknięć dostawali przed posiłkiem insuliny krótko działające, a na noc insulinę o przedłużonym działaniu.

W grupie kontrolnej K-A badani otrzymali atropinę (1 mg Atropinum sulfuricom, Polfa Warszawa), najczęściej z powodu bradykardii < 50/min, ewentualnie jako środek rozkurczający przy kolkach nerkowych lub żółciowych. Natomiast w grupie K-P zastosowano propranolol (0,1 mg/kg masy ciała – Propranolol, Polfa Warszawa) z powodu tachykardii > 150/min połączonej z nadciśnieniem tętniczym. Leki te były podawane doraźnie tylko w dniu badania. Pacjenci nie przyjmowali w tym czasie żadnych innych medykamentów.

Testy biochemiczne

U każdej z badanych osób przeprowadzono podstawowe badania laboratoryjne krwi żylnej, z uwzględnieniem stężenia glukozy, sodu, potasu i wapnia w osoczu. Zmierzono poziom hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} oraz stężenie fruktozaminy we krwi.

Oceniano objętość śliny mieszanej, wypluwanej przez pacjentów bezpośrednio do probówek w ciągu 5 minut. Wydzielanie stymulowano, polecając pacjentowi wyobrazić sobie krojenie cytryny w plasterki. Pacjenci badani byli w godzinach przedpołudniowych, na godzinę przed posiłkiem. Wydzielanie śliny zbadano także u pacjentów z grupy kontrolnej K przed przyjęciem blokerów układu przywspółczulnego i współczulnego oraz ponownie po 30 min od dożylnego podania odpowiednio: 1 mg atropiny (Atropinum sulfuricum, Polfa Warszawa) lub 0,1 mg/kg m.c. propranololu (Propranolol, Polfa Warszawa). Określano objętość stymulowanej śliny mieszanej (mL) oraz objętość wydzielonej śliny w ciągu 1 minuty (mL/min)

Następnie próbki śliny odwirowano z prędkością 4000 obr/min w celu oddzielenia elementów morfotycznych śliny. Uzyskany przesącz poddano dalszej analizie biochemicznej. Zbadano stężenie glukozy w ślinie (mg/dL), sekrecję glukozy (μg/min), stężenie jonów sodu, potasu, wapnia (mmol/L), sekrecję jonów sodu, potasu, wapnia (μmol/min).

Glikemię we krwi żylnej i stężenie glukozy w ślinie oceniano metodą enzymatyczną – glukozydazową, z wykorzystaniem testów firmy bioMerieux i aparatu Technicon RA 1000. Stężenie fruktozaminy zbadano przy użyciu testu firmy Roche i aparatu Technicon RA 1000. Hemoglobinę glikowaną HbA_{1c} oznaczano metodą chromatografii średniociśnieniowej Pharmacia. Stężenia sodu, potasu i wapnia – metodą absorpcjometrii atomowej, z wykorzystaniem aparatu Philips ASN.

Metody statystyczne

Analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu Excel 97 oraz Statistica 5.1 PL. Rozkłady wszystkich zmiennych we wszystkich grupach nie odbiegały od rozkładu normalnego w teście Shapiro–Wilka, dlatego w dalszej analizie stosowano testy parametryczne. Dla wykazania istotności różnic pomiędzy wartościami parametrów w grupach K, DM-N(-) i DM-N(+) stosowano jednowymiarową ANOVA oraz test post-hoc Tukeya. Istotność zmian objętości, sekrecji glukozy i jonów sodu, wapnia, potasu pod wpływem atropiny i propranololu badano testem t-Studenta dla prób zależnych.

Wyniki

W grupie chorych na cukrzycę z współistniejącą wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) średnia objętość wydzielonej śliny uzyskanej w badaniu wynosiła 1,91 ± 0,34 mL i była istotnie mniejsza ($p < 0,001$) od objętości śliny uzyskanej u badanych z cukrzycą bez neuropatii DM-N(-), czyli 5,37 ± 0,78 mL oraz osób z grupy kontrolnej K bez cukrzycy – 5,51 ± 1,05 mL (tab. 1).

Tabela 1. **Objętość wydzielonej śliny w badanych grupach**

Table 1. **Volume of secreted saliva in the groups**

Parametry / Parameters	Grupa K / Group K		Grupa DM-N(-) / Group DM-N(-)		Grupa DM-N(+) / Group DM-N(+)	
	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD
Objętość / Volume (mL)	5,51	1,05	5,37	0,78	1,91†††***	0,34
Sekrecja objętości / Secretion (mL/min)	1,10	0,21	1,07	0,16	0,38†††***	0,07

Istotna różnica w stosunku do grupy DM-N(-) (***p < 0,001) / Significant difference as compared with DM-N(-) (***p < 0.001)
Istotna różnica w stosunku do grupy K (†††p < 0,001) / Significant difference as compared with K (†††p < 0.001)

Poziom kontroli metabolicznej, określony na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} we krwi, był istotnie niższy u pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) i wynosił 8,81 ± 0,83 % w porównaniu z pacjentami z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-) 8,19 ± 0,88% (p < 0,05), (tab. 2).

Tabela 2. **Stężenie fruktozaminy i HbA_{1c} (%) w badanych grupach**

Table 2. **Fructosamine and HbA_{1c} (%) concentrations in the groups**

Parametry / Parameters	Grupa K / Group K		Grupa DM-N(-) / Group DM-N(-)		Grupa DM-N(+) / Group DM-N(+)	
	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD
Fruktozamina / Fructosamine (mM)	-	-	3,32	0,39	3,55	0,46
HbA1c (%)	-	-	8,19	0,88	8,81*	0,83

Istotna różnica w stosunku do grupy DM-N(-) (***p < 0,001) / Significant difference as compared with DM-N(-) (***p < 0.001)

Objętość wydzielonej śliny, w zależności od parametrów wyrównania cukrzycy, nie wykazała istotnych korelacji z poziomem hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} ani w grupie pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) [r = -0,20, p < 0,42], ani w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii DM-N(-) [r = -0,29, p < 0,24]. Stwierdzono natomiast istotną ujemną korelację pomiędzy objętością wydzielonej śliny, a stężeniem fruktozaminy w grupie pacjentów z cukrzycą i bez wegetatywnej neuropatii cukrzycowej DM-N(-) [r = -0,51, p < 0,032]. Nie stwierdzono jej w grupie DM-N(+) [r = -0,018, p < 0,95].

Zbadano stężenia glukozy we krwi i w ślinie. Zarówno u pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+), jak i z cukrzycą bez neuropatii DM-N(-), stężenie glukozy we krwi było istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną pacjentów bez cukrzycy. Natomiast najmniejszą sekrecję glukozy do śliny w ciągu minuty stwierdzono w grupie pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) (tab. 3).

Stężenie sodu i potasu w ślinie w badanych grupach było porównywalne. Stężenie jonów wapnia w ślinie u pacjentów z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-) oraz w grupie z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) było statystycznie istotnie większe w porównaniu

Tabela 3. **Stężenie glukozy i sekrecja minutowa glukozy do śliny w badanych grupach**

Table 3. **Glucose concentrations and rates of glucose secretion to saliva in the groups**

Parametry / Parameters	Grupa K / Group K		Grupa DM-N(-) / Group DM-N(-)		Grupa DM-N(+) / Group DM-N(+)	
Glukoza / Glucose	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD
Osocze / Plasma (mg/dL)	88,00	10,22	180,89†††	39,31	171,26†††	35,6
Ślina / Saliva (mg/dL)	7,29	1,08	9,26††	2,36	8,56	1,3
Sekrecja / Secretion (μg/min)	78,31	14,73	100,48††	32,14	32,92†††***	8,1

Istotna różnica w stosunku do grupy K (††p < 0,01, †††p < 0,001) / Significant difference as compared with K (††p < 0.01, †††p < 0.001)
Istotna różnica w stosunku do grupy DM-N(-) (***p < 0,001) / Significant difference as compared with DM-N(-) (***p < 0.001)

z grupą kontrolną. Sekrecja minutowa jonów sodu, potasu i wapnia w grupie pacjentów z cukrzycą i wegetatywną neurapatią cukrzycową DM-N(+) była istotnie mniejsza (p < 0,001) w porównaniu z grupami kontrolnymi DM-N(-) i K (tab. 4)

Tabela 4. **Stężenie i sekrecja jonów sodu, potasu i wapnia w ślinie i w osoczu w badanych grupach**

Table 4. **Salivary and serum concentrations and secretions rates of sodium, potassium and calcium ions to saliva in the groups**

Parametry / Parameters		Grupa K / Group K		Grupa DM-N(-) / Group DM-N(-)		Grupa DM-N(+) / Group DM-N(+)	
		średnia / mean	SD	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD
Osocze / Plasma (mmml/L)	Na+	139,61	3,05	140,61	3,09	140,37	3,09
	K+	4,62	0,52	4,74	0,51	4,67	0,56
	Ca++	2,42	0,16	2,46	0,17	2,45	0,15
Ślina / Saliva (mmol/L)	Na+	154,72	6,95	149,61	7,13	153,0	8,58
	K+	20,02	3,34	18,12	2,62	18,83	2,91
	Ca++	2,46	0,20	2,77†††	0,20	2,86†††***	0,18
Ślina / Saliva (μmol/min)	Na+	170,17	31,55	160,72	24,41	58,39†††***	10,40
	K+	22,35	6,83	19,27	2,77	7,20†††***	1,63
	Ca++	2,73	0,63	2,97	0,44	1,09†††***	0,19

Istotna różnica w stosunku do grupy K (†††p < 0,001) / Significant difference as compared with K (†††p < 0.001)
Istotna różnica w stosunku do grupy DM-N(-) (***p < 0,001) / Significant difference as compared with DM-N(-) (***p < 0.001)

U osób z grupy K-A, w której zablokowano atropiną receptory muskarynowe, uzyskano istotnie mniejsze wydzielanie śliny (2,24 ± 0,68 mL) oraz sekrecję minutową glukozy, jonów sodu, potasu i wapnia po podaniu atropiny w porównaniu ze stanem przed podaniem brokera.

Natomiast w grupie K-P, w której zablokowano propranololem receptory β, nie stwierdzono różnic w objętości, stężeniu i sekrecji glukozy, sodu oraz potasu przed i po zastosowaniu blokera.

Porównując grupę pacjentów z cukrzycą i wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) z grupą kontrolną K-A po podaniu atropiny, stwierdzono, że obniżona w obu

grupach objętość śliny nie różniła się istotnie między sobą. Objętość wydzielonej śliny w ciągu minuty również była porównywalna. Pozostałe parametry dotyczące stężenia glukozy, sekrecji minutowej glukozy, stężenia wapnia, sodu i potasu oraz sekrecji minutowej tych jonów także były porównywalne (tab. 5).

Tabela 5. **Porównanie badanych parametrów śliny w grupie kontrolnej K-A po podaniu atropiny i w grupie pacjentów z cukrzycą i wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+)**

Table 5. **Comparison of properties of saliva in the K-A group after administration of atropine and in diabetics with autonomic neuropathy DM-N(+)**

Parametry / Parameters	Grupa K-A Po podaniu atropiny / Group K-A After the administration of atropine		Grupa DM-N(+) / Group DM-N(+)	
	średnia / mean	SD	średnia / mean	SD
Objętość / Volume (mL)	2,24	0,08	1,91	0,34
Skrecja objętości / Secretion (mL/min)	0,45	0,14	0,38	0,07
Glukoza / Glucose (mg/dL)	7,99	1,00	8,56	1,30
Sekrecja glukozy / Glucose Secretion (µg/min)	36,12	12,79	32,92	8,10
Sód / Sodium (mmol/L)	141,10	7,74	153,00	8,58
Sekrecja sodu / Sodium Secretion (µmol/min)	62,85	17,54	58,39	10,40
Potas / Potasium (mmol/L)	20,79	2,72	18,83	2,91
Sekrecja potasu / Potasium Secretion (µmol/min)	9,35	3,13	7,20	1,63
Wapń / Calcium (mmol/L)	2,43	0,13	2,86	0,80
Sekrecja wapnia / Calcium Secretion (µmol/min)	1,10	0,36	1,09	0,19

Dyskusja

Długo trwająca cukrzyca doprowadza do zmian degeneracyjnych włókien nerwowych układu wegetatywnego, mającego wpływ na wydzielanie śliny. W przeprowadzonych badaniach próbowano określić wpływ cukrzycy oraz neuropatii cukrzycowej na funkcjonowanie gruczołów ślinowych, objętość i skład śliny.

W badanej grupie pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) uzyskano przeciętnie w ciągu minuty 0,38 ± 0,07 mL/min śliny mieszanej stymulowanej. Wartość ta była istotnie mniejsza ($p < 0,001$) od średniej objętości śliny, otrzymanej w grupie pacjentów z cukrzycą i bez wegetatywnej neuropatii cukrzycowej DM-N(-) – 1,07 ± 0,16 mL oraz od osób z grupy kontrolnej K bez cukrzycy (1,1 ± 0,21 mL). Wynik zgodny z przedstawionymi powyżej uzyskał *Newrick* po zbadaniu 8 pacjentów z neuropatią cukrzycową. Stwierdził, że wydzielanie śliny stymulowanej ze ślinianki przyusznej jest istotnie mniejsze u pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową, w porównaniu z pacjentami z cukrzycą i bez neuropatii oraz z grupą kontrolną. Według niego, spadek wydzielania śliny jest dowodem na rozległe odnerwienie parasympatyczne ślinianek [14].

Potencjalny wpływ neuropatii cukrzycowej wegetatywnej na wydzielanie śliny badała *Ben-Aryeh* [15]. W przedstawionych wynikach nie stwierdziła statystycznie istotnych różnic w wydzielaniu śliny spoczynkowej i stymulowanej ze ślinianki podżuchwowej w grupie pacjentów z neuropatią cukrzycową, w porównaniu z pacjentami z cukrzycą i bez neuropatii. Podobne wyniki uzyskał *Marchettii*, badając objętość wydzielonej śliny spoczynkowej mieszanej w ciągu 2 minut w grupie pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową [13]. Badania *Ben-Aryeh* dotyczyły funkcjonowania tylko pojedynczych par ślinianek, co może w jakimś stopniu wpływać na uzyskiwane wyniki. Ponadto ślinianki podżuchwowe według niektórych autorów znajdują się pod większym wpływem układu współczulnego, którego stymulacja prowadzi do wydzielania śliny, ale o mniejszej objętości i większej zawartości glikoprotein. Z kolei badania *Marchettiego* dotyczyły zbyt krótkiego czasu gromadzenia śliny.

Większość danych dotyczących wydzielania śliny nie rozgranicza cukrzycy i występującej w jej przebiegu neuropatii cukrzycowej. W badaniach przeprowadzonych przez *Meurmana*, badano wydzielanie śliny w grupie pacjentów z cukrzycą insulinozależną, trwającą dłużej niż 10 lat. Wydzielanie spoczynkowe i stymulowane było takie samo, jak w grupie kontrolnej. W badanej grupie wegetatywną neuropatię cukrzycową potwierdzono tylko u 15% pacjentów [16]. Podobne wyniki uzyskali *Chavez*, *Cherry-Peppers*, *Dodds*, *Lamey* oraz *Streckfus*, badając pacjentów z długo trwającą cukrzycą [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. W badaniach własnych autora niniejszej pracy objętość śliny uzyskanej w ciągu minuty u pacjentów z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-) nie różniła się od objętości uzyskanej u osób bez cukrzycy z grupy kontrolnej K.

Wpływ kontroli metabolicznej na wydzielanie śliny podkreślany jest przez wielu autorów. W badaniach przeprowadzonych przez *Meurmana* u pacjentów, u których poziom hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} był niższy od przeciętnej 8,6% uzyskanej w grupie badanej, spoczynkowe i stymulowane wydzielanie śliny było większe niż u pacjentów, u których poziom HbA_{1c} był wyższy od wartości przeciętnej [16]. W przypadku wyrównania cukrzycy, wyrażającego się niskim poziomem HbA_{1c} 7,22 ± 2,7%, nie stwierdzono różnic w wydzielaniu śliny pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na cukrzycę. Według *Chaveza*, pacjenci z niewyrównaną cukrzycą insulinoniezależną oraz ze stężeniem hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} powyżej 9% uzyskali mniej śliny stymulowanej ze ślinianki przyusznej niż pacjenci z dobrze kontrolowaną cukrzycą i osoby zdrowe z grupy kontrolnej

W badaniach *Marchettiego*, w grupie chorych z wegetatywną neuropatią cukrzycową, poziom kontroli metabolicznej był gorszy i wynosił przeciętnie 9,9 ± 0,7% w porównaniu z pacjentami z cukrzycą i bez neuropatii 7,4 ± 0,4%. Wydzielanie śliny było porównywalne u osób z grupy kontrolnej 18 ± 2 mL/h i pacjentów z cukrzycą 16 ± 1,9 mL/h oraz nieznacznie niższe u pacjentów

z neuropatią cukrzycową 13 ± 2 mL/h. Różnice te jednak nie były statystycznie istotne i nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem hemoglobiny glikowanej a objętością wydzielonej śliny [13].

W badaniach własnych również nie wykazano istotnych zależności pomiędzy objętością wydzielonej śliny w grupie pacjentów z wegetatywną neuropatią cukrzycową DM-N(+) a poziomem wyrównania cukrzycy, określonej hemoglobiną glikowaną [HbA_{1c}]. Nie stwierdzono ich także w grupie pacjentów z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-). Istotnie ujemną korelację stwierdzono jedynie pomiędzy objętością wydzielanej śliny a stężeniem fruktozaminy w grupie pacjentów z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-) ($r = -0,51$, $p < 0,032$).

Większość obserwacji wskazuje, że ślina pacjentów chorych na cukrzycę cechuje się większą zawartością glukozy w porównaniu ze śliną ludzi zdrowych [24, 25]. W warunkach fizjologicznych stężenie glukozy wynosi przeciętnie 0,016 mM/L (0,3 mg/dL). Wartość ta jest zmienna i uzależniona od spożywanych posiłków. Mimo licznych prób ustalenia korelacji między stężeniem glukozy w osoczu i w ślinie nie stwierdzono takich zależności. Według *Shoen* i *Sudhofa*, na stężenie glukozy we krwi wpływa stan psychiczny badanego, rodzaj odżywiania, szybkość wchłaniania doustnie podanych węglowodanów oraz czynność układu wegetatywnego. W efekcie pojawiają się duże wahania w wydzielaniu glukozy ze śliną, jednak pozostające bez powiązania z wartościami stężenia glukozy w osoczu [14, 25].

W badaniach własnych istotnie większą zawartość glukozy odnotowano w ślinie pacjentów chorych na cukrzycę bez neuropatii DM-N(-) w porównaniu z osobami bez cukrzycy z grupy kontrolnej K oraz chorymi na cukrzycę i wegetatywną neuropatię DM-N(+). Podwyższone stężenie glukozy w osoczu nie zwiększyło istotnie stężenia glukozy w ślinie u osób z cukrzycą i neuropatią DM-N(+). Mimo dwukrotnie większego stężenia glukozy w osoczu u chorych na cukrzycę z i bez neuropatii w porównaniu z osobami bez cukrzycy stężenie glukozy w ślinie było porównywalne tylko w grupie chorych na cukrzycę i wegetatywną neuropatię cukrzycową oraz w grupie kontrolnej.

Marchetti nie stwierdził istotnych różnic w stężeniu glukozy w ślinie pacjentów z cukrzycą i neuropatią (330 ± 50 μmol/L), cukrzycą bez neuropatii (500 ± 40 μmol/L) oraz pacjentów bez cukrzycy (500 ± 50 μmol/L). Jednak gdy powyższe wyniki zestawił pod względem szybkości wydzielania, stwierdził, że u chorych z cukrzycą i neuropatią sekrecja glukozy była istotnie mniejsza (4,2 ± 1,0 μmol/h) niż w grupie z cukrzycą bez neuropatii (8,0 ± 0,9 μmol/h) oraz w grupie kontrolnej (9,0 ± 1,0 μmol/h) [14]. Według *Marchettiego*, ilość glukozy wydzielanej do śliny w danym czasie jest znacznie niższa u chorych na cukrzycę i neuropatię z powodu (chociaż nieistotnej statystycznie) redukcji szybkości wydzielania śliny (mL/h) i stężenia glukozy ślinowej (μmol/L) w porównaniu z pacjentami chorymi na cukrzycę bez neuropatii i osobami zdrowymi. Stopień kontroli metabolicznej wg niego nie ma wpływu na wydzielanie glukozy przez ślinianki [13]. *Canepari* w badaniach śliny, uzyskanej od dzieci chorych na cukrzycę insulinozależną w zależności od stopnia wyrównania cukrzycy, nie odnotował różnic w stężeniu glukozy w obu porównywanych grupach [26].

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują na istotnie mniejszą sekrecję glukozy do śliny w grupie chorych na cukrzycę i neuropatię DM-N(+) w porównaniu z pozostałymi badanymi grupami. Zjawiska tego nie zaobserwowano w grupie pacjentów z cukrzycą bez neuropatii DM-N(-) oraz w grupie kontrolnej. Zmniejszenie sekrecji glukozy w grupie chorych na cukrzycę i wegetatywną neuropatię cukrzycową może wynikać z uszkodzenia włókien układu wegetatywnego**.**

W porównywanych grupach zbadano zmiany składu chemicznego śliny. Stężenia jonów sodu i potasu były porównywalne i nie różniły się istotnie. Jest to zgodne z wynikami przedstawionymi w badaniach innych autorów [27, 28, 29]. W niektórych publikacjach stwierdzono podwyższone stężenie jonów potasu oraz jonów sodu w ślinie pacjentów z cukrzycą insulinozależną. Według autorów tych publikacji, różnice w stężeniu mogą wynikać zarówno z hiperaldosteronizmu, jak i z uszkodzenia pompy Na^+-K^+-ATPazy, odpowiedzialnej za transport potasu w gruczołach ślinowych [30, 31].

Istotne różnice uzyskano w stężeniu wapnia w ślinie u pacjentów z DM-N(-) 2,77 ± 0,2 mmol/L i DM-N(+) 2,86 ± 0,18 mmol/L w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie stężenie Ca^{2+} wynosiło 2,46 ± 0,2 mmol/L przy poziomie istotności $p < 0,001$. Analogiczny wzrost stężenia jonów wapnia stwierdzili *Streckfus* oraz *Pawlicki* u pacjentów z cukrzycą insulinozależną w porównaniu ze zdrowymi [23, 33]. Stężenie jonów wapnia w ślinie spoczynkowej wynosi średnio 1,5 mmol/L a więc jest niższe niż w surowicy. Przy wzmożonym wydzielaniu śliny stężenie wapnia maleje zazwyczaj poniżej 1 mmol/L. Badanie stężeń elektrolitów w ślinie wydaje się być mało przydatne, ponieważ jej skład chemiczny jest uzależniony od szybkości wydzielania i objętości wydzieliny. W wydzielaniu spoczynkowym stężenie jonów sodu nie różni się od stężenia w surowicy, natomiast po pobudzeniu maleje o 53% [33]. Mimo że ilość wydzielonych jonów sodu zwiększa się w czasie stymulacji na skutek szybszego wypływu śliny i w efekcie krótszego kontaktu wydzieliny z komórkami przewodów wyprowadzających, stężenie spada. Jest to wynikiem zwiększonego wydzielania wody w czasie stymulacji. Stężenie jonów potasu w wydzielaniu podstawowym jest pięciokrotnie większe w ślinie niż w osoczu, po stymulacji wydzielania zawartość ta maleje o 29%. W trakcie przesuwania wydzieliny przez układ cewek i przewodów wyprowadzających dochodzi do wymiany sodu na potas i zmniejszenia zawartości sodu w ślinie ostatecznej. Zwrotne wchłanianie sodu może być niemal całkowite przy zwolnionym przepływie. W miarę wzrostu szybkości przepływu resorpcja zwrotna maleje, a wydzielanie jonów sodu wzrasta.

Korzystniejsze wydaje się być badanie całkowitej sekrecji jonów lub w jednostce czasu. W badaniach własnych sekrecja jonów sodu, potasu i wapnia do śliny w ciągu minuty była w grupie pacjentów z neuropatią cukrzycową DM-N(+) statystycznie istotnie mniejsza ($p < 0,001$) w porównaniu z grupą kontrolną K oraz grupą pacjentów z cukrzycą i bez neuropatii DM-N(-). Efektem zmniejszonego wydzielania u pacjentów z DM-N(+) jest mniejsza sekrecja jonów sodu, potasu, wapnia, mimo porównywalnego z pozostałymi grupami ich stężenia.

Zastosowanie leków blokujących prawidłowo funkcjonujący układ autonomiczny powinno wywoływać zmiany w składzie i objętości wydzielanej śliny. U osób z grupy kontrolnej K-A, którym podano atropinę, objętość śliny wydzielonej w ciągu minuty istotnie zmalała z $1,08 \pm 0,21$ mL/min do $0,45 \pm 0,14$ mL/min po podaniu blokera ($p < 0,001$). Nie stwierdzono takiej różnicy w wydzielaniu śliny w grupie kontrolnej K-P przed i po zastosowaniu propranololu – β-blokera. Wynika z tego, że na objętość wydzielanej u ludzi śliny większy wpływ może mieć układ przywspółczulny niż układ współczulny.

Według badań *Meurmana*, spoczynkowe i stymulowane wydzielanie śliny u pacjentów z cukrzycą, przyjmujących leki z grupy antagonistów receptorów β, nie różniło się istotnie od objętości wydzielonej śliny u chorych na cukrzycę i nie przyjmujących β-blokerów [30].

Zarówno objętość, jak i skład wydzielonej śliny zależy od wielu czynników. Jednak w badaniach porównawczych u chorych na cukrzycę, powikłaną wegetatywną neuropatią cukrzycową można stwierdzić znaczący spadek wydzielania śliny mieszanej stymulowanej. Proste i powtarzalne badanie, dotyczące objętości, umożliwia szybką, wstępną diagnostykę bez konieczności przeprowadzania testów, potwierdzających występowanie neuropatii wegetatywnej części układu nerwowego. Dodatkowe badania dotyczące biochemicznego składu śliny ujawniają zmniejszenie sekrecji glukozy i jonów Na^+, K^+, Ca^{2+} w porównaniu z chorymi na cukrzycę bez neuropatii cukrzycowej. Wykorzystanie powyższych wyników badań mogłoby być pomocne w opracowaniu prostego testu diagnostycznego pozwalającego określić, czy pacjent z cukrzycą dotknięty jest wegetatywną neuropatią cukrzycową.

Wnioski

1. W cukrzycowej neuropatii wegetatywnej, podobnie jak po podaniu atropiny, dochodzi do znaczącego zmniejszenia wydzielania śliny mieszanej stymulowanej, co świadczyłoby o uszkodzeniu układu parasympatycznego.

2. Uszkodzenia układu parasympatycznego w przebiegu neuropatii cukrzycowej prowadzą nie tylko do zmniejszenia wydzielania śliny, lecz również do zmniejszenia sekrecji glukozy, jonów potasu, sodu i wapnia wraz ze śliną.

3. Stwierdzenie zmniejszenia sekrecji śliny, jak również sekrecji glukozy, jonów sodu, potasu i wapnia pozwala na wstępne rozpoznanie cukrzycowej neuropatii wegetatywnej.

Piśmiennictwo

1. *Skommer K.*: Neuropatia układu autonomicznego u chorych na cukrzycę. Nowiny Lek. 1996, 65, 4, 464–468.
2. *Florys B. et al.*: Subkliniczna neuropatia wegetatywna układu krążenia u dzieci i młodzieży chorych na cukrzycę insulinozależną. Endokrynol. Diabetol. Chor. Przemiany Materii Wieku Rozw. 1996, 2, 1, 34–38.
3. *Grzelec H.*: W sprawie patogenezy i leczenia neuropatii cukrzycowej. Neurol. Neuroch. Pol. 1991, 25, 4, 477–480.
4. *Sieradzki J. et al.*: Przewlekłe powikłania cukrzycy. Fund. Rozw. Diagn. Labor. Kraków 1995.
5. *Tatoń J. et al.*: Powikłania cukrzycy. PZWL, Warszawa 1995.
6. *Anderson L., Garrett J.*: The effects of streptozocin-induced diabetes on norepinephrine and cholinergic enzyme activities in rat parotid and submandibular glands. Archs. Oral. Biol. 1994, 39, 2, 91–97.
7. *Kostera-Puszczyk A.*: Neuropatia cukrzycowa u dzieci. Neur. Dziec. 1995, 4 8 31–33.
8. *Lung M.*: Autonomic nervous control of venous pressure and secretion in submandibular gland of anesthetized dogs. Am. J. Physiol. 1998, 38, G331–341.
9. *Murrah V.*: Diabetes mellitus and associated oral manifestation: a review. J. Oral. Pathol. 1985, 14, 271–281.
10. *Pierzchała K.*: Przewlekłe swoiste powikłania w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym u chorych na cukrzycę. ŚAM, Katowice 1995.
11. Majewska A. et al.: Heksozy śliny po doustnym obciążeniu glukozą. Czas. Stom. 1980, 6, 499–503.
12. *Anderson L., Bevan C.*: Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. Archs. Oral. Biol. 1992, 37, 5, 331–336.
13. *Marchetti P. et al.*: Decreased salivary glucose sacretory rate: usefulness for detection of diabetic patients with autonomic neuropathy. Diab. Res. Clin. Pract. 1989, 7, 181–187.
14. *Newrick P. et al.*: Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. J. Diabet. Comlications, 1991, 5, 1, 35–60.
15. *Ben-Aryeh H. et al.*: Autonomic neuropathy and salivary composition in diabetic patients. J. Diab. Compl. 1996, 10, 226–227.
16. *Meurman J. et al.*: Saliva in non-insulin-dependent diabetic and control subjects. The role of the autonomic nervous system. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 1998, 86, 69–76.
17. *Cherry-Peppers G. et al.*: Salivary Gland Function and Glucose Metabolic Status. J. Gerontol. 1992, 47, 4, 130–134.
18. *Ben-Aryeh H. et al.*: Oral health and salivary composition in diabetic patients. J. Diab. Comp. 1993, 7, 57–59.
19. *Ben-Aryeh H.et al.*: Salivary compositon in diabetic patients. J. Diab. Compl. 1988, 2, 96–99.
20. *Chavez E. et al.*: Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2000, 89, 305–311.
21. *Dodds M., Yeh C., Johnson D.*: Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. Community. Dent. Oral Epidemiol. 2000, 28, 373–381.
22. *Lamey P., Fisher B., Frier B.*: The effects of diabetes and autonomic neuropathy on salivary flow in man. Diabet. Med. 1986, 3, 537–540.
23. *Streckfus C. et al.*: Parotid function and composition of parotid saliva among elderly edentulous African-American diabetics. J. Oral Pathol. Med. 1994, 23, 277–281.

24. *Derwazeh A. et al.*: Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. J. Oral Pathol. Med. 1991, 20, 6, 280–283.
25. *Twetman S. et al.*: Two-year longitudinal observations of salivary status and dental caries in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Pediatr. Dent. 1992, 14, 3, 184–188.
26. *Canepari P., Zerman N., Cavalleri G.*: Lack correlation between salivary Streptococcus mutans and lactobacilli counts and caries in IDDM children. Mienerva – Stomatol. 1994, 43, 11, 501–505.
27. *Anderson L., Garrett J., Proctor G.*: Effects of streptozocin-induced diabetes on sympathetic and parasympathetic stimulation of parotid salivary gland function in rats. Diabetes, 1989, 38, 1381–1389.
28. *Anderson L. et al.*: In vivo secretory responses of submandibular glands in streptozocin-diabetic rats to sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. Cell. Tissue Res. 1993, 274, 559–566.
29. *Murai S. et al.*: Effects of short-term (2 weeks) streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine and noradrenaline in the salivary glands and secretory responses to cholinergic and adrenergic sialogogues in mice. Archs. Oral Biol. 1996, 41, 673–677.
30. *Yavuzyilmaz E. et al.*: The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. Aust. Dent. J. 1996, 41, 3, 19–37.
31. *Meyer P., Werner E.*: Sialochemische Untersuchungen an den isolierten Sekreten der grossen Kopfspeicheldrusen. Laryngo-Rhino-Otol. 1994, 73, 9, 472–478.
32. *Pawlicki R., Knychalska-Karwan Z.*: Twarde tkanki zębów w obrazie morfologicznym i mikroanalitycznym u chorych na cukrzycę. Czas. Stom. 1996, 6, 395–399.
33. *Willershausen-Zonnchen B., Lemmen C., Hamm G.*: Beziehung zwischen Speichelkomponenten und Paradontosis bei insulinabhängigen Diabetikern. Dtsch. Zahnarztl. 1991, 46, 4, 281–284.
34. *Religa H., Klucznik R.*: Stężenie sodu, potasu, mocznika, kwasu moczowego i aktywność alfa amylazy w ślinie mieszanej u osób zdrowych. Prz. Lek. 1984, 7, 483–489.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 57–63
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 57–63
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

MONIKA GÓRA

BADANIE SKUTECZNOŚCI WSZCZEPÓW HYDROKSYAPATYTOWYCH W LECZENIU ZNISZCZEŃ WYROSTKA ZĘBODOŁOWEGO W OBRĘBIE ZĘBÓW LECZONYCH METODĄ HEMISEKCJI*

USEFULNESS OF HYDROXYAPATITE IMPLANTS FOR THE MANAGEMENT OF ALVEOLAR BONE LESIONS AT TOOTH HEMISECTION SITES*

Zakład Stomatologii Zachowawczej Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. n. med. *Jadwiga Buczkowska-Radlińska*

Summary

Introduction: Hemisection is a surgical method for treating lesions of two- and multi-rooted teeth. This procedure includes amputation of one or two lesioned roots together with the attached dental crown, leaving an endodontically treated root and the remaining dental crown prepared for future prosthetic restoration. The results of this study demonstrate that HA Biocer implants create optimal conditions for new bone growth.

Material and methods: The study was done in 51 patients after hemisection treated with HA Biocer in the form of granules implanted into the alveolus. The control group consisted of 45 patients without an alloplastic implant. The following indices were assessed: radiological index of alveolar bone atrophy in the maxilla and mandible according to Engelberger, Marthaler and Rateischak [EMR]; gingival pocket depth with WHO 621 probe; tooth mobility index according to Entin; root denudation index according to Cieszyński; bacterial plaque index (Pl.I.) according to Silness and Löe.

Measurements were done before hemisection and were repeated after 1.5, 6, 12, 24, 36, 48, and 60 months thereafter.

It was found that hydroxyapatite implants improved the condition of the hemisected tooth and arrested the destruction process in the alveolar bone.

Results: 1. In the study group (HA Biocer), no bone atrophy was noted in the root region after hemisection, whereas bone loss in the control group reached 11%.

2. The depth of gingival pockets in the study group was half of the depth in the control group.

3. Significant tooth stabilization was achieved in the study group, mainly during the first two years after implantation. Improved tooth stability was noted three times less often in the control group during the same period.

4. Root denudation diminished in patients treated with HA Biocer and increased or remained unchanged in controls.

5. A steady decrease in mean Pl.l. index values was observed in both groups over the five-year follow-up period. However, the mean PI.I. value in the study group was one--third of the value in the control group.

K e y w o r d s: hydroxyapatite – implant – hemisection.

Streszczenie

Wstęp: W niniejszej pracy przeprowadzono długoterminowe badania leczenia ubytków kostnych powstałych w wyniku zabiegów operacyjnych.

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Stomatologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: prof. dr hab. n. med. *Wiesława Szajewska-Jarzynka*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 77 stron, 118 rycin, 24 tabele, 113 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Dentistry, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Wiesława Szajewska-Jarzynka* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 77 pages, 118 figures, 24 tables, 113 references.

Materiał i metody: W tym celu wykonano zabieg hemisekcji u 96 pacjentów (37 mężczyzn i 59 kobiet), którzy zostali zakwalifikowani z powodu nieprawidłowo przeleczonych endodontycznie zębów, rozległych zmian wywołanych chorobą próchnicową w okolicy furkacji czy też zaników kostnych przyzębia. U 51 osób do leczenia ubytków kostnych zastosowano hydroksyapatyt HA Biocer w granulkach. U pozostałych 45 osób leczenie odbywało się siłami natury. Sam zabieg hemisekcji polega na podzieleniu korony zęba na dwie części – bliższą i dalszą – wraz z odseparowaniem korzeni i usunięciu korzenia objętego zmianami patologicznymi a pozostawieniu korzenia wyleczonego endodontycznie. Po 6 tygodniach leczenia wszystkim pacjentom wykonano uzupełnienie protetyczne.

Badania kontrolne polegały na ocenie następujących wskaźników:

- radiologiczny wskaźnik pomiaru zaniku wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy według Engelbergera, Marthalera i Rateischaka (EMR),
- pomiar głębokości kieszonek przyzębowych,
- wskaźnik ruchomości zębów według Entina,
- wskaźnik obnażenia korzenia według Cieszyńskiego,
- wskaźnik płytki bakteryjnej Pl.I. według Silnessa i Löego.

Pacjentów poinformowano o konieczności przestrzegania prawidłowej higieny jamy ustnej. Badania te przeprowadzone były w następujących okresach kontrolnych: po 6 tygodniach, po 6, 12, 24, 36, 48 oraz po 60 miesiącach po wykonaniu zabiegu.

Wyniki: W okresie 5 lat kontroli obserwowano konsekwentne zmniejszanie się średnich wartości wskaźnika Pl.I. zarówno w grupie, jak i w grupie II. Jednakże w grupie, w której stosowano HA Biocer, wskaźnik Pl.I. osiągnął dużo niższą wartość w krótszym czasie niż w grupie, w której nie stosowano hydroksyapatytu.

W grupie I, w której zastosowano HA Biocer, nie doszło do procesów zaniku tkanki kostnej w okolicy korzeni zębów po hemisekcji. W grupie tej zaobserwowano prawie dwukrotne spłycenie kieszonek dziąsłowych. W pierwszych 2 latach badań uzyskano znaczną poprawę stabilizacji zębów, która utrzymała się do końca obserwacji. W pierwszym roku obserwacji zanotowano również zmniejszenie stopnia obnażenia korzeni.

U pacjentów grupy II, u których nie stosowano do gojenia HA Biocer, wskaźnik EMR wykazał ubytek kości na poziomie 11%. Zaobserwowano także dwukrotne pogłębienie się kieszonek dziąsłowych, zaś poprawę stabilizacji zębów w ciągu całego okresu badań stwierdzono u trzykrotnie mniejszej liczby pacjentów. Wykazano też zwiększenie stopnia obnażenia korzeni, w niektórych przypadkach wskaźnik obnażenia korzenia pozostał na niezmienionym poziomie.

Wnioski: Wykazano, że zabieg hemisekcji jest terapią skuteczną i może być alternatywą dla usunięcia zęba. Ząb po hemisekcji może być filarem dla uzupełnienia protetycznego, dając możliwość wykonania stosownego uzupełnienia protetycznego. Zastosowanie terapii skojarzonej (zabieg hemisekcji oraz wszczepienie hydroksyapatytu) przyniosło znacznie lepsze wyniki w postaci poprawy badanych parametrów.

H a s ł a: hydroksyapatyt – wszczep – hemisekcja.

Wstęp

Postęp wiedzy medycznej i rozwój techniki konstrukcyjnej różnorodnego asortymentu biomateriałów stwarzają możliwości przeprowadzenia wielu zabiegów stomatologicznych z ich zastosowaniem. Mimo stałego rozwoju metod i środków w zakresie endodoncji, pozostaje wciąż jeszcze pewien obszar zmian chorobowych nie poddających się leczeniu zachowawczemu, nawet przy zastosowaniu najnowszych technik. Wówczas mogą przyjść z pomocą sposoby leczenia chirurgicznego takie, jak: hemisekcja, premolaryzacja, amputacja czy też resekcja korzenia zęba [1, 8, 9, 23, 36]. Do zabiegów chirurgicznych tego typu kwalifikuje się zęby, których korzenie uprzednio zostały z powodzeniem wyleczone endodontycznie. Jednakże metody te wiążą się z dużą utratą tkanek w operacyjnych okolicach i ograniczoną możliwością samoistnego uzupełnienia zniszczeń, ze względu na specyficzną strukturę kości wyrostków zębodołowych [2, 8, 9, 41].

Tak więc stałym problemem badań nad zdolnościami regeneracyjnymi tkanki kostnej, zwłaszcza w obrębie wyrostka zębodołowego, jest poszukiwanie odpowiedniego materiału biologicznego, za pośrednictwem którego można by przywrócić nie tylko prawidłową lub optymalną budowę utraconej kości, ale również optymalne funkcjonowanie nowo utworzonej tkanki.

Materiałem wspomagającym leczenie zachowawcze, chirurgiczne i protetyczne w prowadzonym badaniu był hydroksyapatyt HA Biocer. Hydroksyapatytowy materiał implantacyjny zastosowany w niniejszych badaniach został wyprodukowany pod kierunkiem dr hab. *A. Ślósarczyka* w AGH w Krakowie. Został wprowadzony do stosowania w implantologii w 1994 roku na podstawie zgody Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej. Materiał ten zakwalifikowano do Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych pod nazwą HA Biocer. Hydroksyapatyt określany jest skrótowo HAp, HAP lub HA, a ostatnio często OHAp [31, 47, 48, 49]. W badaniach klinicznych potwierdzono fakt, że porowate granulki HAp wykazywały wysokie powinowactwo do komórek linii osteoblastycznej [45, 48]. Osteoblasty wysiane na porowatym tworzywie hydroksyapatytowym hodowano przez 4–28 dni. Osteoblasty łączyły się z powierzchnią tworzywa i przylegały do niej. W badaniu skaningowym mikroskopem elektronowym stwierdzono, że osteoblasty zakotwiczały się do tworzywa, proliferowały, uwydatniały skrajnie płaskie konfiguracje oraz kolonizowały się na powierzchni tworzywa. Początkowo wzory kolonizacji

przypominały plaster miodu, gdyż sąsiadujące komórki rozgałęziały się i łączyły między sobą. Następnie rozpościerały się na całej powierzchni HAp, pokrywając ją w całości. Po 28 dniach osteoblasty przylegały do tworzywa i wnikały do jego porów, wypełniając je. Przez większość badaczy tworzywo HAp uważane jest za materiał zdolny do wywoływania osteogenezy [16, 19, 43]. Fenomenem ceramiki HAp jest powierzchnia stwarzająca optymalne warunki do tworzenia bezpośrednio na niej nowej kości. Są to tzw. właściwości osteoindukcyjne [38]. Ilość nowo tworzącej się kości zależy od wielkości makroporów tworzywa, przy czym za minimalny rozmiar porów umożliwiających osadzanie się w ich wnętrzu osteocytów uważa się 100 μm. Za optymalną średnią wielkość porów w tworzywie HAp uważa się 200 μm, co odpowiada średnicy osteonów kości ludzkiej. Po upływie 3–4 miesięcy od chwili implantacji kość wytworzona na powierzchni granicznej jest nie do odróżnienia od dojrzałej kości. Czas potrzebny na całkowite i trwałe połączenia implantu hydroksyapatytowego z kością zależy od jego wielkości i wynosi od 6 do 12 miesięcy. Uważa się, że w ciągu 6 miesięcy porowate implanty hydroksyapatytu wypełniają się kością w 80%. Po zakończeniu procesu gojenia i reparacji nie jest możliwe oddzielenie materiału implantacyjnego od kości ze względu na silne połączenie. Za mechanizm łączenia się ceramiki HAp z kością odpowiedzialne są procesy biologiczne i fizykochemiczne. Ta osteointegracja polega na bezpośrednim funkcjonalnym i strukturalnym przyleganiu wszczepu HAp do powierzchni kości [39, 44]. Główną właściwością tworzywa HAp jest działanie osteotropowe powodujące zapoczątkowanie i stymulowanie procesów odbudowy kostnej. Struktura porowata HAp powoduje, że implanty ulegają przerastaniu przez kość, a następnie dochodzi do remodelowania i przebudowy kostnej. Według badaczy tego problemu [45, 52] porowaty HAp wpływa na intensywny wzrost kości do porów i zapewnia biologiczną stabilność rekonstruowanych tkanek. Przy czym podnoszone są tu właściwości osteokondukcyjne tworzywa hydroksyapatytowego, który nie wzbudzając tworzenia kości w tradycyjnym sensie wykazuje własności „kierujące wzrostem kości". Określane jest to mianem działania osteokondukcyjnego i osteofilnego. Tworzywo HAp imitując mikrostrukturę utwardzonej kości, dostarcza rusztowania, które ułatwia wrastanie kości [3, 4, 17, 18].

Hydroksyapatyt HA Biocer jest od ponad 10 lat efektywnie stosowany w stomatologii w celu wypełniania i odtwarzania ubytków tkanki kostnej [50, 51, 53]. Najważniejsze działanie preparatu to regeneracja ubytków tkanki kostnej wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy u pacjentów ze schorzeniami przyzębia, wypełnianie ubytków kostnych powstałych po ekstrakcji, hemisekcji, resekcji wierzchołków korzeni zębów, dla podtrzymania wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego. Jednym z ważniejszych zagadnień związanych z wytwarzaniem i zastosowaniem materiałów implantacyjnych w medycynie jest ich czystość chemiczna, pożądany skład fazowy oraz odpowiednia mikrostruktura. Czynniki te wpływają znacząco na zachowanie się wykonanych z tych tworzyw implantów w kontakcie z żywymi tkankami, a zwłaszcza na ich resorbowalność, biodegradację, cytotoksyczność czy nawet na kancerogenność [47]. Materiały implantowane do kości wyrostka zębodołowego, które mają bezpośredni kontakt z płynami ustrojowymi oraz tkanką kostną, zwane są biomateriałami. Najważniejszą cechą biomateriału jest jego biozgodność – czyli mechaniczna i czynnościowa integracja z tkankami gospodarza, która zachodzi na drodze reakcji chemicznych i biologicznych. Reakcje te dotyczą zarówno powierzchni wszczepu, jak i tkanek otaczających go, tj. kości i dziąsła [38]. Hemisekcja dotyczy zębów trzonowych i polega na podzieleniu korony na dwie części (bliższą i dalszą) wraz z odseparowaniem korzeni, z czego połowa zęba (część korony i korzeń) zostaje usunięta. Jednakże metody te wiążą się z dużą utratą tkanek w operacyjnych okolicach i z ograniczoną możliwością samoistnego uzupełnienia ubytków, ze względu na specyficzną budowę kości wyrostków zębodołowych [2, 8, 9, 41].

Celem niniejszej pracy było określenie skutecznej alternatywy dla ekstrakcji zębów poprzez próbę leczenia trudnych przypadków, włączając do postępowania endodontycznego metody chirurgiczne oraz biomateriał HA Biocer. Z badań klinicznych osób z chorobami przyzębia wierzchołkowego i brzeżnego wynika, iż w licznych przypadkach nie ma możliwości przeprowadzenia prawidłowego i skutecznego leczenia endodontycznego gwarantującego wyleczenie choroby. Powodem takiego stanu rzeczy są najczęściej nieoperacyjne kanały korzeni bliższych zębów trzonowych dolnych lub kanały korzeni policzkowych trzonowców górnych, a także rozległe zmiany patologiczne w zakresie wierzchołków korzeni i ich furkacji. Jest to w dalszym ciągu najczęstsza przyczyna skłaniająca lekarza do podjęcia decyzji o usunięciu zęba.

W trakcie przytoczonych poniżej badań spodziewano się uzyskać następujące informacje:

- w jakim stopniu zabieg hemisekcji pozwoli na zachowanie leczonego zęba?
- czy uzupełnienie zabiegu hemisekcji wszczepieniem HA Biocer poprawi stan zachowanego zęba?
- czy i w jakim stopniu wszczepienie hydroksyapatytu wpłynie na odbudowę kości w obrębie ubytków kostnych szczęki i żuchwy po zabiegu hemisekcji?

Materiał i metody

W zabiegach hemisekcji uczestniczyło 96 pacjentów (65 kobiet i 31 mężczyzn) w wieku od 13 do 65 lat, wybranych spośród osób zgłaszających się do leczenia w Przyszpitalnej Poradni Stomatologicznej Państwowego Szpitala Klinicznego nr 2 w Szczecinie w okresie od czerwca 1992 roku do czerwca 1997 roku. U wszystkich pacjentów wykonano zabieg hemisekcji z powodu rozpo-

znania u nich rozległych zmian morfologicznych w wyniku przewlekłych zapaleń w obrębie przyzębia wierzchołkowego i brzeżnego, perforacji korony, próchnicy korzenia zęba oraz złamania korony lub korzenia zęba. Po zabiegu hemisekcji pacjenci zostali podzieleni na 2 grupy. W grupie I (51 osób, w tym 28 mężczyzn oraz 23 kobiety) po zabiegu zastosowano hydroksyapatyt HA Biocer w celu przyspieszenia i polepszenia warunków gojenia tkanek. W grupie II (45 osób, 36 kobiet i 9 mężczyzn) leczenie odbywało się bez stosowania wymienionego preparatu.

We wszystkich przypadkach przed zabiegiem hemisekcji wykonano zdjęcie rentgenowskie, przeprowadzono leczenie zachowawczo-endodontyczne tej części zęba, która miała być pozostawiona w zębodole oraz poinstruowano pacjentów odnośnie utrzymania prawidłowej higieny jamy ustnej.

Zabieg hemisekcji [1, 7, 10, 15, 22, 25, 30, 32, 40, 46] wykonywano po 2 tygodniach od leczenia endodontycznego w znieczuleniu miejscowym nasiękowym lub przewodowym, stosując w tym celu środek znieczulający odpowiedni do stanu ogólnego pacjenta. Pole operacyjne przygotowywano, dezynfekując tkanki miękkie. Po odwarstwieniu płata błony śluzowej wykonywano przecięcie korony leczonego zęba w żuchwie w linii strzałkowej, w szczęce w linii policzkowo-podniebiennej w celu usunięcia odpowiedniego korzenia [7, 8, 11, 13].

W 51 przypadkach do zębodołów wprowadzano wcześniej przygotowane i odmierzone (100–200 mg) granulki hydroksyapatytu. Hydroksyapatyt był wysterylizowany w temperaturze 180°C (1 godz.) i rozprowadzony w 0,9% roztworze NaCl, a następnie zaaplikowany łyżeczką chirurgiczną w taki sposób, aby granulki preparatu były ufiksowane w bezpośrednim kontakcie z tkanką kostną do poziomu wysokości ścian kostnych zębodołu. Zębodoły zaszywano lub zaopatrywano opatrunkiem chirurgicznym Peripack lub Septopack na 5–7 dni. W pozostałych 45 przypadkach nie stosowano hydroksyapatytu, a gojenie ran odbywało się siłami natury.

Po 6 tygodniach przystąpiono do opracowywania tkanek zęba, do uzupełnienia protetycznego w postaci wkładów koronowo-korzeniowych, koron, mostów i uzupełnień ruchomych. Łącznie wykonano 15 wkładów koronowo-korzeniowych, 22 korony protetyczne, 74 uzupełnienia w postaci mostów i 4 szynoprotezy. Badania kontrolne zaplanowano i przeprowadzono po 6 tygodniach, 6 miesiącach oraz po 1 roku, 2, 3, 4 i 5 latach od zabiegu.

W celu kontroli wyników badań zastosowano następujące kryteria ocen:

1. Wskaźnik płytki bakteryjnej Pl.I. wg Silnessa i Löego.
2. Pomiar głębokości kieszonek przyzębowych.
3. Wskaźnik ruchomości zęba wg Entina.
4. Radiologiczny wskaźnik pomiaru zaniku wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy wg Engelbergera, Marthalera, Rateitschaka (EMR).
5. Wskaźnik obnażenia korzeni wg Cieszyńskiego.

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wszystkie obliczenia wykonano, przyjmując graniczny poziom istotności $p = 0,05$. Występowanie różnic pomiędzy średnimi wartościami zmiennych w poszczególnych grupach badano testem Manna–Whitneya. W przypadku porównywania ze sobą więcej niż dwóch grup stosowano ANOVA rang – nazywany testem Kruskala–Wallisa. Analizę zmiennych jakościowych prowadzono metodami stosowanymi dla tablic wielodzielczych. Występowanie zależności między dwoma zmiennymi badano testem χ^2, stosując poprawkę Yatesa oraz testem dokładnym Fishera. W celu ustalenia siły związku statystycznego między zmiennymi użyto współczynnika V_c Cramera.

Dla zmiennych zależnych wykonano pomiary danego parametru w różnym czasie. W celu porównania ze sobą zmiennych zastosowano test Friedmanna dla zmiennych ciągłych, test Q Cochrana dla zmiennych binominalnych. W obu testach wynik istotny ($p < 0,05$) świadczył o wystąpieniu co najmniej jednej istotnej różnicy pomiędzy badanymi okresami. Aby stwierdzić, które okresy różnią się istotnie, wykonano obliczenie dla wszystkich kombinacji par, stosując: dla zmiennych ciągłych – test kolejności rang Wilcoxona, a dla zmiennych binominalnych oraz zmiennych jakościowych – testy niezależności dla tablic dwudzielnych (χ^2 z Pearsona, dokładny Fishera i Mc Nemara).

Wyniki

Oceny przeprowadzonych badań dokonano w następujących okresach kontrolnych: po 6 tygodniach, 6 miesiącach oraz po 1, 2, 3, 4 i 5 latach od wykonania zabiegu hemisekcji.

Analizując proces zaniku kości na podstawie wskaźnika radiologicznego EMR u pacjentów zgłaszających się na badania kontrolne w grupie I, w której stosowano hydroksyapatyt, zaobserwowano znacznie mniejszą utratę tkanki kostnej niż w grupie, w której nie aplikowano HA Biocer. Pomimo niewielkich wahań tego wskaźnika – po 36 miesiącach do średniej wartości 64,2%, po 48 miesiącach do 63,6% i po 60 miesiącach do 62,7% – w grupie tej na przestrzeni całego okresu obserwacji nie doszło do istotnego zaniku kości wokół korzeni po hemisekcji. Można zatem stwierdzić, że procesy destrukcyjne zostały zahamowane, a poziom kości wyrostka zębodołowego wg wskaźnika EMR szczęki lub żuchwy nie uległ zmianie w porównaniu z wartością początkową, tj. 62,8%. Natomiast w grupie II w pięcioletnich badaniach sukcesywnie zmniejszała się średnia wartość wskaźnika EMR – po 36 miesiącach do wartości 56,1%, po 48 miesiącach do 54,5% i po 60 miesiącach do 53,5%. W efekcie zaobserwowano ubytek kości rzędu 11,3%, co w porównaniu z grupą pierwszą jest bardzo istotne, zwłaszcza że w grupie tej wyjściowy poziom kości wyrostka zębodołowego był wyższy o 2% niż w grupie I. W obu grupach przy poziomie $p = 0,0001$ i $p = 0,0013$ różnice te były statystycznie istotne.

Po 5 latach obserwacji, po podsumowaniu wyników można stwierdzić, że w grupie I doszło do prawie dwukrotnego zmniejszenia średniej wartości głębokości kieszonek dziąsłowych od 2,53 mm do 1,48 mm, w przeciwieństwie do grupy II, w której doszło do dwukrotnego zwiększenia średniej wartości głębokości kieszonek od 1,77 mm do 3,40 mm. Zależności te były istotne statystycznie w grupach przy poziomie p = 0,0001.

Na podstawie zebranych danych można założyć, że w ciągu pierwszych dwóch lat obserwacji w obu grupach doszło do znacznej poprawy stabilizacji zębów. W późniejszym okresie nie zaobserwowano już zmian w ruchomości zębów po hemisekcji. Jest to związane z właściwą odbudową protetyczną pozwalającą na unieruchomienie zęba oraz z brakiem powikłań ze strony tkanek przyzębia brzeżnego i wierzchołkowego. W ciągu całego okresu obserwacji w grupie I doszło do poprawy stabilizacji zębów u 21 (41,18%) spośród 51 osób. W grupie II odnotowano tylko 7 (6,43%) przypadków, w których nastąpiła poprawa stabilizacji zębów, a więc u trzykrotnie mniejszej liczby osób niż w grupie I. Znacznie korzystniejszy efekt leczniczy uzyskano w grupie I, w której doszło tylko do jednego (1,96%) pogorszenia ruchomości. W grupie II nastąpiło pogorszenie ruchomości zębów aż u 9 (20%) osób. Jak widać, różnice te były znamienne statystycznie w grupach.

Podsumowując dane związane z obnażeniem korzeni, zaobserwowano, że istotne zmiany zachodziły jedynie do pierwszego roku obserwacji, kiedy to łącznie u 5 osób w grupie I zmniejszył się wskaźnik obnażenia korzenia z II° do I° i z I° do 0°. Po tym okresie w tej grupie badanych nie odnotowano już zmian tego wskaźnika. Nieznaczne różnice wykazano w grupie II, w której w badaniach po 36 i 48 miesiącach w pojedynczych przypadkach doszło do zwiększenia stopnia obnażenia korzenia. U pozostałych pacjentów zachował się stan z badania początkowego. W ciągu całego okresu 5-letniej obserwacji pacjentów obu grup zaobserwowano konsekwentne zmniejszanie się średnich wartości wskaźnika Pl.I. do 0,611 w grupie I i do wartości 0,488 w grupie II. Wskazuje to na znaczną poprawę higieny jamy ustnej u badanych pacjentów. Na podstawie średnich wartości wskaźnika Pl.I. stwierdzono, że większą poprawę higieny uzyskano w grupie i od wartości wyjściowej 1,754 do 0,611 niż w grupie II od wartości wskaźnika Pl.I. 1,10 do 0,488.

Po 5 latach skontrolowani pacjenci odczuwali zwiększenie komfortu w jamie ustnej. Był to efekt braku dolegliwości ze strony uzębienia i przyzębia wynikający z eliminowania w trakcie badań kontrolnych potencjalnych zagrożeń w postaci próchnicy wtórnej, nieszczelnego wypełnienia czy też złogów nazębnych. Pacjenci zasygnalizowali również fakt, iż wszczepienie im po hemisekcji materiału bioceramicznego, jakim był hydroksyapatyt HA Biocer, oraz kontrola higieny jamy ustnej była dla nich bodźcem motywującym do przestrzegania higieny.

Dyskusja

Materiałem wspomagającym leczenie zachowawcze, chirurgiczne i protetyczne w omawianym badaniu był hydroksyapatyt HA Biocer, określany w piśmiennictwie jako materiał implantacyjny, tworzywo implantacyjne, implant hydroksyapatytowy lub ceramika hydroksyapatytowa [34, 47, 56]. Hydroksyapatyt HA Biocer jest od ponad 10 lat efektywnie stosowany w stomatologii do wypełniania i odtwarzania ubytków tkanki kostnej [50, 51, 53]. W celu ograniczenia zaniku wyrostka zębodołowego, co sprzyja zachowaniu podłoża, można zastosować po usunięciu korzeni zębów aplikację biomateriałów, które pełnią rolę idealnych alloplastycznych wszczepów chroniąc, wyrostek zębodołowy przed resorpcją [20, 24, 35, 54]. W porównaniu z innymi materiałami implantacyjnymi tworzywo hydroksyapatytowe wykazuje nie tylko bardzo wysoką zgodność biologiczną z tkankami żywego organizmu, ale również cechę określaną jako bioaktywność. Porównując procesy gojenia się zębodołów bez aplikacji oraz z aplikacją tychże materiałów, wielu badaczy skłania się w kierunku uzupełniania ubytków kostnych tworzywami na bazie fosforanów wapniowych [5, 12, 33, 37, 55]. Wielu autorów przypisuje ogromną rolę higieny jamy ustnej w procesach odbudowy i destrukcji kości wokół zębów objętych procesem zapalnym. Wręcz uzależniają leczenie tych zmian od odpowiedniej higieny jamy ustnej pacjenta. Wiąże się to bowiem z niekorzystnym wpływem płytki nazębnej na szereg procesów odtwórczych, reparacyjnych i regeneracyjnych tkanki kostnej [21, 38]. Potwierdzeniem tych wniosków są badania własne, z których wynika, że im lepsza była higiena jamy ustnej pacjenta, tym bardziej widoczny był efekt leczniczy. U pacjentów grupy I, u których zanotowano wysoki stopień poprawy higieny jamy ustnej, uzyskano proporcjonalnie większą poprawę w odbudowie tkanki kostnej wokół zęba poddanego zabiegowi hemisekcji, a wartość wskaźnika EMR utrzymywała się w ciągu 5 lat niemal na niezmienionym poziomie (68,8% w badaniu wstępnym, 68,7% po 5 latach) [14]. Zęby te dodatkowo narażone były na różnego rodzaju ubytki tkanki kostnej wynikające z chorób przyzębia brzeżnego wierzchołkowego oraz innych jednostek chorobowych. Opierając się na wartościach wskaźnika EMR u pacjentów z grupy II, u których nie zastosowano hydroksyapatytu, stopień poprawy higieny jamy ustnej był niższy. Wartość EMR obniżyła się w ciągu 5 lat z 64,8% do 53,5%.

W niniejszych badaniach stwierdzono znaczną redukcję głębokości kieszonek dziąsłowych w grupie I, w której stosowano hydroksyapatyt po hemisekcji zęba. Redukcja ta wynosiła średnio od wartości wyjściowej 2,53 mm do 1,48 mm po 5 latach. Zależności takiej nie zaobserwowano w grupie II, w której nie był zastosowany hydroksyapatyt do zębodołów po zabiegu hemisekcji. Przeciwnie, w grupie tej doszło w tym samym okresie obserwacji do prawie dwukrotnego pogłębienia kieszonek dziąsłowych z 1,77 mm do 3,40 mm. W dostępnym piśmiennictwie

jest wiele publikacji dotyczących wpływu hydroksyapatytu na proces spłycenia kieszonek dziąsłowych [14, 26, 27, 29, 51]. *Van Hoeve J. P.* [22] wykonał 69 zabiegów hemisekcji zębów trzonowych dolnych i górnych. W dwuletnich badaniach *Knychalska-Karwan Z.* [29] po zaaplikowaniu HA Biocer do kieszonek dziąsłowych po zabiegach periodontologicznych uzyskała u pacjentów redukcję głębokości kieszonek dziąsłowych z 8,28 mm do 4,2 mm. W badaniach własnych zaobserwowano również poprawę stabilizacji zębów wraz ze wzrostem wskaźnika EMR w grupie pacjentów ze wszczepionym po hemisekcji hydroksyapatytem HA Biocer. Natomiast u pacjentów, u których leczenie przebiegało bez wspomagania materiałem hydroksyapatytowym, następowało stopniowe zmniejszanie się wartości wskaźnika EMR i nie było poprawy stabilizacji zębów. W okresie 2-letnim ruchomość fizjologiczną w grupie pacjentów, u których stosowano hydroksyapatyt, stwierdzić można było u 86,05% przypadków, a ruchomość patologiczną u 13,95% przypadków. Były to wartości zbliżone do wyników innych autorów [6, 12, 20, 24, 28].

Wszystkie uwzględnione dane potwierdzają słuszność stosowania w leczeniu ubytków kostnych materiałów kościozastępczych, jakim jest m.in. hydroksyapatyt HA Biocer. Doniesienia wielu autorów potwierdzają dobre rokowania po wykonaniu zabiegów hemisekcji. Ich wieloletnie obserwacje kliniczne wykazują, że metody te zostały z pozytywnym skutkiem wypróbowane i są obecnie polecane do szerokiego stosowania. Z powodu możliwości powikłań periodontologicznych po zabiegach, które dotyczą przede wszystkim zaniku tkanki kostnej w postaci kieszeni kostnych z następowym rozchwianiem zęba, obnażeniem, wręcz wyeksfoliowaniem korzenia zęba, proponuje się stosowanie materiałów bioceramicznych. W efekcie aplikowanie ich pozwoli uniknąć tego rodzaju powikłań i jednocześnie przywróci procesy naprawcze kości, co jest postępowaniem godnym uwagi i przeżywającym obecnie swój renesans.

Wnioski

Pięcioletnie badania kliniczne porównujące dwie grupy pacjentów i mające na celu udowodnienie skuteczności stosowania hydroksyapatytów doprowadziły do sformułowania następujących wniosków:

1. Sam zabieg hemisekcji pozwala na utrzymanie leczonego zęba w jamie ustnej, niwelując przyczynę powstawania procesu zapalnego wokół jednego z korzeni.

2. Zęby po hemisekcji mogą pełnić rolę filarów protetycznych, zapewniając odtworzenie ciągłości łuku zębowego w sposób oszczędny dla zębów sąsiednich.

3. Uzupełnienie zabiegu hemisekcji wszczepieniem biomateriału, jakim jest hydroksyapatyt HA Biocer, poprawia stan zachowanego zęba poprzez zahamowanie procesów destrukcji tkanki kostnej.

4. W grupie, w której wszczepiono HA Biocer, uzyskano lepsze oceny dla wszystkich parametrów istotnych statystycznie.

5. Konieczność ciągłej kontroli pacjentów wpływa korzystnie na utrzymanie przez nich właściwej higieny jamy ustnej.

Piśmiennictwo

1. *Abrams L., Trachtenberg D. I.*: Hemisection – technique and restoration. Dent. Clin. North. Am. 1974, 18, 2, 415–444.
2. *Arabska-Przedpełska B.*: Endodoncja współczesna. Med. Tour Press International. Warszawa 1994.
3. *Arentowicz G., Halczy-Kowalik L.*: Odbudowa dziąsła wokół wszczepu. Czas. Stom. 1993, 46, 9, 601–605.
4. *Arentowicz G.*: Zawartość pierwiastków w kości wokół wszczepów tytanowych i ceramicznych. [Maszynopis powielany] Pom. Akad. Med., Szczecin 1996.
5. *Bałczewska E. et al.*: Wykorzystanie hydroksyapatytu w leczeniu periodontopatii. Stom. Współcz. 1996, 3, 6, 475–484.
6. *Barkhodar R.A., Stark M.M., Soelberg K.*: Ocena zdolności apatytowego uszczelniacza kanałów korzeniowych do uszczelniania wierzchołków. Quintessence, 1993, 1, 1, 61–64.
7. *Benoliel R.*: Hemisekcja korzeni podniebiennych i odbudowa zębów po wykonaniu tego zabiegu. Czy jest to zabieg łatwy? Mag. Stom. 1996, 1, 2, 19–24.
8. *Bergenholz A.*: Radectomy of multirooted teeth. JADA, 1972, 85 870–876.
9. *Besner E., Ferrigno P.*: Practical Endodontics. Wiliams, Wilkins, Baltimore, London 1981.
10. *Buth K., Lenz K.*: Die Hemisektion an Molaren im Unterkiefer. Dtsch. Stomatol. 1991, 41, 105–107.
11. *Cohen E.S.*: Atlas of cosmetic and reconstructive periodontal surgery. Lea and Febiger, Philadelphia 1994, 371–384.
12. *Dolina-Młynowska A., Franasik J., Alwas-Danowska H.*: Zastosowanie hydroksyapatytu w codziennej pracy lekarza stomatologa. Stom. Współcz. 1997, 3, 211–215.
13. *Duggins L. D. et al.*: Łączona metoda wstecznego wypełniania kanałów i sterowanego odtwarzania tkanek przyzębia w celu leczenia perforacji furkacji trzonowca: Opis przypadku. Quintessence Int. 1996, 4, 5, 355–360.
14. *Galgut P.N. et al.*: Computerized densitometric analysis of interproximal bone levels in a controlled clinical study into the treatment of periodontal bone defects with ceramic hydroxyapatite implant material. J. Periodontol. 1991, 62, 44–50.
15. *Garling H.*: Hemisektion – ein Fallbericht. Stomatol., DDR, 1990, 40, 182.
16. *Gongloff R.K., Whitlow W., Montgomery C.K.*: Use of collagen tubes for implantation of hydroxylapatite: an experimental study. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1985, 43, 570–573.
17. *Grochowski J. et al.*: Ocena biologiczna implantów bioceramicznych wszczepionych w kości królików. Pol. Prz. Chir. 1988, 60, 11, 911–917.
18. *Grochowski J. et al.*: Hydroksyapatyt – biomateriał stosowany jako implant stały w ubytkach kości królików. Probl. Techn. Med. 1989, 20, 4, 229–235.
19. *Gumaer K.I. et al.*: Evaluation of hydroxylapatite root implants in baboons. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1985, 43, 73–79.
20. *Hamel I., Daculsi G., Poueat J.A.*: Działanie cząsteczek fosforanu wapnia umieszczonych w zębodołach po usunięciu zębów. Prot. Stomat. 1993, 43, 1, 16.
21. *Hill G.*: Restoration of the hemisectioned tooth. Current therapy in dentistry. Mosby Company, Saint Louis 1977.

22. *van Hoeve J.P.*: Resultaten van hemisecties en wortelamputaties. Ned. Tijdschr. Tandheelkd. 1991, 98. 7, 255–258.
23. *Ingle J.I., Beveridge E.E.*: Endodontics. Lea and Febiger, Philadelphia 1976.
24. *Karaagaclioglu L., Ozkan P.*: Zmiany wysokości wyrostka zębodołowego żuchwy w związku ze starzeniem i czasem trwania bezzębia. Stom. Og. 1996, 6, 427–430.
25. *Keith M., Thayer P.*: Hemisection of a mandibular molar. Fixed prosthodontics. Decker B. C. inc. Toronto Philadelphia 1984.
26. *Kenney E.B. et al.*: The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects. J. Periodontol. 1988, 59, 2, 67–72.
27. *Kenney E.B. et al.*: The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects. J. Periodontol. 1984, 56, 2, 82–88.
28. *Knychalska-Karwan Z. et al.*: Możliwości stosowania hydroksyapatytowego materiału bioceramicznego w stomatologii. Stom. Klin. 1991, 12, 5–11.
29. *Knychalska-Karwan Z.*: Zastosowanie syntetycznego hydroksyapatytu w stomatologii. Mag. Stom. 1994, 5, 5–8.
30. *Kożdoń L., Bajdor-Grędzińska M.*: Hemisekcja zęba. Aktualne możliwości powodzenia zabiegu. Czas. Stom. 1999, 52, 7, 475–482.
31. *Laskus-Perendyk A., Mateńko D.*: Odbudowa ubytków kostnych z użyciem syntetycznego polimeru HTR. Opis przypadku. Czas. Stom. 1996, 49, 3, 162–165.
32. *Lost C.*: Hemisektion und Wurzelamputation. Hanser, München, Wien 1985.
33. *Malinowski J., Sobczyk P., Sporniak K.*: Zastosowanie hydroksyapatytu w chirurgii stomatologicznej. Stom. Współcz. 1999, 6, 26–29.
34. *Matsui Y., Kohsuke O., Ken–ichi M., Tetsuhiko T.*: Histomorphometric examination of healing around hydroxylapatite implants in co–irradiated bone. J. Oral. Maxillofacial. Surg. 1994, 67, 167–172.
35. *Oberg S., Kahnberg K.*: Combined use of hydroxyapatite and Tisseel in experimental bone defects in the rabbit. Swed. Dent. J. 1993, 17, 147–153.
36. *Ogilvie A.L., Ingle J.I.*: An atlas of pulpal and periapical biology. Lea and Febiger, Philadelphia 1965.
37. *Pawłowska A.*: Odbudowa pooperacyjnych ubytków kostnych z zastosowaniem hydroksyapatytu HA Biocer. Gaz. Stom. 1999, 3, 14, 22–26.
38. *Pihut M., Wiśniewska G.*: Zagadnienia biokompatybilności i osteointegracji we współczesnej protetyce. Protet. Stom. 1996, 46, 1, 28–32.
39. *Rossman J., Krainau R.*: Wszczep wykonany w zanikłej bezzębnej żuchwie z jednoczesną rekonstrukcyjną operacją plastyczną z zastosowaniem ceramiki hydroksyapatytowej. Mag. Stom. 1994, 6, 25–28.
40. *Rytlowa W.*: Chirurgiczne metody zachowania zębów. Mag. Stom. 1991, I, 1, 22–23.
41. *Sawicki W.*: Histologia. PZWL, Warszawa 1993.
42. *Sewerin I.*: Identyfikacja implantów zębowych na zdjęciach rentgenowskich. Quintessence, 1993, I, 2, 85–92.
43. *Stoelinga P. et al.*: Augmentation of the atrophic mandible with interposed bone grafts and particulate hydroxylapatite. J. Oral Maxillofac. Surg. 1986, 44, 353–360.
44. *Sugimoto A. et al.*: Effect of calcium phosphate ceramic particle insertion on tooth eruption. Oral Surg. Oral Med. Oral Path. Oral Radiol. Endod. 1993, 76, 2, 141–148.
45. *Szymański A.*: Biomineralizacja i biomateriały. PWN, Warszawa 1991.
46. *Ściegienny-Malec J. et al.*: Zachowawczo-chirurgiczno-protetyczne leczenie zębów wielokorzeniowych. Stom. Klin. 1985, 7, 3, 36–43.
47. *Ślósarczyk A., Dzięgiel A.*: Bioceramiczne tworzywa dla chirurgii. Inż. Materiałowa, 1989, 1, 22.
48. *Ślósarczyk A., Prażuch J.*: Porowate tworzywo hydroksyapatytowe dla implantologii. Inż. Materiałowa, 1989, 4, 51, 110.
49. *Ślósarczyk A. et al.*: Biomateriały fosforanowe. Szkło i ceramika, 1990, 6, 1.
50. *Takata T. et al.*: New periodontal ligament formation on a synthetic hydroxyapatite surface. Clin. Oral. Impl. Res. 1993, 4, 130–136.
51. *Wachtel H. et al.*: Implantation von porosem hydroxylapatite in parodontalen Knochentaschen. Dtsch. Zahnarztl. 1989, 4, 44, 277–282.
52. *Waite P.D., Matukas V.J.*: Zygomatic augmentation with hydroxylapatite: a preliminary report. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1986, 44, 349–352.
53. *Wierzbicka M.*: Periodontologia kliniczna. Sanmedia, Warszawa 1992.
54. *Wongthai P., Rosen J.*: Implant restoration of a hemisected molar: clinical report. Implant Dent. 1993, 2, 3, 182–184.
55. *Yukna R.A.*: Clinical comparison of hydroxyapatite-coated titanium dental implants placed in fresh extraction sockets and healed sites. J. Periodontol. 1991, 62, 468–472.
56. *Zide M.F., Nestor D., Karas D.*: Hydroxylapatite block closure of oroantral fistulas: Report of cases. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1982, 50, 71–75.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 65–74
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 65–74
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

PIOTR SZUMIN

ZASTOSOWANIE TOMOGRAFII SPIRALNEJ POPRZECZNEJ APARATU CRANEX–TOME W DIAGNOSTYCE STAWU SKRONIOWO-ŻUCHWOWEGO I IMPLANTOLOGII*

TRANSVERSE SPIRAL TOMOGRAPHY WITH THE CRANEX–TOME APPARATUS IN DISEASES OF THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT AND IN IMPLANTOLOGY*

Katedra i Zakład Radiologii Ogólnej i Stomatologicznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Grażyna Wilk*

Summary

Introduktion: This study was undertaken to determine the usefulness of transverse spiral tomography with the Cranex - Tome apparatus in diseases of the temporomandibular joint and in implantology.

Material and methodes: The temporomandibular joint was studied in 35 patients. Pathologic bony structures, osteophytes, and abnormalities of the joint space were found in 34 patients. A malignant tumor was detected in one patient. In the case of the temporomandibular joint, spiral pantomography appears to offer superior results to conventional radiography by filtering out all structures superimposing on the joint. In addition, 14 patients qualified to receive 60 endosseous implants were studied. Pantomographs of the maxilla and mandible, as well as tomographs were used to measure the height and width of the alveolar process prior to selection of the implant. The precision of imaging of structures important to the implantologist was assessed.

Results: Transverse spiral radiographs of the alveolar process gave a clear view of the mandibular canal, mental foramen, and fundus of the maxillary sinus. Measurements of the height and width of the alveolar process appearing on transverse spiral radiographs created a precise basis for the selection of an implant with the right length and diameter.

K e y w o r d s: temporomandibular joint – implantology – Cranex–Tome apparatus – transverse spiral tomography.

Streszczenie

Wstęp: Podjęto próbę oceny użyteczności tomografii poprzecznej aparatu Cranex–Tome w diagnostyce stawów skroniowo-żuchwowych i w postępowaniu przedimplantologicznym.

Materiał i metody: Badania rentgenowskie stawu skroniowo-żuchwowego przeprowadzono u 35 chorych. U 34 pacjentów widoczne były nieprawidłowe struktury kostne, osteofity i zmiany szerokości szpary stawowej, u 1 proces nowotworowy złośliwy. W diagnostyce stawu skroniowo-żuchwowego pantomografia spiralna jest bardziej skuteczna od konwencjonalnej, ponieważ usuwa wszystkie zbędne

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: prof. dr hab. n. med. *Grażyna Wilk*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 113 stron, 34 ryciny, 13 tabel, 76 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: Prof. *Grażyna Wilk* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 113 pages, 34 figures, 13 tables, 76 references.

cienie struktur rzutujących się na staw. Zbadano 14 pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu osadzenia 60 implantów korzeniowych. Na pantomogramach szczęki i żuchwy oraz na zdjęciach warstwowych badanej okolicy mierzono wysokość i szerokość kości wyrostka zębodołowego i dobierano odpowiedni implant. Oceniano dokładność odwzorowania istotnych dla implantologa struktur anatomicznych. Na zdjęciach spiralnych poprzecznych wyrostka zębodołowego otrzymano dokładne przekroje kanału żuchwy, otworu bródkowego i dna zatoki szczękowej.

Wyniki: Dokonane w oparciu o zdjęcia warstwowe poprzeczne pomiary wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy pozwoliły z dużą dokładnością na wybranie implantu odpowiedniej długości i średnicy.

H a s ł a: staw skroniowo-żuchwowy – implantologia – aparat Cranex–Tome – pantomografia spiralna poprzeczna.

Wstęp

Rentgenodiagnostyka wykorzystywana jest w każdej dyscyplinie stomatologicznej: w protetyce, paradontologii, chirurgii stomatologicznej, ortodoncji, pedodoncji oraz w stomatologii zachowawczej wraz z dynamicznie rozwijającą się endodoncją.

Postęp w stomatologii estetycznej, do której zaliczyć możemy leczenie uzupełnieniami protetycznymi ceramicznymi na podbudowie implantologicznej, wymaga bliskiej współpracy chirurgów stomatologów, protetyków i radiologów. Duże zapotrzebowanie na takie leczenie i jego wysoki koszt zmusza lekarzy do dokładnej oceny wskazań i przeciwwskazań do zabiegu.

W ostatnich latach pojawiło się nowe urządzenie do badań pantomograficznych spiralnych – aparat Cranex–Tome firmy Soredex–Orion. Ma szerokie zastosowanie w diagnostyce stomatologicznej, umożliwiając wykonanie zdjęcia pantomograficzne, warstwowe spiralne poprzeczne wyrostka zębodołowego i stawu skroniowo-żuchwowego oraz cefalometryczne [1]. Koszt tych badań jest względnie niski, co w obecnej sytuacji opieki medycznej jest bardzo istotne. Aparat Cranex–Tome wymaga ponadto znacznie mniejszych warunków ekspozycji i ułatwia diagnostykę przedzabiegową [2].

Zaburzenia czynnościowe narządu żucia dotyczą 50–80% populacji ludzkiej [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. W diagnostyce stawu skroniowo-żuchwowego stosuje się z powodzeniem radiografię konwencjonalną oraz tomografię komputerową (TK), rezonans magnetyczny (MR) i techniki ultrasonograficzne (USG) [10, 11]. Pantomografia spiralna poprzeczna aparatu Cranex–Tome umożliwia uzyskanie zdjęć warstwowych stawu. Dzięki ich dobrej jakości badanie to ma dużą wartość diagnostyczną i stanowi wartościowe uzupełnienie dotychczas stosowanych metod.

Celem pracy była:

1. Ocena skuteczności aparatu Cranex–Tome w diagnostyce schorzeń stawu skroniowo-żuchwowego.
2. Ocena przydatności pantomografii spiralnej aparatu Cranex –Tome w diagnostyce przedimplantologicznej poprzez:
   a) określenie skuteczności obrazowania istotnych dla implantologa struktur anatomicznych kości szczęk,
   b) porównanie pomiarów wysokości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy na zdjęciach warstwowych spiralnych poprzecznych i pantomograficznych konwencjonalnych,
   c) dokonanie pomiarów szerokości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy w wymiarze poprzecznym na zdjęciach warstwowych spiralnych,
   d) ustalenie, czy w oparciu o wykonane pomiary można zaplanować sposób leczenia i dobrać odpowiedniej długości implanty.

Materiał i metody

Pacjenci z dysfunkcją stawów skroniowo-żuchwowych

Badania stawu skroniowo-żuchwowego wykonano u 35 chorych w wieku od 17 do 72 lat, w tym u 25 kobiet i 10 mężczyzn. Wszyscy pacjenci wykazywali kliniczne objawy dysfunkcji, stwierdzane na podstawie wywiadu lekarskiego i badania przedmiotowego.

Pacjenci zakwalifikowani do wszczepienia implantów korzeniowych

Zbadano 14 pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu osadzenia implantów korzeniowych, w tym 8 kobiet i 6 mężczyzn, w wieku od 26 do 63 lat. Badanym pacjentom założono ogółem 60 implantów. Umiejscowienie wszczepów ukazuje tabela 1.

T a b e l a 1. **Podział materiału w zależności od płci pacjentów, okolicy i umiejscowienia wszczepu**

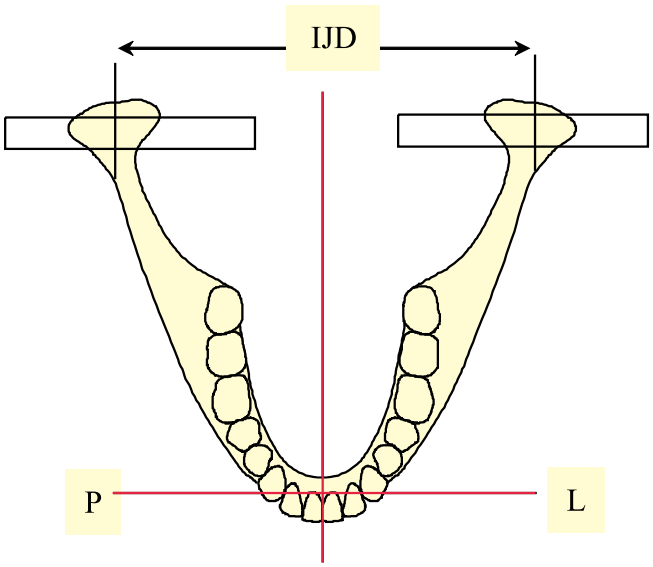
T a b l e 1. **Patient gender, examined region, and implant location**

Parametr / Parameter	Kobiety / Females		Mężczyźni / Males		Suma / Total
	strona prawa / right side	strona lewa / left side	strona prawa / right side	strona lewa / left side	
Szczęka / Maxilla	8	11	3	-	22
Żuchwa / Mandible	7	9	10	12	38
Suma / Total	15	20	13	12	60

Pantomografia spiralna stawów skroniowo-żuchwowych

Przed skierowaniem na badania radiologiczne aparatem Cranex–Tome stan pacjentów oceniano wyliczając wskaźnik kliniczny dysfunkcji stawów skroniowo-żuchwowych wg Helkimo [5, 12]. Badanie rozpoczynano od wy-

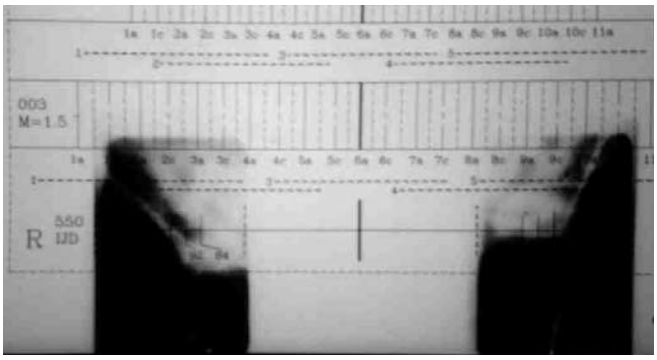
boru programu: dorośli – dzieci. Pantomogram umożliwiał ogólną ocenę układu stomatognatycznego pacjenta, zdjęcie p-a stawów pozwalało na określenie odległości każdego ze stawów od linii środkowej ciała (*Inter–Joint–Distance*, IJD) (ryc. 1). Pomiaru odległości dokonywano za pomocą orygi-



Ryc. 1. Ustalenie odległości międzystawowej

Fig. 1. Measurement of the inter-joint distance

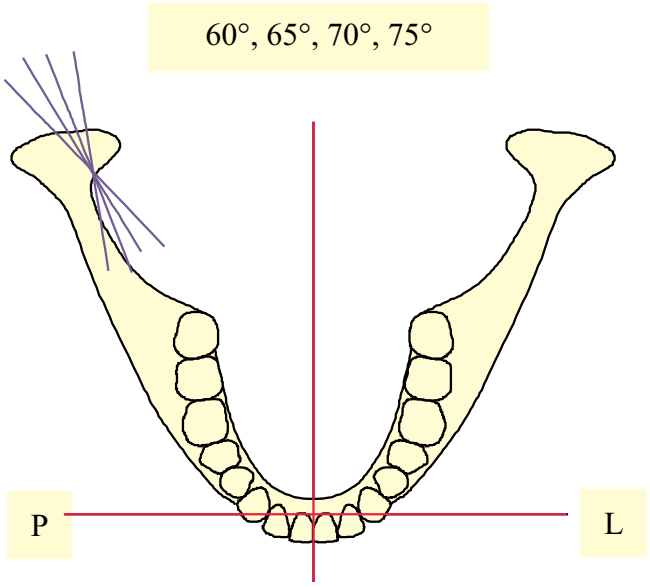
nalnego szablonu (ryc. 2). Wartości uzyskane z pomiarów odległości międzystawowej (IJD) umożliwiły wybór czterech najistotniejszych warstw do badania tomograficznego i wycechowanie urządzenia do wykonania wybranych zdjęć



Ryc. 2. Ustalenie odległości pomiędzy stawami w oparciu o specjalny szablon

Fig. 2. Inter-joint distance measured with a special ruler

warstwowych spiralnych pod różnymi kątami nachylenia lampy (ryc. 3). Prawidłowe ustawienie głowy pacjenta miało wpływ na uzyskanie zdjęć dobrej jakości. Głowa pacjenta była pochylona ku dołowi pod kątem 10–15° z nosem opartym o podpórkę statywu aparatu. Linia łącząca łuk brwiowy z otworem słuchowym zewnętrznym była równoległa do podłogi. Staw skroniowo-żuchwowy znajdował się na wysokości połowy kasety. Do badania przy ustach otwartych ustawienie było podobne. Po uzyskaniu zdjęć pod kątem padania promieni wynoszącym 60°, 65°, 70° i 75° wybierano obraz najostrzejszy np. przy kącie 70°, programowano aparat i wykonywano zdjęcia warstwowe. Stosowano warstwy grubości 2 mm, w odstępach co 2 mm. Przy podejrzeniach zaburzeń ruchomości w stawie wykonywano zdjęcia warstwowe lub kątowe przy ustach otwartych albo też skanogramy czynnościowe stawów



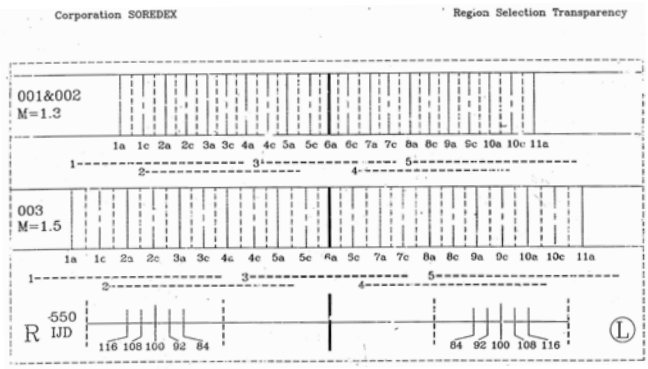
Ryc. 3. Kąty padania promieni rentgenowskich na głowę żuchwy stosowane w badaniu

Fig. 3. X-ray angles directed to the mandibular head

(zdjęcie grubej warstwy badanego odcinka kości). Przy analizie zdjęć warstwowych zwracano uwagę na ostrość i kontrastowość obrazu, stan elementów stawu: szpary stawowej, powierzchni dołka stawowego i głowy żuchwy oraz ułożenie głowy w panewce.

Zdjęcia warstwowe poprzeczne wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy w postępowaniu przedimplantologicznym

W grupie pacjentów przygotowywanych do implantacji – po wywiadzie, dokładnej analizie przeciwwskazań ogólnych do zabiegu osadzenia wszczepu i badaniu przedmiotowym – układano plan leczenia i wykonywano standardowo zdjęcie pantomograficzne szczęki i żuchwy aparatem Cranex–Tome. Do analizy przedimplantologicznej wykorzystywano badanie tomograficzne spiralne wyrostka zębodołowego w okolicach przeznaczonych do umieszczenia wszczepu. Na zdjęciu pantomograficznym za pomocą oryginalnego szablonu, podanego przez firmę Soredex, oznaczano symbole warstw, które miały być uwidocznione na zdjęciu tomograficznym (ryc. 4). Następnie wykonywano zdjęcia tomograficzne badanej okolicy – na jednym filmie 4 warstwy, grubości 2 mm, w odstępach co 2 mm. Znając współczynnik powiększenia aparatu (1,5x), dokonywano pomiarów i na tej podstawie dopasowywano odpowiedni implant, ewentualnie rezygnowano z zabiegu. Wykonywano też pomiary wysokości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy na zdjęciach pantomograficznych przeglądowych. Mierzono wysokość



Ryc. 4. Szablon do badań tomograficznych stawów skroniowo-żuchwowych i wyrostka zębodołowego

Fig. 4. Measurement tool used in tomography of TMJ and alveolar process

w wymiarze pionowym od brzegu wyrostka do zachyłka zębodołowego zatoki szczękowej. W przednim odcinku szczęki mierzono wysokość od szczytu wyrostka do podstawy jamy nosowej. W żuchwie mierzono ilość tkanki kostnej od brzegu części zębodołowej do kanału żuchwy lub otworu bródkowego, a w okolicy bródki od podstawy trzonu żuchwy do szczytu części zębodołowej. Podobne zasady wyznaczania punktów pomiarowych zastosował w swoich badaniach *Abrahams* [13]. Następnie otrzymane wyniki porównywano z wynikami pomiarów uzyskanych na podstawie pomiarów wysokości i szerokości wyrostka na zdjęciach warstwowych. Pomiarów dokonywano za pomocą szablonu z podziałką milimetrową. Po uwzględnieniu współczynnika powiększenia (1,5x dla zdjęć tomo i 1,3x dla pantomogramów) porównywano wyniki uzyskane dla tej samej okolicy na podstawie obydwu zdjęć.

Na zdjęciach warstwowych i pantomograficznych przeglądowych analizowano istotne dla implantologa struktury anatomiczne, mianowicie: kanał żuchwy, otwór bródkowy i zachyłek zębodołowy zatoki szczękowej.

Opracowanie statystyczne polegało na porównaniu zestawionych w kolumny wyników pomiarów wysokości kości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy uzyskanych na podstawie zdjęć warstwowych i pantomograficznych. Badano, czy między kolumnami istnieje statystycznie istotna różnica. W tym celu obliczono średnią wyników uzyskanych na podstawie pantomogramów i zdjęć tomograficznych, a następnie uzyskano średnią arytmetyczną różnic między kolumnami. Analizę statystyczną oparto na teście t-Studenta dla prób zależnych i sprawdzono wg testu kolejności par Wilcoxona [14].

Wyniki

Zmiany w stawach skroniowo-żuchwowych na zdjęciach wykonanych aparatem Cranex–Tome

U 34 pacjentów wykazano dysfunkcje stawów skroniowo-żuchwowych, u jednego proces nowotworowy złośliwy *(carcinoma planoepitheliale)*. W tym przypadku guz wywodzący się ze skóry okolicy skroniowej lewej naciekał elementy stawu skroniowo-żuchwowego. Wśród zbadanych pacjentów u 15 (44,1%) stwierdzono niewielką dysfunkcję, u 14 (41,2%) średnią, a u 6 pacjentów (17,7%) ciężką. Ograniczoną ruchomość w stawie stwierdzono u 28 chorych, u 2 całkowity brak ruchomości, u 5 ruchy były prawidłowe. W przypadku jednego z pacjentów badanie rentgenowskie nie doszło do skutku z powodu jego zasłabnięcia.

Wyniki analizy dokumentacji rentgenowskiej stawów skroniowo-żuchwowych zebrano w tabeli 2.

Tabela 2. **Zestawienie wyników analizy zdjęć rentgenowskich stawów skroniowo-żuchwowych**

Table 2. **Radiographic findings in the temporomandibular joints**

Parametr / Parameter	Liczba chorych z występującymi objawami patologicznymi w stawach / Number of patients with TMJ pathologies		
	obustronnie / bilateral	po stronie prawej / right side	po stronie lewej / left side
Zwichnięcia / Luxation	2	-	-
Nadwichnięcia / Subluxation	1	1	-
Zgęszczenie struktury kostnej głowy żuchwy / Enhanced opacity of mandibular head	10	3	2
Rozrzedzenie struktury kostnej głowy żuchwy / Reduced opacity of mandibular head	8	1	1
Osteofity („dzioby kogucie") / Osteophytes	7	1	2
Spłaszczenie głowy żuchwy / Flattening of mandibular head	6	2	4
Poszerzenie szpary stawu / Enlargement of joint space	1	4	2
Zwężenie szpary stawu / Narrowing of joint space	10	3	1
Asymetryczne ułożenie głowy żuchwy w panewce / Asymmetric position of mandibular head in acetabulum	7	-	-
Brak ruchomości / Immobilization	2	-	-
Ograniczenie ruchomości / Limited mobility	25	1	2
Zwapnienia w szparze stawowej / Calcifications in joint space	1	1	1

Analiza porównawcza pomiarów wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy w oparciu o zdjęcia pantomograficzne i warstwowe poprzeczne

Wyniki pomiarów wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy (w mm) przed rekonstrukcją dna zatoki szczękowej obrazuje tabela 3. W wyżej podany sposób zebrano wyniki pomiarów wysokości w wymiarze pionowym i szerokości w wymiarze poprzecznym wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy u wszystkich pacjentów. Pomiarów dokonywano przed i po ewentualnej

Tabela 3. **Wyniki pomiarów wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy w mm uzyskane na podstawie zdjęć pantomograficznych i tomograficznych u pacjentów bez rekonstrukcji kości**

Table 3. **Height and width of the alveolar process measured on pantomographs and tomographs in patients prior to reconstruction of the bone**

Parametr / Parameter			Wyniki pomiarów kości przed rekonstrukcją / Dimensions before reconstruction (mm)	
			Pantomogram / Pantomograph	Zdjęcie tomograficzne / Tomograph
Pacjent 1 / Patient 1	Okolica zęba / Tooth region		24 26 27	24 26 27
	Wysokość wyrostka zębodołowego w wymiarze pionowym / Height of alveolar process (mm)	odczyt ze zdjęć RTG / raw data	15 3 5	25 4 7
		skorygow. o współczynnik powiększenia corrected for magnification	11,5 2,3 3,8	16,7 2,7 4,7
	Szerokość wyrostka zębodołowego w wymiarze poprzecznym / Width of alveolar process (mm)	odczyt ze zdjęć RTG / raw data	*)	12 10 14
		skorygow. o współczynnik powiększenia corrected for magnification	*)	8 6,7 9,3

*) – brak możliwości wykonania pomiarów wyrostka w wymiarze poprzecznym na zdjęciu pantomograficznym ze względu na jego dwuwymiarowość / measurements not possible due to two-dimensional nature of pantomograph

chirurgicznej rekonstrukcji. (Wszystkie wyniki do wglądu w oryginale pracy.)

Z przeprowadzonych badań umieszczonych w tabelach wynika, że wysokość kości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy oceniana tylko na zdjęciach pantomograficznych w 76,6% przypadków okazywała się być mniejsza niż na zdjęciach warstwowych, w 21,9% porównań była większa. W 1,6% pomiary wykonywane na zdjęciach pantomograficznych pokrywały się z wartościami określonymi na podstawie zdjęć warstwowych. Różnice pomiarów są istotne statystycznie przy poziomie istotności $p < 3 \cdot 10^{-6}$. Średnia wyników pomiarów wysokości kości na pantomogramach wyniosła 15,07 mm ± 6,15 mm, a na zdjęciach warstwowych 16,14 mm ± 5,89 mm. Średnia arytmetyczna różnic pomiarów wykonanych na pantomogramach i na zdjęciach warstwowych wyniosła 1,08 mm, przy odchyleniu standardowym 1,69 ($\bar{d} = 1,08 \pm 1,69$).

W 49 porównaniach (76,6%) wyników otrzymanych na podstawie dwóch rodzajów zdjęć wysokość kości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy mierzona na podstawie tomogramów wykazywała wartości większe niż uzyskane na podstawie pomiarów na pantomogramach. W 14 porównaniach (21,9%) sytuacja była odwrotna. Ze stosunku tych liczb (49/14 = 3,5) wynika, że korzystając ze zdjęć warstwowych poprzecznych zamiast pantomogramów, 3,5x częściej uzyskano większą wysokość kości. Może to mieć wpływ na długość dobieranych wszczepów.

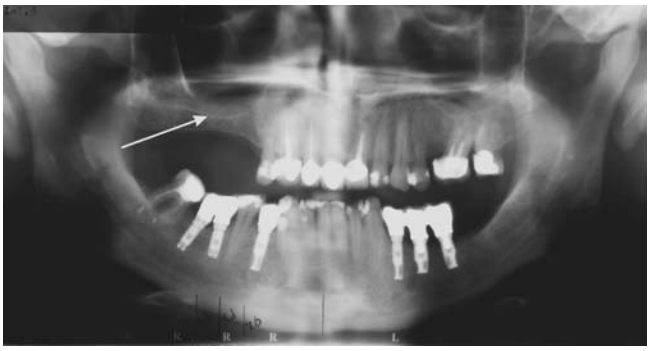
Pantomogram ukazywał przekrój czołowy dna zachyłka zębodołowego zatoki szczękowej w 17 na 22 przypadki, co stanowi 77,3%. Zdjęcie warstwowe ukazujące przekrój poprzeczny dna zatoki było wartościowe w 81,8% przypadków (18 na 22).

Otwór bródkowy na pantomogramach przeglądowych widoczny był w 76,9% przypadków po stronie prawej i w 69,2% po lewej, a kanał żuchwy odpowiednio w 92,3% i w 84,6%. Tomogram przedstawiał szczegółowo kanał żuchwy po stronie lewej na wszystkich zdjęciach, a po prawej w 92,3% przypadków.

Opisy przypadków

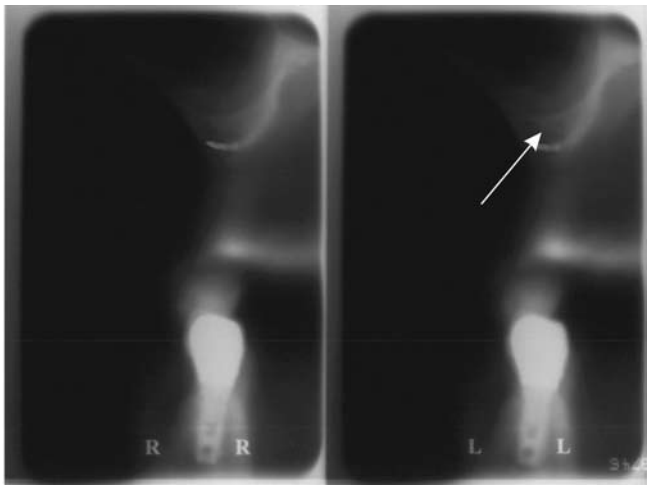
Przypadek 1

Pacjent A.F., lat 42. Pantomogram przeglądowy ukazuje nisko schodzące dno zatoki szczękowej po stronie prawej i bezzębny wyrostek zębodołowy z rozrzedzonym utkaniem beleczkowym w okolicy zębów 15, 16, 17 (ryc. 5). Wysokość wyrostka zębodołowego okolicy zęba



Ryc. 5. Przypadek 1. Pantomogram przeglądowy. Niewystarczająca ilość kości do osadzenia implantów korzeniowych w okolicy zębów 15, 16, 17 (strzałka)

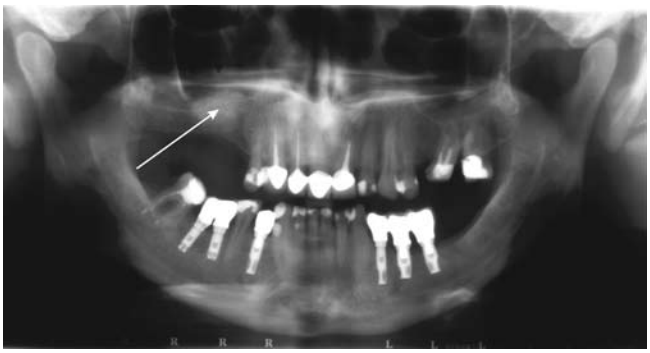
Fig. 5. Case № 1. Pantomograph showing insufficient bone volume (arrow) for implants in the region of teeth 15, 16, and 17



Ryc. 6. Przypadek 1. Zdjęcie warstwowe poprzeczne okolicy zęba 15. Nisko schodzące dno zachyłka zębodołowego zatoki szczękowej i niewielka wysokość wyrostka w wymiarze pionowym (strzałka)

Fig. 6. Case № 1. Transverse spiral tomograph of the tooth 15 region showing reduced height of the alveolar process due to low-lying alveolar recess of the maxillary sinus (arrow)

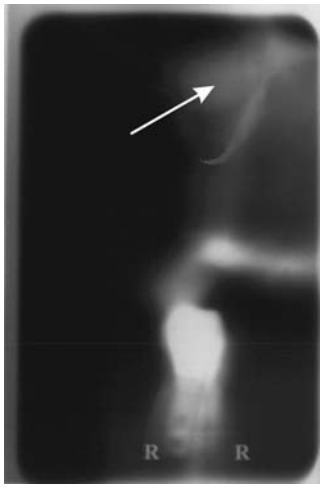
16 oceniana na podstawie pantomogramu wynosiła tylko 7 mm (po korekcie powiększenia – 5,4 mm). Na zdjęciu warstwowym tej okolicy widoczny jest znaczny zanik wyrostka z niewielką ilością beleczek kostnych (ryc. 6). Ponieważ wysokość wyrostka w okolicy zęba 16 mierzona na zdjęciu warstwowym poprzecznym wynosiła tylko 7 mm (po uwzględnieniu powiększenia – 4,7 mm), zdecydowano się na podniesienie dna zatoki przy użyciu materiałów kościozastępczych Bio-Oss i Bio-Gide. Na pantomogramie wykonanym po 9 miesiącach widoczne było zagęszczenie struktury kostnej w zachyłku zębodołowym prawej zatoki szczękowej odpowiadające bliźnie kostnej po dokonanej plastyce (ryc. 7). W okolicy zęba 16 wysokość



Ryc. 7. Przypadek 1. Zacienienie w okolicy dna prawej zatoki szczękowej. Blizna kostna po wykonanej plastyce (strzałka)

Fig. 7. Case № 1. Opacity near the fundus of maxillary sinus. Bone growth following osteoplasty (arrow)

wyrostka zębodołowego szczęki po rekonstrukcji wyliczona na podstawie zdjęcia pantomograficznego po korekcie powiększenia wynosiła 10 mm. Wysokość rzeczywista wyrostka mierzona na zdjęciu warstwowym poprzecznym wynosiła 11,3 mm, a szerokość 8 mm (ryc. 8). W okolicy zęba 16 osadzono implant długości 10 mm i średnicy 4 mm. Po wypreparowaniu łoża implantu na jego dnie zachowana była ciągłość tkanki kostnej, co wskazuje na precyzję oceny na podstawie zdjęcia warstwowego poprzecznego. Zdjęcie



Ryc. 8. Przypadek 1. Zdjęcie warstwowe. Podniesione dno zatoki szczękowej

Fig. 8. Case № 1. Tomograph showing elevated fundus of maxillary sinus

to określało wysokość wyrostka zębodołowego na 11,3 mm. Rycina 9 przedstawia zdjęcie pantomograficzne wykonane po zabiegu implantologicznym.

Ryc. 9. Przypadek 1. Pantomogram wykonany po osadzeniu wszczepów

Fig. 9. Case № 1. Pantomograph following implantation

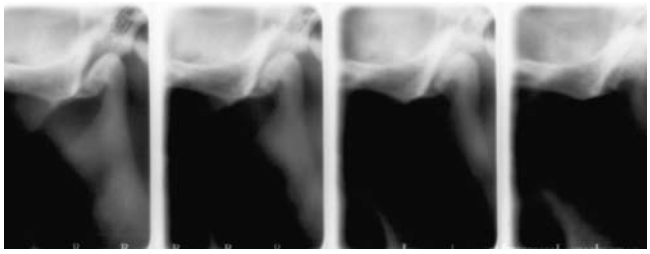
Przypadek 2

Pacjentka J.G., lat 48. Bóle i ograniczenie ruchomości prawego stawu skroniowo-żuchwowego, trzaski podczas rozwierania szczęk spowodowane brakami w uzębieniu i nieprawidłowym żuciem. Uzupełnienia protetyczne poprawiły czynność stawu skroniowo-żuchwowego. Na przeglądowym pantomogramie widoczne są masywne zwapnienia w prawej szparze stawowej, zniekształcenia głowy żuchwy i jej sklerotyzacja oraz spłaszczenie i sklerotyzacja panewki po stronie lewej (ryc. 10). W celu dokład-

Ryc. 10. Przypadek 2. Pantomogram przeglądowy. W prawym ssż masywne zwapnienia w szparze stawowej (grot strzałki), zniekształcenie głowy żuchwy i jej sklerotyzacja. W lewym ssż spłaszczenie głowy żuchwy, sklerotyzacja panewki. Polip w prawej zatoce szczękowej (ozn. strzałką)

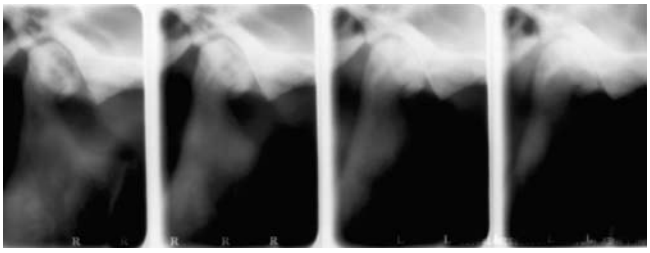
Fig. 10. Case № 2. Pantomograph showing massive calcifications in the right TMJ space (arrowhead), deformation and sclerotization of the mandibular head. Flattening of right madibular head, sclerotization of its acetabulum, and polyp in the right maxillary sinus (arrow)

nej analizy zmian zaobserwowanych na pantomogramie wykonano zdjęcia warstwowe spiralne, które pozwoliły na wyraźną obserwację spłaszczenia i sklerotyzacji głowy żuchwy oraz panewki stawu (ryciny 11 i 12). Zastosowanie pantomografii spiralnej aparatu Cranex–Tome umożliwiło uzyskanie obrazów stawów w wielu przekrojach, co pomogło w wykryciu zmian strukturalnych. Zmiany te były powodem zjawisk osłuchowych (trzaski), na które skarżyła się pacjentka.



Ryc. 11. Przypadek 2. Tomogram spiralny lewego stawu skroniowo-żuchwowego. Spłaszczenie i sklerotyzacja głowy żuchwy oraz panewki

Fig. 11. Case № 2. Transverse spiral tomograph of the left TMJ showing flattening and sclerotization of the mandibular head and acetabulum



Ryc. 12. Przypadek 2. Spiralny tomogram prawego ssż. Spłaszczenie głowy, zwężenie szpary stawowej i zwapnienia w jej obrębie

Fig. 12. Case № 2. Transverse spiral tomograph of the right TMJ showing flattening of the mandibular head, narrowing and calcifications in the joint space

Dyskusja

Metody badań stawu skroniowo-żuchwowego za pomocą tomografii komputerowej (TK) lub rezonansu magnetycznego (MR), chociaż mają bardzo dużą wartość diagnostyczną, nadal są mniej dostępne niż metody konwencjonalne [2, 10, 15, 16, 17, 18]. Tomografia komputerowa dobrze uwidacznia elementy kostne, lecz wysoki koszt i duża dawka promieniowania mogą ograniczać jej zastosowanie [2, 17, 19]. *Laskin* i *Greene* [17] twierdzą, że lokalizacja stawu bezpośrednio pod podstawą czaszki bardzo utrudnia otrzymanie dobrego obrazu struktur stawu w pojedynczej projekcji.

Na podstawie najczęściej wykonywanego zdjęcia wg Schüllera nie można wyciągnąć istotnych wniosków dotyczących budowy anatomicznej stawu, pochyłości guzka i rzeczywistej szerokości szpary stawowej. Jej kształt i szerokość wykazują znaczne różnice osobnicze; zależy to przede wszystkim od kąta pochylenia promienia środkowego.

Pantomografię pomimo wielu zalet należy uznać za badanie przesiewowe. „Odwzorowanie" poszczególnych części stawu jest zależne od grubości i syntopii uwidocznionej warstwy oraz typu budowy części twarzowej czaszki. Zastosowanie rentgenografii umożliwia ocenę jedynie bocznej powierzchni wyrostka kłykciowego żuchwy, co utrudnia dostrzeżenie wczesnych zmian patologicznych na powierzchniach stawowych. *Sztuk i wsp.* [20] w metodzie pantomografii spiralnej doceniają możliwość uzyskania dwuwymiarowych przekrojów oraz czynnościowego obrazowania stawu skroniowo-żuchwowego. Zaznaczają przy tym mniejszy niż w przypadku tomografii komputerowej koszt badania. Za wadę metody uznają konieczność wprowadzania korekty geometrycznej i brak możliwości przestrzennego obrazowania elementów stawu. Jako kontrpropozycję przedstawiają wysokiej rozdzielczości tomografię komputerową z użyciem skanu spiralnego z rekonstrukcją przestrzenną (3D). Technika umożliwia przestrzenne ukazanie stawu i dokonywanie pomiarów liniowych zgodnych z wartościami rzeczywistymi, obarczonymi błędem poniżej 0,1 mm.

Jäger i wsp. [21] polecają do oceny struktury kostnej elementów stawu, jego zwyrodnień i urazów badanie za pomocą tomografii komputerowej. *Różyło-Kalinowska* i *Różyło* [22] twierdzą, że wysokie złamania wyrostka kłykciowego i złamania przezgłówkowe powinny być diagnozowane za pomocą tomografii komputerowej w przekrojach czołowych. Natomiast *Jäger i wsp.* [21] uważają rezonans magnetyczny za najlepszą metodę do oceny krążka stawowego i tkanek miękkich.

Mało wartościową metodą uwidocznienia struktur anatomicznych stawu skroniowo-żuchwowego były uprzednio stosowane zdjęcia warstwowe konwencjonalne.

Dzięki pantomografii spiralnej poprzecznej możliwy jest optymalny wybór badanej warstwy stawu skroniowo-żuchwowego, najlepiej uwidaczniającej zmiany. Zdjęcie p-a stawów i załączony do aparatu oryginalny szablon umożliwiają precyzyjne określenie odległości międzystawowej (IJD). Znana odległość stawu skroniowo-żuchwowego od linii pośrodkowej ciała pozwala nastawić urządzenie na warstwę dostarczającą najwięcej szczegółów. Zdjęcia wykonane aparatem Cranex–Tome są bardziej czytelne na skutek większej rozdzielczości lampy rentgenowskiej, zastosowania automatycznej wywoływarki, czułych filmów i kaset z ekranami wzmacniającymi z ziem rzadkich – co z kolei zmniejsza dawkę promieniowania do 40%. Niedogodnościami tej metody jest czas badania (od 45 minut do 1 godziny, zależny od programu i umiejętności personelu technicznego) oraz konieczność wykonania kilku projekcji w celu uzyskania najlepszego obrazu warstwy. Na jakość otrzymanych obrazów wpływają też błędy w ustawieniu głowy pacjenta. Zmęczenie długim czasem badania, dekoncentracja wywołana dolegliwościami, ogólny zły stan zdrowia lub zaawansowany wiek pacjentów sprzyjają zmianie pozycji czy poruszeniu się podczas pracy urządzenia. Przy wieloetapowości badania niewykluczone są też błędy osoby wykonującej badanie. Przy analizie niedogodności pracy z aparatem należy wspomnieć także o drobnych niedociągnięciach w ergonomii. Urządzenie posiada zbyt krótkie uchwyty dla pacjenta, co utrudnia zajęcie przez niego wygodnej pozycji. Podpórka stabilizująca nos jest niewygodna w użyciu. Aparat nie jest wyposażony w fotel ze stabilizacją podparcia pleców pacjenta, a próba wykonania zdjęcia w pozycji siedzącej jest niemożliwa z powodu zbyt małych przesuwów głowicy lampy. Sugestię przekazano producentowi, który rozważy możliwość

wydłużenia przesuwów ku dołowi, tak aby osoby starsze, niepełnosprawni (szczególnie na wózkach inwalidzkich), z problemami ortopedycznymi lub dzieci mogły korzystać z urządzenia. O istocie poruszanego problemu może świadczyć fakt, iż z powodu wymuszonej pozycji ciała podczas badania stawów (głowa pochylona ku dołowi, przyciągnięta do klatki piersiowej w pozycji stojącej) doszło u pacjenta do chwilowego omdlenia. O niedogodnościach spowodowanych długim czasem badania i pozycją pacjenta donosi także *Layng* [23], opisując bardzo zbliżony budową i funkcjami do Cranex–Tome aparat Scanora.

W badaniach radiologicznych przeprowadzonych za pomocą aparatu Cranex–Tome patologiczne zmiany w stawach stwierdzono u wszystkich chorych. Wstępna weryfikacja i dobór pacjentów do diagnostyki rentgenowskiej przeprowadzony za pomocą wskaźnika Helkimo miały swoje przełożenie na nieprawidłowości stawowe uchwycone na zdjęciach. Były to przede wszystkim zmiany o charakterze zwyrodnieniowym: zgęszczenia i rozrzedzenia struktury warstwy korowej i gąbczastej głowy żuchwy, osteofity, spłaszczenie panewek i głów żuchwy, zwężenia i poszerzenia szpar stawowych oraz zwapnienia w jej obrębie świadczące pośrednio o zmianach zwyrodnieniowych krążka stawowego. Na podstawie zdjęć czynnościowych zarówno warstwowych, jak i skanograficznych można było stwierdzić ograniczenie ruchomości w stawach u zdecydowanej większości chorych (28 na 35 pacjentów), a także nadmierną ruchomość głów żuchwy dającą podstawy do rozpoznania dwóch zwichnięć i dwóch podwichnięć stawów. Zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe w stawach zdarzały się rzadko i nie sprawiały problemów diagnostycznych. Znacznie częściej spotykano się z procesami o nieznacznym stopniu zaawansowania. Zgromadzona przez tych pacjentów dokumentacja radiologiczna (najczęściej pantomogramy i zdjęcia wg Schüllera) ze względu na niedoskonałość technik nie ukazywała zmian w stawach. Dopiero zdjęcia warstwowe uwidaczniały niewielkie, ale kluczowe informacje dla zdiagnozowania pacjentów. Nie bez znaczenia jest fakt, że w tomografii spiralnej poprzeczej aparatu Cranex–Tome usunięte zostają wszystkie zbędne cienie struktur rzutujących się na staw. Stwarza to możliwość precyzyjnej oceny części anatomicznych stawu i ich struktury kostnej.

W radiologicznej diagnostyce przedimplantologicznej wykorzystuje się techniki konwencjonalne – zdjęcia wewnątrzustne, pantomograficzne, telerentgnenogramy, zdjęcia zgryzowe żuchwy, techniki cyfrowe, rezonans magnetyczny i tomografię komputerową. Wprowadzenie techniki cyfrowej oraz ruchu spiralnego do pantomografii znacznie poprawiło możliwości diagnostyczne. Efektem połączenia wąskiego promienia centralnego i ruchu spiralnego lampy jest uzyskanie obrazów przekrojów kostnych o wysokiej kontrastowości i ostrości [1]. Zdjęcia tomograficzne poprzeczne dają możliwość znacznie dokładniejszego zobrazowania tkanki kostnej do celów implantologicznych. Umożliwiają one także ocenę wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki i części zębodołowej żuchwy. Ma to znaczenie przy planowaniu średnicy i długości implantu oraz powierzchni jego kontaktu z łożem kostnym [24]. Brak możliwości odczytu wymiaru policzkowo-językowego wyrostka jest wg wielu autorów podstawową wadą konwencjonalnych metod radiologicznych [13, 23, 24, 25, 26]. Średnia arytmetyczna różnic pomiarów wykonanych na zdjęciach pantomograficznych i warstwowych rzędu 1 mm pozwala wyciągnąć wniosek, że w 76,6% przypadków implant dobierany na podstawie analizy pantomogramu mógłby być w rzeczywistości o 0,5 mm lub nawet 1 mm dłuższy.

Na zdjęciach warstwowych poprzecznych bardzo dokładnie zaznaczone zostają istotne dla postępowania chirurgicznego struktury anatomiczne, takie jak kanał żuchwy, otwór bródkowy, dno zatoki szczękowej [26].

Yahia i wsp. [27] potwierdzają, że odpowiednie dopasowanie i dobór długości implantu warunkują prawidłową rehabilitację protetyczną pacjenta i wydłużają okres użytkowania wszczepów. Podkreślają przydatność tomografii konwencjonalnej liniowej do planowania zabiegu implantologicznego. Technikę tę wykorzystują do oceny struktur anatomicznych okolicy planowanego wszczepu, anomalii i patologii oraz gęstości kości.

Juodžbalys i wsp. [19] oraz *Okano* [24] zwracają uwagę na konieczność dokładnej analizy topografii kanału żuchwy z uwzględnieniem indywidualnych zmienności jego przebiegu [13, 28]. Zdjęcia warstwowe poprzeczne umożliwiają dokładną ocenę ułożenia kanału zarówno w stosunku do brzegu części zębodołowej żuchwy, jak i blaszki policzkowej oraz językowej trzonu żuchwy. Dostarczając więcej informacji niż pantomogramy, zmniejszają ryzyko urazów nerwu zębodołowego dolnego. Powikłanie to dotyczy 15% wszystkich przypadków implantologicznych [19]. Pantomogramy są przydatne dla implantologa przy ocenie ważnych struktur anatomicznych jak kanał żuchwy i otwór bródkowy [29]. *Arentowicz* podaje, że wymiar żuchwy na tym zdjęciu jest znacznie powiększony w stosunku do wymiarów rzeczywistych i zależy on od współczynnika powiększenia aparatu rentgenowskiego [30]. Do takiego samego wniosku doszła w swojej pracy *Graf* [31]. Z badań *Arentowicza* [30] wynika, że na zdjęciach pantomograficznych otwory bródkowe były widoczne w 68%, a kanał żuchwy – w 90% przypadków. Na zdjęciach pantomograficznych wykonanych aparatem Cranex–Tome otwory bródkowe po stronie prawej były widoczne w 76,9%, po lewej w 69,9%, a kanał żuchwy – odpowiednio w 92,3% i 84,6% przypadków. Różnice pomiędzy stroną prawą i lewą wynikały z subiektywnej oceny badającego, jego spostrzegawczości i doświadczenia, artefaktów, różnej jakości zdjęć i ich kontrastu.

Okano [24] podaje, że długość implantów oceniana na przedoperacyjnych tomogramach Scanory – aparatu bardzo podobnego do badanego w niniejszej pracy Cranex–Tome – w 70% przypadków pokrywała się z wynikami

otrzymanymi w postępowaniu chirurgicznym, co dowodzi znacznej przydatności tomografii poprzecznej w postępowaniu przedimplantologicznym. Porównując badania skanograficzne, pantomograficzne spiralne poprzeczne i pantomograficzne konwencjonalne najmniej precyzyjne okazują się pantomogramy konwencjonalne.

Lenglinger i wsp. [32] podkreślają dużą wartość diagnostyczną tomografii komputerowej Dental – CT, która znacznie dokładniej niż metody konwencjonalne ukazuje przebieg kanału żuchwy, wysokość i szerokość wyrostka zębodołowego. Za podstawową wadę zdjęć pantomograficznych i konwencjonalnych tomograficznych autor uważa niedokładności związane z koniecznością stosowania błon rentgenowskich. Za istotną zaletę techniki Dental – CT autor uważa generowanie obrazów w skali 1:1.

Okano [24] i *Abrahams* [33] badając użyteczność nowego programu tomografii komputerowej dla stomatologów DentaScan stwierdzają, że pozwala on na precyzyjną lokalizację kanału żuchwy, dna zatoki szczękowej, wysokości, szerokości i zarysu wyrostka zębodołowego oraz ukazuje jego wymiar policzkowo – językowy. Autorzy opisują szczególne trudności interpretacji obrazu TK w rzucie czołowym z powodu metali obecnych w jamie ustnej pacjenta. Wypełnienia amalgamatowe i niektóre uzupełnienia protetyczne niekorzystnie wpływają na obrazy uzyskane w tomografii komputerowej [13, 34, 35].

Według *Arentowicza,* kanał żuchwy na tomogramach komputerowych w płaszczyźnie pionowej widoczny jest około 70% [30]. Na tomogramach wykonanych aparatem Cranex–Tome kanał żuchwy po stronie prawej widoczny był w 92,3% przypadków, po lewej zaś w 100%. Różnice w wynikach między stroną lewą i prawą, podobnie jak przy ocenie na pantomogramach, wynikały być może z asymetrii w budowie żuchwy pacjenta, z różnej jakości zdjęć i ewentualnie z subiektywnej oceny badającego. *Abrahams* twierdzi, że techniki konwencjonalne w postępowaniu przedimplantologicznym są zbyt mało precyzyjne [13, 33]. Podobny pogląd wyraża *Lenglinger* [32].

Zdjęcie wewnątrzustne wykonywane techniką kąta prostego umożliwia ocenę szerokości łoża wszczepu oraz optyczną ocenę jakości kości. Wadą tej techniki są trudności z uzyskaniem przekroju poprzecznego wyrostka zębodołowego, trudności w prawidłowym ułożeniu filmu w jamie ustnej (ze względu na warunki anatomiczne wykonanie tej projekcji nie zawsze jest możliwe) oraz mały obszar obrazowanego pola [25, 34, 36, 37]. Zdjęcie wewnątrzustne w sposób istotny statystycznie zmniejsza wymiary wyrostka zębodołowego szczęki w okolicy siekaczy i trzonowców [31]. Zdjęcie cefalometryczne pozwala na uzyskanie profilowego obrazu czaszki, jednak jego znaczenie w implantologii jest ograniczone do oceny stosunków przestrzennych między szczęką a żuchwą. Boczne zdjęcie cefalometryczne pozwala uzyskać poprzeczny przekrój szczęki i żuchwy tylko w linii środkowej. Nie ma możliwości oceny struktury kości i jej wymiarów w pozostałych warstwach [24, 31, 38].

Kompromisem między wartością diagnostyczną, jakością i dostępnością mogą stać się zdjęcia spiralne warstwowe części zębodołowej żuchwy i wyrostka zębodołowego szczęki. Schemat postępowania diagnostycznego powinien obejmować zdjęcie pantomograficzne przeglądowe z naniesionymi za pomocą oryginalnego szablonu warstwami do badań tomograficznych. Środek szablonu należy umiejscowić na pantomogramie w linii pośrodkowej ciała, posiłkując się przy tym kolcem nosowym, szczeliną między zębami [11, 21 i 31, 41]. Na tym etapie badania możliwe są pewne niedokładności związane z przesunięciem siekaczy i określeniem linii pośrodkowej ciała. Mimo tego zdjęcia warstwowe poprzeczne spiralne wyrostka zębodołowego cechują się dobrą rozdzielczością i ostrością obrazowania warstwy, co umożliwia ocenę układu beleczek kostnych, grubości warstwy korowej kości, a także wizualizację dna zatoki szczękowej lub kanału żuchwy. Przy spiralnym obrocie lampy rentgenowskiej pantomografu najistotniejsze do oceny szczegóły pozostają w warstwie badanej. Pozostałe, dodatkowe informacje z otaczających tkanek są przez tą metodykę usuwane. Niedogodnością badania może okazać się czas trwania – nieco dłuższy niż przy pojedynczym zdjęciu pantomograficznym lub wewnątrzustnym. Nie bez znaczenia jest również unieruchomienie pacjenta w badanej pozycji na czas dłuższy niż przy metodach tradycyjnych. Te względne utrudnienia w badaniu rekompensuje jakość obrazu rentgenowskiego i możliwość dokładnej oceny struktury kostnej, co będzie miało znaczenie przy ocenie odległych wyników badań, np. osteointegracji implantu. *Markiewicz* i *Opalko* [26] uważają, że zdjęcia poprzeczne spiralne są szczególnie przydatne w implantologii, a pantomografia spiralna poprzeczna otwiera nową erę w radiologii szczękowo-twarzowej. Do skomplikowanych przypadków zalecają jednak tomografię komputerową DentaScan. Na korzyść aparatu Cranex–Tome przemawia mała dawka promieniowania jonizującego.

Wnioski

1. W diagnostyce stawu skroniowo-żuchwowego pantomografia spiralna jest bardziej skuteczna od konwencjonalnej, umożliwia uzyskanie ostrego, kontrastowego obrazu tworzących go struktur anatomicznych i zmian patologicznych w różnych przekrojach, zależnych od kąta padania promieni rentgenowskich. W badaniu tym usunięte zostają wszystkie zbędne cienie struktur rzutujących się na staw.

2. Aparat Cranex–Tome jest bardzo przydatny w przedoperacyjnej diagnostyce implantologicznej, gdyż uwidacznia istotne struktury anatomiczne takie jak: dno zatoki szczękowej, otwór bródkowy, kanał żuchwy. Dokonane w oparciu o zdjęcia warstwowe poprzeczne pomiary wysokości i szerokości wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy pozwoliły z dużą dokładnością na wybranie implantu odpowiedniej długości i średnicy.

Piśmiennictwo

1. *Wilk G., Szumin P., Sych Z., Hahs Z.*: Tomografia spiralna poprzeczna aparatu Cranex–Tome w diagnostyce stawu skroniowo-żuchwowego i implantologii. Część II – diagnostyka przedimplantologiczna. Mag. Stom. 2001, 4, 18–24.
2. *Wilk G., Frączak B., Szumin P., Hahs Z.*: Tomografia spiralna aparatu Cranex–Tome w diagnostyce chorób stawu skroniowo-żuchwowego i implantologii. Część I – staw skroniowo-żuchwowy. Mag. Stom. 2000, 6, 52–56.
3. *Gray R.J.M., Davies S.J., Quayle A.A.*: Patologia układu mięśniowo-stawowego narządu żucia w ujęciu klinicznym. Sanmedica. Warszawa 1996, pp. 14–15, 22–23, 25–28, 37–40.
4. *Karolakowska W., Durko A.*: Dysfunkcje narządu żucia występujące u chorych z samoistnymi bólami głowy. Prot. Stom. 1991, 41, 1, 18–23.
5. *Kubecka A., Baron S.*: Ocena wpływu braków zębowych na czynność stawów skroniowo-żuchwowych. Czas. Stom. 1996, 49, 2, 128–131.
6. *Magas A., Koralewski M., Łakomski J.*: Ocena stanu stawu skroniowo-żuchwowego ważnym elementem w badaniu jamy ustnej. Poznańska Stom. 1991, 65–69.
7. *Ey-Chmielewska H., Cieślińska-Wilk G., Frączak B.*: Leczenie dysfunkcji stawu skroniowo-żuchwowego na podstawie kompleksowej diagnostyki rentgenowskiej i ultrasonograficznej. Część I. Prot. Stom. 1994, 44, 2, 71–73.
8. *Baron S., Herman J., Wojtyna J.*: Próba zastosowania techniki obrazowania USG w diagnostyce i leczeniu dysfunkcji stawów skroniowo-żuchwowych. Czas. Stom. 2001, 54, 11, 737–741.
9. *Kaczmarczyk-Stachowska A., Knychalska-Karwan Z., Chomszyn-Gajewska M., Fijał D., Franaszek E., Gawrzewska B. et al.*: Zaburzenia w stawie skroniowo-żuchwowym i ich zależność od potrzeb protetycznych. Czas. Stom. 1990, 53, 10, 583–586.
10. *Mlosek K., Żochowska E.*: Zagadnienia kliniczne a współczesna diagnostyka wizualizacyjna stawu skroniowo-żuchwowego – cz. I. Medycyna 2000, 1994, 49/50, 5, 46–50.
11. *Ey-Chmielewska H.*: Próba zastosowania techniki ultrasonograficznej do potwierdzenia diagnozowania, planowania i obserwacji odległych wyników leczenia dysfunkcji bólowych stawów skroniowo-żuchwowych. Ann. Med. Univ. Stetin. 1998, 44, 223–236.
12. *Williamson R.A., McNamara D., McAuliffe W.*: True eminectomy for internal dearangement of the temporomandibular joint. Br. J. Oral Maxillofacial Surg. 2000, 38, 554–560.
13. *Abrahams J.J.*: The role of diagnostic imaging in dental implantology. Radiologic Clinics of North America. 1993, 31, 1, 163–180.
14. *Sawicki F.*: Elementy statystyki dla lekarzy. PZWL, Warszawa 1982.
15. *Mlosek K., Żochowska E., Dorosz M., Zaniewska-Krakowiak E.*: Wybrane zagadnienia z kliniki i współczesnej diagnostyki wizualizacyjnej stawów skroniowo-żuchwowych. Czas. Stom. 1994, 47, 1, 56–62.
16. *Cieślińska-Wilk G., Ey-Chmielewska H., Frączak B.*: Badania ultrasonograficzne w diagnostyce artropatii stawów skroniowo-żuchwowych. Prz. Stom. Wieku Rozw. 1998, 21, 39–45.
17. *Laskin D.M., Greene C.*: Technologiczne metody diagnozowania i leczenia zaburzeń skroniowo-żuchwowych. Quintessence, 1994, 2, 5, 337–341.
18. *Roberts-Harry D., Carmichael F.A.*: Applications of Scanora multimodal maxillofacial imaging in orthodontics. Br. J. Orthod. 1998, 25, 15–20.
19. *Juodžbalys G., Kubilius R., Sabalys G.*: Studium urazów nerwu zębodołowego dolnego i jego uszkodzenia podczas implantacji. Implantoprotetyka, 2001, 2, 3–4, 16–21.
20. *Sztuk S., Urbanik A., Stypułkowska J.*: Obrazowanie czynnościowe struktur kostnych stawów skroniowo-żuchwowych z użyciem rekonstrukcji trójwymiarowej tomografii komputerowej. Pol. Prz. Radiol. 2001, 66, 1, 21–24.
21. *Jäger L., Rammelsberg P., Reiser M.*: Bildgebende Diagnostik der Normalanatomie des Temporomandibulargelenks. Radiologe, 2001, 41, 734–740.
22. *Różyło-Kalinowska I., Różyło K.T.*: Wzorzec zastosowania technik obrazowania w diagnostyce złamań żuchwy. Pol. Prz. Radiol. 2001, 66, 3, 80–83.
23. *Layng H.F.*: Scanora: a new perspective in dental radiology. Radiography, 1998, 4, 1, 33–40.
24. *Okano T.*: Imaging strategy in dental implantology. Oral Radiol. 1996, 12, 2, 149–160.
25. *Batenburg R.H.K., Meijer H.J.A., Geraets W.G.M., van der Stelt P.F.*: Radiographic assessment of changes in marginal bone around endosseous implants supporting mandibular overdentures. Dentomaxillofacial Radiol. 1998, 27, 221–224.
26. *Markiewicz H., Opalko K.*: Wartość diagnostyczna zdjęć pantomograficznych w stomatologii. Twój Mag. Med. 2001, 12, 5–11.
27. *Yahia H.I., Mohsen A., Stanley F.K.*: Conventional linear tomography: Protocol for assessing endosseous implant sites. J. Prosthetic Dent. 1995, 73, 2, 153–157.
28. *Ito K., Gomi Y., Sato S., Arai Y., Shinoda K.*: Clinical application of a new compact CT system to assess 3-D images for the preoperative treatment planning of implants in the posterior mandible. Clin. Oral Impl. Res. 2001, 12, 539–542.
29. *Arentowicz G., Mierzwa A., Kowalik S.*: Przydatność tomografii w badaniach struktury żuchwy. Czas. Stom. 1994, 47, 4, 287–289.
30. *Arentowicz G.*: Optymalizacja diagnostyki radiologicznej przedoperacyjnej i stosowania wszczepów stomatologicznych wewnątrzkostnych. Pom. Akad. Med., Szczecin 1995, p. 58–61.
31. *Graf A.*: Ocena różnych metod badania radiologicznego szczęk w planowaniu implantologicznym. [Maszynopis powielany]. Pom. Akad. Med., Szczecin 1994, p. 6–7, 44–45.
32. *Lenglinger F.X., Muhr T., Krennmair G.*: Dental – CT: Untersuchungstechnik, Stralenbelastung und Anatomie. Radiologe, 1999, 39, 1027–1034.
33. *Abrahams J.J.*: Anatomy of the jaw revisited with a dental program. Am. J. Neuroradiol., 1993, 14, 4, 979–990.
34. *Kubani M.*: Ocena przydatności wybranych badań radiologicznych w planowaniu leczenia implantologicznego. [Maszynopis powielany]. Akad. Med., Warszawa 2000.
35. *Kaeppler G., Meyle J., Schulte W.*: Radiographic imaging of the hard palate and maxillary third molars with spiral tomography: A novel technique of patient positioning. Quintessence Int. 1996, 27, 455–463.
36. *Kowalik S.*: Aktualności implantologiczne – przegląd piśmiennictwa za 1999 rok. Czas. Stom. 2000, 53, 5, 304–310.
37. *Opalko K., Markiewicz H.*: Zdjęcia rentgenowskie wewnątrzustne w diagnostyce stomatologicznej. Twój Mag. Med. 2001, 12, 12–18.
38. *Verhoeven J.W., Cune M.S.*: Oblique lateral cephalometric radiographs of the mandible in implantology: usefulness and accuracy of the technique in height maesurements of mandibular bone in vivo. Clin. Oral Impl. Res. 2000, 11, 39–43.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 75–78
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 75–78
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

MARZENA BANDURA, KRYSTYNA OPALKO

ZAWARTOŚĆ FLUORKÓW I MAGNEZU W ZĘBACH STAŁYCH U DZIECI I MŁODZIEŻY Z KONSTYTUCJONALNIE WOLNYM PRZEBIEGIEM WZRASTANIA I ROZWOJU

CONTENT OF FLUORIDE AND MAGNESIUM IN PERMANENT TEETH OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH CONSTITUTIONAL DELAY OF GROWTH AND DEVELOPMENT

Zakład Propedeutyki Stomatologii i Fizykodiagnostyki Stomatologicznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Krystyna Opalko*

Summary

Introduction: The objective of this study was to determine the content of fluorides and magnesium in permanent teeth of children and adolescents with constitutional delay of growth and development (CDGD) and to correlate the findings with susceptibility to caries.

Material and methods: Our study group consisting of 20 patients with CDGD, aged 11 to 20 years, was compared with an age-matched control group of 20 normal subjects. Dentition status was assessed according to the average DMFs score. Acid biopsy of enamel on the labial surface of incisors was done to measure the content of calcium, magnesium, and fluorides. CDGD patients demonstrated a higher average DFs value and less permanent teeth than their normal counterparts.

Results: Microanalyses of enamel showed that the depth of the acid biopsy was similar in all subjects. The content of fluorides and magnesium in enamel was lower in patients with CDGD.

K e y w o r d s: constitutional delay of growth and development – fluorides – magnesium – caries.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było zbadanie zawartości fluorków i magnezu w zębach stałych u dzieci i młodzieży z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrostu i rozwoju (k.w.p.w. i r.) oraz porównanie wyników z podatnością na próchnicę.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono u 20 dzieci i młodzieży w wieku 11–20 roku życia z k.w.p.w. i r. oraz o prawidłowym rozwoju. Badanie kliniczne polegało na ocenie stanu uzębienia przy zastosowaniu średniej liczby PUW_p. Oznaczenie zawartości wapnia, magnezu i fluorków u wszystkich badanych wykonano biopsją kwasową szkliwa z wargowej powierzchni siekaczy. U dzieci z k.w.p.w. i r. średnia liczba PW_p jest wyższa przy jednocześnie niższej średniej liczbie zębów stałych.

Wyniki: Na podstawie analiz mikroprób szkliwa stwierdzono, że głębokość trawienia szkliwa była podobna u wszystkich osób. Natomiast zawartość fluorków i magnezu była niższa u badanych z k.w.p.w. i r.

H a s ł a: konstytucjonalnie wolny wzrost i rozwój – fluorki – magnez – próchnica.

Wstęp

Prawidłowy przebieg wzrastania i rozwoju zależy od trzech głównych czynników warunkujących osiągnięcie charakterystycznego dla danej osoby wzrost ostatecznego.

Wspomniane czynniki to genetyczny, hormonalny i środowiskowy. Indywidualny dla każdego osobnika tor

wzrostu ma podłoże genetyczne. Istotne znaczenie ma tu stwierdzenie, że pewne uwarunkowania proporcji wzrostu kostnego mieszczą się w chromosomie X, a gen odpowiedzialny za wydzielanie hormonu wzrostu mieści się na ramieniu długim chromosomu [6].

Hormonalne czynniki wpływające na dojrzewanie szkieletowe i wzrost somatyczny to: hormon wzrostu, hormony tarczycy, hormony płciowe, insulina, steroidy nadnerczowe, parahormon i inne.

Potencjał wzrostowy w danym wieku chronologicznym jest niejako wpisany w wiek kostny. Wiek ten określany jest na podstawie badania radiologicznego nasad kości długich. Wynik tego badania pozwala prognozować możliwości dalszego wzrostu badanych pacjentów. Na podstawie badań densytometerycznych całego szkieletu lub odcinka lędźwiowego u chłopców z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju (k.w.p.w i r.) udowodniono, że gęstość mineralna kośćca jest niższa w porównaniu do norm dla prawidłowo rozwijających się rówieśników [3].

Czynniki środowiskowe, psychosocjalne oraz intensywność wykonanych ćwiczeń odgrywają również ważne znaczenie w rozwoju fizycznym dzieci. Niedobory jakościowe i ilościowe diety mogą wpływać na obniżenie toru wzrastania oceny wzrostu i rozwoju [6].

Ocenę wzrostu i rozwoju przeprowadza się za pomocą siatek centylowych. Im bardziej wyniki pomiarów wzrostu są odległe od właściwego zakresu, tym istnieje większe prawdopodobieństwo, że wzrost jest nieprawidłowy, siatki ukazują aktualny rozkład pomiarów w danej populacji.

W celu wykrycia ewentualnych nieprawidłowości dotyczących wzrostu należy porównywać wartości pomiarów po pełnym roku od ostatniego badania.

Dzieci z k.w.p.w. i r. stanowią ok. 1/3 zgłaszających się do pediatry endokrynologa z powodu niskiego wzrostu. Rozpoznanie k.w.p.w. i r. musi być oparte na dokładnym wywiadzie osobniczym i rodzinnym oraz na przeprowadzeniu badań laboratoryjnych (morfologii, OB, badaniu ogólnego, moczu, jonogramu z oznaczeniem Ca i P, mocznika, proteinogramu) w celu wykluczenia chorób mogących być przyczyną opóźnienia wzrostu.

Dzieci o tym typie wzrastania mają prawidłową masę ciała i długość przy urodzeniu. Rosną prawidłowo przez kilka pierwszych miesięcy, a czasem do 1–2 roku życia, około 2–3 roku życia bez konkretnej przyczyny zmniejsza się tempo wzrastania. Wówczas wzrost dziecka obniża się do poziomu 3 centyla i poniżej. Wiek kostny jest opóźniony i zazwyczaj zgodny z wiekiem wzrostowym. W kolejnych latach życia tempo wzrastania jest w dolnych granicach normy, ok. 5 cm lub nieco więcej na rok.

Wzrastanie odbywa się do czasu zamknięcia nasad kości długich. W przypadku k.w.p.w.i r. może ono trwać do 20 roku życia, a nawet dłużej. Osoby z rozpoznanym k.w.p.w.i r. osiągają więc wzrost w granicach normy w wieku późniejszym.

Pacjenci z k.w.p.w.i r. z reguły nie wymagają leczenia, ale w pewnych przypadkach mogą być stosowane przez kilka miesięcy lecznicze dawki steroidów anabolicznych. Na podstawie dotychczasowych badań trudno jest określić, czy pacjentów z k.w.p.w.i r. charakteryzuje tylko inny wariant prawidłowego wzrastania, czy powinien być uznany za patologiczny.

Badania densytometryczne szkieletu potwierdzają niższą gęstość mineralną kośćca w odniesieniu do norm dla prawidłowo rozwijających się rówieśników.

W pracy tej postanowiono ocenić stan zdrowotny zębów oraz określić zawartość mineralną powierzchniowej warstwy szkliwa. W porównaniu do dzieci rozwijających się prawidłowo.

Celem badań było oznaczenie zawartości wapnia, magnezu i fluorków w powierzchniowej warstwie szkliwa zębów stałych u dzieci i młodzieży z k.w.p.w.i r oraz porównanie wyników z podatnością na chorobę próchnicową.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 20 dzieci i młodzieży w wieku od 11 do 20 roku życia z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju (k.w.p.w.i r.). Dzieci te stanowiły grupę badaną, w której wyodrębniono dwie podgrupy: dla wieku 11–14 lat i dla wieku 15–20 lat. Badane osoby to pacjenci Przyklinicznej Poradni Fizjopatologii Rozwoju Katedry Chorób Dzieci PAM w Szczecinie. Trafiły one do poradni z powodu niskiego wzrostu. Rozpoznania dokonano na podstawie wywiadu rodzinnego, analizy charakterystycznego przebiegu krzywych centylowych wzrastania oraz po wykluczeniu chorób powodujących zaburzenia wzrastania i rozwoju, a także nieprawidłowości hormonalnych. Żadne z dzieci i młodzieży nie było poddawane długotrwałej terapii hormonalnej.

Do grupy kontrolnej wybrano 20 dzieci i młodzieży w tym samym wieku metrykalnym jak dzieci w grupie badanej. Również tutaj wyodrębniono dwie podgrupy: dla wieku 11–14 lat i dla wieku 15–20 lat. Osoby wybrano losowo spośród pacjentów zgłaszających się na badania kontrolne do gabinetu stomatologicznego. Prawidłowość wzrostu i rozwoju fizycznego dzieci w grupie kontrolnej oceniono na podstawie pomiarów wysokości i masy ciała [6].

Stan kliniczny uzębienia określano na podstawie liczb PUWp [5, 8].

Dla oznaczenia zawartości wapnia, magnezu i fluorków u wszystkich wykonano biopsję kwasową szkliwa z wargowej powierzchni siekacza [1]. Zawartość fluorków w próbkach oznaczano za pomocą jonoselektywnej elektrody fluorkowej firmy Orion. Zawartość wapnia i magnezu oznaczano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej.

Analizę chemiczną badanych pierwiastków wykonano w Katedrze Biochemii i Chemii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.

Prace przeprowadzono po uprzednim otrzymaniu zgody zarówno od komisji Bioetycznej PAM jak również od rodziców badanych dzieci.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując test Shapiro–Wilka.

Wyniki

Badanie kliniczne stanu uzębienia przeprowadzone u pacjentów z obu grup ujawniły zdecydowanie większą średnią liczbę powierzchni zębów stałych objętych procesem próchnicowym u dzieci z k.w.p.w. i r. (grupa badana) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Oceniając średnią liczbę powierzchni zębów z próchnicą i powierzchni wypełnionych w zębach stałych, stwierdzono, że u pacjentów z k.w.p.w. i r. liczba ta wyniosła 9,8, podczas gdy w grupie kontrolnej 7,5 (tab. 1).

Tabela 1. **Średnia liczba powierzchni zębowych z próchnicą i wypełnieniem (PW_p) u badanych w grupie I i II**

Table 1. **Mean number of tooth surfaces with decay and filling (DF_s) in the study and control groups**

Parametr / Parameter	Grupa / Group		Poziom istotności różnicy / Significance
	I (kontrolna / control)	II (badana / study)	
Liczba badanych / Number of subjects	20	20	---
Średnia liczba powierzchni zębów stałych / Mean number of surfaces of permanent teeth	133,0 ± 0,86	128,5 ± 0,74	< 0,05
Średnia liczba P_p / Mean D_s value	3,5 ± 0,69	6,0 ± 1,09	< 0,05
Średnia liczba W_p / Mean F_s value	4,1 ± 1,35	3,8 ± 0,98	n.s.
Średnia liczba $P_p + W_p$ / Mean $D_s + F_s$ value	7,5 ± 1,48	9,8 ± 1,26	n.s.

P_p – powierzchnie zębów z próchnicą / D_s – tooth surface with decay
W_p – powierzchnie zębów z wypełnieniem / F_s – tooth surface with filling
n.s.– różnica nieistotna statystycznie / not significant

Jak wynika dalej z tabeli 1, najwyższą wartość, wśród składowych liczb PW_p, osiągnęła liczba P_p u dzieci z k.w.p.w. i r. Średnia liczba P_p u tych dzieci wynosiła 6,0, podczas gdy u dzieci z grupy kontrolnej wartość ta była prawie o połowę niższa i wynosiła 3,5. Różnica pomiędzy tymi wartościami okazała się znamienna statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Druga składowa liczb PW_p to liczba W_p oznaczająca ilość powierzchni zębów wypełnianych. Tutaj różnica nie była istotna, a średnia liczba W_p 3,8 była niższa u dzieci z k.w.p.w. i r. w porównaniu ze średnią liczbą W_p 4,1 charakteryzującą uzębienie dzieci o prawidłowym przebiegu wzrastania i rozwoju.

U dzieci z obu grup nie stwierdzono usuniętych zębów z powodu próchnicy, w związku z tym nie brano pod uwagę trzeciej składowej liczb PUW, czyli U_p oznaczającej ilości powierzchni zębów usuniętych z powodu próchnicy.

Znamiennie statystyczna różnica, przy poziomie istotności $p < 0,05$, wystąpiła również między średnią liczbą zębów stałych u dzieci grupy badanej w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej. Z danych dotyczących średniej liczby zębów stałych wynika, że przeciętne dziecko z grupy kontrolnej posiadało 26,6 zębów stałych, natomiast dziecko z k.w.p.w. i r. miało ich 25,7 (tab. 2).

Tabela 2. **Średnia liczba zębów stałych oraz średnia liczba zębów z próchnicą i wypełnieniem (PW_z) u badanych w grupie I i II**

Table 2. **Mean number of permanent teeth and mean number of teeth with decay or filling (DF_t) in both groups**

Parametr / Parameter	Grupa / Group		Poziom istotności różnicy / Significance
	I (kontrolna / control)	II (badana / study)	
Liczba badanych / Number of subjects	20	20	---
Średnia liczba zębów stałych / Mean number of permanent teeth	26,6 ± 0,86	25,7 ± 0,74	< 0,05
Średnia liczba P_z / Mean D_t value	2,9 ± 0,54	5,2 ± 0,87	n.s.
Średnia liczba W_z / Mean F_t value	3,1 ± 0,79	3,1 ± 0,71	n.s.
Średnia liczba $P_z + W_z$ / Mean $D_t + F_t$ value	5,9 ± 0,90	8,2 ± 0,91	n.s.

P_z - zęby z próchnicą / D_t – tooth with decay
W_z - zęby z wypełnieniem / F_t – tooth with filling
n.s.- różnica nieistotna statystycznie / not significant

Stwierdzono więc, że u dzieci z grupy badanej średnia liczba PW_p jest wyższa przy jednocześnie niższej średniej liczbie zębów stałych wyrżniętych w porównaniu z dziećmi grupy kontrolnej.

Tabela 3 prezentuje wyniki średnie masy szkliwa i głębokości pobranych mikroprób. Jak wynika z przedstawionych danych, masa pobranego szkliwa z zębów siecznych obu grup badanych była prawie taka sama.

Uzyskane zbliżone głębokości trawienia powierzchniowej warstwy szkliwa, u badanych osób z obu grup, mogą świadczyć o podobnej odporności szkliwa na działanie kwasów. Trudno wytłumaczyć, dlaczego u osób z grupy badanej stwierdzono wyższą średnią liczbę zębów z próchnicą.

Zbadano zawartość fluorków oraz magnezu w powierzchniowej warstwie szkliwa. Przedstawiono to w tabeli 4. Jak można zauważyć, najwyższą średnią zawartość fluorków – 36,1 mmol/kg stwierdzono u młodzieży z grupy kontrolnej, najniższą – 22,9 mmol/kg w szkliwie zębów u dzieci grupy badanej. Średnia zawartość magnezu była również niższa w grupie badanej, zarówno u dzieci, jak i u młodzieży.

Magnez jako jeden z nielicznych pierwiastków nie jest wbudowany w strukturę kryształu hydroksyapatytu, lecz jest absorbowany na jego powierzchni. [7]

Uzyskana jednak niższa zawartość fluorków i magnezu (nieistotna statystycznie) w powierzchniowej warstwie szkliwa w grupie badanej mogłaby wskazywać na zmniejszoną odporność szkliwa na działanie kwasów.

Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest jednoznacznie wyjaśnić, dlaczego przy niższej zawartości fluorków i magnezu w powierzchniowej warstwie

Tabela 3. **Średnia masa szkliwa i średnia głębokość trawienia w powierzchniowej warstwie szkliwa zębów stałych u badanych w grupie I i II**

Table 3. **Mean enamel mass collected and mean depth of acid biopsy of permanent teeth in both groups**

Parametr / Parameter	Grupa / Group					
	I (kontrolna / control)			II (badana / study)		
Wiek / Age	11–14	15–20	razem / total	11–14	15–20	razem / total
Masa szkliwa / Enamel mass (µg ± SD)	16,1 ± 3,24	16,7 ± 2,45	16,5 ± 1,97	16,0±1,21	16,5±1,55	16,3±1,17
Głębokość trawienia / Biopsy depth (µm ± SD)	2,3 ± 0,46	2,3 ± 0,35	2,3 ± 0,28	2,3±0,17	2,3±0,22	2,3±0,16

Brak różnic istotnych statystycznie / Differences not significant

Tabela 4. **Średnia zawartość fluorków i magnezu w powierzchniowej warstwie szkliwa zębów stałych u badanych w grupie I i II**

Table 4. **Mean content of fluorides and magnesium in the superficial layer of enamel of permanent teeth in both groups**

Parametr / Parameter	Grupa / Group					
	I (kontrolna / control)			II (badana / study)		
Wiek / Age	11–14	15–20	razem / total	11–14	15–20	razem / total
Fluorki mmol/kg szkliwa ± SD / Fluorides (mmol/kg enamel ± SD)	26,7±6,36	36,1±6,03	33,6±4,76	22,9±2,42	24,9±2,55	24,4±1,96
Magnez mmol/kg szkliwa ± SD / Magnesium (mmol/kg enamel ± SD)	88,5±11,11	99,8±13,17	96,9±10,18	67,1±3,24	87,3±6,52	82,0±5,26

Brak różnic istotnych statystycznie / Differences not significant

szkliwa osób z grupy badanej podatność na działanie kwasu jest podobna jak w grupie kontrolnej. Niższa zawartość fluorków koresponduje z większą podatnością zęba na próchnicę. Wiadomo, że na zawartość fluorków, w powierzchniowej warstwie szkliwa ma wpływ wiele czynników. *Kirkegaard* nie przypisuje istotnej roli poziomowi fluorków w najbardziej powierzchniowej warstwie szkliwa do 5 µm grubości. Bardziej miarodajny wydaje się według tego autora przyrost poziomu fluorków w głębszych warstwach szkliwa (15–20 µm) [cyt. za 2].

Wielu autorów potwierdza, że zawartość fluorków w najbardziej zewnętrznej warstwie szkliwa nie koresponduje z odpornością na próchnicę [2].

Stwierdzona taka sama odporność szkliwa na działanie kwasów nie została potwierdzona tą samą zawartością fluorków w szkliwie u obu grup badanych.

Rola fluorków i magnezu w rozwoju procesu próchnicowego do dziś nie została do końca wyjaśniona. Badania potwierdzają, że fluorki powinny znaleźć się w codziennych zabiegach profilaktycznego oczyszczania zębów [4].

Zbyt mała liczba zbadanych nie pozwala na wysunięcie ostatecznych wniosków, tym niemniej należy zwrócić uwagę, że jakiekolwiek zaburzenia mineralizacji kośćca u dzieci i młodzieży mają odzwierciedlenie w zaburzonej strukturze szkliwa zębów.

Wnioski

1. Wykonane badania ujawniły większą podatność szkliwa zębów na próchnicę przy mniejszej średniej liczbie zębów wyrzniętych u osób z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju. Takie osoby powinny zostać objęte specjalną opieką stomatologiczną.

2. U osób w grupie badanej stwierdzono niższą średnią zawartości fluorków i magnezu w badanej warstwie szkliwa przy zbliżonej masie pobranego szkliwa (głębokości trawienia).

Piśmiennictwo

1. *Bandura M.*: Zawartość wapnia, magnezu i fluorków w uzębieniu stałym u dzieci i młodzieży z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju oraz jego kliniczna i radiologiczna ocena. [Maszynopis powielany], Pom. Akad. Med., Szczecin 2000.
2. *Jańczuk Z., Opalko K., Lisiecka K., Domżalska E.*: Zaburzenia mineralizacji szkliwa u dzieci poddanych profilaktyce fluorkowej próchnicy zębów. Badania poziomu fluorków w szkliwie, ślinie i moczu. Czas. Stom., 1984, 37, 10, 735–737.
3. *Krupa B.*: Ocena gęstości mineralnej kośćca i wybranych wskaźników metabolizmu kostnego u chłopców z konstytucjonalnie wolnym przebiegiem wzrastania i rozwoju. [Maszynopis powielany], Pom. Akad. Med., Szczecin 1998.
4. *Łagocka R., Jakubowska K., Opalko K., Chlubek D.*: Content of fluoride soluble and insoluble in potassium hydroxide in superficial layers of enamel in adults regularly using fluoride-supplemented toothpaste. The XXIIIrd World Conference of the International Society for Fluoride Research, Abstract, Szczecin, 2000, 88.
5. *Obersztyn A.*: Rodzaje i mianownictwo badań epidemiologicznych nad próchnicą zębów. Czas. Stom., 1973, 6, 577–581.
6. *Romer T.E.*: Zaburzenia hormonalne u dzieci i młodzieży. Omnitech Press, Warszawa 1993, p. 65–73.
7. *Weatherell J.*: Composition of dental enamel. Bt. Med. Bull. 1975, 31, 115-119.
8. World Health Organisation: Oral Health Surveys Basic Methods. Genewa, 1986.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 79–82
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 79–82
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

MAGDALENA SROCZYK[1], FRANCISZEK BIENIA[2], KRYSTYNA OPALKO[1], MAREK LESIAKOWSKI[3]

OCENA W SKANINGOWYM MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM KSZTAŁTU I STRUKTURY ŚCIANY BRUZDY W ZAKRESIE SZKLIWA PO ZASTOSOWANIU ABRAZJI POWIETRZNEJ MSP (FIRMY ART-DENT)

SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC EXAMINATION OF THE SHAPE AND SURFACE OF ENAMEL FISSURES PREPARED WITH THE MSP AIR ABRASION METHOD OF ART-DENT

[1] Studium Doktoranckie Zakładu Propedeutyki i Fizykodiagnostyki Stomatologicznej PAM
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. *Krystyna Opalko*
[2] Instytut Technologii Maszyn i Automatyzacji Politechniki Wrocławskiej
ul. Łukasiewicza 5, 53-171 Wrocław
Kierownik: dr inż. *Zbigniew Smalec*
[3] Zakład Chirurgii Stomatologicznej PAM
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. *Leszek Myśliwiec*

Summary

Introduction: The specific structure of enamel fissures of molar teeth requires pre-treatment before a sealant can be effectively applied.

Material and methods: The air abrasion technique is gaining acceptance for this purpose. This study was undertaken to examine the effect of air abrasion on the shape and surface of fissures at three levels (entry, middle part and fundus).

Results: Compressed air mixed with aluminum oxide particles resulted in enlargement of the fissure. Microretention sites in the form of pits and hollows were discovered at all levels studied.

K e y w o r d s: scanning electron microscopy – air abrasion technique.

Streszczenie

Wstęp: Budowa bruzd zębów trzonowych nie pozwala na zabezpieczenie ich materiałem uszczelniającym bez uprzedniego przygotowania.

Materiał i metody: Coraz częściej stosuje się w tym celu metodę abrazji powietrznej. Celem pracy była ocena kształtu bruzdy poddanej abrazji powietrznej oraz ocena struktury ściany bruzdy w 3 miejscach (wlot, środek, dno bruzdy).

Wyniki: Używana w tej metodzie mieszanina sprężonego powietrza i tlenku glinu powoduje rozszerzenie bruzdy. Na wszystkich poziomach bruzdy powstają mikroretencje w postaci dołków i zagłębień.

H a s ł a: skaningowy mikroskop elektronowy – abrazja powietrzna.

Wstęp

Budowa bruzd zębów trzonowych nie pozwala na zabezpieczenie ich materiałem uszczelniającym bez uprzedniego przygotowania. Dotychczas polegało to na uprzednim opracowaniu bruzdy cienkim diamentowym wiertłem, tzw. lakowanie inwazyjne (*invasive sealing technique*) [1, 2, 3]. W ostatnim okresie coraz częściej stosuje się w tym celu metodę abrazji powietrznej (*air abrasion technique*). Polega ona na oczyszczeniu powierzchni mieszaniną sprężonego

powietrza i tlenku glinu, wyrzucaną z dyszy pod ciśnieniem około 10 atmosfer [4].

Celem pracy była ocena kształtu bruzdy poddanej abrazji powietrznej oraz ocena struktury ściany bruzdy w 3 miejscach: u wlotu, w środku, na dnie bruzdy, po uwzględnieniu przebiegu padania strumienia ścierniwa i energii kinetycznej cząsteczek tlenku glinu. Badania prowadzone były przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego typu Jeol JSM 6100.

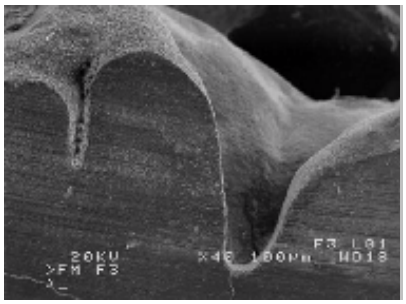
Materiał i metodyka

Badanie przeprowadzono na 4 usuniętych zębach trzonowych stałych. Do badań zakwalifikowano zęby zdrowe, usunięte z przyczyn chirurgicznych. Świeżo usunięte zęby umieszczono w roztworze soli fizjologicznej. Po osuszeniu bruzdy zębów opracowano przy użyciu abrazji powietrznej. Podczas tej czynności dysza piaskarki, mikropreparatora stomatologiczno-protetycznego MSP, utrzymywana była w odległości około 1–2 mm nad powierzchnią zęba, pod kątem 90° do powierzchni żującej. Strumień sprężonego powietrza i tlenku glinu prowadzony był wzdłuż bruzdy. Jako ścierniwo służył tlenek glinu o wielkości ziaren 50 μm. W ten sposób przygotowane zęby przecięto w poprzek bruzdy. Tarcza przecinająca miała szerokość 0,3 mm.

Opracowane powierzchnie napylono w próżni cienką warstwą stopu Au-Pd. Obrazy oglądano w skaningowym mikroskopie elektronowym typu Jeol JSM 6100 w powiększeniu ×40, ×50, ×2000, które następnie sfotografowano.

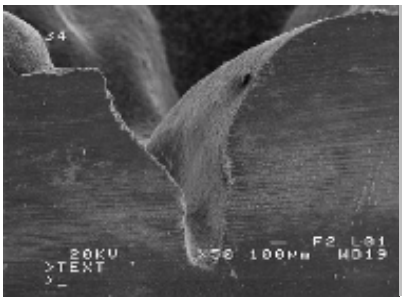
Wyniki

Po przecięciu zębów uzyskano 8 przekrojów. Powiększenie w SEM ×40 oraz ×50 pozwoliło dokonać oceny kształtu bruzdy, jaki uzyskano po zastosowaniu abrazji powietrznej. Używana w tej metodzie mieszanina sprężonego powietrza i tlenku glinu powoduje rozszerzenie bruzdy poprzez zniesienie powierzchownej warstwy szkliwa. Uzyskane bruzdy zakwalifikowano do typu V (ryc. 1) lub U (ryc. 2). Typy określają kształt bruzd.



Ryc. 1. Widoczne są dwie bruzdy, opracowano prawą. Bruzda znajdująca się po lewej stronie zdjęcia była niewidoczna w badaniu klinicznym (gołym okiem)

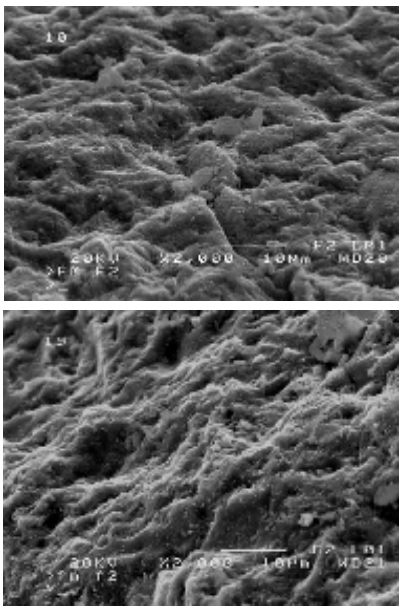
Fig. 1. Shown are two fissures, the right one after air abrasion, the left one undisclosed during visual examination by the dentist



Ryc. 2. Widoczna jest bruzda po opracowaniu MSP, którą zakwalifikowano do typu U

Fig. 2. Shown is a U-type fissure after MSP preparation

W powiększeniu ×2000 oceniono strukturę ściany bruzdy. Dokonano oceny w 3 miejscach – na dnie bruzdy, w środku, u wlotu (ryciny 3, 4).



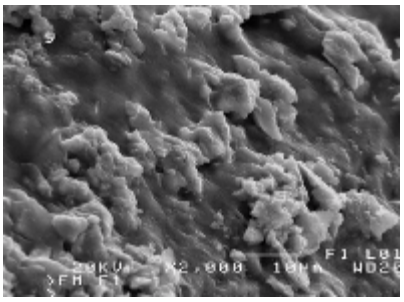
Ryc. 3, 4. Oba zdjęcia przedstawiają strukturę ściany bruzdy u wlotu. Powierzchnia w tym miejscu jest delikatnie „zniszczona", najbardziej przypomina powierzchnię nienaruszoną. Można zauważyć, że jest najbardziej oczyszczona (brak ziarnistości materiału ściernego)

Figs. 3 & 4. Surface of the fissure at its entry showing fine "destruction" but retaining its native appearance, apparently free of abrasive material (effective cleaning)

Na wszystkich poziomach bruzdy powstają mikroretencje w postaci dołków i zagłębień. Pomimo działania tego samego związku ściernego struktura bruzdy nie jest jednakowa w każdym miejscu ściany bruzdy.

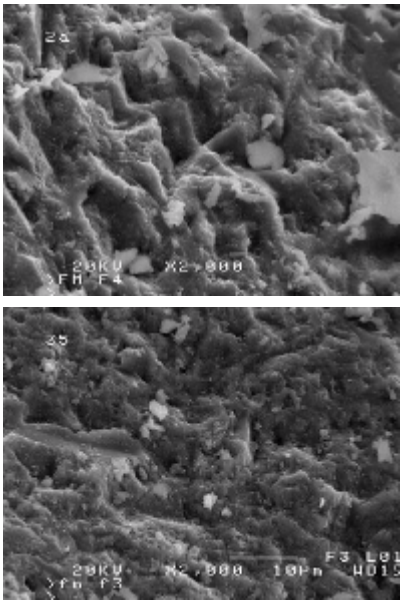
Na rycinie 5 przedstawiono strukturę szkliwa w środkowej części bruzdy. Mikroretencje w tym miejscu są bardziej widoczne niż na zdjęciach poprzednich. Zagłębienia te mogą zwiększać mechaniczną adhezję.

Na rycinach 6 i 7 przedstawiono strukturę ściany bruzdy na dnie. W tym miejscu powstaje największe „spustoszenie". Na dno bruzdy z największą siłą działa sprężona mieszanina (powietrza i materiału ściernego). Takie zróżnicowanie spowodowane jest różną prędkością tych cząsteczek. Energia kinetyczna cząsteczek tlenku gli-



Ryc. 5. Przedstawia strukturę ściany w środkowej części bruzdy. Wygląda jak „szkliwo wytrawione" albo hydroksyapatyt pozbawiony substancji organicznej

Fig. 5. Surface of the middle part of fissure resembling either "digested enamel" or hydroxyapatite without organic material



Ryc. 6, 7. Zdjęcia przedstawiają dno bruzdy. Na obu widoczne są liczne ziarnistości prawdopodobnie materiału ściernego i „startej" tkanki szkliwa

Figs. 6 & 7. Fundus of fissure revealing numerous adhering particles (abrasive material or abraded enamel)

nu powodująca oderwanie pryzmatów szkliwa jest w tym miejscu największa.

W każdym miejscu bruzdy widoczne są różnej wielkości ziarna startego materiału tkanek zęba i prawdopodobnie ścierniwa. Badania wyżej opisanych ziarnistości są kontynuowane.

Dyskusja

W żadnym z badanych obrazów nie zaobserwowano mikropęknięć szkliwa. Mikropęknięcia można zaobserwować po zastosowaniu zarówno mikrosilnika, jak i turbiny. Do pęknięć szkliwa dochodzi zwłaszcza przy stosowaniu małych obrotów, około 3000 obr/min [5, 6]. Ma to znaczenie zwłaszcza na granicy szkliwo–wypełnienie. W miejscu tym prowadzić to może do zmniejszenia utrzymania materiału i wystąpienia przecieku brzeżnego. W naszym badaniu na całej długości ściany bruzdy nie zaobserwowano uszkodzeń szkliwa w postaci mikropęknięć. Na całej powierzchni widoczne są mikroretencje. Najbardziej uwidocznione w części środkowej i na dnie. Powstałe mikroretencje zwiększają utrzymanie materiału w bruździe. Dobra retencja jest zapewniona zwłaszcza w jej środku i na dnie.

Jak pokazano na zdjęciach, odmienna jest struktura mikroretencji na 3 poziomach bruzdy (dno, środek, wlot). Najbardziej „zniszczone" jest dno. Spowodowane jest to największą ilością ścierniwa wyrzucaną z dyszy w strumieniu centralnym. Oddziaływanie w tym miejscu cząstek jest największe. Większa prędkość cząsteczek powoduje, że energia kinetyczna wyzwolona przez cząsteczkę zwiększa się i w związku z tym istnieje większa ścieralność szkliwa.

Mniejsza ilość tlenku glinu rozchodząca się na boki nie powoduje dużego zniszczenia struktury szkliwa. Rozejście strumienia na boki wyzwala mniejszą prędkość cząstki i w związku z tym energia kinetyczna jest mniejsza, powodując delikatniejsze zniszczenie struktury.

Niektórzy autorzy podają, że obraz taki przypomina szkliwo wytrawione, nazywane jest to mechanicznym trawieniem tkanek [7]. Z naszego badania wynika, że takie trawienie nie jest wystarczające, gdyż u wlotu bruzdy retencja w postaci dołków i rowków jest niewielka. Struktura ściany w tym miejscu przypomina prawidłowe szkliwo. Powodować to może nie wystarczające mechaniczne połączenie materiału wypełniającego ze szkliwem i z czasem doprowadzić do powstania szpary brzeżnej i mikroprzecieku. Można się domyślać, że istnieje konieczność dodatkowego wytrawienia lub stosownego bondu.

Kształt bruzdy ma znaczenie, jeśli chodzi o zabezpieczenie jej materiałem uszczelniającym. W przypadku bruzdy wąskiej nie ma takiej możliwości.

Badaniem klinicznym nie można stwierdzić, czy jest to bruzda typu IK czy długa i wąska [3, 5].

Opracowanie bruzdy metodą abrazyjną powoduje nadanie kształtu lejkowatego o zaokrąglonym dnie. Kształt taki umożliwia wpłynięcie materiału.

Przejście ściany pionowej w dno ubytku jest gładkie. Nie powoduje powstawania naprężeń mogących doprowadzić do zniszczenia wypełnienia lub zęba. Powstawanie niekorzystnych naprężeń pojawia się w przypadku pionowego przejścia ściany pionowej w dno [8]. Dodatkowym atutem opracowania bruzdy techniką abrazji jest usunięcie niewidocznej (niemożliwej do zbadania klinicznie) demineralizacji. Proces próchnicowy najczęściej rozpoczyna się na dnie i ścianach bocznych bruzdy, w miejscach niewidocznych w przypadku bruzd długich i wąskich.

Wnioski

1. Bruzdy po oczyszczeniu urządzeniem MSP nabierają kształtu lejkowatego o szerszym wlocie. Uzyskany

kształt przypominający na przekroju litery U lub V pozwala na dokładniejsze ich zbadanie i łatwiejszą penetrację materiału uszczelniającego.

2. Struktura ściany bruzdy różni się w zależności od prędkości padania ścierniwa i powstałej energii kinetycznej cząsteczek.

3. Każda bruzda, jak wynika z badań, powinna być poddana opracowaniu urządzeniem MSP przed jej uszczelnieniem.

Piśmiennictwo

1. Pa*ul-Stelmaszczyk M.*: Rodzaje bruzd na powierzchniach zgryzowych zębów bocznych – badania w SEM. Czas. Stom. 1997, 50, 3, 155–159.
2. *Paul-Stelmaszczyk M.*: Tendencje profilaktyczne w metodyce opracowywania i wypełniania ubytków klasy I w zębach bocznych. Czas. Stom. 1994, 47, 3, 174–176.
3. *Paul-Stelmaszczyk M.*: Wpływ kształtu bruzd oraz ich mechanicznego opracowania na stopień wypełninia lakiem w zębach bocznych. Obserwacje w mikroskopie skaningowym. Czas. Stom.1999, 52, 6, 361–365.
4. *Pękacka K., Pękacki P.*: Zastosowanie urządzenia do abrazji powietrznej MSP w stomatologii estetycznej. Twój Prz. Stom. 2002, 5, 19–22.
5. *Pawlicki P. et al.*: Powierzchnie żujące poddane i nie poddane szlifowaniu przed lakowaniem. Mag. Stom. 2000, 2, 52–54.
6. *Pawlicki P. et al.*: Ocena w SEM wpływu wierteł diamentowych na powierzchnie szkliwa w zależności od szybkości obrotów wiertaki lub turbiny. Czas. Stom. 1999, 52, 10, 653–658.
7. *Goldstein R.E., Parkins F.M.*: Air-abrasive technology; Its new role in restorative dentistry. J. Am. Dent. Assoc. 1994, 125, 551.
8. *Kupczyński P., Borkowski L., Postek-Stefańska L.*: Ocena struktury powierzchni twardych tkanek zębów opracowanych za pomocą piaskarki Air Flow prep K1 – badania w SEM. Stom. Współcz. 2002, 9, 4, 29–33.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 83–94
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 83–94
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

WOJCIECH GŁĄBOWSKI

OCHRONNE DZIAŁANIE CZYNNIKA WZROSTU KOMÓREK MACIERZYSTYCH (STEM CELL FACTOR – SCF) NA POZAUSTROJOWY ROZWÓJ ZARODKÓW MYSICH W OKRESIE PRZEDIMPLANTACYJNYM*

THE PROTECTIVE EFFECT OF STEM CELL FACTOR (SCF) ON IN VITRO DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS*

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. n. med. *Barbara Wiszniewska*

Summary

Introduction: The protective potential of stem cell factor (SCF) on preimplantation embryo development in vitro has not been well investigated.

Material and methods: The aim of the study was to determine the effect of SCF on preimplantation development in vitro of (1) frozen-thawed mouse embryos; (2) mouse embryos exposed to Fas-L. Female mice were stimulated intraperitoneally with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin. An injection of 5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) was given 48 hours later and the animals were mated. 40 hours after eCG injection, embryos at the stage of 2 blastomeres were flushed out of the fallopian tubes. Experiment 1: The two-cell embryos were randomly divided into 3 groups: (A) cultured in standard IVF medium (control); (B) frozen-thawed and cultured without SCF; (C) frozen--thawed and cultured in medium with SCF (100 ng/mL). Experiment 2: two-blastomere embryos were divided into 3 groups: (A) cultured in standard IVF medium (control); (B) cultured in standard IVF medium with Fas-L (500 ng/mL); (C) cultured in standard IVF medium with Fas ligand (500 ng/mL) and SCF (100 ng/mL). Culture was performed for 96 h in groups of 10 embryos in 50 µl droplets under mineral oil at 37°C and 5%CO_2. In both experiments the dynamics of embryo development, outgrown blastocyst rates, total blastocyst cell numbers (TBC) and blastocyst cell viability were analyzed. In experiment 2, TUNEL reaction was additionally performed to detect apoptosis of the blastocyst cells. Statistics was based on ANOVA and log-linear analysis with significance taken at $p < 0.05$.

Results: In experiment 1 significantly more hatched and outgrown blastocysts were noted in the control group when compared to embryos exposed or not exposed to SCF after thawing. Control embryos had better cell viability and higher TBC than in the remaining two groups. Blastocyst rates, TBC and cell viability in the frozen-thawed embryos cultured with and without SCF did not differ significantly. Log-linear analysis revealed that the dynamics of embryo growth was highest in control group, followed by thawed embryos cultured with SCF and finally by thawed embryos cultured without SCF.

In experiment 2, Fas-L decreased embryo growth, but the effect was not apoptosis-dependent as the TUNEL reaction in embryos exposed to Fas-L was only sporadically positive. The growth of embryos exposed to Fas-L was comparable to that observed in media enriched with both Fas-L and SCF. However, blastocysts grown in Fas-L enriched media had significantly smaller cell numbers (TBC) than when cultured in both Fas-L and SCF.

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Rafał Kurzawa*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 68 stron, 18 rycin, 2 tabele, 177 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Rafał Kurzawa* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 68 pages, 18 figures, 2 tables, 177 references.

Conclusions: SCF may improve the dynamics of post-thaw embryo development in vitro but not embryo quality. Fas-L deteriorates preimplantation embryo development in vitro. SCF seems to improve the quality of embryos exposed to Fas-L.

K e y w o r d s: mouse embryos – SCF – *in vitro* culture.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było zbadanie potencjalnego działania ochronnego SCF na pozaustrojowy rozwój przedimplantacyjnych zarodków mysich eksponowanych na działanie Fas-L lub poddanych krioprezerwacji.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły dwukomórkowe zarodki myszy, które pobierano z jajowodów samic szczepu B6C3-F1 stymulowanych wcześniej przy użyciu FSH oraz gonadotropiny kosmówkowej i dopuszczanych do samców szczepu DBA. W pierwszym modelu doświadczalnym zarodki dzielono na 3 grupy: 1) grupę kontrolną, 2) grupę zarodków poddanych działaniu Fas-L, 3) grupę zarodków poddanych działaniu Fas-L oraz SCF. W drugiej części doświadczeń zarodki również dzielono na 3 grupy: 1) grupę kontrolną, 2) grupę zarodków poddanych krioprezerwacji i po rozmrożeniu hodowanych w pożywce podstawowej, 3) grupę zarodków poddanych krioprezerwacji i po rozmrożeniu hodowanych w pożywce wzbogaconej o SCF. W obu modelach doświadczalnych zarodki poddawano przyżyciowej ocenie morfologicznej w mikroskopie kontrastowo-fazowym, w odstępach 24-godzinnych aż do chwili upłynięcia 96 godzin od rozpoczęcia hodowli. Na podstawie tych obserwacji ustalano odsetki zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych, co pozwoliło na analizę dynamiki wzrostu oraz ocenę potencjału rozwojowego zarodków w ocenianych grupach. W mikroskopie fluorescencyjnym przeprowadzono ocenę całkowitej ilości komórek blastocyst (TBC) przy użyciu barwnika DNA Hoechst 33342 oraz żywotności komórek zarodków po wybarwieniu jodkiem propidyny. W grupie zarodków poddanych działaniu Fas-L w celu wykrycia apoptozy wykonano reakcję TUNEL. Reakcję tę obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. W celu oceny ekspresji receptora Fas w obrębie blastocyst wykonano reakcję immunohistochemiczną.

Wyniki: Za pomocą reakcji immunohistochemicznej wykazano obecność receptora Fas w komórkach ocenianych blastocyst. W zarodkach mysich poddanych działaniu Fas-L stwierdzono znamiennie niższe odsetki blastocyst w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnych różnic w zakresie odsetków blastocyst, między grupą zarodków hodowanych w obecności Fas-L a grupą hodowaną w obecności Fas-L i SCF. W grupie blastocyst wyhodowanych w obecności Fas-L wykazano znamiennie niższe wartości TBC niż w kontroli i w grupie zarodków hodowanych z Fas-L i SCF. Reakcja TUNEL była w zarodkach narażonych na działanie Fas-L słabo zaznaczona, a jej nasilenie nie różniło się od stwierdzonego w grupie kontrolnej oraz grupie hodowanej z Fas-L i SCF. Dynamika wzrostu zarodków była znamiennie wyższa w grupie kontrolnej niż w dwóch pozostałych grupach.

Porównanie odsetków blastocyst w grupie zarodków hodowanych po krioprezerwacji w obecności SCF oraz w grupie hodowanej bez tego czynnika nie wykazało istotnych różnic. Dynamika wzrostu zarodków była najlepsza w grupie zarodków nie mrożonych, słabsza w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF, a najsłabsza w przypadku zarodków, które po rozmrożeniu były hodowane w pożywce standardowej bez dodatku SCF. Różnice te były istotne statystycznie. Wykazano lepszą żywotność komórek blastocyst w grupie zarodków niemrożonych niż w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu bez SCF i w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF. Nie stwierdzono istotnych różnic żywotności między dwoma ostatnimi grupami.

Wnioski: Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że: ekspozycja zarodków mysich na Fas-L upośledza ich rozwój w okresie przedimplantacyjnym; reakcja TUNEL nie pozwala wykazać, na jakiej drodze dochodzi do zahamowania wzrostu zarodków narażonych na działanie Fas-L; czynnik SCF wykazuje ochronny wpływ na wczesny rozwój zarodków poddanych działaniu Fas-L, który wyraża się zwiększeniem całkowitej ilości komórek blastocysty; czynnik SCF zwiększa dynamikę wzrostu zarodków poddanych krioprezerwacji.

H a s ł a: zarodki mysie – hodowla in vitro – SCF.

Wstęp

W programach zapłodnienia pozaustrojowego dąży się obecnie do przedłużania hodowli pozaustrojowej zarodków w taki sposób, aby do jamy macicy przenosić embriony w stadium dającym większe prawdopodobieństwo zagnieżdżenia, tzn. w stadium blastocysty. W ośrodkach, które wdrożyły już takie postępowanie, odnotowuje się często poprawę wskaźników skuteczności [15, 45]. Od dłuższego czasu poszukuje się czynników, które wywierałyby protekcyjny wpływ na rozwój zarodków przedimplantacyjnych w warunkach in vitro, a tym samym zwiększały odsetek zarodków osigających stadium blastocysty w tych warunkach. Najlepiej udokumentowano korzystne działanie insuliny i insulinopodobnych czynników wzrostu [18, 19, 30, 37, 42, 50]. Istnieją też liczne doniesienia, że takie czynniki jak EGF i TGF-α także wywierają korzystny wpływ na rozwój przedimplantacyjny zarodków w warunkach hodowli pozaustrojowej [14, 32, 43].

Niewiele uwagi poświęcono dotychczas wpływowi czynnika wzrostu komórek macierzystych (SCF) na przedimlantacyjny rozwój zarodków. Biorąc pod uwagę potwierdzone w badaniach działanie SCF na hematopoezę oraz komórki prapłciowe [3, 9, 12, 23, 40, 46, 48], praw-

dopodobnym wydaje się, że może być on „czynnikiem przeżycia" także dla intensywnie dzielących się komórek zarodka w okresie poprzedzającym implantację. Taki efekt można potwierdzić, oceniając wpływ SCF na zarodki poddane działaniu czynników upośledzających ich wzrost. Przykładem procedury związanej z narażeniem zarodków na takie działanie jest krioprezerwacja, która w programach IVF jest postępowaniem z wyboru w przypadkach pozyskania większej ilości embrionów. Wyniki przeprowadzanych dotychczas badań wydają się potwierdzać możliwość polepszenia rozwoju zarodków poddanych wcześniej krioprezerwacji. Wykazano korzystny wpływ takich czynników jak IGF-I, IGF II, EGF, ale również, choć w mniejszym stopniu, LIF, IL-6 czy też PDGF na dynamikę rozwoju zarodków, potencjał proliferacyjny blastomerów oraz ostateczną jakość blastocyst wyhodowanych z rozmrożonych zarodków [10, 20].

Oprócz ekspozycji na takie czynniki fizyczne, jak krioprezerwacja, światło czy drgania, zarodki rozwijające się w warunkach hodowli pozaustrojowej są eksponowane na różnorodne czynniki chemiczne, a zwłaszcza związki czynne biologicznie. Jednym z działających w ten sposób czynników może być ligand Fas-L (apo-1L). Jest to białko podobne do cząsteczki TNF mające zdolność do indukowania apoptozy w komórkach posiadających receptor Fas [13, 51, 56, 57]. Dotychczasowe doniesienia na temat wpływu tego układu na wczesny rozwój zarodka w okresie przedimplantacyjnym są skąpe, ale sugerują możliwość niekorzystnego działania Fas-L w tym okresie [22, 59].

Badacze oceniający wpływ SCF na różnego typu populacje komórek proliferujących wskazują na działanie antyapoptotyczne i mitogenne tego czynnika [3, 5, 48]. Taki efekt w odniesieniu do rozwijającego się zarodka byłby bardzo pożądany. Stwierdzenie receptorów dla SCF w komórkach zarodków w tym okresie rozwoju pozwala podejrzewać, że SCF może wywierać promujące działanie na ich przedimplantacyjny rozwój [2, 47]. Weryfikacja takiej hipotezy może być przeprowadzona w modelu doświadczalnym, w którym bada się wpływ SCF na wzrost zarodków narażonych na działanie niekorzystnych warunków środowiska.

Celem pracy było zbadanie potencjalnego działania ochronnego, czynnika wzrostu komórek macierzystych na pozaustrojowy rozwój przedimplantacyjnych zarodków mysich poddanych działaniu Fas-L lub krioprezerwacji w stadium 2 komórek.

Materiał i metody

Pozyskiwanie zarodków

Samice pierwszego pokolenia krzyżówki B6C3-F1 (6–9 tyg.) stymulowano, podając dootrzewnowo 5 IU gonadotropiny ciężarnych klaczy (PMSG; Foligon, Intervet, Belgia), po 48 godzinach tą samą drogą podawano 5 IU końskiej gonadotropiny kosmówkowej (eCG; Chorulon, Intervet, Belgia), parowano z samcami szczepu DBA i 48 godz. później z jajowodów pobierano zarodki w stadium 2 blastomerów. Zarodki wstępnie inkubowano przez 2 godziny w atmosferze 95% powietrza, 5% CO_2, w temperaturze 37^0C oraz 100% wilgotności, w pożywce podstawowej, którą stanowił buforowany roztwór Earla (EBSS, Sigma, USA) wzbogacony o pirogronian sodu w stężeniu 0,33 mM, mleczan sodu w stężeniu 21,4 mM i albuminę ludzką w ilości 0,4 g/L (Sigma, USA). Doświadczenia podzielono na dwie części. Pierwsza miała na celu ocenę wpływu SCF na hodowlę zarodków poddanych jednoczesnemu działaniu Fas-L, a druga ocenę wpływu SCF na hodowlę zarodków poddanych krioprezerwacji i rozmrożeniu. Zarodki hodowano po 10 sztuk w każdej kropli pożywki. Wartość n stanowi liczbę kropli, w których hodowano embriony w poszczególnych grupach.

Doświadczenie 1
Hodowla zarodków w obecności Fas-L i SCF

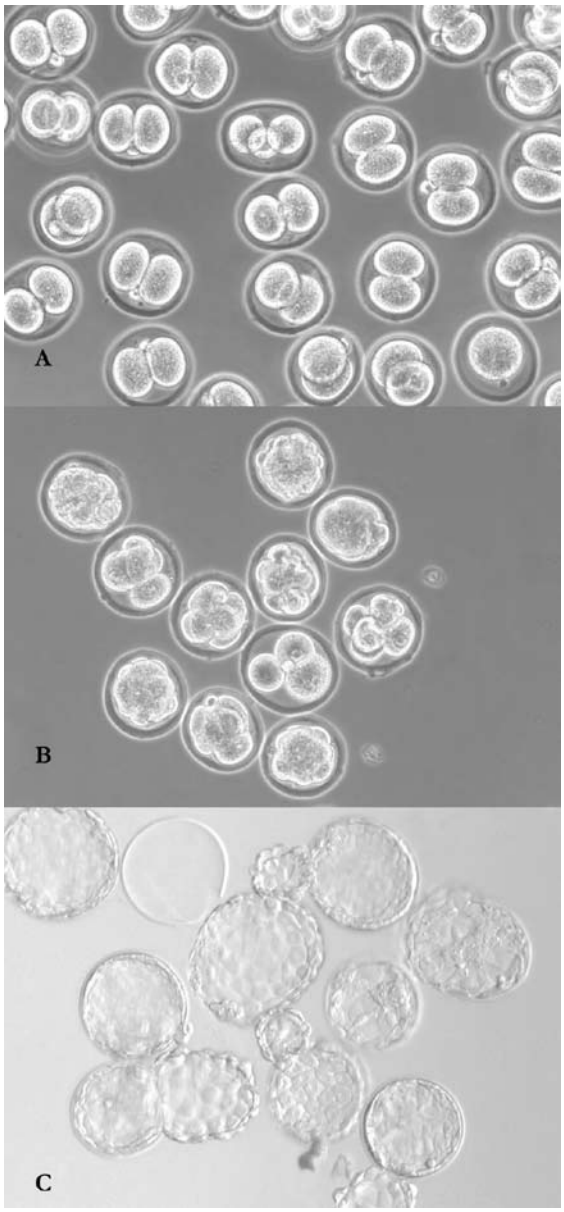
Po 2 godzinach wstępnej hodowli w warunkach podstawowych zarodki dzielono na 3 grupy. Grupa 1 – kontrolna: hodowla w pożywce podstawowej. Grupa 2 – zarodki hodowane w podstawowej pożywce z dodatkiem Fas-L w stężeniu (500 ng/mL). Stężenie Fas-L wyznaczono na podstawie osobnej serii doświadczeń (dane niezałączone) jako najniższe powodujące zatrzymanie wzrostu zarodków w stosunku do grupy kontrolnej. Grupa 3 – zarodki hodowano w pożywce z dodatkiem Fas-L w tym samym stężeniu i wzbogaconej dodatkowo o SCF w stężeniu 100 ng/mL [26, 34].

Doświadczenie 2
Hodowla w obecności SCF zarodków po krioprezerwacji

Zarodki podzielono na 3 grupy. Grupa 1 – kontrolna: hodowla w pożywce podstawowej. Grupa 2 – poddana procesowi krioprezerwacji (patrz dalej); po rozmrożeniu zarodki były hodowane w pożywce podstawowej. Grupa 3 – poddana krioprezerwacji i po rozmrożeniu oraz wstępnej inkubacji zarodki przenoszono do pożywki wzbogaconej o SCF w stężeniu 100 ng/mL.

Zarodki mrożono w stadium dwóch i czterech blastomerów w pożywce z dodatkiem 1,5 M prepandiolu i 0,1 M sacharozy (*Embryo Freezing Medium*, EFM, Medicult). Mrożenie zarodków wykonywano przy użyciu kontrolera CL-863 firmy Cryo-logic (Australia). Po rozmrożeniu i wstępnej dwugodzinnej inkubacji w pożywce podstawowej zarodki włączano do hodowli.

W obu modelach doświadczalnych zarodki poddawano przyżyciowej ocenie morfologicznej w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Dynamikę rozwoju zarodków analizowano na podstawie ustalanych w odstępach 24-godzinnych odsetków zarodków znajdujących się w poszczególnych stadiach rozwojowych uwidocznionych na rycinach. 1A, B, C (zarodka ośmiokomórkowego, moruli oraz blastocysty w różnym stopniu dojrzałości). Oceniano również odsetek zarodków, które w badanych warunkach, po 96 godzinach



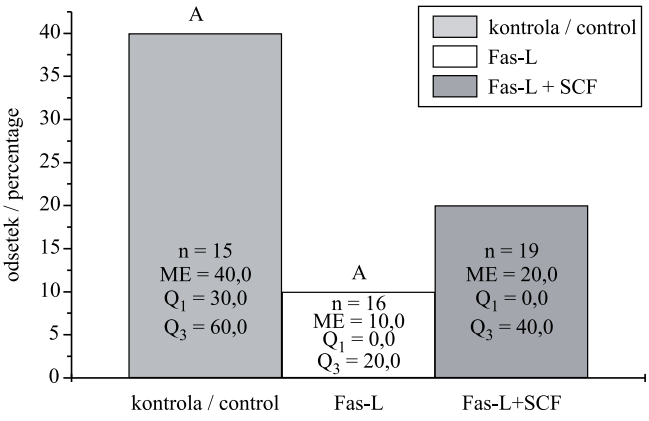
Ryc. 1. Stadia rozwojowe zarodków. A – zarodki dwukomórkowe na początku doświadczenia, B – zarodki cztero- i ośmiokomórkowe oraz morule po 24 h hodowli, C – blastocysty dojrzałe, wylęgające się i wylęgnięte z osłonki po 96 h hodowli. Mikroskop kontrastowo-fazowy (Nicon Eclipse TE200), powiększenie 100x.

Fig. 1. Developmental stages of the embryos. A – 2-cell embryos at the onset of experiment, B – 4–8 cell embryos and morulas following 24 h of culture, C – hatching and outgown blastocysts following 96 h of culture. Phase-contrast microscope (Nicon Eclipse TE200), magnification x100.

od momentu rozpoczęcia doświadczenia osiągnęły stadium blastocysty wylęgniętej z osłonki przejrzystej (*outgrown blastocyst*).

W celu oceny całkowitej ilości komórek blastocyst oraz żywotności komórek zarodków zastosowano barwienie z użyciem dwóch barwników fluorescencyjnych posiadających powinowactwo do DNA: barwnik Hoechst 33342 w stężeniu 1 μg/mL oraz jodek propidyny w stężeniu 10 μg/mL. Hoechst 33342 ma zdolność swobodnego przenikania przez błonę komórkową. Jego zastosowanie pozwoliło na wybarwienie, a następnie zliczenie wszystkich komórek w wyhodowanych blastocystach. Jodek propidyny przenika jedynie do tych komórek, które mają uszkodzoną błonę komórkową, wykorzystanie tego barwnika w tym samym barwieniu pozwoliło na ocenę ilości martwych komórek w obrębie ocenianych blastocyst [25]. Uzyskane preparaty natychmiast oceniano pod kątem całkowitej liczby komórek blastocysty (*total blastocyst cell count*, TBC) w mikroskopie fluorescencyjnym.

W celu wykrycia apoptozy w komórkach zarodka w grupie zarodków poddanych działaniu Fas-L wykonano reakcję TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*), którą oceniano w mikroskopie konfokalnym. Ponieważ istnieją w piśmiennictwie doniesienia, w których na podstawie reakcji TUNEL potwierdzano nasilenie apoptozy w zarodkach po krioprezerwacji, w części doświadczeń dotyczących zarodków mrożonych nie wykonywano tej reakcji, a oceniano jedynie żywotność komórek w mikroskopie fluorescencyjnym przy użyciu jodku propidyny [1, 49]. Celem wykrycia receptora Fas w komórkach blastocyst mysich wykonano reakcję immunohistochemiczną na obecność tego receptora. Dla celów statystycznych wszystkie wartości liczbowe (odsetki zarodków w poszczególnych stadiach, całkowitą ilość komórek zarodków) ustalano dla grup zarodków hodowanych w poszczególnych kroplach pożywki. Liczba n odpowiada ilości kropli. W celu oceny zgodności rozkładu uzyskanych wartości liczbowych zmiennych z rozkładem normalnym wykorzystano testy Kołmogorowa–Smirnowa, Lilleforsa, Shapiro–Wilka. Do oceny istotności różnic dla więcej niż 2 zmiennych wykorzystano test Kruskala–Wallisa jako nieparametryczny odpowiednik analizy wariancji ANOVA. Nieparametryczny test U Manna–Whitneya zastosowano do oceny różnic między 2 zmiennymi. Test χ^2 i analizę log-liniową użyto do porównania zmian ilości zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych w zależności od rodzaju pożywki i czasu trwania hodowli. Istotność statystyczną przyjęto dla $p < 0,05$. Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica 5.0 PL for Windows (StatSoft, Polska).



Ryc. 2. Odsetki blastocyst wylęgniętych z osłonki przejrzystej po 96 godzinach hodowli. A – $p < 0,05$ dla kontrola vs. Fas-L ($p = 0,0026$)

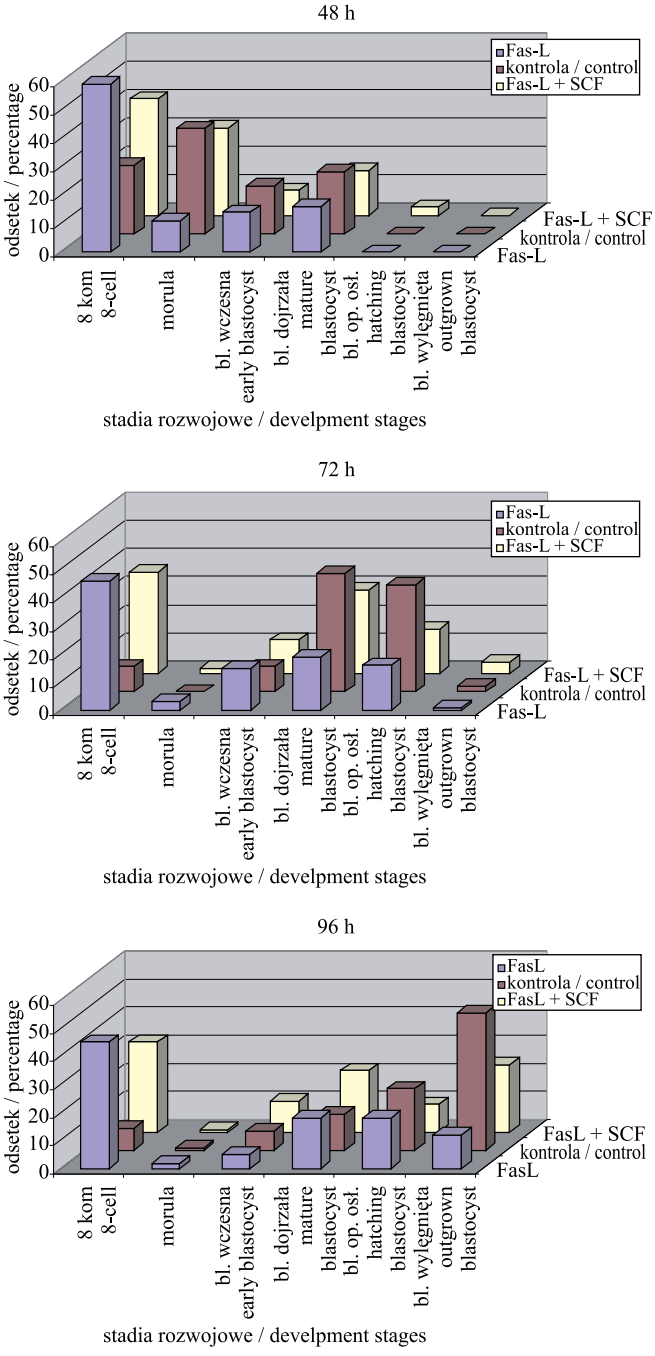
Fig. 2. Outgrown blastocyst rate following 96 hours of culture. A – $p < 0.05$ for control vs. Fas-L

Wyniki

Ocena wpływu SCF na wzrost zarodków eksponowanych na działanie Fas-L

Ocena odsetków blastocyst

Odsetki zarodków, które po 96 godzinach hodowli osiągnęły stadium blastocysty całkowicie wylęgniętej z osłonki przejrzystej były istotnie wyższe w grupie kontrolnej niż w grupie zarodków hodowanych w obecności Fas-L. Różnice w zakresie tego parametru między grupą kontrolną a grupą zarodków hodowanych w pożywce z Fas-L i SCF nie były znamienne (ryc. 1).



Ryc. 3. Odsetki zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych po 48, 72 i 96 h hodowli. Fas-L vs. kontrola $p < 0,05$; Fas-L+SCF vs. kontrola $p < 0,05$; Fas-L vs. Fas-L+SCF $p > 0,05$

Fig. 3. Frequency distribution of different developmental stages of embryos following 48. 72 and 96 h of culture. Fas-L vs. control $p < 0.05$; Fas-L+SCF vs. control $p < 0.05$; Fas-L vs. Fas-L+SCF $p > 0.05$

Ocena dynamiki wzrostu zarodków

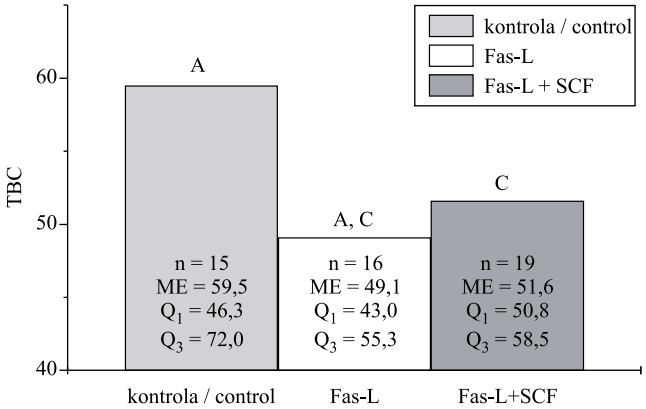
Przeprowadzone przy użyciu analizy log-liniowej jednoczesne porównanie wszystkich trzech badanych grup, uwzględniające zmiany odsetków wszystkich poszczególnych stadiów rozwojowych w czasie i w zależności od warunków hodowli wykazało, że dynamika wzrostu zarodków była znamiennie wyższa w grupie kontrolnej niż w dwóch pozostałych grupach. Nie wykazano istotnych różnic w dynamice wzrostu między zarodkami hodowanymi z Fas-L a grupą hodowaną w obecności Fas-L i SCF (ryc. 2).

Ocena całkowitej ilości komórek blastocyst (TBC)

Porównanie całkowitej ilości komórek blastocyst z poszczególnych grup, oparte na danych uzyskanych w wyniku analiz przeprowadzonych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, wykazało znamiennie wyższe wartości tego parametru w grupie kontrolnej niż w grupie zarodków eksponowanych na Fas-L. Wykazano również istotnie wyższe wartości TBC w zarodkach hodowanych w obecności Fas-L i SCF w porównaniu do zarodków hodowanych z samym Fas-L (ryc. 3).

Reakcja TUNEL

W grupach zarodków narażonych na działanie Fas-L reakcja TUNEL była słabo zaznaczona, ograniczona do pojedynczych komórek (kolor żółto-zielony), a jej nasilenie nie różniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną oraz grupą hodowaną z Fas-L i SCF. Dodatkowe wybarwienie sondą molekularną DNA – EthD-1 pozwoliło na uwidocznienie jąder wszystkich komórek blastocyst – kolor czerwony (ryc. 4).

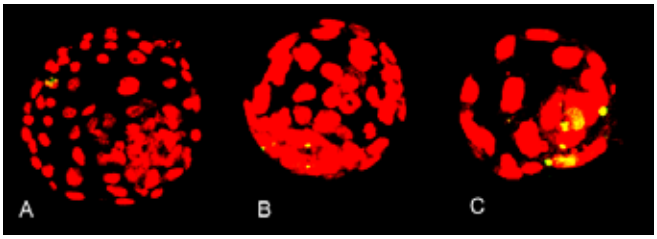


Ryc. 4. Całkowite ilości komórek blastocyst (TBC) po 96 h hodowli. A – $p < 0,05$ dla kontrola vs. Fas-L ($p = 0,0299$); C – $p < 0,05$ dla Fas-L vs. Fas-L+SCF ($p = 0,0487$)

Fig. 4. Total blastocyst cell count (TBC). 96 hours of culture. A – $p < 0.05$ for control vs. Fas-L ($p = 0.0299$); C – $p < 0.05$ for Fas-L vs. Fas-L+SCF($p = 0.0487$)

Immunohistochemiczna ocena ekspresji receptora Fas

Wykonana reakcja immunohistochemiczna potwierdziła obecność (ekspresję) receptora Fas w ocenianych blastocystach. Barwny sygnał będący wyrazem pozytywnej reakcji obserwowano w obrębie trofoblastu oraz w węźle zarodkowym (ryc. 5A). Potwierdzeniem swoistości reakcji był wynik barwień kontrolnych, w których nie obserwowano dodatniej reakcji immunohistochemicznej (ryc. 5B).

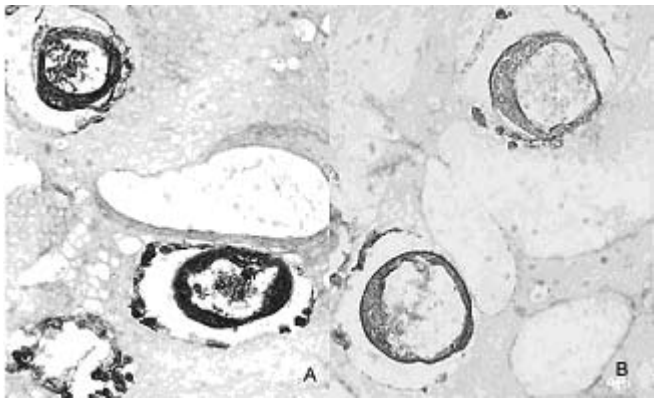


Ryc. 5. Reakcja TUNEL. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, powiekszenie 200x. Dodatnia reakcja na apoptozę – kolor żółto-zielony (fluoresceina). Dodatkowo wybarwiono jądra komórkowe sondą EthD-1 – kolor czerwony. Zdjęcia są trójwymiarową rekonstrukcją kilku przekrojów ocenianej blastocysty. A – blastocysta grupy kontrolnej. B – blastocysta wyhodowana w obecności Fas-L i SCF. C – blastocysta wyhodowana w obecności Fas-L

Fig. 5. TUNEL. Fluorescein: green or yellow – apoptotosis; EthD-1: red – cell nuclei. Images show the blastocysts after 3-dimesional reconstruction of several scans. A – control. B – blastocyst cultured in the presence of Fas-L and SCF. C – blastocyst cultured in the presence of Fas-L only. Confocal microscope, magnification x200

Ocena odsetków blastocyst

Odsetki blastocyst wylęgniętych z osłonki przejrzystej po 96 godzinach hodowli były w grupie kontrolnej istotnie większe niż w dwóch pozostałych grupach (ryc. 6).

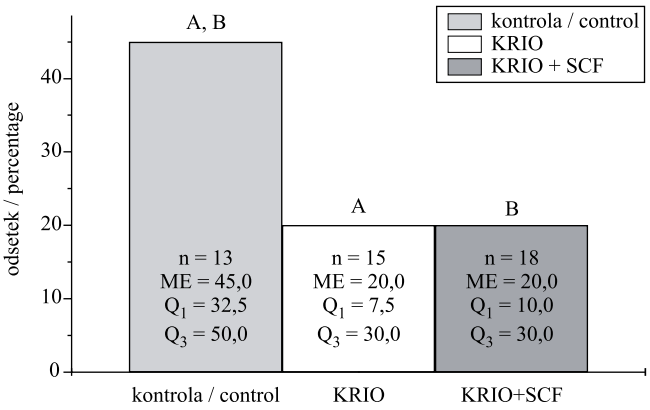


Ryc. 6. Reakcja immunohistochemiczna. Mikroskop świetlny, powiększenie 100x. A – dodatnia reakcja na obecność receptora Fas. B – kontrola – brak reakcji

Fig. 6. Immunoreactivity for Fas receptor. Light microscope, magnification x100. A – positive reaction. B – control

Ocena dynamiki wzrostu zarodków

Jednoczesne porównanie trzech badanych grup przy użyciu analizy log-liniowej, z uwzględnieniem zmian wszystkich stadiów rozwojowych zarodków w czasie i w zależności od warunków hodowli wykazało istotność statystyczną. Dynamika wzrostu zarodków była najlepsza w grupie zarodków nie mrożonych, słabsza w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF, a najsłabsza w przypadku zarodków, które po rozmrożeniu były hodowane w pożywce standardowej bez dodatku SCF. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami były znamienne (ryc. 7).



Ryc. 7. Odsetki blastocyst wylęgniętych z osłonki przejrzystej po 96 godzinach hodowli. A – $p < 0,05$ dla kontrola vs. krio ($p = 0,0064$); B – $p < 0,05$ dla kontrola vs. krio+SCF ($p = 0,0056$)

Fig. 7. Outgrown blastocyst rate following 96 hours of culture. A – $p < 0.05$ for control vs. krio ($p = 0.0064$); B – $p < 0.05$ for control vs. krio+SCF ($p = 0.0056$)

Ocena żywotności komórek blastocyst

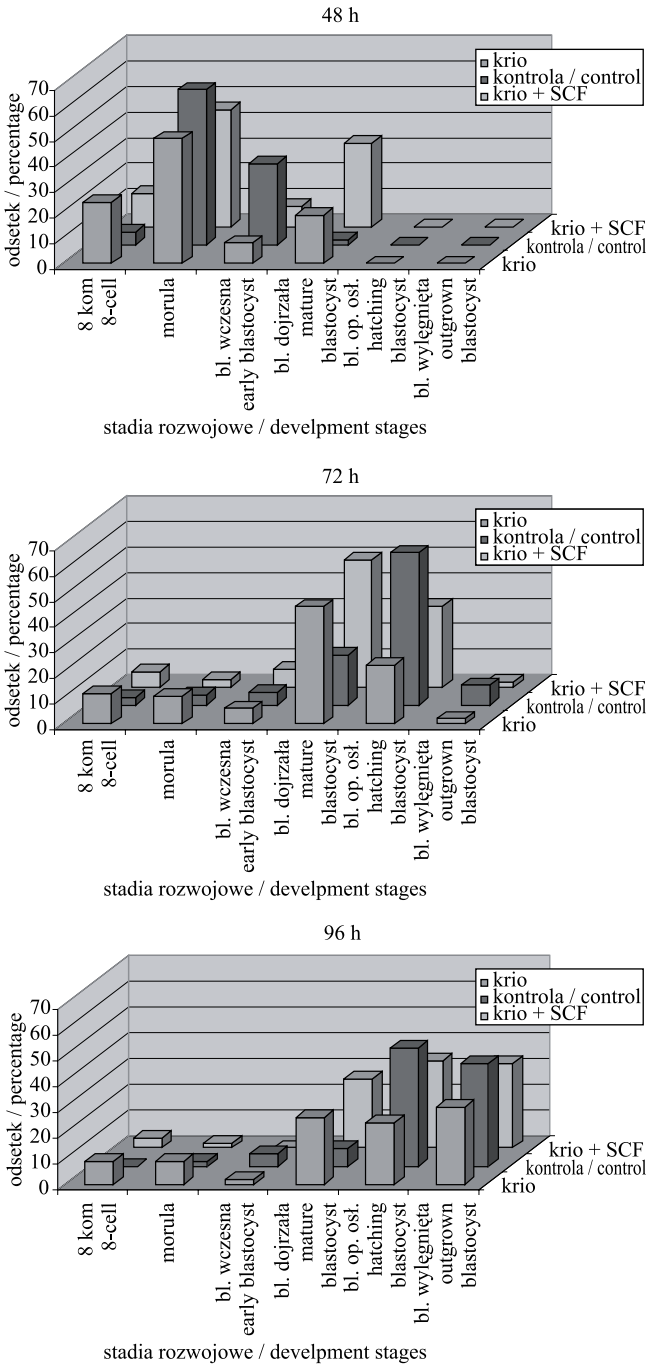
Wykazano lepszą żywotność komórek blastocyst w grupie zarodków nie mrożonych niż w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu bez SCF i w grupie zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF. Nie stwierdzono istotnych różnic żywotności między dwoma ostatnimi grupami (ryc. 8). Barwienie fluorochromami, którego przykład przedstawiono na rycinie 9, posłużyło również do oceny TBC. Wyniki oceny TBC przedstawiono na rycinie 10.

Ocena całkowitej ilości komórek blastocyst (TBC)

Porównanie blastocyst poszczególnych grup, oparte na danych uzyskanych w wyniku analiz przeprowadzonych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, wykazało, że całkowita ilość komórek blastocyst była w grupie zarodków nie mrożonych znamiennie wyższa niż w obu grupach zarodków poddanych krioprezerwacji. Różnice w zakresie tego parametru pomiędzy grupą zarodków hodowanych po rozmrożeniu bez SCF i w grupie zarodków hodowanych w obecności SCF nie były znamienne (ryc. 10).

Dyskusja

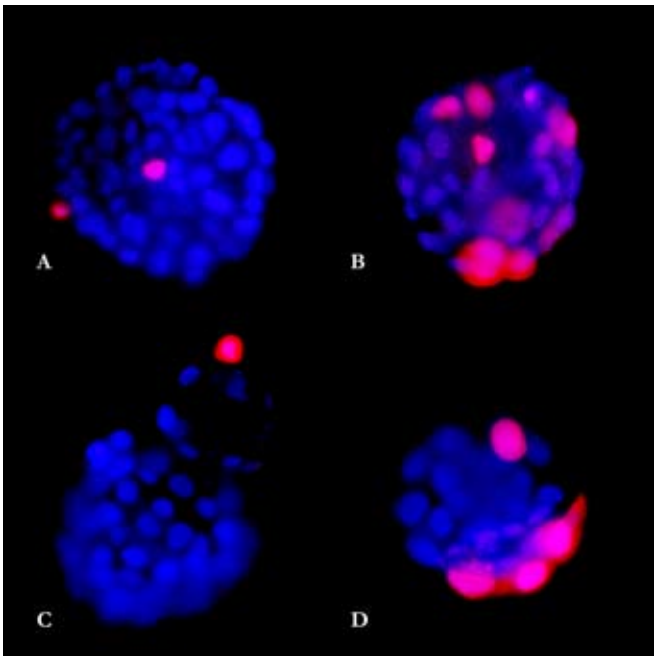
Istnieje niewiele doniesień dotyczących wpływu SCF na rozwój zarodków w okresie przedimplantacyjnym. Istotnym odkryciem było stwierdzenie ekspresji mRNA dla receptora c-kit w komórkach zarodków mysich począwszy od stadium dwóch blastomerów aż do dojrzałej oraz opuszczającej osłonkę przejrzystą blastocysty, a także obecność samego receptora c-kit w blastocystach mysich



Ryc. 8. Odsetki zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych po 48, 72 i 96 h hodowli. (krio – krioprezerwacja). Krio vs. kontrola – $p < 0,05$; krio +SCF vs. kontrola – $p < 0,05$; krio vs. krio+SCF – $p < 0,05$

Fig. 8. Frequency distribution of different developmental stages of embryos following 48, 72 and 96 h of culture. Krio vs. control – $p < 0.05$; krio +SCF vs. control – $p < 0.05$; krio vs. krio+SCF – $p < 0.05$

[2, 26]. Także badania przeprowadzane na zarodkach ludzkich potwierdziły obecność mRNA dla receptora c-kit w komórkach tych zarodków w okresie rozwoju przedimplantacyjnego. Co więcej, w embrionach ludzkich, w odróżnieniu od zarodków myszy, w niektórych stadiach rozwojowych, stwierdzono ekspresję mRNA dla samego czynnika SCF. Dane te sugerują możliwość działania czynnika SCF na tym etapie rozwoju, i to nie tylko na drodze parakrynnej, ale także autokrynnej [47]. Interakcja

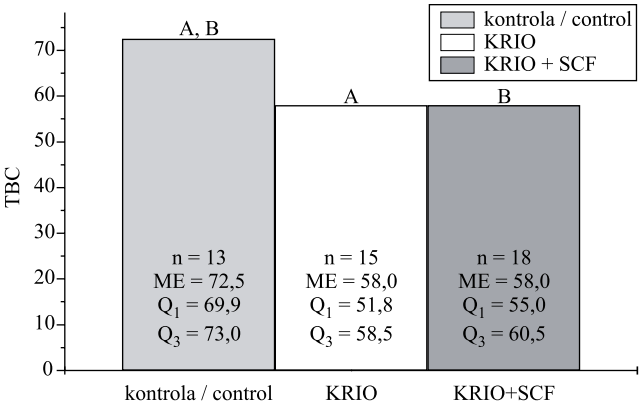


Ryc. 9. Barwienie przy użyciu Hoechst 33342 (komórki żywe – kolor niebieski) i jodku propidyny (komórki martwe – kolor czerwony). A i C – blastocysty grupy kontrolnej. B – blastocysta z grupy hodowanej po rozmrożeniu z SCF. D – blastocysta z grupy hodowanej po rozmrożeniu bez SCF. Mikroskop fluorescencyjny, powiększenie 200x

Fig. 9. Staining with Hoechst 33342 (blue – living cells) and propidium iodide (red – dead cells). A and C – control group blastocyst. B – blastocyst cultured in a presence of SCF after thawing. D – blastocyst cultured without SCF after thawing. Fluorescent microscope, magnification x200

czynnika SCF i receptora c-kit może mieć także bardzo istotny wpływ na autokrynną i/lub parakrynną regulację samego procesu implantacji [2, 34].

W obliczu dotychczasowych doniesień nasuwa się pytanie, czy pobudzenie receptora c-kit obecnego w zarodkach jego naturalnym ligandem, jakim jest SCF, zwłaszcza w sytuacji, gdy embriony wzrastają w niesprzyjających warunkach, może zadziałać ochronnie i poprawić ich rozwój. W pracy podjęto próbę zbadania, czy SCF może



Ryc. 10. Całkowite ilości komórek blastocyst (TBC). A – $p < 0,05$ dla kontrola vs. krio ($p = 0,0005$); B – $p < 0,05$ dla kontrola vs. krio+SCF ($p = 0,0004$)

Fig. 10. Total blastocyst cell count (TBC). 96 hours of culture. A – $p < 0.05$ for control vs. krio ($p = 0.0005$); B – $p < 0.05$ for control vs. krio+SCF ($p = 0.0004$)

działać protekcyjnie na rozwój zarodków wzrastających w wywołanych doświadczalnie warunkach niekorzystnych, a więc powstrzymać progresję negatywnych zmian, które już zaistniały. Zbadano działanie SCF w dwóch modelach doświadczalnych. Pierwszy model polegał na ekspozycji zarodków na działanie Fas-L – biologicznego czynnika indukującego apoptozę w pewnych populacjach komórek [11, 21, 51, 56, 57]. W drugim modelu doświadczalnym zarodki poddawano krioprezerwacji, która jest procedurą powszechnie stosowaną w laboratoriach IVF i której potencjalny niekorzystny wpływ na późniejszy rozwój zarodków jest dobrze udokumentowany [1, 27, 31, 49, 54, 55]. Pierwsza część przeprowadzonych doświadczeń miała na celu stwierdzenie ewentualnego negatywnego wpływu Fas-L na wzrost zarodków w warunkach in vitro oraz zbadanie czy czynnik SCF mógłby niwelować efekt takiego działania Fas-L. W piśmiennictwie istnieją doniesienia świadczące o tym, że Fas-L może indukować proces apoptozy w komórkach układu odpornościowego, ale także na terenie jądra, nerki, jelita cienkiego, płuc i jajnika [13, 52, 53]. Założono więc, że czynnik ten może wywierać podobny efekt na komórki rozwijającego się zarodka. W doświadczeniach przeprowadzonych na zarodkach poddanych działaniu liganda Fas stwierdzono pogorszenie ocenianych parametrów morfologicznych. Wyrazem tego były znamiennie zmniejszone odsetki blastocyst w grupie zarodków hodowanych w obecności Fas-L w stosunku do grupy kontrolnej. W piśmiennictwie są doniesienia potwierdzające ekspresję mRNA dla receptora Fas oraz dla Fas-L, a także obecność samego białka receptora Fas w dwu- i czterokomórkowych zarodkach przedimplantacyjnych myszy, szczurów oraz człowieka. Dodatkowo, takie fakty jak stwierdzenie ekspresji mRNA dla Fas i Fas-L w zarodkach ludzkich ulegających fragmentacji oraz negatywny wpływ pobudzenia receptora Fas na rozwój zarodków w warunkach in vitro mogą sugerować zaangażowanie tego układu w aktywacji procesu apoptozy w trakcie wczesnego rozwoju zarodków [22, 59]. Również w wykonanej dla potrzeb niniejszej pracy reakcji immunohistochemicznej udało się wykazać ekspresję receptora Fas w komórkach ocenianych blastocyst. W przeprowadzonych eksperymentach, niekorzystny wpływ dodania Fas-L ujawnił się najwcześniej dopiero po 72 godzinach hodowli, a wcześniejsze obserwacje dokonywane po 24 i 48 godzinach hodowli nie wykazywały jeszcze istotnych różnic we wzroście zarodków między trzema porównywanymi grupami. Wspomniane powyżej dane z piśmiennictwa mówią z kolei o ekspresji Fas w zarodkach na bardzo wczesnych etapach rozwoju. Zestawienie tych dwóch faktów może sugerować, że efekt działania Fas-L zaczyna ujawniać się dopiero po pewnym czasie od pobudzenia receptora. Już wcześniej pojawiały się w piśmiennictwie sugestie o istnieniu w komórkach rozwijającego się zarodka swego rodzaju „pamięci" dotyczącej czynników, jakie zadziałały na te komórki na wcześniejszych etapach rozwoju [4]. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie praktyczne, ponieważ wykazują, że niekorzystne działanie Fas-L ujawnia się dopiero w zarodkach będących na bardziej zaawansowanych etapach rozwoju, na których nie są one już kontrolowane przez embriologów zajmujących się technikami wspomaganego rozrodu. Świadczy to o tym, że w niektórych przypadkach, przenosząc do jamy macicy zarodki o względnie dobrej morfologii, w rzeczywistości przenosimy embriony, które mają gorszą jakość, ale nie ma to jeszcze odzwierciedlenia w ich budowie w momencie przeniesienia.

Dodatkowa suplementacja pożywki zawierającej Fas-L o czynnik SCF spowodowała pewną tendencję do poprawy wyników hodowli. Gdy analizie statystycznej poddano odsetek blastocyst całkowicie wylęgniętych z osłonki przejrzystej, a więc tych najlepiej przygotowanych do rozpoczęcia implantacji, to okazało się, że pod koniec każdego doświadczenia był on niższy w grupie zarodków hodowanych z Fas-L niż w grupie, w której zarodki hodowano w obecności Fas-L i czynnika SCF. Nie była to jednak różnica znamienna statystycznie. Różnice w zakresie tego parametru pomiędzy kontrolą a grupą hodowaną z Fas-L i SCF także nie były znamienne. Zaznaczył się tu więc korzystny wpływ SCF na potencjał rozwojowy zarodków hodowanych w obecności Fas-L. Interesujące wyniki uzyskano na podstawie analizy całkowitej ilości komórek blastocyst. W grupie blastocyst wyhodowanych w obecności Fas-L wartości TBC były znamiennie niższe niż w grupie zarodków hodowanych z Fas-L i SCF.

Wyniki uzyskane w tej części doświadczeń sugerują zatem ochronny wpływ SCF na rozwój zarodków hodowanych in vitro w obecności niekorzystnie działającego Fas-L. Takie działanie czynnika SCF wydaje się możliwe, ponieważ już wcześniej donoszono, że SCF może zapobiegać apoptozie wywoływanej przez Fas, najprawdopodobniej poprzez zaburzenie wpływu pobudzonego receptora Fas na aktywację kaspazy 3 i 8 [28, 38, 39].

Jak wspomniano wcześniej, negatywny wpływ Fas-L na wyniki hodowli można było zaobserwować najwcześniej po 72 godzinach hodowli. Logicznym wydaje się więc być fakt, że korzystny wpływ SCF można było zaobserwować dopiero po ujawnieniu się uszkadzającego efektu działania Fas-L, a więc w tych parametrach, które oceniano w końcowym okresie doświadczeń. Ponieważ nie zaobserwowano istotnych różnic w nasileniu reakcji TUNEL pomiędzy trzema porównywanymi grupami, nasuwa się pytanie, dlaczego reakcja ta nie potwierdziła wzmożonej apoptozy w zarodkach wyhodowanych w obecności Fas-L. W przeprowadzonych doświadczeniach niekorzystny efekt liganda Fas na hodowane zarodki ujawniał się w hodowli stosunkowo późno, w postaci zmniejszenia odsetka blastocyst oraz całkowitej ilości ich komórek. Jest możliwe, że jeśli był on spowodowany apoptozą zainicjowaną przez Fas-L to w momencie wykonania reakcji TUNEL była ona na wczesnym, niewykrywalnym jeszcze tą metodą etapie, kiedy nie doszło jeszcze do charakterystycznej dla apop-

tozy fragmentacji DNA. Już wcześniej donoszono o tym, że fragmentacja DNA jest wykrywalna w późniejszych etapach procesu apoptozy [6, 7].

Kolejnym poruszanym w niniejszej pracy problemem był ewentualny wpływ czynnika SCF na rozwój zarodków poddanych krioprezerwacji. W piśmiennictwie dużo uwagi poświęca się różnicom wynikającym ze stosowania różnych metod zamrażania, jak również tym związanym ze stadium rozwojowym, w którym dokonuje się krioprezerwacji. Najczęściej stosowaną w pracowniach wspomaganego rozrodu metodą jest powolne, wieloetapowe schładzanie zarodków w obecności odpowiednich krioprotektorów, dobieranych w zależności od stadium, w jakim mrożone są embriony [54]. W niniejszym badaniu zastosowano taki właśnie protokół mrożenia. Użyto mediów, które jako czynniki krioprotekcyjne zawierały propandiol (PROH) oraz sacharozę. W pracy tej zastosowano mrożenie zarodków mysich będących w stadium 2 blastomerów, bezpośrednio po ich pobraniu. O doborze takiego modelu doświadczenia zadecydowała ostatecznie możliwość dużo precyzyjniejszej oceny morfologicznej, która była podstawą włączenia poszczególnych zarodków do doświadczeń.

Doniesienia dotyczące wpływu czynników wzrostu czy też cytokin na efekty hodowli pozaustrojowej zarodków rozmrożonych są bardzo skąpe. Stwierdzono, że w przypadku zarodków zamrożonych w stadium moruli, kokultury w obecności komórek linii Vero (*Vero monkey kidney epithelial cells*) pozwoliły na szybkie i znaczące odwrócenie uszkodzeń spowodowanych przez proces mrożenia i rozmrażania [10]. Żaden z pojedynczo stosowanych czynników wzrostu nie pozwolił na uzyskanie tak dobrych efektów, chociaż takie czynniki jak IGF-I, IGF-II, LIF czy EGF, a w mniejszym stopniu IL-6 i PDGF, również wywierały wyraźny korzystny efekt zarówno na dynamikę wzrostu rozmrożonych zarodków, jak i ich jakość określaną na podstawie ilości komórek. Donoszono również o lepszych wynikach krioprezerwacji zarodków hodowanych w kokulturach przed zamrożeniem [10, 20].

W pracy niniejszej, w celu ocenienia wpływu czynnika wzrostu komórek macierzystych na rozwój zarodków mysich poddanych krioprezerwacji, stosowano suplementację pożywek hodowlanych o SCF. Wyniki wyraźnie potwierdzają niekorzystny wpływ krioprezerwacji na rozwój zarodków i są zgodne z uzyskiwanymi przez innych autorów [1, 16, 54]. Porównanie grup zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF oraz bez tego czynnika w większości przypadków nie wykazywało istotnych różnic. Stwierdzono niewielki ochronny wpływ SCF na przedimplantacyjny wzrost zarodków mrożonych, który ujawnił się w postaci znamiennie lepszej dynamiki wzrostu (zmienność odsetków wszystkich stadiów rozwojowych w funkcji czasu) zarodków hodowanych po rozmrożeniu w obecności SCF w porównaniu do grupy rozwijającej się bez tego czynnika. Może to sugerować korzystne działanie czynnika wzrostu komórek macierzystych na potencjał rozwojowy zarodków mrożonych.

W piśmiennictwie brak jest danych, z którymi można by porównać uzyskane w pracy wyniki. Dotychczas, przeprowadzano jedynie badania, które wykazały brak poprawy wzrostu zarodków hodowanych w obecności czynnika SCF w porównaniu do embrionów wzrastających w standardowych warunkach hodowli pozaustrojowej, bez narażenia na dodatkowe niekorzystne warunki [26]. Niniejsza praca miała natomiast na celu ocenę wpływu SCF na rozwój zarodków w dwóch modelach doświadczalnych symulujących warunki niesprzyjające ich wzrostowi. W badaniu udało się wykazać niewielkie promujące działanie SCF na rozwijające się w tych warunkach zarodki. Istnieją dane sugerujące antyapoptotyczne działanie czynnika SCF [12, 17, 23, 33, 36]. Szczególnie ciekawe jest doniesienie mówiące o hamującym wpływie SCF w stosunku do apoptozy indukowanej poprzez aktywację receptora Fas w ludzkich komórek prekursorowych erytropoezy [39]. Teoretycznie, nasilona apoptoza powinna dotyczyć zarodków w obu zastosowanych modelach doświadczalnych. Przeprowadzona reakcja TUNEL nie potwierdziła jednak nasilenia procesu apoptozy w zarodkach poddanych działaniu liganda Fas. Prawdopodobną przyczynę takich rezultatów przedstawiono powyżej. Wykonana w doświadczeniach z zarodkami mrożonymi ocena żywotności komórek blastocyst wykazała większą ilość komórek martwych (z uszkodzoną integralnością błony komórkowej) w zarodkach hodowanych po rozmrożeniu w porównaniu do zarodków niemrożonych („świeżych"). Być może było to spowodowane nasileniem procesu apoptozy w zarodkach mrożonych. Wskazywałyby na to wcześniejsze doniesienia mówiące o nasileniu apoptozy w zarodkach po krioprezerwacji [85, 86]. Nie można jednak wykluczyć innego charakteru śmierci komórek w tych zarodkach. Donoszono na przykład o uszkadzającym wpływie procesu krioprezerwacji na funkcję istotnych białek komórkowych, jakim jest między innymi nośnik glukozy tzw. GLUT1. Okazuje się, że wykorzystanie glukozy przez zarodki rozwijające się po rozmrożeniu w warunkach in vitro (ustalone w oparciu o wychwyt 3H-2-deoksyglukozy) jest znacznie niższe w porównaniu do zarodków niemrożonych i jest to związane ze zmniejszeniem ilości nośnika GLUT1 w embrionach poddanych krioprezerwacji. Uważa się, że taki efekt krioprezerwacji może być przyczyną gorszych wskaźników implantacji zarodków rozmrożonych [54, 55]. Niewykluczone, że taki mechanizm stanowił podłoże zwiększonej ilości martwych komórek obserwowanych w blastocystach powstałych z zarodków rozmrożonych. Przyczyną śmierci komórek mogły być zmiany struktury błony komórkowej, których przejawem są uszkodzenia białek błonowych takich jak na przykład GLUT1. W takim wypadku nie jest zaskoczeniem to, że czynnik SCF nie zahamował obumierania komórek, ponieważ było ono prawdopodobnie skutkiem powstania nieodwracalnych już uszkodzeń. Z drugiej jednak strony w zarodkach rozmrożonych, które nie zatrzymały się w rozwoju na wczesnych etapach, SCF zwiększał dynamikę ich wzrostu powodując, że mimo zwiększonej ilości komó-

rek obumarłych, osiągały one stadium blastocysty szybciej niż zarodki hodowane po rozmrożeniu bez obecności tego czynnika. W tym aspekcie można mówić o zaznaczonym ochronnym efekcie badanego czynnika.

Podsumowując należy podkreślić, że w obu modelach doświadczalnych wykorzystanych w pracy stwierdzono wprawdzie pewien korzystny wpływ badanego czynnika, ale był on ograniczony do wybranych parametrów. Szczególnie wyraźny wpływ na całkowitą ilość komórek w zarodkach hodowanych w obecności Fas-L i SCF przy jednoczesnym braku nasilenia apoptozy w zarodkach hodowanych z samym Fas-L może sugerować, że SCF wywiera w obrębie zarodka działanie promitotyczne. Jest również rzeczą prawdopodobną, że w tym układzie SCF może działać synergistycznie, wspomagając działanie innych czynników, lub też efekt jego działania może być uzależniony od ich obecności. Zależność taką stwierdzono w szpiku kostnym, gdzie czynnik pobudzający kolonie-1 (CSF-1) oraz czynnik SCF wywierają synergistyczny wpływ pobudzający proliferację i różnicowanie się komórek macierzystych w kolonie makrofagów [2, 47]. Innymi przykładami takiej kooperacji może być indukcja tworzenia kolonii erytropoetycznych przez SCF oraz erytropoetynę, czy też synergiczne, promujące działanie SCF i IL-6 na rozwój mastocytów [44, 58]. Dla wzrastających zarodków czynnikiem takim mógłby być na przykład czynnik hamujący białaczkę (LIF), który podobnie jak SCF wpływa na przeżycie komórek prapłciowych (PGC) poprzez hamowanie procesu apoptozy [8, 12, 40], a jednocześnie znany jest jego promujący wpływ na wczesny rozwój embrionalny [24]. Mając na względzie te fakty oraz wyniki niniejszej pracy (prawdopodobny efekt promitotyczny w pierwszej i zwiększoną dynamikę rozwoju w drugiej części doświadczeń) można powiedzieć, że praca ta pozwoliła na wytyczenie kierunków dla dalszych badań. Należałoby w nich zbadać ewentualny synergistyczny wpływ SCF z innymi czynnikami wzrostu czy cytokinami na wzrost zarodków w warunkach pozaustrojowych.

Wnioski

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wnisków:

1. Ekspozycja zarodków mysich na Fas-L upośledza ich rozwój w okresie przedimplantacyjnym.

2. Reakcja TUNEL nie pozwala wykazać, na jakiej drodze dochodzi do zahamowania wzrostu zarodków narażonych na działanie Fas-L.

3. Czynnik SCF wykazuje ochronny wpływ na wczesny rozwój zarodków poddanych działaniu Fas-L. Wyraża się on zwiększeniem całkowitej ilości komórek blastocysty.

4. Czynnik SCF wykazuje ochronny wpływ na wczesny rozwój zarodków poddanych krioprezerwacji. Wyraża się on zwiekszeniem dynamiki wzrostu tych zarodków.

Piśmiennictwo

1. *Ahn H.J. et al.*: Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. Mol. Reprod. Dev. 2002, 61, 466–476.
2. *Arceci R.J., Pampfer S., Pollard J.W.*: Expression of CSF-1/c-fms and SF/c-kit mRNA during preimplantation mouse development. Dev. Biol. 1992, 151, 1–8.
3. *Ashman L.K.*: The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 1999, 31, 1037–1051.
4. *Brison D.R., Schultz R.M.*: Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. Biol. Reprod. 1997, 56, 1088–1096.
5. *Carson W.E. et al.*: The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91, 7553–7557.
6. *Cohen G.M. et al.*: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. Biochem. J. 1992, 286, 331– 334.
7. *Collins J.A. et al.*: Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. J. Histochem. Cytochem. 1997, 45, 923–934.
8. *De Felici M., Dolci S.*: Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev. Biol. 1991, 147, 281–184.
9. *De Felici M.*: Regulation of primordial germ cell development in the mouse. Int. J. Dev. Biol. 2000, 44, 575–580.
10. *Desai N., Lawson J., Goldfarb J.*: Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. Hum. Reprod. 2000, 15, 410–418.
11. *Dhein J. et al.*: Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti--APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. J. Immunol. 1992, 149, 3166–3173.
12. *Dolci S., Pesce M., De Felici M.*: Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. Mol. Reprod. Dev. 1993, 35 134–139.
13. *French L.E. et al.*: Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. J. Cell. Biol. 1996, 133, 335–343.
14. *Garcia-Lloret M.I. et al.*: Epidermal growth factor inhibits cytokine--induced apoptosis of primary human trophoblasts. J. Cell. Physiol. 1996, 167, 324–332.
15. *Gardner D.K., Lane M.*, Schoolcraft W.B.: Physiology and culture of the human blastocyst. J. Reprod. Immunol. 2002, 55, 85–100.
16. *Gelety T., Surrey E.*: Cryopreservation of embryos and oocytes: an update. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 1993, 5, 606–614.
17. *Godin I. et al.*: Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature, 1991, 352, 807–809.
18. *Harvey M.B., Kaye P.L.*: Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. Mol. Reprod. Dev. 1992, 31, 195–199.
19. *Herrler A., Krusche C. A., Beier H. M.*: Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. Biol. Reprod. 1998, 59, 1302–1310.
20. *Hsieh Y.Y. at al.*: Prolonged culture of human cryopreserved embryos with recombinant human leukemia inhibitory factor. J. Assist. Reprod. Genet. 2000, 17, 131–134.
21. *Itoh N., Nagata S.*: A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. J. Biol. Chem. 1993, 268, 1093–1097.
22. *Kawamura K. et al.*: Expression of Fas and Fas ligand mRNA in rat and human preimplantation embryos. Mol. Hum. Reprod. 2001, 7, 431–436.
23. *Keller J.R., Ortiz M., Ruscetti F.W.*: Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. Blood. 1995, 86, 1757–1764.

24. *Keltz M.D. et al.*: Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. Am. J. Obstet. Gynecol. 1996, 175, 1611–1619.
25. *Kurzawa R., Głąbowski W., Wenda-Różewicka L.*: Evaluation of mice preimplantation embryos cultured in media enriched with insulin-like growth factors I and II, epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha. Fol. Hist. Cytochem. 2001, 39, 245–251.
26. *Kurzawa R.*: Optymalizacja warunków hodowli pozaustrojowej przedimplantacyjnych zarodków mysich z uwzględnieniem roli wybranych czynników wzrostu. Ann. Acad. Med. Stetin. 2001, Suppl. 67.
27. *Lane M., Maybach J.M., Gardner D.K.*: Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Hum. Reprod. 2002, 17, 2686–2693.
28. *Lee J.W. et al.*: HLA-DR-triggered inhibition of hemopoiesis involves Fas/Fas ligand interactions and is prevented by c-kit ligand. J. Immunol. 1997, 159, 3211–3219.
29. *Lee R.K. et al.*: A comparison of the effects of different degrees of zona pellucida damage followed by cryopreservation on the postthaw development of mouse embryos. J. Assist. Reprod. Genet. 1997, 14, 170–173.
30. *Lighten A.D. et al.*: Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. Hum. Reprod. 1998, 13, 3144–3150.
31. *Marti M. et al.*: Plasma membrane and cytocortex alterations in frozen/thawed mouse embryos deprived of the zona pellucida. J. Exp. Zool. 1998, 280, 38–44.
32. *Martin K.L., Barlow DH., Sargent I.L.*: Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. Hum. Reprod. 1998, 13, 1645–1652.
33. *Matsui Y. et al.*: Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature, 1991, 353, 750–752.
34. *Mitsunari M. et al.*: The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. Mol. Hum. Reprod. 1999, 5, 874–879.
35. *Mori T. et al.*: Expression of Fas/Fas ligand system associated with atresia through apoptosis in murine ovary. Horm. Res. 1997, 48 Suppl. 3, 11–19.
36. *Nakagawa S., Kitoh T.*: Measurement of KIT ligand/stem cell factor: clinical and biochemical significance. Curr. Opin. Hematol. 2000, 7, 133–142.
37. *Narula A., Taneja M., Totey S.M.*: Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophectoderm and inner cell mass of in vitro fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. Mol. Reprod. Dev. 1996, 44, 343–351.
38. *Nishio M. et al.*: Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. Exp. Hematol. 2001, 29, 19–29.
39. *Oda A., Nishio M., Sawada K.*: Stem cell factor regulation of Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells. J. Hematother. Stem. Cell. Res. 2001, 10, 595–600.
40. *Pesce M. et al.*: Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). Development, 1993, 118, 1089–1094.
41. *Quirk S.M. et al.*: Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. Biol. Reprod. 1995, 52, 279–287.
42. *Rao L.V., Wikarczuk M.L., Heyner S.*: Functional roles of insulin and insulinlike growth factors in preimplantation mouse embryo development. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1990, 26, 1043–1048.
43. *Rawson C.L. et al.*: Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation. J. Cell. Biol. 1991, 113, 671–680.
44. *Saito H. et al.*: Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. J. Immunol. 1996, 157, 343–350
45. *Schoolcraft W.B., Gardner D.K.*: Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. Semin. Reprod. Med. 2001, 19, 259–268.
46. *Sette C. et al.*: The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. Int. J. Dev. Biol. 2000, 44, 599–608.
47. *Sharkey A.M. et al.*: Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. Biol. Reprod. 1995, 53, 974–981.
48. *Smith M.A., Pallister C.J., Smith J.G.*: Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. Acta Haematol. 2001, 105, 143–150.
49. *Sohn I.P. et al.*: Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of two-cell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. Mol. Cells. 2002, 13, 272–280.
50. *Spanos S. et al.*: Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. Biol. Reprod. 2000, 63, 1413–1420.
51. *Suda T., Nagata S.*: Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 1994, 179, 873–879.
52. *Suda T. et al.*: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell, 1993, 75, 1169–1178.
53. *Takahashi T. et al.*: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. Cell, 1994, 76, 969–976.
54. *Uechi H. et al.*: Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. Hum. Reprod. 1999, 14, 2827–2832.
55. *Uechi H. et al.*: Cryopreservation of mouse embryos affects later embryonic development possibly through reduced expression of the glucose transporter GLUT1. Mol. Reprod. Dev. 1997, 48, 496–500.
56. *Watanabe-Fukunaga R. et al.*: The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. J. Immunol. 1992, 148, 1274–1279.
57. *Wong G.H., Goeddel D.V.*: Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. J. Immunol. 1994, 152, 1751–1755.
58. *Wu H. et al.*: Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 1806–1810.
59. *Zou G.M. et al.*: Fas-mediated apoptosis of mouse embryo stem cells: its role during embryonic development. Am. J. Reprod. Immunol. 2000, 43, 240–248.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 95–105
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 95–105
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

ANNA NOWAKOWSKA

POLIMORFIZMY I/D GENU ENZYMU KONWERTUJĄCEGO ANGIOTENSYNĘ I (ACE) ORAZ 4G/5G REGIONU PROMOTOROWEGO GENU INHIBITORA AKTYWATORA PLAZMINOGENU (PAI-1) A UKŁAD HEMOSTAZY U PACJENTÓW Z SAMOISTNYM NADCIŚNIENIEM TĘTNICZYM*

THE INFLUENCE OF I/D POLYMORPHISM OF THE ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME (ACE) GENE AND 4G/5G POLYMORPHISM OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR (PAI-1) GENE PROMOTER ON THE HAEMOSTATIC SYSTEM IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION AND DYSLIPIDEMIA*

Studium Doktoranckie Samodzielnej Pracowni Zaburzeń Hemostazy Katedry Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej PAM
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Maria Jastrzębska*

Summary

Introduction: Many studies indicate that hypertension-related high shear stress and activation of renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system lead to endothelium damage and imbalance among haemostatic factors secreted by this tissue. Tissue plasminogen activator (t-PA) and its inhibitor (PAI-1), von Willebrand factor (vWF), and soluble thrombomodulin (sTM) are haemostatic markers of endothelial injury related to hypertension. Hypertensive status is also accompanied by high fibrinogen (Fb) levels and blood platelet activation. The influence of RAA system on haemostatic disorders is mainly due to the action of angiotensin II (Ang II) on PAI-1 synthesis by endothelial cells. Ang II is generated by angiotensin converting enzyme (ACE). It is believed that genes encoding PAI-1 and ACE may interact and regulate the delicate balance in the haemostatic system. The aim of this study was to: (1) compare hypertensive and normotensive subjects with regard to haemostatic factors; (2) assess the effect of ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms on haemostatic parameters in patients with essential hypertension as compared with normotensive subjects; (3) determine whether lipid disturbances modify the influence of ACE and PAI-1 gene polymorphisms on haemostatic factors; (4) investigate if there is an interaction of ACE and PAI-1 gene polymorphisms with haemostatic parameters in patients with essential hypertension.

Material and methods: 147 patients were enrolled in this study. They underwent a clinical and laboratory examination and were also interviewed. The patients were divided into two groups: hypertensive (HT – 104 patients with untreated essential hypertension and without clinical signs of ischaemic heart disease); and normotensive (NT – 43 healthy subjects). A subgroup of 45 patients diagnosed with mixed dyslipidemia was formed from the HT group. Haemostatic parameters (t-PA, PAI-1, β-thromboglobulin (β-TG), vWF, Fb) and ACE activity were determined using ELISA, ELFA, chronometric and spectrophotometric methods. Genotypes for ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms were determined with the polymerase chain reaction

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Maria Jastrzębska*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 106 stron, 5 rycin, 23 tabele, 226 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Maria Jastrzębska* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 106 pages, 5 figures, 23 tables, 226 references.

amplification followed by electrophoresis of the product on an agarose gel and detection with ethidium bromide.

Conclusion: The results led to the following conclusions: (1) Untreated essential hypertension is associated with the prothrombotic state reflected by increased levels of fibrinogen and tissue plasminogen activator and its inhibitor; (2) Deletion alleles (D or 4G) potentiate the prothrombotic state manifested by fibrinolytic disturbances in hypertensive patients as compared with normotensive subjects; (3) Lipid disorders enhance the prothrombotic effect of deletion alleles (D or 4G) in untreated essential hypertension; (4) There is no interaction between ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in the regulation of levels of haemostatic factors.

K e y w o r d s: gene polymorphism – haemostasis – essential hypertension.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy były: (1) ocena charakteru zaburzeń układu hemostazy u pacjentów z nieleczonym, samoistnym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób normotensyjnych, (2) ocena wpływu polimorfizmu I/D genu *ACE* oraz polimorfizmu 4G/5G regionu promotorowego genu *PAI-1* na stopień nasilenia zmian w układzie hemostazy u chorych z samoistnym nadciśnieniem tętniczym, (3) ocena powiązań pomiędzy wpływem badanych polimorfizmów na układ hemostazy a zaburzeniami lipidowymi, (4) poszukiwanie interakcji pomiędzy polimorfizmem I/D genu *ACE* oraz polimorfizmem 4G/5G regionu promotorowego genu *PAI-1* a układem hemostazy u pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym.

Materiał i metody: 147 pacjentów poddano badaniom klinicznym (monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi, testy wysiłkowe), laboratoryjnym i przeprowadzono u nich wywiad lekarski. Pacjentów podzielono na dwie grupy – hipertensyjną (HT) i normotensyjną (NT). Grupę HT stanowiły 104 osoby (88 mężczyzn i 16 kobiet, średnia wieku 29,4 ± 8,3 lat) z nieleczonym samoistnym nadciśnieniem tętniczym (eHT) bez cech klinicznych choroby niedokrwiennej serca. Grupę NT tworzyły 43 zdrowe osoby (24 mężczyzn i 19 kobiet, średnia wieku 26,9 ± 5,3 lat) z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Następnie pacjentów z eHT podzielono na dwie podgrupy: z dyslipidemią mieszaną (DL) – 45 pacjentów i bez zaburzeń lipidowych (NLP) – 59 pacjentów. Oznaczeń parametrów hemostatycznych (PAI-1, t-PA, β-TG, Fb) i aktywności ACE dokonano stosując metody: immunoenzymatyczną i immunofluorescencyjną (ELISA, ELFA), chronometryczną oraz spektrofotometryczną. W celu uwidocznienia polimorficznych regionów genów *ACE* i *PAI-1* wykorzystano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR).

Wnioski: Na podstawie otrzymanych wyników sformułowano następujące wnioski: (1) nieleczone samoistne nadciśnienie tętnicze usposabia chorych do stanu prozakrzepowego, który charakteryzuje się wzrostem stężenia fibrynogenu, tkankowego aktywatora plazminogenu i jego inhibitora typu 1; (2) nosicielstwo allelu D polimorfizmu I/D genu *ACE* lub allelu 4G polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* u pacjentów hipertensyjnych wiąże się z nasileniem stanu prozakrzepowego, objawiającego się upośledzeniem fibrynolizy w porównaniu do osób normotensyjnych; (3) współwystępowanie dyslipidemii nasila wpływ alleli delecyjnych (D lub 4G) na występowanie stanu prozakrzepowego u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym; (4) oba badane polimorfizmy modulują układ hemostazy niezależnie od siebie.

H a s ł a: polimorfizm genetyczny – hemostaza – nadciśnienie tętnicze.

Wstęp

Ciśnienie tętnicze jest dodatnio skorelowane z ryzykiem miażdżycy oraz śmiertelnością z powodu jej powikłań, nawet w zakresie wartości prawidłowych rekomendowanych przez WHO (ciśnienie skurczowe ≤ 140 mm Hg i/lub rozkurczowe ≤ 90 mmHg) [1]. Pomimo że nadciśnienie tętnicze uznano za niezależny czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, fizjologiczny i molekularny mechanizm jego wpływu na tworzenie się blaszki miażdżycowej nie został w pełni wyjaśniony. Ważną rolę w tym procesie odgrywają między innymi czynniki hemostatyczne. Wiele badań wskazuje, że towarzyszące nadciśnieniu tętniczemu zwiększone siły ścinania (*shear stress*) i nadmierna aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) prowadzą do uszkodzenia śródbłonka, a w konsekwencji, m.in. do stanu prozakrzepowego, związanego z zaburzeniem równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antykoagulacyjnymi wydzielanymi przez te komórki [2]. Za hemostatyczne markery uszkodzenia śródbłonka towarzyszące nadciśnieniu tętniczemu uznaje się powszechnie podwyższenie stężenia tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i jego inhibitora typu 1 (PAI-1), czynnika von Willebranda (vWF) oraz wolnej trombomoduliny (sTM). Z występowaniem nadciśnienia tętniczego ściśle związany jest również wzrost stężenia fibrynogenu (Fb) oraz aktywacja płytek krwi [3, 4].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że towarzyszący nadciśnieniu tętniczemu stan prozakrzepowy jest skutkiem zwiększonej aktywności układu RAA. Najlepiej udokumentowano wpływ aktywności tego systemu na czynniki układu fibrynolizy. Konwertaza angiotensyny I (ACE) jest odpowiedzialna za degradację bradykininy (BK) − peptydu, który między innymi pełni ważną rolę mediatora wydzielania t-PA przez komórki śródbłonka [5]. Z tego powodu nasilona działalność układu RAA wiąże się z obniżeniem aktywności t-PA. Z kolei stymulacja wydzielania PAI-1 w nadciśnieniu tętniczym zależy przede wszystkim od

peptydów angiotensynowych – AngII, AngIII i AngIV [6, 7, 8].

Fizjologiczna zależność między układami RAA oraz fibrynolitycznym może być konsekwencją interakcji genów kodujących ich składniki. Ostatnio wiele uwagi poświęca się zagadnieniu współdziałania dwóch genów kodujących czynniki kontrolujące poziom aktywności tych układów – *ACE* i *PAI-1*.

Zlokalizowany na chromosomie 17 gen dla *ACE*, liczy 22 tysięcy pz i zbudowany jest z 26 eksonów oraz 25 intronów. Znane są dwa warianty polimorficzne genu *ACE*: allel I (insercyjny), który w obszarze intronu 16 zawiera sekwencję repetytywną Alu o długości 287 pz oraz allel D (delecyjny), w którym nie stwierdza się obecności tego fragmentu. Polimorfizm ten odpowiada za około 47% całkowitej zmienności stężenia *ACE* w osoczu. W populacji ludzkiej wyróżniono trzy rodzaje genotypów: heterozygoty ID oraz homozygoty II i DD. Nosicielstwo allelu D wiąże się ze zwiększoną aktywnością *ACE* [9]. Wydaje się, że najbardziej prawdopodobny jest związek allelu D ze stanami patologicznymi, które na długo wyprzedzają miażdżycę objawową, dysfunkcją śródbłonka oraz zaburzeniami hemostatycznymi o charakterze prozakrzepowym. Natomiast wystąpienie cięższych objawów sercowo-naczyniowych i mózgowych uzależnione jest od działania wielu innych współdziałających ze sobą czynników genetycznych i środowiskowych [10]. Zaobserwowano, że nawet u osób młodych, z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego, genotyp DD predysponuje do słabszej odpowiedzi naczyniorozszerzającej tętnic na acetylocholinę (a więc również obniżonego wydzielania NO), co wskazuje na upośledzenie funkcji śródbłonka [11]. Homozygoty DD charakteryzuje również znacznie nasilony katabolizm bradykininy, co jest związane z wyższą aktywnością *ACE*, w porównaniu do osób z genotypem II [12], a jak wiadomo, stan ten ma istotny wpływ na równowagę w układzie fibrynolizy. Według *Makrisa i wsp.*, osoby z genotypem DD mają istotnie wyższe osoczowe stężenie *PAI-1*, t-PA, Fb, D--dimerów i vWF, w odniesieniu do osób z genotypem ID bądź II [13].

Gen kodujący *PAI-1* leży na długim ramieniu chromosomu 7 i liczy około 12,2 tys. pz, zawiera 9 eksonów i 8 intronów. Ekspresja genu *PAI-1* jest regulowana przez wiele czynników zewnętrznych (przede wszystkim przez parametry lipidowe), a także przez polimorfizmy zlokalizowane w jego obszarze [14]. Do tej pory opisano około 9 polimorfizmów genu *PAI-1* wpływających w różnym stopniu na stężenie *PAI-1* w osoczu [15], jednakże największe znaczenie funkcjonalne przypisuje się jednonukleotydowemu polimorfizmowi 4G/5G regionu promotorowego. Jest on zlokalizowany w pozycji -675 pz od miejsca startu transkrypcji i polega na obecności sekwencji 4 lub 5 nukleotydów guaninowych (allel 4G lub 5G). Na tej podstawie można określić genotyp *PAI-1* jako 4G/4G, 4G/5G lub 5G/5G. Dowiedziono, że allel 5G w przeciwieństwie do allelu 4G dodatkowo posiada zdolność wiązania białka represorowego, które prawdopodobnie hamuje transkrypcję genu *PAI-1* [16]. Towarzyszące allelom 4G wyższe stężenie osoczowego *PAI-1* jest związane ze zwiększeniem częstości występowania choroby wieńcowej serca oraz zawału mięśnia sercowego [17, 18, 19]. Polimorfizm 4G/5G moduluje również wpływ aktywacji układu RAA na ekspresję *PAI-1*. Zauważono, że homozygoty 4G/4G znacznie silniej niż nosiciele allelu 5G reagują na wywołany niskim spożyciem soli wzrost stężenia Ang II, co przejawia się najwyższym stężeniem PAI-1 [20]. Polimorfizm ten wpływa także na mierzone spadkiem PAI-1 efekty leczenia inhibitorami ACE. Zahamowanie układu RAA daje najlepsze wyniki w grupie osób z genotypem 4G/4G, które wyjściowo prezentują najmniej korzystny fenotyp (najwyższe stężenie PAI-1 wywołane największą aktywnością układu RAA) [21].

Badania *Margaglione i wsp.* podkreślają istnienie trendu do występowania wyższego stężenia PAI-1 w osoczu u pacjentów z zaawansowaną miażdżycą będących homozygotami pod względem alleli delecyjnych genów dla *PAI-1* i *ACE* (4G/4G + DD) [22]. Ta sama analiza przeprowadzona na dużej grupie osób bez klinicznych objawów miażdżycy pokazała, że oba polimorfizmy są niezależnymi predyktorami stężenia osoczowego PAI-1 [23]. Zagadnieniu interakcji między polimorfizmami 4G/5G genu *PAI-1* i I/D genu *ACE* poświęcono wiele uwagi. Badano ich wpływ na śmiertelność z powodu chorób naczyniowych, na występowanie choroby wieńcowej i zawału serca oraz makroangiopatii towarzyszącej cukrzycy [24, 25, 26, 27]. Wyniki tych prac nie są jednoznaczne z wnioskami płynącymi z badań *Margaglione i wsp.*

Opublikowane wcześniej wyniki badań przeprowadzonych na grupie pacjentów z eHT, która będzie przedmiotem analiz w niniejszej pracy, wskazują, że nosicielstwo alleli delecyjnych polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* związane jest ze stanem prozakrzepowym przejawiającym się wzrostem stężenia Fb, PAI-1 i t-PA [28]. Być może allele delecyjne polimorfizmu I/D genu *ACE* również odgrywają znaczącą rolę w modulowaniu układu hemostazy u tych pacjentów. Wydaje się, że są oni dogodnym materiałem do weryfikacji wyników badań *Margaglione i wsp.* Wynika to z tego, że u pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym można się spodziewać zwiększonej aktywacji układu RAA. Z uwagi na fakt, że na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego, poza czynnikami genetycznymi, niewątpliwie duży wpływ mają też czynniki środowiskowe, analiza powinna być poszerzona także o ich udział.

W oparciu o przedstawione dane w niniejszej pracy sformułowano następujące cele: (1) ocena charakteru zaburzeń układu hemostazy u pacjentów z nieleczonym samoistnym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób normotensyjnych; (2) ocena wpływu polimorfizmu I/D genu *ACE* oraz polimorfizmu 4G/5G regionu promotorowego genu *PAI-1* na stopień nasilenia zmian w układzie hemostazy u chorych z samoistnym nad-

ciśnieniem tętniczym; (3) ocena powiązań pomiędzy wpływem badanych polimorfizmów na układ hemostazy a zaburzeniami lipidowymi; (4) poszukiwanie interakcji pomiędzy polimorfizmem I/D genu *ACE* oraz polimorfizmem 4G/5G regionu promotorowego genu *PAI-1* a układem hemostazy u pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym.

Materiał i metody

Protokół badań uzyskał aprobatę Komisji Bioetycznej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o charakterze badań i wyrazili pisemną zgodę na ich przeprowadzenie. Badanych rekrutowano spośród pacjentów hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii PAM, a także spośród osób zgłaszających się do Przychodni Przyklinicznej.

147 pacjentów poddano badaniom klinicznym (monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi, testy wysiłkowe), laboratoryjnym i przeprowadzono u nich wywiad lekarski. Pacjentów podzielono na dwie grupy – hipertensyjną (HT) i normotensyjną (NT). Grupę HT stanowiły 104 osoby (88 mężczyzn i 16 kobiet, średnia wieku 29,4 ± 8,3 lat), z nieleczonym do chwili rozpoznania, samoistnym nadciśnieniem tętniczym (eHT) bez cech klinicznych IHD. Grupę NT stanowiły 43 zdrowe osoby (24 mężczyzn i 19 kobiet, średnia wieku 26,9 ± 5,3 lat) z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Ciśnienie tętnicze krwi mierzono za pomocą sfigmomanometru rtęciowego, a następnie monitorowano przez 24h metodą ABPM (Ambulatory Blood Pressure Monitoring) aparatem Spacelabs. Kryterium rozpoznania eHT było SBP≥140 mmHg oraz DBP ≥ 90 mmHg (wg WHO). W oparciu o wywiad i badania biochemiczne wykluczono pacjentów z cukrzycą, chorobami nerek, otyłością i chorobami wywołującymi wtórną hiperlipoproteinemię. Zaburzenia lipidowe w grupie hipertensyjnej rozpoznano na podstawie kryteriów (i/lub): TC ≥ 5,17 mmol/L, LDL-C ≥ 3,49 mmol/L, HDL-C ≤ 1,03 mmol/L, TG ≥ 2,06 mmol/L. Na tej podstawie podzielono pacjentów z nadciśnieniem tętniczym na dwie podgrupy: z dyslipidemią mieszaną (DL) i bez zaburzeń lipidowych (NLP). Do podgrupy DL zakwalifikowano 45 pacjentów z eHT. Cechowało ich podwyższone stężenie TG i obniżone HDL-C (hiperlipoproteinemia pierwotna typu IV) lub podwyższone stężenia TC, LDL-C i TG (hiperlipoproteinemia pierwotna typu IIb). Podgrupa NLP zawierała pozostałych 59 pacjentów z eHT. Charakterystykę ogólną i biochemiczną grupy hipertensyjnej i normotensyjnej zawiera tabela 1.

Tabela 1. **Charakterystyka biochemiczna grupy hipertensyjnej (HT) i normotensyjnej (NT) ($\bar{x}$ ± SD)**

Table 1. **Biochemical characteristics of hypertensive (HT) and normotensive (NT) groups ($\bar{x}$ ± SD)**

Parametr / Parameter	HT n=104	NT n=43	p
Wiek / Age (lata / years)	29,4 ± 8,3	26,9 ± 5,3	NS
Glukoza / Glucose (mmol/L)	5,03 ± 0,60	4,80 ± 0,45	0,03
Kwas moczowy / Uric acid (mmol/L)	0,38 ± 0,07	0,33 ± 0,07	0,0003
AspAT (U/L)	25,2 ± 9,1	24,5 ± 6,4	NS
AlaAT (U/L)	30,4 ± 15,5	24,7 ± 10,9	0,03
BMI (body mass index) (kg/m^2)	25,6 ± 3,6	23,0 ± 3,3	0,0001
TC (mmol/L)	5,35 ± 1,09	4,73 ± 0,90	0,001
LDL-C (mmol/L)	3,01 ± 0,82	2,42 ± 0,6	0,0001
HDL-C (mmol/L)	1,21 ± 0,22	1,35 ± 0,27	0,0009
Triglicerydy / Triglycerides (mmol/L)	1,76 ± 1,59	1,08 ± 0,55	0,006

Metodyka oznaczeń parametrów hemostatycznych, lipidowych i aktywności ACE

Oznaczenia PAI-1, t-PA i β-TG wykonano z użyciem gotowych zestawów testowych ASSERACHROM firmy Diagnostica Stago (ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*). Stężenie Fb zostało określone metodą chronometryczną wg Claussa (test Hemolab Fibrinomat; bioMerieux). Stężenie vWF zostało oznaczone metodą immunofluorescencyjną (ELFA mini Vidas – *enzyme linked fluorescent assay*). Aktywność ACE mierzono metodą spektrofotometryczną, z użyciem zestawów diagnostycznych firmy Sigma – UV Test ACE.

Spośród parametrów lipidowych oznaczano stężenie cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG) oraz cholesterolu lipoprotein o niskiej (LDL-C) i wysokiej gęstości (HDL-C) przy użyciu zestawów testowych firmy Boehringer Mannheim z aplikacją na analizator Clinilab (bioMerieux).

Pomocnicze badania laboratoryjne

Badania pomocnicze wykonano w celu oceny stanu zdrowia badanych osób. Badania biochemiczne (aktywność aminotransferaz, stężenie kwasu moczowego i glukozy) wykonano metodami przyjętymi za rutynowe w Laboratorium Centralnym Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 PAM w Szczecinie. Laboratorium pracuje pod kontrolą krajową (AM Łódź) i międzynarodową (Randox, Irlandia).

Izolacja DNA

Genomowy DNA izolowano metodą nieenzymatyczną-nieorganiczną z użyciem 2% roztworu Tritonu X-100 [29]. Uzyskany DNA zawieszano w buforze (Tris-EDTA) TE pH 5,5. Pomiary stężenia DNA wykonane były za pomocą spektrofotometru (UV/VIS spectrometr Lambda 40, Perkin-Elmer, Niemcy) przy analitycznej długości fali 260 nm. Materiał przechowywano do dalszych badań w temperaturze -20ºC.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) genu *ACE*

Do PCR używano DNA po rozcieńczeniu go do stężenia 40 ng/μL. Dla oceny polimorfizmu I/D genu *ACE* przy amplifikacji DNA w PCR zostały zastosowane pary oligonukleotydów: 5`-GCCCTGCAGGTGTCTGCAG-

CATGT-3` jako primer sensowy (ACE-1) i 5`-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3` jako primer antysensowy (ACE-2). Produktami PCR z tymi primerami były fragmenty cDNA: dla allelu D fragment o długości 319 par zasad (pz), a dla allelu I fragment o długości 597 par zasad. Z uwagi na zjawisko preferencyjnej amplifikacji krótszych fragmentów DNA (w tym przypadku allelu D) i stąd ryzyko „niedoszacowania" częstości występowania genotypu ID, próbki DNA od osób, wstępnie określonych jako homozygoty DD, były weryfikowane poprzez wykonanie drugiej łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) z parą primerów 5`-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3` jako primerem sensowym (ACE-3) i 5`-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3` jako primerem antysensowym (ACE-4). Primery ACE-3 i ACE-4 są swoiste dla allelu I [30]. Produkt PCR o długości 395 pz jest dowodem obecności genotypu ID, brak powyższego produktu potwierdza obecność genotypu DD.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) genu *PAI-1*

Dla oceny polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* przy amplifikacji DNA w PCR została zastosowana para oligonukleotydów: 5`-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3` jako primer sensowy (PAI-se) i 5`-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3` jako primer antysensowy (PAI-as) [31]. Produktem PCR z tymi primerami jest fragment DNA o długości 98 par zasad dla allelu 4G i 99 par zasad dla allelu 5G. Przy kostrukcji primera PAI-se w miejsce szóstej od końca 3' adeniny obecnej w prawidłowej sekwencji genu wprowadzona została cytozyna (podkreślone C). Spowodowało to pojawienie się „sztucznego" miejsca restrykcyjnego dla enzymu BseL I (Boehringer Mannheim) (CCN5↓N2GG) w przypadku allelu 5G i strawienie produktu PCR na fragmenty 77 i 22 par zasad. Przy obecności allelu 4G produkt PCR (98 par zasad) po inkubacji z enzymem BseL I pozostaje niestrawiony.

Protokół PCR

Próbki DNA (40 ng) były amplifikowane w roztworze o końcowej objętości 20 µL, zawierającym 4 pM każdego primera, 2,5 mM każdego z trifosforanów dezoksyrybonukleotydów (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Promega), bufor do PCR (końcowe stężenie magnezu: 1,5 mM MgC_{12}) (Boehringer Mannheim) i 0,5 jednostki polimerazy Taq (Boehringer Mannheim). Amplifikacje zostały przeprowadzone w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) w następujących warunkach: wstępna denaturacja w temp. 94ºC przez 5 min, a następnie 35 cykli: denaturacja w temp. 94ºC przez 15 s, wiązanie primerów (tzw. *annealing*) przez 30 s w temp. 64ºC i wydłużanie łańcucha w temp. 72ºC przez 30 s; PCR kończyło 8 minutowe wydłużanie łańcucha w temp. 72ºC. Otrzymane w wyniku trawienia fragmenty cDNA oraz kontrole negatywne (produkty PCR bez trawienia enzymem restrykcyjnym) i marker wielkości DNA były rozdzielane elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym wybarwianym bromkiem etydyny. W celu dokumentacji wyników wykonano zdjęcia żeli w świetle UV.

Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu Statistica (StatSoft, USA). Dla oceny normalności rozkładów wykorzystano test Kołmogorowa–Smirnowa; w razie konieczności zastosowano transformację logarytmiczną. Porównania między podgrupami przeprowadzono, stosując testy parametryczne: test t-Studenta oraz dwuczynnikową ANOVA wraz z testami porównań wielokrotnych (test Tukeya, test NIR). Wyliczono współczynniki korelacji r Pearsona. Za istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 2–6. Tabela 2 zawiera porównanie średnich wartości ciśnienia tętniczego, aktywności ACE i badanych parametrów hemostazy w grupie hipertensyjnej i normotensyjnej.

Rezultaty analiz dotyczących zależności między polimorfizmem I/D genu *ACE* a badanymi parametrami w grupie nadciśnieniowej i osób zdrowych zawierają tabele 3 i 4. Tabela 3 przedstawia analizę dwuczynnikową w układzie przynależność grupowa (grupa HT lub NT) x polimorfizm I/D w odniesieniu do wartości ciśnienia tętniczego, aktywności ACE oraz parametrów hemostatycznych, natomiast tabela 4 w układzie dyslipidemia x polimorfizm I/D u pacjentów nadciśnieniowych. Analiza związków korelacyjnych pokazała, że wyłącznie u pacjentów z eHT z genotypem DD wystąpiła znamienna korelacja ACE z BMI ($r = 0,49$; $p = 0,01$), a także PAI-1 z ACE ($r = 0,48$; $p = 0,05$), z BMI ($r = 0,61$; $p = 0,01$) oraz z HDL-C ($r = -0,55$; $p = 0,01$). Zależności takich nie stwierdzono w grupie normotensyjnej. Uwzględnienie w analizie dodatkowego czynnika, jakim jest występowanie zaburzeń lipidowych, spowodowało nasilenie obserwowanych zależności. Świadczą o tym silniejsze korelacje ACE z BMI ($r = 0,62$; $p = 0,05$), PAI-1 z BMI

Tabela 2. **Wartości ciśnienia tętniczego krwi, aktywność ACE i badane parametry hemostazy w grupie hipertensyjnej (HT) i normotensyjnej (NT) ($\bar{x} \pm SD$)**

Table 2. **Blood pressure, ACE activity, and haemostatic parameter levels in hypertensive (HT) and normotensive (NT) groups ($\bar{x} \pm SD$)**

Parametr / Parameter	HT n=104	NT n=43	p
SBP (mm Hg)	153,4 ± 10,8	119,7 ± 15,2	0,0000
DBP (mm Hg)	99,5 ± 6,9	75,1 ± 10,9	0,0000
ACE (U/L)	48,1 ± 26,0	44,7 ± 30,3	NS
t-PA (ng/mL)	7,3 ± 3,8	5,7 ± 2,8	0,0131
PAI-1 (ng/mL)	31,2 ± 22,8	18,0 ± 15,5	0,0006
Fb (g/L)	2,88 ± 0,62	2,64 ± 0,48	0,0199
vWF (%)	76,3 ± 30,3	70,4 ± 31,3	NS
β-TG (IU/L)	128,4 ± 52,0	148,8 ± 40,6	0,0210

Tabela 3. **Interakcja polimorfizmu I/D genu *ACE* oraz przynależności grupowej (grupa hipertensyjna – HT lub normotensyjna – NT) a wartości ciśnienia tętniczego krwi, aktywność ACE oraz badane parametry hemostazy ($\bar{x}$ ± SD)**

Table 3. **Interaction between *ACE* gene I/D polymorphism and hypertensive status (hypertensive – HT or normotensive – NT group) in the regulation of blood pressure, ACE activity and haemostatic parameter levels ($\bar{x}$ ± SD)**

Parametr / Parameter		II HT (n = 30) NT (n = 15)	ID HT (n = 50) NT (n = 21)	DD HT (n = 24) NT (n = 7)	p (ANOVA)		
					1	2	1x2
SBP (mm Hg)	HT	155,0 ± 9,7	150,7 ± 10,3	157,0 ± 11,9	0,0000	NS	0,02
	NT	114,1 ± 12,8	123,1 ± 16,6	119,7 ± 8,9			
DBP (mm Hg)	HT	101,3 ± 6,1	98,8 ± 6,7	98,4 ± 8,0	0,0000	NS	NS
	NT	74,3 ± 12,2	75,7 ± 10,6	74,3 ± 6,7			
ACE (U/L)	HT	33,4 ± 19,9	53,3 ± 27,0 †	55,2 ± 23,9 ‡	NS	0,0000	0,008
	NT	37,5 ± 23,6	40,0 ± 22,7	81,0 ± 40,9 *			
t-PA (ng/mL)	HT	8,4 ± 4,9 #	6,7 ± 3,2	7,3 ± 3,3	0,011	NS	NS (0,13)
	NT	4,9 ± 2,2	6,1 ± 3,1	5,9 ± 3,0			
PAI-1 (ng/mL)	HT	28,6 ± 20,1	31,1 ± 23,4	34,7 ± 25,2 §	0,001	NS	NS
	NT	16,0 ± 14,9	20,7 ± 17,6	15,1 ± 9,7			
Fb (g/L)	HT	3,03 ± 0,73¶	2,80 ± 0,60	2,88 ± 0,49	NS (0,06)	NS	NS
	NT	2,68 ± 0,48	2,59 ± 0,45	2,78 ± 0,58			
vWF (%)	HT	84,8 ± 44,0 &	72,9 ± 22,7	72,9 ± 21,6	NS	NS	NS (0,1)
	NT	61,6 ± 16,6	76,2 ± 40,5	73,8 ± 25,8			
β-TG (IU/L)	HT	130,6 ± 50,2	127,9 ± 52,3	126,9 ± 55,6	0,05	NS	NS
	NT	153,7 ± 42,7	148,5± 44,4	142,0 ± 25,4			

1 – wpływ przynależności grupowej / effect of group, 2 – wpływ polimorfizmu I/D / effect of I/D polymorphism, 1x2 – interakcja: przynależność grupowa x polimorfizm I/D / interaction: group x I/D polymorphism

† vs. HT II, p= 0,02; ‡ vs. HT II, p= 0,009; * vs. NT II, p=0,002; oraz vs. NT ID, p=0,003; oraz vs. HT II, p=0,0001; # vs. NT II p=0,022; § vs. NT DD, p=0,03; vs. NT II, p=0,009; vs. NT ID, p=0,03; ¶ vs. NT ID, p=0,009; & vs. NT II, p=0,02; (test Tukeya / Tukey's test)

(r = 0,78; p = 0,01) oraz PAI-1 z HDL-C (r = -0,64; p =0,05) zanotowane u pacjentów nadciśnieniowych z genotypem DD i dyslipidemią. U homozygot II zanotowano także istnienie silnej korelacji stężenia t-PA ze stężeniem TG (r = 0,58). Związki takie nie występowały w grupie pacjentów z eHT bez zaburzeń lipidowych. Ocena danych testem χ^2 nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą HT i NT, jeśli chodzi o częstości występowania genotypów i alleli badanego polimorfizmu. Rozkład częstości genotypów w grupie HT i NT był zgodny z częstością spodziewaną, wyliczoną z równania Hardy'ego–Weinberga (grupa HT: $\chi^2 = 0,125$, p = 0,94; grupa NT: $\chi^2 = 0,004$, p = 0,99).

Rezultaty analiz dotyczących zależności między polimorfizmem 4G/5G a badanymi parametrami przedstawiają tabele 5 i 6. Tabela 5 zawiera dwuczynnikową analizę wariancji, w układzie przynależność grupowa (grupa HT lub NT) x polimorfizm 4G/5G, w odniesieniu do wartości ciśnienia tętniczego, aktywności ACE i badanych parametrów hemostazy, natomiast tabela 6 w układzie dyslipidemia x polimorfizm 4G/5G w grupie HT. Populacja nadciśnieniowa i osób normotensyjnych nie różniły się istotnie statystycznie

Tabela 4. **Interakcja polimorfizmu I/D genu *ACE* i zaburzeń lipidowych (dyslipidemia) a wartości ciśnienia tętniczego, aktywność ACE i parametry hemostazy u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($\bar{x}$ ± SD)**

Table 4. **Interaction between *ACE* gene I/D polymorphism and dyslipidemia in the regulation of blood pressure, ACE activity and haemostatic parameter levels ($\bar{x}$ ± SD)**

Parametr / Parameter	Dyslipidemia (DL) / Dyslipidemia (DL)			Bez zaburzeń lipidowych (NLP) / Normolipemia (NLP)			p (ANOVA)		
	II n = 12	ID n = 22	DD n = 11	II n = 18	ID n = 28	DD n = 13	1	2	1x2
SBP (mm Hg)	155,5 ± 13,3	150,1 ± 11,4	160,0 ± 13,8	154,6 ± 6,7	151,2 ± 9,5	154,5 ± 9,9	NS	0,03	NS
DBP (mm Hg)	101,8 ± 5,1	99,5 ± 8,5	99,0 ± 7,4	101,0 ± 6,8	98,3 ± 5,1	97,8 ± 8,7	NS	NS	NS
ACE (U/L)	44,8 ± 23,6	62,6 ± 29,4 †	58,1 ± 26,1 ‡	25,4 ± 12,2	46,1 ± 22,9	52,8 ± 22,7*	0,006	0,001	NS
t-PA (ng/mL)	11,6 ± 2,8 #	7,3 ± 9,7	9,4 ± 2,9	6,2 ± 2,5	6,1 ± 3,6	5,5 ± 2,5	0,0000	0,03	0,03
PAI-1 (ng/mL)	31,2 ± 19,2	38,9 ± 27,3 §	43,1 ± 29,3 §	26,8 ± 21,0	25,0 ± 18,2	27,0 ± 18,9	0,02	NS	NS
Fb (g/L)	3,22 ± 0,92	2,82 ± 0,58	3,04 ± 0,57	2,91 ± 0,56	2,78 ± 0,62	2,74 ± 0,38	NS	NS	NS
vWF (%)	76,3 ± 25,9	75,5 ± 22,2	69,1 ± 19,5	90,8 ± 53,2	70,8 ± 23,3	76,0 ± 23,5	NS	NS	NS
β-TG (IU/L)	113,2 ± 40,0	124,8 ± 47,0	137,3 ± 54,8	142,9 ± 54,1	134,0 ± 57,1	118,2 ± 56,9	NS	NS	NS

1 – wpływ dyslipidemii / effect of dyslipidemia, 2 – wpływ polimorfizmu I/D / effect of I/D polymorphism, 1x2 – interakcja: dyslipidemia x polimorfizm I/D / interaction: dyslipidemia x I/D polymorphism

† vs. II NLP, p=0,0001; ‡ vs. II NLP, p=0,01; * vs. II NLP p=0,02; # vs. DL_{ID}, p=0,01 oraz vs. NLP_{DD}, p=0,0004; oraz vs. NLP_{ID}, p=0,0002; oraz vs. NLP_{II}, p=0,001(test Tukeya / Tukey's test); § vs. NLP_{ID}, p=0,03 (test NIR / NIR test)

Tabela 5. **Interakcja polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* oraz przynależności grupowej (grupa hipertensyjna – HT lub normotensyjna – NT) a wartości ciśnienia tętniczego krwi, aktywność ACE oraz badane parametry hemostazy ($\bar{x}$ ± SD)**

Table 5. **Interaction between *PAI-1* gene 4G/5G polymorphism and hypertensive status (hypertensive – HT or normotensive – NT group) in the regulation of blood pressure, ACE activity and haemostatic parameter levels ($\bar{x}$ ± SD)**

Parametr / Parameter		5G/5G HT (n = 17) NT (n = 4)	4G/5G HT (n = 50) NT (n = 21)	4G/4G HT (n = 37) NT (n = 18)	p (ANOVA)		
					1	2	1x2
SBP (mm Hg)	HT	155,8 ± 12,6	152,9 ± 10,7	152,9 ± 10,0	0,000	NS	NS
	NT	114,3 ± 4,3	124,6 ± 15,4	115,1 ± 14,0			
DBP (mm Hg)	HT	95,9 ± 7,9	99,3 ± 6,7	101,3 ± 6,2§	0,000	0,22	0,0005
	NT	74,5 ± 6,2	79,7 ± 10,5	69,9 ± 9,0			
ACE (U/L)	HT	49,4 ± 22,6	48,9 ± 28,1	43,2 ± 27,0	NS	NS	NS
	NT	49,3 ± 26,5	43,3 ± 33,4	43,8 ± 36,0			
t-PA (ng/mL)	HT	6,6 ± 2,8	7,3 ± 4,3 †	7,6 ± 3,7 ‡	NS (0,07)	NS	NS
	NT	6,0 ± 2,4	6,3 ± 2,9	4,8 ± 2,7			
PAI-1 (ng/mL)	HT	25,4 ± 17,5	31,3 ± 24,4 *	33,9 ± 22,9 #	0,019	NS	NS
	NT	20,8 ± 16,3	18,6 ± 16,6	17,1 ± 15,0			
Fb (g/L)	HT	2,84 ± 0,63	2,88 ± 0,46	2,91 ± 0,79	NS	NS	NS
	NT	2,87 ± 0,49	2,69 ± 0,45	2,56 ± 0,46			
vWF (%)	HT	81,1 ± 34,7	77,5 ± 34,7	72,3 ± 20,2	NS	NS	NS
	NT	105,1 ± 55,0	67,5 ± 17,5	66,8 ± 36,2			
β-TG (IU/L)	HT	119,0 ± 51,1	128,7 ± 52,2	132,6 ± 53,0	0,028	NS	NS
	NT	158,3 ± 146,2	148,2 ± 40,9	148,4 ± 41,6			

1 – wpływ przynależności grupowej / effect of group, 2 – wpływ polimorfizmu 4G/5G / effect of 4G/5G polymorphism, 1x2 – interakcja: przynależność grupowa x polimorfizm 4G/5G / interaction: group x 4G/5G polymorphism

§ vs. NT 4G/4G, vs. NT 4G/5G, vs. NT 5G/5G p=0,0000; (test Tukeya / Tukey's test); † vs. NT 4G/4G, p=0,01; ‡ vs. NT 4G/4G, p=0,007; * vs. NT 4G/4G i vs. NT 4G/5G, p=0,02; # vs. NT 4G/4G, p=0,068; vs. NT 4G/5G, p=0,09; (test NIR / NIR test)

rozkładem genotypów i częstością alleli 4G i 5G. Obie grupy znajdowały się w stanie równowagi Hardy'ego–Weinberga pod względem polimorfizmu 4G/5G genu PAI-1 (grupa HT: $\chi^2 = 0{,}0005$, p = 0,99; grupa NT: $\chi^2 = 0{,}3769$, p = 0,83).

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym przeprowadzono również dwuczynnikową analizę wariancji w układzie polimorfizm I/D genu *ACE* x polimorfizm 4G/5G regionu promotorowego genu *PAI-1*. Nie wykazano wspólnego oddziaływania badanych polimorfizmów na wartości wybranych parametrów hemostazy, aktywność ACE i wartości ciśnienia tętniczego.

Dyskusja

Wyniki badań własnych wskazują, że pacjentów z nieleczonym, samoistnym nadciśnieniem tętniczym charakteryzuje występowanie zaburzeń w układzie hemostazy o charakterze prozakrzepowym przejawiających się podwyższonym stężeniem czynników fibrynolitycznych (t-PA i PAI-1) oraz fibrynogenu. Ich obecność jest niekorzystnym czynnikiem prognozującym rozwój i pogłębienie patologicznych zmian w układzie sercowo-naczyniowym (miażdżyca tętnic, włóknienie ściany naczyń). Stan ten

Tabela 6. **Interakcja polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* i zaburzeń lipidowych (dyslipidemia) a wartości ciśnienia tętniczego, aktywność ACE i parametry hemostazy u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($\bar{x}$ ± SD)**

Table 6. **Interaction between *PAI-1* gene 4G/5G polymorphism and dyslipidemia in the regulation of blood pressure, ACE activity and haemostatic parameter levels ($\bar{x}$ ± SD)**

Parametr / Parameter	Dyslipidemia (DL) / Dyslipidemia (DL)			Bez zaburzeń lipidowych (NLP) / Normolipemia (NLP)			p (ANOVA)		
	5G/5G n = 9	4G/5G n = 22	4G/4G n = 14	5G/5G n = 8	4G/5G n = 28	4G/4G n = 23	1	2	1x2
SBP (mm Hg)	159,6 ± 15,3	152,4 ± 13,8	152,8 ± 9,22	151,6 ± 7,6	153,4 ± 7,8	152,9 ± 10,7	NS	NS	NS
DBP (mm Hg)	99,2 ± 6,53	98,9 ± 8,7	102,1 ± 5,2 †	92,3 ± 8,1	99,5 ± 4,6	100,8 ± 6,8 ‡	NS	0,02	NS
ACE (U/L)	55,1 ± 20,9	63,3 ± 27,8	43,1 ± 33,6	45,8 ± 23,3	37,6 ± 23,1	43,2 ± 19,5	0,03	NS	NS
t-PA (ng/mL)	8,3 ± 2,8	9,1 ± 4,6 *	9,1 ± 4,4 #	7,7 ± 1,2	6,0 ± 3,5	6,6 ± 2,8	0,0002	NS	NS
PAI-1 (ng/mL)	34,0 ± 18,3	37,5 ± 28,2 §	41,0 ± 26,9	15,7 ± 10,6	26,4 ± 20,1	29,1 ± 19,1	0,006	NS	NS
Fb (g/L)	3,03 ± 0,73	3,04 ± 0,47	2,8 ± 0,94	2,63 ± 0,44	2,75 ± 0,43	2,95 ± 0,70	NS	NS	NS
vWF (%)	66,0 ± 18,5	77,4 ± 26,3	74,2 ± 17,3	98,0 ± 41,7	77,6 ± 40,8	71,1 ± 22,3	NS	NS	NS
β-TG (IU/L)	109,0 ± 56,8	128,9 ± 42,5	128,4 ± 48,6	133,0 ± 44,9	128,5 ± 59,8	135,2 ± 56,6	NS	NS	NS

1 – wpływ dyslipidemii / effect of dyslipidemia, 2 – wpływ polimorfizmu 4G/5G / effect of 4G/5G polymorphism, 1x2 – interakcja: dyslipidemia x polimorfizm 4G/5G / interaction: dyslipidemia x 4G/5G polymorphism

† vs. NLP 5G/5G, p=0,01; ‡ vs. NLP 5G/5G, p=0,03; * vs. NLP 4G/5G, p=0,03; vs. NLP 5G/5G, p=0,04; # vs. NLP 4G/5G, p=0,08; vs. NLP 5G/5G, p=0,07 (zacytowano mimo braku istotności stat.) (test Tukeya/ Tukey's test); § vs. NLP 5G/5G, p=0,02; ¶ vs. NLP 4G/5G, p=0,05; vs. NLP 5G/5G, p=0,01 (test NIR / NIR test)

zwykle prowadzi do wystąpienia ostrych epizodów sercowo-naczyniowych. Wyniki te wydają się dobrze potwierdzać wcześniejsze badania nad układem hemostazy u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym [32, 33, 34, 35].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że allele delecyjne polimorfizmów I/D genu *ACE* oraz 4G/5G genu *PAI-1* mogą wiązać się z predyspozycją do stanu prozakrzepowego [13, 28]. Analizując interakcje między przynależnością osób badanych do grupy nadciśnieniowej lub normotensyjnej a polimorfizmami genów *ACE* i *PAI-1*, wyodrębniono spośród pacjentów z eHT grupy o niekorzystnych fenotypach związanych z większym ryzykiem wystąpienia stanu prozakrzepowego. Osobami, u których wystąpił przejawiający się wzrostem stężenia PAI-1 defekt fibrynolizy, byli pacjenci z nadciśnieniem tętniczym z genotypem DD lub będący nosicielami allelu 4G. Z kolei wzrost t-PA był charakterystyczny dla pochodzących z grupy nadciśnieniowej homozygot II lub nosicieli allelu 4G.

Zależność między polimorfizmem genu *ACE* a hemostazą jest tematem budzącym wiele kontrowersji. Część prac potwierdza związek allelu delecyjnego ze stanem prozakrzepowym. Na przykład, w przeprowadzonych u osób zdrowych badaniach *Kima* i *Matsubary* genotyp DD lub nosicielstwo allelu D wiązało się z podwyższonym stężeniem PAI-1 w osoczu badanych [36, 37]. Również u rekrutowanych z populacji greckiej 104 pacjentów, z nieleczonym do chwili rozpoznania eHT, homozygotyczność DD predysponowała do wysokiego stężenia PAI-1 [13]. U pacjentów po zawale mięśnia sercowego, u których wykonano zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej, wzrost stężenia PAI-1, wywołany uszkodzeniem śródbłonka naczyń podczas zabiegu, był silniejszy u osób z genotypem DD. Zdaniem autorów pracy, stan taki może wiązać się w przyszłości ze zwiększonym ryzykiem restenozy w tej grupie chorych [38]. Z drugiej strony amerykańskie badania NHLBI Family Heart, w których uczestniczyło 1005 osób bez klinicznych objawów choroby niedokrwiennej serca, (*ischaemic heart disease* – IHD) wykazały brak związku między stężeniem PAI-1 a polimorfizmem genu *ACE* [39]. Także wyniki pracy *Jenga i wsp*., przeprowadzonej u pacjentów z nadciśnieniem, nie potwierdziły istnienia zależności między allelem D a defektem fibrynolizy [40].

Obserwowane w badaniach własnych podwyższone stężenie PAI-1 u nosicieli allelu 4G z grupy nadciśnieniowej jest zgodne z wynikami wielu prac [17, 18]. Wyodrębniona, na podstawie oznaczania polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1*, grupa zwiększonego ryzyka stanu prozakrzepowego może być narażona na wystąpienie w przyszłości ostrych epizodów wieńcowych [17, 18, 19] lub nagłej śmierci sercowej [41]. Jednakże autorzy niektórych badań przypisują allelowi 4G raczej rolę protekcyjną. Według *Roesta i wsp*., homozygotyczność 4G/4G wiąże się z obniżonym ryzykiem śmiertelności z powodu udaru mózgu. Zależność tę tłumaczono ochronną rolą PAI-1 w stabilizacji blaszek miażdżycowych [42]. Wyższą częstość występowania allelu 4G zanotowano również u włoskich stulatków [43] oraz u słynących z niskiej zapadalności na choroby układu sercowo-naczyniowego Indian Inuit z Grenlandii [44].

Jednymi z głównych czynników zakłócających równowagę w układzie fibrynolizy u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym są parametry związane z gospodarką lipidową [45, 46]. Mimo że badania własne zostały przeprowadzone u osób młodych, w celu ograniczenia czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych związanych z wiekiem, to nie udało się uniknąć występowania zaburzeń lipidowych u badanych pacjentów. Niemal u połowy z nich zdiagnozowano dyslipidemię mieszaną. Cała grupa nadciśnieniowa charakteryzowała się także podwyższonym BMI, stężeniem glukozy i mniej korzystnym profilem lipidowym − w porównaniu do grupy normotensyjnej (tab. 1). Współwystępowanie dyslipidemii u pacjentów z eHT wpływało szczególnie na objawiające się wzrostem stężenia PAI-1 zaburzenia fibrynolizy, jeżeli byli oni dodatkowo nosicielami allelu 4G polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* lub allelu D polimorfizmu I/D genu *ACE*. Z kolei niekorzystny wzrost stężenia t-PA charakteryzował albo nosicieli allelu 4G albo homozygoty II (tabele 4 i 6). Wynika z tego, że zaburzenia lipidowe nasilają defekt fibrynolizy u pacjentów z eHT − głównie u nosicieli alleli delecyjnych obu badanych polimorfizmów. O modyfikującym wpływie zaburzeń lipidowych świadczą również silniejsze korelacje PAI-1 z BMI i HDL u homozygot DD z dyslipidemią.

Zaobserwowany w badanej grupie pacjentów z eHT wpływ zaburzeń lipidowych i czynników genetycznych na podwyższone stężenie PAI-1 potwierdzają wyniki wcześniej przeprowadzonych badań klinicznych. *Ossei-Gerning* obserwował w przebadanej przez siebie populacji istotną interakcję między czynnikami genetycznymi i związkami lipidowymi, przejawiającą się dodatnią korelacją stężenia PAI-1 ze stężeniem TG u pacjentów z genotypem 4G/4G [17]. Podobne wyniki dały badania przeprowadzone u pacjentów z cukrzycą [47] i chorobami układu sercowo -naczyniowego [22]. Z drugiej strony wyniki badań *Iwai i wsp*. wskazują, że podwyższone stężenie PAI-1 jest związane z nosicielstwem allelu 4G i wysokością stężenia insuliny. Autor nie oceniał jednak wpływu parametrów związanych z gospodarką lipidową na wysokość stężenia PAI-1 [19]. Badania *Gardemanna i wsp.* wykazały związek współwystępowania podwyższonego BMI i nadciśnienia tętniczego ze stopniem zaawansowania zmian miażdżycowych u pacjentów z genotypem 4G/4G [18]. Inne doniesienia wskazują, że homozygotyczność 4G/4G wiąże się z podwyższonym stężeniem PAI-1 tylko u osób z otyłością brzuszną [48].

Z kolei obserwowany w badaniach własnych udział polimorfizmu I/D genu *ACE* i zaburzeń lipidowych w regulacji stężenia PAI-1 u pacjentów z eHT potwierdzają wyniki wielu badań. *Kim i wsp*., badając pacjentów bez cech choroby niedokrwiennej serca, wykazali, że na stężenie PAI-1 wpływa polimorfizm I/D oraz wartości BMI [33]. Także *Matsubara i wsp.* po przebadaniu 110 zdrowych męż-

czyzn zauważyli, że za wzrost stężenia PAI-1 odpowiada polimorfizm genu *ACE* (allele D), jak również stężenie TG [34]. Z drugiej strony wyniki badań *Jenga i wsp.* sugerują, że jedynymi znamiennymi wyznacznikami stężenia PAI-1 są triglicerydy [37].

Wzrost stężenia t-PA u badanych przeze mnie nosicieli allelu 4G z dyslipidemią i eHT jest najprawdopodobniej skutkiem odpowiedzi homeostatycznej na wzrost stężenia PAI-1. Natomiast w przypadku polimorfizmu I/D genu *ACE*, wbrew oczekiwaniom najwyższe stężenie t-PA, wśród pacjentów nadciśnieniowych z dyslipidemią, zaobserwowano u homozygot II. W grupie tej zanotowano także istnienie silnej korelacji stężenia t-PA ze stężeniem TG (r = 0,58), co może tłumaczyć zaistniałą sytuację, jeżeli weźmie się pod uwagę wpływ zaburzeń lipidowych na stężenie t-PA [43, 49, 50]. Z drugiej strony wzrost stężenia t-PA u homozygot II nie jest skorelowany ze wzrostem stężenia PAI-1 (homozygoty II z dyslipidemią cechuje niższe stężenie PAI-1 niż nosicieli allelu D z dyslipidemią – tabela 5), co może sugerować, że jest to t-PA niezwiązany w kompleks z PAI-1, a więc aktywny biologicznie. Z tego powodu wzrost stężenia t-PA powinno się, być może, traktować jako zjawisko korzystne, będące wtórną odpowiedzią na towarzyszący nadciśnieniu tętniczemu stan prozakrzepowy [51]. Pewnym ograniczeniem w interpretacji występowania tendencji prozakrzepowej u homozygot II jest fakt, iż w badaniach własnych pomiarom stężenia t-PA nie towarzyszył pomiar jego aktywności. W związku z tym trudno jest określić, jaki procent mierzonego t-PA był rzeczywiście aktywny biologicznie.

Potwierdzony na poziomie fizjologicznym związek Ang II ze wzrostem wydzielania PAI-1 przez komórki śródbłonka skłania do poszukiwań podobnej zależności na poziomie molekularnym. Założono, że może być ona w pewien sposób opisana przez interakcje polimorfizmów I/D genu *ACE* oraz 4G/5G genu *PAI-1*. Jako pierwszy próbę zbadania wpływu tych polimorfizmów na stężenie PAI-1 podjął *Margaglione i wsp.* Najpierw, badając pacjentów z zaawansowaną miażdżycą, zauważył tendencję do występowania wyższego stężenia PAI-1 u osób będących jednocześnie homozygotami DD i 4G/4G. Powtórzenie analizy na liczącej 1032 grupie pacjentów, bez klinicznych objawów miażdżycy, zaowocowało wykryciem niezależnego wpływu obu polimorfizmów na wysokość stężenia PAI-1 [22, 23]. Opublikowane rok później badania *Kimury i wsp.* wykazały, że interakcja genotypów DD genu *ACE* i 4G/4G genu *PAI-1* jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia makroangiopatii u pacjentów z cukrzycą typu 2. Iloraz szans wystąpienia makroangiopatii u cukrzyków, będących jednocześnie homozygotami DD i 4G/4G, wynosił 9,83, podczas gdy u homozygot DD – tylko 2,79 [27].

W badaniach własnych nie zaobserwowano jednak interakcji między polimorfizmem I/D genu *ACE* i polimorfizmem 4G/5G genu *PAI-1*. Żadna z kombinacji genotypowych nie miała też wpływu na badane parametry hemostazy u pacjentów z nieleczonym, do chwili rozpoznania, pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Badani pacjenci, podobnie jak pacjenci *Margaglione i wsp.*, nie wykazywali klinicznych objawów choroby niedokrwiennej serca. Nosiciele allelu D cechowali się wyższą aktywnością ACE w porównaniu do homozygot II, jednakże nosicielstwo allelu 4G wiązało się z wyższym stężeniem PAI-1 tylko wówczas, gdy porównywano grupę hipertensyjną do normotensyjnej.

Molekularny związek między genami dla *ACE* i *PAI-1* został zakwestionowany także przez autorów innych prac. Analiza sprzężeń przeprowadzona w 118 rodzinach z potwierdzoną angiograficznie przedwczesną chorobą niedokrwienną serca i 110 zdrowych nie wykazała żadnego związku między loci genów kodujących *PAI-1* i *ACE* a zachorowalnością [25]. Z kolei *Heijmans i wsp.* nie zaobserwowali wzrostu ryzyka śmiertelności u starszych osób z genotypem 4G/4G lub DD ani też nie wykryli interakcji między tymi genotypami [24]. Nie wykazali istnienia takiej zależności również *Aucella i wsp.*, badając pacjentów dializowanych [26].

Przyczyną rozbieżności między wynikami badań własnych a badaniami *Margaglione i wsp.* jest, być może, ekspozycja pacjentów na odmienne warunki środowiskowe. Populację polską charakteryzują niewłaściwe nawyki żywieniowe, w porównaniu do badanej przez *Margaglione i wsp.* populacji włoskiej, stosującej zapobiegającą miażdżycy dietę śródziemnomorską. Jak wiadomo, wpływ środowiska sprawia, że nawet osobniki o identycznych genotypach mogą różnić się fenotypowo. W badaniach własnych wpływ polimorfizmu I/D genu *ACE* lub 4G/5G genu *PAI-1* na hemostazę silnie zależał od modyfikującego oddziaływania parametrów związanych z gospodarką lipidową. Czynniki te potęgowały wpływ alleli D, I oraz 4G na stężenie PAI-1 i t-PA. Być może w celu określenia genetycznej predyspozycji do „prozakrzepowego" fenotypu powinno się brać pod uwagę również szerszy kontekst genetyczny. Do tej pory wykryto ok. 9 funkcjonalnych polimorfizmów genetycznych w samym tylko genie kodującym *PAI-1*. Co więcej, polimorfizmy te pozostają w sprzężeniu względem siebie, wspólnie wpływając na stężenie PAI-1 w osoczu [15]. Poza tym przyjmuje się, że nadciśnienie tętnicze i będąca jego późniejszą konsekwencją miażdżyca są schorzeniami uwarunkowanymi przez współdziałanie wielu genów uaktywniających się w różnych warunkach środowiska. Nawet osoby z genotypami „niskiego ryzyka" mogą zachorować z powodu działania niekorzystnych czynników środowiskowych.

Mimo to informacja o zmienności genotypowej może być bardzo użytecznym narzędziem przy identyfikacji grup wysokiego ryzyka, narażonych na choroby o wieloczynnikowej etiologii, takie jak miażdżyca tętnic. W grupach takich można starać się eliminować szkodliwe czynniki środowiskowe, przewidywać progresję i stopień nasilenia choroby, jak również indywidualizować metody leczenia pacjentów.

Wnioski

1. Nieleczone samoistne nadciśnienie tętnicze usposabia chorych do stanu prozakrzepowego, który charakteryzuje się wzrostem stężenia fibrynogenu, tkankowego aktywatora plazminogenu i jego inhibitora typu 1.

2. Nosicielstwo allelu D polimorfizmu I/D genu *ACE* lub allelu 4G polimorfizmu 4G/5G genu *PAI-1* u pacjentów hipertensyjnych wiąże się z nasileniem stanu prozakrzepowego, objawiającego się upośledzeniem fibrynolizy w porównaniu do osób normotensyjnych.

3. Współwystępowanie dyslipidemii nasila wpływ alleli delecyjnych (D lub 4G) na występowanie stanu prozakrzepowego.

4. Oba badane polimorfizmy modulują układ hemostazy niezależnie od siebie.

Piśmiennictwo

1. World Health Organisation – International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. J. Hypertens. 1999, 17, 151–183.
2. *De Keulenaer G.W., Chappell D.C., Ishizaka N. et al.*: Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state. Role of a superoxide-producing NADH oxidase. Circ. Res. 1998, 82, 1094–1101.
3. *Blann A.D., Naqvi T., Waite M. et al.*: von Willebrand factor and endothelial damage in essential hypertension. J. Hum. Hypertens. 1993, 7, 107–111.
4. *Lee A.J.*: The role of rheological and haemostatic factors in hypertension. J. Hum. Hypertens. 1997, 11, 767–776.
5. *Labinjoh C., Newby D.E., Dawson P. et al.*: Fibrinolytic actions of intra-arterial angiotensin II and bradykinin in vivo in man. Cardiovasc. Res. 2000, 47, 707–714.
6. *Ridker P.M., Gaboury C.L., Conlin P.R. et al.*: Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. Circulation, 1993, 87, 1969–1977.
7. *Nishimura H., Tsuji H., Masuda H. et al.*: The effects of angiotensin metabolites on the regulation of coagulation and fibrinolysis in cultured rat aortic endothelial cells. Thromb. Haemost. 1999, 82, 1516–1521.
8. *Gesualdo L., Ranieri E., Monno R. et al.*: Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor in proximal tubular epithelial cells. Kidney Int. 1999, 56, 461–470.
9. *Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al.*: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J. Clin. Invest. 1990, 86, 1343–1346.
10. *Sing Ch.F., Stengård J.H., Kardia S.L.R.*: Genes, environment, and cardiovascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003, 23, 1190–1196.
11. *Butler R., Morris A.D., Burchell B. et al.*: DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal human. Hypertension, 1999, 33, 1164–1168.
12. *Murphey L.J., Gainer J.V., Vaughan D.E. et al.*: Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. Circulation, 2000, 102, 892–932.
13. *Makris T.K., Stavroulakis G.A., Dafni U.G. et al.*: ACE/DD genotype is associated with hemostasis balance disturbances reflecting hypercoagulability and endothelial dysfunction in patients with untreated hypertension. Am. Heart J. 2000, 140, 760–765.
14. *Binder B.R., Christ G., Gruber F. et al.*: Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. News Physiol. Sci. 2002, 17, 56–61.
15. *Nordt T.K., Lohrmann J., Bode Ch.*: Regulation of PAI-1 gene expression by genetic polymorphisms. Impact on atherogenesis. Thromb Res. 2001, 103, S1–S5.
16. *Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A. et al.*: The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. J. Biol. Chem. 1993, 268, 10739–10745.
17. *Ossei-Gerning N., Mansfield M.W., Stickland M.H. et al.*: Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17, 33–37.
18. *Gardermann A., Lohre D., Katz N. et al.*: The 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. Thromb. Haemost. 1999, 82, 1121–1126.
19. *Iwai N., Shimoike H., Nakamura Y. et al.*: The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes. Atherosclerosis, 1998, 136, 109–114.
20. *Brown N.J., Murphey L.J., Sricuma N. et al.*: Interactive effect of PAI-1 4G/5G genotype and salt intake on PAI-1 antigen. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001, 21, 1071–1077.
21. *Brown N.J., Abbas A., Byrne D. et al.*: Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women. Circulation, 2002, 105, 304–309.
22. *Margaglione M., Grandone E., Vecchione G. et al.*: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphism of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17, 2082–2087.
23. *Margaglione M., Cappucci G., d'Addeda M. et al.*: PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998, 18, 562–567.
24. *Heijmans B.T., Wetstendorp R.G.J., Knook D.L. et al.*: Angiotensin I-converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 gene variants: risk of mortality and fatal cardiovascular disease in an elderly population-based study. J. Am. Coll. Cardiol. 1999, 34, 1176–1183.
25. *Viitanen L., Pihlajamäki J., Halonen P. et al.*: Association of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 promoter gene polymorphisms with features of the insulin resistance syndrome in patients with premature coronary heart disease. Atherosclerosis, 2001, 157, 57–64.
26. *Aucella F., Margaglione M., Vigilante M. et al.*: PAI-1 4G/5G and ACE I/D gene polymorphisms and the occurrence of myocardial infarction in patients on intermittent dialysis. Nephrol. Dial. Transplant. 2003, 18, 1142–1144.
27. *Kimura H., Gejuo F., Suzuki Y. et al.*: Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy. Kidney Int. 1998, 54, 16559–16569.
28. *Jastrzębska M., Gorący I., Naruszewicz M.*: Relationships between fibrinogen, plasminogen activator inhibitor-1, and their gene polymorphisms in current smokers with essential hypertension. Thromb. Res. 2003, 110, 339–344.
29. *Lahiri D.K., Bye S., Nurnbrger J.I. Jr. et al.*: A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. J. Biochem. Biophys. Met. 1992, 25, 193–205.
30. *Lindpaitner K., Pfeffer M.A., Kreutz R. et al.*: A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. N. Engl. J. Med. 1995, 11, 706.
31. *Margaglione M., Grandone F., Cappucci G. et al.*: An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. Thromb. Haemost. 1997, 77, 605–606.

32. *Makris T.K., Tsoukala C., Krespi P. et al.*: Haemostasis balance disorders in patients with essential hypertension. Thromb. Res. 1997, 88, 99–107.
33. *Lip G.Y., Blann A.D., Beevers D.G.* Prothrombotic factors, endothelial function and left ventricular hypertrophy in isolated systolic hypertension compared with systolic-diastolic hypertension. J. Hypertens. 1999, 17, 1203–1207.
34. *Fadl Y.Y., Zareba W., Moss A.J. et al.*: History of hypertension and enhanced thrombogenic activity in postinfarction patients. Hypertension, 2003, 41, 943–949.
35. *Lechi C., Gaino S., Zuliani V. et al.*: Elevated plasma fibrinogen levels in patients with essential hypertension are related to vascular complications. Int. Angiol. 2003, 22, 72–78.
36. *Kim D.K., Kim J.W., Kim S. et al.*: Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17, 3242–3247.
37. *Matsubara Y., Hayakawa T., Tsuda T. et al.*: Angiotenstin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with plasma antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 in healthy Japanese population. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000, 11, 115–120.
38. *Prisco D., Fatini C., Battaglini B. et al.*: Angiotenstin converting enzyme DD genotype affects the changes of the plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity after primary precutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial infarction patients. Int. J. Clin. Lab. Res. 2000, 30, 179–185.
39. *Pankow J.S., Arnett D.K., Borecki I.B. et al.*: Lack of association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000, 11, 551–558.
40. *Jeng J.R., Harn H.J., Yueh K.C. et al.*: Plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in patients with hypertension. Am. J. Hypertens. 1998, 11, 235–239.
41. *Anwari A., Schuster E., Gottsauner-Wolf M. et al.*: PAI-1 4G/5G polymorphism and sudden cardiac death in patients with coronary artery disease. Thromb. Res. 2001, 103, 103–107.
42. *Roest M., van der Schouw Y.T., Banga J.D. et al.*: Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. Circulation, 2000, 101, 67–70.
43. *Manucci P.M., Mari D., Merati G. et al.*: Gene polymorphism predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins. A study in centenarians. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17, 755–759.
44. *de Maat M.P.M., Bladbjerg E.M., Johansen L.G. et al.*: DNA-polymorphisms and plasma levels of vascular disease risk factors in Greenland Inuit. Thromb. Haemost. 1999, 81, 547–552.
45. *Jansson J.H., Johansson B., Boman K. et al.*: Hypo-fibrinolysis in patients with hypertension and elevated cholesterol. J. Intern. Med. 1991, 229, 309–316.
46. *Yarnell J.W.G., Sweetnam P.M., Rumley A. et al.*: Lifestyle and haemostatic risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly Study. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, 20, 271–279.
47. *Panahloo A., Mohamed-Ali V., Lane A. et al.*: Determinants of plasminogen activator inhibitor 1 activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor 1 gene. Diabetes, 1995, 44, 37–42.
48. *Sartori M.T., Vettor R., De Pergola G. et al.*: Role of the 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter on PAI-1 levels in obese patients. Thromb. Haemost. 2001, 86, 1161–1169.
49. *Hiraga T., Shimada M., Tsukada T. et al.*: Hypertriglyceridemia, but not hypercholesterolemia, is associated with the alternations of fibrinolytic system. Horm. Metab. Res. 1996, 28, 603–606.
50. *Mussoni L., Baldassarre D., Mannucci L. et al.*: Relationship between fibrinolytic and metabolic variables: a study in patients attending a lipid clinic. Ann. Med. 2000, 32, 134–141.
51. *Pedersen O.D., Gram J., Jeunemaitre X. et al.*: Does long-term angiotensin converting enzyme inhibition affect the concentration of tissue-type plasminogen activator – plasminogen activator inhibitor-1 in the blood of patients with a previous myocardial infarction. Coron. Artery Dis. 1997, 8, 283–291.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 107–115
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 107–115
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

JOANNA KABAT-KOPERSKA

WPŁYW POLIMORFIZMU GENU ENZYMU KONWERTUJĄCEGO ANGIOTENSYNĘ I (ACE) BIORCY I DAWCY NA CZYNNOŚĆ NERKI PRZESZCZEPIONEJ*

THE INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISM OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN DONOR AND RECIPIENT ON THE FUNCTION OF RENAL GRAFT*

Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych PAM
al. Powstańców Wlkp 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Kazimierz Ciechanowski*
Zakład Patologii Ogólnej PAM
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. med. *Bogusław Machaliński*

Summary

Introduction: The gene coding for the angiotensin I-converting enzyme is known for its polymorphism revealed by the presence or absence of a 287-base pair fragment. The question arises whether ACE gene polymorphism in the recipient and donor has any effect on renal graft function.

Material and methods: This prospective study enrolled 94 renal graft recipients. 27 ACE donor genotypes were ascertained. Creatinine clearance after cimetidine, laboratory tests, and episodes of acute and chronic rejection were analyzed.

None of the recipient genotype subgroups differed significantly as to creatinine clearance. Only in the group of patients not on ACE inhibitors were there significantly higher creatinine concentrations in recipients with II genotype as compared with ID and DD genotypes pooled together. No differences were found between the genotype subgroups as to the frequency of rejection episodes. Ultimately, donor ACE genotype had no effect on graft function.

Results: In conclusion, the I/D genotype is not an independent prognostic factor for renal graft survival during the first four years after transplantation. The use of ACE inhibitors may modify the effect of the genotype on some parameters of renal function.

K e y w o r d s: gene polymorphism – angiotensin I-converting enzyme – kidney transplantation – creatinine clearance – cimetidine.

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmu I/D genu enzymu konwertującego angiotensynę I biorcy i dawcy na czynność nerki przeszczepionej.

Materiał i metody: Badaniami prospektywnymi objęto 94 biorców przeszczepu nerki; uzyskano 27 genotypów ACE od dawców. Wykonano oznaczenia klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny, przeanalizowano podstawowe badania laboratoryjne, ilość epizodów ostrego i przewlekłego odrzucania.

Zmiany klirensu kreatyniny nie były istotnie różne w podgrupach zależnie od genotypu. Stwierdzono

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Bogusław Machaliński*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 54 stron, 4 ryciny, 11 tabel, 77 pozycje piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Bogusław Machaliński* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 54 pages, 4 figures, 11 tables, 77 references.

wyższe stężenia kreatyniny u biorców z genotypem II w porównaniu z połączonymi grupami ID+DD u pacjentów nie leczonych inhibitorami konwertazy angiotensyny I. Nie stwierdzono różnic częstości występowania ostrego i przewlekłego odrzucania zależnie od genotypu ani istotnego wpływu genotypu ACE dawcy na czynność nerki przeszczepionej.

Wyniki: Genotyp I/D nie stanowi samodzielnego czynnika prognostycznego co do dalszych losów funkcjonowania nerki przeszczepionej w ciągu pierwszych 4 lat po transplantacji nerki. Stosowanie ACEI w terapii nadciśnienia tętniczego u biorców przeszczepu nerki być może zmienia wpływ genotypu na niektóre parametry.

H a s ł a: polimorfizm genetyczny – enzym konwertujący angiotensynę I – przeszczep nerki – klirens kreatyniny – cymetydyna.

Wstęp

W terminalnym stadium przewlekłej niewydolności nerek (ESRD) uznaną metodą leczenia jest przeszczepienie nerki od dawcy zmarłego lub żywego. Trwałość poprawy jakości życia pacjentów z ESRD jest uzależniona od właściwego i jak najdłuższego funkcjonowania nerki przeszczepionej. Poznanie czynników wpływających na czynność przeszczepu, ich siły i wzajemnej interakcji warunkuje postępowanie lecznicze po dokonanej transplantacji. Wciąż poszukuje się nowych dróg i środków zapobiegawczych, aby powstrzymać nie do końca poznany proces zwany przewlekłym odrzucaniem. Proces ten jest w przeważającej części przypadków odpowiedzialny za utratę przeszczepu po upływie kilku bądź kilkunastu lat po dokonaniu udanej transplantacji nerki. Obok wpływu czynników środowiskowych w centrum zainteresowań badaczy znajdują się czynniki genetyczne. Mogą one indukować wystąpienie choroby, wpływać na jej naturalny przebieg oraz warunkować odpowiedź na leczenie [24].

W obrębie układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) istnieje kilkaset poznanych polimorfizmów genetycznych oznaczających występowanie dwóch lub większej liczby alleli zajmujących to samo miejsce w chromosomie [32]. Są to m.in. geny kodujące reninę, angiotensynogen i receptory dla angiotensyny II. Jednym z genów o postulowanym wpływie na przebieg przewlekłych nefropatii oraz chorób układu krążenia jest gen kodujący enzym konwertujący angiotensynę I (ACE). Gen dla ACE jest zlokalizowany na 17 chromosomie i zawiera 26 egzonów oraz 25 intronów. Polimorfizm Xba zlokalizowany w intronie 16 został po raz pierwszy opisany przez *Rigat i wsp.* w 1990 r. Odpowiada on za około 47% zmienności stężenia ACE w surowicy [25]. W obrębie 16 intronu wykryto obecność lub brak fragmentu zawierającego 287 par zasad. Allel I to allel insercyjny, allel D to allel delecyjny. Istnieją trzy możliwe genotypy: DD, DI oraz II. Genotyp posiada działanie modulujące aktywność ACE w osoczu i w tkankach – jest ona najwyższa u homozygot DD, pośrednia u heterozygot DI oraz najniższa u homozygot II.

Enzym konwertujący angiotensynę II (ACE, kininaza II) jest egzopeptydazą. Enzym ten posiada dwa miejsca aktywne. Istnieje pula tkankowa i osoczowa enzymu. ACE przekształca angiotensynę I w angiotensynę II poprzez odszczepienie karboksydipeptydu. Angiotensyna II jako hormon efektorowy wywiera działanie wazokonstruktywne i stymuluje uwolnienie aldosteronu z nadnerczy. Hamuje również działanie biologiczne bradykininy poprzez jej rozkład, uczestniczy w metabolizmie neurotensyny i substancji P. W obrębie nerek kininy uczestniczą prawdopodobnie w kontroli krążenia wewnątrznerkowego [8]. Angiotensyna II wpływa również na komórki cewek nerkowych, powodując retencję płynów. Przyczynia się do wzrostu poziomu czynników wzrostu, takich jak TGF i PDGF-B, aktywuje niektóre geny (c-fos) [32]. Pobudza uwalnianie noradrenaliny w zakończeniach nerwów współczulnych w mięśniu sercowym [16]. Stymuluje ponadto produkcję kolagenu przez fibroblasty, zwiększa stężenie inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-I) [31]. Efektem działania angiotensyny II na ścianę naczyń jest powstanie zmian o charakterze zarostowym [32]. Aktywność angiotensyny II w tkance nerkowej jest zwykle wyższa niż w surowicy, co sugeruje, iż lokalna produkcja angiotensyny II nie pozostaje bez znaczenia dla funkcjonowania nerek [1, 21].

Czynność nerki przeszczepionej u biorców monitoruje się na przestrzeni czasu za pomocą danych z badania podmiotowego, przedmiotowego oraz podstawowych badań dodatkowych. Bardziej dokładnym, ale często nie wykonywanym rutynowo badaniem, jest ocena wielkości filtracji kłębuszkowej (GFR). „Złotym standardem" oceny GFR jest klirens inuliny. Metoda ta prawie została wyeliminowana z praktyki klinicznej ze względu na wysoki koszt, pracochłonność oraz ograniczoną przydatność w grupie chorych na cukrzycę (inulina jest wielofruktozanem). Na co dzień stosowany jest klirens kreatyniny. Należy pamiętać o tym, iż u osób zdrowych około 15% kreatyniny wydzielanej jest do moczu na drodze aktywnej sekrecji cewkowej. W miarę postępu niewydolności nerek wzrasta sekrecja cewkowa kreatyniny, co powoduje uzyskanie wyników klirensu kreatyniny znacznie odbiegających od rzeczywistej wielkości przesączania kłębuszkowego i zawyżenie wartości GFR [18]. Lekiem hamującym wydzielanie cewkowe kreatyniny jest cymetydyna [19]. Klirens kreatyniny po podaniu cymetydyny znacznie bardziej odpowiada rzeczywistej wartości GFR niż klirens bez podania leku czy klirens szacowany na podstawie wzoru *Cockrofta* i *Gaulta* [15]. Klirens kreatyniny po podaniu cymetydyny jest więc precyzyjną, prostą i niedrogą metodą oceny GFR oraz umożliwia monitorowanie funkcji nerki przeszczepionej na przestrzeni czasu.

Układ RAA odgrywa rolę w regulacji mikrokrążenia w obrębie nerek oraz w procesie przebudowy naczyniowej, może modulować odpowiedź immunologiczną poprzez

wpływ na układ kinin. Powstaje zatem pytanie, czy i w jaki sposób polimorfizm genu dla ACE zarówno biorcy, jak i dawcy warunkujący aktywność ACE w surowicy i tkankach wpływa na losy nerki przeszczepionej.

Materiał i metody

Materiał genetyczny do oznaczenia polimorfizmu I/D pobrano od 94 biorców przeszczepu nerki (pacjenci pozostający pod opieką Poradni Transplantacyjnej Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych PAM). Wśród nich było 91 biorców nerek pochodzących od heparynizowanych dawców narządów i 3 biorców nerek pochodzących od dawców żywych spokrewnionych, którym przeszczepiono nerki zgodne w układzie ABO, przy ujemnej krzyżowej próbie limfocytotoksycznej. Przeszczepień nerek dokonano w latach 1999–2001 w Klinice Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej PAM. Zgodność antygenów układu HLA kształtowała się średnio na 12+2 punktów. Grupa biorców składała się z 31 kobiet i 63 mężczyzn w wieku od 16 do 69 lat, średnio 42,24 ± 12,53 lat. Wszyscy pacjenci wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Pomorskiej Akademii Medycznej (nr BN – 001/251/02).

W leczeniu immunosupresyjnym stosowano terapię trójlekową: inhibitory kalcyneuryny doustnie w połączeniu z azatiopryną lub mykofenolanem mofetylu oraz prednizonem. W leczeniu nadciśnienia tętniczego stosowano leki z grupy ACEI u 40–45% chorych (enalapril lub trandolapril). Ostre odrzucanie diagnozowano na podstawie obrazu klinicznego i biopsji narządu przeszczepionego (w przypadkach o nasilonych objawach klinicznych i typowym obrazie w badaniu ultrasonograficznym biopsji nie wykonywano) i leczono pulsami metyloprednizolonu.

Grupa dawców, w której wykonano oznaczenia materiału genetycznego (genotyp ACE), składała się z 18 osób: 5 kobiet i 13 mężczyzn w wieku od 17 do 71 lat, średnio 43,76 ± 12,19 lat. Pozwoliło to na dobranie 27 genotypów ACE dawców dla 94-osobowej grupy biorców (9 dawców oddało 2 nerki dla analizowanej grupy biorców i 9 tylko 1 nerkę). Część próbek DNA dawców zawierała materiał nie nadający się do oceny, dlatego uzyskano tylko 18 zidentyfikowanych genotypów ACE.

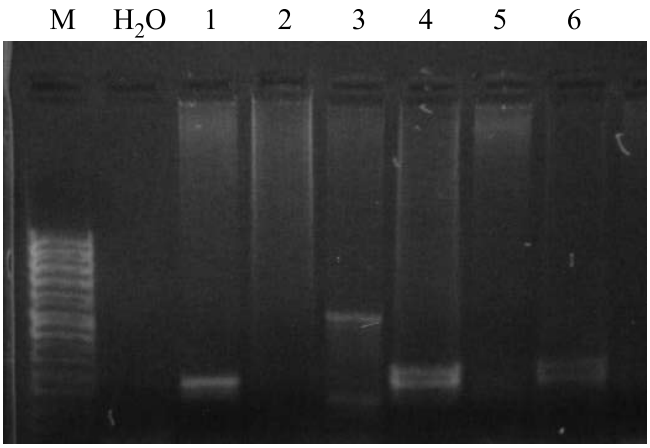
Analizie poddano badania dodatkowe wykonywane rutynowo podczas wizyt kontrolnych w Poradni Transplantacyjnej: stężenie mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego w surowicy, stężenie glukozy w surowicy, ilość białka w pojedynczej próbce moczu i wartości pomiaru ciśnienia tętniczego krwi. W celu dokładnej oceny funkcjonowania nerki przeszczepionej w grupie 67 biorców oznaczono klirens kreatyniny po podaniu 1000 mg cymetydyny w dawkach podzielonych (dobowa dawka terapeutyczna) i w tym czasie prowadzono dobową zbiórkę moczu. Następnie oznaczano stężenie kreatyniny w surowicy i w próbce z zebranego moczu. Klirens kreatyniny obliczono, korzystając ze standardowego wzoru [9].

Wybrane parametry poddawano analizie średnio w odstępach 10-miesięcznych.

W grupie 94 biorców przeanalizowano również częstość występowania epizodów ostrego odrzucania oraz obecność przewlekłego odrzucania. Rozpoznanie przewlekłego odrzucania zawsze potwierdzone było badaniem histopatologicznym uzyskanym z bioptatu nerki przeszczepionej. Przeanalizowano również liczbę niezgodnych antygenów w układzie HLA (liczbę HLA-A, -B i -DR *mismatches*) oraz poziom przeciwciał antyleukocytarnych (PRA) wyrażony w procentach, będący wyrazem stopnia immunizacji potencjalnych biorców, wykorzystując dane pochodzące z protokołów doboru biorcy i dawcy.

W celu izolacji DNA pobierano 10 mL krwi żylnej do probówek z 0,2 mL 5% EDTA. Genomowy DNA z krwinek białych biorców izolowano metodą nieenzymatyczną – nieorganiczną z użyciem 2% roztworu Tritonu X-100, uzyskany DNA zawieszano w buforze (Tris-EDTA) TE pH 5,5. Z pracowni HLA Zakładu Mikrobiologii uzyskano DNA dawców (DNA izolowane z limfocytów węzłów chłonnych dla celów oznaczenia antygenów zgodności tkankowej, przechowywane w temp. 0–4°C).

Dla oceny polimorfizmu I/D genu ACE przy amplifikacji DNA w PCR zostały zastosowane pary oligonukleotydów: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3' jako primer sensowy (ACE-1) i 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3' jako primer antysensowy (ACE-2). Produktami PCR z tymi primerami były fragmenty cDNA: dla allelu D fragment o długości 319 par zasad (pz), a dla allelu I fragment o długości 597 par zasad. Z uwagi na zjawisko preferencyjnej amplifikacji krótszych fragmentów DNA (w tym przypadku allelu D) i wynikające stąd ryzyko niedoszacowania częstości występowania genotypu ID, próbki DNA od osób wstępnie określonych jako homozygoty DD były weryfikowane poprzez wykonanie drugiej łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) z parą primerów: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' jako primerem sensowym (ACE-3) i 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3' jako primerem antysensowym (ACE-4). Primery ACE-3 i ACE-4 były swoiste dla allelu I. Produkt PCR o długości 335 pz był dowodem obecności genotypu ID, brak powyższego produktu potwierdzał obecność genotypu DD. Próbki DNA (40 ng) były amplifikowane w roztworze o końcowej objętości 20 µL zawierającym 4 pM każdego z pary primerów, 2,5 mM każdego z trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), bufor do PCR i 0,5 jednostki polimerazy Taq. Amplifikacje zostały przeprowadzone w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf, Niemcy) w następujących warunkach: wstępna denaturacja w temp. 94°C przez 5 min, następnie 35 cykli: denaturacja w temp. 94°C przez 15 s, wiązanie primerów przez 30 s w temp. 58°C i wydłużanie łańcucha w temp. 72°C przez 30 s. Reakcję PCR kończyło 8-minutowe wydłużanie łańcucha w temp.



Ryc. 1. Polimorfizm I/D. M – marker, H_2O – woda (kontrola), 1, 2 – homozygota DD, 3, 4 – heterozygota ID, 5, 6 – homozygota II. Cyfry nieparzyste (1, 3, 5) – primery ACE-1 i ACE-2. Cyfry parzyste (2, 4, 6) – primery ACE-3 i ACE-4

Fig. 1. I/D polymorphism. M – molecular weight marker, H_2O – water (control), 1, 2 – DD homozygote, 3, 4 – ID heterozygote, 5, 6 – II homozygote. Odd lanes (1, 3, 5) – ACE-1 and ACE-2 primers. Even lanes (2, 4, 6) – ACE-3 and ACE-4 primers

72°C. Produkty amplifikacji były następnie rozdzielone poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. W celu dokumentacji wyników wykonano zdjęcia żeli w świetle UV (ryc. 1).

Większość analizowanych mierzalnych zmiennych zależnych istotnie odbiegała od rozkładu normalnego (test Shapiro–Wilka). Dlatego różnice między ich wartościami dla poszczególnych genotypów ACE analizowano przy użyciu testu U Manna–Whitneya. Istotność różnic częstości wystąpienia epizodów odrzucania zależnie od genotypu ACE, przyjmowania inhibitorów ACE (ACEI) itp. oceniano testem χ^2 (przy podziale na 3 grupy genotypów) lub dokładnym testem Fishera (przy podziale na 2 grupy genotypów). Istotność zmian parametrów w trakcie badania (3 pomiary) oceniano przy zastosowaniu ANOVA Friedmanna i testu kolejności par Wilcoxona. Przeprowadzono również odrębne analizy dla grup biorców przyjmujących i nie przyjmujących ACEI. Do analizy wieloczynnikowej, mającej na celu zbiorczą ocenę zmiennych wpływających na stężenie i klirens kreatyniny zastosowano ANOVA

Tabela 1. **Charakterystyka analizowanych parametrów funkcji nerki przeszczepionej u 94 pacjentów pogrupowanych według genotypu biorcy. Oznaczenia klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny dotyczą 67 chorych**

Table 1. **Parameters of renal graft function in 94 patients depending on recipient genotype. Creatinine clearance after cimetidine is given for 67 recipients only**

Genotyp biorcy / Recipient genotype	II	ID	DD
Liczba biorców / Number of recipients	20	38	36
Kobiety/mężczyźni / Women/Men	7/13	11/27	13/23
Wiek biorcy (lata) / Age of recipient (years)	44,10 + 12,28	40,84 + 12,95	44,17 + 12,28
Wiek dawcy (lata) / Age of donor (years)	49,57 + 14,96	43,07 + 11,87	48,38 + 16,67
Kreatynina 1 / Creatinine 1 (mg/dL)	2,18 + 0,68 *	1,81 + 0,64	1,85 + 0,75
Kreatynina 2 / Creatinine 2 (mg/dL)	2,09 + 0,74 **	1,73 + 0,48	1,82 + 0,68
Kreatynina 3 / Creatinine 3 (mg/dL)	2,18 + 0,94 *	1,81 + 0,72	1,81 + 0,76
Klirens cym1 / Clearance with cimetidine 1 (mL/min)	45,8 + 15,1 *	60,2 + 24	61 + 30,1
Klirens cym2 / Clearance with cimetidine 2 (mL/min)	51,7 + 23,6	59,4 + 34,5	56,3 + 22,6
Klirens cym3 / Clearance with cimetidine 3 (mL/min)	43,8 + 22,1	51,1 + 20,4	56,2 + 26,2
Mocznik 1 / Urea 1 (mg/dL)	78,56 + 36,08	74,85 + 33,45	75,82 + 33,26
Mocznik 2 / Urea 2 (mg/dL)	85,62 + 41,53	74,12 + 40,15	72,68 + 39,15
Mocznik 3 / Urea 3 (mg/dL)	85,76 + 37,42	70,9 + 39,19	81,02 + 50,74
Kwas moczowy 1 / Uric acid 1 (mg/dL)	6,81 + 1,83	6,75 + 1,8	6,92 + 1,78
Kwas moczowy 2 / Uric acid 2 (mg/dL)	7,77 + 2,36	7,77 + 2,62	8,01 + 2,5
Kwas moczowy 3 / Uric acid 3 (mg/dL)	7,75 + 2,08	7,5 + 1,77	7,9 + 2,12
Białko w moczu maks. / Protein in urine max (mg/dL)	54,2 + 11,77	61,39 + 15,77	60,5 + 16,85
Glukoza 1 (mg%) – Glucose 1	101,9 + 28,99	103,29 + 29,35	104,55 + 33,38
Glukoza 2 (mg%) – Glucose 2	104,05 + 22,68	107,76 + 32,16	109,97 + 33,38
Glukoza 3 (mg%) – Glucose 3	91,1 + 13,91	95,58 + 15,3	102,22 + 16,64
MAP 1 (mmHg)	104,62 + 26,83	102,57 + 36,61	106,97 + 28,02
MAP 2 (mmHg)	101,25 + 36,03	104,01 + 31,81	103,12 + 32,79
MAP 3 (mmHg)	110,5 + 21,7	102,87 + 31,09	109,03 + 16,26
Mismatches	3,23 + 0,75	2,85 + 0,74	3,13 + 0,72
% pacjentów leczonych ACEI / % of patients treated with ACEI	40	44,7	41,7

* $p < 0,05$ dla różnicy pomiędzy genotypem II a połączonymi grupami genotypów ID+DD / $p < 0.05$ for the difference between II genotype and pooled ID+DD genotype groups

** $p < 0,06$ dla różnicy pomiędzy genotypem II a połączonymi grupami genotypów ID+DD / $p < 0.06$ for the difference between II genotype and pooled ID+DD genotype groups

białko w moczu maks. – największa wartość stężenia białka w przygodnej próbce moczu dla każdego pacjenta podczas okresu obserwacji / protein max in urine – maximum protein concentration in random urine sample during follow-up

w układzie z powtarzanymi pomiarami. Analizowano 3 zmienne niezależne: przyjmowanie ACEI, genotyp ACE I/D oraz czas pomiaru (czynnik powtarzanych pomiarów), a także wszystkie możliwe interakcje między nimi. Zmienne zależne poddano przekształceniom logarytmicznym, aby uzyskać normalizację rozkładów, wymaganą dla przeprowadzenia ANOVA. Jako próg istotności statystycznej przyjęto $p<0,05$ dla testów dwustronnych. Analizy przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 5.1.

Wyniki

W analizowanej grupie 94 biorców nerek z funkcjonującym co najmniej 10 miesięcy przeszczepem 36 posiadało genotyp DD (38,3%), 38 ID (40,4%) oraz 20 II (21,3%). W grupie 27 genotypów uzyskanych od dawców w 10 przypadkach materiał genetyczny pochodził od osób z genotypem DD (37%), w 10 przypadkach z genotypem ID (37%) oraz w 7 przypadkach z genotypem II (26%). Nie było istotnych różnic co do częstości występowania poszczególnych chorób prowadzących do ESRD pomiędzy pacjentami z różnymi genotypami ACE (test χ^2). Połowę przypadków stanowiły przewlekłe glomerulopatie, a połowę pozostałe choroby nerek.

W tabeli 1 przedstawiono statystykę opisową wykonanych badań dodatkowych podczas okresu obserwacji dla trzech grup zależnie od genotypu. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± odchylenie standardowe, niektóre parametry oceniano w 3 odstępach czasowych (dziesięciomiesięcznych) i oznaczono cyframi wskazującymi na kolejność wykonania (np. kreatynina 1, 2, 3). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy trzema grupami odnośnie wieku dawcy i biorcy, płci, liczby niezgodnych antygenów w układzie HLA (HLA *mismatches*), stężenia glukozy, mocznika, kwasu moczowego, wartości średniego ciśnienia tętniczego oraz ilości białka w pojedynczej próbce moczu. Nie odnotowano istotnych różnic badanych parametrów pomiędzy grupami genotypów DD i ID. Stwierdzono natomiast istotnie wyższe stężenia kreatyniny we wszystkich pomiarach u biorców z genotypem II w porównaniu z połączonymi grupami ID + DD. Zmiany klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny w trakcie obserwacji nie były istotne statystycznie w żadnej z podgrup zależnie od genotypu ani w całej grupie (ANOVA Friedmanna). Istotnie niższe wartości klirensu kreatyniny zaobserwowano w grupie II jedynie przy pierwszym pomiarze.

Wystąpienie ostrego odrzucania stwierdzono u 26% pacjentów, natomiast obecność przewlekłego odrzucania zdiagnozowano u 9% biorców. Nie odnotowano różnic w częstości występowania ostrego i przewlekłego odrzucania zależnie od genotypu ACE (tabele 2 i 3).

Nie stwierdzono istotnych różnic parametrów pomiędzy grupą pacjentów leczonych i nie leczonych ACEI bez uwzględnienia genotypu ACE biorcy. W dalszych etapach analizy pacjentów podzielono zależnie od genotypu I/D. Ponieważ nie było istotnych różnic parametrów pomiędzy grupami biorców z genotypem DD i ID, w dalszych analizach połączono te grupy (DD+ID). W tabeli 4 przedstawiono wyniki uwzględniające stosowane leczenie inhibitorami konwertazy (ACEI). Genotyp II biorcy wiązał się z istotnie wyższym stężeniem kreatyniny jedynie u pacjentów nie leczonych inhibitorami konwertazy angiotensyny I (ACEI). Homozygoty II, u których w leczeniu nadciśnienia tętniczego po przeszczepie nerki stosowano te leki, mieli stężenie kreatyniny podobne jak biorcy ID i DD. Zależności te przedstawiono graficznie na rycinie 2. U biorców II leczonych ACEI jedynie klirens kreatyniny po podaniu cymetydyny w pierwszym pomiarze był znamiennie niższy od klirensów dla pacjentów z pozostałymi genotypami leczonych tymi lekami. U pacjentów leczonych ACEI oraz nie leczonych tymi lekami odrzucanie ostre i przewlekłe występowało z podobną częstością, niezależnie od genotypu ACE.

Tabela 2. **Ilość przypadków ostrego odrzucania w grupie 94 biorców po podziale w zależności od genotypu oraz liczebności alleli**

Table 2. **Number of acute rejection episodes in the group of 94 recipients depending on genotype and allele**

Parametr / Parameter	Genotyp DD* / DD genotype	Genotyp ID* / ID genotype	Genotyp II* / II genotype	Allel I** / I allele	Allel D** / D allele
Ostre odrzucanie (+) / Acute rejection (+)	7 (19,4%)	10 (26,3%)	6 (30%)	22 (28,2%)	24 (21,8%)
Ostre odrzucanie (-) / Acute rejection (-)	29 (80,6%)	28 (73,7%)	14 (70%)	56 (71,8%)	86 (78,2%)

* liczba przypadków oraz % pacjentów w danej grupie, $p < 0,81$ / number of episodes and % for genotype, $p < 0.81$

** liczba alleli (% alleli), $p < 0,51$ / number of episodes and % for allele, $p < 0.51$

Tabela 3. **Ilość przypadków przewlekłego odrzucania w grupie 94 biorców po podziale w zależności od genotypu oraz liczebności alleli**

Table 3. **Number of chronic rejection episodes in the group of 94 recipients depending on genotype and allele**

Parametr / Parameter	Genotyp DD* / DD genotype	Genotyp ID* / ID genotype	Genotyp II* / II genotype	Allel I** / I allele	Allel D** / D allele
Przewlekłe odrzucanie (+) / Chronic rejection (+)	5 (13,9%)	3 (7,9%)	2 (10%)	7 (9%)	13 (11,8)
Przewlekłe odrzucanie (-) / Chronic rejection (-)	31 (86,1%)	35 (92,1%)	18 (90%)	71 (91%)	97 (88,1%)

* liczba przypadków oraz % pacjentów w danej grupie, $p < 0,7$ / number of episodes and % for genotype, $p < 0.7$

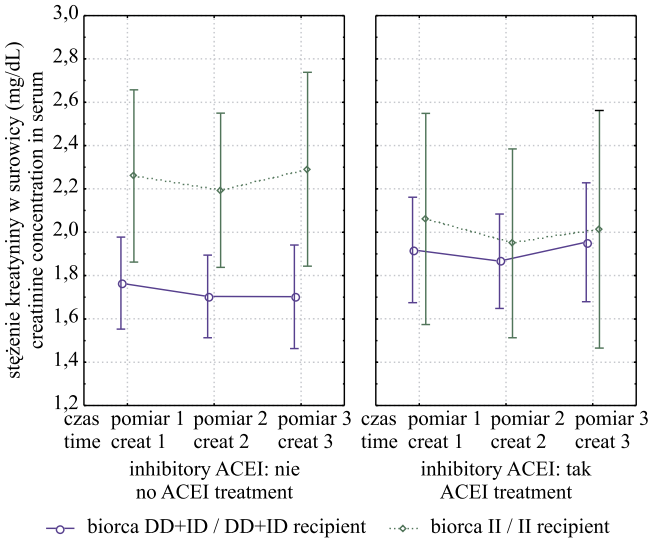
** liczba alleli (% alleli), $p < 0,64$ / number of episodes and % for allele, $p < 0.64$

Tabela 4. **Charakterystyka wybranych parametrów funkcji nerki przeszczepionej u 94 pacjentów pogrupowanych według stosowanego leczenia ACEI oraz genotypu ACE biorcy (II lub DD+ID). Oznaczenia klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny dotyczą 67 chorych**

Table 4. **Parameters of renal graft function in 94 patients depending on ACEI treatment and recipient genotype (II or DD+ID). Creatinine clearance after cimetidine is given for 67 recipients only**

Leczenie ACEI / ACEI treatment	Nie / No (n=54)		Tak / Yes (n = 40)	
Genotyp biorcy / Recipient genotype	II (n = 12)	DD+ID (21+21 = 42)	II (n = 8)	DD+ID (15+17 = 32)
Kobiety/mężczyźni / Women/men)	4/8	17/25	3/5	7/25
Wiek biorcy (lata) / Age of recipient (years)	40,92 ± 12,94	41,28 ± 12,59	48,87 ± 10,16	44,32 ± 11,88
Wiek dawcy (lata) / Age of donor (years)	48 ± 13,85	44,58 ± 11,09	53,5± 19,12	47,36 ± 11,78
Kreatynina 1 / Creatinine 1 (mg/dL)	2,26 ± 0,74**	1,76 ± 0,72	2,06 ± 0,60	1,92 ± 0,66
Kreatynina 2 / Creatinine 2 (mg/dL)	2,19 ± 0,77**	1,7 ± 0,58	1,95 ± 0,71	1,87 ± 0,55
Kreatynina 3 / Creatinine 3 (mg/dL)	2,29 ± 1,12**	1,7± 0,69	2,01 ± 0,62	1,95 ± 0,75
Klirens cym1 / Clearance with cimetidine 1 (mL/min)	46.7 ± 17.3	58.9 ± 23.5	44.8 ± 13.8**	61.8 ± 29.4
Klirens cym2 / Clearance with cimetidine 2 (mL/min)	48.1 ± 29.5	63.1 ± 35.6	55.3 ± 17.6	53.4 ± 22.9
Klirens cym3 / Clearance with cimetidine 3 (mL/min)	40.7 ± 27.0	57.1 ± 24.4	46.9 ± 17.3	49.4 ± 21.2
Ostre odrzucanie (liczba przypadków) / Acute rejection (number of episodes)	5	7	1	10
Przewlekłe odrzucanie (liczba przypadków) / Chronic rejection (number of episodes)	2	5	0	3

** $p < 0,05$ – pomiędzy grupami genotypów II a DD+ID (pacjenci nie leczeni ACEI) / $p < 0.05$ for the difference between II genotype and pooled ID+DD genotype groups (patients not treated with ACEI)



Ryc. 2. Wykresy średnich stężeń kreatyniny w surowicy i ich odchyleń standardowych podczas okresu obserwacji u 94 biorców uwzględniające wpływ genotypu ACE biorcy i stosowanie leczenia inhibitorami ACE

Fig. 2. Graphs of mean serum creatinine concentrations and their standard deviations during follow-up of 94 recipients. The influence of recipient ACE genotype and ACEI treatment is presented

Przeprowadzona analiza ANOVA (tab. 5) potwierdziła, że stężenia kreatyniny są wyższe u biorców z genotypem ACE II ($p<0,05$), natomiast nie zależą od leczenia ACEI ani nie zmieniają się istotnie pomiędzy pomiarami. Analogiczną analizę wariancji przeprowadzono dla klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny, jednak w tym przypadku wpływ żadnego z analizowanych czynników nie osiągnął znamienności statystycznej.

Analiza wpływu genotypu ACE dawcy na czynność nerki przeszczepionej wykazała nieco wyższe (na granicy istotności statystycznej) wartości klirensu po cymetydynie dla przeszczepów od dawców DD w porównaniu z połączoną grupą genotypów ACE dawców II+ID – nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami genotypów II i ID (tab. 6). Należy jednak zwrócić uwagę, że dawcy DD byli nieco młodsi od pozostałych. Nie wykazano związku pomiędzy genotypem ACE dawcy a odpowiedzią na leczenie inhibitorami ACE u biorców po przeszczepieniu nerki (w odniesieniu do klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny).

Dyskusja

Na patogenezę większości chorób nerek prowadzących do ich niewydolności mają wpływ zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Do genów „kandydatów" odpowiedzialnych za rozwój chorób nerek i nadciśnienia tętniczego zalicza się między innymi geny kodujące składowe układu RAA, takie jak gen kodujący ACE, gen aldosteronu (CYP11B2), gen angiotensynogenu (M235T- substytucja treoniny w miejsce metioniny w kodonie 235), gen receptora typu 1 dla angiotensyny AT1R (A1166C- transwersja adeniny w miejsce cytozyny w pozycji 1166) itd. [7]. Najwięcej przesłanek w piśmiennictwie co do istotnego znaczenia dla przebiegu chorób nerek posiada polimorfizm ACE I/D. Być może polimorfizm ten jest sprzężony z innym, kluczowym dla znaczenia funkcjonalnego polimorfizmem genu ACE. Istnieją hipotezy, iż w regionie delecji znajduje się *silencer* („wyciszacz") ekspresji genu. Brak tego wyciszacza u pacjentów z allelem D prowadzi do większej ekspresji genu (większej aktywności ACE) [7, 8].

Zanim podjęto badania nad wpływem polimorfizmu genu kodującego ACE na czynność nerki przeszczepionej, próbowano ustalić powyższy związek przyczynowo-skutkowy w chorobach układu krążenia i nerek. W większości patologii rysuje się trend uznający negatywny wpływ genotypu DD na przebieg choroby [22, 23, 27, 31], choć nie wszyscy badacze potwierdzają tę zależność [20, 29].

Genotyp w zakresie polimorfizmu genu dla ACE stanowi zatem według niektórych autorów niezależny czynnik pogorszenia się funkcji nerek (nefropatia IgA, nefropatia

Tabela 5. **Wyniki ANOVA związków pomiędzy logarytmem stężenia kreatyniny w surowicy biorcy a stosowaniem leczenia ACEI, genotypem ACE II biorcy oraz czasem pomiaru stężenia kreatyniny (3 pomiary wykonywane co 8–10 miesięcy) dla 94 pacjentów. Podano liczbę stopni swobody rozkładu F (df 1, df 2), wartość statystyki F i odpowiadającą jej wartość prawdopodobieństwa p**

Table 5. **ANOVA for associations between logarithm of recipient serum creatinine concentration and ACEI treatment, recipient ACE II genotype, and creatinine concentration measurement (3 measurements were performed 8–10 months apart) in 94 patients. The number of degrees of freedom (F) of distribution (df1, df2), value of F statistics and respective value of probability (p) are given below**

Parametry i interakcje / Parameters and interactions	df 1	df 2	F	p
Leczenie ACEI / ACEI treatment	1	90	0,011	0,916
Genotyp ACE II biorcy / Recipient ACE II genotype	1	90	4,002	0,048
Czas pomiaru stężenia kreatyniny / Time of creatinine concentration measurement	2	180	0,581	0,560
ACEI × genotyp ACE II[1] / ACEI × ACE II genotype[1]	1	90	1,740	0,190
ACEI × czas pomiaru[2] / ACEI × time of measurement[2]	2	180	0,146	0,864
Genotyp ACE II × czas pomiaru[3] / ACE II genotype × time of measurement[3]	2	180	0,144	0,866
ACEI × genotyp ACE II × czas pomiaru[4] / ACEI × ACE II genotype × time of measurement[4]	2	180	0,095	0,909

[1] interakcja pomiędzy leczeniem ACEI a genotypem we wpływie na stężenie kreatyniny / interaction between ACEI treatment and genotype concerning creatinine concentration level

[2] interakcja pomiędzy leczeniem ACEI a zmianami stężenia kreatyniny w czasie / interaction between ACEI treatment and changes of creatinine concentration level during observation

[3] interakcja pomiędzy genotypem II a zmianami stężenia kreatyniny w czasie / interaction between genotype II and changes of creatinine concentration level during observation

[4] interakcja pomiędzy leczeniem ACEI, genotypem II a zmianami stężenia kreatyniny w czasie / interaction between ACEI treatment, genotype II and changes of creatinine concentration level during observation

cukrzycowa, ADPKD) [4, 11, 12, 14, 30]. Jednak *Suzuki* [29] oraz *Schmidt* [28] nie znaleźli tego związku w swoich pracach. Skoro w większości patologii związanych z układem moczowym negatywny wpływ na przebieg choroby cechuje genotyp DD, można zatem oczekiwać zwiększonego odsetka nosicieli tego genu wśród osób poddanych terapii nerkozastępczej. *Gaciong i wsp.* analizując chorych w młodszym wieku wykazali częstsze występowanie genotypu DD u biorców przeszczepu nerki [10]. W grupie dializowanych nie stwierdzono istotnej przewagi allelu D [32], co zwolennicy teorii „negatywnego wpływu allelu D" tłumaczą zmniejszającą się jego częstością wraz z kolejnymi latami dializoterapii – allel D jako czynnik ryzyka powikłań ze strony układu krążenia powodować ma skrócenie długości życia u nosicieli i zanikanie ich odsetka w grupie dializowanych [10, 32]. Wśród chorych z nefropatią cukrzycową dowiedziono, iż odsetek homozygot DD u dializowanych krócej niż 12 miesięcy wynosił około 30%, podczas gdy u chorych leczonych dłużej niż rok 15% (*Yoshida i wsp.* [32]). U dzieci poddanych transplantacji nerki w ciągu 10-letniej obserwacji stwierdzono, iż genotyp DD wiązał się z krótszym czasem przeżycia przeszczepu (różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą dzieci z genotypem DD i grupą pacjentów posiadającą pozostałe genotypy, tj. ID i II pojawiła się dopiero po 7 latach od dokonania transplantacji nerki) [5], ale nie z wystąpieniem procesu przewlekłego odrzucania. W badaniach dotyczących losów przeszczepu nerki u osób dorosłych znaleziono jedynie nieco wyższą częstość allelu D na granicy istotności statystycznej w grupie biorców z wysokim ryzykiem przewlekłego odrzucania przeszczepu (klirens kreatyniny < 50 mL/min, białkomocz > 0,5 g/24h oraz starszy wiek dawcy).

Tabela 6. **Charakterystyka analizowanych parametrów funkcji nerki przeszczepionej u 27 pacjentów pogrupowanych według genotypu ACE dawcy**

Table 6. **Parameters of renal graft function in 27 patients depending on donor ACE genotype**

Genotyp ACE dawcy / Donor ACE genotype	II	ID	DD
Liczba biorców / Number of recipients	7	10	10
Kobiety/mężczyźni (biorcy) / Women/men (recipients)	3/4	6/4	4/6
Wiek biorcy (lata) / Age of recipient (years)	47,9 ± 13,7	42,4 ± 10,9	44,7 ± 14,68
Wiek dawcy (lata) / Age of donor (years)	55,7 ± 12,7	49,4 ± 14,9	43,4 ± 3,78*
Klirens cym1 / Clearance with cimetidine 1 (mL/min)	52,5 ± 34,7	42,2 ± 19,3	47,4 ± 17,6
Klirens cym2 / Clearance with cimetidine 2 (mL/min)	43,7 ± 22,2	50,1 ± 21,6	79,5 ± 55,6*
Klirens cym3 / Clearance with cimetidine 3 (mL/min)	41,5 ± 25,4	40,9 ± 24,4	62,8 ± 25,9*
Kreatynina 1 / Creatinine 1 (mg/dL)	2,26 ± 1,17	2,44 ± 0,86	1,77 ± 0,60
Kreatynina 2 / Creatinine 2 (mg/dL)	2,16 ± 0,80	2,12 ± 0,81	1,48 ± 0,41
Kreatynina 3 / Creatinine 3 (mg/dL)	2,27 ± 1,03	2,44 ± 1,39	1,68 ± 0,68
Ostre odrzucanie (liczba przypadków) / Acute rejection (number of episodes)	4	3	2
Przewlekłe odrzucanie (liczba przypadków) / Chronic rejection (number of episodes)	2	3	1
% pacjentów leczonych ACEI / % of patients treated with ACEI	43	50	50

* $p < 0,08$ dla różnicy pomiędzy genotypem DD a połączonymi grupami genotypów II+ID / $p < 0.08$ for the difference between DD genotype and pooled II+ID genotype groups

Nie stwierdzono istotnych różnic co do czasu przeżycia przeszczepu w trzech grupach zależnie od genotypu I/D na przestrzeni 6-letniej obserwacji [6]. Genotyp dawcy nie miał wpływu na funkcjonowanie nerek po przeszczepie. Podsumowując, genotyp biorcy nie wywierał decydującego wpływu na funkcjonowanie przeszczepionego narządu, allel D nie był związany z indukcją procesu przewlekłego odrzucania, a jedynie mógł wywierać działanie modulujące jego przebieg. Obie cytowane powyżej prace opisywały badania retrospektywne i analizowano w nich jedynie podstawowe parametry dotyczące monitorowania funkcji nerki przeszczepionej. Badania własne zakładały dokładniejszą prospektywną obserwację funkcji przeszczepu, możliwej na skutek powtarzalnych pomiarów klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny. Procentowy rozkład genotypów ACE w 3 grupach (DD, ID, II) był bardzo zbliżony do rozkładu opisywanego dla populacji kaukaskiej przez innych badaczy [17, 24], zarówno dla grupy biorców jak i dawców. Nie stwierdzono różnic w wartościach klirensu kreatyniny pomiędzy grupami biorców zależnie od genotypu (oprócz pierwszego – wyjściowego pomiaru; kolejne oznaczenia nie wykazały już istotnie niższych wartości klirensu kreatyniny u biorców II w stosunku do biorców DD i ID). Posiadanie genotypu DD, zarówno u biorcy jak i dawcy, nie wpływało negatywnie na kolejno oznaczane wartości klirensu kreatyniny. W grupie dawców uzyskane wyniki należy interpretować ostrożnie ze względu na małą liczebność dawców z oznaczonym genotypem ACE. U osób z genotypem II stwierdzono wyższe stężenia kreatyniny w surowicy. Trudno wyjaśnić zaobserwowane zjawisko i prawdopodobnie nie wpływa ono negatywnie na funkcjonowanie nerki przeszczepionej jako narządu. Kolejno oznaczane wartości klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny u pacjentów II były podobne jak w pozostałych grupach genotypowych, co świadczy o stabilnej w miarę funkcji nerki przeszczepionej. Nie odnotowano żadnych istotnych różnic w rozkładzie alleli I i D u biorców i dawców, u których występowało ostre lub przewlekłe odrzucanie. W przypadku ostrego odrzucania można by spodziewać się większego ryzyka uszkodzenia nerek przez proces immunologiczny dla genotypu II. Niższa aktywność ACE u biorców II wiąże się ze zmniejszoną degradacją bradykininy i substancji P, które nasilają proces zapalny przez indukcję chemotaksji neutrofili, monocytów, proliferację limfocytów i uwolnienie mediatorów reakcji immunologicznej. W przebiegu tocznia rumieniowatego układowego u chorych z genotypem II stwierdzano znamiennie wyższy indeks aktywności jako wskaźnik ostrej odpowiedzi zapalnej w obrębie nerek [3].

U biorców II stwierdzono wyższe stężenia kreatyniny w surowicy w stosunku do pacjentów z genotypem ID i DD, ale tylko w przypadku, gdy nie byli oni leczeni inhibitorami ACE (w grupie leczonych ACEI te różnice między genotypami zacierały się). Wśród pacjentów po przeszczepie nerki blisko 80% chorych wymaga leczenia nadciśnienia tętniczego [13]. W badanej grupie biorców u połowy pacjentów stosowano ACEI, u pozostałych terapię innymi lekami, najczęściej blokerami kanału wapniowego. Znany jest uniwersalny nefroprotekcyjny wpływ inhibitorów ACE hamujący powstawanie zmian stwardnieniowych w kłębuszkach [26], szczególnie w przebiegu nefropatii cukrzycowej. Leki te redukują ciśnienie śródkłębkowe poprzez rozkurcz tętniczki odprowadzającej, hamują proliferację komórek mezangium kłębuszka nerkowego i produkcję białek macierzy pozakomórkowej i kolagenu. Kardio- i nefroprotekcyjny wpływ leczenia ACEI jest obserwowany niezależnie od ich efektu hipotensyjnego [32]. Udowodniono, iż leczenie chorych z nefropatią IgA inhibitorami ACE, nawet przy braku nadciśnienia tętniczego, znacząco redukuje białkomocz i opóźnia tempo progresji do schyłkowej niewydolności nerek. Jak okazuje się, u pacjentów z potencjalną niższą aktywnością ACE w osoczu i tkankach (biorcy II) leki te wykazują również korzystne działanie, co dowodzi, że nie wszystkie punkty uchwytu działania ACEI są do końca poznane. W badaniach własnych podawanie ACEI nie było czynnikiem randomizowanym – co znacznie zmniejsza możliwość wnioskowania odnośnie wpływu ich stosowania na badane parametry. Jednakże podobny wynik uzyskano w randomizowanym badaniu BANFF, gdzie znamiennie zwiększone rozszerzenie tętnicy zależne od przepływu stwierdzono u pacjentów z genotypem II lub ID leczonych chinaprilem. W przypadku genotypu DD nie stwierdzono zmiany reakcji naczynia po 8 tygodniach leczenia [2]. Wskazywałoby to na zmniejszoną skuteczność inhibitorów ACE w przypadku obecności allelu D, a być może na konieczność stosowania wyższych dawek ACEI u homozygot DD. W innych badaniach zdania autorów co do efektów działania inhibitorów ACEI w obrębie grup genotypowych są podzielone. Część badaczy wskazuje na korzyści z takiej terapii u pacjentów z genotypem II, inni – u chorych z genotypem DD [20].

W podsumowaniu można stwierdzić, że w badaniach własnych genotyp I/D nie stanowił samodzielnego czynnika prognostycznego co do dalszych losów funkcjonowania nerki przeszczepionej (brak wpływu na zmianę w czasie wartości klirensu kreatyniny po podaniu cymetydyny). Stosowanie ACEI w terapii nadciśnienia tętniczego u biorców przeszczepu nerki może zmieniać wpływ genotypu na niektóre parametry. Ponieważ ograniczeniem obecnego badania jest brak randomizacji pacjentów odnośnie przyjmowania ACEI, należy przyjąć, iż wnioski przedstawione powyżej dotyczące wpływu leczenia ACEI zależnie od genotypu mają raczej charakter wstępny.

Wnioski

1. Genotyp DD biorcy i dawcy nie ma negatywnego wpływu na czynność nerki przeszczepionej w pierwszych 4 latach po dokonanej transplantacji nerki.

2. Genotyp I/D wywiera wpływ na niektóre parametry – stwierdzono wyższe stężenia kreatyniny w surowicy u biorców z genotypem II.

3. Wpływ genotypu I/D na funkcję nerki przeszczepionej może być zależny od stosowania u biorcy inhibitorów konwertazy angiotensyny I.

Piśmiennictwo

1. *Allan D.R. et al.*: Converting enzyme inhibition and renal tissue angiotensin II in the rat. Hypertens, 1994, 24, 516–522.
2. *Anderson T., Elstein E., Haber H.*: Comparative study of ACE-inhibiton, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilatation in patients with coronary disease (BANFF study). J. Am. Coll. Cardiol. 2000, 35, 60–66.
3. *Akai Y. et al.*: Association of an insertion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with the activity of lupus nephritis. Clin. Nephrol. 1999, 51, 141.
4. *Asano T. et al.*: Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and renal pathology in Japanese children with IgA nephropathy. Clin. Nephrol. 1999, 51, 335–340.
5. *Barocci S. et al.*: Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients. Transplantation, 1999, 67, 534–538.
6. *Broekroelofs J. et al.*: Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: A role for angiotensin-converting enzyme (Insertion/Deletion) polymorphism? J. Am. Soc. Nephrol. 1998, 9, 2075–2081.
7. *Ciechanowicz A., Januszewicz A., Januszewicz W.* (red.): Genetyka chorób układu krążenia. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2002.
8. *Costerousse O., Danilov S., Alhenc-Gelas F.*: Genetics of angiotensin I-converting enzyme. Clin. Exper. Hypertens, 1997, 19, 659–669.
9. *Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W.*: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Volumed, Wrocław 1998, p. 220.
10. *Gaciong Z. et al.*: Znaczenie polimorfizmu genu dla enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) w chorobach nerek. Nefrol. Dial. Pol. 1997, 1, 196–200.
11. *Gaciong Z. et al.*: ACE genotype and progression of IgA nephropathy. Lancet, 1995, 346, 570–571.
12. *Harden P.N. et al.*: Polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. Lancet, 1995, 345, 1540–1542.
13. *Hruby Z.* (red.): Nefrologia praktyczna. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2001.
14. *Hunley T.E. et al.*: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: Potental silencer motiv and impact on progression in IgA nephropathy. Kidney Int. 1996, 49, 571–577.
15. *Ixkes M.C. et al.*: Cimetidine improves GFR-estimation by the Cockroft and Gault formula. Clin. Nephrol. 1997, 47, 229–236.
16. *Jalil J.E. et al.*: Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and adrenergic response to exercise in hypertensive patients. Med. Sci. Monit. 2002, 8, CR566–571.
17. *Johanning G. et al.*: Ethnic differences in angiotensin gene polymorphism. J. Hypertens, 1995, 13, 710–711.
18. *Kabat-Koperska J. et al.*: Methods of GFR determination – creatinine clearance after cimetidine administration in clinical practice. AMA, 2004, 31, 51–55.
19. *Kemperman F.A. et al.*: Cimetidine improves prediction of the glomerular filtration rate by the Cockroft-Gault formula in renal transplant recipients. Transplantation, 2002, 73, 770–774.
20. *Mayer G.*: ACE Genotype and ACE inhibitor response in kidney disease: A perspective. Am. J. Kidney. Dis. 2002, 40, 227–235.
21. *Mayer N.J. et al.*: Association of the D allele of the angiotensin I converting enzyme polymorphism with malignant vascular injury. J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. 2002, 55, 29–33.
22. *Miller J.A. et al.*: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal hemodynamic function in early diabetes. Kidney Int. 1997, 51, 119–124.
23. *Mizuiri S. et al.*: Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy. Am. J. Kidney Dis. 1998, 31, 301–307.
24. *Navis G. et al.*: Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. J. Mol. Med. 1999, 77, 781–791.
25. *Rigat B. et al.*: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J. Clin. Invest. 1990, 86, 1343–1346.
26. *Roy-Chaudhury P., Khan I.H.*: Angiotensin-converting enzyme (ACE) polymorphisms, angiotensin II, ACE inhibitors and glomerulosclerosis-A hypothesis. Nephron, 1995, 71, 359.
27. *Samuelsson O. et al.*: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in non-diabetic renal disease. Nephrol. Dial. Transplant. 2000, 15, 481–486.
28. *Schmidt S. et al.*: No association of converting enzyme insertion/deletion polymorphism with immunoglobulin A glomerulonephritis. Am. J. Kidney. Dis. 1995, 26, 727–731.
29. *Suzuki S. et al.*: Insertion/deletion polymorphism in ACE gene is not associated with renal progression in Japanese patients with IgA nephropathy. Am. J. Kidney. Dis. 2000, 35, 896–903.
30. *Tanaka R. et al.*: ACE gene polymorphism in childhood IgA nephropathy: Association with Clinicopathologic Findings. Am. J. Kidney Dis. 1998, 31, 774–779.
31. *Teranishi M. et al.*: Insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism affects the microvascular structure of the kidney in patients with nondiabetic renal disease. J. Hypertens, 1999, 17, 351–356.
32. *Yoshida H., Kon V., Ichikaawa I.*: Polymorphisms of renin-angiotensin system genes in progressive renal diseases. Kidney Int. 1996, 50, 732–744.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 117–126
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 117–126
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

ALDONA SIENNICKA

WPŁYW KRÓTKOŁAŃCUCHOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH NA STYMULOWANĄ ZMODYFIKOWANYMI OKSYDACYJNIE LDL EKSPRESJĘ ŚRÓDBŁONKOWYCH CZĄSTEK ADHEZYJNYCH*

THE EFFECT OF SHORT-CHAIN FATTY ACIDS ON EXPRESSION OF ENDOTHELIAL ADHESION MOLECULES STIMULATED BY OXIDATIVELY MODIFIED LDL*

Katedra Biochemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: prof. dr hab. n. farm. *Marek Naruszewicz*

Summary

Introduction: Adhesion and migration of mononuclear leukocytes into the vascular wall is a crucial step in atherogenesis. Expression of cell adhesion molecules by endothelial cells plays a leading role in this process. Natural short-chain fatty acids produced by bacterial fermentation of dietary fiber have been attributed with antiatherogenic properties.

Material and methods: This in vitro study has been conceived in an attempt to shed light on the mechanisms responsible for the modulatory effect of short-chain fatty acids in atherogenesis. The following conclusions have been drawn. Butyrate and propionate are selective inhibitors of ox-LDL-stimulated VCAM-1 and ICAM-1 expression with a mechanism of action involving reduced protein and specific mRNA production through inhibition of NF-κB activation. Suppressed expression of VCAM-1 and ICAM-1 was associated with reduced adherence of monocytes and lymphocytes to ox-LDL stimulated endothelial cells.

Results: Butyrate and propionate may have anti-inflammatory and antiatherogenic properties partly attributable to an inhibitory effect on NF-κB activation.

K e y w o r d s: endothelial cells – adhesion molecules – short-chain fatty acids – oxidized LDL.

Streszczenie

Wstęp: Adhezja i migracja mononuklearnych leukocytów do błony wewnętrznej naczynia odgrywa istotną rolę w patogenezie miażdżycy. W procesie tym pośredniczą cząstki adhezyjne. Sugeruje się, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, produkowane podczas bakteryjnej fermentacji błonnika pokarmowego w jelicie grubym, wywierają korzystne działanie przeciwmiażdżycowe.

Materiał i metody: Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że kwas propionowy i masłowy mogą mieć bezpośredni wpływ na funkcje komórek śródbłonka. Podjęto badania in vitro zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów, za pomocą których kwasy te mogłyby wpływać na istotny dla rozwoju miażdżycy etap, jakim jest dysfunkcja komórek śródbłonka i związana z tym ich zwiększona adhezywność dla monocytów i limfocytów.

Wyniki: Wykazano, że kwas propionowy i masłowy hamują stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Danuta Zapolska-Downar*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 104 stron, 20 rycin, 159 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Danuta Zapolska-Downar* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 104 pages, 20 figures, 159 references.

i ICAM-1, zarówno na poziomie białka jak i mRNA, poprzez wpływ na zależne od NF-κB mechanizmy transkrypcyjne obniżają również adhezywność komórek śródbłonka dla monocytów i limfocytów. Zaobserwowane właściwości kwasu propionowego i masłowego, a szczególnie ich wpływ na stopień aktywacji NF-κB, wskazują na istnienie nowych mechanizmów przeciwzapalnego i antymiażdżycowego działania tych kwasów.

H a s ł a: komórki śródbłonka – cząstki adhezyjne – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe – ox-LDL.

Wstęp

Aktualnie uważa się, że miażdżyca jest przewlekłą choroba zapalną, modyfikowaną zaburzeniami lipidowymi, z towarzyszącym stresem oksydacyjnym w ścianie naczynia i toczącym się w obrębie błony wewnętrznej procesem fibroproliferacyjnym [29]. Kluczowym wydarzeniem dla powstawania i rozwoju miażdżycy wydaje się być dysfunkcja komórek śródbłonka, z następową lokalną adhezją mononuklearnych leukocytów (ML) do komórek śródbłonka tętnic i akumulacją tych komórek w błonie wewnętrznej naczynia [29, 39]. W obecności zmodyfikowanych lipoprotein niskiej gęstości (ox-LDL) monocyty przekształcają się w makrofagi, wyłapują cząsteczki lipoprotein i przechodzą w komórki piankowate. Migracja komórek mięśni gładkich w obręb błony wewnętrznej ściany naczynia prowadzi do powstania tzw. pasm tłuszczowych, które przechodzą w zmiany typowe dla kolejnych etapów miażdżycy [29, 39]. Adhezja, transendotelialna wędrówka i akumulacja ML w błonie wewnętrznej naczynia odbywa się za sprawą śródbłonkowych cząstek adhezyjnych m.in. VCAM-1 (CD106) i ICAM-1 (CD54) [14]. W świetle aktualnej wiedzy, oprócz czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α) i interleukiny 1 (IL-1) [2, 17], również utleniona forma LDL stanowi jeden z najważniejszych czynników sprawczych dysfunkcji komórek śródbłonka [30, 38, 39]. Istotną rolę cząstek adhezyjnych w selektywnym przechodzeniu monocytów i limfocytów do ściany naczynia w miażdżycy potwierdzają badania epidemiologiczne oraz badania przeprowadzone na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy [14, 20 ,27].

Natura sygnałów i związanych z nimi mechanizmów molekularnych, które stymulują ekspresję genu dla VCAM-1 i ICAM-1 we wczesnych etapach miażdżycy, nie jest w pełni wyjaśniona. Sugeruje się, że istotną rolę w regulacji ekspresji genu dla VCAM-1 może odgrywać stres oksydacyjny [25]. Zaliczany do tzw. prozapalnych czynników transkrypcyjnych NF-κB [31] reguluje głównie ekspresję genów związanych z przebiegiem procesu zapalnego m.in. genów dla VCAM-1 i ICAM-1 [6, 31]. Czynnik ten jest aktywowany przez ox-LDL i wolne rodniki tlenowe (RZT) [6]. Wykazano, że hamowanie aktywacji NF-κB przez antyoksydanty związane jest z selektywnym hamowaniem stymulowanej przez TNF-α i IL-1 ekspresji VCAM-1 oraz z hamowaniem adhezji monocytów do stymulowanych komórek śródbłonka [34].

W pierwotnej i wtórnej prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego ważną rolę odgrywa dieta. W wyniku przetwarzania błonnika pokarmowego przez bakterie żyjące w jelicie grubym powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) [32]: octowy, masłowy i propionowy. Są one substancjami o działaniu plejotropowym i wykazują, poprzez regulację ekspresji różnych genów, zdolność do indukcji wielu biochemicznych zmian w różnych typach komórek. Kwas masłowy zmienia morfologię i ultrastrukturę hodowanych komórek śródbłonka [13], jest silnym czynnikiem antyproliferacyjnym, indukującym różnicowanie się komórek [10] oraz stymulującym apoptozę komórek nowotworowych [11, 22]. Maślan poprawia gojenie i redukuje stan zapalny śluzówki jelita poprzez redukcję aktywacji czynnika NF-κB w makrofagach błony właściwej jelita u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem okrężnicy [23], ma również właściwości antyutleniające i może obniżać produkcję proaterogennych ox-LDL [3].

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że występujące naturalnie SCFA, którym przypisuje się działanie przeciwmiażdżycowe, głównie poprzez wpływ na metabolizm lipidów, mogą mieć również bezpośredni wpływ na funkcje komórek śródbłonka. Podjęto badania in vitro zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów, za pomocą których kwas propionowy i masłowy mogłyby wpływać na istotny dla rozwoju miażdżycy etap, jakim jest dysfunkcja komórek śródbłonka i związana z tym zwiększona ich adhezywność dla monocytów i limfocytów. Jak dotąd, nie badano wpływu SCFA na proadhezywne funkcje komórek śródbłonka.

Materiał i metody

Izolacja i hodowla komórek śródbłonka

Komórkach śródbłonka (HUVEC) izolowano z ludzkich żył pępowinowych wg metody opisanej przez *Jaffe* [16]. Do światła żyły wstrzykiwano 0,1% roztwór kolagenazy (typ Ia) i inkubowano w temp. 37˚C. Komórki hodowano w buteleczkach hodowlanych i płytkach inkubacyjnych pokrytych uprzednio Endothelial Cell Attachment Factor (ECAF), w medium 199 z solami Earle'a, $NaHCO_3$ i 25 mmol/L HEPES, antybiotykami i 20% surowicą płodów bydlęcych (FBS) (vol/vol). Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temp. 37˚C przy stałym dopływie 5% CO_2, 95% O_2 i wilgotności 90%. Komórki śródbłonka identyfikowano na podstawie ich charakterystycznego wyglądu „kostki brukowej" w obrazie inwertoskopu oraz na podstawie obecności na ich powierzchni antygenu CD31.

Izolacja mononuklearnych leukocytów

Mononuklearne leukocyty (ML) izolowano z heparynizowanej krwi żylnej techniką wirowania w gradiencie gęstości przy użyciu Gradisolu L (20 min przy 400 x g w 18˚C). Pierścień monocytów i limfocytów aspirowano, przemywano zimnym PBS, a komórki zawieszano w 5% roztworze FBS w medium 199 z antybiotykami. Zawiesinę komórek (około 10% monocytów i 90% limfocytów) zużywano do adhezji w ciągu 15 min.

Izolacja i utlenianie LDL

Z osocza techniką sekwencyjnego wirowania w gradiencie gęstości izolowano LDL (1,019–1,055 g/mL) (112 000xg, 24 h, 16°C) [12]. LDL w stężeniu 200 μg/mL utleniano metodą z użyciem komórek śródbłonka w medium Ham's F-10 z antybiotykami i 5% FBS, przez 24 h w temp. 37°C, przy stałym dopływie CO_2. Rozmiar utleniania określano poprzez pomiar poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) [4]. Wyniki przedstawiano jako ilość dwualdehydu malonowego (MDA) w nmol MDA/mg białka.

Warunki eksperymentów

Komórki śródbłonka preinkubowano z kwasem masłowym lub propionowym (0,1, 1,0, 5,0 i 10,0 mmol/L) i bez kwasu, przez 24 h w 5% roztworze FBS w medium 199. Dla komórek preinkubowanych z 10,0 mmol/L roztworem kwasów zastosowano trzy czasy preinkubacji: 30 min, 12 h i 24 h. Następnie badane komórki poddawano działaniu ox-LDL (100 μg/mL) przez 12 h dla VCAM-1 i 24 h dla ICAM-1 (ekspresja powierzchniowa), 12 h (adhezywność komórek śródbłonka dla ML), 6 h (ekspresja mRNA) i 2 h (aktywacja NF-κB). Dawka ox-LDL wybrana została na podstawie doniesień z piśmiennictwa [8]. W badaniu kontrolnym komórki śródbłonka hodowano w 5% roztworze FBS w medium 199, bez badanych kwasów i ox-LDL. Przeżywalność komórek śródbłonka badano poprzez określenie wielkości uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i zdolności do wyłapywania błękitu trypanu.

Oznaczanie ekspresji VCAM-1 i ICAM-1

Po zakończeniu fazy inkubacji komórek śródbłonka z kwasami i ox-LDL komórki przemywano roztworem 0,1% albuminy z surowicy bydlęcej (BSA) w PBS, znakowano przeciwciałami, odpowiednio: anty-VCAM-1 (CD106: R-PE) lub anty-ICAM-1 (CD54: R-PE) oraz dodatkowo anty-PECAM-1 (CD31: FITC). Dla każdej serii badanych komórek wykonywano badanie kontrolne (kontrola izotypowa). Przeciwciała inkubowano z komórkami przez 30 min w temp. +4°C, komórki przemywano, utrwalano 0,5% formaldehydem i odklejano 0,01% roztworem trypsyny/EDTA, nastepnie poddawano analizie w cytometrze przepływowym FACS Calibur (Becton-Dickinson) przy użyciu programu komputerowego Cell Quest. W wybramkowanych komórkach analizowano ekspresję VCAM-1 i ICAM-1 mierzoną jako średnie natężenie fluorescencji. Ostateczną wartość ekspresji badanych cząstek uzyskiwano po uwzględnieniu wiązania niespecyficznego (kontrola izotypowa). Ocena wielkości ekspresji CD31 służyła również jako marker żywotności komórek.

Adhezja mononuklearnych leukocytów

Komórki preinkubowane wcześniej z kwasami i ox-LDL dwukrotnie płukano medium 199, do każdej celki dodawano ML ($1x10^6$/mL). Inkubowano 30 min w temp. +37°C, dwukrotnie płukano PBS i znakowano anty-PECAM-1 (CD31: FITC) i anty-CD14 (CD14: PE). Następnie komórki liczono i poddawano analizie w cytometrze przepływowym. Procentową zawartość monocytów określano po wybramkowaniu komórek zawierających antygen CD14, a komórek śródbłonka – antygen CD31. Pozostałe komórki uznano za limfocyty. Liczbę przyklejonych do komórek śródbłonka monocytów i limfocytów obliczano w odniesieniu do całkowitej liczby komórek uzyskanych po trypsynizacji. Wyniki przedstawiono jako procent komórek dodanych.

Oznaczanie zawartości mRNA dla VCAM-1 i ICAM-1 metodą RT-PCR

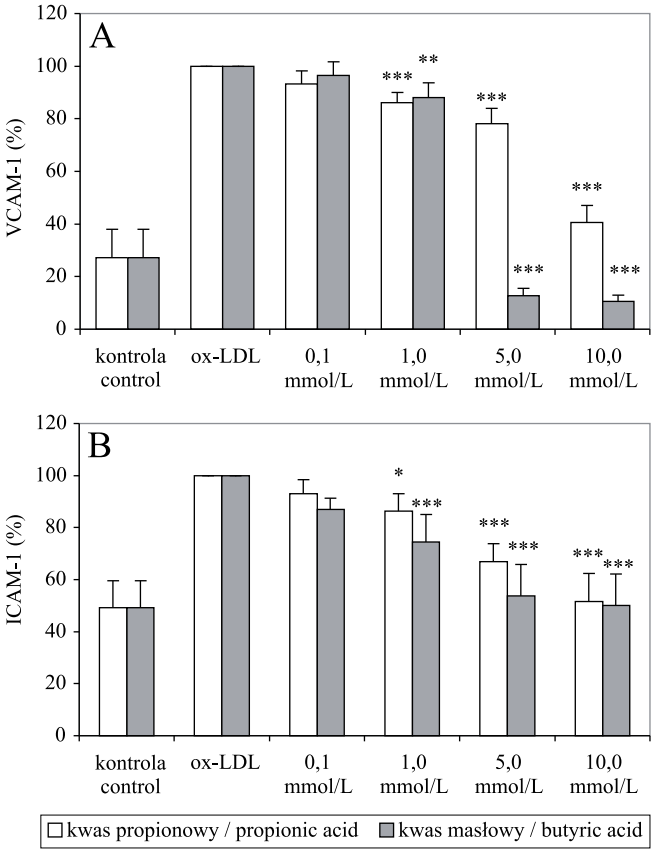
Zawartości mRNA dla VCAM-1 i ICAM-1 oznaczano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-PCR) z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jako genem konstytutywnym. Całkowite RNA izolowano z komórek śródbłonka, stosując zestaw do izolacji totalnego RNA (*Total RNA Prep-Plus*). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w roztworze zawierającym: bufor do RT, dNPTs, Random Hexamer Primer, RNAsin, RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase i RNA w temp. 37°C przez 60 min i kończono 5-min denaturacją w temp. 94°C. PCR przeprowadzano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: PCR Master Mix Composition, pary primerów i cDNA. Dla genu GAPDH zastosowano 22 cykle, dla VCAM-1 16 cykli, ICAM-1 18 cykli. Do swoistej amplifikacji cDNA dobrano odpowiednie sekwencje primerów. Dla VCAM-1 [28] (241 par zasad – pz): 5'-CCCTTGACCGGCTGGAGATT-3' jako primer sensowny i 5'-CTGGGGGCAACATTGACATAAAGTG-3' jako primer antysensowny. Dla ICAM-1 (Primer Select 4.00 DNASTAR) (409 pz): jako primer sensowny 5`-TGAAGGCCACCCCAGAGGACAAC-3` i 5`-CCCATTATGACTGCGGCGCTGCTACC-3` jako primer antysensowny. Dla GAPDH [9] (482 pz): 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' jako primer sensowny i 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGG-3' jako primer antysensowny. Elektroforetyczny rozdział produktów RT-PCR na 2% żelu agarozowym, wybarwianym bromkiem etydyny, fotografowano w świetle UV i skanowano. Przy zastosowaniu programu komputerowego Kodak Digital Science v 3.0 porównywano profil gęstości optycznej prążków cDNA dla VCAM-1 i ICAM-1 w stosunku do profilu gęstości optycznej prążków cDNA genu konstytutywnego GAPDH.

Pomiar aktywacji NF-κB

Stopień aktywacji NF-κB oznaczano w lizacie komórkowym przy użyciu zestawów opartych na metodzie ELISA firmy Active Motif zgodnie z załączonym protokołem. Wyniki przedstawiono jako $OD_{450\ nm}$.

Statystyczna analiza wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu Statistica 5.0 PL firmy StatSoft. Średnie i odchylenia standardowe mierzonych parametrów przedstawiono na wykresach i w tekście omawiając wyniki. Średnie porównywano ANOVA, z testem Tukeya jako testem *post hoc*.



Ryc. 1. Wpływ kwasu propionowego i masłowego na stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1 w zależności od stężenia. Komórki śródbłonka preinkubowano przez 24 h bez lub z kwasem propionowym albo masłowym (0,1, 1,0, 5,0 and 10,0 mmol/L) przed 12-godzinną (VCAM-1) lub 24-godzinną (ICAM-1) inkubacją bez (badanie kontrolne) lub z ox-LDL (100 μg/mL). Ekspresję VCAM-1 (A) i ICAM-1 (B) oceniano za pomocą cytometrii przepływowej. Uzyskane z cytometrii wyniki średniego natężenia fluorescencji wyrażano jako % zmian w stosunku do komórek stymulowanych ox-LDL (100%) i przedstawiono jako x ± SD z 8 oddzielnych eksperymentów. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ w porównaniu do ekspresji na komórkach stymulowanych ox-LDL bez preinkubacji z kwasem propionowym lub masłowym

Fig. 1. Propionate and butyrate inhibits ox-LDL-induced surface expression of VCAM-1 and ICAM-1 in a dose-dependent manner. Cells were pretreated without or with propionate or butyrate (0.1, 1.0, 5.0 and 10.0 mmol/L) for 24 hours before incubation without or with ox-LDL (100 μg/ml) for 12 hours (VCAM-1) and 24 hours (ICAM-1). Next, cells were stained for VCAM-1 (A) and ICAM-1 (B) and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as percentage of ox-LDL-stimulated cell (100%) and are given as mean ± SD from eight experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$,*** $p \leq 0.001$ compared with cells stimulated with ox-LDL in the absence of propionate or butyrate

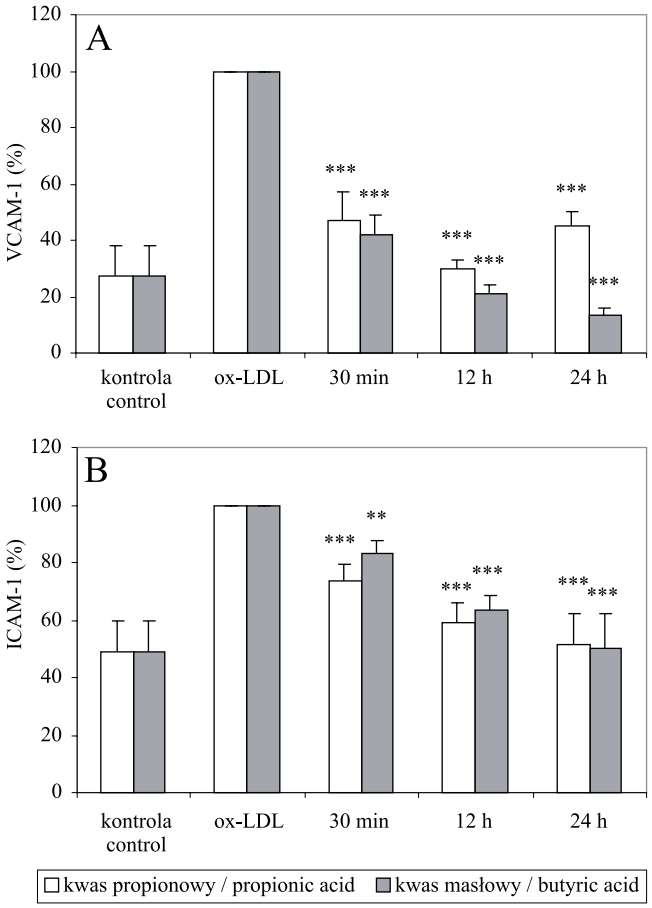
Wyniki

Wpływ kwasu propionowego i masłowego na stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1

Ekspresja VCAM-1 była istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższa na komórkach preinkubowanych 24 h z kwasem propionowym w stężeniu 1.0, 5.0 i 10.0 mmol/L przed inkubacją z ox-LDL, w porównaniu do komórek inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu, i wynosiła odpowiednio: 86,1 ± 4,0%; 78,2 ± 5,7%; 40,5 ± 6,6% (n = 8). Hamujące działanie kwasu propionowego było zależne od stężenia, z maksymalnym efektem dla stężenia 10,0 mmol/L (ryc. 1A). Również kwas masłowy hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 w sposób zależny od stężenia. Ekspresja VCAM-1 na komórkach śródbłonka, preinkubowanych 24 h z kwasem masłowym w stężeniu: 1,0, 5,0 i 10,0 mmol/L, przed inkubacją z ox-LDL była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do komórek inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu, i wynosiła odpowiednio: 88,0 ± 5,7% ($p \leq 0,01$, n = 8); 12,8 ± 2,7% ($p \leq 0,001$, n = 8) i 10,5 ± 2,5% ($p \leq 0,001$, n = 8) (ryc. 1A). Maksymalny wpływ uzyskano dla stężenia 10,0 mmol/L. Hamujące działanie kwasu masłowego było silniejsze niż działanie kwasu propionowego. Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L (40,5 ± 6,6) vs kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L (10,5 ± 2,5), $p \leq 0,0000$.

Kwas propionowy hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję ICAM-1 w sposób zależny od stężenia, z maksymalnym wpływem przy 10,0 mmol/L. Ekspresja ICAM-1 była istotnie statystycznie niższa na komórkach preinkubowanych 24 h z kwasem propionowym w stężeniu 1,0 mmol/L (86,3 ± 6,7%; $p \leq 0,05$; n = 8), 5,0 mmol/L (66,8 ± 7,0%; $p \leq 0,001$; n = 8) i 10,0 mmol/L (51,5 ± 10,9%; $p \leq 0,001$; n = 8) przed inkubacją z ox-LDL w porównaniu do ekspresji na komórkach inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu (ryc. 1B). Również kwas masłowy hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję ICAM-1 w sposób zależny od stężenia. Ekspresja ICAM-1 na komórkach śródbłonka preinkubowanych 24 h z kwasem masłowym (od 1,0 do 10 mmol/L), przed inkubacją z ox-LDL była istotnie statystycznie niższa ($p \leq 0,001$) w porównaniu do komórek inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu, i wynosiła odpowiednio: 74,5 ± 10,57%; 53,8 ± 12,1%; 50,0 ± 12,2% (n = 8) (ryc. 1B). Maksymalny wpływ uzyskano dla stężenia 10,0 mmol/L. W porównaniu do VCAM-1, gdzie kwas masłowy okazał się być silniejszym inhibitorem niż kwas propionowy, hamujące działanie kwasu masłowego na stymulowaną ox-LDL ekspresję ICAM-1 było podobne do działania kwasu propionowego. Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L (51,5 ± 10,9) vs kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L (50,0 ± 12,2), p = ns.

Ekspresja VCAM-1 na komórkach śródbłonka preinkubowanych z kwasem propionowym przez 30 min, 12 h i 24 h, przed inkubacją z ox-LDL była istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższa w porównaniu do ekspresji na komórkach, inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu

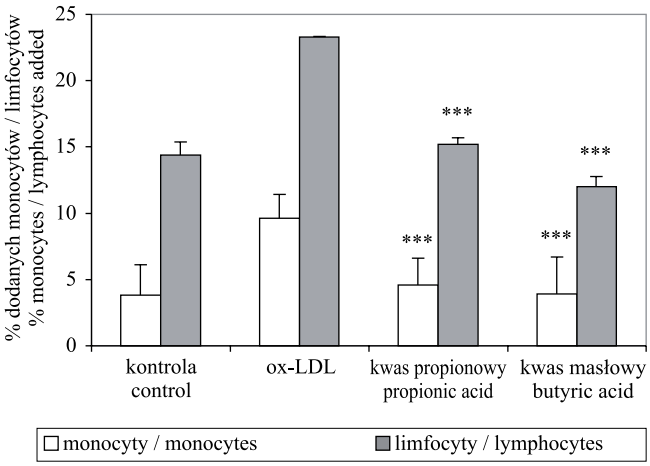


Ryc. 2. Wpływ kwasu propionowego i masłowego na stymulowaną ox--LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1 w zależności od czasu preinkubacji. Komórki śródbłonka preinkubowano bez lub z kwasem propionowym albo masłowym (10,0 mmol/L) przez 30 min, 12 h lub 24 h, przed 12-godzinną (VCAM-1) i 24-godzinną (ICAM-1) inkubacją bez (badanie kontrolne) lub z ox-LDL (100 μg/mL). Ekspresję VCAM-1 (A) i ICAM-1 (B) oceniano za pomocą cytometrii przepływowej. Uzyskane z cytometrii wyniki średniego natężenia fluorescencji wyrażano jako % zmian w stosunku do komórek stymulowanych ox-LDL (100%) i przedstawiono jako x ± SD z 8 oddzielnych eksperymentów. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ w porównaniu do ekspresji na komórkach stymulowanych ox-LDL bez preinkubacji z kwasem propionowym lub masłowym.

Fig. 2. Propionate and butyrate inhibits ox-LDL-induced surface expression of VCAM-1 and ICAM-1 in a time-dependent manner. Cells were preteated without or with propionate or butyrate (10.0 mmol/L) for 30 minutes, 12 hours and 24 hours before incubation without or with ox-LDL (100 μg/ml) for 12 hours (VCAM-1) and 24 hours (ICAM-1). Next, cells were stained for VCAM-1 (A) and ICAM-1 (B) and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as percentage of ox-LDL-stimulated cell (100%) and are given as mean ± SD from eight experiments. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with cells stimulated with ox-LDL in the absence of propionate or butyrate.

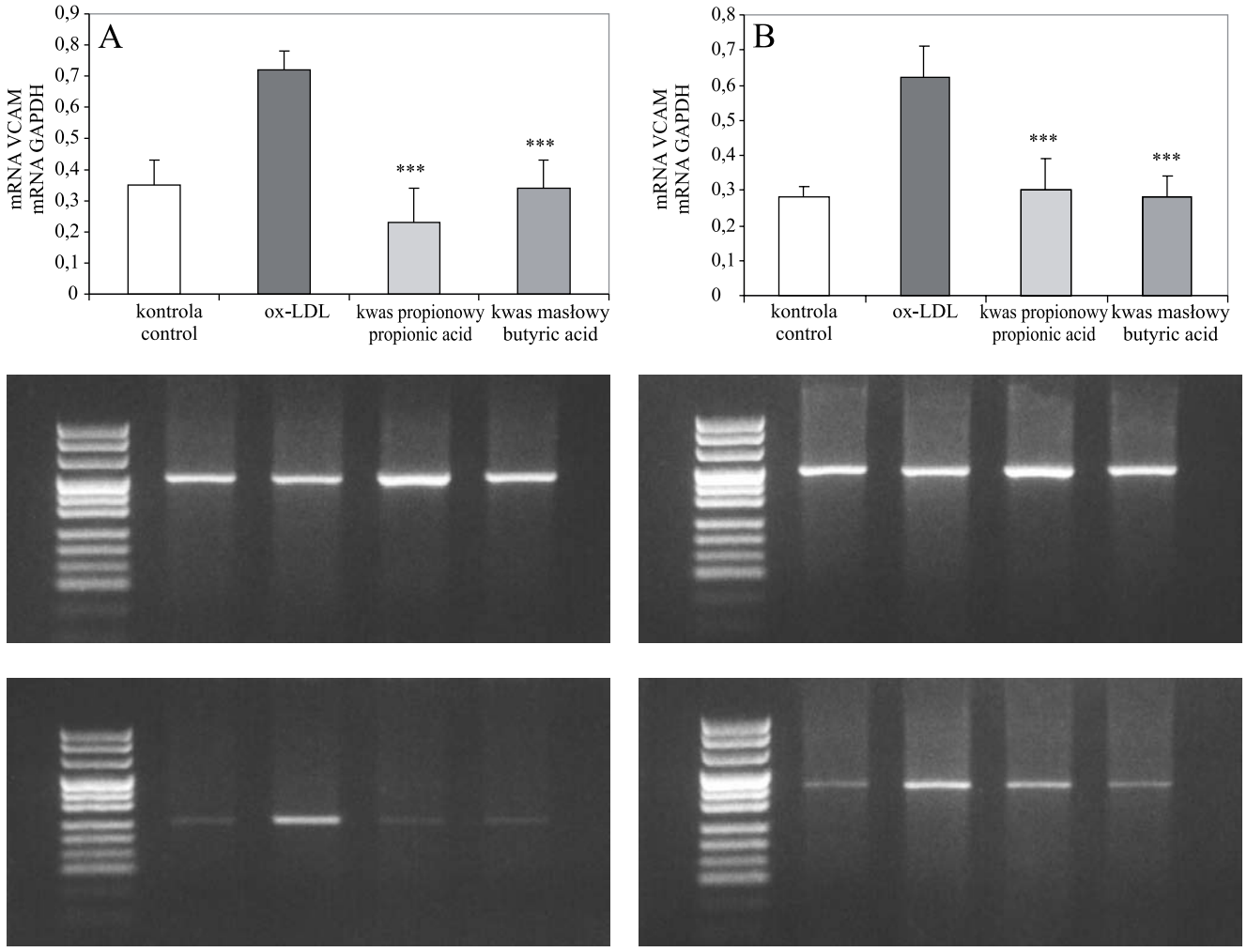
i wynosiła odpowiednio: 47,0 ± 9,9%; 30,0 ± 3,2%; 44,9 ± 5,0% (n = 8) (ryc. 2A). Maksymalny wpływ zaobserwowano w przypadku 12 h preinkubacji. Natomiast kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 w sposób zależny od czasu preinkubacji, z maksymalnym wpływem po 24 h. Ekspresja VCAM-1 na komórkach śródbłonka, preinkubowanych z kwasem masłowym przez 30 min, była istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższa w porównaniu do ekspresji na komórkach inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu masłowego i wynosiła 42,2 ± 6,9% (n = 8), a po 12 h i 24 h przed dodaniem ox-LDL obniżał ekspresję VCAM-1 poniżej wartości spotykanych na komórkach spoczynkowych (20,7 ± 3,5% i 13,2 ± 2,8%; odpowiednio) (ryc. 2A).

Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L hamował w sposób zależny od czasu preinkubacji stymulowaną ox-LDL ekspresję ICAM-1. Ekspresja ICAM-1 na komórkach śródbłonka, preinkubowanych 30 min, 12 h i 24 h z kwasem propionowym przed inkubacją z ox-LDL, była istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższa w porównaniu do ekspresji na komórkach inkubowanych z ox-LDL bez dodatku tego kwasu i wynosiła odpowiednio: 73,6 ± 6,0%; 59,2 ± 6,9%; 51,5 ± 10,9% (n = 8) (ryc. 2B). Ekspresja ICAM-1 na komórkach preinkubowanych z kwasem masłowym przez 30 min związana była z istotnym statystycznie ($p \leq 0,01$) obniżeniem stymulowanej ox-LDL ekspresji ICAM-1 (83,0 ± 4,8%; n = 8), a po 12 h i 24 h była istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższa w porównaniu do ekspresji na komórkach inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu i wynosiła odpowiednio: 63,5 ± 4,8% i 50,0 ± 12,1% (n = 8) (ryc. 2B).



Ryc. 3. Wpływ kwasu propionowego i masłowego na zawartość mRNA dla VCAM-1 i ICAM-1 w komórkach śródbłonka stymulowanych ox-LDL.
Komórki śródbłonka preinkubowano bez lub z kwasem propionowym albo masłowym (10,0 mmol/L) przez 24 h przed 6-godzinną inkubacją bez (badanie kontrolne) lub z ox-LDL (100 μg/mL). Wyizolowane mRNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji w reakcji PCR przy użyciu specyficznych dla GAPDH, VCAM-1 i ICAM-1 primerów. Ilość produktów PCR oceniano poprzez pomiar gęstości optycznej sfotografowanych prążków cDNA. Wyniki wyrażano jako stosunek gęstości optycznej cDNA dla VCAM-1 (A) i ICAM-1 (B) do gęstości optycznej cDNA dla GAPDH (standard wewnętrzny). Rycina przedstawia wyniki wyrażone jako x ± SD z 7 oddzielnych eksperymentów. *** $p \leq 0,001$ w porównaniu do komórek stymulowanych ox-LDL bez preinkubacji z kwasem propionowym lub masłowym

Fig. 3. Propionate and butyrate inhibits VCAM-1 and ICAM-1 mRNA expression in HUVEC.
Cells were pretreated without or with propionate or butyrate (10.0 mmol/L) for 24 hours before incubation without or with ox-LDL (100 μg/mL) for 6 hours. mRNA was extracted, reverse transcribed, and amplified by PCR using specific primers for GAPDH and VCAM-1 and ICAM-1. Optical densities are from seven separate experiments after normalization to GAPDH (internal standard). Data are expresed as VCAM-1/GAPDH (A) and ICAM-1/GAPDH (B) and are given as mean ± SD from seven experiments. *** $p \leq 0.001$ compared with cells stimulated with ox-LDL in the absence of propionate or butyrate. Photographs below show ultraviolet-iluminated gel electrophoregrams from a representative experiment



Ryc. 4. Wpływ kwasu propionowego i masłowego na adhezję monocytów i limfocytów do komórek śródbłonka stymulowanych ox-LDL. Komórki śródbłonka preinkubowano bez lub z kwasem propionowym albo masłowym (10,0 mmol/L) przez 24 h przed 12-godziną inkubacją bez (badanie kontrolne) lub z ox-LDL (100 μg/mL). Następnie do komórek dodawano świeżo wyizolowane z krwi obwodowej mononuklearne leukocyty (1 x 106/mL) i inkubowano 30 min. Pomiaru ilości przyklejonych monocytów i limfocytów dokonywano wg metody opisanej w rozdziale Materiał i Metody. Wyniki wyrażano jako % dodanych monocytów lub limfocytów i przedstawiono jako x ± SD z 9 oddzielnych eksperymentów, przeprowadzonych podwójnie. *** $p \leq 0{,}001$ w porównaniu do komórek stymulowanych ox-LDL bez preinkubacji z kwasem propionowym lub masłowym

Fig. 4. Propionate and butyrate inhibits adhesion of monocytes and lymphocytes to ox-LDL-stimulated HUVEC. Cells were pretreated without or with propionate or butyrate (10.0 mmol/L) for 24 hours before incubation without or with ox-LDL (100 μg/ml) for 12 hours. Freshly isolated PBMC were coincubated with endothelial cells for 30 minutes. Subsequently, monocyte and lymphocyte adhesion was measured as described in the „Materials and Methods" section. Results are expressed as percentage of monocytes and lymphocytes added and are given as mean ± SD from nine experiments. *** $p \leq 0.001$ compared with cells stimulated with ox-LDL in the absence of propionate or butyrate

Wykazano, że zarówno kwas propionowy jak i masłowy hamowały stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1 w sposób zależny od stężenia w zakresie od 1,0 do 10,0 mmol/L oraz od czasu preinkubacji. Hamujący wpływ obu badanych kwasów na ekspresję ICAM-1 był podobny, natomiast kwas masłowy, w porównaniu do kwasu propionowego, okazał się być silniejszym inhibitorem stymulowanej ox-LDL ekspresji VCAM-1.

Wpływ kwasu propionowego i masłowego na adhezję monocytów i limfocytów do komórek śródbłonka stymulowanych ox-LDL

Stymulacja komórek śródbłonka ox-LDL związana była z około 2-krotnym wzrostem ilości monocytów przyklejonych do tych komórek (z 14,4 ± 2,2% do 23,3 ± 1,8%, n = 9). Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L istotnie statystycznie ($p \leq 0{,}001$) hamował stymulowaną ox-LDL zwiększoną adhezywność komórek śródbłonka dla monocytów (z 23,3 ± 1,8% do 15,5 ± 2,0%, n = 9) (ryc. 3). Podobnie preinkubacja komórek śródbłonka z kwasem masłowym w stężeniu 10,0 mmol/L, przed inkubacją z ox-LDL, prowadziła do istotnego statystycznie ($p \leq 0{,}001$) obniżenia liczby przyklejonych monocytów, z 23,3 ± 1,8% do 12,0 ± 2,8 % (n = 9) (ryc. 3). Kwas masłowy okazał się być silniejszym, w porównaniu do kwasu propionowego, inhibitorem stymulowanej ox-LDL, zwiększonej adhezywności komórek śródbłonka dla monocytów. Kwas propionowy (15,2 ± 2,0) vs. kwas masłowy (12,0 ± 2,8), $p \leq 0{,}05$.

Stymulacja komórek śródbłonka ox-LDL powodowała około 3-krotny wzrost liczby przyklejonych limfocytów (z 3,8 ± 0,97 do 9,6 ± 0,93, n = 8). Preinkubacja komórek śród-

błonka z kwasem propionowym w stężeniu 10,0 mmol/L, przed inkubacją z ox-LDL, prowadziła do istotnego statystycznie ($p \leq 0,001$) obniżenia liczby przyklejonych limfocytów (4,6 ± 0,78%, n = 9) w porównaniu do liczby limfocytów przyklejonych do komórek stymulowanych ox-LDL (9,6 ± 0,93%, n = 9) (ryc. 3). Również kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) obniżał stymulowaną ox-LDL zwiększoną adhezywność komórek śródbłonka dla limfocytów (z 9,6 ± 0,93% do 3,9 ± 0,5%, n = 9). Kwas masłowy hamował stymulowaną ox-LDL zwiększoną adhezywność limfocytów do komórek śródbłonka w podobnym zakresie jak kwas propionowy. Kwas propionowy (4,6 ± 0,78) vs. kwas masłowy (3,9 ± 0,5), p = ns). Kwas masłowy okazał się być silniejszym niż kwas propionowy inhibitorem, stymulowanej ox-LDL, zwiększonej adhezywności komórek śródbłonka dla monocytów.

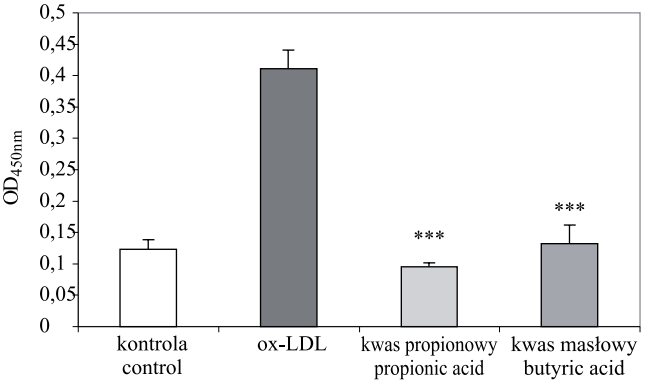
Wpływ kwasu propionowego i masłowego na ekspresję mRNA dla VCAM-1 i ICAM-1 w komórkach śródbłonka stymulowanych ox-LDL

Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję mRNA dla VCAM-1. Poziom mRNA dla VCAM-1 był niższy w komórkach preinkubowanych z kwasem propionowym przed inkubacją z ox-LDL (0,34 ± 0,11, n = 7), w porównaniu do komórek inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu (0,72 ± 0,06, n = 7) (ryc. 4A). Stopień obniżenia różnił się w poszczególnych populacjach komórek śródbłonka, a średnia zawartość mRNA dla VCAM-1 w komórkach preinkubowanych z kwasem propionowym przed stymulacją ox-LDL była podobna jak w komórkach spoczynkowych (0,35 ± 0,08). Kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L, podobnie jak w przypadku powierzchniowej ekspresji VCAM-1, hamował stymulowaną ox-LDL ekspresję mRNA dla VCAM-1 poniżej poziomu ekspresji mRNA dla VCAM-1 w komórkach spoczynkowych (z 0,72 ± 0,06 do 0,23 ± 0,09; $p \leq 0,001$; n = 7) (ryc. 4A). Wpływ kwasu masłowego na stymulowaną ox-LDL ekspresję mRNA dla ICAM-1 był podobny do wpływu kwasu propionowego. Kwas propionowy (0,34 ± 0,11) vs. kwas masłowy (0,23 ± 0,09), p = ns.

Kwas propionowy w stężeniu 10,0 mmol/L istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) obniżał poziom mRNA dla ICAM-1 w komórkach stymulowanych ox-LDL (z 0,62 ± 0,09 do 0,28 ± 0,09, n = 7). Kwas masłowy w stężeniu 10,0 mmol/L również istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) obniżał zawartość specyficznego dla ICAM-1 produktu RT-PCR w komórkach stymulowanych ox-LDL (z 0,62 ± 0,09 do 0,30 ± 0,06, n = 7) (ryc. 4B). Zakres hamującego działania kwasów był zbliżony wielkością do poziomu jaki wykazano w przypadku wpływu tych kwasów na powierzchniową ekspresję białka badanych cząstek adhezyjnych.

Wpływ kwasu propionowego i masłowego na stymulowaną ox-LDL aktywację NF-κB

Stymulacja komórek śródbłonka ox-LDL związana była z około 3-krotnym wzrostem ilości aktywnej postaci



Ryc. 5. Wpływ kwasu propionowego i masłowego na stymulowaną ox-LDL aktywację NF-κB.
Komórki śródbłonka preinkubowano bez lub z kwasem propionowym albo masłowym (10,0 mmol/L) przez 24 h przed 2-godzinną inkubacją bez lub z ox-LDL (100 μg/mL). Następnie w lizacie komórkowym oznaczano poziom białka p65 przy użyciu zestawów testowych opartych na metodzie ELISA. Wyniki wyrażono jak wartość ekstynkcji przy 450 nm i przedstawiono jako x ± SD z 7 oddzielnych eksperymentów, przeprowadzonych podwójnie. *** $p \leq 0,001$ w porównaniu do komórek stymulowanych ox-LDL bez preinkubacji z kwasem propionowym lub masłowym

Fig. 5. Propionate and butyrate inhibits ox-LDL induced activation of NF-κB.
Cells were pretreated without or with propionate or butyrate (10.0 mmol/L) for 24 hours before incubation without or with ox-LDL (100 μg/mL) for 2 hours. A whole cell extract was obtained and NF-κB activation was measured with ELISA-based kit. Results are expressed as OD450nm and are given as mean ± SD from seven experiments. *** $p \leq 0.001$ compared with cells stimulated with ox-LDL in the absence of propionate or butyrate

NF-κB (ryc. 5). Poziom białka p65 był istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższy w komórkach preinkubowanych z kwasem propionowym w dawce 10,0 mmol/L, przed inkubacją z ox-LDL (0,131 ± 0,029, n = 7) niż w komórkach inkubowanych z ox-LDL bez dodatku kwasu (0,410 ± 0,029, n = 7). Poziom aktywnej postaci NF-κB w komórkach preinkubowanych z kwasem masłowym (10,0 mmol/L), a następnie inkubowanych z ox-LDL, był istotnie statystycznie ($p \leq 0,001$) niższy (0,095 ± 0,006, n = 7) niż w komórkach spoczynkowych (0,122 ± 0,015, n = 7). Podobnie jak to wykazano, zarówno dla powierzchniowej ekspresji białka jak i dla mRNA w przypadku VCAM-1, wpływ kwasu masłowego na stopień aktywacji NF-κB był silniej zaznaczony niż wpływ kwasu propionowego. Kwas propionowy (0,131 ± 0,029) vs. kwas masłowy (0,095 ± 0,006), $p \leq 0,05$. Zarówno kwas propionowy, jak i masłowy hamują stymulowaną ox-LDL aktywację NF-κB. Sugeruje to, że omawiane powyżej właściwości badanych kwasów związane są z ich wpływem na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF-κB i tym samym na ekspresję genu dla VCAM-1 i ICAM-1.

Dyskusja

Jednym z ważnych czynników patogenetycznych miażdżycy jest dysfunkcja komórek śródbłonka [5] i toczący się w ścianie naczynia proces zapalny, za który

w głównej mierze odpowiedzialne są obecne tam monocyty i limfocyty [29]. Do znanych czynników, stymulujących dysfunkcję śródbłonka, należą ox-LDL oraz cytokiny zapalne [38]. Podjęte badania własne miały na celu określenie wpływu propionianu i maślanu na stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1. Jako stymulatorów dysfunkcji śródbłonka użyto ox-LDL. Inkubacja komórek śródbłonka z LDL przez 24 godziny prowadziła do około 5-krotnego wzrostu ilości dwualdehydu malonowego, mierzonego jako TBARS. Wyniki te są zgodne z doniesieniami *Cominacini i wsp.* [8], którzy wykazali 4–5-krotny wzrost TBARS w ox-LDL utlenionych komórkami śródbłonka. Autorzy ci zaobserwowali, że tak utlenione LDL (50–100 μg/mL) stymulują w sposób zależny od stężenia ekspresję VCAM-1 i ICAM-1, ale nie selektyny E. Zastosowanie propionianu i maślanu, SCFA o nieznanym jak dotąd wpływie na funkcje komórek śródbłonka, spowodowało zależne od stężenia i czasu preinkubacji zahamowanie stymulowanej ox-LDL ekspresji VCAM-1 i ICAM-1, silniejsze właściwości hamowania okazał się mieć maślan. Funkcjonalnym potwierdzeniem powyższych obserwacji było wykazanie hamującego wpływu kwasów na indukowaną ox-LDL zwiększoną adhezywność komórek śródbłonka dla monocytów i limfocytów. Wyniki badań własnych sugerują, że zarówno propionian jak i maślan mogą hamować stan zapalny i potencjalnie progresję miażdżycy, poprzez wpływ na ekspresję śródbłonkowych cząstek adhezyjnych i tym samym na adhezję monocytów i limfocytów do komórek śródbłonka, z następową ich akumulacją w błonie wewnętrznej ściany naczynia. Uzyskane wyniki wydają się interesujące w aspekcie ewentualnego przeciwmiażdżycowego działania badanych substancji.

W badaniach własnych wykazano, że zarówno propionian jak i maślan w dużo większym stopniu hamują, stymulowaną ox-LDL, ekspresję VCAM-1 niż ICAM-1. *Cominacini i wsp.* [8] wykazali, że probukol jak i witamina E hamują stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1, ale hamujący wpływ był bardziej zaznaczony w stosunku do VCAM-1. Podobnych obserwacji dokonano stosując inne substancje o właściwościach antyutleniających [34, 35, 36].

Zaobserwowany w badaniach własnych wpływ propionianu i maślanu na powierzchniową ekspresję VCAM-1 i ICAM-1 korelował z działaniem tych kwasów na zawartość mRNA dla badanych cząstek adhezyjnych. Stąd można sądzić, że ich działanie jest raczej wynikiem wpływu na mechanizmy transkrypcyjne, regulujące zawartość mRNA dla VCAM-1 i ICAM-1 niż następstwem wpływu na mechanizmy translacyjne i postranslacyjne, które regulują ekspresję białka na powierzchni komórki. Dlatego w następnym etapie badań oceniano wpływ badanych kwasów na aktywność NF-κB. Inkubacja komórek śródbłonka z ox-LDL prowadziła do 3-krotnego wzrostu poziomu aktywnej postaci NF-κB (białka p65). *Palmetshofer i wsp.* [26] w swoich badaniach zaobserwowali, że lisofosfatydylocholina, składowa ox-LDL, prowadzi do aktywacji NF-κB z następową indukcją ekspresji VCAM-1 i ICAM-1. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że wiele stymulatorów aktywacji NF-κB pobudza również uwalnianie RZT, natomiast wiele substancji o właściwościach antyutleniających hamuje wewnątrzkomórkową syntezę RZT i aktywację NF-κB. Uwalniane wewnątrzkomórkowo RZT przyczyniają się do aktywacji czynnika transkrypcyjnego, niemniej dokładna rola RZT w aktywacji NF-κB nie jest znana [25]. Z badań *Kretz-Remy i wsp.* [19] wynika, że zwiększona ekspresja peroksydazy glutationu w komórkach poddanych działaniu stresu oksydacyjnego związana była zarówno ze zmniejszoną degradacją IκB, jak i translokacją NF-κB do jądra. Wykazano również, że antyoksydanty hamują aktywację NF-κB z następową redukcją VCAM-1, bez wpływu na ICAM-1 [24, 34].

Z badań własnych wynika, że zarówno propionian jak i maślan redukują stymulowaną ox-LDL zwiększoną zawartość białka p65 w lizacie komórkowym. Podobnie jak w przypadku cytowanych wcześniej prac z użyciem antyoksydantów, hamujące działanie badanych kwasów na aktywację NF-κB związane było z dużo większą redukcją VCAM-1 niż ICAM-1. W dostępnym piśmiennictwie brak danych na temat wpływu propionianu na stymulowaną cytokinami czy ox-LDL aktywację NF-κB, z następową indukcją genów odpowiedzi zapalnej. Niewiele jest też badań oceniających wpływ maślanu na funkcję komórek śródbłonka [1, 18, 33]. W badaniach wykonanych na ludzkich komórkach nabłonka błony śluzowej jelita grubego maślan hamował stymulowaną IL-1 aktywację NF-κB [21]. W badaniach przeprowadzonych na ludzkiej linii komórek okrężnicy wykazano, że maślan hamował zarówno konstytutywną, jak i stymulowaną cytokinami aktywność NF-κB [15]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych, gdzie zaobserwowano, że poziom białka p65 w komórkach preinkubowanych z maślanem, a następnie stymulowanych ox-LDL był niższy niż w komórkach spoczynkowych.

Wykazany w badaniach własnych dużo większy wpływ maślanu na ekspresję VCAM-1 niż ICAM-1 sugeruje, że stwierdzone jednocześnie hamowanie aktywacji NF-κB przez kwasy odbywa się poprzez mechanizm podobny do działania antyoksydantów. Tę sugestię potwierdzają ostatnio opublikowane badania, z których wynika, że maślan ma właściwości hamowania stresu oksydacyjnego [3]. W większości badań nie wykazano wpływu maślanu na ekspresję ICAM-1. Natomiast w badaniach własnych, mimo że w dużo mniejszym stopniu, to jednak maślan hamował również ekspresję ICAM-1. Może być to wynikiem wykazanego w innych badaniach oddziaływania maślanu na białka inhibitorowe odpowiedzialne za utrzymanie NF-κB w postaci nieczynnej w cytoplazmie [7, 37]. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na istnienie również innych mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie aktywacji NF-κB przez maślan. W eksperymentach przeprowadzonych na ludzkich komórkach okrężnicy wykazano, że maślan hamuje stymulowaną TNF-α aktywację NF-κB poprzez redukcję aktywności proteasomów i zapobiega

w ten sposób degradacji IκBα [37]. Wykazano też, że maślan hamuje aktywację NF-κB poprzez stabilizację IκBα oraz IκBβ [7] i może hamować aktywację NF-κB poprzez wpływ na deacetylazę histonową [15].

Wobec powyższych danych celowe wydają się dalsze eksperymenty, zmierzające do zbadania terapeutycznego znaczenia propionianu i maślanu w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Wartym rozważenia są również próby mające na celu zwiększenie poziomu propionianu w surowicy poprzez wprowadzenie do diety większej ilości pożywienia bogatego we włókna celulozowe czy oporną na trawienie skrobię lub spożywanie diety funkcjonalnej, zawierającej w swoim składzie bakterie rozkładające celulozę czy skrobię w jelicie grubym. Natomiast jeżeli chodzi o maślan, celowym wydaje się być skonstruowanie takiej postaci kwasu, która zapewniałaby uzyskanie odpowiedniego poziomu maślanu w surowicy, gdyż tylko niewielka ilość tego kwasu w następstwie fermentacji celulozy w jelicie grubym przedostaje się do krążenia.

Wnioski

1. Kwas propionowy i masłowy hamują stymulowaną ox-LDL ekspresję VCAM-1 i ICAM-1, zarówno na poziomie białka jak i mRNA, poprzez wpływ na zależne od NF-κB mechanizmy transkrypcyjne, co może być powiązane z właściwościami antyoksydacyjnymi tych kwasów.

2. Kwas propionowy i masłowy obniżają adhezywność komórek śródbłonka dla monocytów i limfocytów. Potencjalnie to ograniczenie dysfunkcji komórek śródbłonka prowadzi w konsekwencji do zmniejszonej akumulacji monocytów i limfocytów w błonie wewnętrznej ściany naczynia.

3. Zaobserwowane właściwości kwasu propionowego i masłowego, a szczególnie ich wpływ na stopień aktywacji NF-κB, wskazuje na istnienie nowych mechanizmów przeciwzapalnego i antymiażdżycowego działania tych kwasów.

4. Zarówno kwas propionowy, jak i masłowy mają potencjalne znaczenie terapeutyczne i zasługują na podjęcie dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. *Arts J. et al.*: Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation. Biochem. J. 1995, 310, 171–176.
2. *Beekhuizen H., van Furth R.*: Monocyte adherence to human vascular endothelium. J. Leukoc. Biol. 1993, 54, 363–378.
3. *Blache D. et al.*: Oxidant stress: the role of nutrients in cell-lipoprotein interactions. Proc. Nutr. Soc. 1999, 58, 559–563.
4. *Buege J.A., Aust S.D.*: Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978, 52, 302–310.
5. *Chłopicki S., Gryglewski R.P.*: Farmakologia śródbłonka. Kardiol. Pol. 2002, 57, IV5–IV15.
6. *Collins T., Cybulsky M.I.*: NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? J. Clin. Invest. 2001, 107, 255–264.
7. *Chakravortty D. et al.*: The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. J. Endotoxin. Res. 2000, 6, 243–247.
8. *Cominacini L. et al.*: Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. Free Radic. Biol. Med. 1997, 22, 117–127.
9. *Ercolani L. et al.*: Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. J. Biol. Chem. 1988, 263, 15335–15341.
10. *Feng P. et al.*: Sodium butyrate is a potent modulator of smooth muscle cell proliferation and gene expression. Cell. Prolif. 1996, 29, 231–241.
11. *Gaschott T., Maassen C.U., Stein J.*: Tributyrin, a butyrate precursor, impairs growth and induces apoptosis and differentiation in pancreatic cancer cells. Anticancer Res. 2001, 21(4A), 2815–2819.
12. *Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H.*: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. 1955, 34, 1345–1353.
13. *Hormia M. et al.*: Vimentin filaments in cultured endothelial cells form butyrate-sensitive juxtanuclear masses after repeated subculture. Exp. Cell. Res. 1982, 138, 159–166.
14. *Huo Y., Ley K.*: Adhesion molecules and atherosclerosis. Acta Physiol. Scand. 2001, 173, 35–43.
15. *Inan M.S. et al.*: The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. Gastroenterology, 2000, 118, 724–734.
16. *Jaffe E.A.*: Culture and identification of large vessel endothelial cells. In: Biology of endothelial cells. Ed. E.A. Jaffe. Martinus. Nijhoff. Publ. Boston, 1984, p. 1–9.
17. *Jang Y. et al.*: Cell adhesion molecules in coronary artery disease. J. Am. Coll. Cardiol. 1994, 24, 1591–1601.
18. *Justus A.C., Hoggatt A.M., Faulk W.P.*: Heparan-dependent endothelial antithrombin binding is increased by butyrate. Thromb. Res. 1995, 80, 125–133.
19. *Kretz-Remy C. et al.*: Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. J. Cell. Biol. 1996, 133, 1083–1093.
20. *Li H. et al.*: An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. Arterioscler. Thromb. 1993, 13, 197–204.
21. *Lührs H. et al.*: Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor-kappa B activation in human epithelial cells. Dig. Dis. Sci. 2001, 46, 1968–1973.
22. *Lührs H. et al.*: Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. Anticancer Res. 2002, 22, 1561–1568.
23. *Lührs H. et al.*: Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. Scand. J. Gastroenterol. 2002, 37, 458–466.
24. *Marui N. et al.*: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J. Clin. Invest. 1993, 92, 1866–1874.
25. *Offermann M.K., Medford R.M.*: Antioxidants and atherosclerosis: a molecular perspective. Heart Dis. Stroke, 1994, 3, 52–57.
26. *Palmetshofer A., Robson S.C., Nehls V.*: Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. Thromb. Hemost. 1999, 82, 1532–1537.
27. *Patel S.S. et al.*: Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in Apo-E--deficient mice. Circulation, 1998, 97, 75–81.
28. *Polte T., Newman W., Gopal TV.*: Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Nucleic. Acids Res. 1990, 18, 5901.

29. *Ross R.*: Atherosclerosis – an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999, 340, 115–126.
30. *Selwyn A.P. et al.*: Atherogenic lipids, vascular dysfunction, and clinical signs of ischemic heart disease. Circulation, 1997, 95, 5–7.
31. *Siednienko J., Gorczyca W.A.*: Regulacja aktywności NF-κB. Post. Hig. Med. Dośw. 2003, 57, 19–32.
32. *Topping D.L., Clifton P.M.*: Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol. Rev. 2001, 81, 1031–1064.
33. *Tse C.S., Williams D.M.*: Inhibition of human endothelial cell proliferation in vitro in response to n-butyrate and propionate. J. Periodont. Res. 1992, 27, 506–510.
34. *Weber C. et al.*: Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappaB mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. Arterioscler. Thromb. 1994, 14, 1665–1673.
35. *Wolle J. et al.*: Selective inhibition of tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcription factor NF-kappa B. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1996, 16, 1501–1508.
36. *Yamaguchi M. et al.*: Selective inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by verapamil in human vascular endothelial cells. Transplantation, 1997, 63, 759–764.
37. *Yin L., Laevsky G., Giardina C.*: Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. J. Biol. Chem. 2001, 276, 44641–44646.
38. *Zapolska-Downar D.*: Dysfunkcja komórek śródbłonka jako jeden z czynników patogenetycznych miażdżycy. Normalizujący wpływ niektórych leków. Czyn. Ryz. 2000, 4, 5–15.
39. *Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A.*: Miażdżyca jako przewlekła choroba zapalna. Prz. Lek. 2002, 59, 147–152.

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS, 2005, 51, 127–133
ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE
ANNALS OF THE POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, 2005, 51, 127–133
TOM LI/1 2005 VOLUME LI/1

KATARZYNA GÓRNIK

BADANIA PATOGENNYCH WŁAŚCIWOŚCI WOLNO ŻYJĄCYCH PEŁZAKÓW IZOLOWANYCH Z NATURALNYCH I SZTUCZNYCH KĄPIELISK WOJEWÓDZTWA ZACHODNIOPOMORSKIEGO*

PATHOGENIC PROPERTIES OF FREE-LIVING AMOEBAE ISOLATED FROM NATURAL AND MAN-MADE BATHING SITES IN THE PROVINCE OF WESTERN POMERANIA*

Katedra i Zakładzie Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Kierownik: dr hab. n. med. *Wanda Kuźna-Grygiel*

Summary

Introduction: Pathogenic amoebae belonging to the genus of *Acanthamoeba* and *Naegleria*, as well as species such as *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia diploidea* cause harmful, life-threatening infections in humans and animals. These amoebae commonly occur in the natural environment. Free-living, pathogenic amoebae have hitherto been detected in water reservoirs near Poznań, Gdańsk, and Lublin.

Material and methods: The present work focused on the occurrence of thermophilic amoebae potentially pathogenic to humans. Natural and man-made bathing sites in the province of Western Pomerania were studied. A total of 299 water samples were collected between 2001 and 2003 from 86 sites (indoor swimming pools, seasonal pools, physiotherapy pool, fountains, lakes, ponds, rivers, lagoons, and coastal waters of the Baltic Sea). Amoebae were isolated at 37°C from 223 samples, of which 34 (15.2%) demonstrated thermophilic properties. Tests using thermophilic isolates were carried out on mice through intranasal inoculation. Pathogenic properties and intensity of infection were determined on the basis of re-isolation of amoebae from agar substrates inoculated with fragments of internal organs. Organs of infected mice were examined histologically.

Results: Six isolates exhibited infective properties in mice. Five of them were obtained from two man-made water reservoirs belonging to the recreational complex of the city of Szczecin (AM 17, AM 148, AD 16, AD 148, AD 166). One isolate was from a natural reservoir (JG 172). Amoebae were isolated from the brain, lungs, liver, kidneys, spleen, and heart of the infected animals.

Key words: free-living ameba – *Acanthamoeba* – swimming pools – lakes – therophillic – pathogenicity.

Streszczenie

Wstęp: Celem badań była ocena częstości występowania termofilnych szczepów pełzaków w rekreacyjnych zbiornikach sztucznych i naturalnych województwa zachodniopomorskiego, a także ocena właściwości patogenicznych i stopnia zjadliwości izolatów na podstawie histologicznej oceny narządów zarażonych myszy.

* Zwięzła wersja rozprawy doktorskiej przyjętej przez Radę Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Promotor: dr hab. n. med. *Wanda Kuźna-Grygiel*. Oryginalny maszynopis obejmuje: 89 stron, 30 rycin, 7 tabel, 196 pozycji piśmiennictwa.

* Concise version of doctoral thesis approved by the Council of the Faculty of Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Promotor: *Wanda Kuźna-Grygiel* M.D., D.M.Sc.Habil. Original typescript comprises: 89 pages, 30 figures, 7 tables, 196 references.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły pełzaki izolowane z 299 prób wody pobranych z 86 zbiorników wodnych w 17 powiatach. 34 izolaty (15,2%) wykazywały właściwości termofilne, 6 z nich było inwazyjne dla myszy. Ameby reizolowano z mózgu, płuc, wątroby, nerek, śledziony i serca zarażonych zwierząt.

Wnioski: Więcej izolatów termofilnych pełzaków wolno żyjących występuje w zbiornikach sztucznych w porównaniu z naturalnymi województwa zachodniopomorskiego. Największe ryzyko kontaktu z wirulentnymi szczepami *Acanthamoeba* spp. istnieje w sztucznych kąpieliskach odkrytych, zlokalizowanych na terenie miasta Szczecina. Wyizolowane patogeniczne *Acanthamoeba* spp. wykazują zróżnicowany stopień zjadliwości dla inokulowanych myszy.

H a s ł a: wolno żyjące pełzaki – *Acanthamoeba* – baseny – jeziora – termofilny – patogeniczność.

Wstęp

Pełzaki należące do rodzajów *Acanthamoeba* spp. i *Naegleria* oraz gatunków *Balamuthia mandrillaris* i *Sappinia diploidea* stanowią poważny problem w parazytologii medycznej [1, 2, 3, 4]. Są to organizmy amfizoiczne, ponieważ wykazują intensywny rozwój zarówno w środowisku naturalnym, jak i w tkankach żywiciela. Występują powszechnie w wodzie, w wilgotnej glebie i powietrzu [5, 6], a ich cysty są odporne na wysychanie, zasolenie, chlorowanie, wysoką i niską temperaturę [7, 8, 9]. W temperaturze 4°C zachowują żywotność i właściwości patogeniczne nawet przez 25 lat [10]. Są jednak wrażliwe na działanie pulsującego pola elektrycznego [11], promieniowania ultrafioletowego [12] oraz mikrofali [13].

Inwazje pełzaków amfizoicznych u ludzi wykrywano najczęściej w mózgu, ale również w płucach, wątrobie, nerkach, skórze i gałkach ocznych. *Naegleria fowleri* wywołuje u człowieka pierwotne pełzakowe zapalenie opon mózgowych i mózgu (*primary amoebic meningoencephalitis* – PAM), natomiast patogeniczne szczepy *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* i *Sappinia diploidea* wywołują ziarniniakowe pełzakowe zapalenia mózgu (*granulomatous amebic encephalitis* – GAE). Dodatkowo gatunki *Acanthamoeba* wywołują pełzakowe zapalenie rogówki *(acanthamoeba keratitis),* głównie u osób noszących szkła kontaktowe [14, 15, 16]. Wrotami inwazji dla pełzaków amfizoicznych jest najczęściej jama nosowa. Dodatkowym miejscem wnikania pełzaków jest również błona śluzowa jamy ustnej, uszkodzona lub wrzodziejąca skóra, zmiany w układzie oddechowym oraz śluzówka jelita [9, 17, 18, 19].

Według dotychczasowych badań, właściwości patogeniczne ameb korelują z tolerancją wysokich temperatur. Pełzaki izolowane pośmiertnie z narządów zarażonych ludzi i zwierząt wykazywały zawsze zdolność do wzrostu w temperaturze 42–45°C. Należy podkreślić, że obok szczepów patogenicznych wykazujących właściwości termofilne występują w środowisku szczepy niepatogeniczne o podobnych preferencjach temperaturowych [20, 21]. Jedynie sporadycznie szczepy nietermofilne mogą wykazywać właściwości chorobotwórcze, jak np. szczep wyizolowany z rogówki pacjenta przez *Matias i wsp.* [22].

Badania środowiskowe dotyczące występowania pełzaków termofilnych, patogenicznych dla myszy prowadzono w Polsce tylko w okolicach Poznania, Gdańska i Lublina [21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]. Z uwagi na brak danych dotyczących występowania ameb amfizoicznych w zbiornikach wodnych województwa zachodniopomorskiego celem moich badań była:

1. Ocena częstości występowania termofilnych, potencjalnie wirulentnych szczepów pełzaków w zbiornikach sztucznych oraz w naturalnych zbiornikach pełniących rolę sportowo-rekreacyjną;
2. Ocena właściwości patogenicznych i stopnia zjadliwości wyizolowanych szczepów termofilnych na podstawie histologicznej oceny narządów zarażonych myszy.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły pełzaki izolowane z prób wody pobranych z 30 sztucznych zbiorników wodnych (tab. 1) i z 56 naturalnych (tab. 2) służących celom sportowo-rekreacyjnym, zlokalizowanych w 17 powiatach województwa zachodniopomorskiego. Próby wody do badań pobierano do jednorazowych jałowych 1l pojemników plastikowych. Wodę ze zbiorników naturalnych pobierano od lutego do końca sierpnia 2002 i 2003 roku. Próby wody ze zbiorników sztucznych, tj. kąpielisk odkrytych i fontann pobierano od maja do września; natomiast z pływalni krytych niezależnie od pory roku w tych samych latach. Wodę z basenów i fontann pobierano wraz z osadem ze ścian, krat wylotowych oraz z dna. Temperatura wody wynosiła w basenach krytych 27–33°C, natomiast w basenach odkrytych 27–30°C. Stężenie chloru wynosiło 0,3–0,5 µg/mL. W jednym basenie krytym (pływalnia nr 6) woda jest dodatkowo uzdatniana ozonem (0,1 mg O_3/dm^3). Wodę z jezior, stawów i nabrzeży Bałtyku pozyskiwano wraz z mułem w stosunku 1:1.

Zebrane próby wody filtrowano. Sączki wraz z osadem umieszczano na powierzchni pożywki agarowej (NN agar) w szalkach Petriego i inkubowano w temperaturze 37°C. Identyfikację pełzaków do rodzaju prowadzono w oparciu o test flagellacji, budowę oraz wielkość trofozoitów i cyst. W celu izolacji pełzaków termofilnych, potencjalnie patogenicznych dla ludzi i zwierząt, wykonano test tolerancji termicznej, inkubując hodowle w 42°C.

Inwazyjność pełzaków oceniano na podstawie zdolności zarażania myszy doświadczalnych i określano jako stosunek liczby zwierząt zarażonych (obecność pełzaków w tkankach) do liczby zwierząt inokulowanych. Każdy termofilny szczep ameb testowano na 3 myszach szczepu Swiss, pochodzących z jednego miotu, w wieku około 2 tygodni i wadze

Tabela 1. **Wykaz zbiorników sztucznych objętych badaniami i ich lokalizacja**

Table 1. **The list of man-made bathing sites and location of them**

Miejscowość / Place	Lp.	Rodzaj zbiornika – Lokalizacja / Type of reservoir – Location
Szczecin	1.	Pływalnia nr 1/k Zespół Szkół Ogólnokszt nr 3
	2.	Pływalnia nr 2/k Szkoła Podstawowa nr 6
	3.	Pływalnia nr 3/k Szkoła Podstawowa nr 51
	4.	Pływalnia nr 4/k Szkoła Podstawowa nr 30
	5.	Pływalnia nr 5/k Szkoła Podstawowa nr 10
	6.	Pływalnia nr 6/k Wyższa Szkoła Morska
	7.	Pływalnia nr 7/k Liceum Ogólnokszt. nr 1
	8.	Pływalnia nr 8/k Szczeciński Dom Sportu duży
	9.	Pływalnia nr 9/k Szczeciński Dom Sportu mały
	10.	Pływalnia nr 10k Zespół Szkół Ogólnokszt nr 8
	11.	Pływalnia nr 11/k Hotel „Radisson”
	12.	Kąpielisko rekreacyjne nr 1/o „Arkona” mały
	13.	Kąpielisko rekreacyjne nr 2/o „Arkona” duży
	14.	Pływalnia nr 12/o Szczeciński Dom Sportu
	15.	Fontanna nr 1 Al. Niepodległości
	16.	Fontanna nr 2 Wały Chrobrego
	17.	Fontanna nr 3 Park Kasprowicza
	18.	Fontanna nr 4 Plac Tobrucki
Choszczno	19.	Pływalnia nr 1/k „Wodny Raj” – rekreacyjny
	20.	Pływalnia nr 2/k „Wodny Raj” – sportowy
Gryfino	21.	Pływalnia nr 1/k Centrum Wodne „Laguna”
Myślibórz	22.	Pływalnia nr 1/k Szkoła podstawowa nr 2
Połczyn Zdrój	23.	Pływalnia nr 1/o Zakład Lecznictwa Uzdrowiskowego „Gryf”
	24.	Basen rehabilitacyjny Zakład Lecznictwa Uzdrowiskowego „Gryf”
Pyrzyce	25.	Fontanna nr 1 miejska przy ul. 1 Maja
Świdwin	26.	Pływalnia nr 1/k Park Wodny „Relax”
Stargard Szczeciński	27.	Pływalnia nr 1/k Szkoła Podstawowa nr 5
	28.	Pływalnia nr 2/k Gimnazjum nr 4
Wałcz	29.	Pływalnia nr 1/k „Puls”
Koszalin	30.	Pływalnia nr 1/k Motel „Trawa” Stare Bielice

k – pływalnia kryta / indoor swimming-pool; o – pływalnia odkryta / open-air swimming pool

12–15 g. Myszy zarażano poprzez donosową inokulację 3 µL zawiesiny zawierającej 10–20 tys. pełzaków. Sekcji poddane zostały myszy po upływie 3 do 30 dni po inokulacji (dpi), w zależności od wystąpienia objawów inwazji (brak ruchliwości, osowiałość lub bezcelowe kręcenie się w kółko, zmierzwiona sierść, brak łaknienia prowadzący do odwodnienia i wychudzenia). Zwierzęta sekcjonowano po dootrzewnowym podaniu usypiającej dawki pentobarbitanu (Morbital – 2 mL/kg mc.). Z uśpionych zwierząt pobierano jałowo fragmenty mózgu, płuc, wątroby, nerek, śledziony i serca, które posiewano na podłoże agarowe w 42°C. Jednocześnie do badań histologicznych pobierano wycinki tych samych narządów i sporządzono preparaty barwione hematoksyliną i eozyną.

Wyniki

W latach 2001 – 2003 z 86 stanowisk pobrano łącznie 299 prób wody. Ze zbiorników sztucznych (37% ogółu

Tabela 2. **Wykaz naturalnych zbiorników wodnych objętych badaniami i ich lokalizacja**

Table 2. **The list of natural bathing sites and location of them**

Powiat / Province	Miejscowość / Place	Lp.	Rodzaj zbiornika / Type of bathing site
Szczecin	Szczecin	1.	J. Dąbie – kąpielisko
		2.	J. Dąbie – przystań harcerska
		3.	J. Rusałka
		4.	J. Szmaragdowe
		5.	J. Głębokie
		6.	J. Goplana
		7.	Kąpielisko Dziewoklicz
		8.	Staw Uroczysko
		9.	Staw na os. Bukowym
		10.	Rzeka Regalica
		11.	Kanał rzeczny przy Elektrowni Pomorzany
Stargardzki	Morzyczyn	12.	J. Miedwie
	Chociwel	13.	J. Starzyć (Chociwelskie)
	Ińsko	14.	J. Ińsko
	Cieszyno	15.	J. Woświn
Myśliborski	Myślibórz	16.	J. Myśliborskie – plaża miejska
		17.	J. Myśliborskie – „wieża”
		18.	J. Królewskie
	Barlinek	19.	J. Barlineckie
	Dębno	20.	J. Lipowo
	Kinice	21.	J. Karskie Wielkie
Pyrzycki	Lipiany	22.	J. Wądół
	Chabówko	23.	J. Będgoszcz
Gryfiński	Trzcińsko Zdrój	24.	J. Trzcińskie
	Strzeszów	25.	J. Strzeszewskie
	Banie	26.	J. Długie
Policki	Bartoszewo	27.	J. Bartoszewo
Kamieński	Kamień Pomorski	28.	Zalew Kamieński
	Wolin	29.	Zalew Szczeciński
	Międzywodzie	30.	Bałtyk – Nabrzeże nr 1
	Dziwnów	31.	Bałtyk – Nabrzeże nr 2
	Dziwnówek	32.	Bałtyk – Nabrzeże nr 3
	Wisełka	33.	Bałtyk – Nabrzeże nr 4
	Międzyzdroje	34.	Bałtyk – Nabrzeże nr 5
	Łukęcin	35.	Bałtyk – Nabrzeże nr 6
	Pobierowo	36.	Bałtyk – Nabrzeże nr 7
Świnoujście	Świnoujście	37.	Bałtyk – Nabrzeże nr 8
Goleniowski	Maciejewo	38.	J. Lechickie
Łobeski	Węgorzyno	39.	J. Węgorzyno
Drawski	Złocieniec	40.	J. Dłusko
	Czaplinek	41.	J. Czaplino
	Ciemino	42.	J. Ciemino
	Drawsko Pom.	43.	J. Lubie
	Siecino	44.	J. Siecino
	Cieszyno	45.	J. Morzysław
	Jankowo	46.	J. Jankowo
	Rakowo	47.	J. Rakowo Duże
		48.	J. Rakowo Małe
Choszczeński	Choszczno	49.	J. Klukom
	Pełczyce	50.	J. Pełcz Wlkp.
Kołobrzeski	Kołobrzeg	51.	Bałtyk – Nabrzeże nr 9
	Ustronie Morskie	52.	Bałtyk – Nabrzeże nr 10
Gryficki	Niechorze	53.	Bałtyk – Nabrzeże nr 11
	Trzebiatów	54.	Bałtyk – Nabrzeże nr 12
	Pogorzelica	55.	Bałtyk – Nabrzeże nr 13
	Rewal	56.	Bałtyk – Nabrzeże nr 14

stanowisk) pobrano 112 prób wody, a ze zbiorników naturalnych (63% wszystkich stanowisk) – 187 prób. Ze wszystkich pobranych prób wody, w temperaturze 37°C, uzyskano łącznie 223 izolaty wolno żyjących ameb, spośród których 34 (15,2%) wykazywały właściwości termofilne (tab. 3).

Tabela 3. **Porównanie wyników izolacji wolno żyjących pełzaków ze sztucznych i naturalnych zbiorników wodnych województwa zachodniopomorskiego**

Table 3. **The comparison of the results of free-living amoebae isolation from natural and man-made bathing sites of the Western Pomerania Voivodship**

Rodzaj zbiorników / Type of reservoir	Liczba stanowisk / Number of spots	Liczba prób wody / Number of water samples	Liczba izolatów / Number of strains			
			ogółem / total		termofilnych / termophilic	
			n	%	n	%
Sztuczne / Artificial	30	112	88	78,5	17	19,3
Naturalne / Natural	56	187	135	72,2	17	12,6
Ogółem / Total	86	299	223	74,6	34	15,2

W tabeli 4 przedstawiono wyniki izolacji pełzaków ze zbiorników sztucznych zlokalizowanych w obrębie 9 powiatów województwa. Z basenów krytych wyizolowano w 37°C więcej ameb w porównaniu z kąpieliskami otwartymi oraz fontannami i różnice te były statystycznie istotne ($p = 0,05$). Porównując jednak liczbę izolatów termofilnych z poszczególnych rodzajów zbiorników, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy ($p > 0,05$).

Tabela 4. **Wyniki izolacji ameb wolno żyjących ze sztucznych zbiorników wodnych województwa zachodniopomorskiego**

Table 4. **The results of free-living amoebae isolation from man-made bathing sites of the Western Pomerania Voivodship**

Rodzaj zbiornika / Type of bathing site	Liczba stanowisk / Number of spots	Liczba prób wody / Number of water sample	Liczba izolatów / Number of strains			
			ogółem / total		termofilnych / termophilic	
			n	%	n	%
Pływalnie kryte / Indoor swimming-pool	20	72	49*	68,0	8	16,0
Pływalnie odkryte / Open-air swimming pool	4	12	12	100,0	6	50,0
Basen rehabilitacyjny / Bath for rehabilitation	1	2	2	100,0	1	50,0
Fontanny / Fountains	5	26	25	96,0	2	8,0
Ogółem / Total	30	112	88	78,5	17	19,3

Wyniki izolacji pełzaków ze zbiorników naturalnych znajdujących się na terenie 14 powiatów ilustruje tabela 5. Najwięcej prób wody pochodziło z jezior, 12,5% stanowiły pełzaki termofilne. Z wybrzeża Bałtyku pobrano do badań 34 próby wody, z których tylko 3 (11,1%) wzrastały w temp. 42°C. Jednak już po pierwszym pasażu obserwowano fragmentację i rozpad trofozoitów najprawdopodobniej z powodu krystalizującej się w ich cytoplazmie soli mor-

Tabela 5. **Wyniki izolacji ameb wolno żyjących ze zbiorników naturalnych województwa zachodniopomorskiego**

Table 5. **The results of free-living amoebae isolation from natural bathing sites of the Western Pomerania Voivodship**

Rodzaj zbiornika / Type of reservoir	Liczba stanowisk / Number of spots	Liczba prób wody / Number of water samples	Liczba izolatów / Number of strains			
			ogółem / total		termofilnych / termophilic	
			n	%	n	%
Jeziora / Lakes	36	139	96	69	12	12,5
Stawy / Ponds	2	5	4	80	0	0,0
Rzeki / Rivers	2	3	3	100	1	33,3
Zalewy / Reservoirs	2	6	5	83	1	20,0
Nabrzeża morskie / Sea coasts	14	34	27	79	3	11,1
Ogółem / Total	56	187	135	72	17	12,6

skiej. Analizując dane liczbowe z tabeli 5 nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ilości izolatów, w tym również termofilnych z poszczególnych typów stanowisk ($p > 0,05$).

Nie wykazano zależności liczby izolatów wolno żyjących ameb od temperatury wody. Termofilne izolaty pochodziły z wody pobranej zarówno w miesiącach zimowych (2–5°C) jak i letnich (21–29°C), natomiast izolaty o właściwościach patogenicznych miesiącach wody pozyskiwanej w miesiącach letnich.

Testy biologiczne

Testom poddano 29 izolatów, które wykazywały umiarkowany lub intensywny wzrost w temp. 42°C. Pozostałe hodowle były zakażone grzybami. Na podstawie negatywnego testu flagellacji, oceny mikroskopowej budowy trofozoitów i cyst izolaty ameb termofilnych zakla-

Tabela 6. **Właściwości inwazyjne szczepów *Acanthamoeba* spp.**

Table 6. **The virulent properties of *Acanthamoeba* spp. strains**

Szczep / Strain	n	dpi	Liczba zarażonych myszy i intensywność zarażenia narządów / Number of infected mice and intensity of the organs infection											
			mózg / brain		płuca / lung		wątroba / liver		nerka / kidney		śledziona / spleen		serce / heart	
			n	i	n	i	n	i	n	i	n	i	n	i
AM 17	3	3	3	+++	3	+	-	-	3	+	2	+	2	+
AM 148	3	14	3	+	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AD 16	3	3	3	+	3	++	2	+	2	+	2	++	2	+
AD 148	1	14	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AD 166	3	14	3	+	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JG 172	3	7	2	+	3	++	3	+	3	+	1	+	-	-

n – liczba myszy zarażonych / number of infected mice, i – intensywność zarażenia w skali 0–3 / intensity of infection in scale 0–3, (-) – brak inwazji u myszy / lack infection in mice, dpi – dni po zarażeniu / days post infection

syfikowano do rodzaju *Acanthamoeba*. Pozytywny wynik testu inwazyjności poszczególnych izolatów termofilnych stwierdzano na podstawie obecności ameb w posiewanych fragmentach narządów na pożywce agarowej. Spośród 29 testowanych izolatów 6 wykazywało właściwości inwazyjne dla myszy. Przy czym 5: AM 17, AM 148, AD 16, AD 148, AD 166 pochodziły z dwóch kąpielisk otwartych należących do kompleksu rekreacyjnego „Arkonka" zlokalizowanego na terenie miasta Szczecina. Z naturalnych zbiorników wyizolowano tylko jeden patogeniczny izolat JG 172, pochodzący z Jeziora Goplana, zlokalizowanego w Szczecinie. W przypadku izolatów OR 254, JB 278, JST 208, EP 108, obserwowano zmiany w wyglądzie i w zachowaniu zarażonych myszy, jednak nie stwierdzono obecności pełzaków w ich narządach.

Wyniki badań właściwości inwazyjnych ameb izolowanych z narządów zarażonych myszy przedstawiono w tabeli 6. Największy stopień inwazyjności wykazywały dwa izolaty: AD 16 i AM 17, ponieważ u wszystkich inokulowanych nim myszy zarażone były mózg i płuca, a u dwóch zwierząt pozostałe badane narządy. Najmniejszą inwazyjnością cechował się AD 148, ponieważ tylko u jednej myszy stwierdzono inwazję mózgu.

Badania histologiczne

U zwierząt kontrolnych płuca, mózg, wątroba, nerki, serce i śledziona wykazywały prawidłową budowę histologiczną.

Mózg

Makroskopowo półkule mózgowe inokulowanych zwierząt wykazywały obrzęk i silne przekrwienie. W obrazie mikroskopowym w rejonie opon mózgowych jak i kory mózgu zarażonych myszy stwierdzano krwawe wybroczyny (ryc. 1), uszkodzenie śródbłonka oraz rozwarstwienie naczyń żylnych i tętniczych. W powierzchniowej warstwie kory obserwowano ogniska martwicy, niektórym towarzyszyły nacieki zapalne. Stwierdzano również odwarstwienie opon od części korowej półkul mózgowych, głównie w rejonie płatów czołowych. W preparatach histologicznych, pod oponami, obserwowano obecność licznych trofozoitów, którym towarzyszyły neutrofile, makrofagi, komórki plazmatyczne oraz pojedyncze wielojądrzaste komórki olbrzymie (ryc. 2). Pojedynczym trofozoitom oraz cystom nigdy nie towarzyszył odczyn zapalny (ryc. 1). U zwierząt sekcjonowanych 3 dpi. zmiany histopatologiczne mózgu były bardziej rozległe w porównaniu z myszami sekcjonowanymi 14 dpi.

Płuca

W płucach zarażonych zwierząt stwierdzano zmiany makroskopowe i mikroskopowe, których nasilenie zależało od czasu trwania inwazji. W preparatach histologicznych obecność pełzaków stwierdzano w pęcherzykach płucnych (ryc. 3), w przestrzeniach okołonaczyniowych, jak również w ścianie oraz w świetle oskrzeli i oskrzelików. Obserwowano uszkodzenia ściany naczyń i krwawe wybroczyny do miąższu i światła pęcherzyków płucnych. W oskrzelach i oskrzelikach wszystkich zarażonych myszy obserwowano hiperplazję i metaplazję nabłonka, prowadzące do znacznego zwężenia ich światła (ryc. 4). Zmiany martwicze, pogrubienie ścian pęcherzyków, rozległe śródmiąższowe zapalenie płuc obserwowano u myszy, u których inwazja trwała 14 dni.

Wątroba

W wątrobie zarażonych myszy stwierdzano krwawe wybroczyny (ryc 5). W rejonie obszarów martwiczych obserwowano pojedyncze lub liczne trofozoity. Stwierdzano zatarcie beleczkowej architektoniki, obecność małych ognisk zapalnych oraz wzmożoną aktywność komórek Browicza–Kupffera, a wokół naczyń i zatok nacieki zapalne.

Nerki

W nerkach myszy, inokulowanych izolatami AM 17 i AD 16 (sekcja 3 dpi), występowały krwawe wybroczyny i niewielkie ogniska zapalne (ryc. 6), natomiast u zwierząt inokulowanych izolatem JG 172 (sekcja 7 dpi) stwierdzono rozległe zmiany nekrotyczne kanalików i kłębuszków nerkowych. W nerkach myszy, z których nie reizolowano ameb, odnotowano jedynie drobne ogniska zapalne w części korowej.

Śledziona

Stwierdzono rozrost miazgi białej, natomiast w obszarze miazgi czerwonej zwiększoną ilość makrofagów (ryc. 7).

Serce

Obserwowano rozległe krwawe wybroczyny w ubytkach tkanki mięśniowej oraz drobne nacieki zapalne (ryc. 8).

W preparatach nerek, śledziony i serca zarażonych myszy nie stwierdzano obecności trofozoitów i cyst.

Dyskusja

Od czasu opisania u ludzi pierwszych przypadków inwazji ameb amfizoicznych prowadzone są intensywne badania nad ich występowaniem w naturalnym środowisku. W najbliższym sąsiedztwie Polski śmiertelne inwazje u młodych osób, których czynnikiem etiologicznym były amfizoiczne pełzaki *Naegleria fowleri,* zdiagnozowano w byłej Czechosłowacji, w Usti nad Łabą [31]. Ponieważ w opisywanych inwazjach u ludzi źródłem zarażenia był najczęściej bezpośredni kontakt z wodą, badaniami środowiskowymi objęto przede wszystkim baseny i jeziora służące celom sportowo-rekreacyjnym [32, 33, 34, 35, 36]. W Polsce badania nad występowaniem pełzaków amfizoicznych w środowisku naturalnym były prowadzone w okolicach Poznania [21, 23, 25, 29], Lublina [27, 28, 29] i Gdańska [26]. W tych regionach autorzy wykrywali szczepy patogeniczne *Acanthamoeba* spp. i *Naegleria fowleri,* zarówno w naturalnych, jak i sztucznych zbiornikach.

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają powszechność występowania w środowisku wolnym pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Spośród szczepów, które wyizolowano

z pobranych 299 prób wody, 15,2% wykazywało właściwości termofilne. Jak wiadomo, z wielu badań szczepy tolerujące wysokie temperatury mogą wykazywać właściwości patogeniczne. Wydaje się, że zdolność wzrostu w temperaturze powyżej 40°C ma związek z adaptacją do organizmu zarażanego żywiciela.

Z pływalni krytych, o temperaturze wody od 27°C do 30°C, wyizolowano najwięcej ameb, wśród których był też najwyższy odsetek termofilnych izolatów *Acanthamoeba* spp. Dane te potwierdzają pogląd innych autorów, według których podgrzewana woda sprzyja rozmnażaniu się szczepów termofilnych, potencjalnie patogenicznych dla człowieka. Chociaż jak wykazały badania *Mazura i wsp.* [10], w temperaturze 4°C cysty *Acanthamoeba* nie tracą żywotności i właściwości wirulentnych nawet przez 25 lat. W przebadanych pływalniach krytych nie stwierdzono obecności szczepów wirulentnych, chociaż w pływalniach innych krajów takie szczepy były wykrywane [37, 38, 39]. Pozytywne wyniki izolowania pełzaków z pływalni świadczą, że chlorowanie wody w ilości dopuszczalnej dla zdrowia człowieka nie niszczy wszechobecnych wolno żyjących pełzaków. Według *Rivera i wsp.* [39], dopiero stężenie chloru w wodzie powyżej 1,5 mg/L skutecznie niszczy formy przetrwalnikowe ameb. *Griffin* [40] sugeruje, że podgrzewanie i chlorowanie wody eliminuje inne konkurencyjne mikroorganizmy, co stwarza lepsze warunki dla rozwoju odpornych na te czynniki pełzaków. *Rivera i wsp.* [12] podkreślają też wyjątkowo wysoką odporność cyst *Acanthamoeba* na promienie ultrafioletowe.

W pływalniach województwa zachodniopomorskiego wyhodowano izolaty należące wyłącznie do rodzaju *Acanthamoeba,* co koresponduje z wynikami podobnych badań przeprowadzonych w niektórych krajach europejskich. Z pływalni krytych na terenie Niemiec i Belgii autorzy izolowali patogeniczne szczepy należące jedynie do *Acanthamoeba* spp [37, 41]. Szczepy *Naegleria fowleri* izolowano w pływalniach Szwecji i w Czechach [32, 33].

Wyniki moich badań świadczą, że większe prawdopodobieństwo kontaktu człowieka ze szczepami patogenicznymi istnieje w basenach odkrytych. Z tego typu basenów, zlokalizowanych na terenie miasta Szczecina, wyhodowano pięć izolatów *Acanthamoeba* patogenicznych dla myszy. Podobnie Rivera i wsp. [38] izolowali patogeniczne *Acanthamoeba* jedynie z prób wody z basenów odkrytych w Meksyku. Czynnikiem sprzyjającym obecności szczepów zjadliwych w basenach otwartych mogą być opady atmosferyczne oraz zanieczyszczenia organiczne nanoszone przez ludzi i wiatr z gruntu otaczającego pływalnie [12]. Ponadto ameby zatrzymują się na filtrach i szczelinach ścian basenów, gdzie proliferują zwiększając liczebność swojej populacji [42].

W obecnych badaniach wodę ze zbiorników naturalnych pobierano głównie z miejsc bardzo często uczęszczanych przez ludzi w celach rekreacyjnych. Izolaty termofilne uzyskano z prób pobieranych zarówno w miesiącach zimowych (2–5°C), jak i letnich (21–29°C), co potwierdza pogląd *Mazura* [21] a także *Browna* i *Cursonsa* [43], według których pora roku nie ma bezpośredniego związku z liczbą izolowanych szczepów zjadliwych.

W prezentowanych badaniach wyhodowano z prób wody z Bałtyku 2 termofilne izolaty ameb nie wirulentnych dla myszy. Nie można jednak wykluczyć występowania chorobotwórczych ameb w wodzie słonej, ponieważ wcześniej z osadów oceanicznych szczepy patogeniczne były izolowane przez *Sawyer i wsp.* [44].

W obecnej pracy, spośród 34 izolatów termofilnych 6 (17,6%) wykazywało właściwości patogeniczne dla myszy, o różnym stopniu zjadliwości. Wszystkie wywoływały inwazję mózgu. Obecność pełzaków w płucach, wątrobie, nerkach, śledzionie i sercu należy uznać jako wtórne. Inni autorzy [24, 45] wskazują również najczęściej na mózg jako pierwotne miejsce inwazji przy inokulacji donosowej. Jak wykazały doświadczenia tych samych autorów, niektóre szczepy patogenicznych ameb mają większe powinowactwo do płuc i nie powodują inwazji mózgu. Według niektórych autorów, nasilenie zmian histopatologicznych zarażonych narządów zależy od zjadliwości szczepu [46], a według innych od czasu trwania inwazji [28]. Wyniki obecnych badań wskazują na zależność nasilenia zmian w mózgu od zjadliwości szczepu. Największą zjadliwością cechowały się izolaty AD 16 i AM 17, ponieważ inwazja u myszy trwała tylko 3 dni, a zmiany histopatologiczne były bardzo rozległe. Nasilenie zmian w płucach zależało od czasu trwania inwazji. Śródmiąższowe zapalenie płuc obejmowało całe płuca u myszy, u których inwazja trwała 14 dni.

Do najczęstszych zmian mikroskopowych obserwowanych w narządach zarażonych zwierząt należały krwawe wylewy jako następstwo uszkodzenia i przerwania ciągłości ściany naczyń, co podkreślali w swoich badaniach także inni autorzy [27, 28, 45, 47].

Chociaż w porównaniu z innymi regionami, ze zbiorników województwa zachodniopomorskiego wyizolowano stosunkowo niewiele patogenicznych ameb, to jednak wyniki niniejszych badań świadczą o istnieniu ryzyka zarażenia się nimi. Nie można też całkowicie wykluczyć obecności ameb amfizoicznych także w zbiornikach, z których nie wyhodowano pełzaków chorobotwórczych, ponieważ ich obecność zależy od wielu czynników środowiskowych.

Wnioski

1. Więcej izolatów termofilnych pełzaków wolno żyjących występuje w zbiornikach sztucznych w porównaniu z naturalnymi województwa zachodniopomorskiego.

2. Największe ryzyko kontaktu z wirulentnymi szczepami *Acanthamoeba* spp. istnieje w sztucznych kąpieliskach odkrytych, zlokalizowanych na terenie miasta Szczecina.

3. Wyizolowane patogeniczne *Acanthamoeba* spp. wykazują zróżnicowany stopień zjadliwości dla inokulowanych myszy.

Piśmiennictwo

1. *Gelman B.B. et al.*: Amoebic encephalitis due to Sappinia diploidea. JAMA. 2001, 285, 2450–2451.
2. *Martinez A.J., Visvesvara G.S.*: Balamuthia mandrillaris infection. J. Med. Microbiol. 2001, 50, 205–207.
3. *Gelman B.B. et al.*: Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by Sappinia diploidea. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2003, 62, 990–998.
4. *Marciano-Cabral F., Cabral G.*: Acanthamoeba spp. as agents of diesease in humans. Clin. Microbiol. Rev. 2003, 16, 273–307.
5. *Rivera F. et al.*: Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. Environ. Res. 1984, 33, 428–440.
6. *Rodriguez-Zaragoza S.*: Ecology of free-living amoebae. Crit. Rev. Microbiol. 1994, 20, 225–241.
7. *De Jonckheere J.F., Van de Voorde H.*: Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 1976, 31, 294–297.
8. *Gupta S., Das S.R.*: Stock cultures of free-living amebas: effect of temperature on viability and pathogenicity. J. Parasitol. 1999, 85, 137–139.
9. *Schuster F.L.*: Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 342–354.
10. *Mazur T., Hadaś E., Iwanicka I.*: The duration of cyst stage and the viability and virulence of Acanthamoeba isolates. Trop. Med. Parasitol. 1995, 46, 106–108.
11. *Vernhes M.C. et al.*: Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. Water Res. 2002, 36, 3429–3438.
12. *Rivera F. et al.*: Pathogenic Acanthamoeba isolated during an atmospheric survey in Mexico City. Rev. Infect Dis. 1991, 13, Suppl. 5, 388–389.
13. *Hiti K. et al.*: Microwave treatment of contact lens cases contaminated with Acanthamoeba. Cornea, 2001, 20, 467–470.
14. *Lang G.E., von Heimburg-Elliger A.*: Acanthamöben-keratitis bei trägerin harter kontktlinsen. Klein. Mbl. Augenheilk. 1991, 198, 290–294.
15. *Dougherty P.J. et al.*: Acanthamoeba sclerokeratitis. Am. J. Ophthalmol. 1994, 117, 475–479.
16. *Singh S., Sachdeva M.P.*: Acanthamoeba keratitis. BMJ, 1994, 309, 273.
17. *Martinez A.J., Kasprzak W.*: Patogenne pełzaki wolno żyjące – przegląd. Wiad. Parazytol. 1980, 26, 495–522.
18. *Visvesvara G.S., Schuster F.L., Martinez A.J.*: Balamuthia mandrillaris, N. G., N. sp., Agent of amebic meninoencephalitis in humans and other animals. J. Euk. Microbiol. 1993, 40, 504–514.
19. *Sadaka H.A., Emam E.E.*: Is the intestinal tract a portal of entry for Acanthamoeba infection? J. Egypt. Soc. Parasitol. 2001, 31, 781–790.
20. *Schuster F.L.*: Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 342–354.
21. *Stevens A.R., De Jonckheere J.F., Willaert E.*: Naegleria lovaniensis new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with Naegleria fowleri. Int. J. Parasitol. 1980, 10, 51–64.
22. *Mazur T.*: Występowanie Naegleria fowleri w środowisku wolnym i właściwości biologiczne izolowanych szczepów. Wiad. Parazytol. 1984, 1, 3–35.
23. *Matias R. et al.*: Species identification and characterization of an Acanthamoeba strain from human cornea. Parasitol. Res. 1991, 77, 469–474.
24. *Kasprzak W., Mazur T.*: Free-living amoeba isolated from waters frequented by people in vicinity of Poznań, Poland. Experimental studies in mice on the pathognicity of the isolates. Z. Tropenmed. Parasitol. 1972, 23, 391–398.
25. *Kasprzak W.*: Występowanie wolno żyjących potencjalnie patogennych pełzaków w środowiskach naturalnych. Wiad. Parazytol. 1974, 2–3, 244–246.
26. *Kasprzak W., Mazur T., Červa L.*: Naegleria fowleri in thermally polluted waters. Folia Parasitol. (Praha), 1982, 29, 211–218.
27. *Befinger M., Myjak P., Pietkiewicz H.*: Occurence of amphizoic amoebae in lake Żarnowieckie. Bull. Inst. Mar. Trop. Med. 1986, 37, 275–286.
28. *Gieryng H., Gieryng R.*: Zmiany histologiczne w mózgu myszy wywołane doświadczalnym zarażaniem pełzakami z grupy limax. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, 1987, Sectio D, 42, 103–109.
29. *Gieryng H., Gieryng R., Piróg Z.*: Zmiany histologiczne w płucach myszy wywołane doświadczalnym zarażaniem pełzakami z grupy „limax". Wiad. Parazytol. 1993, 39, 367–372.
30. *Mazur T., Jóźwiak M.*: Pozamózgowe inwazje Acanthamoeba spp. u myszy. Wiad. Parazytol. 1993, 39, 357–366.
31. *Toczołowski J. et al.*: Zakażenie pełzakami z rodzaju Acanthamoeba w pływalniach i jeziorach Lubelszczyzny u osób stosujących soczewki kontaktowe. Klin. Ocz. 2000, 102, 207–208.
32. *Červa L., Novak K.*: Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. Science, 1968, 160, 92.
33. *Červa L., Huldt G.*: Limax amoebae in five swimming pools in Stockholm. Folia Parasitol. Praha, 1974, 21, 71–75.
34. *Kadlec V., Červa L., Škvarova J.*: Virulent Naegleria fowleri in an indoor swimming pool. Science, 1978, 201, 1025.
35. *Kadlec V. et al.*: Virulent Naegleria fowleri in indoor swimming pool. Folia Parasitol. Praha, 1980, 27, 11–17.
36. *Visvesvara G.S., Stehr-Green J.K.*: Epidemiology of free-living ameba infections. J. Protozool. 1990, 37, 25–33.
37. *Shenoy S. et al.*: Primary meningoencephalitis by Naegleria fowleri: first reported case from Mangalore, South India. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 309–310.
38. *Kuhlencord A., Mergerian H., Bommer W.*: Studies on the pathogenesis of Acanthamoeba – associated meningoencephalitis. Zentralbl. Bakteriol. 1989, 271, 256–260.
39. *Rivera F. et al.*: A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. Environ Res. 1983, 32, 205–211
40. *Rivera F. et al.*: Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. Environ. Res. 1993, 62, 43–52.
41. *Griffin J.L.*: Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. Science, 1972, 178, 869–870.
42. *De Jonckheere J.F.*: Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 1979, 130B, 205–212.
43. *Vesaluoma M. et al.*: Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? Br. J. Ophthalmol. 1995, 79, 178–181.
44. *Brown J.T., Cursons R.T.M.*: Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. Scand. J. Infect. Dis. 1977, 9, 237–240.
45. *Sawyer T.K., Visvesvara G.S., Harke A.B.*: Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of Acanthamoeba hatchetti, n. sp. Science, 1977, 196, 1324–1325.
46. *Mazur T. et al.*: Secondary amoebic eye infections in mice due to Acanthamoeba sp. Parasitol Res. 1999, 85, 776–778.
47. *Rucka A.*: Obraz zmian histopatologicznych mózgowia i płuc myszy zarażonych patogennymi pełzakami wolnożyjącymi. Wiad. Parazytol. 1974, 20, 247–250.
48. *Martinez A.J.*: Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba. Rev. Infect. Dis. 1991, 13, Suppl. 5, 399–402.

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University is a scientific periodical regularly published since 1951. *Annals* content is covered by all major abstracting and indexing services, including Index Medicus (Medline), Biological Abstracts, and Chemical Abstracts, and is accessible in more than 150 national and foreign libraries.

Annals accepts original articles, reviews, and case reports relevant to basic sciences, clinical research, and medical humanities, by authors at the Pomeranian Medical University, as well as at other national and foreign centres.

Papers in Polish or English should be submitted in line with the Notice to Contributors. Each volume consists of three parts: (1) original articles, concise doctoral theses, reviews, etc.; (2) chronicle of the Pomeranian Medical University for the past year with the inaugural address by the Rector opening the current academic year; and (3) list of departments and annual bibliography of the University.

As of volume 50, changes have been introduced into the Notice to Contributors.

NOTICE TO CONTRIBUTORS*

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University

Annales Academiae Medicae Stetinensis – Annals of the Pomeranian Medical University accepts original articles in all fields of medicine, including those being too extensive to be published in specialized periodicals.

The typescript should not exceed 20–25 pages of A4 size paper, inclusive of figures, tables, legends, references cited (limited to a minimum), and abstracts.

The article in Polish or English is to be typed on white paper, without highlighting. Only one side of the sheet is to be typed on, the other side is to remain empty. A 12-point font and double spacing are to be used throughout. Pages should be numbered consecutively starting with the title page and placing the number in the bottom right corner of every page. The text should be structured as follows: title page, main text, illustrative material, references.

Title page

The following information should be given: names and surnames of author (authors); title in two languages; institution conferring the scientific degree (in case of a doctoral dissertation) or employing the author (name and address, head's scientific title and degree); key words in two languages, listed in the MeSH catalogue; address and name of institution where the work was performed; details of the dissertation (applicable to doctoral theses: name of promotor, number in the original thesis of: pages, figures, tables, and references).

Main text

S u m m a r y: in English and/or other language, structured as follows: objectives of study or trial, basic procedures (enrolment criteria, methods of observation or analysis), basic results (important data and their statistical significance), and conclusions. New and important aspects of the study should be exposed. I n t r o d u c t i o n: presentation of the objectives of the study and reasons for undertaking the investigation, accompanied by references if needed. M e t h o d s: easy to understand description of criteria for selection of study material and of research and statistical methods applied. R e s u l t s: in logical order, not repeating data given in tables and figures, with emphasis on important findings. D i s c u s s i o n: focusing on new and important aspects of the study and on conclusions arising therefrom, without repeating information from the Introduction and Results sections. Comparisons with the findings of other authors should be made. C o n c l u s i o n s: related to the study objectives and concisely presented. S t r u c t u r e d a b s t r a c t (Introduction, Material and Methods, Results, Conclusions): in the language of the article, presenting the quintessence of the study and counting from 200 to 250 words. A b b r e v i a t i o n s: used for the first time should be preceded by the term in full. A sentence should not begin with an abbreviation. U n i t s o f m e a s u r e m e n t a n d t h e i r s y m b o l s should belong to the international SI system. K e y w o r d s: 3 to 6 words, not repeating words in the title of the article, listed in the MeSH catalogue.

Illustrative material

Each figure (graph, diagram and photograph) and table should be accompanied by a title (under the figure, above the table). Figures and tables should be provided each on a separate page, oriented (top – bottom), and numbered consecutively as cited in the text. Figures and tables should be numbered separately. Micrographs should possess a scale bar and the symbols, arrows and signs should be legible. Colours should be used only in case of necessity. Titles and internal information of the figures and tables should be in Polish and English. Numbers should be shown on the typescript margin at places where the figure or table is to appear.

References

References cited should be numbered in the order as they appear in the text. Each reference should be typed starting from a new line. References should not be duplicated. Numbers of the references should be given in brackets, separated by commas and spaces. Surname of every author with initial letters of names are to be given. All authors should be shown when the article has no more than six authors; if otherwise, the first six authors should be given, followed by *et al.* The name of the journal should be abbreviated using Index Medicus (Medline) format.

Typescripts should be submitted in duplicate and accompanied by an electronic version (diskette or CD-ROM) in MS Word format.

---

* Based on the guidelines published by the International Committee of Medical Journal Editors cf. *Problemy Medycyny Nuklearnej 1997, 11 (21), 67–87.*

NADCHODZĄCE WYDARZENIA NAUKOWE W PAM

- ZAKAŻENIE A ZDROWIE REPRODUKCYJNE KOBIET – styczeń 2007 r., Kazimierz nad Wisłą. Organizatorzy: Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii PAM.

- PROBLEMY NEUROLOGICZNE OKRESU NOWORODKOWEGO, WCZESNA REHABILITACJA – 1–3 lutego 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Neonatologii PAM, Polskie Towarzystwo Neonatologiczne, Oddział Zachodniopomorski.

- IV POLSKO-NIEMIECKIE SYMPOZJUM CHIRURGII RĘKI – 13–14 kwietnia 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki PAM, Oddział Chirurgii Ręki w Schwerinie.

- SYMPOZJUM Z OKAZJI 50-LECIA ZAKŁADU MEDYCYNY NUKLEARNEJ – NAJNOWSZE TRENDY W ZAKRESIE DIAGNOSTYKI I TERAPII RADIOIZOTOPOWEJ – 19–22 kwietnia 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Zakład Medycyny Nuklearnej PAM, European School of Nuclear Medicine, European Association of Nuclear Medicine, Polskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej.

- AUTYZM – PROBLEMY MEDYCZNE, PSYCHOLOGICZNE I SPOŁECZNE – 18–19 maja 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Samodzielna Pracownia Pielęgniarstwa Rodzinnego PAM.

- VI POMORSKIE WARSZTATY ALERGOLOGICZNE – 18–20 maja 2007 r., Kołobrzeg. Organizatorzy: Zakład Alergologii Klinicznej PAM, Oddział Przewlekłych Chorób Płuc i Alergii ZOZ nad Matką i Dzieckiem w Gdańsku.

- SYMPOZJUM ORTOPEDII DZIECIĘCEJ – 24–26 maja 2007 r., Międzyzdroje. Organizatorzy: Katedra i Klinika Ortopedii Dziecięcej.

- BLIŹNIĘTA W RÓŻNYCH OKRESACH ŻYCIA: ASPEKTY BIOLOGICZNE, MEDYCZNE, PSYCHOLOGICZNE I SPOŁECZNE – maj 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej PAM, Polskie Towarzystwo Gemeliologiczne.

- XLII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO – 18–21 września 2007 r., Szczecin. Organizator: Oddział Szczeciński Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

- WSPÓŁCZESNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA LEKÓW BIOLOGICZNYCH W LECZENIU WYBRANYCH SCHORZEŃ W CHIRURGII STOMATOLOGICZNEJ – październik 2007 r., Szczecin. Organizatorzy: Samodzielna Pracownia Farmakoekonomiki PAM, Zakład Chirurgii Stomatologicznej PAM.

- NOWOTWORY DZIEDZICZNE – PROFILAKTYKA – październik 2007 r., Międzyzdroje – Szczecin. Organizatorzy: Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych PAM, Ogólnopolskie Stowarzyszenie Wspierania Rodzin z Predyspozycjami do Nowotworów Dziedzicznych.