

**Współczesne badania przyrodnicze i
medyczne: zastosowania praktyczne.
Wybrane zagadnienia**

Redakcja naukowa

dr Martyna Nowak

mgr Remigiusz Chęciński

© Copyright by Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań 2019

ISBN: 978-83-65599-25-4

Redakcja naukowa:

dr Martyna Nowak

mgr Remigiusz Chęciński

Recenzent:

prof. UAM dr hab. Renata Jastrząb

Redakcja techniczna i językowa:

Jan Mizerka

Klaudia Stecka

Mikołaj Wieczór

Wydawca:

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

ul. Wieniawskiego 1, 61-712 Poznań

publikat@amu.edu.pl

wyd. 1, format B5, ark.wyd. 8,6

Spis treści

Roksana Trznadel, Lech Celewicz	5
Chemioterapia – wcześniej i dziś	5
Iwona Nowak, Iwona Rykowska, Rafał Nowak	39
Jednodniowe, silikonowo-hydrożelowe soczewki kontaktowe jako nośnik cyklosporyny A w leczeniu chorób oczu	39
Magdalena Kowalska, Iwona Kowalska, Adrian Kowalski, Alicja Nowaczyk	59
Ocena biodostępności oraz bezpieczeństwa stosowania leków używanych w narkolepsji z wykorzystaniem metod obliczeniowych	59
Magdalena Kowalska, Łukasz Fijałkowski, Alicja Nowaczyk	74
Wykorzystanie metod obliczeniowych <i>in silico</i> w celu oceny przeciwbólowego mechanizmu działania wybranych pochodnych kwasu gamma-aminomasłowego	74
Mirosława Ziółkowska, Dorota Rogala, Jagoda Hawryło	89
Wsparcie społeczne a lęk i depresja u pacjentek z nowotworem piersi, mózgu i płuc poddanych radioterapii	89
Wiktoria Zych, Natalia Stafiej, Łukasz Kucharski, Anna Nowak, Adam Klimowicz	108
Porównanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów pozyskanych z porzeczki czarnej (<i>Ribes nigrum</i> L.) i porzeczki czerwonej (<i>Ribes rubrum</i> L.)	108
Anna Nowak, Joanna Zielonka-Brzezicka, Anna Muzykiewicz, Danuta Martyniuk, Magdalena Tkacz, Adam Klimowicz	121
Aktywność antyoksydacyjna alkoholowych ekstraktów z kwiatów i owoców bzu czarnego (<i>Sambucus nigra</i> L.)	121
Anna Przybylska-Balcerek, Tomasz Góral, Danuta Kurasiak-Popowska, Kinga Stuper-Szablewska	137
Antioxidant properties, quantitative and qualitative profile of flavonoids in various genotypes of cereals grown in Poland	137
Natalia Kuźma, Agata Jędrzejuk, Radosław Łażny	151
Ochrona zasobów torfowisk poprzez stosowanie alternatywnych podłoży w ogrodnictwie	151
Gracjan Kasprzak Paulina Plenzler	176
Wpływ rolnictwa na ornitofaunę	176

Lidia Orłowska.....	188
Co dieta wydry <i>Lutra lutra</i> może nam powiedzieć o zmianach zachodzących w środowisku?	188

Chemioterapia – wcześniej i dziś

Wprowadzenie

Choroby nowotworowe towarzyszą człowiekowi od zawsze. Tak też od tysięcy lat angażuje on ogromny wysiłek w poszukiwania wszelkich metod, które pozwoliłyby mu na przezwyciężenie tej jednostki chorobowej. Podejmowane próby były mniej lub bardziej skuteczne, ale niepodważalnie ich ewolucja doprowadziła do wyodrębnienia trzech głównych kierunków działań na tym polu. Pierwszym i najstarszym z nich jest chirurgia, drugi to radioterapia, a trzeci, najmłodszy, stanowi chemioterapia nowotworów. Niniejsza praca stanowi opis rysu historycznego rozwoju chemioterapii nowotworów na świecie i w Polsce. Precyzując – materiał przedstawia dzieje chemioterapii widziane oczami chemika organika. Tematyka ta jest nieodzownie związana z zakresem prowadzonych przez nas badań wykorzystujących cytostatyki. Woli ścisłości pragniemy jednak zaznaczyć, iż jako że nie jesteśmy ekspertami w dziedzinie historii medycyny czy też onkologii klinicznej, praca ta dla znawców tego tematu może okazać się zbyt mało doprecyzowana czy też niepełna. Jednakże naszym celem było, jako sympatyków rozwoju leków przeciwnowotworowych, przedstawienie w przystępny sposób ogólnej charakterystyki wątku historycznego chemioterapii nowotworów.

1. Charakterystyka pojęć: chemioterapia, chemioterapia nowotworów, nowotwór i rak

Przed omówieniem głównego wątku pracy należałoby się zastanowić nad znaczeniem podstawowych zwrotów i terminów. Chemioterapia nowotworów wykorzystuje związki chemiczne, nazywane cytostatykami, które mają na celu leczenie chorób nowotworowych. Najprościej mówiąc wywołują one śmierć komórki czy też zahamowują jej wzrost poprzez zablokowanie funkcji mikrotubul, białka czy syntezy DNA^{1,2}. Skąd więc tytuł owej pracy – „Chemioterapia – wcześniej i dziś”?

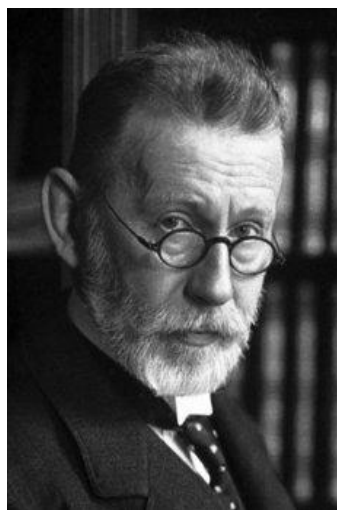
¹ *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*, praca zbiorowa pod red. prof. dr hab. med. K. Orzechowskiej-Juzwenko, Volumed, Wrocław 2000, s. 1–12.

Współcześnie bowiem przyjęło się stosować nawet częściej, skróconą wersję tego pojęcia. Jednakże z fachowego punktu widzenia traktowanie chemioterapii i chemioterapii nowotworów jako tożsame nie jest do końca poprawne, nie stanowią one *stricto* synonimów. Chemioterapia nowotworów stanowi niejako podgrupę chemioterapii. Według definicji Encyklopedii PWN, „chemioterapia to leczenie za pomocą preparatów chemicznych niszczących wybiórczo drobnoustroje chorobotwórcze lub hamujących rozwój komórek nowotworowych”³. Pod pojęciem drobnoustrojów chorobotwórczych kryją się następujące czynniki chorobotwórcze bakterie, wirusy, priony, grzyby, drożdże czy pierwotniaki. Tak też antybiotyki, leki przeciwwirusowe, leki przeciwgrzybicze, preparaty pierwotniakobójcze czy też cytostatyki wchodzi w skład chemioterapeutyków. Choć tytuł naszej pracy wykorzystuje potocznie stosowaną formę, w dalszej części monografii konsekwentnie będziemy wykorzystywali poprawną i nieskróconą terminologię. Za punkt strategiczny rozwoju współczesnej chemioterapii przyjmuje się osiągnięcia dobrze nam wszystkim znanego z powiedzenia, „Cóż jest trucizną? Wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną. Tylko dawka czyni, że dana substancja jest trucizną” – Paracelsusa. Wprowadził on szereg nowych leków, terminów medycznych, ale przede wszystkim zmienił dotychczasowy punkt widzenia dotyczący medykamentów. Jednakże ogromny postęp w dziedzinie chemioterapii miał miejsce na przełomie XIX i XX wieku. Rozwój mikrobiologii w tamtych czasach pozwolił na coraz to lepsze poznanie drobnoustrojów chorobotwórczych i skutecznych wobec nich metod leczniczych. Jednakże to niemiecki biolog i lekarz, absolwent Uniwersytetu Wrocławskiego – Paul Ehrlich – jest uznawany za twórcę pojęcia chemioterapia.⁴

² Roth H.J., Schubert-Zsilavec M., Steinhilber D, *Chemia medyczna cle leków – substancje czynne – biologia chemiczna*, MedPharm Polska, Wrocław 2012, s. 471–530.

³ <https://sjs.pwn.pl/sjp/chemioterapia;2447980.html> [dostęp: 01.06.2019].

⁴ Magner Lois N., *A History of Medicine*, Taylor & Francis 2005, s. 221–239, 552–585.



Ryc. 1. Paracelsus⁵ i Paul Ehrlich⁶.

Wśród jego licznych osiągnięć na uwagę zasługuje odkrycie salwarsanu (arsenoorganiczny związek chemiczny), pierwszego skutecznego medykamentu wykorzystywanego w leczeniu kiły czy również błękitu metylenowego skutecznego w przypadku malarii. Pod względem rozwoju cytostatyków znaczący jest tutaj fakt, iż w roku 1908 podczas badań nad salwarsanem zastosował on króliczy model w celu zbadania ludzkiej kiły. Stworzyło to podwaliny dla późniejszych badań *in vivo* wykorzystujących modele zwierzęce. Badania te miały i mają nadal znaczący wpływ dla dynamicznego rozwoju testowania i poszukiwania potencjalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym. Ponadto Ehrlich słynął z wielodyscyplinarnego podejścia do swoich badań, stąd też zainteresował się również substancjami o charakterze przeciwnowotworowym. Pomimo eksperymentów prowadzonych w zakresie barwników anilinowych czy też pierwszych prymitywnych środków alkilujących nie udało mu się dokonać w tej dziedzinie żadnych spektakularnych osiągnięć, ale zasłynął z powiedzenia, które zamieścił na drzwiach wejściowych do swojego laboratorium testującego te pochodne, „*Give up all hope, you who enter*” („Porzućcie wszelką nadzieję, ci którzy wchodzić”) ⁷. W drugiej połowie XIX wieku w 1878 roku odnotowano aktywność przeciwnowotworową innego związku opartego na arsenie, tzw. roztworu Flowera, czyli 1% roztworu arsenu i węgla potasu. Z

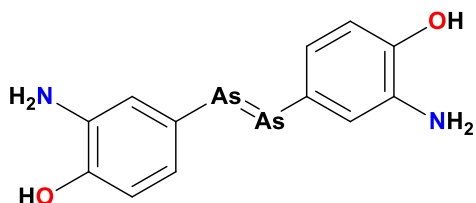
⁵ <https://www.ancient-origins.net/history-famous-people/paracelsus-fathertoxicologyandenemyphysicians003958> [dostęp: 20.07.2019].

⁶ <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/biographical/> [dostęp: 20.07.2019].

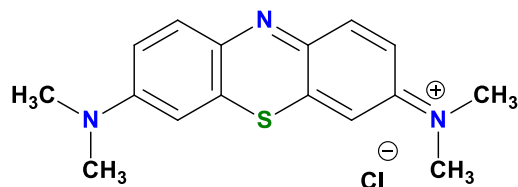
⁷ Magner L. N. *op. cit.* s. 552–585.

powodzeniem był wykorzystywany w próbach leczniczych, a nawet i jest współcześnie jako lek sierocy w przypadku ostrej białaczki promielocytowej (AML)⁸.

(1)



(2)



Ryc. 2. Struktura chemiczna salwarsanu (1) i błękitu metylenowego (2)

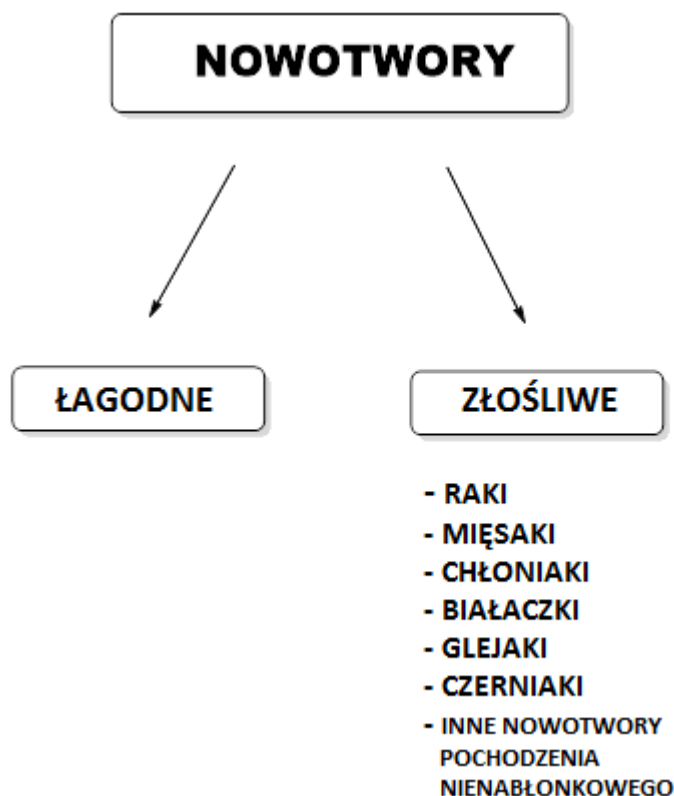
Nowotwór, którego leczymy cytostatykami, definiujemy jako chorobę, w której obserwuje się niekontrolowane podziały komórkowe. Szybko dzielące się komórki nie różnicują się w typowe komórki tkanek. Brak kontroli nad podziałami jest wynikiem mutacji genów. Czy rak i nowotwór to to samo? Odpowiedź brzmi nie, ponieważ rakiem nazywamy grupę nowotworów złośliwych, które wywodzą się z tkanki nabłonkowej. Oznacza to, że nie każdy nowotwór musi mieć charakter złośliwy, ale każdy rak na pewno jest złośliwy^{9,10}. Co ciekawe, pojęcie raka figuruje już w zmiankach pochodzących z czasów starożytnych. Termin ten używał sam Hipokrates z Kos. Nazwa ta została zaczerpnięta od wyglądu zaawansowanego guza piersi, który przypominał kraba. Jednakże to dopiero w czasach średniowiecznych Paweł z Eginę przypisał pojęcie raka do guza nowotworowego występującego w różnych miejscach ciała¹¹.

⁸ Falzone L., Salomone S., Libra M., *Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium*, „Frontiers in Pharmacology”, 2018, 9, DOI: 10.3389/fphar.2018.01300.

⁹ *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*, op. cit.

¹⁰ Roth H.J. op. cit.

¹¹ Mould R. F., *Rozwój wiedzy o raku od najdawniejszych czasów do końca XVIII wieku*, „NOWOTWORY Journal of Oncology”, 2008, 58: 172–185.

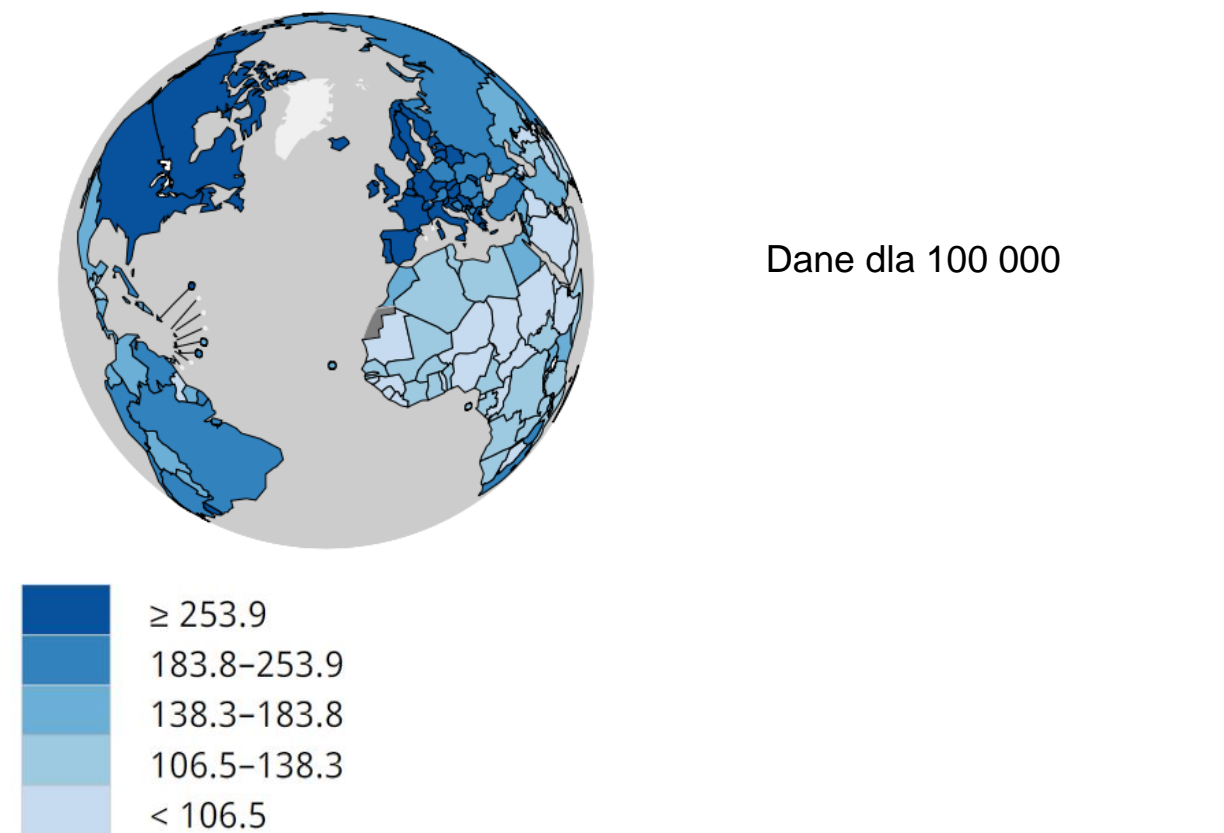


Ryc. 3. Podstawowy podział nowotworów

2. Podejście statystyczne – epidemiologia chorób nowotworowych

Mimo znacznych i niepodlegających dyskusji postępów naukowych choroby nowotworowe stanowią główną przyczynę zgonów na całym świecie. Rosnące obciążenie jest wynikiem kilku czynników, między innymi wzrostu populacji i starzenia się, a także rozwoju społecznego i gospodarczego. Wzrost ten jest nieunikniony stąd też rozwój badań nad terapiami przeciwnowotworowymi jest tak potrzebny. Według najnowszego globalnego raportu opublikowanego przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC od ang. *International Agency for Research on Cancer*) liczba nowych zachorowań w roku 2018 to ponad 18 milionów przypadków, a śmiertelność sięga rzędu 10 milionów pacjentów. Oznacza to, że 1 na 5 mężczyzn i 1 na 6 kobiet na świecie zachoruje na raka w ciągu swojego życia, a 1 na 8 mężczyzn i 1 na 11 kobiet umrze na tę chorobę. Dane te dotyczą 185 krajów objętych globalną obserwacją. Badania te przeprowadzono dla 36 rodzajów nowotworów dla obu płci, bez zróżnicowania wiekowego. Ponadto liderami

odpowiedzialnymi za 1/3 przypadków zachorowalności i śmiertelności są nowotwory płuc, piersi oraz jelita grubego.¹²



Ryc. 4. Szacowane światowe wskaźniki zapadalności na wszystkie nowotwory, bez zróżnicowania na płeć i wiek¹³

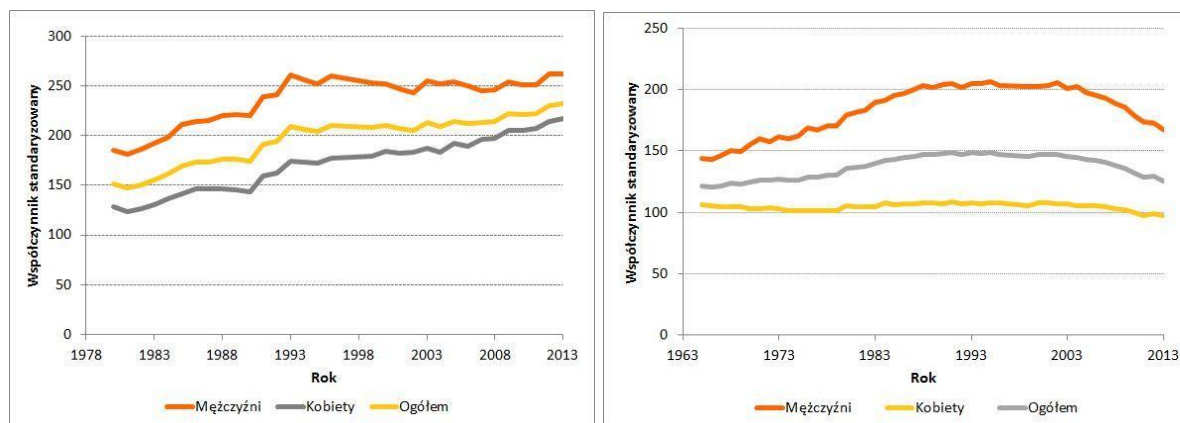
W Polsce nowotwory stanowią drugą z kolei przyczynę zgonów. Nieco wyższy o kilka procent wskaźnik odnotowuje się u mężczyzn. Jednakże jest on bardzo zależny od wieku, bowiem w przypadku dorosłych młodych kobiet oraz w średnim wieku, nowotwory jako przyczyna zgonów awansują w tych przypadkach na miejsce pierwsze. Postawienie takiego wniosku jest możliwe dzięki prowadzeniu Krajowego Rejestru Nowotworów. W Polsce od 1952 roku został nałożony obowiązek zgłaszania danych dotyczących zachorowań na nowotwory złośliwe. Trzy lata temu liczba chorych sięgała ponad 160 tysięcy. Co ciekawe wzrost zachorowalności w przypadku mężczyzn ustabilizował się w połowie lat 90. XX wieku. W przypadku

¹² https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf [dostęp: 01.06.2019].

¹³

https://gco.iarc.fr/today/online.analysismap?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=globe&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%25B10%25C0%255D [dostęp: 23.07.2019].

kobiet obserwuje się rosnący trend zapadalności na choroby nowotworowe. W XXI wieku odnotowuje się spadki umieralności u obu płci. Ogromny wpływ na rozwój polskiej epidemiologii chorób nowotworowych miał prof. dr hab. n. med. Witold Antoni Zatoński. Jest on autorem bardzo użytecznych atlasów umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce.¹⁴



Ryc. 5. Zachorowalność i umieralność z powodu nowotworów złośliwych w Polsce¹⁵

3. Dzieje rozwoju chemioterapii nowotworowej na świecie

Człowiek od zarania dziejów poszukiwał możliwości leczniczych mających na celu poprawę jego komfortu życia. Już w okresie antyku można doszukać się materiałów świadczących o stosowaniu wszelakiego rodzaju ekstraktów z ziół i skomponowanych na ich podstawie maści. Informacje te pochodzą z kodeksu Hammurabiego czy papirusów z Egiptu. W tzw. papirusie George'a Ebersa obecna jest informacja na temat tłuszczaka lecz bez wyraźnego wyodrębnienia go jako samodzielnej jednostki chorobowej o charakterze nowotworowym. Pierwsze możliwości lecznicze w chorobach nowotworowych opierały się na chirurgii. Starożytna Grecja zaślęła z wspomnianego już powyżej Hipokratesa, to dzięki jego wysiłkom już prawie 2500 tysięcy lat temu powszechnym stało się operowanie pojęciem raka piersi, gardła czy języka. Natomiast osobistości takie jak Celsus czy Galen to specjaliści medycyny Starożytnego Rzymu. Wobec zmian nowotworowych oprócz chirurgicznych metod wykorzystywali żrące maści, przyżeganie czy preparaty stanowiące sole miedzi, ołowiu czy też arszenik. Z czasów starożytnych wyłoniła się grecka teoria humoralna, która trwała aż do wieków średniowiecznych głosząc, iż rak

¹⁴ *Onkologia Podręcznik dla studentów i lekarzy*, pod redakcją Jacka Jassemę i Radziława Kordka, VIA MEDICA, Gdańsk 2019, s. 1–46.

¹⁵ <http://onkologia.org.pl/nawotwory-zlosliwe-ogolem-2/> [dostęp: 23.07.2019].

jest skutkiem gromadzenia się tak zwanej czarnej żółci. Odrzucenie tej teorii wpłynęło na rozwój medycyny^{16,17}. W roku 1773 Bernard Peyrilhe jako pierwszy zaobserwował łączące cechy różnych postaci raka, a także stwierdził, iż rak początkowo występujący w jednym miejscu jest zdolny do ekspansji z wykorzystaniem układu limfatycznego. Coraz to lepsze poznanie anatomii, rozwój patologii, a także wprowadzenie narkozy (William Morton w Bostonie w 1847 roku przeprowadził pierwszą operację wykorzystując narkozę eterową) i środków odkażających (Lister w 1867 odkrył antyseptyczne właściwości karbolu) umożliwiły wprowadzenie radykalnych zmian w chirurgii. W roku 1885 Rudolf Virchow na podstawie swoich badań doszedł do wniosku, iż każda komórka organizmu powstaje z prekursorów tychże komórek, a co za tym idzie każdy z nich może nabrać nowotworowego charakteru. Ogłosił także, że przerzuty raka są skutkiem wydzielania przez guzy substancji chemicznych¹⁸. Dopiero końcowe lata XIX wieku to rozwój radioterapii, za sprawą odkrycia promieni X przez Wilhelma Röntgena (1895), a także naszej rodaczki Marii Curie-Skłodowskiej i jej męża Piotra Curie, którzy odkryli rad (1898). Dopiero w latach 50. XX wieku dzięki opracowaniu kobaltionów, stosowanie radiacji w leczeniu chorób nowotworowych stało się bardziej bezpieczne i zarazem powszechne, bowiem skóra nie ulegała takim poparzeniom jak poprzednio¹⁹.

O narodzinach trzeciego członu filaru leczniczego nowotworów – chemioterapii zaczęto realnie myśleć dopiero w latach 30. XX wieku i to zupełnie z powodu przypadkowo zebranych obserwacji. Podczas I wojny światowej używano iperytu siarkowego i azotowego w postaci gazu bojowego. Podczas badań przeprowadzonych wśród weteranów wojennych odnotowano znaczne zmiany w szpiku kostnym, ale fakt ten nie został dalej wykorzystany w medycynie. Prezydent Stanów Zjednoczonych Franklin D. Roosevelt na mocy ustawy podpisanej 5 sierpnia 1937 roku powołał Narodowy Instytut Raka (NCI, *National Cancer Institute*) jako oddział publicznej służby zdrowia. Pomimo wielu modyfikacji na przestrzeni kilku dekad związanych ze strukturą jej działania, instytucja ta działa po dziś dzień²⁰. Kolejne niespodziewane wydarzenie tym razem z okresu II wojny światowej uważane

¹⁶ Magner L. N. *op. cit.* s. 89–134.

¹⁷ Mould R. F. *op. cit.*

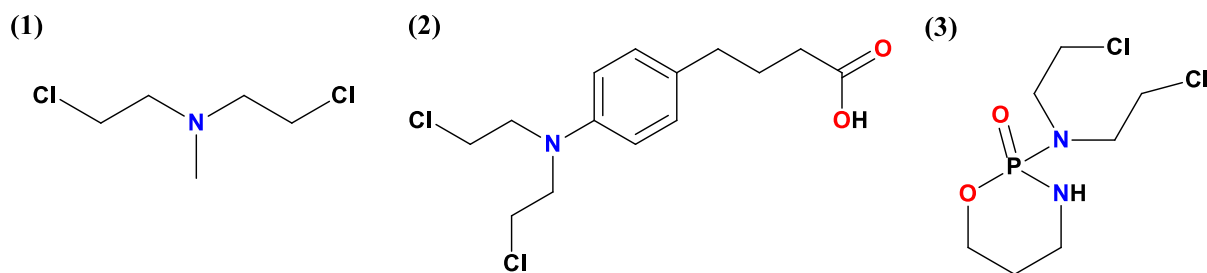
¹⁸ Lenartowicz J., *Leczenie chirurgiczne nowotworów na przestrzeni wieków ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów jamy ustnej*, „NOWOTWORY”, 2000, 50:625–631.

¹⁹ Falzone L., *op. cit.*

²⁰ DeVita V. T., Chu E., *A History of Cancer Chemotherapy*, „Cancer Research”, 2008, 68 (21): 8643–8653.

jest za datę narodzin współczesnej chemioterapii nowotworów. Oficjalnie już podczas II wojny światowej Niemcy nie wykorzystywali broni chemicznej na polu bitwy. Jednakże amerykański rząd w celu zabezpieczenia się przed ewentualnym atakiem ze strony wojsk niemieckich przechowywał dwa tysiące bomb z iperytem azotowym. Znajdowały się one w ładowni amerykańskiego transportowca serii *Liberty Ship* – SS *John Harvey*. Stacjonował on w 1942 roku we włoskim porcie w Bari, tam też został zbombardowany w wyniku niemieckiego nalotu. Po tym incydencie amerykański lekarz wojskowy Stewart Francis Alexander odkrył, iż zarówno u poległych żołnierzy, jak i u rozbitków, którzy przeżyli występują znaczne zmiany w szpiku kostnym, a mianowicie obserwuje się spadek liczby białych ciałek krwi. To zdarzenie rozpoczęło burzę myśli na temat tego, że substancja chemiczna może okazać się być skuteczną w leczeniu nowotworów krwi i węzłów chłonnych. Pierwsze badania nad rozwojem tej dziedziny miały miejsce w *Yale University Medical School*. Tam też Milton Winternitz, który brał czynny udział w badaniach nad iperytem siarkowych podczas I wojny światowej, nakłonił dwóch znakomitych farmakologów tego uniwersytetu, Alfreda Gilmana i Louisa Goodmana do przeprowadzenia badań z iperytem azotowym, płynną pochodną gazu fosgenowego. W tym celu wykorzystali oni wsobne szczepy myszy z przeszczepionym nowotworem limfatycznym. Wyniki tego eksperymentu okazały się obiecujące, dlatego też ówczesnie znany torakochirurg Gustaf Lindskog, za namową swoich przyjaciół postanowił po raz pierwszy podać iperyt azotowy człowiekowi. Pacjentem tym był *notabene* polski imigrant określony inicjałami JD. Pracował on w fabryce łożysk kulkowych w środkowej części stanu Connecticut. Chorował on na chłoniaka nieziarnistego powodującego niedrożność oddechową. Wyniki po kuracji były znakomite i zachęcające do dalszego działania. Jak się jednak ostatecznie okazało remisja ta była dość krótkotrwała. Co ciekawe, z powodu tajemnicy rządowej dotyczącej stosowania gazów bojowych, wyniki badań zakończonych w 1943 roku, ujrzały światło dzienne dopiero po trzech latach. Pomimo tego rok 1942 to narodziny chemioterapii nowotworów, a pierwszym odkrytym lekiem cytostatycznym stała się chlorometyna, stwarzając podwaliny dla dzisiejszej grupy leków alkilujących (chlorambucyl i cyklofosamid to późniejsze doustne warianty iperytu gazowego; cyklofosamid to pierwszy cytostatyk zsyntetyzowany poza USA przez niemieckich naukowców)^{21,22}.

²¹ DeVita V. T., Chu E., *op. cit.*



(4)

BRONCHIOGENIC CARCINOMA*

GUNWAF E. LINDSKOG, M.D.

NEW HAVEN, CONN.

FROM THE DEPARTMENT OF SURGERY, YALE UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, NEW HAVEN, CONNECTICUT

RAPID ADVANCES have been made in the technic of surgical resection for the eradication of primary pulmonary cancer since Graham reported the first successful total pneumonectomy for carcinoma in 1933. Thereafter a commendable optimism began to appear, with published reports of successful cases, or series of cases. To date, however, too few surgeons have indicated the background of case material from which their occasional therapeutic successes have been derived. Considered in this light, the comprehensive picture of therapy for bronchiogenic carcinoma is still a disappointing one and constitutes a challenge to further efforts.

It is the author's purpose to relate his own experience with a consecutive series of 100 primary pulmonary cancers seen within a five-year period, ending December 1943, at the New Haven Hospital, which is a general hospital of about 500 beds.

VITAL STATISTICS.—There were 82 male and 18 female patients, a ratio of 4.5 to 1. Ninety-nine were white and one negro, an expected racial distribution since the State of Connecticut has a negro population of 1.0 per cent, according to the 1940 census. The average age of all patients was 54.8 years. In this decade occurs the peak incidence of nearly all visceral cancer. The youngest patient was 22 years of age. There were five cases in the fourth decade, 21 in the fifth, 41 in the sixth, 28 in the seventh, and four patients were older than 70.

SYMPTOMATOLOGY.—The first observed symptom was usually cough, pain in the chest, or a gripe-like "cold." Sixty per cent of the cases began with one of these three complaints. Six had early dyspnea. Only four patients noted hemoptysis or bloody sputum as an early complaint. Three had an acutely pneumonic onset. Nine patients had vague general complaints of weakness and weight loss, and 14 had initial symptoms frankly related to metastases or extensions of tumor beyond the lung.

The average duration of symptoms prior to hospital admission was 6.7 months in 98 cases; two cases were unable to evaluate the time of onset. The inoperable cases had an exactly similar average duration. The presumably operable group, which was subjected to surgical exploration, had a slightly longer duration of symptoms, rather than a shorter one.

LOCATION OF THE PRIMARY LESION.—The right lung was affected 51 times and the left 47. This is approximately the normal ratio of the two lungs in

*Read before the American Surgical Association, April 2-4, 1946, Hot Springs, Virginia.

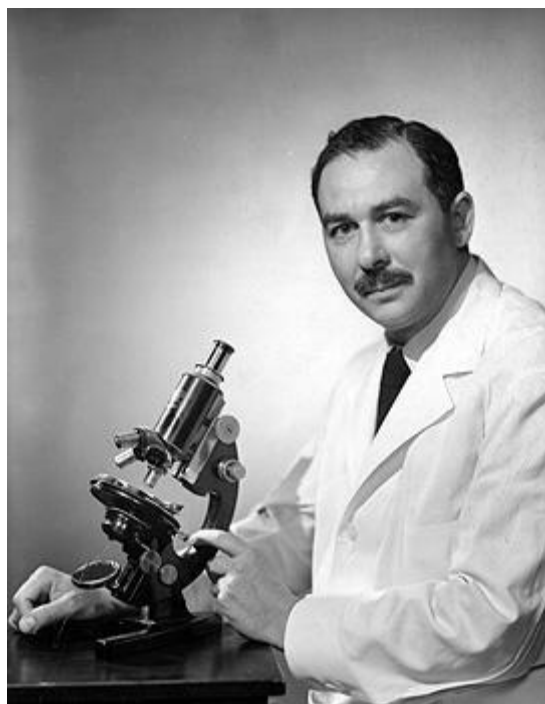
667

Ryc. 5. Struktura chemiczna chlorometyny (1), chlorambucylu (2), cyklofosfamidu (3) oraz pierwsza strona pionierskiego artykułu Lindskoga (4)

Badacze zachęteni wiadomościami opublikowanymi w artykule Lindskoga kontynuowali prace w tym kierunku. Było to o tyle istotne, że w latach 40. XX wieku odsetek przeżywalności nie przekraczał 30%. Ponadto procent ten obejmował tylko i wyłącznie pacjentów bez przerzutów, mogąc ich wyleczyć chirurgicznie czy też naświetleniami. Niestety z powodu nieustępujących nawrotów choroby po uzyskanych remisjach, a także z powodu silnych ubocznych działań toksycznych na długi okres zapanował marazm w otoczeniu naukowców. Atmosfera była na tyle nieprzyjazna, iż nawet zaniechano używania w jednym zdaniu „lek” i „chemioterapia”.

²² Watson J. D., Berry A., Davies K., *DNA Historia Rewolucji Genetycznej*, Wydawnictwo CiS, Stare Groszki 2018, s. 435–467.

Jednakże już po niespełna dwóch latach bieg zdarzeń odwrócił się dzięki dokonaniom ojca nowoczesnej chemioterapii, Sidneya Farbera²³.



Ryc. 6. Sidney Farber – ojciec nowoczesnej chemioterapii²⁴

Przed rozpoczęciem II wojny światowej odkryto, iż w warzywach zielonych istnieje czynnik, który korzystnie oddziałuje na szpik kostny. Zidentyfikowano go jako kwas foliowy i zsyntetyzowano po raz pierwszy w 1937 roku. Następnie po zakończeniu działań wojennych zaobserwowano, iż brak tego kwasu wywołuje podobny efekt w przypadku szpiku kostnego, jaki odnotowuje się podczas stosowania iperytu azotowego. Tak rozpoczęły się prace zespołu badawczego Farbera nad poszukiwaniem antagonistów kwasu foliowego. Działania te zaowocowały odkryciem aminopteryny i ametopteryny (komercyjnie znana pod nazwą metotreksat). Dzięki ametopterynie Farberowi udało się po raz pierwszy doprowadzić do efektywnej remisji w przypadku pacjenta z dziecięcą ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). Farber wydłużał remisje u dzieci, jednak dopiero dekadę po tym odkryciu opracowano nieomal w pełni skuteczną metodę leczenia^{25,26,27}.

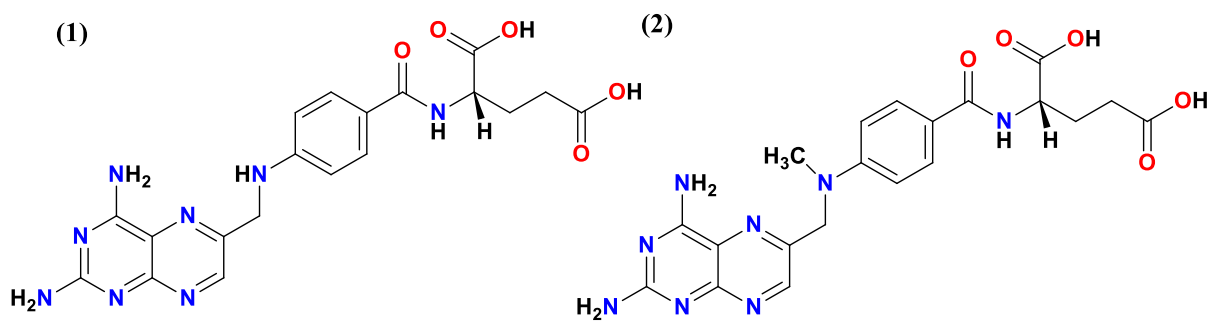
²³ https://www.yalecancercenter.org/Answers_July_6_08_89594_5_v1.pdf [dostęp: 28.06.2019].

²⁴ <https://www.dana-farber.org/about-us/history-and-milestones/sidney-farber,-md/> [dostęp: 23.07.2019].

²⁵ DeVita V. T., Chu E., *op. cit.*

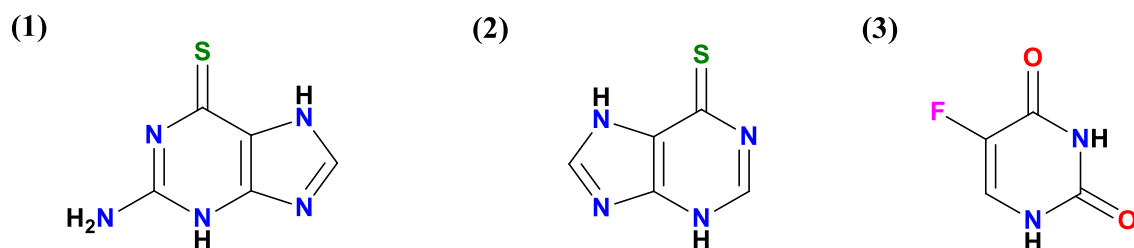
²⁶ Baguley B. C., Kerr David J., *Anticancer Drug Development*, Academic Press 2002, s. 1–11.

²⁷ DeVita V. T., *Śmierć raka*, KURHAUS PUBLISHING, Warszawa 2016, s. 40–63.



Ryc. 7. Struktura chemiczna aminopteryny (1) i metotreksatu (2)

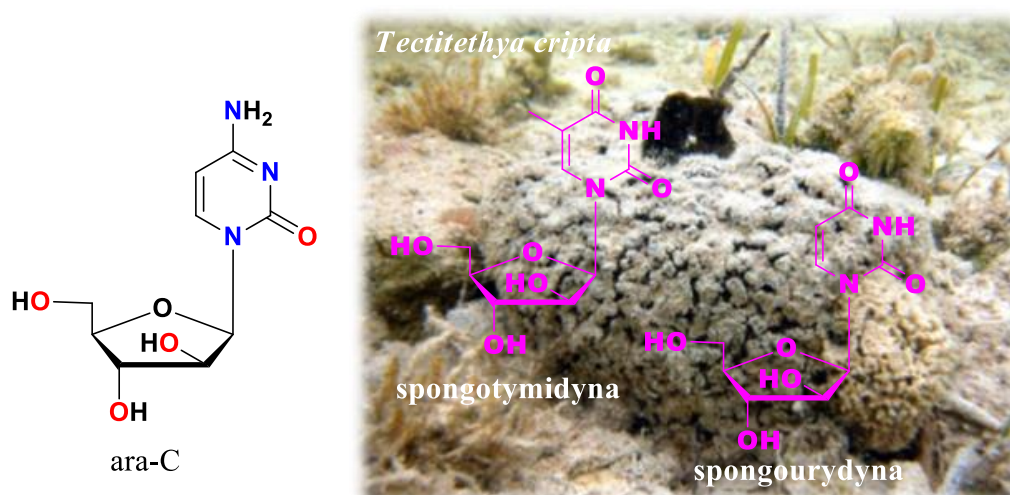
Kolejnym istotnym ewenementem w dziejach rozwoju, które zostało nagrodzone Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w 1988 roku, stanowi odkrycie kolejnych antymetabolitów w 1951 roku, tiopuryn: 6-tioguaniny i 6-merkaptopuryny, przez George'a Herberta Hitchingsa i Gerturdy Belle Elion. Stosowane szeroko w leczeniu ostrych białaczek, a także opryszczki, dny moczanowej czy jako środki immunosupresyjne w transplantacji narządów. W tym samym czasie Charls Heidelberg odkrył, iż pewne komórki nowotworowe chętniej wyłapują z zasobów uracylu. Stąd też postanowił zsyntetyzować „fałszywy” substrat zdolny do zablokowania tego szlaku metabolicznego, w postaci uracylu podstawionego w pozycji 5 atomem fluoru. Tak też od 1957 roku 5-fluorouracyl (5-FU) stał się pierwszym lekiem wprowadzonym do leczenia guzów litych. Ponadto odkrycie to dało początek chemioterapii celowanej, pomimo tego, że celem tutaj jest szlak biochemiczny, a nie konkretny cel molekularny. W tym samym roku w NCI wyleczono pierwszego raka z wykorzystaniem chemioterapeutyków - raka kosmówki. W latach 50. podjęto decyzję, iż ogólnym niezmiennym modelem do badań *in vivo* zostanie mysia białaczka (ostra białaczka -L1210). Obecnie badania te opierają się na wielu innych modelach.²⁸



Ryc. 8. Struktura chemiczna 6-tioguaniny (1), 6-merkaptopuryny (2) i 5-FU (3)

²⁸ DeVita V. T., Chu E., *op. cit.*

Lata 60. XX wieku to przełom związków pochodzenia naturalnego wykazujących działanie antynowotworowe. Badania te były tak zintensyfikowane, iż podejmowano się nawet prób izolowania bakterii od osób zmarłych na nowotwory, z nadzieją, iż dany organizm wytworzył skuteczny antybiotyk. Zatwierdzona przez FDA w 1969 roku cytarabina (ara-C) zsyntetyzowana po raz pierwszy w 1959 roku, powstała jako skutek zainspirowania się badaczy strukturą arabinonukleozydów pochodzenia naturalnego – spongotymidyny i spongourydyny wyizolowanych z gąbki morskiej *Tectitethya cripta*. Wydarzenie to zmieniło dotychczasowe podejście naukowców co do budowy podstawowych składników budulcowych DNA i RNA, dowiedziono bowiem, że aktywność biologiczną wykazują nie tylko nukleozydy z rybozą czy deoksyrybozą. Znane już antymetabolity, w tym nawet arabinonukleozydy mogły okazać się być skutecznymi cytostatykami i tak też się stało²⁹.



Ryc. 9. Struktura chemiczna ara-C, spongotymidyny i spongourydyny³⁰

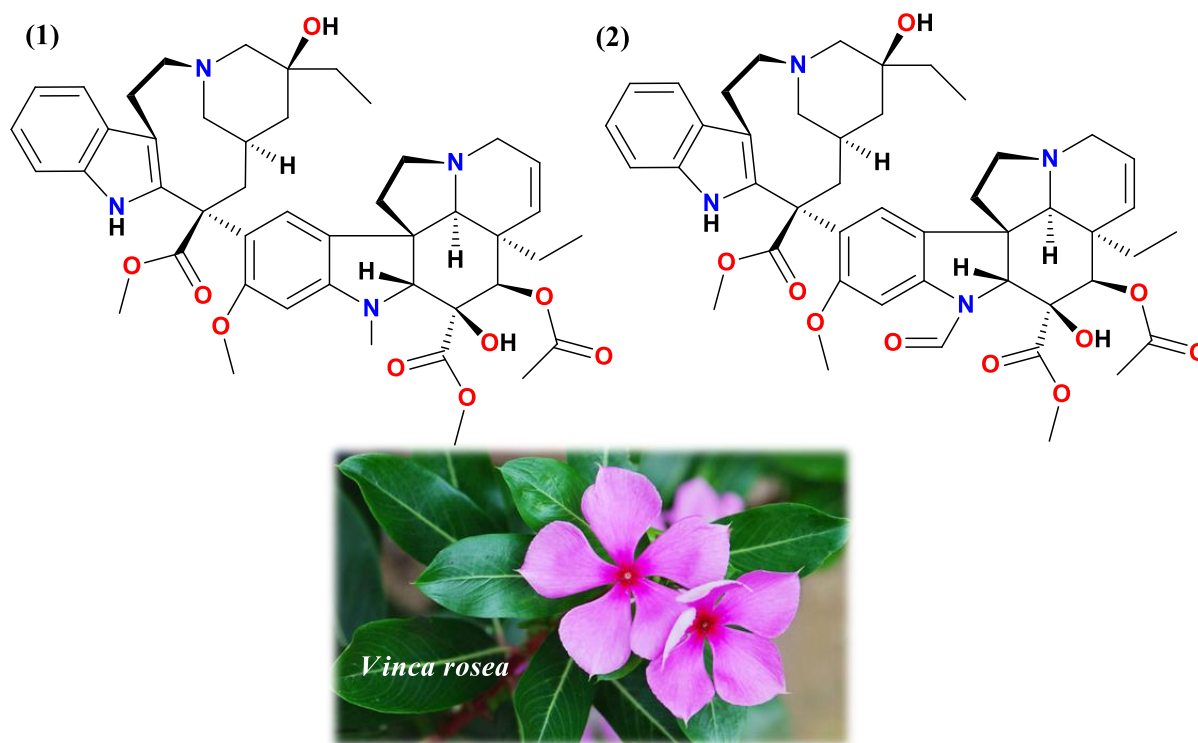
W latach 50. XX wieku za sprawą kanadyjskich uczonych Roberta Nobla i Charlesa Beera odkryto po raz pierwszy alkaloidy barwinka.³¹ Jednakże ogromne znaczenie miały tutaj dwa alkaloidy wyizolowane kilka lat później z *Vinca rosea* (dziś *Catharanthus roseus* – barwinek różowy). Pierwszym była winblastyna, a drugim winkrystyna dając początek współczesnym inhibitorom mitozy. Początkowo badano je pod względem pozytywnych efektów wobec cukrzycy. To odkrycie przyczyniło się

²⁹ Jimenez S. C., Veras Wilke D., Veras Costa-Lotufolli L., *Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans*, „CLINICS” 2018, 73 (suppl 1):e482s.

³⁰ <https://ocean.si.edu/ocean-life/invertebrates/sea-sponge-hiv-medicine> [dostęp: 26.07.2019].

³¹ Moudi M., Go R., Yong Seok Yien C., Nazre M., *Vinca Alkaloids*, „International Journal of Preventive Medicine”, 2013, 4(11): 1231–1235.

do zapoczątkowania chemioterapii skojarzonej (kombinacyjnej, polichemioterapii). Pierwsze sukcesy na tym polu osiągnięto, tak jak już zostało wspomniane w przypadku dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL)³².



Ryc. 10. Struktura chemiczna winblastyny (1), winkrystyny (2)³³

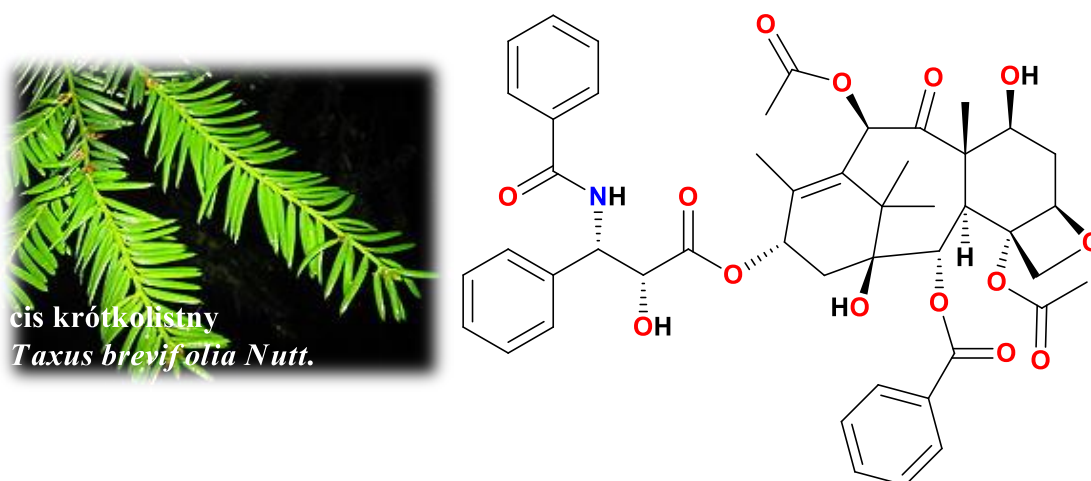
Program nazwany VAMP od pierwszych liter stosowanych leków, obejmował połączenie czterech medykamentów w pełnych dawkach: winkrystynę, metotreksat, 6-merkaptopurynę i prednizon. Narodziny tej metodologii stosowanej z sukcesem po dziś dzień przypisuje się następującym trzem pionierom onkologii klinicznej – Emil Frei, Emil J. Freireich i James F. Holland. Innowacyjność tej metody polegała na wykorzystaniu kombinacji leków o różnych mechanizmach działania. Ich sukces był możliwy dzięki podjęciu współpracy z biomatematykiem Howardem Skipperem, który dzięki mysim modelom pomógł ustalić konkretny harmonogram podawania leków jak i ich dawki, czyli to co jest niezbędne w przypadku polichemioterapii. Coraz to dokładniejsze poznanie doprowadziło do zmian w schematach działania, stąd też VAMP przekształcił się w POMP, a następnie w BIKE. Taka wielokierunkowość

³² DeVita V. T., Chu E., *op. cit.*

³³ <https://www.amazon.in/MG-Naturals-Catharanthus-Roseus-Nithya-Kalyani-Live/dp/B01N586YDM> [dostęp: 26.07.2019].

działania zmniejsza ryzyko uodpornienia się komórek nowotworowych. Równie obiecujące efekty odnotowano w kolejnym amerykańskim programie MOPP. Pomijał on metotreksat (zastąpiony prokarbazyną), 6-merkaptopuryna została zastąpiona iperytem azotowym i z pełnym sukcesem doprowadził on do całkowitych remisji w przypadku chorych na chłoniaka Hodgkina. Osiągnięcie sukcesu przede wszystkim przez Vincenta T. DeVita było możliwe dzięki przeprowadzeniu poszerzonych badań z udziałem mysich modeli i trytowanej tymidyny. W ten sposób ustalono, iż cykl komórkowy u myszy trwa dwa razy krócej niż ma to miejsce w przypadku ludzkiego szpiku. To pozwoliło określić poprawny harmonogram dawkowania. W późniejszych latach zastępując iperyt azotowy cyklofosfamidem powstała nowa kombinacja pod nazwą C-MOPP. Skuteczna w przypadku chłoniaka nieziarniczego³⁴.

Kolejną pochodną, która zrewolucjonizowała rynek farmaceutyczny, wyizolowano w 1964 roku przez Monroe E. Walla i Mansukh C. Waniego. Był to taksol, dziś bardziej znany pod nazwą paklitaksel. Informacje o jego aktywności cytotoksycznej zostały opublikowane dopiero w 1978 roku. Rok później Susan Horwitz przedstawiła jego ciekawy mechanizm działania polegający na hamowaniu funkcji mikrotubul, dziś wchodzi on w skład taksanów, czyli podgrupy inhibitorów mitozy, a w 1992 roku dopuszczono go do powszechnego użytku klinicznego³⁵.



Ryc. 11. Struktura chemiczna paklitakselu³⁶

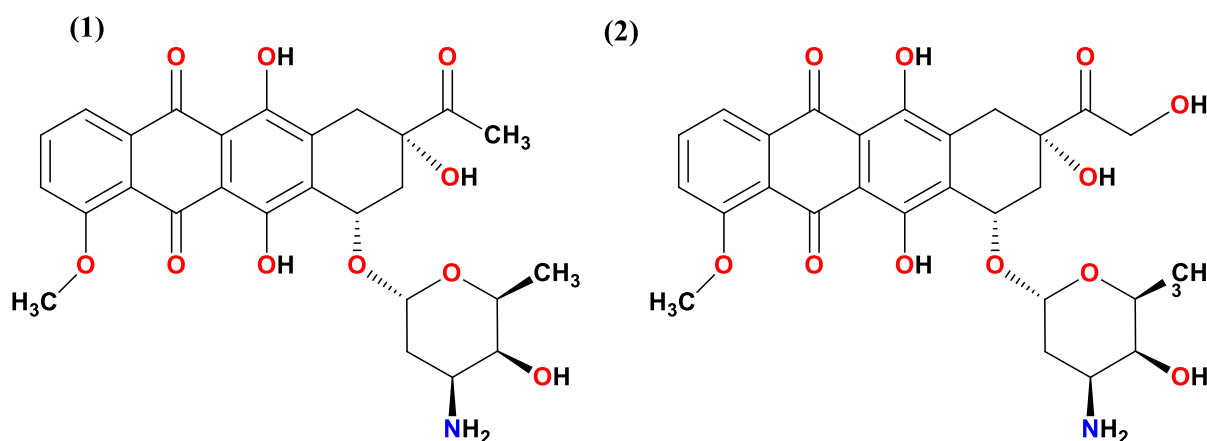
³⁴ DeVita V. T. *op. cit.* s. 65–114.

³⁵ Kampan N. C., Madondo M. T., NcNally O. M., Quinn M., *Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer*, „BioMed Research International”, 2015, DOI: 10.1155/2015/413076.

³⁶ <https://atlas.roslin.pl/plant/8565> [dostęp z dnia: 25.07.2019].

Aby otrzymać 1 g taksolu potrzeba było aż 200 kg kory cisu krótkolistnego. Stąd też koniecznym było wynalezienie innej metody otrzymywania tego cytostatyku. Nową technologię oparto na inżynierii genetycznej, dzięki której opracowano szczepy grzybów i bakterii zdolnych do wydzielania substancji o takich właściwościach leczniczych³⁷.

Okres ten był również związany z odkryciem pierwszych antybiotyków o działaniu cytotoksycznym. Pierwszą antracyklinę wyizolowano już w latach 50. XX wieku, ale należało poczekać do następnej dekady aby wykazać jej aktywność przeciwnowotworową. Dwie niezależne grupy badawcze z Włoch i z Francji prowadziły badania przesiewowe wśród drobnoustrojów gleby. Poszukiwania te zakończyły się odkryciem właśnie daunorubicyny. Jako iż cechowała ją znaczna toksyczność, postanowiono dokonać pewnej modyfikacji w szczepach *Streptomyces peucetius*, z których ją wyizolowano poprzez działanie na nie *N*-nitrozo-*N*-metylomocznikiem. W ten sposób otrzymano jej pochodną doksorubicynę ze zmniejszonymi efektami ubocznymi. W tym samym czasie w 1966 roku japoński badacz Hamao Umezawa prowadząc eksperymenty ze szczepami *Streptomyces verticillus* wyizolował kolejny tego typu cytostatyk – bleomycynę³⁸.



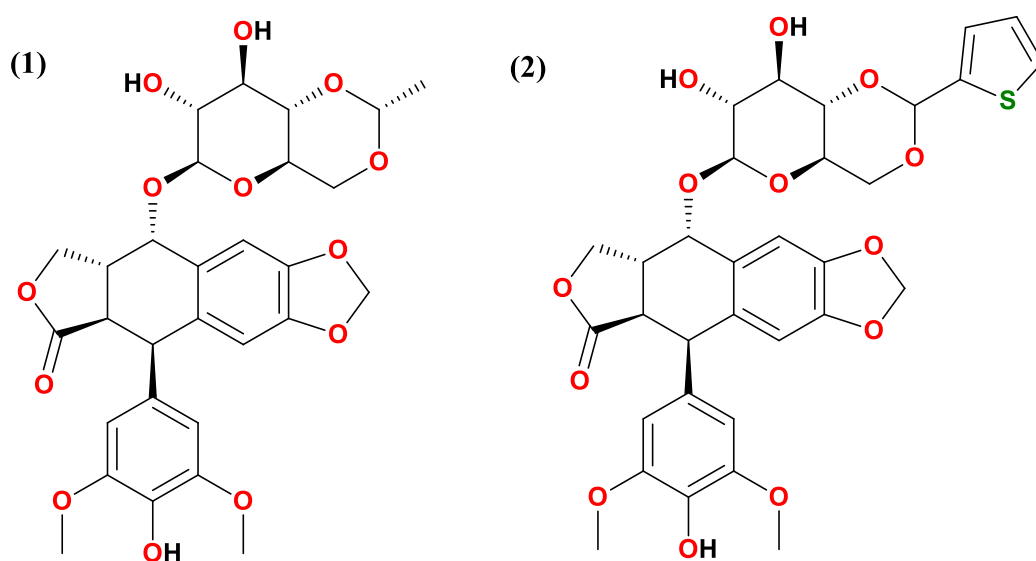
Ryc. 12. Struktura chemiczna daunorubicyny (1), doksorubicyny (2)

Historia powstania półsyntetycznych pochodnych podofilotoksyny – etopozydyny i tenipozydyny – w 1966 roku jest bardzo długa i zarazem ciekawa. Robert Bentley z Kings College London w 1861 roku zaobserwował lokalny efekt przeciwnowotworowy w badanym wyciągu z korzeni *Podophyllum peltatum*. Po

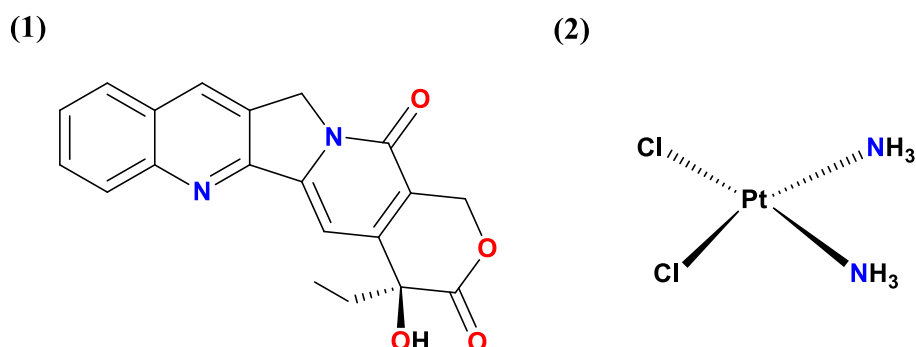
³⁷ Kampan N. C., *op. cit.*

³⁸ Bhattacharya B., Mukherjee S., *Cancer Therapy Using Antibiotics*, „Journal of Cancer Therapy”, 2015, 6: 849–858.

dwudziestu latach Valerian Podwyssotzki odkrył, że substancja czynna korzenia *Podophyllum* jest obojętną substancją krystaliczną o nazwie pikropodofilina, która była związana z nieaktywnym kwasem żywicznym, nazwanym kwasem pikropodofilowym. Ostatecznie oba związki łącznie określono jako podofilotoksynę. W 1946 roku dowiedziono supresji guza w wyniku hamowania funkcji wrzeciona podziałowego, po podaniu podofilotoksyny. To skłoniło badaczy to poszukiwania pochodnych tego związku, które wykazywałyby mniejszą toksyczność, tak też po ponad stu latach wysiłki uwieńczyono sukcesem i dopiero wtedy zaczęto realnie myśleć o wykorzystaniu ich jako cytostatyki³⁹.



Zaobserwowano, że elektroliza platynowymi elektrodami spowodowała powstanie rozpuszczalnego związku platyny, który hamował podział bakterii^{40,41}.



Ryc. 14. Struktura chemiczna kamptotecyny (1) cisplatyny (2)

Filantropka Mary Lasker dzięki swoim koneksją, wiedzy medycznej, a także posiadaniu znacznych zasobów pieniężnych, zdołała przekonać amerykańskie społeczeństwo, członków Kongresu i nawet samego prezydenta Richarda M. Nixona do podpisania umowy *National Cancer Act*. Ustawa ta rozpoczęła narodową walkę z rakiem. Miało to być niejako prezent z okazji Świąt Bożego Narodzenia, bowiem ustawę podpisano 23 grudnia 1971 roku. Działalność tej jednej kobiety miała ogromny wpływ na rozwój chemioterapii nowotworów, który nie byłby możliwy bez finansowego wsparcia, o które tak walecznie dążyła. Zainicjowała ona również zawiązanie w 1964 roku Specjalnego Programu Wirusa Raka (*Special Virus Cancer Council, SVCP*) z dofinansowaniem na 5 mln dolarów. Program ten dzięki poszukiwaniu wirusów jako czynników wywołujących zmiany nowotworowe przyczynił się do rozwoju tak ważnego biologicznego poznania natury raka. Dziś wiadomo, iż około 1/4 wszystkich rodzajów nowotworów jest wynikiem działalności wirusa. Lata 70. XX wieku to narodziny chemioterapii adjuwantowej (uzupełniającej). Zadawalające efekty osiągnięto w przypadku przerzutowego raka jąder, stosując chirurgiczne usunięcie guza z cisplatyną, winblastyną i bleomycyną. Kolejny sukces odnotowano w przypadku raka piersi. Zmniejszenie śmiertelności obserwował Bernie Fisher z użyciem melfalanu (L-PAM), a także Giannini Bonadonna kontynuując pracę zespołu Vincenta T. DeVita z CMF (cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl).⁴²

⁴⁰ Jones G. B. *op. cit.*

⁴¹ DeVita V. T., Chu Edward *op. cit.*

⁴² DeVita V. T. *op. cit.* s. 115–158.

Lata 90. to narodziny leków celowanych, tak dziś popularnych i nakierowanych na medycynę spersonalizowaną. Ich powstanie nie byłoby możliwe bez ogromnego postępu w rozwoju technik molekularno-genetycznych i w konsekwencji poznania natury komórek nowotworowych. Bardzo obrazowy przykład stanowi Gleevec wykorzystywany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Przyczyną jej jest obecność błędnego genu fuzyjnego (BCR-Abl), który koduje nieprawidłowe białko (kinaza tyrozynowa BCR-Abl). Istotny jest tutaj fakt, iż występuje w niej jedna dominująca nieprawidłowość, co w przypadku innych nowotworów nie jest już tak pospolite. Stąd też lek ten jako między innymi inhibitor kinazy BCR-Abl, hamuje powstawanie tego białka, w konsekwencji hamując proliferację i wywołując apoptozę. Ogromny wpływ na rozwój komórkowej teorii powstawania komórek nowotworowych miały prace Boba Wienberga. Zasłynął on z odkrycia pierwszego ludzkiego onkogenu Ras, a także pierwszego genu supresorowego nowotworu Rb. Znanych jest ponad 100 rodzajów nowotworów, ale każdą komórkę nowotworową cechują pewne stałe właściwości. Te cechy zostały przedstawione w przełomowej pracy Weinberga⁴³, a po 11 latach opublikował on kolejną pracę⁴⁴ uaktualniając ją o dwie kolejne cechy: komórka namnaża się w sposób nieograniczony, posiada zdolność do angiogenezy i wytwarzania własnych czynników wzrostowych, wytwarza oporność na zewnętrzne czynniki wzrostowe, zachodzi nieprawidłowa praca metabolizmu komórki, cechuje ją zdolność do przerzutów i inwazyjność. Molekularne poznanie czynników wzrostu stało się motorem napędowym dla dalszego rozwoju terapii celowanej (np. Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny dla Stanley'a Cohena i Rity Levi-Montalcini za prace nad mechanizmem wzrostu komórek). Jednym ze znanych preparatów o tego typu działaniu jest Erbitux (zatwierdzony przez FDA w 2006 roku dla płaskonabłonkowego raka głowy i szyi). Z powodzeniem stosowany wobec raka jelita grubego z ekspresją receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR). W 2007 roku zarejestrowano topotekan, pierwszy doustny inhibitor topoizomerazy I.^{45,46}

4. Dzieje rozwoju chemioterapii nowotworowej w Polsce

Początki chemioterapii w Polsce to przełom lat 50. i 60. XX wieku, miały one swoje miejsce w Instytucie Onkologii w Warszawie utworzonego przy Instytucie

⁴³ Hanahan D., Weinberg R.A., *The hallmarks of cancer*, „Cell” 2000, 1:57–70.

⁴⁴ Hanahan D., Weinberg R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*, „Cell” 2011, 5:646–674.

⁴⁵ DeVita V. T. *op. cit.* s. 229–267.

⁴⁶ Watson J. D. *op. cit.*

Radowym w Warszawie. Instytut Radowy powstał 29 maja 1932 roku, był to piąty z kolei tego typu ośrodek w Europie. Niestety okres II wojny światowej znacznie wpłynął na działalność instytutu. Jednakże do czasu wybuchu wojny pracownicy Instytutu byli autorami ponad pięćdziesięciu prac naukowych⁴⁷. Już w styczniu 1947 roku w jeszcze nieodnowionym budynku, zniszczonym na skutek działań wojennych, powołano do życia trzy działy Instytutu Radowego: radioterapię, patologię oraz chirurgię⁴⁸.



Ryc. 15. Instytut Radowy w Warszawie⁴⁹

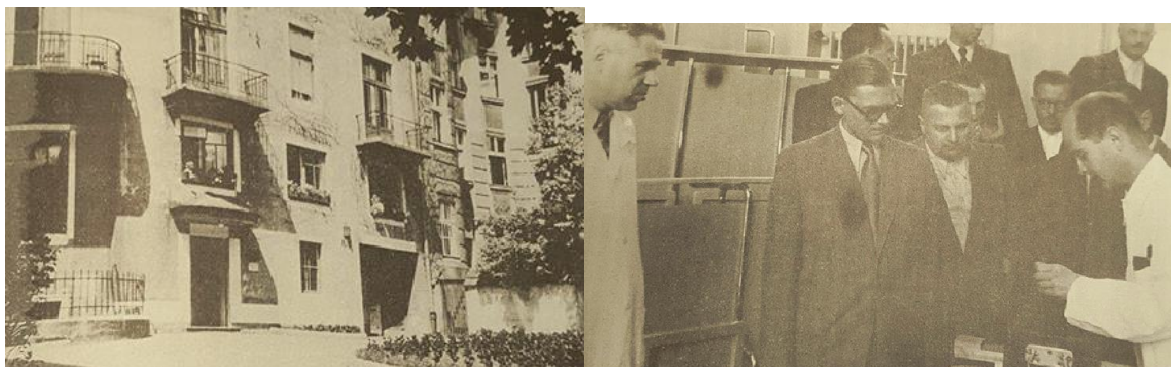
Główne trzy założone przez ówczesną kadrę zadania stanowiły: przeprowadzanie badań podstawowych dotyczących biologii nowotworów, opieka nad chorymi oraz prowadzenie badań klinicznych, a także opracowanie organizacji walki z chorobami nowotworowymi. Dzięki ogromnemu zaangażowaniu profesora Franciszka Łukaszczyka w 1947 roku powstał Państwowy Instytut Przeciwrakowy w Gliwicach, a dwa i pół roku później Szpital Onkologiczny w Krakowie. To zaowocowało powstaniem w 1951 roku Instytutu Onkologicznego im. Marii Curie-Skłodowskiej z centralą w Warszawie oraz Gliwickim i Krakowskim Oddziałem. W Oddziale Gliwickim pionierskie prace nad biologią nowotworów, zarówno w polskim

⁴⁷ *Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 2 lata 1914-1944*, redakcja naukowa prof. dr hab. n. med. W. Noszczyka, prof. dr hab. n. med. J. Supady, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2015, s. 500–502.

⁴⁸ *Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 3 lata 1944-1989*, redakcja naukowa prof. dr hab. n. med. W. Noszczyka, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2016, s.185–190.

⁴⁹ <https://warszawa.fotopolska.eu/649831,foto.html> [dostęp: 23.07.2019].

jak i zagranicznym znaczeniu tego słowa, prowadził prof. dr hab. med. Mieczysław Chorąży⁵⁰.



Ryc. 16. Instytut Onkologii w Krakowie w latach 1951-1984, docent J. Święcki – wieloletni dyrektor Gliwickiego Centrum Onkologii

Po niespełna dwóch latach polscy onkolodzy założyli Centralny Rejestr Nowotworów zbierający dane statystyczne co na tamte czasy było nie lada wyczynem. Równolegle opracowano drugi program walki z rakiem w Polsce. Zakładał on przede wszystkim utworzenie zakładów i wojewódzkich przychodni onkologicznych, przeprowadzanie kursów doszkalających, dokonanie podziału w dziedzinie onkologii na odrębne specjalizacje oraz wydanie podręcznika. Założenia te zostały w bardzo szybki sposób zrealizowane. Już w 1953 roku w onkologii wyróżniano chirurgię, radiologię, chemioterapię oraz patologię. Pierwszy podręcznik wydano w 1955 roku pod redakcją profesor Hanny Kołodziejkiej – „Zarys onkologii”⁵¹.

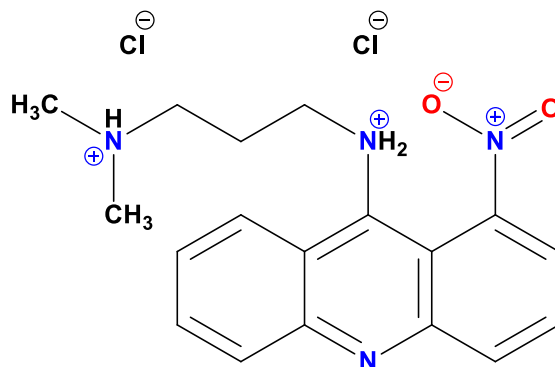
Oficjalna data powstania Kliniki Chemioterapii to rok 1974 (założyciel Kliniki Chemioterapii: prof. dr hab. n. med. Tadeusz Koszarowski⁵²), ale już w latach 50. prof. Jan Buraczewski, wybitny radiolog, jako pierwszy zakładał maskę chirurgiczną, podając cytostatyk – nitrogranulogen. Równolegle w latach 50. w Polskiej Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem profesora Zygmunta Ledóchowskiego, a następnie jego bratanka profesora Andrzeja Ledóchowksiego, prowadzono badania nad poszukiwaniem pochodnych akrydyny o właściwościach przeciwnowotworowych. Po przebadaniu kilkuset związków

⁵⁰ *Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 3 lata 1944-1989 op. cit.*

⁵¹ *Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 3 lata 1944-1989 op. cit.*

⁵² Rubach M., Siedlecki S., *Początki chemioterapii w Polsce: w 40. rocznicę powstania pierwszej w kraju Kliniki Chemioterapii w Instytucie Onkologii w Warszawie*, „NOWOTWORY Journal of Oncology”, 2014, 64:544–550.

stwierdzono, iż grupa nitrowa w pozycji 1 oraz podstawnik aminoalkiloaminowy w pozycji 9 są niezbędne. W ten sposób otrzymano pierwszy polski związek cytotoksyczny – LEDAKRIN⁵³.



Ryc. 17. Struktura chemiczna LEDAKRINU

Pierwszymi pracownikami zespołu warszawskiej kliniki byli dr Józef Zborzil (kierownik Kliniki Chemioterapii w latach 1974-1994 oraz ordynator w Klinice Chemioterapii w latach 1975-1981), dr Anna Żelechowska (zastąpiła z prenumerowania czasopisma *Cancer Chemotherapy Reports*), dr Feliksa Pieńskowska, dr Maciej Żuławski, dr Maryna Rubach, dr Piotr Siedlecki. Wstępne działania pierwszych polskich chemioterapeutów były trudne. Między innymi ze względu na brak osobnego ambulatorium, niewielkiej dostępności leków (początkowo były to tylko dwa, trzy leki – winkrystyna, metotreksat, prokarbazyna). Zadawalające wyniki osiągnęto tylko i wyłącznie wobec nowotworów układu chłonnego⁵⁴.

⁵³ <https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234428/cz3.pdf> [dostęp: 02.06.2019].

⁵⁴ Rubach M., Siedlecki P. *op. cit.*



Ryc. 18. Dr Józef Zborzil i dr Anna Żelechowska⁵⁵

W miarę nabywania doświadczenia zaczęto zwracać uwagę na toksyczność stosowanych leków. Już w 1976 roku dr Piotr Siedlecki oraz dr Adam Michałowski opublikowali w *Nowotworach* artykuł na temat bezpiecznego obchodzenia się z cytostatykami⁵⁶. Historia powstania czasopisma *Nowotwory. Journal of Oncology* jest bardzo ciekawa. Pierwsza wersja czasopisma ukazała się już w kwietniu 1923 roku w formie „Biuletynu Polskiego Komitetu do Zwalczenia Raka” (do 1928 roku). Polacy mogą poszczycić się tak wczesną publikacją czasopisma specjalizującego się w tematyce chorób nowotworowych, bowiem światowi liderzy tematu, tego typu czasopisma publikowali kilka, a nawet kilkanaście lat później. Dzięki temu wiemy dziś, że już w 1929 roku prowadzono fundamentalne badania cenione na całym świecie nad serologiczną charakterystyką nowotworów (autorstwa Ludwika Hirszfelda, Wandy Halberówniej, Józefa Laskowskiego), a także wpływem gruczołów dokrewnych na wzrost guza nowotworowego (autorstwa J. Flaksa, W. Karnickiego).⁵⁷

⁵⁵ *Ibidem* s. 545.

⁵⁶ *Ibidem* s. 547.

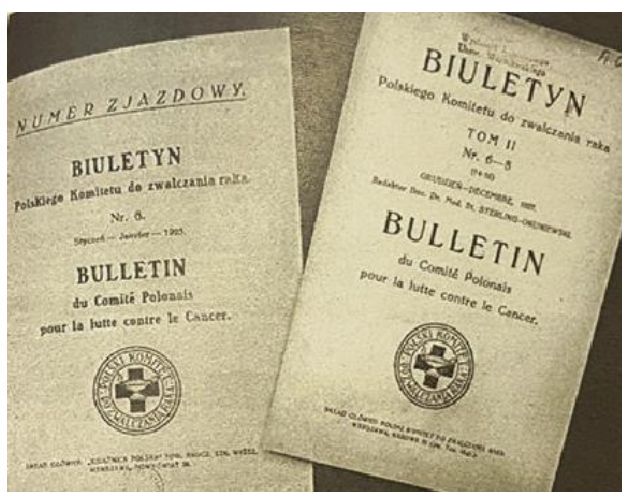
⁵⁷ *Wybrane problemy historii medycyny pięć perspektyw*, pod redakcją Anity Magowskiej i Katarzyny Pękackiej-Falkowskiej, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2017, s. 258–270.

KURS CHEMIOTERAPII NOWOTWORÓW

Wisła, 11–15 października 1976

do druku przygotowali:

A. MICHAŁOWSKI i P. SIEDLECKI



Ryc. 19. Praca dra Siedleckiego i Michałowskiego⁵⁸, „Biuletyn Polskiego Komitetu do Zwalczania Raka” (numer specjalny z roku 1923 o tytule „Nowotwory” pod redakcją Józefa Hornowskiego⁵⁹

Wiele nowych leków, które dopiero co stawały się dostępne, były podawane po raz pierwszy w klinice w Warszawie. Następnie w krótkim czasie powstały Kliniki w Oddziałach Instytutu Onkologii w Krakowie i Gliwicach, a dopiero po kilku latach w Poznaniu, Łodzi i Gdańsku⁶⁰. W roku 1952 narodziła się inicjatywa utworzenia Ośrodka Onkologicznego w Poznaniu. W tym celu w marcu tego roku zapadła decyzja o przeznaczeniu Szpitala Ubezpieczalni Społecznej w Poznaniu przy ul. Garbary (dawniej Raczyński) dla działań w zakresie leczenia onkologicznego. W roku 1968 nazwę szpitala zmieniono na Wojewódzki Szpital Onkologiczny im. Marii Skłodowskiej-Curie, a w 1990 na Wielkopolskie Centrum Onkologii. Po ponad siedmiu latach zmodernizowano budynek szpitala, co zaowocowało powstaniem na jednym piętrze nowych obiektów, w których skład wchodziły: pracownia histopatologiczna, analityki medycznej, mikrobiologii, a także pracownia hodowli tkankowych z przeznaczeniem do oceny chemiozależności ówczynie stosowanych cytostatyków⁶¹.

⁵⁸ Rubach M., Siedlecki S., *op. cit.* s. 547.

⁵⁹ *Wybrane problemy historii medycyny pięć perspektyw op. cit.* s. 259.

⁶⁰ Rubach M., Siedlecki S., *op. cit.* s. 548.

⁶¹ *Materiały do historii walki z rakiem w Polsce*, pod redakcją C. Ramlau, Wydawnictwo Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 1998, s. 107–132.



Ryc. 20. Pierwszy budynek dzisiejszego Wielkopolskiego Centrum Onkologii na Garbarach w okresie międzywojennym; Wojewódzki Szpital Onkologii w Poznaniu; dobudowane skrzydło Wojewódzkiego Szpitala Onkologicznego w Poznaniu; gabinet zabiegowy Oddziału Chemioterapii Kliniki Onkologii z wyciągami laminarnymi polskiej produkcji (firmy POLON z Poznania)⁶²

Profesorowie Andrzej Kułakowski wraz z Jurkiem Meyzą już w latach 60. Ubiegłego wieku przeprowadzali chemioterapię w wyłączonym krążeniu tak zwanej perfuzji kończyn w czerniakach. W latach późniejszych profesor Jurek Meyza zasłynął z przeprowadzania leczenia skojarzonego opartego na chemioterapii i zabiegach chirurgicznych⁶³. W tych samych latach w klinikach Akademii Medycznej we Wrocławiu powstał nowy preparat, który rzekomo miał wykazywać aktywność przeciwnowotworową. Był to preparat torfowy Tołpy, jednakże badania te okazały się być jedną wielką herezją. Autor tego specyfiku Stanisław Tołpa został wydalony z Akademii. Pomimo tego zasługi profesora, absolwenta Akademii Rolniczej we Wrocławiu, były nieocenione, ale w innej dziedzinie, w badaniach bagien i torfowisk.

⁶² *Ibidem* s. 115, 118, 123, 129.

⁶³ Furman R., *Drogi do onkologii Liderzy patrzą wstecz*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa 2017, s. 59–62.

Mimo tych niepowodzeń profesor Tołpa próbował po nieomal dwóch dekadach ponownie wprowadzić preparat na rynek. Postępowanie to zakończyło się kolejnym fiaskiem. Ostatecznie oficjalnie potwierdzono brak właściwości przeciwnowotworowych, ale substancja ta jest dziś sprzedawana jako suplement regeneracyjno-wspomagający⁶⁴.

Rok założenia kliniki w Warszawie (1974) datuje się również jako początek współpracy chemioterapeutyków w ramach RWPG (Rady Wzajemnej Pomocy Gospodarczej państw socjalistycznych). Ze strony polskiej czołową rolę odgrywali w niej dr Józef Zborzil, dr Piotr Sedlecki, dr Czesław Radzikowski oraz dr Marek Pawlicki. Pomimo wieloletnich politycznych obwarowań rada ta zdołała między innymi opracować jednolite kryteria oceny leczenia nowotworów, a także prowadzić owocne badania kliniczne. Po rozpadzie RWPG grupa przekształciła się w *South-East European Study Group*, a od 1999 roku po dziś dzień nosi nazwę *Central European Cooperative Oncology Group (CECOG)*⁶⁵.



Ryc. 21. Rada Pełnomocników z lat 70. XX wieku, od lewej siedzą: Z. Dienstbier, N. Błochin, I. Todorow, M. Marinello, S. Eckhard; wśród stojących: N.N. Trapeznikow, M. Bojewa, A. Kułakowski, O. Mioduszevska⁶⁶

W początkowych latach działania kliniki dr Piotr Siedlecki opracował broszurę „Wybrane schematy leczenia chemicznego nowotworów” – skrypt Instytutu Onkologii.

⁶⁴ *Ibidem* s. 123–124.

⁶⁵ Kułakowski A., *Współpraca polskich onkologów z krajami Europy Centralnej I Wschodniej (RWPG) w latach 1973-1990*, „NOWOTWORY Journal of Oncology”, 2011, 61:501–508.

⁶⁶ *Ibidem* s. 503.

Była to prawdopodobnie pierwsza tego typu praca opublikowana na świecie⁶⁷. W roku 1976 zorganizowano I Międzynarodowy Kurs Chemioterapii w Wiśle, który przyczynił się do poszerzenia wiedzy polskich chemioterapeutów, dzięki obecności światowych autorytetów tej dziedziny. Organizatorem przedsięwzięcia był ówczesny docent Adam Michałowski. Na tym wydarzeniu omawiano zalety pierwszego polskiego chemioterapeutyku (Ledakwinu), a ponadto ustalono ujednoliconą terminologię – leczenia uzupełniającego, wspomagającego oraz podtrzymującego. Trzy lata później zorganizowano pierwszą w Polsce międzynarodową konferencję poświęconą eksperymentalnej chemioterapii nowotworów, za sprawą profesora Janika i Radzikowskiego^{68,69}. W latach 70. XX wieku ukazała się pierwsza praca o tematyce chemioterapii nowotworów (polskiego autorstwa) o cyrkulacji międzynarodowej. Artykuł wydano w 1976 roku w *Archives für Geschwulstforschung*, autorstwa prof. dr hab. n. med. Wiesława Wiktora Jędrzejczaka *et al.*,⁷⁰ *notabene* pioniera polskiej hematologii, który przeprowadził w 1984 roku pierwszy zabieg allogenicznego przeszczepu szpiku. W pracy tej zostały zaprezentowane wyniki dotyczące później poszerzonej już tematyki skutków ubocznych chemioterapii nowotworów. Precyzując, w tym przypadku chodziło o zastosowanie synchronizowanej chemioterapii wobec pacjentów z rakiem płuc. W tamtych czasach nie wiedzano jeszcze o zróżnicowaniu na raka niedrobnokomórkowego i drobnokomórkowego płuc, ale w przypadku tego drugiego połączenie w leczeniu metotreksatu z cyklofosfamidem okazywało się być skuteczne. Tak jak i na arenie międzynarodowej badania tego typu nie spotykały się ze zbyt wieloma pochlebstwami, panowało przekonanie, iż polichemioterapia to zbędny precedens niepotrzebnie narażający organizm na jeszcze bardziej spotęgowane działania toksyczne. Jednakże w tym przypadku odnotowywano zadawalające efekty, a wszystko dzięki obserwacjom poczynionym podczas badań naukowych prowadzonych z modelem ludzkich limfocytów⁷¹.

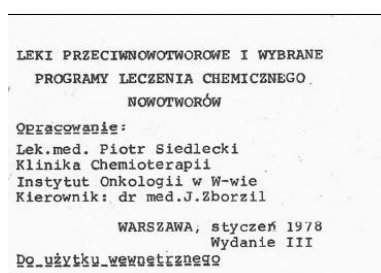
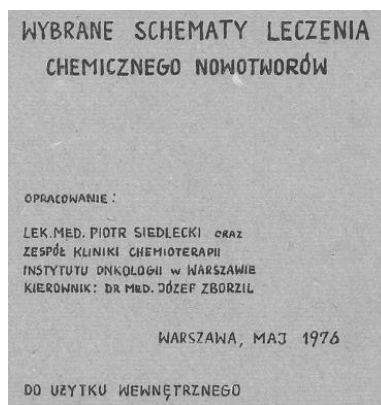
⁶⁷ Rubach M., Siedlecki S., *op. cit.* s. 549–550.

⁶⁸ *Ibidem*, s. 548.

⁶⁹ *Onkologia Kliniczna Tom I*, redakcja prof. dr hab. med. Macieja Krzakowskiego, Wydawnictwo Medyczne Borgis® Pod patronatem Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, Warszawa 2006, s. 15–23.

⁷⁰ Jędrzejczak W., Siekierzyński M., Dziuk E., Czarnecki C., Bielec M., *Combination of ametopterine (MTX) and cyclophosphamide (CPM) based on the principle of partial synchronization of cell proliferation in lung cancer. Phase II study*, „Archiv für Geschwulstforschung”, 1976, 46(6): 471–7.

⁷¹ Furman R., *op. cit.* s. 20–37.



Ryc. 22. Broszura dra Siedleckiego⁷²

Niestety lata 80. ubiegłego wieku nie były łatwe dla chemioterapeutów, w tym profesora Tadeusza Pieńkowskiego. Zły stan rzeczy był wynikiem deficytu w preparatach farmakologicznych, niestety liczba dostępnych cytostatyków nie była wystarczająca dla chorujących na choroby nowotworowe⁷³. Dopiero w 1977 roku w ramach Polskiego Towarzystwa Onkologicznego (PTO) utworzono sekcję Chemioterapii, która corocznie efektywnie poszerzała wiedzę lekarzy. Natomiast dzięki staraniom tej sekcji w 1985 roku Ministerstwo Zdrowia zatwierdziło nową specjalizację lekarską – chemioterapia nowotworów. Co ciekawe, Polska była drugim krajem w Europie po Węgrzech, w którym chemioterapia nowotworów została uznana jako odrębna specjalizacja. W 2003 roku została ona przekształcona w onkologię kliniczną. W roku 2011 Parlament Europejski w wyniku działań i nalegań ze strony wielu organizacji i towarzystw medycznych, zatwierdził onkologię medyczną jako samodzielną specjalizację. Europejska onkologia medyczna jest odpowiednikiem polskiej onkologii klinicznej. Pierwszy polski podręcznik „Onkologii klinicznej” pod redakcją profesora Tadeusza Koszarowskiego, *notabene* zwanego protoplastem polskiej chirurgii onkologicznej i terminu onkologia, ukazał się już w

⁷² Rubach M., Siedlecki S., *op. cit.* s. 548.

⁷³ Furman R., *op. cit.* s. 92.

1985 roku⁷⁴. Kolejna pozycja „Chemioterapia” ukazała się trzy lata później pod redakcją profesora Grzegorza Madeja. Na rozwój współczesnej onkologii klinicznej ogromny wpływ miało wydanie pozycji pod redakcją profesora Macieja Krzakowskiego (aktualnego Konsultanta Krajowego w dziedzinie onkologii klinicznej) i dra Piotra Siedleckiego – „Standardy leczenia systemowego nowotworów złośliwych u dorosłych” (1999 rok). Sekcję Chemioterapii PTO w 1996 roku zastąpiono Polskim Towarzystwem Onkologii Klinicznej (PTOK), które aktywnie po dziś dzień współpracuje z ESMO (*European Society of Medical Oncology*) aby zapewnić nam pacjentom opiekę na jak najwyższym poziomie, dorównując światowym standardom onkologii klinicznej^{75,76}.

5. Podsumowanie

Oficjalnie chemioterapia nowotworów (onkologia kliniczna) rozwija się od niespełna osiemdziesięciu lat. Na przestrzeni tych kilku dekad dokonano wielu licznych osiągnięć. Ten bujny okres rewolucji rozpoczął się od gazu bojowego, syntezy antymetabolitów i izolowania związków pochodzenia naturalnego. Punkt przełomowy to wprowadzenie schematów kombinacyjnych czy terapii wspomaganych. Końcowe lata ubiegłego wieku zostały zdominowane przez terapie biologiczne, które aktualnie wykorzystują leczenie cytokinami i czynnikami wzrostu, przeciwciałami monoklonalnymi, swoistą immunoterapię, terapie genowe czy też terapie zaburzające proces angiogenezy. Pomimo ogromnego postępu w nowych technologiach i metodach leczniczych, o którym świadczy między innymi ubiegłoroczna Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny przyznana za działania na polu immunoterapii, tradycyjna chemioterapia nowotworowa nadal jest wykorzystywana w leczeniu. Zarówno jako metoda radykalna zwłaszcza w nowotworach hematologicznych, czy też jako wstępna czy uzupełniająca działania chirurgiczne, radioterapię czy leczenie celowane. Na chwilę obecną lekarze dysponują zasobem ponad 200 leków przeciwnowotworowych, które zostały dopuszczone do użytku klinicznego przez Agencję Żywności i Leków (FDA od ang. *Food and Drug Administration*). Wśród tej liczby większość stanowi leki celowane, a pozostałe 63 to cytostatyki. Znaczenie ma tutaj fakt, iż dzięki chemioterapii

⁷⁴ *Onkologia Kliniczna Tom I op. cit. s. 21–23.*

⁷⁵ *Ibidem, s. 22–23.*

⁷⁶ Rubach M., Siedlecki S., *op. cit. s. 550.*

nowotworów możliwe jest wyleczenie niektórych typów nowotworów, a w jeszcze większej ich liczbie doprowadzić do tego, iż choroba nowotworowa staje się chorobą przewlekłą, a nie śmiertelną. Pociuszającym jest to, że dokonania na przełomie niecałych osiemdziesięciu lat potrafiły tak zmienić krzywe umieralności, bowiem wskaźnik umieralności z powodu chorób nowotworowych od około 1900 roku zamiast nadal wzrastać liniowo, zaczął zwalniać i zbliżać się do *plateau*. Na zakończenie należałoby rzec, że nam pacjentom, nie pozostało nic innego jak tylko zmniejszać prawdopodobieństwo zachorowania na chorobę nowotworową poprzez działania prewencyjne: zdrową dietą, ruchem, braniem udziału w badaniach przesiewowych, regularnymi badaniami kontrolnymi i w końcu unikaniem stresu, bo przecież psychoonkologia to prężnie rozwijająca się odnoga onkologii.

Bibliografia:

Baguley Bruce C., Kerr David J., *Anticancer Drug Development*, Academic Press 2002.

Bhattacharya Biplob, Mukherjee Sreya, *Cancer Therapy Using Antibiotics*, „Journal of Cancer Therapy”, 2015, nr 6.

DeVita Vincent T., Chu Edward, *A History of Cancer Chemotherapy*, „Cancer Research”, 2008, 68 (21): 8643–8653.

DeVita Vincent T., *Śmierć raka*, Kurhaus Publishing, Warszawa 2016.
Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 2 lata 1914-1944, redakcja naukowa prof. dr hab. n. med. Wojciecha Noszczyka, prof. dr hab. n. med. Jerzego Supady, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2015.

Dzieje medycyny w Polsce Opracowania i szkice tom 3 lata 1944-1989, redakcja naukowa prof. dr hab. n. med. Wojciecha Noszczyka, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2016.

Falzone Luca, Salomone Salvatore, Libra Massimo, *Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium*, „Frontiers in Pharmacology”, 2018, 9, DOI: 10.3389/fphar.2018.01300.

Hanahan D., Weinberg R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*, „Cell” 2011, nr 5.

Hanahan D., Weinberg R.A., *The hallmarks of cancer*, „Cell” 2000, nr 1.

Jędrzejczak W., Siekierzyński M., Dziuk E., Czarnecki C., Bielec M., *Combination of ametopterine (MTX) and cyclophosphamide (CPM) based on the principle of partial synchronization of cell proliferation in lung cancer. Phase II study*, „Archiv für Geschwulstforschung”, 1976, nr 46(6).

Jimenez Paula Christine, Veras Wilke Diego, Veras Costa-Lotufolli Leticia, *Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans*, „CLINICS” 2018, nr 73 (suppl 1).

Jones Graham B., *History of Anticancer Drugs*, In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2014, DOI: 10.1002/9780470015902.a0003630.pub2.

Kampan Nirmala Chanralega, Madondo Mutsa Tatenda, NcNally Orla M., Quinn Michael, *Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer*, „BioMed Research International”, 2015, DOI: 10.1155/2015/413076.

Kułakowski Andrzej, *Współpraca polskich onkologów z krajami Europy Centralnej i Wschodniej (RWPG) w latach 1973-1990*, „Nowotwory Journal of Oncology”, 2011, nr 61.

Lenartowicz Jacek, *Leczenie chirurgiczne nowotworów na przestrzeni wieków ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów jamy ustnej*, „Nowotwory”, 2000, nr 50.

Magner Lois N., *A History of Medicine*, Taylor & Francis 2005.

Materiały do historii walki z rakiem w Polsce, pod redakcją C. Ramlau, Wydawnictwo Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 1998.

Moudi Maryam, Go Rusea, Yong Seok Yien Christina, Nazre Mohd, *Vinca Alkaloids*, „International Journal of Preventive Medicine”, 2013, nr 4(11).

Mould Richard F., *Rozwój wiedzy o raku od najdawniejszych czasów do końca XVIII wieku*, „Nowotwory Journal of Oncology”, 2008, nr 58.

Mukherjee Siddhartha, *Cesarz wszech chorób Biografia raka*, Wydawnictwo Czarne, Wołowie 2013.

Onkologia Kliniczna Tom I, redakcja prof. dr hab. med. Macieja Krzakowskiego, Wydawnictwo Medyczne Borgis® Pod patronatem Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, Warszawa 2006.

Onkologia Podręcznik dla studentów i lekarzy, pod redakcją Jacka Jassema i Radziława Kordka, VIA MEDICA, Gdańsk 2019.

Renata Furman, *Drogi do onkologii Liderzy patrzą wstecz*, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa 2017.

Roth H.J., Schubert-Zsilavec M., Steinhilber D, *Chemia medyczna cle leków – substancje czynne – biologia chemiczna*, MedPharm Polska, Wrocław 2012.

Rubach Maryna, Siedlecki Piotr, *Początki chemioterapii w Polsce: w 40. rocznicę powstania pierwszej w kraju Kliniki Chemioterapii w Instytucie Onkologii w Warszawie*, „NOWOTWORY Journal of Oncology”, 2014, nr 64.

Watson James D., Berry Andrew, Davies Kevin, *DNA Historia Rewolucji Genetycznej*, Wydawnictwo CiS, Stare Groszki 2018.

Wybrane problemy historii medycyny pięć perspektyw, pod redakcją Anity Magowskiej i Katarzyny Pękackiej-Falkowskiej, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2017.

Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych, praca zbiorowa pod redakcją prof. dr hab. med. Krystyny Orzechowskiej-Juzwenko, Volumed, Wrocław 2000.

<http://onkologia.org.pl/nowotwory-zlosliwe-ogolem-2/> [dostęp: 23.07.2019].

<https://atlas.roslin.pl/plant/8565> [dostęp z dnia: 25.07.2019].

<https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234428/cz3.pdf> [dostęp: 02.06.2019].

https://gco.iarc.fr/today/online.analysismap?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=globe&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D [dostęp: 23.07.2019].

<https://ocean.si.edu/ocean-life/invertebrates/sea-sponge-hiv-medicine> [dostęp: 26.07.2019].

<https://sjp.pwn.pl/sjp/chemoterapia;2447980.html> [dostęp: 01.06.2019].

<https://warszawa.fotopolska.eu/649831,foto.html> [dostęp: 23.07.2019].

<https://www.amazon.in/MG-Naturals-Catharanthus-Roseus-Nithya-Kalyani-Live/dp/B01N586YDM> [dostęp: 26.07.2019].

<https://www.ancient-origins.net/history-famous-people/paracelsus-father-toxicology-and-enemy-physicians-003958> [dostęp: 20.07.2019].

<https://www.dana-farber.org/about-us/history-and-milestones/sidney-farber,-md/> [dostęp: 23.07.2019].

https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf [dostęp: 01.06.2019].

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/biographical/> [dostęp: 20.07.2019].

https://www.yalecancercenter.org/Answers_July_6_08_89594_5_v1.pdf [dostęp: 28.06.2019].

Wykaz skrótów:

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukemia*)

AML – ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*)

Ara-C – arabinozyd cytozyny, cytarabina

BCR-Abl – gen fuzyjny BCR-Abl; BCR (*breakpoint cluster region*, locus 22q11.21),
Abl (gen mysiej białaczki Abelsona, locus 9q34.1)

BIKE – zmiany cykli podawania leków kombinacji POMP

CECOG – *Central European Cooperative Oncology Group*

CMF – nazwa kombinacji leków: *Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-Fluorouracil*

CML – przewlekła białaczka szpikowa (ang. *chronic myeloid leukemia*)

C-MOPP – nazwa kombinacji leków: *Cyclophosphamide, Oncovin, Procarbazine, Prednisone*

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

ESMO - *European Society of Medical Oncology*

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

5-FU – 5-fluorouracyl

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*)

L-PAM – melfalan

MOPP – nazwa kombinacji leków: *Nitrogen Mustard, Oncovin, Procarbazine, Prednisone*

NCI – Narodowy Instytut Raka (ang. *National Cancer Institute*)

POMP – nazwa kombinacji leków: *Purinethol, Oncovin, Methotrexate, Prednisone*

PTOK – Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

PTO – Polskie Towarzystwo Onkologiczne

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RWPG – Rada Wzajemnej Pomocy Gospodarczej państw socjalistycznych

SVCP – Specjalny Program Wirusa Raka (ang. *Special Virus Cancer Council*)

VAMP – nazwa kombinacji leków: *Vincristine Sulfate, Adriamycin (Doxorubicin Hydrochloride), Methotrexate, Prednisone*

Jednodniowe, silikonowo-hydrożelowe soczewki kontaktowe jako nośnik cyklosporyny A w leczeniu chorób oczu

Wstęp

Choroby oczu dotyczą wiele osób na całym świecie. Powszechnie stosowaną drogą podaży leków okulistycznych jest używanie preparatów w postaci kropli do oczu. Jest to jednak aplikacja, która z kilku powodów wiąże się z ryzykiem niskiej skuteczności leczenia. Pierwszym, dużej wagi, jest nie przestrzeganie przez pacjenta zaleceń lekarskich, w tym nieprawidłowe zakraplanie leku lub pomijanie dawkowania. Ograniczona skuteczność wiąże się także z nanoszeniem leku w postaci porcji zwanych „bolusami” zakraplanych do oka w sposób nieciągły, ekspozując oko na krótkotrwałe działanie stosunkowo dużych stężeń leku. Problematyczna jest także słaba penetracja rogówki i wnikanie leków do wnętrza oka ograniczające ich biodostępność. Szacuje się, że na skutek łzawienia oraz mrugania, które zmywają bolus z powierzchni oka, blisko 90 do 99% dawki leku nie dociera do założonego obszaru oka¹.

Alternatywą dla podniesienia skuteczności dawkowania leków jest ich podawanie poprzez soczewki kontaktowe, których powierzchnia jest pokrywana zalecanym lekiem. Potencjał takiej metody tkwi przede wszystkim w możliwości dostarczania leku do oka w sposób ciągły, w szczególności u pacjentów, którzy używają soczewek kontaktowych w codziennej rutynie. Zastosowanie soczewek silikonowo - hydrożelowych stwarza ponadto możliwość dostarczania leku nieprzerwanie zarówno w trybie nocnym jak i dziennym, co może prowadzić do przyspieszenia procesu zdrowienia. Użycie soczewek kontaktowych daje także możliwość zaniechania stosowania konserwantów w tym BAK (*Benzaalkonium chloride*, Chlorek benzalkoniowy), rutynowo dodawanych do kropel do oczu. Konserwanty w preparatach okulistycznych często odpowiedzialne są za pieczenie, swędzenie, wzmożone łzawienie zmniejszając komfort, a także skuteczność leczenia. Soczewki kontaktowe uważane są za nieinwazyjne, proste w aplikacji oraz stosunkowo łatwo dostępne i tanie. Co więcej, hydrożelowe soczewki mogą stanowić

¹ Mc Namara N.A., Poise K.A., Brand R.J., Graham A.D., Chan J.S., Mc Kenney C.D., *Tear mixing under a soft contact lens: effects of lens diameter*, Am. J. Ophthalmol. 1999, 127.

dobry nośnik preparatów o właściwościach hydrofobowych, trudno rozpuszczalnych w wodzie. Już w 1965 roku, kiedy miękkie soczewki kontaktowe wprowadzono na rynek, rozważano możliwość ich zastosowania jako nośnika środków farmaceutycznych podawanych miejscowo². Od tego czasu w wielu badaniach określano zdolność soczewek kontaktowych do poprawy penetracji rogówki i biodostępności stosowanych miejscowo środków farmaceutycznych³⁻⁸.

Cyklosporyna jest związkiem silnie hydrofobowym, o bardzo ograniczonej rozpuszczalności w roztworach wodnych. Charakteryzuje ją wysoki współczynnik podziału w stosunku do polimerowych soczewek kontaktowych. I tak, porównanie współczynników podziału dla hydrofobowych soczewek silikonowych SiH oraz hydrofilowych p-HEMA pokazało, że te pierwsze wykazują znacznie wyższe powinowactwo do CyA. W konsekwencji czas uwalniania CyA z soczewek hydrofilowych p-HEMA jest dużo krótszy (1 dzień)^{9,10} niż z soczewek SiH (15 dni). Przy czym, iloraz czasu uwalniania CyA jest w przybliżeniu równy ilorazowi współczynników podziału⁹. Przyczyna takiego zróżnicowania tkwi w dużej masie molowej CyA oraz w jej wysokim powinowactwie do powierzchni soczewki SiH. Duży rozmiar cząsteczki oraz silne wiązanie leku z polimerem soczewki obniża zdolność dyfuzyjną CyA wydłużając jej czas uwalniania. Dodatkowo stwierdzono, że możliwe jest wydłużenie czasu uwalniania leku z soczewki hydrofilowej p-HEMA, poprzez wprowadzenie do roztworu inkubacyjnego w postaci 10 % roztworu witaminy E^{11,12}. W takim przypadku czas uwalniania określono na 30 dniowy. Witamina E zwiększa

² Sedlacek, J., *Possibilities of application of eye drugs with the aid of gel-contact lenses.*, Cs. Oftal. 1965, 21.

³ Silbert, J.A., *A review of therapeutic agents and contact lens wear*, J. Am. Optom. Assoc. 1996, 67.

⁴ Horne, R.R., Jude K.E., Pitt W.G., *Rapid loading and prolonged release of latanoprost from a silicone hydrogel contact lens*, J. of Drug Deliv. Sci. and Tech. 2017, 41.

⁵ Baudouin C., Labbe A., Liang H., Pauly A., Brignole - Baudouin F., *Progress in Retinal and Eye Research* 2010, 29.

⁶ Xu J., Xu Y., Hu G., Lin T., Gou J., Yin T., He H., Zhang Y., Tang X., *A comprehensive review on contact lens for ophthalmic drug delivery*, J. Controlled Release 2018, 281.

⁷ Hui A., Willcox M., *In vivo studies evaluating the use of contact lenses for drug delivery*, Optom. Vis. Sci. 2016, 93.

⁸ Molssseiev E., Loewenstein A., *Drug delivery to the posteriori segment of the eye*, Dev. Ophthalmol. 2017, 58.

⁹ Peng C.C., Chauhan A., *Extended cyclosporine delivery by silicone–hydrogel contact lenses*, J. of Controlled Release 2011, 154.

¹⁰ Kapoor Y., Chauhan A., *Drug and surfactant transport in Cyclosporine A from Brij-98 laden p-HEMA hydrogels*, J. Colloid Interface Sci. 2008, 322 (2).

¹¹ Kim C.C., Peng A., Chauhan A., *Extended release of dexamethasone from silicone hydrogel contact lenses containing vitamin E*, J. Control Release 2010, 148.

¹² Peng A., Kim C.C., Chauhan A., *Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone hydrogel contact lenses containing Vitamin E diffusion barriers*, Biomaterials 2010, 31 (14).

powinowactwo CyA do powierzchni polimeru, obniżając potencjalne ryzyko niepożądanego przenikania leku do roztworu, w którym soczewka jest przechowywana do momentu aplikacji do oka.

Ważnym aspektem, który należy brać pod uwagę podczas modyfikacji powierzchni soczewek kontaktowych jest ewentualny wpływ naniesionych leków na parametry krytyczne soczewki, w tym moc soczewki. Stwierdzono, że witamina E powoduje niewielki wzrost współczynnika refrakcji jednakże, nie powoduje to zmienności mocy soczewki podczas jej użytkowania, ponieważ witamina E nie jest uwalniana z powierzchni soczewki⁹.

Przedstawione w pracy badania dotyczą zastosowania jednodniowych silikonowo-hydrożelowych soczewek kontaktowych jako nośnika cyklosporyny A (CyA). Soczewki tego typu, w odróżnieniu do dawniej stosowanych hydrofilowych soczewek p-HEMA, charakteryzują się wysoką przenikliwością dla tlenu, co stwarza możliwość ich użytkowania także w trybie nocnym. W prezentowanej metodzie soczewki zanurzano w roztworze leku przez określony badaniem czas, a następnie umieszczano w roztworze buforowym o składzie i wartości pH zbliżonej do płynu łzowego (sztuczny płyn łzowy, Artificial Lacrimal Fluid, ALF) w ilości odpowiadającej dziennej produkcji łez przez ludzkie oko⁹. Celem badania była ilościowa ocena procesu nanoszenia i uwalniania CyA na i z jednodniowych silikonowo - hydrożelowych soczewek kontaktowych. Zaproponowano kilka przedziałów czasowych nanoszenia leku od 12 godzin do 20 dni. Następnie soczewki poddawano uwalnianiu leku zanurzając je w sztucznym płynie łzowym, na kolejne pierwszą, trzecią, piątą, siódmą, dziewiątą, dwunastą i dwudziestą czwartą godzinę ekspozycji w ALF. W badaniach zaobserwowano wysokie początkowe uwalnianie leku, po którym następowało wolniejsze, długotrwałe w ciągu kolejnych 12 godzin. Badania ilościowe prowadzono z zastosowaniem HPLC. Mechanizm działania soczewki można opisać następująco: soczewka działa jako rezerwuar, powoli uwalniając lek do łez, gdy ogólne stężenie leku w filmie łzowym maleje¹³. Można w ten sposób

¹³ Leshner, G.A., Gunderson, G.G., *Continuous drug delivery through the use of disposable contact lenses*, *Optometry Vision Sci.* 1993, 70.

wydłużyć czas kontaktu leku z rogówką¹⁴, a tym samym poprawić biodostępność leku do całej struktury oka¹⁵.

1. Materiały i metoda

1.1. Soczewki

Do badań użyto komercyjnie dostępne silikonowo - hydrożelowe, jednodniowe soczewki kontaktowe hilafilcon B, Soflens Daily Disposable, Bausch&Lomb®, 59% wody, o krzywiznie 8.6 mm, średnicy 14.2 mm oraz mocy -1 D, zanurzone w soli fizjologicznej zawierającej bufor fosforanowy. Soczewki zakupiono w ogólnodostępnych drogeriach kosmetycznych.

Badania prowadzono w dwóch równoległych seriach pomiarowych. Seria pierwsza prowadzona na soczewkach pochodzących wprost z oryginalnego opakowania (SN, soczewki nieprzemylwane).

Druga seria dotyczyła soczewek wstępnie przygotowanych (SP, soczewki przemylwane). W tym celu, soczewki wyjmowano z oryginalnego opakowania i umieszczano w probówce typu *Eppendorf*. Dodawano 2 mL DIW (DIW, *deionised water*) i pozostawiano na 2 h. Procedurę powtarzano 3 krotnie.. Tak przygotowane soczewki osuszano i poddawano nanoszeniu leku.

1.2. Roztwór do inkubacji leku

Cyklosporyna A (CyA) zakupiono w formie roztworu do infuzji, *Novartis, Sandimmun, 50 mg/ml*. Kolejne roztwory powstawały przez rozcieńczenie leku w płynie do czyszczenia, dezynfekcji, płukania soczewek kontaktowych wszystkich rodzajów, *Multi purpose solution, ReNu, MultiPlus, Bausch&Lomb*, zakupionego w drogerii kosmetycznej. Przygotowano następujące stężenia roztworów CyA: 1, 0.5, 0.1, 0.02 mg/mL.

1.3. Roztwór do uwalniania leku

Uwalnianie leku prowadzono z wykorzystaniem roztworu buforowego, o składzie i $\text{pH}=7.9\pm 0.3$ imitującym ludzki płyn łzowy (ALF, *Artificial Lacrimal Fluid*).

¹⁴ Hehl, E.M., Beck, R., Luthard, K., Guthoff, R., Drewelow, B., *Improved penetration of aminoglycosides and fluoroquinolones into the aqueous humour of patients by means of Acuvue contact lenses*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1999, 55.

¹⁵ Bawa, R., *Ocular Inserts*. Mitra, New York 1993.

W tym celu odważono 6.78 g NaCl (Merck, Poland), 2.18 g NaHCO₃ (Merck, Poland), 1.38 g KCl (Merck, Poland); i 0.06 g bezwodnego CaCl₂ (Merck, Poland) i rozpuszczono w 1000mL DIW.

1.4. Próba kontrolna

Trzy soczewki dla obu serii pomiarowych (SNK, soczewka nieprzemiana kontrolna) oraz (SPK, soczewka przemiana kontrolna) zanurzono w roztworze buforowym na określony badaniem czas. Uzyskany w ten sposób roztwór poddawano analizie chromatograficznej w zakresie od 210 do 350 nm.

1.5. Metoda pomiarowa

Do określenia obecności CyA w roztworach poekstrakcyjnych zastosowano analizę chromatograficzną z wykorzystaniem techniki HPLC. Do badań użyto wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Shimadzu LC Workstation z detektorem DAD, wyposażony w kolumnę chromatograficzną NUCLEOSIL®100-5 C18, (250 mm x 4.6 mm; 5 µm). Ustalono następujące parametry analizy: faza ruchoma acetonitryl/woda w stosunku 80:20 (v/v), przepływ fazy ruchomej: 1mL/min, objętość próbki dozowanej 20 µl, temperatura pomiaru: 40 °C, ciśnienie w kolumnie: 6.4 MPa, czas analizy: 15 min, analityczna długość fali λ=210 nm.

1.6. Krzywa kalibracyjna

Krzywa kalibracyjna została sporządzona dla serii roztworów CyA powstałych przez rozcieńczenie roztworu CyA, Sandimmun w zakresie od 0 do 1 mg/mL. Parametry krzywej wzorcowej przedstawiono w

Tab. 1

Tab. 1. Parametry krzywej kalibracyjnej

1.7. Nanoszenie leku

Nanoszenie CyA odbywało się w identycznym trybie dla soczewek przemywanych (SP) i nieprzemywanych (SN). Zastosowano cztery stężenia CyA: A=0.02 mg/mL, B=0.1 mg/mL, C=0.5 mg/mL, D=1.0 mg/mL. Soczewkę umieszczoną w próbówce *Eppendorf*, zanurzano w 2 mL roztworu leku o określonym stężeniu i pozostawiono na 20, 16, 14 dni oraz 24 i 12 godziny. Stale monitorowano temperaturę otoczenia, która wynosiła 21 ± 2 °C.

1.8. Uwalnianie leku

Soczewki, z naniesionym lekiem, zanurzono w 3.5 mL sztucznego płynu łzowego (ALF). Objętość ALF odpowiada dobowej ilości⁹ uwalnianego płynu łzowego przez zdrowego człowieka. Soczewkę pozostawiono w tej porcji płynu na określony badaniem czas. Po tym czasie, soczewkę przenoszono do nowej porcji ALF (3.5 mL) i pozostawiono na kolejny określony procedurą czas. Ostatecznie, wymywanie leku z pojedynczej soczewki monitorowano przez 52 godziny w interwałach czasowych wskazanych w

Tab. 2.

Proces powtarzano pięciokrotnie. Przez cały czas uwalniania leku monitorowano temperaturę otoczenia, która utrzymywała się na poziomie 21 ± 2 °C. Każdy cykl, dla pojedynczej soczewki, powtarzano minimum trzykrotnie. Skolekcjonowane roztwory, szczelnie zamknięte, przechowywano w lodówce. Stężenie uwolnionej CyA określono stosując technikę HPLC.

Tab. 2. Czas uwalniania CyA

Stężenie CyA [mg/mL]		Czas uwalniania CyA [h]					
A	0.02						
B	0.1	1	3	8	16	28	52
C	0.5						
D	1						
A*	0.02	1	3	5	7	9	12

*badanie ze zwiększoną liczbą punktów pomiarowych w pierwszych 12 godzinach uwalniania leku

1.9. Analiza statystyczna

Wyniki zilustrowano i poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem MS Excel oraz programu Statistics (IBM SPSS Statistics v. 25) i dostępnych tam narzędzi do analizy danych.

Wszystkie dane zaprezentowano jako średnia \pm SD dla $n=3$. W celu określenia różnic pomiędzy seriami dla poszczególnych stężeń roztworu CyA, a czasem nanoszenia leku zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji 1-ANOVA. W każdym przypadku przyjęto poziom ufności jako statystycznie istotny dla wartości $P < 0.05$.

Z kolei, stosując test post-hoc LSD wskazano wyniki istotnie różniące się od pozostałych. Do oceny różnic statystycznie istotnych pomiędzy wydajnością uwalniania leku z soczewek przemywanych i nieprzemywanych zastosowano test t - studenta.

2. Wyniki

W Tabeli 3 i Tabeli 4 przedstawiono wyniki uzyskane dla procesu adsorpcji i desorpcji CyA na i z soczewek wstępnie przemywanych wodą zdemineralizowaną (CP), oraz soczewek nieprzemywanych (CNP), ekspozowanych na działanie CyA o stężeniu wynoszącym $C=0.5$ mg/mL, odpowiadającemu stężeniu leku w komercyjnie dostępnych preparatach okulistycznych w postaci kropeł do oczu. Z kolei, na Rysunku 1 i 2 zilustrowano powyższe wyniki w postaci grafów.

Zarówno w przypadku soczewki nieprzemywanej CNP, jak i przemywanej CP około 75 % sumarycznie uwolnionego leku zostało wyekstrahowane w pierwszym kroku ekstrakcyjnym. Z kolei, po dwóch godzinach porcja uwalnianego leku stanowiła około 10 % sumarycznie uwolnionego leku, zarówno dla CP i CNP. Porcje leku w 8, 16, 28 oraz 52 godzinie były statystycznie identyczne i stanowiły około 3 % uwolnionej całościowo CyA (CP i CNP). Przy czym, bolus CyA (nanoszenie 12 h) uwolnionej w pierwszej godzinie był o 25 % wyższy dla soczewki nieprzemywanej CNP. Całkowita ilość uwolnionej CyA po 12 godzinach intubacji była wyższa o 25 % dla soczewki CNP (ok. 138 μ g/soczewkę) w stosunku do CP (ok. 110 μ g/soczewkę). Natomiast, porcje leku uwalnianego od 2 do 52 godziny były statystycznie takie same zarówno dla soczewki CNP jak i CP (około 4 μ g/soczewkę).

Jednoczynnikowa analiza wariancji 1-Anova wskazała na statystycznie istotne zróżnicowanie wyników na poziomie istotności 5 %. Można zatem ocenić, iż zarówno stężenie CyA w roztworze do inkubacji jak i wstępne przemywanie soczewek wpływa

na wydajność uwalniania leku. I tak, najlepsze, statystycznie jednakowe wyniki uzyskano dla soczewki nieprzemijanej CNP, inkubowanej przez 12 i 24 h oraz 20 dni

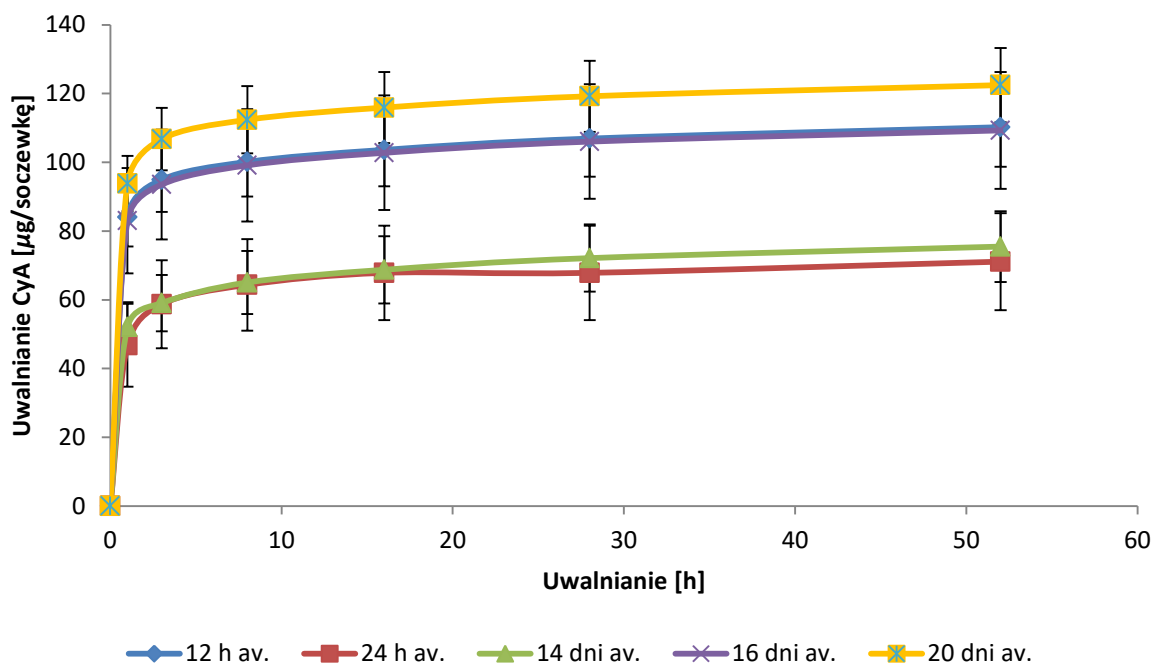
Tab. 4 i Rys. 2. Przy czym, wydajność uwalniania była o połowę niższa, gdy soczewkę poddawano nanoszeniu leku przez 14 i 16 dni.

W przypadku soczewki przemijanej CP najlepsze wydajności uwalniania leku uzyskano, gdy procedura nanoszenia leku trwała 12 godzin lub 16 i 20 dni. Z kolei ekspozycja soczewki na działanie CyA przez 24 h i 14 dni skutkowało blisko 2 razy mniejszą wydajnością uwalniania leku Tab. 3 i Rysunek 1.

Można zatem postulować brak konieczności wstępnego przygotowania soczewki do etapu nanoszenia leku. Takie same statystycznie wyniki uzyskano bowiem dla soczewek przemijających i nieprzemijających, przy czym ilość uwalnianego leku była wyższa, gdy soczewka była nieprzemijająca.

Tab. 3. Uwalnianie CyA [$\mu\text{g}/\text{soczewkę}$] dla soczewki przemijanej CP, inkubowanej w roztworze CyA o stężeniu 0.5 mg/mL

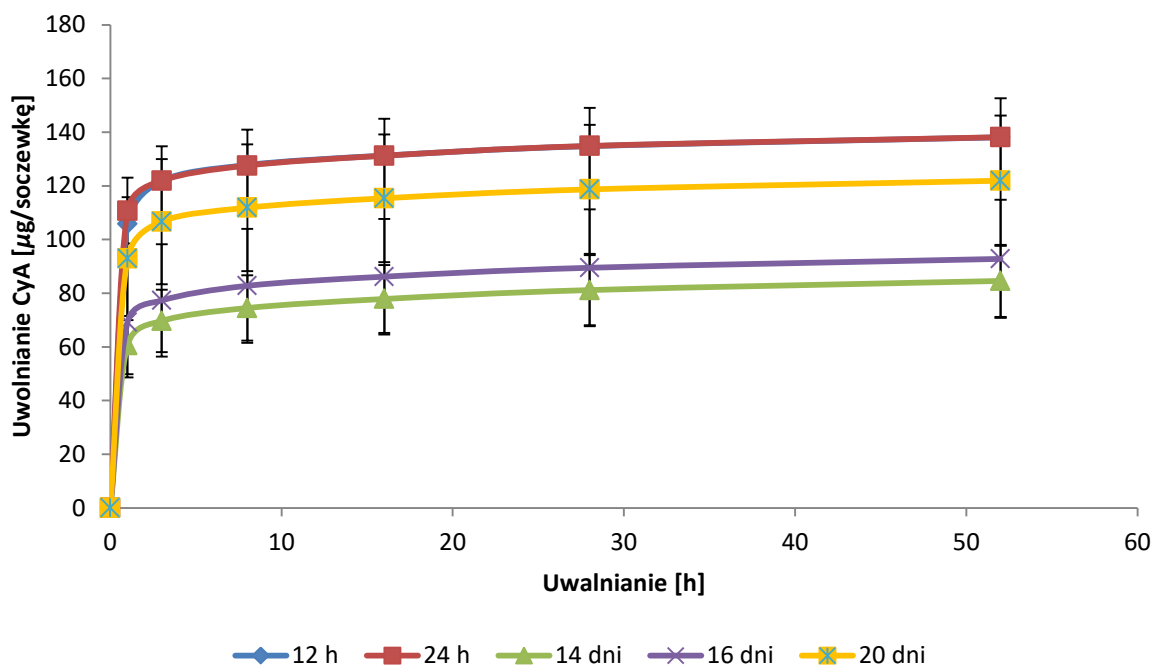
Czas nanoszenie	Uwalnianie CyA [$\mu\text{g}/\text{soczewkę}$]				
	12 h	24 h	14 dni	16 dni	20 dni
Czas uwalniania [h]					
1	84.0 \pm 8.5	46.8 \pm 12.1	52.1 \pm 7.2	83.0 \pm 15.3	93.8 \pm 8.1
2	94.9 \pm 9.4	58.7 \pm 12.8	59.1 \pm 8.2	93.5 \pm 15.9	106.8 \pm 9.1
8	100.12 \pm 10.05	64.4 \pm 13.3	65.0 \pm 9.2	99.1 \pm 16.3	112.4 \pm 9.8
16	103.6 \pm 10.6	67.9 \pm 13.7	68.7 \pm 9.8	102.8 \pm 16.7	115.9 \pm 10.3
28	106.9 \pm 11.1	67.9 \pm 13.7	72.1 \pm 9.8	106.0 \pm 16.7	119.2 \pm 10.3
52	110.2 \pm 11.5	71.1 \pm 14.1	75.5 \pm 10.3	109.3 \pm 17.0	122.5 \pm 10.8



Ryc. 1. Wykres uwalniania CyA [$\mu\text{g}/\text{soczewkę}$] dla soczewki przemywanej CP, inkubowanej w roztworze CyA o stężeniu 0.5 mg/mL

Tab. 4. Uwalnianie CyA [$\mu\text{g}/\text{soczewkę}$] dla soczewki nieprzemijanej CNP, inkubowanej w roztworze CyA o stężeniu 0.5 mg/mL

Czas nanoszenie	Uwalnianie CyA [$\mu\text{g}/\text{soczewkę}$]				
	12 h	24 h	14 dni	16 dni	20 dni
Czas uwalniania [h]					
1	105.9 \pm 20.6	110.8 \pm 12.3	60.7 \pm 10.9	69.2 \pm 20.6	92.9 \pm 22.9
2	121.8 \pm 21.2	121.9 \pm 12.9	69.7 \pm 11.7	77.3 \pm 21.0	106.7 \pm 23.3
8	127.8 \pm 21.5	127.6 \pm 13.3	74.5 \pm 12.2	82.8 \pm 21.3	111.9 \pm 23.6
16	131.3 \pm 21.7	131.2 \pm 13.7	77.9 \pm 12.6	86.2 \pm 21.5	115.4 \pm 23.8
28	134.8 \pm 22.0	134.9 \pm 14.1	81.2 \pm 13.0	89.5 \pm 21.8	118.7 \pm 24.0
52	138.1 \pm 22.2	138.1 \pm 14.5	84.6 \pm 13.4	92.8 \pm 22.0	121.9 \pm 24.2



Ryc. 2. Wykres uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewki nieprzemycanej CNP, inkubowanej w roztworze CyA o stężeniu 0.5 mg/mL

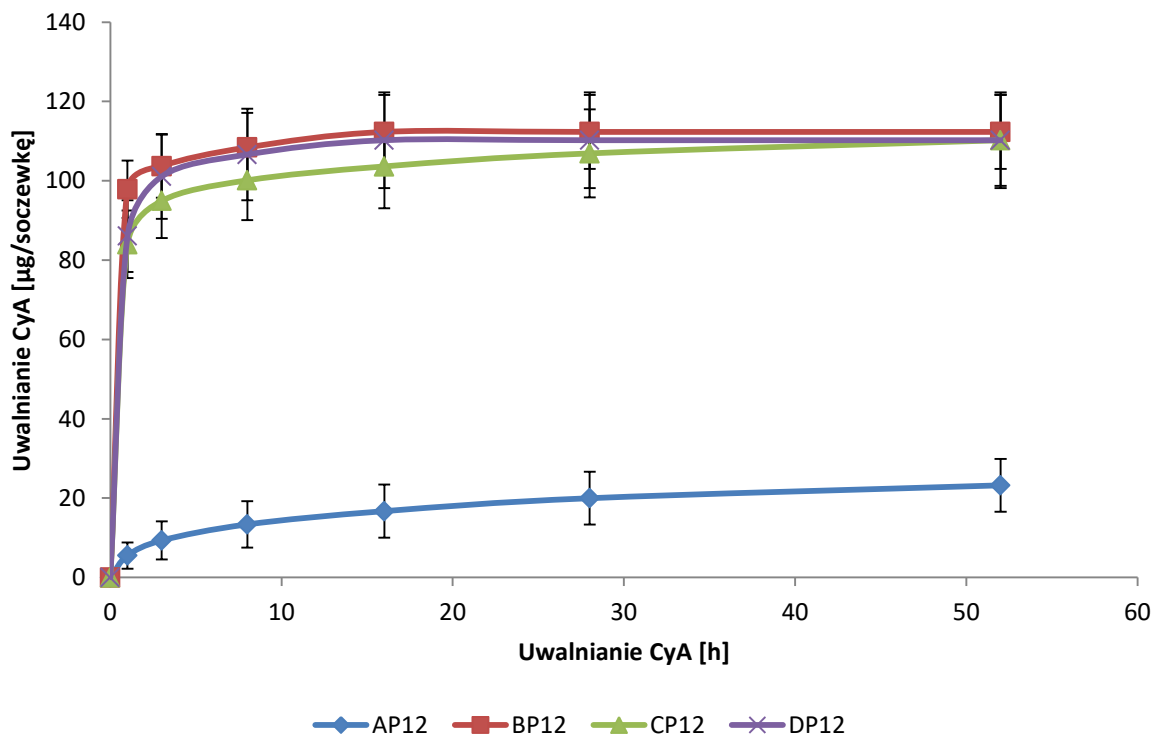
Na Rysunkach 3-12 porównano wydajność ekstrakcji CyA, gdy parametrami różnicującymi były czas nanoszenia leku na soczewkę, oraz wstępne przygotowanie soczewek. Najlepsze wyniki uzyskano, gdy stężenie CyA w roztworze do inkubacji było równe lub wyższe od stężenia leku w komercyjnych kroplach do oczu [CyA] \geq 0.5 mg/mL (około 120 – 140 $\mu\text{g/soczewkę}$). Wyjątek stanowią soczewki przemycane (BP12) oraz (BP24), [CyA]=0.1 $\mu\text{g/mL}$. W tym przypadku przebieg krzywej uwalniania leku był porównywalny z krzywą uwalniania z soczewek inkubowanych w roztworach $\text{CyA}\geq$ 0.5 mg/mL (Rysunek 3 i 5).

Zaobserwowano 4 do 6 krotnie wyższą wydajność ekstrakcji dla stężeń \geq 0.5 mg/mL w stosunku do wydajności uzyskanej dla stężeń CyA poniżej 0.5 mg/mL. Przy czym, ilość uwolnionego leku dla stężeń $\text{CyA}\geq$ 0.5 mg/mL była statystycznie taka sama i wynosiła około 130 $\mu\text{g/soczewkę}$, niezależnie od czasu inkubacji oraz wstępnego przygotowania soczewek, oraz około 25 $\mu\text{g/soczewkę}$ dla [CyA] $<$ 0.5 mg/mL. Wyjątek stanowi przypadek nanoszenia leku przez 14 dni, gdzie zarówno z soczewki P i NP uwolniono około 80 $\mu\text{g/soczewkę}$, gdy inkubacja prowadzona była w roztworze $\text{CyA}\geq$ 0.5 mg/mL oraz około 20 $\mu\text{g/soczewkę}$, gdy [CyA] $<$ 0.5 mg/mL.

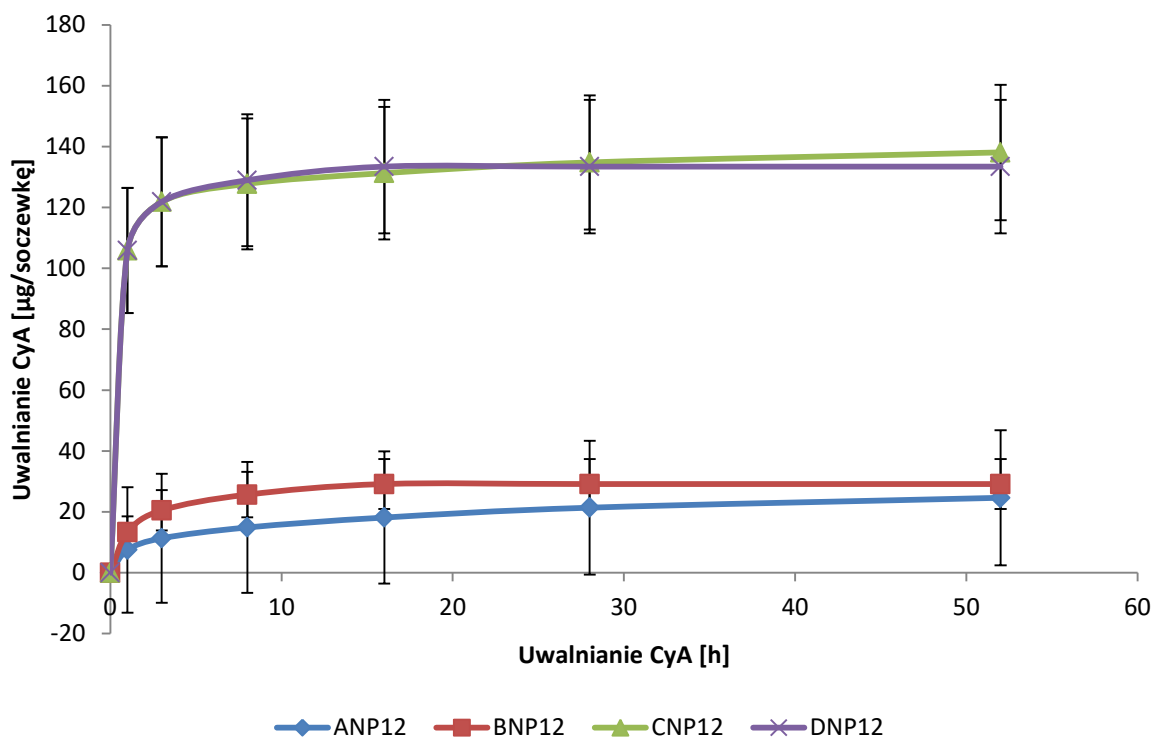
Odnotować należy także charakterystyczne, większe odchylenia w wartościach odpowiadających ilości uwalnianej CyA, gdy soczewki poddawano wstępnemu przemycaniu i osuszaniu przed okresem inkubacji.

Z analizy wyników można wnioskować, iż już 12. godzinna inkubacja soczewek w roztworze $\text{CyA}\geq$ 0.5 mg/mL powoduje naniesienie maksymalnej ilości leku. Dalsze

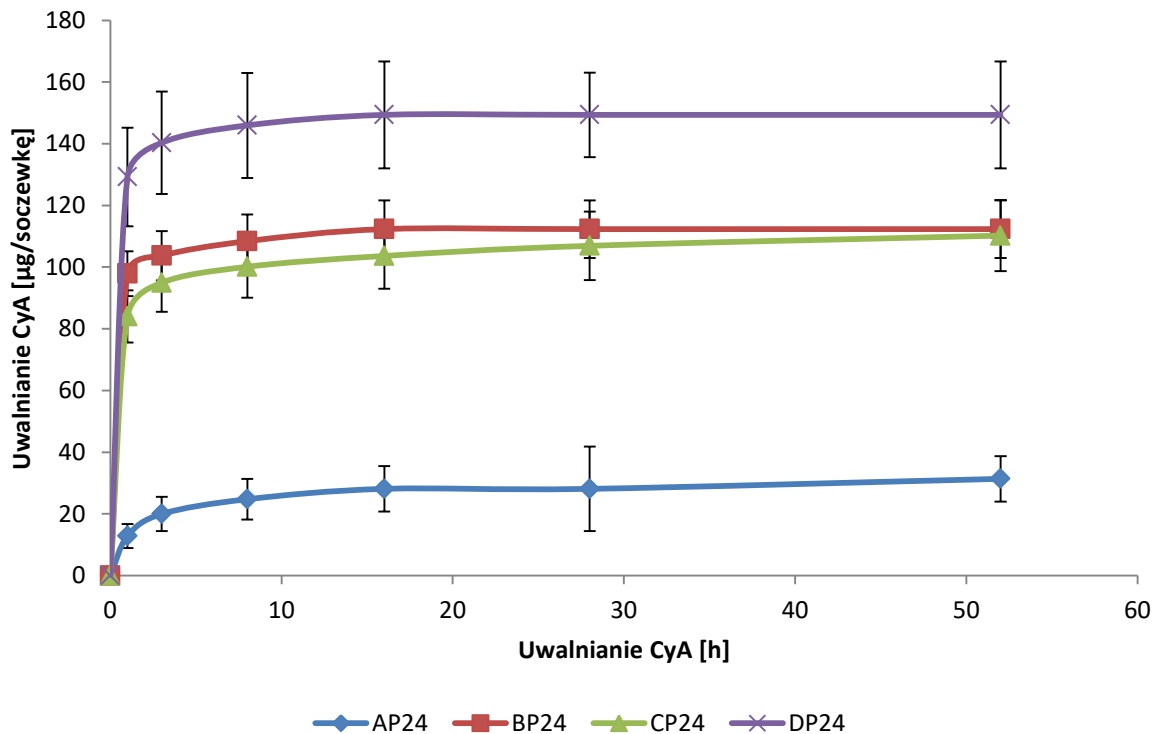
zwiększanie stężenia CyA w roztworach do nanoszenia, oraz wydłużanie czasu adsorpcji nie skutkuje zwiększeniem ilości leku uwalnianego do płynu łzowego ALF. Ponadto, wstępne przygotowanie soczewek można określić jako niecelowe, daje bowiem większą niepewnością co do ilości naniesionego i w konsekwencji uwalnianego leku.



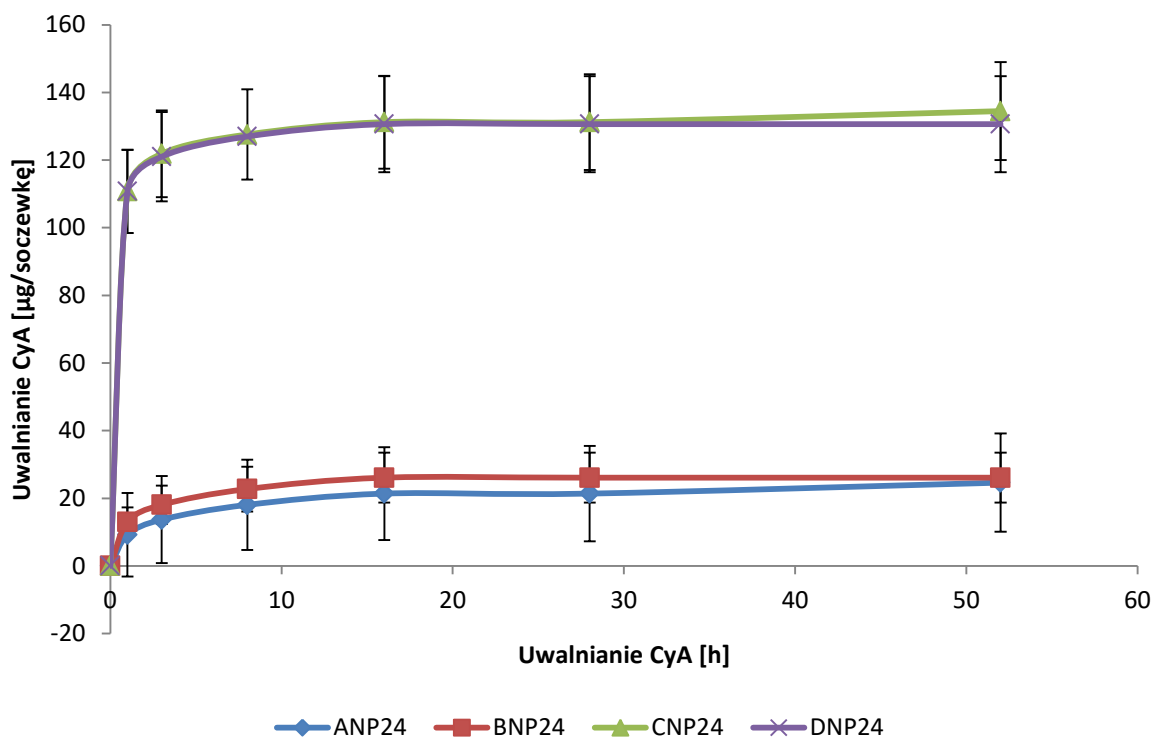
Ryc. 3. Porównanie uwalniania CyA [µg/soczewkę] dla soczewek przemywanych P, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach AP12=0.02, BP12=0.1, CP12=0.5 i DP12=1 mg/mL przez 12 godzin.



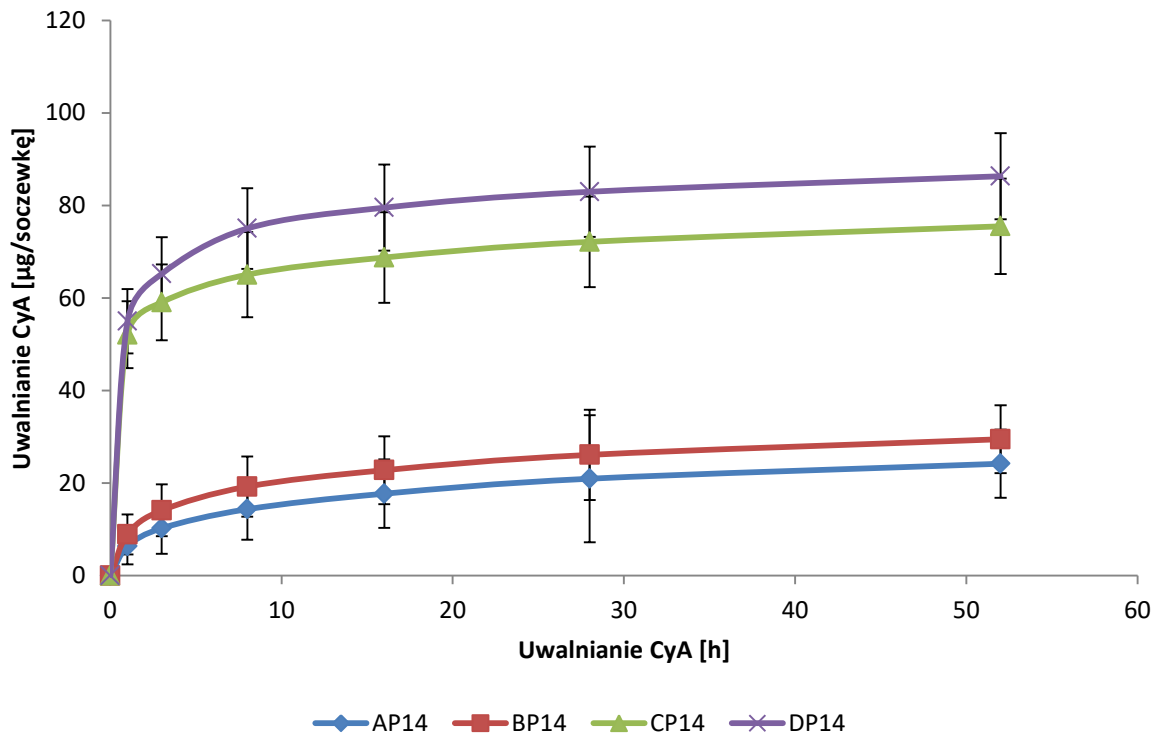
Ryc. 4 Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych NP, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach ANP12=0.02, BNP12=0.1, CNP12=0.5 i DNP12=1 mg/mL przez 12 godzin.



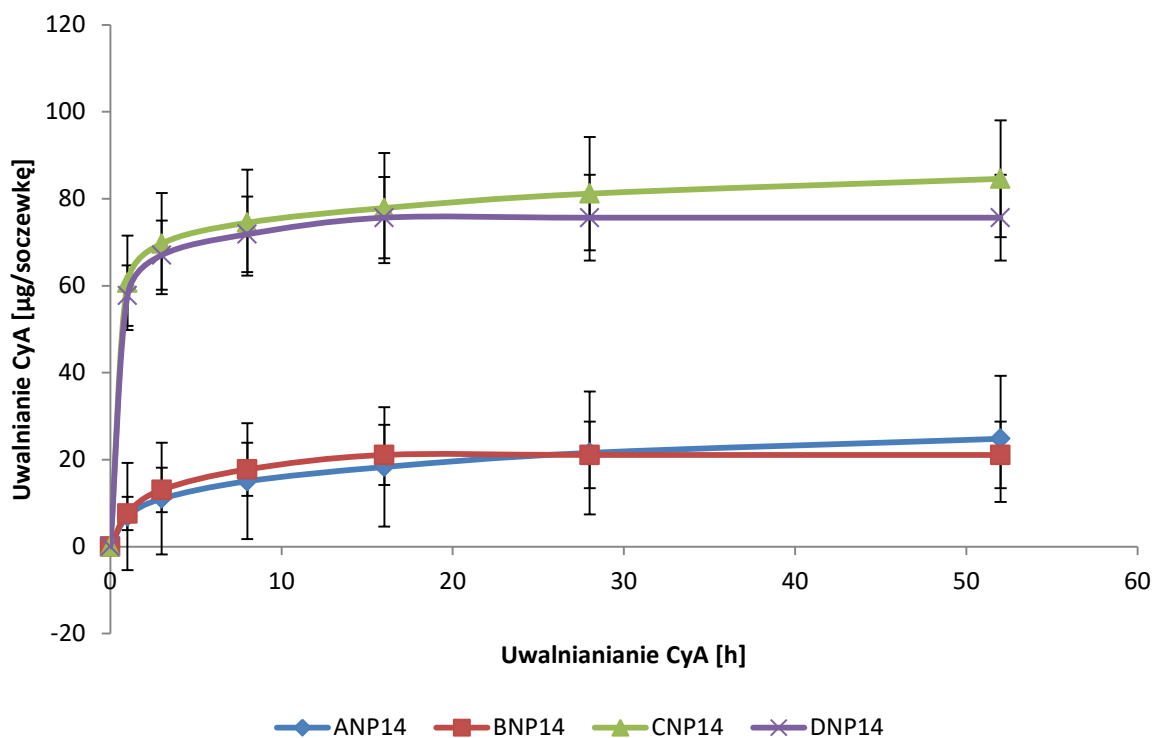
Ryc. 5. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych P, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach AP24=0.02, BP24=0.1, CP24=0.5 i DP24=1 mg/mL przez 24 godziny.



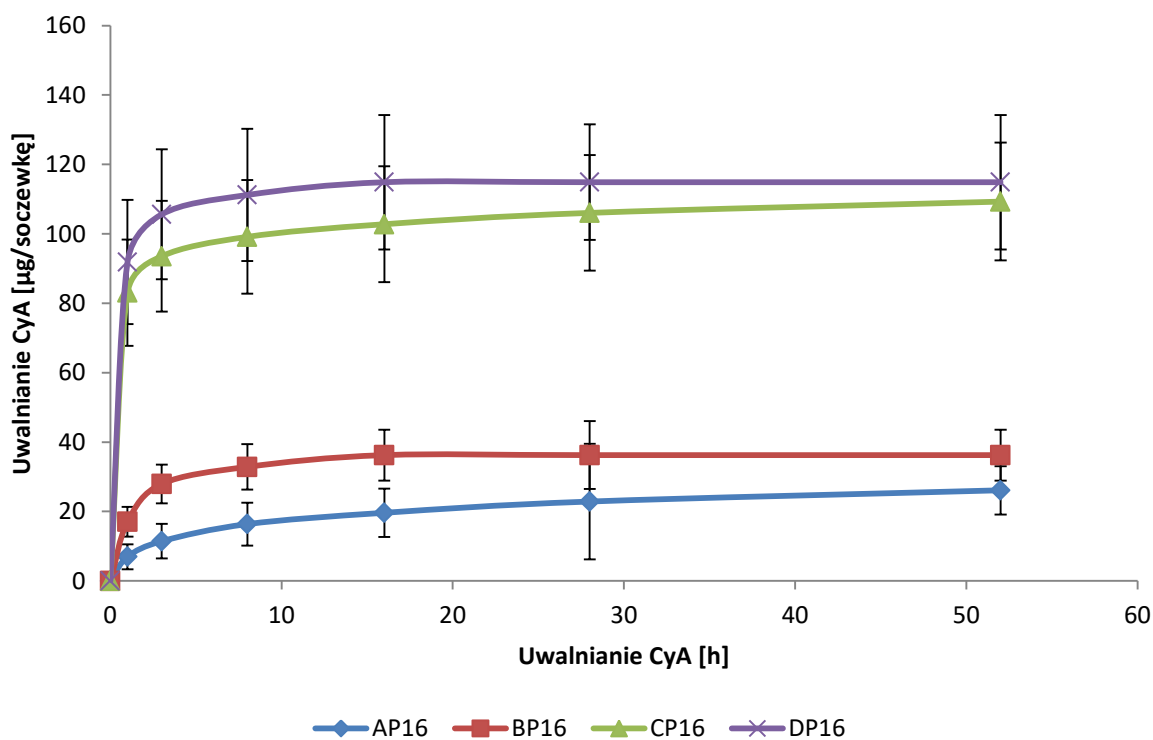
Ryc. 6. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych NP, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach ANP24=0.02, BNP24=0.1, CNP24=0.5 i DNP24=1 mg/mL przez 24 godziny.



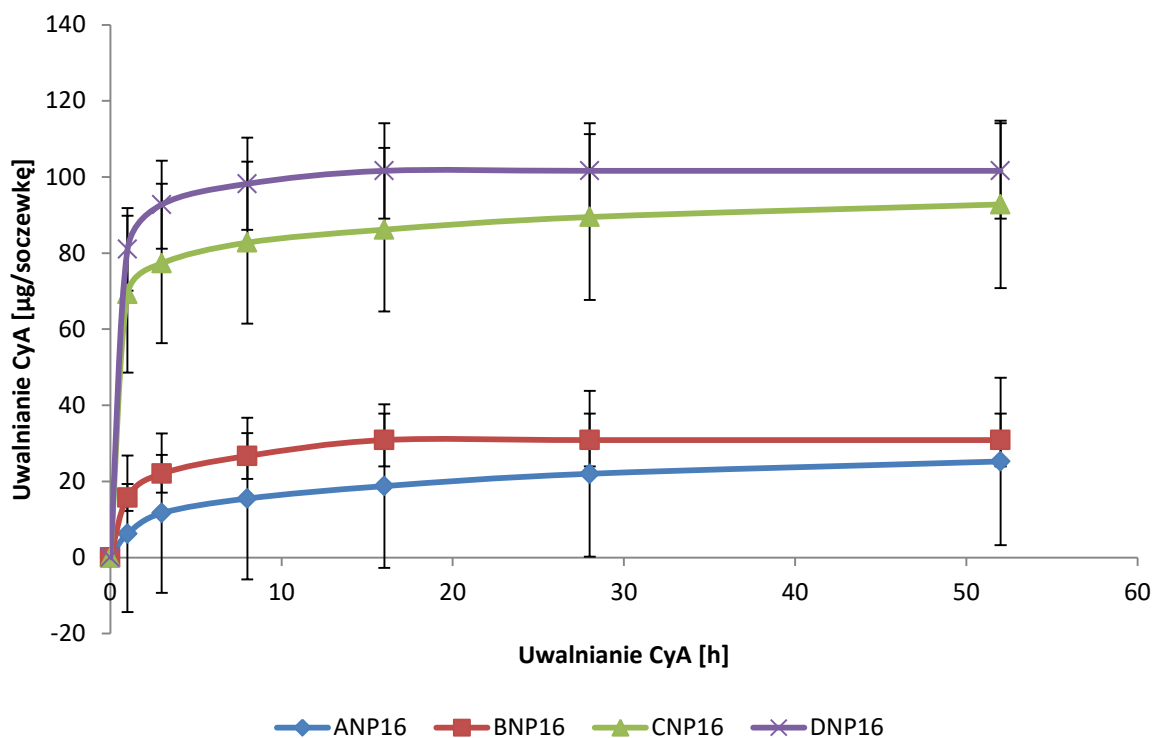
Ryc. 7. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych P, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach AP14=0.02, BP14=0.1, CP14=0.5 i DP14=1 mg/mL przez 14 dni.



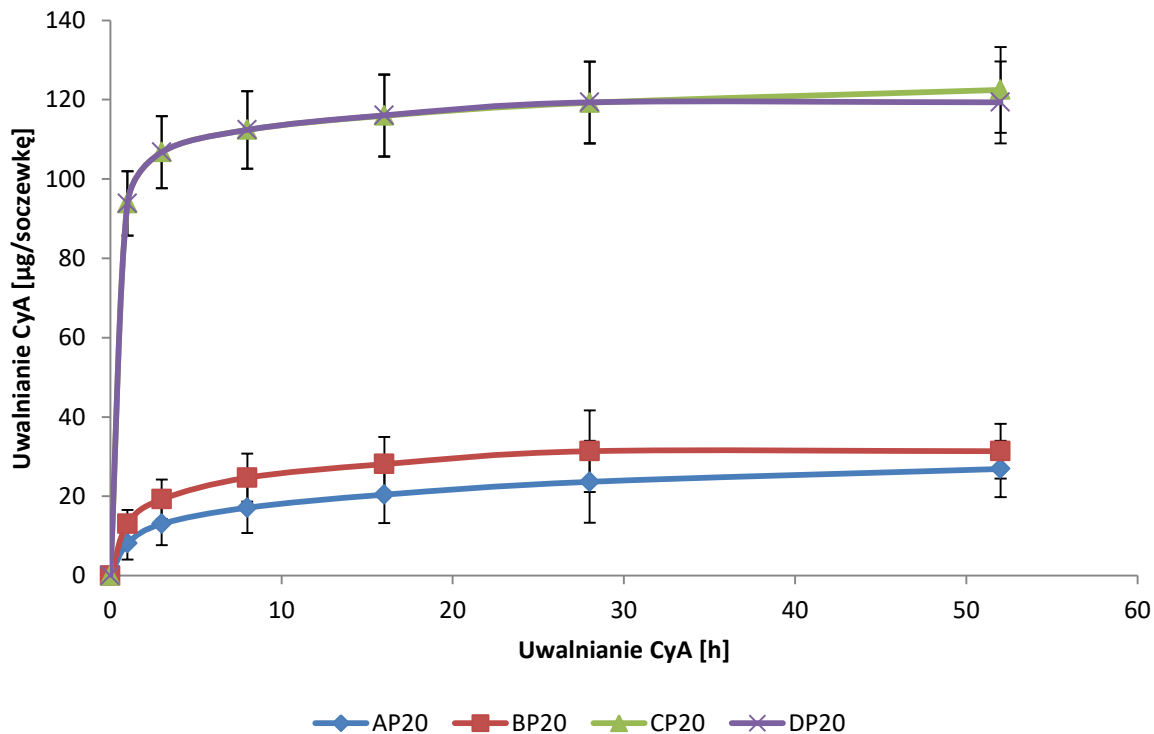
Ryc 8. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych NP, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach ANP14=0.02, BNP14=0.1, CNP14=0.5 i DNP14=1 mg/mL przez 14 dni.



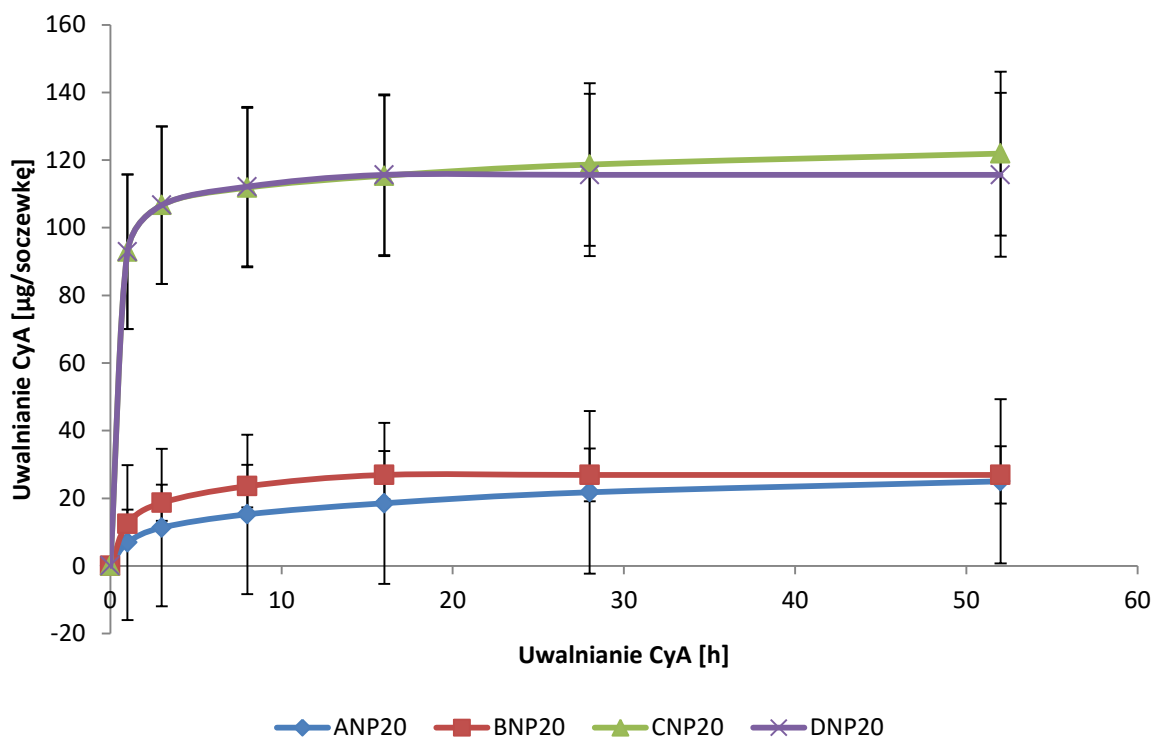
Ryc 9. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych P, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach AP16=0.02, BP16=0.1, CP16=0.5 i DP16=1 mg/mL przez 16 dni.



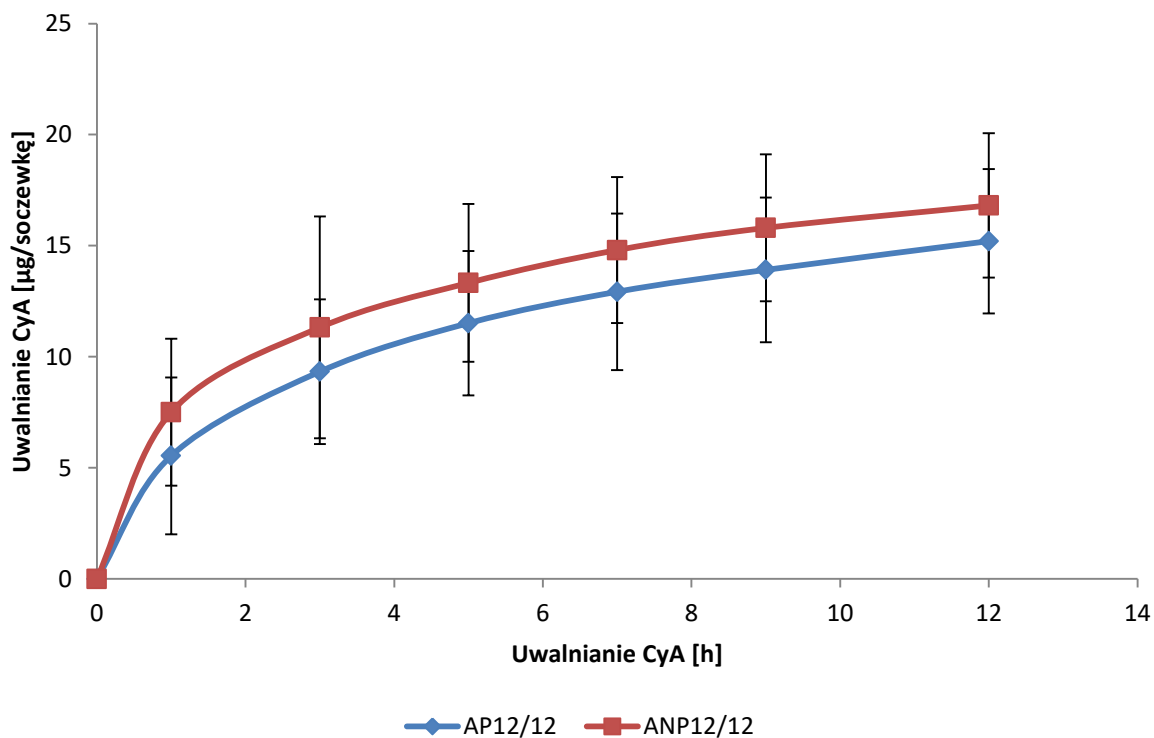
Ryc. 10. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych NP, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach ANP16=0.02, BNP16=0.1, CNP16=0.5 i DNP16=1 mg/mL przez 16 dni.



Ryc. 11. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych P, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach AP20=0.02, BP20=0.1, CP20=0.5 i DP20=1 mg/mL przez 20 dni.



Ryc. 12. Porównanie uwalniania CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych NP, inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach ANP20=0.02, BNP20=0.1, CNP20=0.5 i DNP20=1 mg/mL przez 20 dni.



Ryc. 13. Uwalnianie CyA [$\mu\text{g/soczewkę}$] dla soczewek przemywanych P i nieprzemywanych NP., inkubowanych w roztworze CyA o stężeniach A=0.02 mg/mL przez 12 godzin i

uwalnianych do płynu łzowego przez 12 h. Pomiar stężenia CyA w ALF w interwałach czasowych wynoszących 2 h i 3 h.

3. Dyskusja

Celem powyższych badań była symulacja procedury nanoszenia cyklosporyny A w trybie 12 godzinnym (noc), w temperaturze pokojowej, na jednodniowe soczewki kontaktowe, z przeznaczeniem do aplikacji soczewek z naniesionym lekiem do oka ludzkiego i użytkowania ich w trybie dziennym (12 h). Do badań wykorzystano dostępne w sprzedaży aptecznej roztwory CyA oraz płyny do codziennej higieny soczewek kontaktowych. Wyniki prowadzono równoległe dla stężeń CyA dwukrotnie wyższych oraz 5. i 25. krotnie niższych od stężenia leku występującego w kroplach do oczu. Porównano także efektywność nanoszenia CyA na soczewki pochodzące wprost z oryginalnego opakowania oraz soczewki obmyte z płynu do przechowywania soczewek i osuszone.

3.1. Stężenie terapeutyczne CyA

W leczeniu umiarkowanego zespołu suchego oka, zgodnie z zaleceniami, pacjent, podczas podawania CyA w postaci zawiesiny olejowej (krople do oczu Restasis®, Allergan) stosuje 2 krople leku dziennie w dawkach podzielonych, dostarczając w ten sposób 28 µg leku (obj. kropli 28 µL) do każdego oka. Biodostępność CyA podawanej w postaci Restasis® ocenia się na ok. 2.8 %¹⁶. Oznacza to, że w ten sposób do rogówki i soczewki oka dostarczane jest około 0.78 µg CyA dziennie. Na podstawie szacowań matematycznych zakłada się z kolei, że biodostępność CyA dostarczanej poprzez soczewki kontaktowe wzrasta do 50 %¹⁷. Zatem, aby dostarczyć do oka równoważną ilość leku stosując soczewki kontaktowe modyfikowane CyA ilość uwalnianego leku powinna wynosić w przybliżeniu 1.6 µg/dzień. Ponadto, badania kliniczne z zastosowaniem Restasis® wskazał^{18,19} okno

¹⁶ Gupta C., Chauhan A., *Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctual plugs*, Control Release 2011, 150 (1).

¹⁷ Li A., Chauhan A., *Modeling ophthalmic drug delivery by soaked contact lenses*, Ind. Eng. Chem. Res. 2006, 45 (10).

¹⁸ Sall K., Stevenson O.D., Mundorf T.K., Reis B.I., A.S.S.G., *Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease*, Ophthalmology 2000, 107 (4).

¹⁹ Stevenson D., Tauber j., Reis B.I., A.S.S.G. *Cyclosporine. Efficacy and safety of cyclosporine A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease-A dose-ranging, randomized trial*, Ophthalmology 2000, 107 (5).

terapeutyczne (brak niekorzystnych efektów ubocznych przy 12 tygodniowym leczeniu) na poziomie 28 do 224 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ co daje 1.6 do 12.8 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ w przypadku zastosowania soczewek kontaktowych.

Zaproponowana w pracy procedura pokazała, że już 12. godzinne zanurzenie soczewki kontaktowej w roztworze leku o najniższym stężeniu 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ daje możliwość podaży leku do oka w porcjach podzielonych przez 12 godzin na poziomie około 20 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ **Ryc. 13**. Przy czym pierwszy bolus leku (po pierwszej godzinie uwalniania CyA) wynosi 5.54 $\mu\text{g}/\text{soczewkę}$ dla SP oraz 7.50 $\mu\text{g}/\text{soczewkę}$ dla SNP. Druga porcja leku (trzecia godzina uwalniania leku do ALF) w obu przypadkach (SP i SNP) wynosi 3.8 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{soczewkę}$. Kolejne, średnie porcje leku w 5, 7, 9 i 12 godzinie ekstrakcji do ALF wynoszą 1.5 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{soczewkę}$ dla SP, oraz 1.4 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{soczewkę}$ dla SNP.

4. Wnioski

W niniejszej pracy przeprowadzono procedurę nanoszenia CyA na jednodniowe soczewki kontaktowe zanurzając je w roztworze leku przygotowanym w płynie do higieny soczewek kontaktowych. Eksperyment pokazał, że 12 godzinne zanurzenie soczewek w roztworze CyA o stężeniu 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pozwala na naniesienie wystarczającej ilości leku mogącej zapewnić podaż leku na poziomie terapeutycznym przez 12 godzin aplikacji soczewki do oka. W badaniach nie stosowano witaminy E, ponieważ bez jej udziału stężenia uwalnianego leku były w pełni satysfakcjonujące. Przebieg eksponencyjny procesu uwalniania leku, stężenie uwalnianej CyA w granicach okna terapeutycznego, wyższa biodostępność CyA dostarczanej do oka ludzkiego przy udziale soczewek kontaktowych w porównaniu z kroplami do oczu pozwala wnioskować, iż modyfikowane CyA soczewki mogą stanowić dobre, kontrolowane źródło leku w leczeniu zespołu suchego oka. Zaproponowana procedura sugeruje możliwość samodzielnego przygotowania soczewek do aplikacji CyA w warunkach domowych wg. następującego schematu postępowania. Pacjent wieczorem zanurza soczewki, wyjęte z oryginalnego opakowania, w roztworze CyA o odpowiednim stężeniu. Po 12 h (rano) aplikuje soczewki do oczu, zapewniając równomierne dawkowanie leku w ciągu całego dnia, bez ryzyka pominięcia dawki, nieumiejętnego zakraplania oka, czy też nadmiernego łzawienia, w szczególności podczas podawania leku.

Bibliografia:

Mc Namara N.A., Poise K.A., Brand R.J., Graham A.D., Chan J.S., Mc Kenney C.D., *Tear mixing under a soft contact lens: effects of lens diameter*, Am. J. Ophthalmol. 1999, nr 127.

Sedlacek, J., *Possibilities of application of eye drugs with the aid of gel-contact lenses.*, Cs. Oftal. 1965, nr 21.

Silbert, J.A., *A review of therapeutic agents and contact lens wear*, J. Am. Optom. Assoc. 1996, nr 67.

Horne, R.R., Jude K.E., Pitt W.G., *Rapid loading and prolonged release of latanoprost from a silicone hydrogel contact lens*, J. of Drug Deliv. Sci. and Tech. 2017, nr 41.

Baudouin C., Labbe A., Liang H., Pauly A., Brignole - Baudouin F., *Progress in Retinal and Eye Research* 2010, nr 29.

Xu J., Xu Y., Hu G., Lin T., Gou J., Yin T., He H., Zhang Y., Tang X., *A comprehensive review on contact lens for ophthalmic drug delivery*, J. Controlled Release 2018, nr 281.

Hui A., Willcox M., *In vivo studies evaluating the use of contact lenses for drug delivery*, Optom. Vis. Sci. 2016, nr 93.

Molssseiev E., Loewenstein A., *Drug delivery to the posteriori segment of the eye*, Dev. Ophthalmol. 2017, nr 58.

Peng C.C., Chauhan A., *Extended cyclosporine delivery by silicone–hydrogel contact lenses*, J. of Controlled Release 2011, nr 154.

Kapoor Y., Chauhan A., *Drug and surfactant transport in Cyclosporine A from Brij-98 laden p-HEMA hydrogels*, J. Colloid Interface Sci. 2008, nr 322 (2).

Kim C.C., Peng A., Chauhan A., *Extended release of dexamethasone from silicone hydrogel contact lenses containing vitamin E*, J. Control Release 2010, nr 148.

Peng A., Kim C.C., Chauhan A., *Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone hydrogel contact lenses containing Vitamin E diffusion barriers*, Biomaterials 2010, nr 31 (14).

Leshner, G.A., Gunderson, G.G., *Continuous drug delivery through the use of disposable contact lenses*, Optometry Vision Sci. 1993, nr 70.

Hehl, E.M., Beck, R., Luthard, K., Guthoff, R., Drewelow, B., *Improved penetration of aminoglycosides and fluoroquinolones into the aqueous humour of patients by means of Acuvue contact lenses*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1999, nr 55.

Bawa, R., *Ocular Inserts*. Mitra, New York 1993.

Gupta C., Chauhan A., *Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctual plugs*, Control Release 2011, nr 150 (1).

Li A., Chauhan A., *Modeling ophthalmic drug delivery by soaked contact lenses*, Ind. Eng. Chem. Res. 2006, nr 45 (10).

Sall K. Stevenson O.D., Mundorf T.K., Reis B.I., A.P.S.G., *Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease*, Ophthalmology 2000, nr 107 (4).

Stevenson D., Tauber j., Reis B.I., A.P.S.G. Cyclosporine. *Efficacy and safety of cyclosporine A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease-A dose-ranging, randomized trial*, Ophthalmology 2000, nr 107 (5).

Ocena biodostępności oraz bezpieczeństwa stosowania leków używanych w narkolepsji z wykorzystaniem metod obliczeniowych

1. Sen

Sen to stan fizjologiczny, który jest w pełni odwracalny i polega na utracie świadomości, obniżeniu progu reaktywności na bodźce środowiskowe i zahamowaniu aktywności ruchowej¹. Zaburzenia snu dzielimy na dwie grupy: dyssomnie (nieprawidłowy przebieg snu) oraz parasomnie (nieprawidłowe zjawiska towarzyszące wybudzaniu bądź przechodzeniu między stadiami snu). Do grupy dyssomnii zaliczane jest zjawisko nadmiernej senności (hipersomnolencji) a jedną z jej manifestacji jest choroba neurologiczna zwana narkolepsją. Cechuje się ona nadmierną sennością w ciągu dnia, z towarzyszącymi jej epizodycznymi stanami nagłej utraty napięcia mięśniowego (katapleksji). Na pełny obraz choroby składają się także inne objawy związane ze snem, takie jak porażenie przysenne oraz omamy hipnagogiczne i hipnopompiczne. Wymieniony zespół objawów nazywany jest tetradą narkoleptyczną².

Przy obecnym rozwoju medycyny i nauki nie jesteśmy w stanie w pełni wytłumaczyć fizjologicznego i patofizjologicznego znaczenia snu. Wiemy, że jest on niezbędny do prawidłowego funkcjonowania wielu procesów życiowych a jego zaburzenia znacząco obniżają jakość życia i negatywnie wpływają na zdrowie. Dlatego też problemy ze snem są częstymi dolegliwościami zgłaszanymi lekarzom przez swoich pacjentów³.

1.1. Rys historyczny

Autorem pierwszego udokumentowanego opisu pacjenta z objawami narkolepsji w 1877r. był niemiecki neurolog i psychiatra Carl Westhal⁴. Terminu *narcolepsie*, pochodzącego od greckich słów *narkē* (osłupienie, zamroczenie) i *lepsis*

¹ Gmitrowicz A., Janas-Kozik M., *Zaburzenia psychiczne dzieci i młodzieży*, Warszawa: Medical Tribune Polska, 2018, 264-275

² Steinborn B., *Neurologia wieku rozwojowego*, Warszawa: PZWL, 2017, 763- 795.

³ Pużyński S., Rybakowski J., Wciórka J., *Psychiatria Tom 2*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017, 500-515.

⁴ Westphal C., *Eigenthumlich mit einschlafen verbundene Anfalle*, Arch Psychiatr Nervenkr, 1877, 7, 63-65.

(atak, napad) po raz pierwszy użył francuski lekarz Gelineau, który w 1880r. opisał kolejny przypadek tej jednostki chorobowej⁵⁶⁷. Jednak dopiero w 1998r., po odkryciu neuropeptydów zwanych hipokretynami (oreksynami), nastąpił przełom w badaniach nad patofizjologią narkolepsji⁸.

1.2. Etiologia

Obecny stan wiedzy medycznej nie pozwala jednoznacznie wyjaśnić przyczyn narkolepsji. Dotychczasowe badania wskazują jednak, że u jej podłoża leżą nieprawidłowości w tzw. układzie hipokretynowym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)⁹. Nieprawidłowości te związane są z uszkodzeniem grupy neuronów zlokalizowanych w podwzgórzu, wydzielających neuroprzekaźnik hipokretynę (oreksynę)¹⁰. Odpowiada on za stabilizację rytmu snu i czuwania oraz reguluje apetyt i odczuwanie przyjemności. Poziom hipokretyny w OUN ulega obniżeniu, gdy dojdzie do uszkodzenia ponad 85% neuronów wydzielających hipokretynę¹¹. Osoby cierpiące na narkolepsję z katapleksją mają nieoznaczalny poziom oreksyny w płynie mózgowo – rdzeniowym¹². U podłoża zaniku tych neuronów leżą prawdopodobnie procesy autoimmunologiczne. Dochodzi do nich zazwyczaj od okresu dojrzewania. Blisko 95% pacjentów z rozpoznaniem narkolepsji z katapleksją posiada antygen HLA DQB1*0602, który jest typowy dla tej choroby. U osób cierpiących na narkolepsję bez katapleksji wspomniany antygen występuje równie często jak w populacji ogólnej 12-18%¹³. Pacjenci będący homozygotycznymi nosicielami allelu DQB1*0602 mają 2-4 krotnie wyższe ryzyko zachorowania na

⁵ Wierzbička A., Wichniak A., Jernajczyk W., *Narkolepsja-czy poznaliśmy wszystkie tajemnice choroby?*, Kosmos, 2017, 63(2), 245-252.

⁶ Passouant P., *La narcolepsie du temps de Gelineau*, Histoire des Sciences Naturelles, 1981, 2, 1-7.

⁷ Schenck C. H., Bassetti C. L., Arnulf I., Mignot E., *English translations of the first clinical reports on narcolepsy and cataplexy by Westphal and Gelineau in the late 19th century, with commentary*, Journal of Clinical Sleep Medicine, 2007, 3(03), 301-311.

⁸ Yudofsky S., Hales R., *The American Psychiatric Publishing textbook of neuropsychiatry and behavioral neurosciences. 6th ed.* Washington, DC: American Psychiatric Pub., 2018, 384-386.

⁹ Skalski M., *Zaburzenia snu i czuwania*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017, 17-24.

¹⁰ Morrison J., Andruszko R., Heitzman J., *DSM-5 bez tajemnic. 1st ed.*, Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2016, 341-349.

¹¹ Coelho F., Aloe F., Moreira G., Sander H. H., Roitman I., Prado L. F., Alves R. S., *Narcolepsy in childhood and adolescence*, Sleep Science, 2012, 5(4), 139-144.

¹² *International classification of sleep disorders Third Edition*, Michael J. Sateia, American Academy of Sleep Medicine, 2014.

¹³ Gałeczki P., Krawczyk P., Świącicki Ł., *Kryteria diagnostyczne z DSM-5*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017, 178-179

narkolepsję. Odnotowuje się związek pomiędzy liczbą alleli DQB1*0602 a nasileniem objawów chorobowych^{14,15}.

Wyniki badań sugerują związek narkolepsji z przebytymi infekcjami górnych dróg oddechowych o etiologii paciorkowcowej (*Streptococcus pyogenes*)¹⁶. Dowodzić temu ma obecność immunologicznych markerów infekcji paciorkowcowej ASO i anty-DNazy B u pacjentów przebadanych w ciągu 12 miesięcy od wystąpienia objawów chorobowych¹⁷.

W ostatnich latach odnotowuje się wzrost zapadalności na narkolepsję zwłaszcza w populacji dzieci i młodzieży w Europie i Stanach Zjednoczonych. Może mieć to związek ze szczepieniami przeciwko grypie H1N1 (Pandemrix)¹⁸. Tzw. narkolepsja poszczepienna rozwija się w młodszym wieku niż zwykle, zazwyczaj krótko po szczepieniu (do 7 tygodni)¹⁹.

Podczas gdy narkolepsja z katapleksją (pierwotna) związana jest niedoborem hipokretyn w OUN, narkolepsja symptomatyczna (wtórna) wywołana jest zaburzeniami wrodzonymi (Choroba Niemann –Picka typu C, Zespół Pradera –Williego), procesami rozrostowymi OUN (guzy przysadki), zmianami naczyniowymi bądź urazami głowy^{20,21}.

1.3. Epidemiologia

Badania nad rozpowszechnieniem narkolepsji w Europie i na świecie wskazują, że częstość zachorowań wynosi 1:2000 (0,05%)²². Europejskie badanie

¹⁴ Cassidy S. B., Schwartz S., Miller J. L., Driscoll D. J., *Prader-willi syndrome*, Genetics in Medicine, 2012, 14(1), 10.

¹⁵ Benmedjahed K., Wang Y. G., Lambert J., Evans C., Hwang S., Black J., Johns M., *Assessing sleepiness and cataplexy in children and adolescents with narcolepsy: a review of current patient-reported measures*, Sleep Medicine, 2017, 32, 143-149.

¹⁶ Żarowski M., Steinborn B., Kothare S., *Narcolepsy in children*, Child Neurology, 2014, 23(47),9-19

¹⁷ *Ibidem*, Michael J.

¹⁸ Kaczor M., Szczęśna M., *Zaburzenia snu u dzieci*, Warszawa: Medical Tribune Polska, 2016, 13-24.

¹⁹ Koziorynska E. I., R, Alcibiades J., *Narcolepsy: Clinical Approach to Etiology, Diagnosis, and Treatment*, Reviews in neurological diseases, , 8 (3), 2011 , 97-106.

²⁰ *Occurrence of narcolepsy with cataplexy among children and adolescents in relation to the H1N1 pandemic and Pandemrix vaccinations – results of a case inventory study by the MPA in Sweden during 2009–2010*, MPA Report, 2011; 1: 1–20

²¹ Zawilska J. B., Woldan-Tambor A., Płocka A., Kużajska K., Wojcieszak J., *Narkolepsja: etiologia, obraz kliniczny, diagnostyka i leczenie*, Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2012; 66: 771-786

²² Rosch R. E., Farquhar M., Gringras P., Pal D. K., *Narcolepsy Following Yellow Fever Vaccination: A Case Report*, Frontiers in Neurology, 2016, 7:130

przeprowadzone w krajach Europy Zachodniej (Portugalia, Hiszpania, Włochy, Niemcy) oszacowały częstość występowania na 0,047% w populacji ogólnej²³.

Narkolepsja występuje równie często u obu płci. Może wystąpić w każdym wieku, jednak rzadko bywa rozpoznawana przed 5 r.ż. Obserwuje się dwa szczyty zachorowań –pierwszy pomiędzy 15 r.ż. a 25 r.ż., drugi około 40 r.ż.²⁴. Najczęściej odnotowuje się sporadyczne występowanie choroby, jednak raportowane są nieliczne przypadki narkolepsji rodzinnej²⁵. Jak wynika z dotychczas publikowanych badań, ryzyko narkolepsji u krewnych I stopnia wynosi 1-2%, i jest 10–40-krotnie wyższe niż w populacji ogólnej²⁶.

1.4. Objawy kliniczne i diagnostyczne

Pierwszą manifestacją choroby jest nadmierna senność w ciągu dnia, która zazwyczaj pojawia się wiele lat wcześniej niż pozostałe objawy choroby. Bardzo często narkolepsji towarzyszy katapleksja, która charakteryzuje się nagłą utratą napięcia mięśniowego, głównie w mięśniach szyi, twarzy, kończyn górnych i dolnych. Napad wywołany jest najczęściej przez śmiech, a u młodszych dzieci z oczekiwaniem nagrody. U dzieci może występować pod postacią uogólnionego lub częściowego (ograniczonego do twarzy) obniżenia napięcia mięśniowego, opadnięcia powiek, otwarciem ust, wysunięcia języka (twarz kataplektyczna). Częstość napadów bywa różna - od kilku w ciągu roku do kilkunastu w ciągu dnia. Czas trwania pojedynczego epizodu zwykle nie przekracza 2 minut. W trakcie napadów świadomość pacjenta jest całkowicie zachowana^{27,28}.

W skład tzw. tetrady narkoleptycznej wchodzi dodatkowo paraliż i halucynacje przysenne. Omamy przysenne, najczęściej wzrokowe, dzielimy na hipnagogiczne (przy zasypianiu) oraz hipnopompiczne (przy wybudzaniu)²⁹. W trakcie krótkich drzemek u dzieci pojawiają się często żywe i kolorowe marzenia

²³ N. Seiji, *Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy*, Sleep Medicine, 2007, 8: 373–399

²⁴ A. Imran, Thorpy Michael, *Cinical features, diagnosis and treatment of narcolepsy*, Clinics in Chest Medicine, 2010, 31:371-381

²⁵ Mahoney C. E., Cogswell A., Koralnik I. J., Scammell T. E., *The neurobiological basis of narcolepsy*. Nature Reviews, Neuroscience, 2019, 20: 83–93

²⁶ *Ibidem*, Wierzbicka A., Wichniak A., Jernajczyk W., s 245-252.

²⁷ Billiard M., *Diagnosis of narcolepsy and idiopathic hypersomnia. An update based on the international classification of sleep disorders, 2nd edition*, Sleep Medicine, 2007, 11: 377–388

²⁸ Trogstad L., Bakken I. J., Gunnes N., Ghaderi S., Stoltenberg C., Magnus P., Håberg Siri E., *Narcolepsy and hypersomnia in Norwegian children and young adults following the influenza A(H1N1) 2009 pandemic*, Vaccine, 2017, 1879-1885

²⁹ Mignot E., *Genetic and familiar aspects of narcolepsy*. Neurology, 1998, 50: 16–S22.

senne. Paraliż przysenny jest stanem uniemożliwiającym wykonywanie ruchów celowych³⁰. Porażeniu ulegają wszystkie mięśnie poza gałkoruchowymi i oddechowymi. Przyпуска się, że paraliż przysenny jest efektem atonii mięśniowej, która fizjologicznie występuje we śnie REM (*Rapid Eye Movement*) podczas zasypiania i budzenia. Charakterystycznym i często występującym objawem jest również fragmentacja snu nocnego³¹.

W międzynarodowej klasyfikacji zaburzeń snu (*International Classification of Sleep Disorders -3, ICSD-3*) narkolepsja znalazła się w grupie hipersomnii pochodzenia centralnego. Hipersomnia wg ICSD jest określana jako niezdolność do utrzymania odpowiedniego poziomu czuwania w ciągu dnia, niezależnie od długości snu nocnego. Klasyfikacja ICSD dokonuje podziału narkolepsji na typ 1 (narkolepsja z katapleksją) i typ 2 (narkolepsja bez katapleksji).

Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne w najnowszej wersji klasyfikacji chorób psychicznych - zaburzenia snu i czuwania DSM-5, dzieli narkolepsję na kilka podtypów³²:

- narkolepsja bez katapleksji, z niedoborem hipokretyny;
- narkolepsja z katapleksją, bez niedoboru hipokretyny;
- autosomalna dominująca ataksja mózdkowa, głuchota i narkolepsja;
- autosomalna dominująca narkolepsja, otyłość i cukrzyca typu 2;
- narkolepsja wtórna do innego stanu ogólnomedycznego.

W kryteriach diagnostycznych za obniżone stężenie hipokretyny w płynie mózgowo -rdzeniowym uznaje się poziom $< 110\text{pg/ml}$ lub $< 1/3$ wartości prawidłowej.

Blisko 1/3 przypadków narkolepsji diagnozowanej u dzieci jest wtórna do innych chorób (zespół Pradera Williego, choroba Niemann - Picka typu C, stwardnienie rozsiane, guzy mózgu, uszkodzenia podwzgórza, urazy czaszkowo mózgowie).

W diagnostyce narkolepsji, poza badaniem przedmiotowym i podmiotowym, używa się różnych skal oraz kwestionariuszy³³. Polismonografia (PSG) oraz test wielokrotnej latencji snu (MSLT) są złotym standardem diagnostycznym. W trakcie PSG ocenie poddaje się wiele parametrów w czasie snu, w tym elektroencefalogram (EEG), elektrokardiogram (EKG), elektromiogram (EMG), elektrookulogram (EOG), a

³⁰ *Ibidem*, Żarowski M., Steinborn B., Kothare S. s. 9-19.

³¹ *Ibidem*, Mignot Emmanuel, s. 16–22.

³² *Ibidem*, Żarowski M., Steinborn B., Kothare S. s. 9-19.

³³ *Ibidem*, Żarowski M., Steinborn B., Kothare S., s. 9-19.

także przepływ powietrza w drogach oddechowych i saturację. Natomiast test MSLT służy ocenie czasu zasypiania w trakcie dnia. Poza oceną czynności elektrycznej mózgu, ruchu gałek ocznych i napięcia mięśniowego, mierzy się czas do zaśnięcia i ewentualne wystąpienie snu REM.

Poza oceną MSLT w diagnostyce stosuje się także badanie SOREMP (*sleep onset REM period*), w którym stwierdza się wystąpienie snu REM do 15 minut od zaśnięcia³⁴. Kolejnym testem używanym w diagnostyce nadmiernej senności jest test utrzymania czuwania (MWT), który mierzy jakość czuwania w ciągu dnia³⁵. Spośród badań laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce narkolepsji wymienia się oznaczanie stężenia hipokretyny-1 w płynie mózgowo rdzeniowym (CSF hcrt-1) oraz ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA). Oznaczenie CSF hcrt-1 rekomendowane jest w przypadkach, gdy niemożliwe bądź znacząco utrudnione jest przeprowadzenie badania MSLT. Oznaczenie HLA zaleca się pomocniczo u pacjentów z podejrzeniem narkolepsji z katapleksją. Dodatni wynik haplotypu DQB1*0602 może potwierdzić trafność diagnozy³⁶.

1.5. Leczenie

Główną rolę w poprawie jakości życia odgrywają nefarmakologiczne metody terapii: regularny tryb życia oraz właściwa higiena snu. Planowanie drzemek w ciągu dnia oraz dbanie o unikanie sytuacji bardzo emocjonujących bądź monotonicznych korzystnie wpływa na zmniejszenie częstości pojawiania się napadowego snu.

Niemniej duże znaczenie ma farmakoterapia polegająca na stosowaniu środków wpływających na transmisję monoaminergiczną. Stosowane są dwa rodzaje leczenia mogące zniwelować objawy narkolepsji: immunomodulacyjna (ograniczenie degeneracji neuronów hipokretynowych) oraz hipokretynowa terapia zastępcza (zwiększanie ośrodkowej transmisji hipokretyny.) Zwalczanie objawów towarzyszących narkolepsji jest powszechnie stosowaną metodą leczenia. Przed rozpoczęciem terapii bardzo ważna jest ocena pacjenta na temat tego, który z symptomów narkolepsji jest dla niego najbardziej uciążliwy. Pozwala to dobrać

³⁴ Mahoney C. E., Cogswell A., Koralnik I. J., Scammell T. E., *op: cit.* S. 83–93.

³⁵ Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., *Mutschler Farmakologia i toksykologia*, 2010, 196-200.

³⁶ Mahoney C. E., Cogswell A., Koralnik I. J., Scammell T. E., *op: cit.* S. 83–93.

odpowiednie leczenie. W praktyce stosowane są minimum dwa leki, które niwelują nieprzyjemne objawy choroby. Wśród stosowanych leków możemy wyróżnić³⁷:

- **Pochodne amfetaminy**

W Polsce stosowany jest tylko jeden lek z tej grupy- metylofenidat. Badania wskazują, że dextroamfetamina, podawana 2 razy na dobę, pomimo długiego okresu półtrwania, najlepiej znosi objawy senności. Jednak w Polsce nie została jeszcze zarejestrowana w leczeniu narkolepsji. Psychostymulanty są stosowane u dzieci powyżej 6 roku życia. Są przeciwwskazane u dzieci z chorobami serca³⁸.

- **Modafinil**

Stosowany od 1986 jako lek pierwszego rzutu w leczeniu narkolepsji. Skutecznie utrzymuje stan czuwania. Armodafinil jest około dwukrotnie silniejszą, racemiczną pochodną modafinilu. Żaden z leków nie został zatwierdzony do użytku poniżej 16 roku życia, ale stosowanie *off-label* (poza wskazaniami) jest powszechne w populacji pediatrycznej³⁹. Obydwa preparaty są przeciwwskazane do stosowania podczas ciąży⁴⁰.

- **Pitolisant**

Należy do grupy leków działających na receptory histaminowe. Powoduje zwiększenie wydzielania histaminy powyżej poziomu podstawowego. Dzięki temu wpływa na podtrzymywanie stanu czuwania. Dodatkowo zwiększa wydzielanie acetylocholiny oraz dopaminy. Wyniki badań z 2013 roku wskazują, że pitolisant oraz modafinil z podobną siłą znosi senność dzienną. Niemniej pitolisant był lepiej tolerowany przez pacjentów⁴¹.

- **Leki antykataplektyczne**

Należą do trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (np. imipramina, dezipramina, klomipramina), selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego

³⁷ Ivanenko A., Tauman R., Gozal D., *Modafinil in the treatment of excessive daytime sleepiness in children*, Sleep Medicine, 4 (6) (2003), 579-582.

³⁸ Dauvilliers Y., Bassetti C., Lammers G. J. i wss., *Pitolisant versus placebo or modafinil in patients with narcolepsy: a double-blind, randomised trial*, Lancet Neurology, 2013;12(11):1068 – 5.

³⁹ *Ibidem*, Cassidy S. B., Schwartz S., Miller J. L., Driscoll D. J., s. 10.

⁴⁰ *Ibidem*, Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth Peter, s. 196-200.

⁴¹ *Ibidem*, Dauvilliers Y., Bassetti C., Lammers G. J. i wss., s.1068 – 5.

serotoniny (5-HT) (np. fluoksetyna), inhibitorów wychwytu zwrotnego noradrenaliny i serotoniny (np. wenlafaksyna). Mechanizm działania tych środków polega na hamowaniu fazy REM snu. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, w porównaniu z trójcyklicznymi lekami przeciwdepresyjnymi, słabiej znoszą objawy kataplektyczne, jednakże wykazują lepszy profil bezpieczeństwa⁴².

- **Nowe sposoby leczenia**

Nadzieją dla pacjentów wydaje się być nowy lek - kwas gamma-hydroksymasłowy (GHB). Jest to pochodna neurotransmitera, naturalnie występującego w organizmie - kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Mechanizm działania GHB nie jest do końca poznany. Wiadomo, że wchodzi on w interakcję z receptorami GHB. Uzyskuje się w ten sposób wydłużenie snu NREM (wolnofalowego), ustabilizowanie fazy REM oraz wydłużenie latencji snu. Ponadto sól sodowa GBH wykorzystywana jest do skrócenia pierwszej fazy snu oraz wydłużenia trzeciej i czwartej. Skuteczność zastosowanego leczenia GHB polega na zmniejszeniu senności w ciągu dnia oraz częstotliwości napadów katapleksji⁴³.

2. Ocena bezpieczeństwa stosowania leków.

Aby poprawić skuteczność prowadzonej farmakoterapii, naukowcy na całym świecie szukają nowych substancji, które będą bezpieczniejsze w stosowaniu w porównaniu z obecnie zarejestrowanymi lekami. Wprowadzenie nowego leku na rynek jest jednak nie lada wyzwaniem. Biorąc pod uwagę szereg badań, które musi przejść potencjalny nowy lek, czas oczekiwania na wprowadzenie leku na rynek może sięgać nawet 16 lat⁴⁴. Ze względów humanitarnych oraz w celu ograniczenia kosztów i czasu przeprowadzania wstępnych badań szacujących użyteczność substancji jako leku, zastosowanie znalazły metody obliczeniowe wykonywane *in silico*, czyli przy użyciu algorytmów wbudowanych w programy komputerowe. Testy te pozwalają na wstępną selekcję badanych związków. Badania *in silico* znalazły szerokie zastosowanie m.in. w celu oceny bezpieczeństwa stosowania nowej substancji, dlatego są popularnym i skutecznym sposobem poszukiwania tych

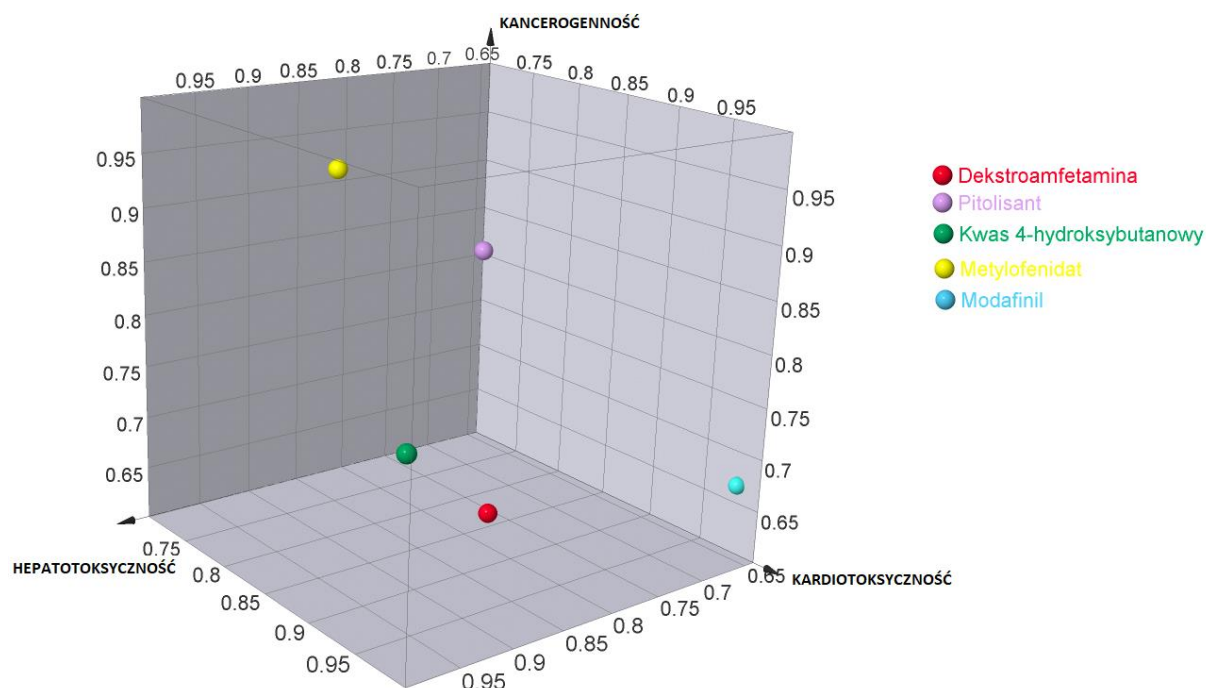
⁴² *Ibidem*, Rosch R. E., Farquhar M., Gringras P., Pal D. K., s. 130.

⁴³ Kowalski A., Kowalska I., Kowalska M., Drózdź W., Nowaczyk A., *Narcolepsy in the light of modern diagnostic, clinical and therapeutic concepts*, Journal of Education, Health and Sport. 2018, 8(11):99-111

⁴⁴ Fajkis N., Kołaczkowski M., Marcinkowska M., *Strategia repozycjonowania, czyli nowe zastosowanie dla starych leków*, Wiadomości Chemiczne, 2018, 72, 11-12

po pochodnych, których działania niepożądane przewyższają właściwości terapeutyczne.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania hepatotoksyczności, kancerogenności, kardiotoxyczności oraz mutagenności nowego potencjalnego leku tj. soli sodowej kwasu gamma-hydroksymasłowego. Otrzymane wyniki porównano z wartościami parametrów otrzymanych dla zarejestrowanych już w tej przypadłości leków. W tym celu, bazując na strukturze chemicznej ww. związków, wyznaczono wartości liczbowe parametrów przy pomocy oprogramowania admetSAR, dostępnego na stronie: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000>. Następnie korzystając z programu OSIRIS DataWarrior otrzymane wyniki zestawiono na wykresie, przedstawionym poniżej.



Wyk. 1. Ocena toksyczności kwasu gamma- hydroksymasłowego oraz leków stosowanych w narkolepsji.

Większość leków ulega metabolizmowi w wątrobie, dlatego niezwykle istotne jest, aby nie wykazywały one działania hepatotoksycznego lub wywierały w jak najmniejszym stopniu wpływ na komórki wątrobowe. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wśród stosowanych w narkolepsji leków jeden, pitolisant, może z dużym prawdopodobieństwem (0,8138) wykazywać działanie hepatotoksyczne. Pozostałe stosowane leki są słabymi inhibitorami cytochromów, podobnie jak kwas gamma-hydroksymasłowy. Dane pismienne wskazują, że pitolisant jest

stosunkowo bezpiecznym lekiem, natomiast przeprowadzone testy dostarczyły informacji na temat inhibicji cytochromu CYP2D6 przez ten lek ⁴⁵.

Badane substancje przeanalizowano również w kierunku prawdopodobieństwa blokowania genu hERG (*human Ether-a-go-go-related Gene*), którego działanie związane jest z wydłużeniem procesu depolaryzacji mięśnia sercowego (odcinek QT w zapisie EKG). Konsekwencją tego działania mogą być częstoskurcze komorowe, prowadzące do poważnych zakłóceń pracy serca a nawet do nagłej śmierci sercowej⁴⁶. Analiza wykazała, że z dużym prawdopodobieństwem modafinil, dekstroamfetamina oraz metylofenidat nie mają komponenty kardi toksycznej. Co więcej, GHB również nie będzie wykazywał takiego działania. Badania wykazały jednak, że pitolisant może blokować gen hERG, z prawdopodobieństwem 0.8726. Dane te znajdują potwierdzenie w piśmiennictwie, z których wynika, że podawanie dużych dawek pitolisantu może powodować wydłużenie odcinka QT⁴⁷.

Niezwykle istotne jest oszacowanie ryzyka występowania nowotworów po suplementacji lekami. Według najnowszych badań⁴⁸ zapadalność na choroby nowotworowe stale wzrasta. W dostępnych prognozach oszacowano, że liczba nowych zachorowań może sięgnąć nawet 18,1 miliona, przy czym niemal połowa będą to przypadki śmiertelne. Zastosowanie algorytmów obliczeniowych w pierwszych etapach badań nad lekiem pozwala na wstępną ocenę ryzyka nowotworzenia występującego po stosowaniu leku.

Otrzymane wyniki wskazują, że żaden wprowadzony do leczenia narkolepsji lek oraz GHB nie ma komponenty kancerogennej. Zakres wartości prawdopodobieństwa nie wywoływania nowotworu mieści się od 0,6665 do 0,9648. W najnowszym piśmiennictwie nie znaleziono informacji dotyczących zgłaszania przypadków występowania nowotworów, których bezpośrednią przyczyną mogłyby być wyżej badane leki.

⁴⁵ Jakubiak G., Kamiński P., *Pitolisant jako pierwsza realizacja kliniczna nowej koncepcji leczenia narkolepsji*, Farmacja Współczesna, 2017, 187-192

⁴⁶ Owczuk R., Wujtewicz M., Zienciuk-Krajka A., Lasińska-Kowara M., Piankowski A., Wujtewicz M., *The influence of anesthesia on cardiac repolarization*, Minerva Anesthesiol. 2012, 78, 483-95

⁴⁷ Calik M. W., *Update on the treatment of narcolepsy: clinical efficacy of pitolisant*, Nat Sci Sleep. 2017; 9: 127–133

⁴⁸ Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., *Cancer Statistic, 2019*, Ca Cancer J Clin, 2019;69:7–347

3. Wnioski

Narkolepsja jest wciąż nie do końca zbadaną jednostką chorobową. Podniesienie jakości życia pacjentów cierpiących na to schorzenie jest determinantą skłaniającą lekarzy oraz farmaceutów do poszukiwania coraz to nowszych, bezpieczniejszych i skuteczniejszych w stosowaniu leków. Wykorzystanie metod chemii obliczeniowej pozwoliło przyspieszyć pierwsze etapy prac nad nowymi lekami. Wstępne wyniki otrzymane dla kwasu gamma-hydroksymasłowego potwierdzają bezpieczeństwo stosowania tego leku w narkolepsji. Niemniej niezbędne jest przeprowadzenie dalszych testów potwierdzające zasadność stosowania tej substancji w leczeniu.

Bibliografia:

Ahmed Imran, Thorpy Michael, *Cinical features, diagnosis and treatment of narcolepsy*, Clinics in Chest Medicine, 2010, nr 31.

Benmedjahed Khadra, Wang Y. Grace, Lambert Jeremy, Evans Christopher, Hwang Steve, Black Jed, Johns Murray, *Assessing sleepiness and cataplexy in children and adolescents with narcolepsy: a review of current patient-reported measures*, Sleep Medicine, 2017, nr 32.

Billiard Michel, *Diagnosis of narcolepsy and idiopathic hypersomnia. An update based on the international classification of sleep disorders, 2nd edition*, Sleep Medicine, 2007, nr 11.

Calik Michael W., *Update on the treatment of narcolepsy: clinical efficacy of pitolisant*, Nat Sci Sleep. 2017, nr 9.

Cassidy Suzanne B., Schwartz Stuart, Miller Jennifer L., Driscoll Daniel J., *Prader-willi syndrome*, Genetics in Medicine, 2012, nr 14(1), 10.

Coelho Fernando, Aloe Flavio, Moreira Gustavo, Sander Heidi H., Roitman Israel, Prado Lucila F., Alves Rosana S., *Narcolepsy in childhood and adolescence*, Sleep Science, 2012, 5(4).

Dauvilliers Yves, Bassetti Claudio, Lammers Gert J. i wsp., *Pitolisant versus placebo or modafinil in patients with narcolepsy: a double-blind, randomised trial*, Lancet Neurology, 2013, nr 12(11).

Fajkis Nikola, Kołaczkowski Marcin, Marcinkowska Monika, *Strategia repozycjonowania, czyli nowe zastosowanie dla starych leków*, Wiadomości Chemiczne, 2018, nr 72.

Gałecki Piotr, Krawczyk Piotr, Świącicki Łukasz, *Kryteria diagnostyczne z DSM-5*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017.

Gmitrowicz Agnieszka, Janas-Kozik Małgorzata, *Zaburzenia psychiczne dzieci i młodzieży*, Warszawa: Medical Tribune Polska, 2018.

International classification of sleep disorders Third Edition, Michael J. Sateia, American Academy of Sleep Medicine, 2014.

Ivanenko Anna, Tauman Riva, Gozal David, *Modafinil in the treatment of excessive daytime sleepiness in children*, Sleep Medicine, 2003, nr 4 (6).

Jakubiak Grzegorz, Kamiński Paweł, *Pitolisant jako pierwsza realizacja kliniczna nowej koncepcji leczenia narkolepsji*, Farmacja Współczesna, 2017.

Kaczor Magda, Szczęsna Magdalena, *Zaburzenia snu u dzieci*, Warszawa: Medical Tribune Polska, 2016.

Kowalski Adrian, Kowalska Iwona, Kowalska Magdalena, Dróżdź Wiktor, Nowaczyk Alicja, *Narcolepsy in the light of modern diagnostic, clinical and therapeutic concepts*, Journal of Education, Health and Sport. 2018, nr 8(11).

Koziorynska Ewa I., Rodriguez Alcibiades J., *Narcolepsy: Clinical Approach to Etiology, Diagnosis, and Treatment*, Reviews in neurological diseases, 2011, nr 8 (3).

Mahoney Carrie E., Cogswell Andrew, Koralnik Igor J., Scammell Thomas E., *The neurobiological basis of narcolepsy*. *Nature Reviews, Neuroscience*, 2019, nr 20.

Mignot Emmanuel, *Genetic and familiar aspects of narcolepsy*. *Neurology*, 1998, nr 50.

Morrison James, Andruszko Robert, Heitzman Janusz, *DSM-5 bez tajemnic. 1st ed.*, Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2016.

Mutschler Ernst, Geisslinger Gerd, Kroemer Heyo K., Ruth Peter, *Mutschler Farmakologia i toksykologia*, 2010.

Nishino Seiji, *Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy*, *Sleep Medicine*, 2007, nr 8.

Occurrence of narcolepsy with cataplexy among children and adolescents in relation to the H1N1 pandemic and Pandemrix vaccinations – results of a case inventory study by the MPA in Sweden during 2009–2010, MPA Report, 2011, nr 1.

Owczuk Radosław, Wujtewicz, Magdalena, Zienciuk-Krajka Agnieszka, Lasińska-Kowara Magdalena, Piankowski Arkadiusz, Wujtewicz Magdalena, *The influence of anesthesia on cardiac repolarization*, *Minerva Anesthesiol.* 2012, nr 78.

Passouant Pierre, *La narcolepsie du temps de Gelineau*, *Histoire des Sciences Naturelles*, 1981, nr 2.

Pużyński Stanisław, Rybakowski Janusz, Wciórka Jacek, *Psychiatria Tom 2*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017.

Rosch Richard E., Farquhar Michael, Gringras Paul, Pal Deb K., *Narcolepsy Following Yellow Fever Vaccination: A Case Report*, *Frontiers in Neurology*, 2016.

Schenck Carlos H., Bassetti Claudio L., Arnulf Isabelle, Mignot Emanuelle, *English translations of the first clinical reports on narcolepsy and cataplexy by*

Westphal and Gelineau in the late 19th century, with commentary, Journal of Clinical Sleep Medicine, 2007, nr 3(03).

Siegel Rebecca L., Miller Kimberly D., Jemal Ahmedin, *Cancer Statistic, 2019*, Ca Cancer J Clin, 2019, nr 69.

Skalski Michał, *Zaburzenia snu i czuwania*, Wrocław: Edra Urban & Partner, 2017.

Steinborn Barbara, *Neurologia wieku rozwojowego*, Warszawa: PZWL, 2017.

Trogstad Lill, Bakken Inger Johanne, Gunnes Nina, Ghaderi Sara, Stoltenberg Camilla, Magnus Per, Håberg Siri E., *Narcolepsy and hypersomnia in Norwegian children and young adults following the influenza A(H1N1) 2009 pandemic*, Vaccine, 2017.

Westphal Carla, *Eigenthumlich mit einschlafen verbundene Anfalle*, Arch Psychiatr Nervenkr, 1877, nr 7.

Wierzbicka Aleksandra, Wichniak Adam, Jernajczyk Wojciech, *Narkolepsja- czy poznaliśmy wszystkie tajemnice choroby?*, Kosmos, 2017, nr 63(2).

Yudofsky Stuart, Hales Robert, *The American Psychiatric Publishing textbook of neuropsychiatry and behavioral neurosciences. 6th ed. Washington, DC: American Psychiatric Pub.*, 2018.

Zawilska Jolanta B., Woldan-Tambor Agata, Płocka Anna, Kużajska Katarzyna, Wojcieszak Jakub, *Narkolepsja: etiologia, obraz kliniczny, diagnostyka i leczenie*, Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2012, nr 66.

Żarowski Marcin, Steinborn Barbara, Kothare Sanjeev, *Narcolepsy in children*, Child Neurology, 2014, nr 23(47).

Wykaz skrótów:

OUN- Ośrodkowy Układ Nerwowy

REM- Rapid Eye Movement

ICSD-3- International Classification of Sleep Disorders -3

PSG- Polismonografia

MSLT- Test wielokrotnej latencji snu

EEG- Elektroencefalogram

EKG- Elektrokardiografia

EMG- Elektromiogram

EOG- Elektrookulogram

SOREMP- Sleep onset REM period
MWT- Maintenance of Wakefulness Test
CSF hcrt-1- Cerebrospinal Fluid Hypocretin-1
HLA — ang. human leukocyte antigens
5-HT- 5-hydroxytryptamine receptor
GABA- Kwas gamma-aminobutanowy
GHB- Kwas gamma-hydroksybutanowy
NREM- Non-rapid eye movement
hERG - human Ether-a-go-go-related Gene

Wykorzystanie metod obliczeniowych *in silico* w celu oceny przeciwbólowego mechanizmu działania wybranych pochodnych kwasu gamma-aminomasłowego

Wprowadzenie

Według Międzynarodowego Stowarzyszenia Badań nad Bólem (*International Association for the Study of Pain (IASP)*) ból neuropatyczny powstaje w wyniku zaburzenia działania układu czucia somatycznego. Nie jest jednostką chorobową samą w sobie, a zespołem objawów, pogarszającym jakość życia pacjentów. Obniżony próg bólu towarzyszący tej chorobie objawia się zbyt intensywnym jego odczuwaniem po zadziałaniu bodźca, normalnie nie wykazującego takiej reakcji (allodynia) oraz spontanicznymi epizodami bólu. Najnowsze badania wskazują, że nawet 16% populacji boryka się ze zmniejszeniem jakości życia wywołanej bólem neuropatycznym¹. Liczba cierpiących z powodu bólu neuropatycznego prawdopodobnie będzie wzrastała na przestrzeni lat, ze względu na wzrost przeżywalności np. po chorobach nowotworowych czy coraz większej liczbie chorych na cukrzycę²³. Jest trudny do zniwelowania, ponieważ istnieje wiele mechanizmów wywołujących powstawanie tego rodzaju bólu. Badania wskazują, że dostępność na rynku wielu środków leczniczych nie gwarantuje sukcesu terapeutycznego. Około 40% pacjentów nie odczuwa ulgi po zastosowaniu dostępnych terapii leczenia bólu neuropatycznego⁴. Powoduje to nadużywanie analgetyków przez pacjentów, co niejednokrotnie może prowadzić do zatrucia. Z tego względu ośrodki naukowe na całym świecie prowadzą badania mające na celu znalezienie i wyjaśnienie mechanizmu działania nowych leków, które mogłyby ukoić cierpienie pacjentów.

¹ North R. Y., Lazaro T. T., Dougherty P. M., *Ectopic Spontaneous Afferent Activity and Neuropathic Pain*. *Neurosurgery*, 2018, 65(CN_suppl_1): s. 49–54.

² Murnion Bridin S., *Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment*. *Aust Prescr*, 2018, 41: s. 60-63.

³ Colloca L., Bouhassira D., Baron R., Dickenson A. H., Yarnitsky D., Freeman R., Truini A., Attal N., Finnerup N. B., Eccleston C., Kalso E., Bennett D. L., Dworkin R. H., Raja S. N., *Neuropathic pain*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17002. doi:10.1038/nrds.2017.2.

⁴ Fijałkowski Ł., et al., *Potential role of selected antiepileptics used in neuropathic pain as human GABA transporter isoform 1 (GAT1) inhibitors—Molecular docking and pharmacodynamic studies*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 96: s. 362-372.

W toku wielu przeprowadzonych badań stwierdzono, że aktywność analgetyczna i antyepileptyczna środków leczniczych jest bezpośrednio ze sobą powiązana. W wyniku aktywacji receptorów NMDA zarówno w epilepsji jak i bólu neuropatycznym zaobserwować można zwiększenie pobudliwości neuronów (tzw. zjawisko *kindling*) oraz powstanie nieproporcjonalnej regulacji wzmacniającej w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (tzw. zjawisko *wind-up*)⁵. Nadzieją dla pacjentów okazało się wykorzystanie w terapii bólu leków stosowanych w epilepsji, o czym świadczą aktualnie prowadzone badania^{6,7}.

Grupa Neuropatyczna ds. Bólu Neuropatycznego IASP (NeuPSIG) opracowała listę leków używanych w terapii bólu neuropatycznego. Lekami pierwszego rzutu są trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, inhibitory wychwytu serotoniny (duloksetyna i wenlafaksyna) oraz gabapentyna i pregabalina. W drugiej kolejności rekomendowane jest zastosowanie plastrów z kapsaicyną, lidokainy bądź tramadolu. Silne opioidy stosowane są wówczas, gdy żadne z powyższych leków nie jest w stanie uśmierzyć bólu⁸.

Sposobów oddziaływanie przeciwepileptycznych leków w kierunku aktywności znoszącej ból jest wiele. Wśród nich można wymienić blokadę sodowo i wapniowo zależnych kanałów jonowych, prowadzącą do zmniejszenia pobudzenia neuronów (np. karbamazepina, lamotrygina), zwiększenie transmisji neuronalnej, która tłumi impulsy bólowe (np. tigabina, vigabatryna, fenobarbital). Najczęściej podawanymi lekami w leczeniu bólu neuropatycznego są substancje oddziałujące na podjednostkę alfa-2-delta (pregabalina, gabapentyna), mające jednocześnie najbezpieczniejszy profil bezpieczeństwa⁹. Najnowsze badania skupiają się na powiązaniu aktywności przeciwpadaczkowej i przeciwbólowej z układem GABA-ergicznym, dlatego to właśnie ten kierunek badań wydaje się być godnym uwagi.

⁵ Davydov O.P., *Antiepileptic Drugs Beyond Epilepsy (use of anticonvulsants in the treatment of pain syndromes)*. Neuroscience and Behavioral Physiology, 2014, 44(7): s. 772-778.

⁶ Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Zaręba P., Sałat K., *Docking and pharmacodynamic studies on hGAT1 inhibition activity in the presence of selected neuronal and astrocytic inhibitors. Part I*. Journal of Molecular Graphics and Modelling 2018, 85: s. 171-181.

⁷ Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Kowalska M., Podkowa A., Sałat K., *Studies on the Activity of Selected Highly Lipophilic Compounds toward hGAT1 Inhibition. Part II*. ACS Chemical Neuroscience, 2019, 10: s. 337-347.

⁸ Finnerup N. B., Attal N., Haroutounian S., et al., *Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Neurology, 2015, 14(2): s. 162-173.

⁹ Woroń J., Adamczyk A., Malec-Milewska M., Jakowicka-Wordliczek J., *Stosowanie koanalgetyków u pacjentów z bólem neuropatycznym w przebiegu choroby nowotworowej*. Medycyna Paliatywna w Praktyce 2014, 8(2): s. 85-90.

Słuszność użycia ww. leków potwierdzają badania kliniczne przeprowadzone m.in. dla tiagabiny. Co więcej liczne eksperymenty na zwierzętach potwierdziły potencjał analgetyczny leków przeciwpadaczkowych. W związku z tym podjęto próbę wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania pochodnych leków przeciwpileptycznych w kierunku potencjału analgetycznego¹⁰.

W niniejszej pracy zebrano najnowsze wyniki badań, których celem jest opisanie mechanizmu działania inhibitorów wychwytu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) jako potencjalnych leków znoszących doznania bólowe.

1. Kwas gamma-aminomasłowy

Aktywność ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w dużym stopniu zależy od kwasu γ -aminobutanowego (GABA). Jest on jednym z głównych neurotransmiterów hamujących, zlokalizowany w mózgu i rdzeniu kręgowym ssaków. Obficie występuje w synapsach OUN (nawet do 70%). Jest substancją naturalnie występującą w organizmie, syntetyzowaną w zakończeniach neuronalnych, w cyklu glutaminowym. Ze względu na budowę chemiczną GABA zaliczany jest do aminokwasów. W organizmie występuje w postaci jonu obojnaczego (zwitterionu), co czyni go nośnikiem prądu elektrycznego oraz daje możliwość przenoszenia bodźców. Powyżej punktu izoelektrycznego (pI), który dla GABA pI = 7.3, staje się anionem (pH > pI), natomiast poniżej (pH < pI) kationem. Ze względu na elastyczną budowę, kwas ten może przyjmować wiele różnych konformacji, co ułatwia efektywne wiązanie z receptorem. Dowiedziono, że najskuteczniej GABA wiąże się z receptorem w konformacji zagiętej.

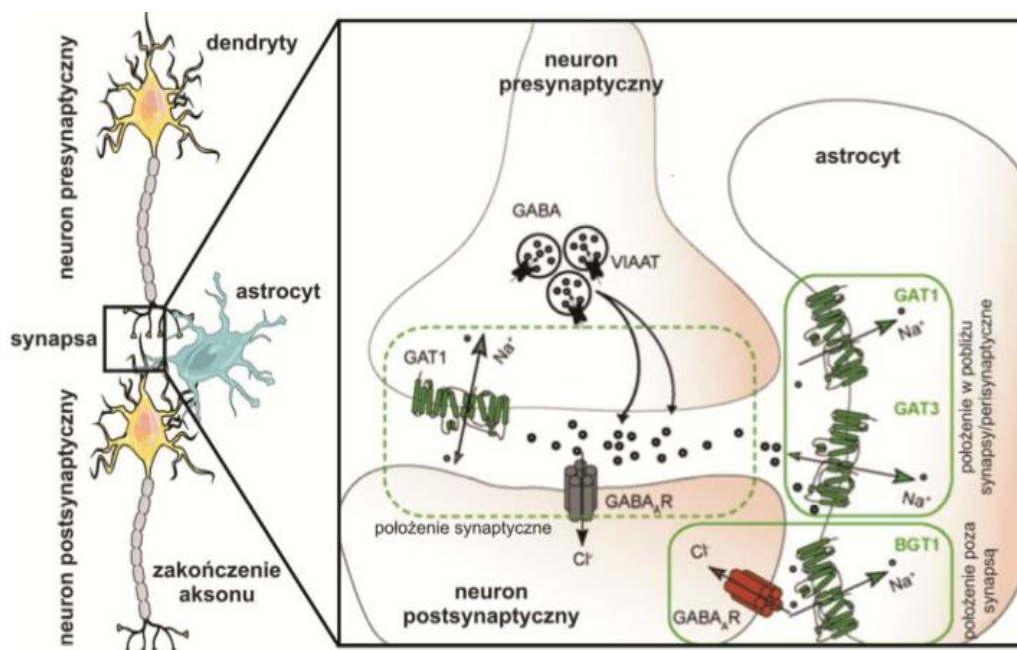
Kwas gamma-aminomasłowy działa za pośrednictwem trzech receptorów: jonotropowego GABA_A, GABA_C i metabotropowego GABA_B¹¹. Aktywność wielu neuronów jest kontrolowana przez kwas GABA, dlatego konsekwencją spadku neurotransmisji GABA-ergicznej może być rozwój zaburzeń neurologicznych oraz psychicznych takich jak: epilepsja, ból neuropatyczny, depresja, bezsenność, niepokój czy choroba Parkinsona¹².

¹⁰ Ibidem Fijałkowski Ł., et al., *Potential role of selected antiepileptics ...*, s. 362-372.

¹¹ Conti F., Minelli A., Melone M., *GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications*. Brain Research Reviews, 2004, 45(3): s. 196-212.

¹² D. Buckingham, Ihara S., Makoto B., Sattelle D., Kazuiho M., , *Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors*,. Curr. Med.Chem. , 2017, 24.

Agonistyczne działanie na receptory GABA-ergiczne, hamowanie katabolizmu oraz wychwyty zwrotnego GABA stosowanych leków powoduje zwiększenie stężenia tego kwasu. Transport neuroprzekaźnika jest możliwy dzięki białkom GAT, wśród których wyróżniamy: pęcherzykowy transporter GABA (VGAT) oraz cztery białka błonowe (GAT1 – GAT3, BGT-1). W OUN ssaków białka te znajdują się w różnych typach komórek nerwowych, w zależności od lokalizacji (rysunek 1).



Ryc. 1 Lokalizacja transporterów GAT w przestrzeni synaptycznej.

Uważa się obecnie, że największe znaczenie w neurotransmisji GABAergicznej odgrywają zakończenia nerwów oraz komórki astrocytowe (rysunek 1). W XX wieku sądzono, że komórki glejowe są tylko spoiwem neuronów (gr. *glia*, klej) oraz pełniącym drugoplanowe funkcje podporowe, odżywcze i ochronne, nie posiadającym żadnych ważniejszych funkcji w OUN. Najnowsze badania pokazują jednak, że astrocyty są zdolne do magazynowania neuroprzekaźników i uwalniania ich po zadziałaniu bodźca przez co istotnie wpływają na proces neurotransmisji¹³. Ponadto białka GAT1 i GAT3 występujące na ich powierzchni (rysunek 1) są odpowiedzialne za wychwyt zwrotny GABA ze szczeliny synaptycznej¹⁴. Dlatego astrocyty mogą modulować stężenia GABA w szczelinie synaptycznej a przez to

¹³ Komórki glejowe w mózgu mogą się komunikować jak neurony. 2004 <http://laboratoria.net/aktualnosci/3377.html> [dostęp: 16.07.2019].

¹⁴ Ibidem; Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Kowalska M., et al, *Studies on the Activity...*, s. 337–347.

modulują transmisję synaptyczną samych neuronów. Transportery GAT działają na zasadzie kanałów jonowych, do przenoszenia GABA w obrębie błony komórkowej niezbędne są dwa jony sodu i jeden jon potasu. Migracja neuroprzekaźnika odbywa się na zasadzie transportu aktywnego, pobierając energię z rozkładu adenozyntrifosforanu (ATP)¹⁵.

1.1. Inhibitory białek GAT1

Obiecujące w leczeniu bólu neuropatycznego wydają się być zatem inhibitory GAT, dlatego na nich skupia się obecnie uwaga naukowców. Wzmacniają one sygnał GABA, dzięki czemu mogą zostać wykorzystane w leczeniu chorób, w których obserwuje się zmniejszoną funkcję tego kwasu¹⁶. Obecnie inhibitory wychwytu GABA dzieli się na kilka grup, z czego najistotniejsze w lecznictwie są alifatyczne, cykliczne oraz aromatyczne pochodne, posiadające zdolność przenikania przez barierę krew-mózg (BBB)¹⁷.

Jednym z interesujących kierunków badań jest potwierdzenie molekularnego mechanizmu przeciwbólowego działania leków działających na układ GABA-ergiczny. W piśmiennictwie specjalistycznym przedstawiono cykl badań w grupie pochodnych leków przeciwpadaczkowych w kierunku inhibicji ludzkiego transportera 1 GABA. Badania te przeprowadzono metodą dokowania molekularnego, przy użyciu programów AutoDock i AutoDockTools. Analizie poddano wybrane 44 kompleksy ligand-hGAT1.

Ze względu na niedostępność struktury 3D białka GAT1 do badań wykorzystano model ludzkiego białka (hGAT1), którego sekwencję pobrano z bazy Swiss-Prot¹⁸. Wykorzystany model białkowy hGAT1 cechuje najwyższa dostępna obecnie homologia między modelowaną sekwencją a szablonem (aż 47%), co potwierdza wiarygodność uzyskanych wyników.

¹⁵ Zafar S., Nguyen M. E., Muthyala R., Jabeen I., Sham Y. Y., *Modeling and Simulation of hGAT1: A Mechanistic Investigation of the GABA Transport Process*. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 19: s. 61-69.

¹⁶ McQuail J. A., Frazier C. J., Bizon J. L., *Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling*. Trends in molecular medicine, 2015, 21(7): s. 450-460.

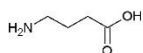
¹⁷ Ibidem Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Zaręba P., Sałat K., *Docking and pharmacodynamic studies ...*: s. 171-181.

¹⁸ Boeckmann B., et al., *The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003*. Nucleic acids research, 2003, 31(1): s. 365-370.

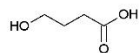
2. Wyniki badań

Do pierwszego etapu analiz wybrano z grupy związków aktywnych: endogenne metabolity (GABA, GHB), leki przeciwpadaczkowe bez komponenty przeciwbólowej (kod ATC: N03AG) oraz leki przeciwpadaczkowe (kod ATC: N03AX). Wzory chemiczne związków przedstawiono na rysunku 2 [4].

endogenne metabolity

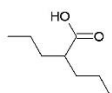


kwask 4-aminobutanowy
GABA

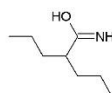


kwask 4-hydroksybutanowy
GHB

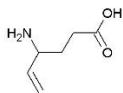
pochodne kwasów tłuszczowych- ATC kod N03AG, leki antyepileptyczne bez właściwości analgetycznych



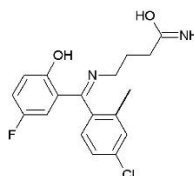
Kwas walproinowy



Walpromid

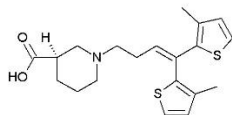


Wigabatryna

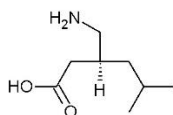


Progabid

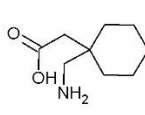
inne antyepileptyczne leki- ATC kod N03AX, antyepileptyczne leki posiadające właściwości analgetyczne



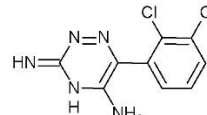
Tiagabina



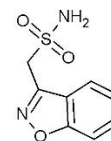
Pregabalina



Gabapentyna



Lamotrygina



Zonisamid

Ryc. 2. Wzory chemiczne badanych związków.

Otrzymane za pomocą ww. programów wyniki wskazują, że wszystkie leki oraz metabolity użyte w badaniu tworzą kompleksy z hGAT1. Niemniej, dla każdej z analizowanych grup związków otrzymano inne zakresy wartości liczbowych energii utworzonego kompleksu (E_B). Niezwykle istotnym jest, aby energia wiązania kompleksu była relatywnie niska. To właśnie wartość E_B ma decydujące znaczenie w ocenie stabilności utworzonego kompleksu.

Przeprowadzone analizy wskazały, że stabilniejsze energetycznie kompleksy z białkiem hGAT1 tworzą leki przeciwpadaczkowe posiadające komponentę przeciwbólową. Wartość energii zawierająca się w przedziale ($-4.51 \div -7.23$ kcal/mol) determinuje zatem pojawienie się efektu analgetycznego. Najniższą

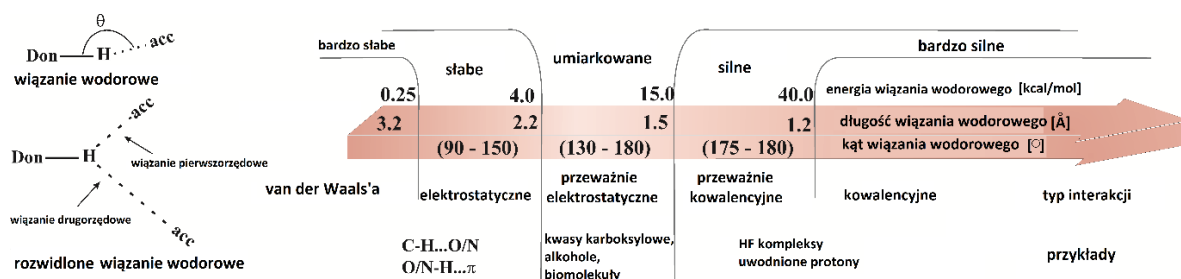
wartość energii uzyskano dla kompleksu izomeru R-Tiagabiny (TGB). Wyniki te potwierdzają doniesienia piśmiennicze - TGB jest jedynym klinicznie potwierdzonym inhibitorem białka GAT1¹⁹²⁰. Natomiast najwyższą wartość energii uzyskano dla Zonisamidu (-3.49 kcal/mol). Doniesienia piśmiennicze²¹ wskazują jednak, że mechanizm działania tego leku nie jest jeszcze do końca wyjaśniony.

Zdecydowanie wyższe wartości E_B uzyskano dla leków nieposiadających działania przeciwbólowego (-3.63 ÷ -4.52 kcal/mol). Najmniej stabilnie energetycznie kompleksy uzyskano dla połączenia hGAT1 i walpromidu (VPD).

Podsumowując, uzyskane kompleksy hGAT1-lek z grupy N03AG są mniej stabilne energetycznie w porównaniu z kompleksami tego samego białka z lekami z grupy N03AX.

W celu potwierdzenia związku pomiędzy aktywnością anlgetyczną i przeciwepileptyczną a białkiem transportującym GABA przeprowadzanych badań wykonano dokowanie kwasu gamma-aminomasłowego i kwasu gamma-hydroksymasłowego do modelu białka hGAT1. W toku przeprowadzonych badań potwierdzono, że oba związki wchodzi w interakcje z białkiem. Niemniej uzyskana wartość liczbowa E_B dla GABA (-4.93kcal/mol) ma wyższą wartość niż dla GHB (-3.52kcal/mol).

Dodatkowym parametrem w ocenie inhibicji białka transportującego GABA są wiązania wodorowe jakimi badana substancja łączy się z białkiem, ich długości oraz kąty. Na rysunku 3 przedstawiono najistotniejsze typy wiązań chemicznych, służące ocenie siły wiązania leku do białka.



¹⁹ Lee-Kubli C., Calcutt N., *Painful neuropathy: Mechanisms*. Handbook of clinical neurology, 2013, 126: s. 533-557.

²⁰ Wein T., et al., *Different Binding Modes of Small and Large Binders of GAT1*. Chem. Med. Chem., 2016, 11(5): s. 509-518.

²¹ Małek R., Piskorska B., Czuczwar S. J., *Zonisamide: a new antiepileptic drug*. Pol. J. Pharmacol, 2003, 55: s. 683-689.

Ryc. 3 Typy wiązań chemicznych oraz ich wartości istotne w procesie wiązania receptora z białkiem.

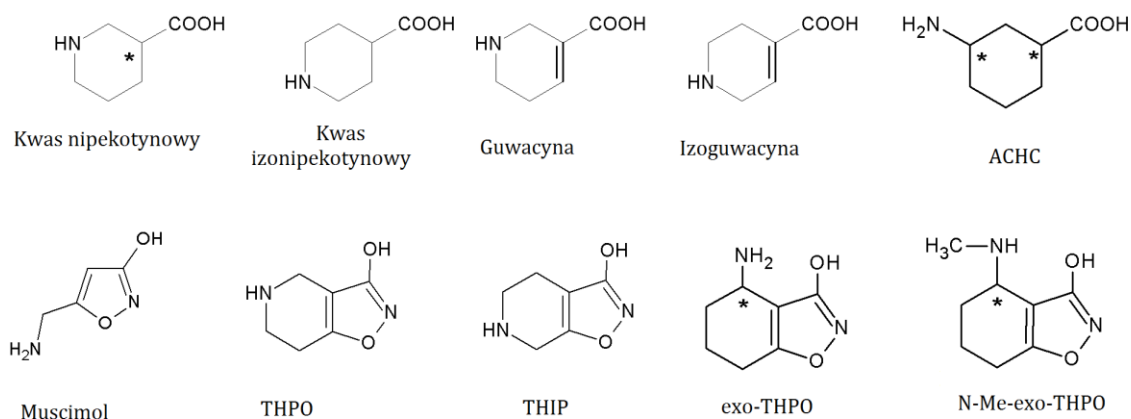
Przeprowadzone badania dokowania wskazują, iż najbardziej istotne znaczenie w procesie wiązania się liganda w centrum aktywnym receptora w kontekście wywoływania analgezji są ugrupowania: CONH, RNH oraz COOH związku. Znajomość połączeń pomiędzy aminokwasami hGAT1 oraz ugrupowaniami badanych pochodnych dostarczyła dodatkowych informacji na temat trwałości utworzonych kompleksów. Porównując połączenia GABA-hGAT1 oraz GHB-hGAT1 stwierdzono, że odpowiednio drugi z nich cechuje się silniejszymi wiązaniami wodorowymi w porównaniu z pierwszym. Ponadto po zestawieniu długości wiązań GABA z białkiem (1.93 - 2.23 Å) z wiązaniami jakimi GHB łączy się z hGAT1 (1.78–1.86 Å) odnotowano silniejszą siłę wiązania drugiego kompleksu. Niemniej to właśnie połączenie GABA-hGAT1 wykazuje większą trwałość ze względu na wcześniej podaną, wyższą wartość E_B w porównaniu z kompleksem prekursora GABA z tym samym białkiem²². Wśród leków należących do grupy N03AX zaobserwowano, że słabymi oddziaływaniami cechuje się Lamotrygina (LTG), ponieważ posiada tylko jedno ugrupowanie mogące wytworzyć wiązania wodorowe z hGAT1. Natomiast TGB i Pregabalina (PGB) posiada wiele ugrupowań wchodzących w interakcję z aminokwasami tego białka, dlatego kompleksy te są bardziej stabilne.

Kolejny etap badań skupił się na kompleksach białka hGAT1 z 16 alifatycznymi analogami GABA, będącymi strukturami wyjściowymi do syntezy nowych pochodnych²³. Wnikliwa analiza najnowszych danych piśmienniczych dostarczyła także informacji na temat powiązania aktywności komórek astrocytowych, z aktywnością analgetyczną i antyepileptyczną związków. Struktury badanych pochodnych przedstawiono na rysunku 4.

²² Ibidem Colloca L., Bouhassira D., Baron R. et al., *Neuropathic pain*.

²³ Ibidem Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Zaręba P., Sałat K., *Docking and pharmacodynamic*, s. 171-181.

analogi GABA (izosteryczne pochodne GABA)



Ryc. 4 Wzory chemiczne badanych związków.

Badania piśmiennicze wskazują²⁴, że niemal wszystkie cząsteczki endogennego GABA łączą się z receptorem w konformacji zagiętej. Dlatego większość pochodnych GABA, które nie są strukturami cyklicznymi, pomimo swoich właściwości agonistycznych względem receptora GABA nie będą mogły skutecznie hamować jego wychwytu zwrotnego²⁵. Niemniej przeprowadzone testy wskazują, że aminokwasy cykliczne będące analogami GABA, np. kwas nipekotynowy oraz inzonipekotynowy podobnie do acyklicznych struktur nie hamują wychwytu zwrotnego neuroprzekaźnika. Powodem jest bowiem brak wystarczającej lipofilowości do penetrowania granicy krew-mózg. Co więcej, ze względu na słabą lipofilowość GABA nie jest syntezowany w celu stosowania go jako lek anksjolityczny. Z tego względu modyfikując strukturę GABA poszukiwane są substancje imitujące jego funkcje biologiczne. Przeprowadzone badania potwierdziły, że wysokie wartości energii, które mieszczą się w zakresie (-4.11 ÷ -6.45) utworzonych kompleksów badanych pochodnych z hGAT1 determinują właściwości analgetyczne badanych związków. Niestety nie są one w stanie przechodzić przez barierę krew-mózg. Z tego względu kolejne testy były skoncentrowane na 17 analogach o zwiększonej lipofilowości²⁶. Struktury, które analizowano, zostały porównane z modelem farmakoforu inhibitorów wychwytu GABA, zaproponowanym

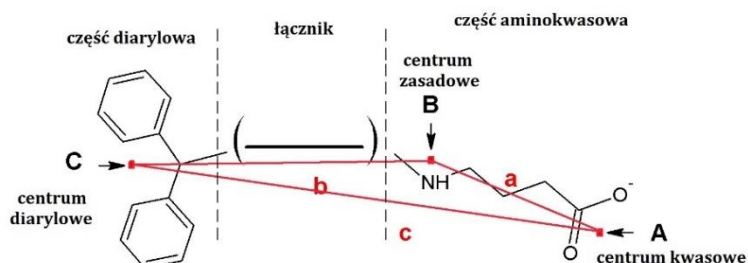
²⁴ Rodrigo M., et al., *The structure and diffusion behaviour of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) in neutral aqueous solutions*. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2017, 104: s. 110-117.

²⁵ Bourguignon J.-J., Schmitt M., Didier B., *Design and structure-activity relationship analysis of ligands of gamma-hydroxybutyric acid receptors*. Alcohol, 2000, 20(3): s. 227-236.

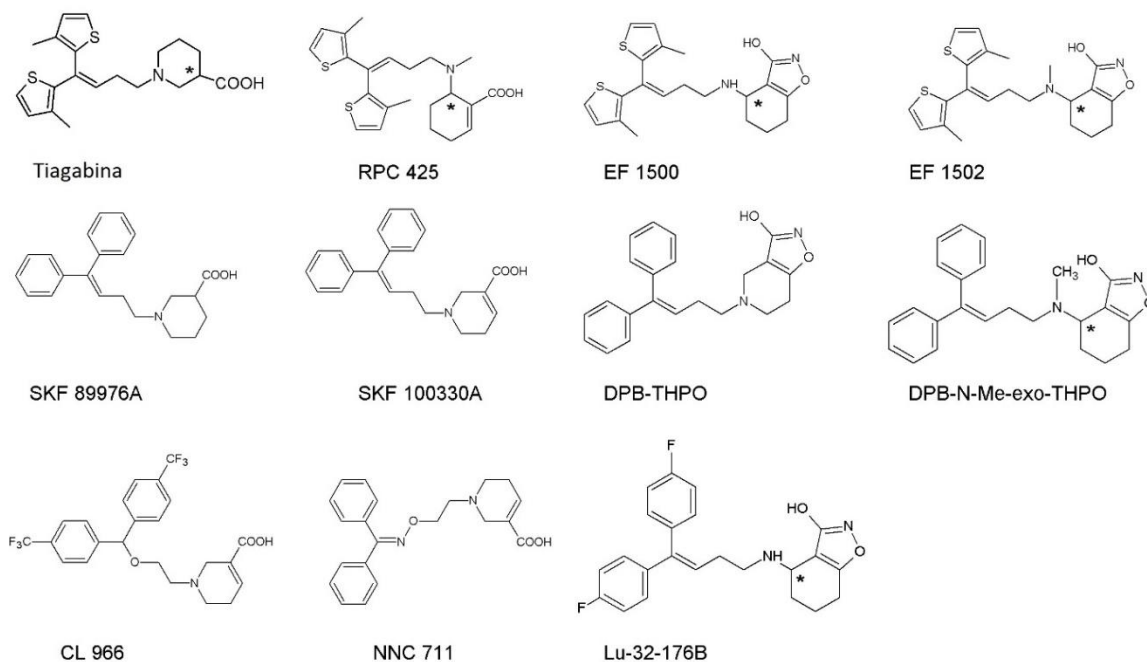
²⁶ Ibidem Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Kowalska M., et al., *Studies on the Activity ...* s. 337-347.

przez grupę badaczy pod przewodnictwem N'Goka w 1990 roku²⁷. Na rysunku 5 przedstawiono badane pochodne oraz model użytego do rozważań farmakoforu. Zaznaczono najbardziej istotne regiony niezbędne do oceny przeciwbólowego potencjału badanych związków

model farmakoforowy dla inhibitorów GABA



wybrane struktury lipofilowych inhibitorów wychwyty GABA



Rys. 5 Model farmakoforowy inhibitorów transportu GABA.

Niemniej, nie określono bezwzględnie w jaki sposób powinna wyglądać dana struktura, alby jak najlepiej mogłaby się dopasować do centrum aktywnego białka GAT. Wiadomo jednak, że kluczowe znaczenie w sposobie oddziaływania z receptorem ma odległość między poszczególnymi regionami farmakoforowymi oraz

²⁷ N'Goka V., et al., *GABA-uptake inhibitors: construction of a general pharmacophore model and successful prediction of a new representative*. Journal of medicinal chemistry, 1991, 34(8): s. 2547-2557.

konformacja przestrzenna związku (prosta lub zagięta). Przeprowadzone badania wykazały, że odległość pomiędzy centrum kwasowym i zasadowym (a) ma wpływ na siłę wiązania do GAT zlokalizowanych w różnych komórkach nerwowych i glejowych. Najlepszymi inhibitorami transporterów GABA w komórkach glejowych są struktury o $a > 1,6 \text{ \AA}$. Blokowanie wychwytu w neuronach i komórkach nerwowych jest najskuteczniejsze przy długości $a < 5 \text{ \AA}$, natomiast gdy $a > 5,4 \text{ \AA}$ związek jest w stanie zahamować wychwyty neuronalny. Zamknięcie ugrupowania NH_2 oraz COOH w strukturę pierścienia pozwala usztywnić strukturę. Dzięki takim zabiegom niektóre aminokwasy, np. kwas nipekotynowy czy izonipekotynowy potrafią silnie wiązać się z transporterami GAT²⁸ [22]. Ze względu na słabą przenikalność przez barierę krew-mózg nie są jednak wykorzystywane w leczeniu. Udowodniono, że najkorzystniejsze wartości odległości pomiędzy regionami farmakoforowymi związków wchodzących w interakcję z transporterami GAT wynoszą: $a = 3.9\text{-}5.6 \text{ \AA}$, $b = 3.8\text{-}7.8 \text{ \AA}$, $c = 3.4\text{-}9.7 \text{ \AA}$, natomiast kąty wiązań pomiędzy regionami a i b powinny mieścić się w zakresie $\angle ABC = 42\text{-}147^\circ\text{C}$.

W grupie analizowanych pochodnych w przeprowadzonym badaniu potwierdzono również wcześniejsze wyniki dotyczące zależności pomiędzy wartością energii kompleksu (stabilnością) oraz jego aktywnością przeciwbólową.

Aby potwierdzić działanie analgetyczne badanych związków w warunkach *in vivo*, myszom w różnych patomechanizmach bólu (allodynia mechaniczna oraz hiperalgezia termiczna) podano dwa znane inhibitory hGAT1- kwas nipekotynowy oraz tiagabinę. Myszy poddano testom sprawdzającym koordynację ruchową oraz pamięć warunkową po podaniu ww leków. Otrzymane wyniki potwierdziły rolę transportera hGAT1 w patomechanizmie bólu neuropatycznego²⁹.

3. Wnioski

Wyniki przedstawione w pracy sugerują, że wykorzystanie inhibitorów transporterów GABA w leczeniu bólu neuropatycznego jest jak najbardziej uzasadnione. Niemniej badania *in silico* oraz *in vitro* należy uzupełnić o testy

²⁸ Krosgaard-Larsen P., Frolund B., Frydenvang K., *GABA uptake inhibitors. Design, molecular pharmacology and therapeutic aspects*. Current pharmaceutical design, 2000, 6(12): s. 1193-1209.

²⁹ Ibidem Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Kowalska M., et al., *Studies on the Activity ...* s. 337-347.

bezpieczeństwa stosowania leków u ludzi. Dopiero pozytywne przejście każdej z faz badań klinicznych będzie podstawą wykorzystania tych związków w leczeniu bólu.

Bibliografia:

North Robert Y., Lazaro Tyler T., Dougherty Patrick M., Ectopic Spontaneous Afferent Activity and Neuropathic Pain. *Neurosurgery*, 2018, nr 65(CN_suppl_1).

Murnion Bridin P., Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr*, 2018, nr 41.

Colloca Luana, Bouhassira Didier, Baron Ralf, Dickenson Anthony H., Yarnitsky David, Freeman Roy, Truini Andrea, Attal Nadine, Finnerup Nanna B., Eccleston Christopher, Kalso Eija, Bennett David L., Dworkin Robert H., Raja Srinivasa N., Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, nr 3: 17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2.

Fijałkowski Łukasz, et al., Potential role of selected antiepileptics used in neuropathic pain as human GABA transporter isoform 1 (GAT1) inhibitors—Molecular docking and pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, nr 96.

Davydov OS., Antiepileptic Drugs Beyond Epilepsy (use of anticonvulsants in the treatment of pain syndromes). *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2014, nr 44(7).

Nowaczyk Alicja, Fijałkowski Łukasz, Zaręba Paula, Sałat Kinga, Docking and pharmacodynamic studies on hGAT1 inhibition activity in the presence of selected neuronal and astrocytic inhibitors. Part I. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2018, nr 85.

Nowaczyk Alicja, Fijałkowski Łukasz, Kowalska Magdalena, Podkowa Adrian, Sałat Kinga, Studies on the Activity of Selected Highly Lipophilic Compounds toward hGAT1 Inhibition. Part II. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, nr 10.

Finnerup Nanna B., Attal Nadine, Haroutounian Simon, et al., Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology*, 2015, nr 14(2).

Woroń Jarosław, Adamczyk Anna, Malec-Milewska Małgorzata, Jakowicka-Wordliczek Joanna, Stosowanie koanalgetyków u pacjentów z bólem neuropatycznym w przebiegu choroby nowotworowej. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 2014, nr 8(2):.

Conti Fiorenzo, Minelli Andrea, Melone Mariarosa, GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research Reviews*, 2004, nr 45(3).

D. Buckingham, Ihara Steven, Makoto B., Sattelle David, Kazuiho Matsuda, , Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors,. *Curr. Med.Chem.* , 2017, nr 24.

Komórki glejowe w mózgu mogą się komunikować jak neurony. 2004 <http://laboratoria.net/aktualnosci/3377.html> [dostęp 16.07.2019].

Zafar Sadia, Nguyen Megin E., Muthyala Ramaiah, Jabeen Ishrat, Sham Yuk Y., Modeling and Simulation of hGAT1: A Mechanistic Investigation of the GABA Transport Process. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2019. 19: p. 61-69.

McQuail Joseph A., Frazier Charles J., Bizon Jennifer L., Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. *Trends in molecular medicine*, 2015, nr 21(7).

Boeckmann Brigitte, et al., The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic acids research*, 2003, nr 31(1).

Lee-Kubli Corinne, Calcutt Nigel, Painful neuropathy: Mechanisms. *Handbook of clinical neurology*, 2013, nr 126.

Wein Thomas, et al., Different Binding Modes of Small and Large Binders of GAT1. *Chem. Med. Chem.*, 2016, nr 11(5).

Małek Robert, Piskorska Barbara, Czuczwar Stanisław J., Zonisamide: a new antiepileptic drug. *Pol. J. Pharmacol*, 2003, nr 55.

Rodrigo Melia, et al., The structure and diffusion behaviour of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) in neutral aqueous solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2017, nr 104.

Bourguignon Jean-Jacques, Schmitt Martine, Didier Bruno, Design and structure-activity relationship analysis of ligands of gamma-hydroxybutyric acid receptors. *Alcohol*, 2000, nr 20(3).

N'Goka Victor, et al., GABA-uptake inhibitors: construction of a general pharmacophore model and successful prediction of a new representative. *Journal of medicinal chemistry*, 1991, nr 34(8).

Krogsgaard-Larsen Povl, Frolund Bente, Frydenvang Karla, GABA uptake inhibitors. Design, molecular pharmacology and therapeutic aspects. Current pharmaceutical design, 2000, nr 6(12).

Wykaz skrótów:

OUN- Ośrodkowy Układ Nerwowy

GABA- Kwas gamma-aminobutanowy

GHB- Kwas gamma-hydroksybutanowy

IASP- International Association for the Study of Pain

pI- punkt izoelektryczny

ATP- adenzynotryfosforan

E_B- energia kompleksu

TGB- Tiagabina

PGB- Pregabalina

VPD- Walpromid

LTG- Lamotrygina

Wsparcie społeczne a lęk i depresja u pacjentek z nowotworem piersi, mózgu i płuc poddanych radioterapii

Wprowadzenie

Dla pacjentów chorych onkologicznie dużym obciążeniem emocjonalnym są nie tylko odczuwalne objawy choroby, ale również ich przewlekłość, proces leczenia oraz brak pewności co do rokowania. Rozpoznanie choroby nowotworowej i leczenie onkologiczne wymagają od pacjenta i jego bliskich psychicznego przystosowania do nowej sytuacji, które prowadzi do zrozumienia, czym jest wykryta choroba i na czym polega proponowane leczenie. Reakcje towarzyszące przystosowaniu, takie jak niedowierzanie, złość, smutek są objawem zdrowia psychicznego i jeśli mają charakter przemijający nie wymagają interwencji. Zdarza się, że proces przystosowania do choroby nie przebiega prawidłowo, a u pacjenta występują objawy, których intensywność i czas utrzymywania się wskazuje na wystąpienie zaburzeń psychicznych. Obniża to znacząco jakość życia chorych i może utrudniać przebieg leczenia onkologicznego. Do najczęstszych stanów wymagających specjalistycznej pomocy psychoterapeutycznej i/lub psychiatrycznej należą zaburzenia lękowe i depresja.

1. Zaburzenia psychiczne w przebiegu choroby nowotworowej

U osób cierpiących na choroby somatyczne, w tym na choroby nowotworowe, częściej niż w populacji ogólnej, obserwuje się występowanie zaburzeń psychicznych. Można je podzielić na dezadaptacyjne oraz neuropsychologiczne (ostre i przewlekłe). Do najczęściej występujących zaburzeń psychicznych w przebiegu choroby nowotworowej zaliczamy, należące do zaburzeń dezadaptacyjnych, zaburzenia lękowe i depresję.¹

¹ Rolińska A., Furmaga O., Kwaśniewski W. *et al.*, *Zaburzenia psychiczne w przebiegu choroby nowotworowej*, Curr. Probl. Psychiatry, 2011, 12: 546–549.

2.1. Zaburzenia lękowe w chorobie nowotworowej

Okres diagnozy w chorobie nowotworowej i zmiany w trakcie leczenia (np. remisja, nawrót choroby, progresja, zakończenie leczenia przyczynowego itp.) wywołują u chorych onkologicznie wzmożony poziom lęku. Wynika to z poczucia utraty bezpieczeństwa, zagrożenia dla zdrowia i/lub życia. Z czasem, szczególnie z chwilą podjęcia leczenia onkologicznego, lęk maleje. Wiąże się to m.in. z poczucia przywrócenia częściowej kontroli nad sytuacją, pojawienia się nadziei na opanowanie zagrożenia wywołanego chorobą.² Lęk może być paraliżujący, ale może też mieć aspekt pozytywny, może mobilizować do działania (np. współpracy z personelem medycznym, stosowania się do zaleceń, pilnowania terminów badań i wizyt kontrolnych itp.), a także ostrzegać przed niebezpieczeństwem.

Zespół lękowy obejmujący sferę psychiczną, behawioralną i wegetatywno-somatyczną, to lęk „chorobowy”, który przekracza reakcję fizjologiczną, powodując dezorientację w codziennych czynnościach. Może występować nawet u ok. 47% chorych na nowotwór.³ Wymaga farmakoterapii albo psychoterapii lub połączenia tych dwóch metod.

W chorobie nowotworowej możemy mieć do czynienia z kilkoma rodzajami lęku, zwłaszcza z: lękiem przewlekłym, inaczej zespołem lęku uogólnionego (*GAD - General Anxiety Disorder*), ostrym zespołem lękowym (*panic disorder*), fobiami, lękową koncentracją na chorobie (*anxious preoccupation*). W przypadku lęku przewlekłego pacjent nie może w ogóle sprawować kontroli nad lękiem. Pojawiają się trudności w zasypianiu, występują objawy ze strony układu wegetatywnego, lęk zabiera choremu więcej niż 50% czasu poza snem. Lęk napadowy to nagły i gwałtowny lęk, który charakteryzuje się krótkim okresem trwania, wieloma objawami wegetatywnymi – skokami ciśnienia, przyspieszonym tętnem i oddechem, uczuciem zaciskania w klatce piersiowej i uczuciem nagłej duszności. U chorych onkologicznie mogą się również pojawić fobie, które ujawniają się w trakcie specyficznych procedur medycznych, np. klaustrofobia przy badaniach TK lub MR, trypanofobia, czyli lęk przed iniekcjami, itp. Lękowa koncentracja na chorobie pojawia się przede wszystkim u osób długo chorujących, starszych lub w fazie terminalnej

² Kieszkowska-Grudny A., Grudny J., Sierko E. *et al.*, *Role of psychological and emotional factors in cancer related fatigue (CRF) syndrome in advanced NSCLC patients undergoing palliative chemotherapy*, *Advances in Palliative Medicine*, 2010, 9: 81-86.

³ Stark D., Hack K.M., Smith A.B. *et al.*, *Anxiety disorders in cancer patients: their nature, associations, and relation to quality of life*, *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20(14): 3137-48.

choroby, kiedy chory szczególnie koncentruje się na wszelkich objawach chorobowych. Wówczas pacjent może dużo czasu poświęcać na dokładną analizę ulotek lekowych, może odczuwać potrzebę samodzielnego zmniejszania lub omijania dawek zapisanych leków, by uniknąć potencjalnych działań niepożądanych.⁴

W przypadku dużego nasilenia lęku postępowaniem z wyboru powinna być farmakoterapia. Wybór leczenia zależy od stanu ogólnego chorego, a także od perspektywy leczenia onkologicznego, w tym również rokowania w chorobie nowotworowej.

2.2. Depresja w przebiegu choroby nowotworowej

Objawy depresyjne w chorobie nowotworowej często mogą być nierozpoznane. Mogą być mylone z przygnębieniem, które wydaje się naturalnym objawem towarzyszącym chorobie nowotworowej. Zespół depresyjny u osób cierpiących na choroby somatyczne występuje częściej niż w populacji ogólnej, a obecność przewlekłej choroby stanowi czynnik ryzyka zachorowania na depresję. Objawy depresyjne można stwierdzić średnio u około 20–40% leczonych z powodu nowotworów złośliwych. Osoby w depresji mają z reguły większe trudności w podejmowaniu decyzji, pojawia się tendencja do izolowania się od otoczenia, co zwiększa ryzyko nieregularności wizyt, niestosowania się do zaleceń. Spadek motywacji i poczucia sensu życia może prowadzić do odsuwania w czasie diagnostyki i leczenia. Zakłada się przynajmniej trzy przyczyny powstawania depresji w chorobie nowotworowej. Po pierwsze, już informacja o chorobie może sprawić, że myślenie o terażniejszości i przyszłości będzie przygnębiające, a jeśli przygnębienie będzie trwało dłużej, to spowoduje wyczerpanie zasobów i przerodzi się w depresję. Drugim powodem depresji mogą być skutki uboczne leczenia nowotworów, które mogą znacząco zmienić samopoczucie chorych. Po trzecie, jak pokazują najnowsze badania, prawdopodobnie substancje chemiczne produkowane przez komórki nowotworu mogą bezpośrednio wpływać na powstawanie depresji.⁵ Diagnoza depresji w chorobie nowotworowej oparta jest głównie na weryfikacji objawów ze strony poznawczej (tzw. triadzie depresyjnej) i/lub psychologicznej, tj. obniżenia

⁴ Araszkievicz A., Bartkowiak W., Starzec W., *Zaburzenia lękowe w chorobie nowotworowej*, Psychiatr. Prakt. Ogólnolek. 2004, 4: 157–166.

⁵ Pyter L.M., Pineros V., Galang J.A. *et al.*, *Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary- adrenal axis regulation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 9069-9074.

nastroju, poczucia bezradności, beznadziejności, obniżenia samooceny, poczucia winy, anhedonii, a także myśli samobójczych i pragnienia śmierci. Pojawiają się liczne dezadaptacyjne myśli (np. ruminacje, samokrytycyzm, wybiórcze skupianie się na negatywach, katastrofizowanie), które pacjentowi wydają się realistyczne i logiczne, a powodują pogorszenie nastroju, funkcjonowanie behawioralne, pogłębiają ukryte irracjonalne przekonania i tym samym utrudniają wydajne myślenie i mierzenie się z sytuacją. Zwykle początkowa reakcja chorego na diagnozę nowotworową jest krótka, trwa co najwyżej kilka dni lub tygodni i może wiązać się z uczuciem zaprzeczania, braku akceptacji, rozstrojenia emocjonalnego, strachu, obaw czy smutku. Ta normalna reakcja może być częścią objawów depresji, które prowadzą od zwykłego smutku, poprzez zaburzenia adaptacyjne, aż do ciężkiej depresji.⁶

Leczenie przeciwdepresyjne zależy od diagnozy, stopnia nasilenia objawów oraz długości ich trwania. Optymalne jest połączenie metod psychoterapii i farmakoterapii.

3. Wsparcie społeczne w chorobach nowotworowych

Chorym na nowotwory można i należy oferować pomoc służącą poprawie jakości i komfortu ich życia, bez względu na rokowanie. Choroba przewlekła wywiera szczególny wpływ na zapotrzebowanie na wsparcie społeczne. Jej treść zależy od stanu i samopoczucia pacjenta oraz dynamiki choroby. W przypadku nowotworu bardzo stresująca jest diagnoza, uzyskanie informacji na temat choroby i dostępnych metod leczenia, a także sama terapia. Na każdym z tych etapów wsparcie społeczne odgrywa istotną rolę, a poszczególne jego wymiary mogą przynieść pomoc w rozwiązywaniu pojawiających się problemów.

Do działań zapewniających wsparcie należy poradnictwo indywidualne oraz grupy wsparcia, które zwiększają świadomość choroby, poprawiają samoocenę i poczucie skuteczności, a nawet mogą wydłużyć czas przeżycia. Znalezienie oparcia w społeczeństwie pomaga również poprzez determinowanie do podjęcia diagnostyki i leczenia, co jest szczególnie istotne w przypadku nowotworów, przy których długość przeżycia ściśle zależy od etapu na którym zostanie on wykryty. Najczęściej

⁶ Block S.D., *Assessing and managing depression in the terminally ill patient. ACP-ASIM End-of-Life Care Consensus Panel. American College of Physicians – American Society of Internal Medicine*, Ann. Intern. Med. 2000, 132(3): 209-218.

największym wsparciem dla chorego jest rodzina, bliscy i przyjaciele.⁷ Chorzy poszukują dostępnej sieci społecznej, z której w razie potrzeby mogą skorzystać, grupy osób na których mogą polegać. Dystans fizyczny i psychologiczny pozwala na wyróżnienie sieci pierwotnej i wtórnej. Sieć pierwotną stanowią osoby, z którymi jednostka pozostaje w bliskich kontaktach i jest z nimi powiązana emocjonalnie. Sieć wtórna to bardziej formalne kontakty, do których można zaliczyć instytucje zdrowotne, kościoły, pracodawcę.

Stresujący charakter choroby nowotworowej wydaje się oczywisty, a chęć niesienia pomocy takim osobom słuszna, jednak trzeba mieć na uwadze zapotrzebowanie pacjenta. Określenie, który człowiek najbardziej potrzebuje wsparcia i jakiego rodzaju, jest problematyczne. Pomoc psychologiczna jest bardzo ważna, jednak należy pamiętać, że nie odniesie ona skutków jeżeli każda ze stron nie będzie gotowa na jej realizowanie. Na różnych etapach choroby mogą występować u pacjenta inne problemy, co jest podstawowym czynnikiem, który powinien determinować rodzaj udzielanego wsparcia, dlatego warto zwrócić uwagę na ich określenie.⁸ Oprócz udzielenia wsparcia w zakresie przezwyciężenia trudnej sytuacji ważne jest również wytworzenie u osoby chorej wewnętrznej siły do samodzielnej walki.

Wsparcie emocjonalne daje pozytywny efekt w przypadku odnalezienia motywacji do podjęcia leczenia. Pozwala na wyjawienie swoich obaw i uwolnienie się od negatywnych uczuć.⁹ Okazywane jest, również, poprzez towarzyszenie podczas wizyty lekarskiej, a także pozwolenie choremu na samodzielne podejmowanie decyzji. Nie należy dawać choremu nadziei na coś niemożliwego do osiągnięcia, a raczej skupić się na wysłuchaniu go. Wsparcie informacyjne stanowi psychoedukacja, która pozwala na lepsze zrozumienie swojej choroby, szybszą ocenę jej symptomów, przeciwdziała opóźnieniom w konsultacjach i zastosowaniu leczenia oraz skłania osobę do wykorzystania przekazanej wiedzy. Może być ono realizowane poprzez indywidualne spotkania a także współpracę z rodziną. Jako

⁷ Fopka-Kowalczyk M., *Wsparcie społeczne w chorobie nowotworowej*, Psychoonkologia, 2013, 4: 156-162.

⁸ *Ibidem*.

⁹ *Ibidem*.

formę wsparcia instruktazowego można wskazać udzielanie pomocy w znalezieniu miejsc z artykułami potrzebnymi w trakcie leczenia czy konsultacji medycznych.¹⁰

Problemem w okazywanej pomocy ze strony otoczenia może być stygmatyzacja choroby nowotworowej. Bliscy często relacjonują, że nie wiedzą jak się zachować w obecności chorego, czują, że przebywają w obliczu śmierci co powoduje narastanie dyskomfortu i napięcia. Efektem tego jest porzucanie pacjenta w momencie diagnozy lub powolne oddalanie się poprzez zmniejszanie czasu wizyt i zwiększanie przerw między nimi. W przypadku najbliższej rodziny, gdzie fizyczne wycofanie nie jest możliwe, może dojść do wycofania psychologicznego. Kolejnym problemem jest wycofanie pacjenta z jego dotychczasowych ról co może skutkować obniżeniem poczucia koherencji.¹¹

4. Cel pracy

Praca ma na celu zwrócenie uwagi na psychospołeczną sytuację osób chorych onkologicznie w trakcie radioterapii oraz analizę zjawiska wsparcia społecznego w kontekście choroby nowotworowej, jak również, zbadanie zależności między poziomem wsparcia społecznego a nasileniem lęku i depresji u pacjentek z nowotworem piersi, mózgu i płuc leczonych radioterapią.

5. Metodologia badań

Badania przeprowadzono w okresie od października 2016 r. do kwietnia 2017 r. na Oddziale Klinicznym Radioterapii Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Do badań zostało zakwalifikowanych 30 pacjentek poddanych radioterapii. Grupa badana była zróżnicowana pod względem wieku, wykształcenia, stanu cywilnego, warunków socjalno-bytowych i sytuacji finansowej. Chore podzielono ze względu na typ nowotworu: nowotwór piersi – 16 kobiet, nowotwór mózgu – 8 kobiet, nowotwór płuc – 6 kobiet.

Jako narzędzia wykorzystano analizę dokumentacji medycznej i kwestionariusze: Szpitalną Skalę Lęku i Depresji (*HADS- Hospital Anxiety and Depression Scale*) oraz Berlińskie Skale Wsparcia Społecznego (*BSSS- Berlin*

¹⁰ Kacperczyk A., *Wsparcie społeczne w instytucjach opieki paliatywnej i hospicyjnej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2006.

¹¹ *op. cit.* Fopka-Kowalczyk M., *Wsparcie społeczne...*

Social Support Scales) wypełnione dwukrotnie: na początku i na końcu hospitalizacji (po 6 tygodniach).

Skala *HADS* zawiera 14 pytań i składa się z dwóch niezależnych podskal mierzących poziom lęku i depresji. Każda z nich zawiera siedem stwierdzeń dotyczących aktualnego stanu badanego. Za każdą odpowiedź respondent może uzyskać od 0 do 3 punktów. Nasilenie określonych cech ocenia sam pacjent mając do wyboru czterostopniową skalę oceny. W celu wykluczenia chwilowych wahań nastroju ocenie podlega ostatni tydzień przed badaniem. Osiągnięcie w każdej podskali od 0–7 punktów uważane jest za normę, 8–10 za łagodne, 11–14 pkt. – umiarkowane, a 15–21 – za ciężkie zaburzenie. Współczynnik α -Cronbacha wynosi 0,884 (0,829 w przypadku lęku i 0,840 w przypadku depresji).

Skala *BSSS* to zestaw narzędzi, który służy do pomiaru poznawczych i behawioralnych wymiarów wsparcia społecznego. Zawiera on pięć niezależnych skal: wsparcie społeczne spostrzegane (8 pozycji), zapotrzebowanie na wsparcie (4 pozycje), poszukiwanie wsparcia (5 pozycji), aktualnie otrzymywane wsparcie (15 pozycji) oraz wsparcie ochraniające (6 pozycji). Odpowiedzi udziela się w skali od 1 do 4, a dla każdej ze skal oblicza się średnie wartości. Współczynnik α -Cronbacha dla poszczególnych skal wynosi od 0,63 do 0,83.

W analizie statystycznej wykorzystano test χ^2 , test Persony, analizę wariancji Anova, test Kruskala-Wallisa. Jako poziom istotności przyjęto $p \leq 0,05$.

6. Wyniki badań

W poniższych Tab.ch i na wykresach przedstawiono wyniki badań z podziałem na typ nowotworu i moment oceny. W pierwszym etapie badań przeprowadzonych podczas przyjęcia do kliniki wzięło udział 30 pacjentek chorych onkologicznie, w drugim etapie, przeprowadzonym w dniu wypisu, 25 kobiet.

Poziom lęku w poszczególnych typach nowotworów w momencie przyjęcia i wypisu

W pierwszej kolejności analizie poddano lęk w momencie przyjęcia w zależności od typu nowotworu.

Tab. 1. Poziom lęku w momencie przyjęcia w poszczególnych typach nowotworów.

			Typ nowotworu			Wynik testu
			Nowotwór piersi	Nowotwór mózgu	Nowotwór płuc	
Lęk w momencie przyjęcia	Wynik w granicach normy	N	9	6	5	$p = 0,884$
		%	56,3%	75,0%	83,3%	
	Wynik na granicy normy	N	3	1	0	
		%	18,8%	12,5%	0,0%	
	Wynik poza normą	N	4	1	1	
		%	25,0%	12,5%	16,7%	
Ogółem		N	16	8	6	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

We wszystkich grupach wyodrębnionych ze względu na typ nowotworu większość stanowiły osoby, których wyniki mieściły się w normie (od 56,3% do 83,3%). Różnice procentowe pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie.

Następnie analizie poddano lęk w momencie wypisu w zależności od typu nowotworu.

Tab. 2. Poziom lęku w momencie wypisu w poszczególnych typach nowotworów.

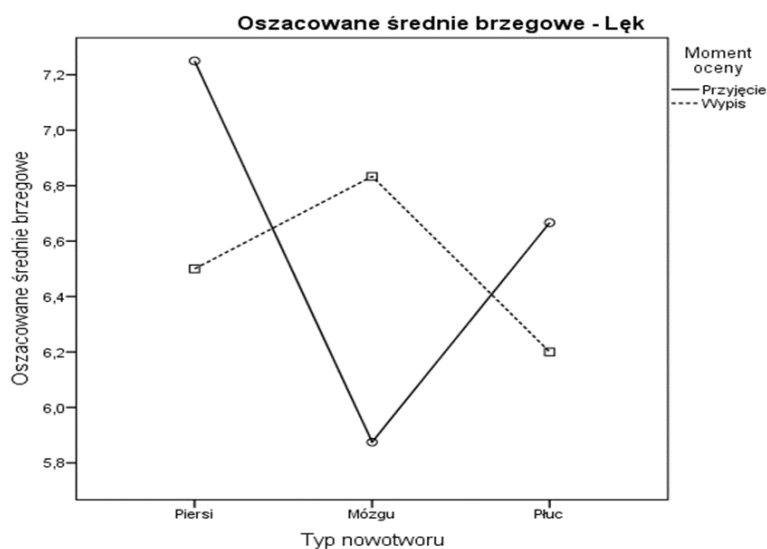
			Typ nowotworu			Wynik testu
			Nowotwór piersi	Nowotwór mózgu	Nowotwór płuc	
Lęk w momencie wypisu	Wynik w granicach normy	N	9	4	5	$p = 0,865$
		%	64,3%	66,7%	100,0%	
	Wynik na granicy normy	N	2	1	0	
		%	14,3%	16,7%	0,0%	
	Wynik poza normą	N	3	1	0	
		%	21,4%	16,7%	0,0%	
Ogółem		N	14	6	5	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Osoby z wynikiem w normie stanowiły 64,3% badanych z nowotworem piersi, 66,7% badanych z nowotworem mózgu i 100% badanych z nowotworem płuc. Różnice procentowe pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie.

Następnie analizowano czy nasilenie lęku u pacjentek było uzależnione od momentu, w którym dokonywano pomiaru oraz od typu nowotworu. Uzyskane wyniki zaprezentowano w poniższej tabeli i na wykresie.

Tab. 3. Nasilenie lęku w zależności od momentu oceny oraz typu nowotworu.

	<i>F</i>	<i>p</i>	Częstkowe η^2
Model skorygowany	0,125	0,986	0,013
Stała	100,64 3	0,000	0,673
Moment pomiaru	0,004	0,948	0,000
Rodzaj nowotworu	0,083	0,920	0,003
Moment pomiaru * Rodzaj nowotworu	0,180	0,835	0,007



Uzyskany wynik nie był istotny statystycznie dla całego modelu ($F = 0,125$; $p > 0,05$). Oznacza to, że nasilenie lęku u badanych kobiet nie było uzależnione od typu nowotworu ani od momentu, w którym dokonywano pomiaru.

Poziom depresji w poszczególnych typach nowotworów w momencie przyjęcia i wypisu

W drugiej kolejności analizie poddano poziom depresji w momencie przyjęcia w zależności od typu nowotworu.

Tab. 4. Poziom depresji w momencie przyjęcia w poszczególnych typach nowotworów.

			Typ nowotworu			Wynik testu
			Nowotwór piersi	Nowotwór mózgu	Nowotwór płuc	
Depresja w momencie przyjęcia	Wynik w granicach normy	N	11	6	5	$p = 0,955$
		%	68,8%	75,0%	83,3%	
	Wynik na granicy normy	N	3	1	0	
		%	18,8%	12,5%	0,0%	
	Wynik poza normą	N	2	1	1	
		%	12,5%	12,5%	16,7%	
Ogółem		N	16	8	6	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

W każdej grupie większość badanych stanowiły osoby z wynikiem w normie.

Analizie poddano również poziom depresji w momencie wypisu w zależności od typu nowotworu.

Tab. 5. Poziom depresji w momencie wypisu w poszczególnych typach nowotworów.

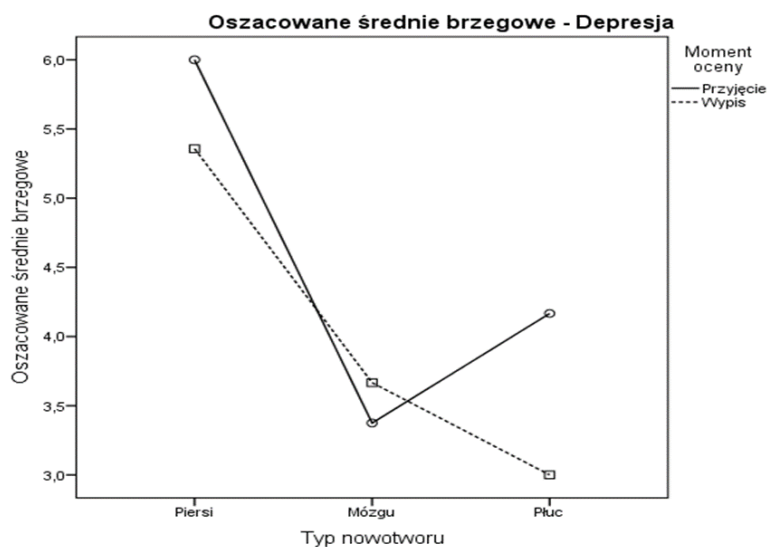
			Typ nowotworu			Wynik testu
			Nowotwór piersi	Nowotwór mózgu	Nowotwór płuc	
Depresja w momencie wypisu	Wynik w granicach normy	N	10	5	5	$p = 1,000$
		%	71,4%	83,3%	100,0%	
	Wynik na granicy normy	N	2	1	0	
		%	14,3%	16,7%	0,0%	
	Wynik poza normą	N	2	0	0	
		%	14,3%	0,0%	0,0%	
Ogółem		N	14	6	5	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Nie wykazano zależności pomiędzy rodzajem nowotworu a poziomem depresji w momencie wypisu.

Następnie analizowano czy poziom depresji u pacjentek był uzależniony od momentu w którym dokonywano pomiaru oraz od typu nowotworu. Uzyskane wyniki zaprezentowano w poniższej tabeli i na wykresie.

Tab. 6. Nasilenie depresji w zależności od momentu oceny i typu nowotworu.

	<i>F</i>	<i>p</i>	Częstkowe η^2
Model skorygowany	1,061	0,393	0,098
Stała	62,842	0,000	0,562
Moment pomiaru	0,222	0,640	0,005
Rodzaj nowotworu	2,333	0,108	0,087
Moment pomiaru * Rodzaj nowotworu	0,134	0,875	0,005



Uzyskany wynik nie był istotny statystycznie dla całego modelu ($F = 1,061$; $p > 0,05$). Oznacza to, że nasilenie depresji u badanych kobiet nie było uzależnione od typu nowotworu ani od momentu w którym dokonywano pomiaru.

Poziom wsparcia społecznego w poszczególnych typach nowotworów w momencie przyjęcia i wypisu

W dalszej kolejności przeanalizowano poziom wsparcia społecznego w momencie przyjęcia i wypisu u chorych na nowotwór piersi, mózgu i płuc.

Tab. 7. Poziom wsparcia społecznego w zależności od momentu oceny i typu nowotworu.

	Nowotwór piersi			Nowotwór mózgu			Nowotwór płuc			Wynik testu
	Me	Min	Maks	Me	Min	Maks	Me	Min	Maks	
Spostrzegane dostępne wsparcie emocjonalne (przyjęcie)	15,0	12,0	16,0	16,0	14,0	16,0	16,0	12,0	16,0	$\chi^2 = 0,144$ $df = 2$ $p=0,931$
Spostrzegane dostępne wsparcie instrumentalne (przyjęcie)	16,0	12,0	16,0	16,0	15,0	16,0	16,0	13,0	16,0	$\chi^2 = 1,293$ $df = 2$ $p=0,524$
Zapotrzebowanie na wsparcie (przyjęcie)	10,5	7,0	15,0	11,5	7,0	13,0	11,0	10,0	15,0	$\chi^2 = 0,516$ $df = 2$ $p=0,772$
Poszukiwanie wsparcia (przyjęcie)	14,0	8,0	18,0	16,0	14,0	17,0	15,0	9,0	17,0	$\chi^2 = 4,642$ $df = 2$ $p=0,098$
Emocjonalne wsparcie społeczne (przyjęcie)	30,0	25,0	36,0	36,0	32,0	36,0	36,0	27,0	36,0	$\chi^2 = 5,956$ $df = 2$ $p = 0,051$
Instrumentalne wsparcie społeczne (przyjęcie)	11,5	5,0	12,0	12,0	11,0	12,0	12,0	6,0	12,0	$\chi^2 = 3,738$ $df = 2$ $p = 0,154$
Informacyjne wsparcie społeczne (przyjęcie)	6,0	4,0	8,0	8,0	7,0	8,0	7,0	4,0	8,0	$\chi^2 = 3,900$ $df = 2$ $p = 0,142$
Zadowolenie ze wsparcia społecznego (przyjęcie)	4,0	1,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	$\chi^2 = 4,009$ $df = 2$ $p = 0,135$
Wsparcie buforująco-ochronne (przyjęcie)	15,0	12,0	24,0	17,0	10,0	24,0	20,0	14,0	24,0	$\chi^2 = 1,299$ $df = 2$ $p = 0,522$
Spostrzegane dostępne wsparcie emocjonalne (wypis)	15,5	12,0	16,0	16,0	14,0	16,0	16,0	13,0	16,0	$\chi^2 = 1,760$ $df = 2$ $p = 0,415$

Spostrzegane dostępne wsparcie instrumentalne (wypis)	16,0	12,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	13,0	16,0	$\chi^2 = 2,750$ $df = 2$ $p = 0,253$
Zapotrzebowanie na wsparcie (wypis)	10,5	7,0	15,0	11,5	5,0	13,0	11,0	10,0	15,0	$\chi^2 = 0,442$ $df = 2$ $p = 0,802$
Poszukiwanie wsparcia (wypis)	14,5	9,0	18,0	16,5	16,0	17,0	15,0	10,0	17,0	$\chi^2 = 5,446$ $df = 2$ $p = 0,066$
Emocjonalne wsparcie społeczne (wypis)	32,5	25,0	36,0	36,0	33,0	36,0	36,0	32,0	36,0	$\chi^2 = 4,551$ $df = 2$ $p = 0,103$
Instrumentalne wsparcie społeczne (wypis)	12,0	5,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	10,0	12,0	$\chi^2 = 3,476$ $df = 2$ $p = 0,176$
Informacyjne wsparcie społeczne (wypis)	6,0	4,0	8,0	8,0	7,0	8,0	7,0	5,0	8,0	$\chi^2 = 5,358$ $df = 2$ $p = 0,069$
Zadowolenie ze wsparcia społecznego (wypis)	4,0	1,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,0	4,0	$\chi^2 = 2,084$ $df = 2$ $p = 0,353$
Wsparcie buforująco-ochronne (wypis)	15,0	12,0	24,0	17,0	10,0	24,0	18,0	14,0	22,0	$\chi^2 = 1,294$ $df = 2$ $p = 0,524$

W odniesieniu do żadnej zmiennej nie stwierdzono wyniku istotnego statystycznie ($p > 0,05$). Oznacza to, że poziom wsparcia społecznego w momencie przyjęcia i wypisu nie był zróżnicowany ze względu na typ nowotworu.

Wsparcie społeczne a nasilenie lęku i depresji u pacjentek z nowotworem piersi, mózgu i płuc w zależności od momentu oceny i typu nowotworu

W ostatnim etapie badań analizowano związek pomiędzy poszczególnymi wymiarami wsparcia społecznego a poziomem nasilenia lęku i depresji, w dwóch momentach pomiaru, w zależności od typu nowotworu.

Analizę przeprowadzono w oparciu o regresję liniową dla czterech modeli: pierwszy dotyczył nasilenia lęku w momencie przyjęcia, drugi – nasilenia depresji w momencie przyjęcia, trzeci – nasilenia lęku w momencie wypisu, a czwarty – nasilenia depresji w momencie wypisu. W każdym z modeli predyktorami były poszczególne wymiary wsparcia społecznego oraz występowanie badanych typów nowotworów. Poniżej przedstawiono tabeli ogólne wyniki dotyczące poszczególnych analizowanych modeli.

Tab. 8. Ogólne wyniki dotyczące wpływu wsparcia społecznego na występowanie depresji i lęku.

Model	<i>F</i>	<i>P</i>
Lęk w momencie przyjęcia	0,840	0,598
Depresja w momencie przyjęcia	0,659	0,748
Lęk w momencie wypisu	1,479	0,244
Depresja w momencie wypisu	1,061	0,447

Żaden z analizowanych modeli nie był istotny statystycznie ($p > 0,05$). Lęk i depresja w momencie przyjęcia i wypisu nie były uzależnione od wsparcia społecznego ani od typu nowotworu.

7. Dyskusja

Analiza badań wykonanych przy przyjęciu do szpitala wykazała, że 56,3% kobiet z nowotworem piersi, 75% kobiet z nowotworem mózgu i 83,3% kobiet z nowotworem płuc otrzymała wynik wskazujący na poziom lęku w granicach normy. Wynik na granicy normy otrzymało 18,8% pacjentek z nowotworem piersi oraz 12,5% z nowotworem mózgu. Zaburzenia lękowe występowały u 25% z badanych chorych na nowotwór piersi i 12,5% chorych na nowotwór mózgu. Dla porównania w badaniach Szwałt dotyczących sposobów radzenia sobie z chorobą nowotworową oraz poziomem lęku i depresji u chorych poddanych opiece paliatywnej u 54%

otrzymano wynik w granicach normy, u 30% na pograniczu normy, a u 16 % występowały zaburzenia związane z lękiem.¹²

W naszym badaniu poziom depresji przy przyjęciu do szpitala był w granicach normy u 68,8% pacjentek z nowotworem piersi, 75% z nowotworem mózgu i 83,3% z nowotworem płuc. Wynik na granicy normy otrzymało 18,8% kobiet z nowotworem piersi i 12,5% kobiet z nowotworem mózgu. Poza normą znalazło się 12,5% pacjentek z nowotworem piersi i mózgu oraz 16,7% pacjentek z nowotworem płuc. W badaniach Szwat u 40% nie stwierdzono zaburzeń, 30% otrzymało wynik na granicy normy, a 30% miało zaburzenia depresyjne. Autorka jako element determinujący występowanie lęku i depresji podaje ból.¹³

W badaniach Cepuch i Wordliczka oceniano poziom bólu, depresji i lęku u młodych pacjentów z chorobą nowotworową i reumatyczną. W grupie osób z chorobą nowotworową 58,4% otrzymało wynik w granicach normy, 28,5% na pograniczu normy, a u 13,41% występowały zaburzenia depresyjne.¹⁴

Stępień i Wrońska w swoich badaniach analizowały natomiast poziom depresji i lęku u pacjentek po radykalnym leczeniu nowotworu piersi, w zależności od stanu funkcjonalnego z grupy pięciu dziedzin: stan fizyczny, stan emocjonalny, życie rodzinne i towarzyskie, funkcjonowanie w życiu codziennym, a także specyficzne dolegliwości związane z leczeniem nowotworu piersi. Ich badania wykazały, że wraz ze wzrostem poziomu lęku i depresji obniżało się ogólne funkcjonowanie we wszystkich wymiarach.¹⁵

W badaniach Baczewskiej oceniano ból, depresję i lęk u pacjentów hospitalizowanych z powodu nowotworu. Z badań wynika, że u prawie wszystkich respondentów występował lęk, z czego u 48,04% był on na poziomie umiarkowanym,

¹² Szwat B., Słupski W., Krzyżanowski D., *Sposoby radzenia sobie z chorobą nowotworową a poczucie depresji i nasilenie bólu u chorych objętych opieką paliatywną*, Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne, 2011, 1(1): 35-41.

¹³ *Ibidem*.

¹⁴ Cepuch G., Wordliczek J., *Ocena zależności pomiędzy natężeniem bólu a występowaniem lęku i depresji u młodych pacjentów hospitalizowanych z powodu choroby nowotworowej i reumatycznej*, Polska Medycyna Paliatywna, 2006, 5(2): 44-53.

¹⁵ Stępień R., Wrońska I., *Lęk i depresja jako emocjonalne uwarunkowania możliwości funkcjonalnych kobiet po radykalnym leczeniu raka piersi*, Studia Medyczne, 2008, 10: 31-35.

a u co szóstej osoby badanej był na wysokim poziomie. Ciężka depresja dotykała co dziesiątą osobę, a u 38,24% była ona na poziomie umiarkowanym.¹⁶

Linden i wsp. w swoich badaniach oceniali lęk i depresję u osób po diagnozie nowotworowej w zależności od płci, wieku oraz typu nowotworu. Wykazano, że u kobiet lęk i depresja występowała częściej niż u mężczyzn.¹⁷

Badania własne wykazały, że różnica w poziomie depresji i lęku w zależności od momentu oceny nie była istotna statystycznie. Badania wykonane przez Vahdaninie

i wsp. oceniały poziom depresji i lęku u pacjentek z nowotworem piersi na początku leczenia, po 3 miesiącach i po roku od zakończenia leczenia. Wynikało z nich, że poziom lęku i depresji z upływem czasu uległ zmniejszeniu. Pomimo tego w 18 miesiącu badań, aż 38,4% pacjentek odczuwało nasilony lęk, a 22,2% miało depresję.¹⁸ Badania własne dotyczące poziomu wsparcia społecznego nie wykazały istotnych statystycznie różnic w zależności od momentu oceny i typu nowotworu u pacjentek z grupy badawczej. Nie wykazano również wpływu wsparcia społecznego na występowanie lęku i depresji. Natomiast w badaniach Wojtyny i wsp. określano znaczenie spostrzeganego wsparcia emocjonalnego i instrumentalnego dla pacjentów w wieku powyżej 60. lat hospitalizowanych z powodu zaburzeń depresyjnych. Wykazały one, że oba rodzaje wsparcia obniżały poziom depresji u pacjentów, przy czym wsparcie emocjonalne poprawiało stan pacjentów w czterech pierwszych tygodniach leczenia, a wsparcie instrumentalne w ostatniej fazie leczenia, podczas pobytu w domu.¹⁹

Kurowska i Kościelna w swoich badaniach oceniały wpływ wsparcia społecznego na orientację życiową pacjentów z kolostomią wylonioną z powodu raka jelita grubego. Ich badania wykazały, że osoby otrzymujące wsparcie instrumentalne

¹⁶ Baczevska B., Kropornicka B., Drozd C. i in., *Ocena bólu, lęku i depresji u pacjentów hospitalizowanych z powodu choroby nowotworowej*, *Przedsiębiorczość i Zarządzanie*, 2013, 14, 10(2): 7-21.

¹⁷ Wolfgang L., Vodermaier A., Mac Kenzie R. *et al.*, *Anxiety and depression after cancer diagnosis, Prevalence rates by cancer type, gender and age*, *Journal of Affective Disorders*, 2012, 141(2/3): 345-51.

¹⁸ Vahdaninia M., S. Omidvari S., Montazeri A., *What do predict anxiety and depression in breast cancer patients? A follow-up study*, *Social Psychiatry And Psychiatric Epidemiology*, 2010, 45(3): 355-361.

¹⁹ Wojtyna E., Dosiak M., Życińska J., *Wpływ wsparcia społecznego na przebieg zaburzeń depresyjnych u pacjentów w podeszłym wieku*, *Psychogeriatrya Polska*, 2007, 4(1): 17-26.

mają większy poziom zrozumienia i globalnego poczucia koherencji. Ponadto chorzy otrzymujący mniej wsparcia wykazywali się mniejszą zaradnością.²⁰

W wyniku analizy dyskusji można zauważyć, że zarówno u pacjentek z nowotworem piersi, mózgu i płuc poddanych radioterapii, jak i u pacjentów z chorobą nowotworową ze wszystkich wspomnianych badań występują zaburzenia związane z nasilonym lękiem i depresją.

8. Podsumowanie

1. Poziom nasilenia lęku i depresji u chorych onkologicznie był podobny na początku i na końcu radioterapii.
2. Poziom wsparcia społecznego nie różnił się w zależności od typu nowotworu i momentu oceny.
3. Poziom lęku i depresji podczas przyjęcia i wypisu nie był istotnie zróżnicowany w zależności od poziomu wsparcia społecznego i momentu oceny.

9. Wnioski

1. Poziom nasilenia lęku i depresji u chorych onkologicznie był podobny na początku i na końcu radioterapii. Należy jednak wziąć pod uwagę stosunkowo krótki okres przeprowadzania badań. Warto byłoby rozszerzyć badania o wypełnienie kwestionariusza wsparcia społecznego po dłuższym okresie wynoszącym na przykład 3 czy 6 miesięcy. Mogłoby to uwidocznić problemy ze zmniejszającym się poziomem wsparcia społecznego, których nie udało się zauważyć podczas sześciotygodniowej hospitalizacji.

2. U części kobiet z grupy badawczej poziom lęku i depresji znajdował się na granicy normy lub poza nią. W związku z tym uzasadnione byłoby, aby wszyscy pacjenci chorzy onkologicznie wypełniali przy przyjęciu Szpitalną Skalę Lęku i Depresji – *HADS*. Umożliwiłoby to wczesne wykrycie problemów psychicznych u chorych i rozpoczęcie odpowiedniej terapii.

²⁰ Kurowska K., Kościelna H., *Orientacja życiowa a wsparcie społeczne u osób z kolostomią wyłonioną z powodu raka jelita grubego*, Współczesna Onkologia, 2008, 12(5): 228-233.

Bibliografia:

Araszkievicz Aleksander, Bartkowiak Witold, Starzec Wioletta, *Zaburzenia lękowe w chorobie nowotworowej*, „Psychiatr. Prakt. Ogólnolek.” 2004, 4: 157–166.

Baczewska Bożena, Kropornicka Beata, Drozd Celina i in., *Ocena bólu, lęku i depresji u pacjentów hospitalizowanych z powodu choroby nowotworowej*, „Przedsiębiorczość i Zarządzanie” 2013, nr 14, 10(2).

Block Susan D., *Assessing and managing depression in the terminally ill patient. ACP-ASIM End-of-Life Care Consensus Panel. American College of Physicians – American Society of Internal Medicine*, „Ann. Intern. Med.” 2000, nr 132(3).

Cepuch Grażyna, Wordliczek Jerzy, *Ocena zależności pomiędzy natężeniem bólu a występowaniem lęku i depresji u młodych pacjentów hospitalizowanych z powodu choroby nowotworowej i reumatycznej*, „Polska Medycyna Paliatywna” 2006, nr 5(2).

Fopka-Kowalczyk Małgorzata, *Wsparcie społeczne w chorobie nowotworowej*, „Psychoonkologia” 2013, nr 4.

Kacperczyk Anna, *Wsparcie społeczne w instytucjach opieki paliatywnej i hospicyjnej*, Łódź 2006.

Kieszkowska-Grudny Anna, Grudny Jacek, Sierko Ewa et al., *Role of psychological and emotional factors in cancer related fatigue (CRF) syndrome in advanced NSCLC patients undergoing palliative chemotherapy*, „Advances in Palliative Medicine” 2010, nr 9.

Kurowska Krystyna, Kościelna Hanna, *Orientacja życiowa a wsparcie społeczne u osób z kolostomią wyłonioną z powodu raka jelita grubego*, „Współczesna Onkologia” 2008, nr 12(5).

Pyter Leah M., Pineros Vanessa, Galang Jerome A. et al., *Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary- adrenal axis regulation*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 2009, nr 106.

Rolińska Agnieszka, Furmaga Ola, Kwaśniewski Wojciech et al., *Zaburzenia psychiczne w przebiegu choroby nowotworowej*, „Curr. Probl. Psychiatrii” 2011, nr 12.

Stark Dan, Hack Kiely M., Smith Angela B. et al., *Anxiety disorders in cancer patients: their nature, associations, and relation to quality of life*, „J. Clin. Oncol.” 2002, nr 20(14).

Stępień Renata, Wrońska Irena, *Lęk i depresja jako emocjonalne uwarunkowania możliwości funkcjonalnych kobiet po radykalnym leczeniu raka piersi*, „Studia Medyczne” 2008, nr 10.

Szwat Barbara, Słupski Wojciech, Krzyżanowski Dominik, *Sposoby radzenia sobie z chorobą nowotworową a poczucie depresji i nasilenie bólu u chorych objętych opieką paliatywną*, „Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne” 2011, nr 1(1).

Vahdaninia Mariam, Omidvari Sepideh, Montazeri Ali, *What do predict anxiety and depression in breast cancer patients? A follow-up study*, „Social Psychiatry And Psychiatric Epidemiology” 2010, nr 45(3).

Wojtyna Ewa, Dosiak Małgorzata, Życińska Jolanta, *Wpływ wsparcia społecznego na przebieg zaburzeń depresyjnych u pacjentów w podeszłym wieku*, „Psychogeriatrics Polska” 2007, nr 4(1).

Wolfgang Linden, Vodermaier Andrea, Mac Kenzie Regina et al., *Anxiety and depression after cancer diagnosis. Prevalence rates by cancer type, gender and age*, „Journal of Affective Disorders” 2012, nr 141(2/3).

Porównanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów pozyskanych z porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) i porzeczki czerwonej (*Ribes rubrum* L.)

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie zdrowym stylem życia, który obejmuje m.in. prawidłowe zbilansowanie diety pod kątem zawartości związków przeciwutleniających¹. Sugeruje się, iż jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach wysokorozwiniętych są choroby, inicjowane często przez nasilony stres oksydacyjny². Główną przyczyną stresu oksydacyjnego jest występowanie w nadmiarze reaktywnych form tlenu (RFT), które mogą prowadzić do utlenienia białek, tłuszczów czy DNA³. To z kolei jest w stanie zwiększyć podatność organizmu na wiele chorób cywilizacyjnych, do których zalicza się m.in. choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne czy układu krążenia⁴. Ponadto stres oksydacyjny zwiększa ryzyko zachorowania na choroby metaboliczne, do których zaliczamy m.in. cukrzycę. Zjawisko to jest również przyczyną uszkodzeń wielu struktur i narządów, takich jak: mózg, płuca, oczy, stawy, nerki oraz serce, w wyniku których może dojść do rozwoju chorób takich jak np. astma, przewlekłe zapalenie oskrzeli, zaćma, niewydolność serca, depresja, reumatyzm czy arterioskleroza. Zjawisko stresu oksydacyjnego jest również jednym z czynników starzenia się organizmu⁵. W celu eliminacji reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za stres oksydacyjny stosuje się antyoksydanty. Cennym źródłem tych związków bioaktywnych są surowce roślinne, odgrywające

¹ Krzepilko, A., Prazak, R., i wss. *Pąki, liście i nasiona porzeczki czarnej-źródło substancji bioaktywnych o prozdrowotnych właściwościach*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.”, 2018, 24-33.

² Karabela M. *Czarna porzeczka "Panacea - Leki ziołowe"*, styczeń - marzec 2008, 1(22): 30-31.

³ Jessa, J., Hozyasz K.K. "Czarna porzeczka i olej z jej nasion – fitoterapeutyczne panaceum?." 2016, *Energia* 63.31: 15.

⁴ Jurgiel-Małecka, G., Buchwał, A. *Charakterystyka składu chemicznego owoców porzeczki uprawianej w regionie Pomorza Zachodniego*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.”, 2016, 6 (109): 90-101.

⁵ Bonarska-Kujawa, D. i wss. *Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2015, 22.3.

coraz większą rolę w prawidłowym i zdrowym odżywianiu⁶. Do takich surowców zaliczmy między innymi porzeczkę czarną (*Ribes nigrum* L.) oraz porzeczkę czerwoną (*Ribes rubrum* L.), występujące powszechnie w Polsce i będące popularnymi i lubianymi owocami spożywczymi.

Porzeczka czarna (*Ribes nigrum* L.) jest gatunkiem rośliny należącej do rodziny agrestowatych (*Grossulariaceae*), przy czym pochodzi z obszarów Azji i Europy, na których panuje klimat umiarkowany. Pierwsze wzmianki na jej temat pojawiły się już w XI wieku⁷. Znana starożytnym Grekom oraz Europejczykom, była wykorzystywana także w Indiach, w medycynie ajurwedyjskiej, zaś w średniowieczu przez ojca medycyny nowożytnej Paracelsusa⁸. Roślina ta stosowana była również w medycynie ludowej do leczenia chorób układu krwionośnego czy moczowego⁹. Stanowi niewielki krzew, dorastający do 2 metrów wysokości. Częścią jadalną są małe, czarne jagody o słodkawym smaku, zawierające dużą ilość witamin, m.in. A, C, D, E oraz z grupy B, a także znaczne ilości makro- i mikroelementów (fosfor, wapń, magnez, potas, sód, jod, żelazo, miedź, cynk)¹⁰. Owoce porzeczki są również cenione ze względu na wysokie stężenie flawonoidów, pektyn i kwasów organicznych, m.in. kwasu cytrynowego, jabłkowego oraz bursztynowego^{11,12}, a także antocyjanów nadających intensywną, ciemną barwę skórcie¹³. Liście, podobnie jak pozostałe części tej rośliny, bogate są w składniki wykazujące właściwości

⁶ Ochmian, I., Dobrowolska, A. i wss. *Porównanie jakości owoców trzech odmian porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) w zależności od ich wielkości*. Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica, 2013, 26.

⁷ Jopkiewicz S. *Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych* „Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine” 2018, 21 (2): 48-52.

⁸ Asmat, U., Abad K. i wss. *Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review*. Saudi Pharm. J. 2016, 24(5): 547-553.

⁹ Nowak A, Zielonka-Brzezicka J i wss. *Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści *Ginkgo biloba* L. po zakończeniu wegetacji*. „Pomeranian J Life Sci” 2017, 63(1): 9-15.

¹⁰ Nowak A., Zielonka-Brzezicka J. i wss. *Aktywność antyoksydacyjna alkoholowych ekstraktów męczennicy jadalnej (*Passiflora edulis* Sims.) i hurmy wschodniej (*Diospyros kaki* L.)* „Probl Hig Epidemiol” 2018a, 99(4): 336-343.

¹¹ Krzepilko, A., Prazak, R., i wss. *Pąki, liście i nasiona porzeczki czarnej-źródło substancji bioaktywnych o prozdrowotnych właściwościach*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.”, 2018, 24-33.

¹² Bonarska-Kujawa, D. i wss. *Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2015, 22.3.

¹³ Nowak A., Maciejewska A. i wss. *Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.)*. „Problem Hig Epidemiol” 2018, 99(3): 245-258.

przeciwutleniające, głównie ze względu na wysoką zawartość polifenoli. Ponadto wykazują działanie odtruwające oraz regenerujące^{14,15}.

Porzeczka czerwona (*Ribes rubrum* L.) to roślina występująca w stanie dzikim w Europie oraz na Syberii. W Polsce jest bardzo pospolita za wyjątkiem Karpat, na terenie których jest rzadka. Osiąga ona podobne rozmiary jak porzeczka czarna. Owocami są małe, czerwone jagody, przy czym, analogicznie do owoców porzeczki czarnej, charakteryzuje się bogatym składem chemicznym, obejmującym między innymi: witaminy, flawonoidy, kwasy organiczne czy związki mineralne. Również liście, dzięki związkom polifenolowym wykazującym działanie antyoksydacyjne, znalazły zastosowanie w profilaktyce wielu chorób¹⁶.

Celem badań była ocena aktywności antyoksydacyjnej alkoholowych ekstraktów z liści dwóch gatunków porzeczki, tj. czarnej (*Ribes nigrum* L.) i czerwonej (*Ribes rubrum* L.) przy wykorzystaniu dwóch technik pomiaru DPPH i ABTS. Wyciągi z surowca były przygotowane stosując cztery rozpuszczalniki w trzech stężeniach (40, 70% (v/v), stężonym) metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami przez 15 lub 30 minut.

1. Materiał i metodyka

2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), kwas 2,2-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) ABTS, kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy (troloks) pochodzący z firmy Sigma Aldrich, USA; alkohol etylowy, alkohol metylowy, alkohol izopropylowy, n-propanol (wszystkie o czystości cz.d.a) pochodzący z firmy Chempur, Piekary Śląskie.

Surowiec roślinny stanowiły suszone liście porzeczki czarnej i porzeczki czerwonej, pozyskane w województwie zachodniopomorskim w 2016 roku.

Materiał był ekstrahowany z wykorzystaniem czterech rozpuszczalników takich jak: metanol, etanol, propan-1-ol (n-propanol), propan-2-ol (izopropanol), każdy w trzech stężeniach: 40% (v/v), 70% (v/v) oraz stężony. Wyciągi zostały przygotowane

¹⁴ Jessa, J., Hozyasz K.K. "Czarna porzeczka i olej z jej nasion – fitoterapeutyczne panaceum?." 2016 Energia 63.31: 15.

¹⁵ Sasaki T., Li W. i wss. *Antioxidant lignoids from leaves of Ribes nigrum*. „Phytochemistry” 2013, 95: 333-340.

¹⁶ Szajdek A., Borowska J. *Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2004, 4(41): 5 – 28.

z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej o częstotliwości 40 kHz w dwóch czasach ekstrakcji: 15 i 30 minut.

Do oceny zdolności neutralizacji wolnych rodników przez surowiec, wykorzystano metodę DPPH, a także metodę ABTS.

W przypadku techniki DPPH pomiarów aktywności antyoksydacyjnej dokonano jak opisano w poprzednich pracach^{17,18}. W technice tej dodano porcję 150 µl badanego ekstraktu roślinnego do 2850 µl 0,3 mM roztworu DPPH w 96% (v/v) etanolu. Pomiaru aktywności przeciwutleniającej dokonano przy długości fali 517 nm. Natomiast w metodzie ABTS, pomiar aktywności antyoksydacyjnej wykonano jak opisano poprzednio¹⁹. W technice tej jako roztwór roboczy wykorzystano roztwór 7 mM kwasu 2,2-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (ABTS) w 2,45 mM roztworu, który następnie poddano inkubacji przez 24 godziny. Pomiarów potencjału przeciwutleniającego dokonano przy długości fali 734 nm. Jako substancję wzorcową, w przypadku obydwu metod, wykorzystano kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchromano-2-karboksylowy (troloks), który posłużył do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej. Aktywność antyoksydacyjną przedstawiono w mg troloksu/g surowca, a także jako procent zmiatania wolnych rodników (*radical scavenging activity*), wyrażony w % RSA., Z każdego badanego ekstraktu sporządzono trzy próby, natomiast wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD).

2. Wyniki i dyskusja

Jednym z podstawowych źródeł związków o właściwościach antyoksydacyjnych są dla człowieka surowce pochodzenia roślinnego. Wśród produktów naturalnych, wysoką aktywność przeciwutleniającą wykazują niektóre owoce, powszechnie dostępne na rynku krajowym. W profilaktyce zdrowotnej mogą być wykorzystywane, obok owoców, również inne,

¹⁷ Nowak A, Zielonka-Brzezicka J i wss. Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści *Ginkgo biloba* L. po zakończeniu wegetacji. „Pomeranian J Life Sci” 2017, 63(1): 9-15.

¹⁸ Nowak A., Maciejewska A. i wss. Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.). „Problem Hig Epidemiol” 2018, 99(3): 245-258.

¹⁹ Szajdek A., Borowska J. Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2004, 4(41): 5 – 28.

niedoceniane części roślin, jak na przykład liście, charakteryzujące się bogatym składem chemicznym²⁰.

Zarówno porzeczka czarna (*Rubus nigra* L.), jak i czerwona (*Rubus rubra* L.) należą do roślin powszechnie wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. Owoce charakteryzujące się wysoką wartością odżywczą, spowodowaną głównie przez bogaty skład chemiczny, zawierają m.in. polifenole, flawonoidy, witaminy, kwasy organiczne, makro- i mikrośladniki. Surowiec ten stosuje się powszechnie w profilaktyce chorób reumatycznych, nadciśnieniu, miażdżycy oraz chorobach serca, zaś zawarte w nich flawonoidy wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Wykorzystanie owoców porzeczki jest bardzo popularne, szczególnie w przemyśle przetwórczym do produkcji dżemów, soków czy galaretek²¹. W ostatnich latach obserwuje się coraz większe zainteresowanie zastosowaniem innych części tej rośliny, takich jak liście. Podobnie jak owoce, ta część rośliny również zawiera duże ilości związków fenolowych, flawonoidów, kwasów organicznych oraz makro- i mikroelementów. Ponadto w porównaniu z pąkami i owocami, wykazuje najwyższe właściwości przeciwutleniające²². W badaniach własnych oznaczano aktywność antyoksydacyjną suszonych liści porzeczki czerwonej i czarnej, pochodzących z województwa zachodniopomorskiego. Właściwości przeciwutleniające oznaczono powszechnie wykorzystywanymi metodami DPPH i ABTS. Ekstrakty roślinne zostały przygotowane z wykorzystaniem alkoholu etylowego, metylowego, n-propanolu oraz izopropanolu, wszystkie w trzech stężeniach (40%, 70% oraz stężonym). Próby sporządzono przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, stosując czas ekstrakcji 15 lub 30 minut. Wielu autorów donosi, iż zarówno porzeczka czerwona, jak i czarna charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną^{23,24,25}.

W badaniach własnych potwierdzono wysokie działanie przeciwutleniające liści obydwu gatunków porzeczki, jednak wyniki były zróżnicowane w zależności od

²⁰ Laczko-Zöld E., Komlósi A. i wss. *Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity*. „Acta Biol Hung” 2018, 69(2): 156-169.

²¹ Feng C., Su S., i wss. *Antioxidant capacities and anthocyanin characteristics of the black-red wild berries obtained in Northeast China*. „Food Chem” 2016, 204: 150-158.

²² Sasaki T., Li W. i wss. *Antioxidant lignoids from leaves of Ribes nigrum*. „Phytochemistry” 2013, 95: 333-340.

²³ Szajdek A., Borowska J. *Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2004, 4(41): 5 – 28.

²⁴ Sasaki T., Li W. i wss. *Antioxidant lignoids from leaves of Ribes nigrum*. „Phytochemistry” 2013, 95: 333-340.

²⁵ Człapka-Matyasik M., Fejfer M., i wss. *Właściwości antyrodnikowe wybranych soków owocowych dostępnych na rynku polskim*. „Probl Hig Epidemiol” 2011, 92(4): 9912-993.

zastosowanego rozpuszczalnika oraz czasu ekstrakcji. W Tab.ch 1 i 2 zamieszczono średnią aktywność antyoksydacyjną, mierzoną metodami DPPH i ABTS, przy czym wynik wyrażono jako równoważnik troloksu w mg troloksu/g surowca. Wykresy natomiast przedstawiają zdolność zmiatania wolnych rodników, wyrażoną jako % RSA (Rycina 1, 2).

Aktywność antyoksydacyjna dla porzeczek czarnej, mierzona metodą DPPH, mieściła się w zakresie od $0,26 \pm 0,25$ mg troloksu/g surowca dla wyciągów przyrządzanych

w stężonym izopropanolu, w czasie 30 minut do $4,39 \pm 0,01$ mg troloksu/g surowca dla ekstraktów przygotowywanych w 70% metanolu, również przez 30 minut. Wyniki te odpowiadały zdolności zmiatania wolnych rodników odpowiednio $7,12 \pm 1,26$ oraz $94,20 \pm 0,30$ %RSA. Natomiast w przypadku porzeczek czerwonej był to zakres od $0,87 \pm 0,20$ mg troloksu/g surowca dla próbek ekstrahowanych w stężonym izopropanolu, przez 30 minut do $4,47 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca dla wyciągów ekstrahowanych w stężonym metanolu w czasie 30 minut. Wartości takie odpowiadały procentowi zmiatania wolnych rodników odpowiednio $19,09 \pm 4,20$ oraz $95,69 \pm 1,08$ %RSA. Wysokimi wartościami w przypadku porzeczek czerwonej charakteryzowały się również liście, poddane ekstrakcji w 70% etanolu, w przypadku których aktywność wynosiła $4,45 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca, co odpowiadało procentowi zmiatania wolnych rodników na poziomie $95,22 \pm 0,55$ %RSA (Tab. 1, Ryc. 1).

Zarówno liście, jak i owoce porzeczek czerwonej i czarnej wykazują aktywność antyoksydacyjną. O wysokich właściwościach przeciwutleniających owoców tych roślin informują Laczkó-Zöld i wsp., którzy analizowali ekstrakty przygotowywane w 50% (v/v), jak również w stężonym metanolu oraz w wodzie. Autorzy ci oceniali przygotowane wyciągi metodami DPPH i ABTS, przy czym najwyższe właściwości antyoksydacyjne wykazali dla próbek ekstrahowanych zarówno w metanolu stężonym, jak i rozcieńczonym w przypadku porzeczek czarnej oraz w rozcieńczonym metanolu, w przypadku owoców porzeczek czerwonej²⁶.

Wysoką aktywność antyoksydacyjną liści innych roślin krajowych mierzonych metodą DPPH stwierdzili również Zielonka-Brzezicka i wsp., oceniając liście maliny

²⁶ Laczkó-Zöld E., Komlósi A. i wss. *Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity*. „Acta Biol Hung” 2018, 69(2): 156-169.

właściwej (*Rubus idaeus*) i jeżyny europejskiej (*Rubus fruticosus*). Autorzy poddali ocenie materiał świeży i suszony, ekstrahowany przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, jak i aparatu Soxhleta, wykorzystując jako rozpuszczalnik 70% (v/v) etanol. Analizy wykazały, iż najwyższą aktywnością charakteryzowały się ekstrakty ze świeżych liści maliny, których zdolność do zmiatania wolnych rodników wynosiła w przypadku zastosowania do ekstrakcji aparatu Soxhleta 99 %RSA, natomiast w przypadku łaźni ultradźwiękowej 97 %RSA. Liście jeżyny wykazywały również wysoki potencjał antyoksydacyjny, wynoszący ponad 70 %RSA. Co ciekawe, autorzy wykazali, iż wyciągi z owoców posiadały znacznie niższą zdolność do zmiatania wolnych rodników w porównaniu z liśćmi²⁷.

Owoce porzeczki wykorzystywane są często do produkcji soków. Człapka-Matyasik i wsp. podają, iż sok z czarnych porzeczek charakteryzuje się wysokim działaniem przeciwutleniającym, wynoszącym 76 %RSA. Według autorów jest to wartość istotnie większa w porównaniu z innymi sokami produkowanymi z krajowych owoców, jak na przykład soku z czerwonych winogron, soku z aronii, soku jabłkowego - których zdolności redukcyjne wynoszą średnio 70 % RSA. Wysoka aktywność antyoksydacyjna soków z czarnej porzeczki jest spowodowana między innymi dużą zawartością antocyjanów, będących składnikami przeciwutleniającymi²⁸. W przypadku liści, związkami odpowiedzialnymi za potencjał przeciwutleniający są między innymi polifenole, których zawartość w tej części rośliny jest wysoka i skorelowana z aktywnością antyoksydacyjną^{29,30}.

W badaniu własnym aktywność antyoksydacyjną surowca wykazano również przy wykorzystaniu techniki ABTS. Stosując tę metodę pomiaru wykazano, iż działanie przeciwutleniające dla ekstraktów z porzeczki czarnej, mieściło się w zakresie od $0,06 \pm 0,04$ mg troloksu/g surowca, dla wyciągów przygotowanych w stężonym n-propanolu w czasie 15 minut do $3,27 \pm 0,11$ mg troloksu/g surowca dla ekstraktów przyrządzonych w stężonym metanolu w czasie 15 minut. Wartości takie

²⁷ Zielonka-Brzezicka J., Nowak A. i wss. *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (*Rubus idaeus*) i jeżyny europejskiej (*Rubus fruticosus*)*. „Pomeranian J Life Sci” 2016, 62(4): 52-59.

²⁸ Człapka-Matyasik M., Fejfer M., i wss. *Właściwości antyrodnikowe wybranych soków owocowych dostępnych na rynku polskim*. „Probl Hig Epidemiol” 2011, 92(4): 9912-993.

²⁹ Nowak A, Zielonka-Brzezicka J i wss. *Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści *Ginkgo biloba* L. po zakończeniu wegetacji*. „Pomeranian J Life Sci” 2017, 63(1): 9-15.

³⁰ Zielonka-Brzezicka J., Nowak A. i wss. *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (*Rubus idaeus*) i jeżyny europejskiej (*Rubus fruticosus*)*. „Pomeranian J Life Sci” 2016, 62(4): 52-59.

odpowiadały zmiataniu wolnych rodników na poziomie od $2,84 \pm 0,76$ do $70,47 \pm 2,37$ % RSA. Natomiast w przypadku porzeczki czerwonej, był to zakres od $0,12 \pm 0,06$ mg troloksu/g surowca dla wyciągów przygotowanych w stężonym n-propanolu przez 15 minut do $3,90 \pm 0,06$ mg troloksu/g surowca dla wyciągów przygotowanych w 70% metanolu ekstrahowanych przez 30 minut, co odpowiadało procentowi zmiatania wolnych rodników odpowiednio: $6,18 \pm 1,99$ oraz $82,69 \pm 1,69$ % RSA (Tab. 2, rycina 2).

W badaniu własnym wykazano, iż aktywność antyoksydacyjna, mierzona poszczególnymi metodami była w większości przypadków uzależniona od czasu ekstrakcji,

jak również zastosowanego rozpuszczalnika. Analizując poszczególne rozpuszczalniki zaobserwowano, iż najlepsze właściwości przeciwutleniające wykazywały najczęściej ekstrakty przygotowane w alkoholach rozcieńczonych, z wyjątkiem metanolu, w przypadku którego zastosowanie wszystkich stężeń (40%, 70% oraz stężonego) prowadziło do wysokiej aktywności antyoksydacyjnej. W przypadku liści porzeczki czarnej, jak i czerwonej, stosując obydwie techniki pomiaru, najmniej wartościowe okazały się ekstrakty w stężonym izopropanolu, bowiem aktywność wahała się od $0,09 \pm 0,07$ mg troloksu/g surowca do $0,87 \pm 0,20$ mg troloksu/g surowca. Również inni autorzy stwierdzili, że rozpuszczalnik odgrywa bardzo ważną rolę w izolacji z surowca substancji będących antyoksydantami. Pawlak i Sielicka informują o wysokiej ogólnej zawartości polifenoli w ekstraktach z aronii czarnoowocowej (*Aronia melanokarpa*) po zastosowaniu rozcieńczonych rozpuszczalników, takich jak aceton: woda w mieszaninie (50:50 v/v) w porównaniu ze acetonem stężonym³¹. Potwierdzają to badania własne, w których najwyższe wyniki uzyskano stosując najczęściej alkohole rozcieńczone. Podobnego zdania są Duymuś i wsp., którzy uzyskali wyższą zawartość ogólnej zawartości polifenoli dla wodnych ekstraktów z owoców bzu czarnego (*Sambucus nigra*) (8974 mg kwasu galusowego (GA)/100g suchej masy) w porównaniu z ekstraktami przygotowywanymi w stężonym metanolu - 4917 mg GA/100g suchej masy. W badaniach tych stwierdzono również wysokie wartości dla ekstraktów

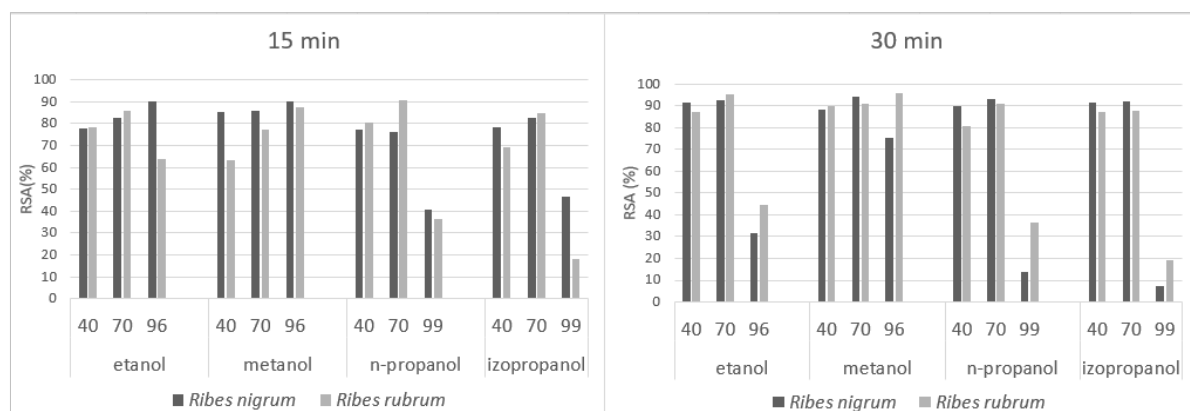
³¹ Pawlak S., Sielicka M. *Wpływ rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji na oznaczoną zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą wytlóków z aronii.* [w: *Zagospodarowanie ubocznych produktów przemysłu spożywczego*], pod red. Góreckiej D., Pospiecha E. Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań 2016, s: 25-35.

przygotowanych

w 70% alkoholu etylowym (7594 mg GA/100g suchej masy)³². W badaniach własnych zaobserwowano w większości przypadków różnice w aktywności antyoksydacyjnej, biorąc pod uwagę czas ekstrakcji surowca. Wykazano, iż wyciągi przygotowywane przy dłuższych czasach ekstrakcji charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością antyoksydacyjną, w porównaniu z wyciągami ekstrahowanymi w łaźni ultradźwiękowej tylko przez 15 minut (Tab. 1, 2).

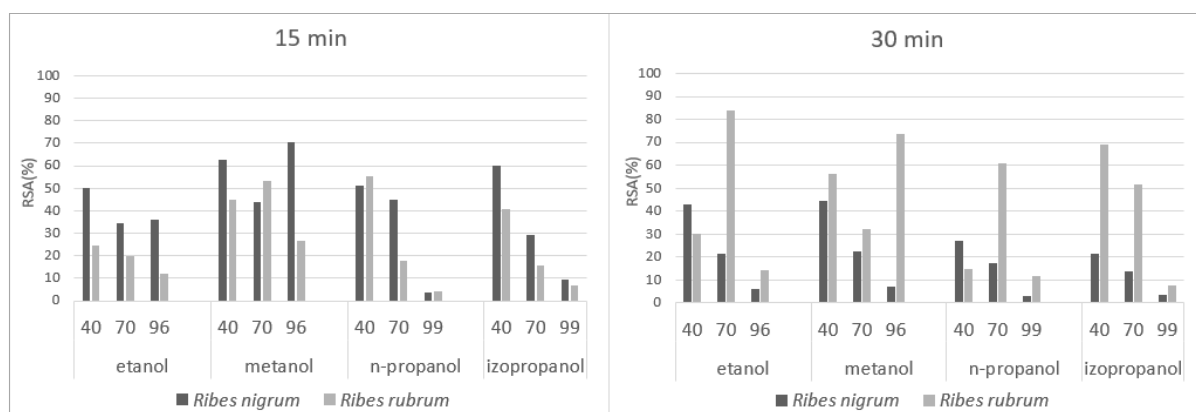
Wnioski

1. Suszone liście porzeczki czerwonej i czarnej charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, oznaczoną metodami DPPH i ABTS.
2. Wysokie zdolności przeciwutleniające wykazywały najczęściej ekstrakty z badanych surowców w rozcieńczonych alkoholach.
3. Liście porzeczki czerwonej i czarnej wydają się być cennym źródłem antyoksydantów, mogą zatem znaleźć potencjalne zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym.



Ryc. 1. Średnie właściwości przeciwutleniające ekstraktów z suszonych liści porzeczki czarnej i czerwonej uzyskanych przy dwóch czasach ekstrakcji, oznaczone metodą DPPH, wyrażone jako % RSA

³² Duymuş H.G., Göger F. i wss. *In vitro antioxidant properties and anthocyanin composition of elderberry extracts.* „Food Chem” 2014, 155: 112-119.



Ryc. 2. Średnie właściwości przeciwutleniające ekstraktów z suszonych liści porzeczki czarnej i czerwonej uzyskanych przy dwóch czasach ekstrakcji, oznaczone metodą ABTS, wyrażone jako % RSA

Tab. 1. Średnie \pm odchylenia standardowe (SD) aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z liści porzeczki czarnej i porzeczki czerwonej oznaczone metodą DPPH wyrażone jako równoważniki troloksu.

Rozpuszczalnik	Stężenie [%]	<i>Ribes nigrum</i>		<i>Ribes rubrum</i>	
		mg troloksu/g surowca			
		czas ekstrakcji [min]		czas ekstrakcji [min]	
		15	30	15	30
Metanol	40	3,95 \pm 0,05	4,11 \pm 0,15	2,95 \pm 0,13	4,19 \pm 0,18
	70	4,01 \pm 0,18	4,39 \pm 0,01	3,62 \pm 0,01	4,24 \pm 0,03
	99	4,21 \pm 0,02	3,51 \pm 0,17	4,07 \pm 0,04	4,47 \pm 0,03
Etanol	40	3,61 \pm 0,03	4,27 \pm 0,02	3,60 \pm 0,02	4,05 \pm 0,03
	70	3,84 \pm 0,06	4,33 \pm 0,03	3,98 \pm 0,03	4,45 \pm 0,03
	96	4,21 \pm 0,02	1,48 \pm 0,10	2,98 \pm 0,06	1,98 \pm 0,11
n-propanol	40	3,59 \pm 0,03	4,20 \pm 0,06	3,36 \pm 0,10	3,76 \pm 0,02
	70	3,53 \pm 0,09	4,34 \pm 0,03	3,44 \pm 0,09	4,22 \pm 0,26
	99	1,82 \pm 0,14	0,65 \pm 0,23	1,67 \pm 0,03	0,96 \pm 0,03
izopropanol	40	3,64 \pm 0,05	4,27 \pm 0,03	3,22 \pm 0,11	4,06 \pm 0,02

	70	3,83 ± 0,03	4,29 ± 0,01	3,93 ± 0,03	4,08 ± 0,03
	99	2,10 ± 0,14	0,26 ± 0,25	1,17 ± 0,87	0,87 ± 0,20

Tab. 2. Średnie ± odchylenia standardowe (SD) aktywności antyoksydacyjne ekstraktów z liści porzeczki czarnej i porzeczki czerwonej oznaczone metodą ABTS i wyrażone jako równoważniki troloksu

Rozpuszczalnik	Stężenie [%]	Ribes nigrum		Ribes rubrum	
		mg troloksu/g surowca			
		czas ekstrakcji [min]		czas ekstrakcji [min]	
		15	30	15	30
metanol	40	2,89 ± 0,04	2,02 ± 0,05	2,04 ± 0,04	2,59 ± 0,01
	70	1,98 ± 0,09	0,99 ± 0,03	2,43 ± 0,10	1,43 ± 0,06
	96	3,27 ± 0,11	0,25 ± 0,06	1,17 ± 0,17	3,42 ± 0,39
Etanol	40	2,28 ± 0,14	1,96 ± 0,18	1,05 ± 0,04	1,34 ± 0,12
	70	1,56 ± 0,03	0,92 ± 0,13	0,83 ± 0,09	3,90 ± 0,06
	96	1,58 ± 0,18	0,20 ± 0,14	0,46 ± 0,14	0,58 ± 0,10
n-propanol	40	2,34 ± 0,44	1,19 ± 0,33	2,56 ± 0,09	0,60 ± 0,01
	70	2,04 ± 0,18	0,73 ± 0,07	0,76 ± 0,04	3,07 ± 0,49
	99	0,06 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,12 ± 0,06	0,45 ± 0,03
izopropanol	40	2,76 ± 0,20	0,95 ± 0,03	1,86 ± 0,03	3,43 ± 0,44
	70	1,27 ± 0,38	0,58 ± 0,04	0,67 ± 0,06	2,73 ± 0,70
	99	0,33 ± 0,06	0,09 ± 0,07	0,26 ± 0,21	0,25 ± 0,10

Bibliografia:

Asmat, U., Abad K. i wsp. *Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review*. Saudi Pharm. J. 2016, nr 24(5).

Bonarska-Kujawa, D. i wsp. *Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów polifenolowych z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2015, nr 22(3).

Człapka-Matyasik M., Fejfer M., i wsp. *Właściwości antyrodnikowe wybranych soków owocowych dostępnych na rynku polskim*. „Probl Hig Epidemiol” 2011, nr 92(4).

Duymuş H.G., Göger F. i wsp. *In vitro antioxidant properties and anthocyanin composition of elderberry extracts*. „Food Chem” 2014, nr 155.

Feng C., Su S., i wsp. *Antioxidant capacities and anthocyanin characteristics of the black-red wild berries obtained in Northeast China*. „Food Chem” 2016, nr 204.

Jessa, J., Hozyasz K.K. *Czarna porzeczka i olej z jej nasion – fitoterapeutyczne panaceum?* „Energia” 2016, 63.31: 15.

Jopkiewicz S. *Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych* „Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine” 2018, nr 21 (2).

Jurgiel-Małecka, G., Buchwał, A. *Charakterystyka składu chemicznego owoców porzeczki uprawianej w regionie Pomorza Zachodniego*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.”, 2016 nr 6 (109).

Karabela M. *Czarna porzeczka "Panacea - Leki ziołowe"*, styczeń - marzec 2008, nr 1(22).

Krzepilko, A., Prazak, R., i wsp. *Pąki, liście i nasiona porzeczki czarnej-źródło substancji bioaktywnych o prozdrowotnych właściwościach*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.”, 2018.

Laczkó-Zöld E., Komlósi A. i wsp. *Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity*. „Acta Biol Hung” 2018, nr 69(2).

Nowak A, Zielonka-Brzezicka J i wsp. *Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści Ginkgo biloba L. po zakończeniu wegetacji*. „Pomeranian J Life Sci” 2017, nr 63(1).

Nowak A., Maciejewska A. i wsp. *Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (Camellia sinensis L.)*. „Probl Hig Epidemiol” 2018, nr 99(3).

Nowak A., Zielonka-Brzezicka J. i wsp. *Aktywność antyoksydacyjna alkoholowych ekstraktów męczennicy jadalnej (Passiflora edulis Sims.) i hurmy wschodniej (Diospyros kaki L.)*. „Probl Hig Epidemiol” 2018, nr 99(4).

Ochmian, I., Dobrowolska, A. i wsp. *Porównanie jakości owoców trzech odmian porzeczki czarnej (Ribes nigrum L.) w zależności od ich wielkości*. Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica, 2013, nr 26.

Pawlak S., Sielicka M. *Wpływ rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji na oznaczoną zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą wyłoków z aronii*. [w: *Zagospodarowanie ubocznych produktów przemysłu spożywczego*], pod red. Góreckiej D., Pospiecha E. Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań 2016.

Sasaki T., Li W. i wsp. *Antioxidant lignoids from leaves of Ribes nigrum*. „Phytochemistry” 2013, nr 95.

Szajdek A., Borowska J. *Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego*. „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.” 2004, nr 4(41).

Van Wyk BE, Wink M. *Rośliny lecznicze świata*, pod red. Fecka I. i wsp., MedPharm Wrocław 2004.

Zielonka-Brzezicka J., Nowak A. i wsp. *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (Rubus idaeus) i jeżyny europejskiej (Rubus fruticosus)*. „Pomeranian J Life Sci” 2016, nr 62(4).

Anna Nowak, Joanna Zielonka-Brzezicka, Anna Muzykiewicz, Danuta Martyniuk, Magdalena Tkacz, Adam Klimowicz

Aktywność antyoksydacyjna alkoholowych ekstraktów z kwiatów i owoców bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.)

Wstęp

Bez czarny jest rośliną należącą do rodziny *Caprifoliaceae*, rosnącą w większości regionów Europy, Północnej Afryki, Zachodniej Azji oraz USA. Kwiaty i jagody tej rośliny są wykorzystywane w medycynie ze względu na wysoką zawartość flawonoidów, glikozydów, kwasów fenolowych, karotenoidów, olejków eterycznych, wolnych kwasów tłuszczowych oraz witamin i minerałów.^{1,2}

Stres oksydacyjny to brak równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu (ROS) i układem antyoksydacyjnym. ROS mogą powodować utlenienie lipidów, białek i DNA, czego następstwem jest uszkodzenie tkanek. Produkcja w nadmiarze reaktywnych form tlenu w rezultacie prowadzi do stresu oksydacyjnego przyspieszającego proces starzenia oraz przyczyniającego się do rozwoju wielu tzw. chorób cywilizacyjnych. Regularne spożywanie niektórych roślin zawierających naturalne antyoksydanty jest skorelowane z obniżeniem ryzyka takich schorzeń.^{3,4} Antyoksydanty uważane są za czynniki ochronne zmniejszające uszkodzenia oksydacyjne ludzkiego organizmu.^{5,6,7} Wiele roślin stosowanych w medycynie zawiera przeciwutleniacze i wykazuje właściwości farmakologiczne, związane z

¹ Waszkiewicz-Robak B., Biller E., *Właściwości prozdrowotne czarnego bzu*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, 99(3), s. 217-224.

² Veberic R., Jakobic J., Stampar F., Schmitzer V., *European elderberry (Sambucus nigra L.) rich in sugars, organic acid, antocyanins and selected polyphenols*, „Food Chemistry” 2009, 114, s. 511-515.

³ Magrone T., Perez de Heredia F., Jirillo E., Morabito G., Marcos A., Serafini M., *Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases*, „Canadian Journal of Physiology and Pharmacology” 2013, 91, s. 387-396.

⁴ Śliż D., Zgliczyński W., Szeligowska J., Rostkowska O., Pinkas J., *Modyfikacja zwyczajów żywieniowych w prewencji chorób cywilizacyjnych*, „Postępy Nauk Medycznych” 2016, 5, s. 344-349.

⁵ Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A., *Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek*, „Polski Merkuriusz Lekarski” 2009, 27(157), s. 44-48.

⁶ Cybul M., Nowak R., *Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych*, „Herba Polonica” 2008, 54(1), s. 68-78.

⁷ Czajka A., *Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu*, „Nowiny Lekarskie” 2006, 75(6), s. 582-586.

obecnością związków fenolowych, głównie flawonoidów.^{8,9} Przykładem takiej rośliny jest bez czarny charakteryzujący się wysoką aktywnością antyoksydacyjną.^{10,11} Napary z jego owoców czy kwiatów są znane jako wartościowe, tradycyjne środki pomocne w leczeniu różnych schorzeń, wykazują bowiem działanie moczopędne, napotne, immunostymulujące, przeciwbakteryjne i rozkurczowe. Ponadto owoce tej rośliny wykorzystywane są w przemyśle spożywczym do produkcji między innymi galaretek, dżemów, syropów, likierów.^{12,13} Ekologiczne produkty uznawane są przez konsumentów za bezpieczniejsze. Związane jest to z opinią, że produkty takie wydają się być lepszym źródłem antyoksydantów.¹⁴

Celem badań było oznaczenie ogólnej zawartości polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej etanolowych i metanolowych ekstraktów z owoców i kwiatów bzu czarnego w surowcu ekologicznym i nieekologicznym.

1. Materiał i metody

Materiał roślinny stanowiły suszone owoce i kwiaty bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), zakupione w lokalnym sklepie zielarskim. Analizowano dwa rodzaje materiału roślinnego – deklarowany jako ekologiczny (producent – Eco) i niezawierający takiej deklaracji (producent – Kawon). Rośliny były ekstrahowane z wykorzystaniem dwóch alkoholi: 40% (v/v), 70% (v/v) i 96% (v/v) etanolu oraz 99,8% (v/v) metanolu. Zastosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami o częstotliwości 40 kHz w czasie 15, 30 lub 60 minut.

Aktywność antyoksydacyjna badanych ekstraktów oznaczana była trzema metodami DPPH, ABTS i FRAP, natomiast ogólną zawartość polifenoli oceniono metodą Folin-Ciocalteu.

⁸ Jabłońska-Ryś E., Zalewska-Korona M., Kalbarczyk J., *Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits*, „Journal of Fruit and Ornamental Plant Research” 2009, 17(2), s. 115-120.

⁹ Cybul M., Nowak R., *op. cit.*

¹⁰ Duymuş H. G., Göger F., Hüsnü Can Başer K., *In vitro antioxidant properties and anthocyanin composition of elderberry extract*, „Food Chemistry” 2014, 155, s. 112-119.

¹¹ Viapiana A., Wesołowski M., *The phenolic content and antioxidant activities of infusion of Sambucus nigra L.*, „Plant Foods for Human Nutrition” 2017, 72, s. 82-87.

¹² *Ibidem.*

¹³ Waszkiewicz-Robak B., Biller E., *op.cit.*

¹⁴ Zatecka A., Hallman E., Rembiałkowska E., *Zawartość związków bioaktywnych w nowych sokach owocowych z produkcji ekologicznej* „Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering” 2013, 58(4), s. 242-245.

W przypadku metody DPPH pomiary aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono jak w poprzednich badaniach.^{15,16} W metodzie tej 150 µl badanego ekstraktu mieszano z 2850 µl roztworu DPPH w 96% (v/v) etanolu o absorbancji $1,00 \pm 0,02$. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 517 nm. Ocenę aktywności antyoksydacyjnej techniką ABTS przeprowadzono jak opisano poprzednio.¹⁷ W metodzie tej roztwór roboczy stanowił 7mM roztwór soli amonowej kwasu 2,2-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (ABTS) w 2,45mM roztworze nadsiarczanu potasu, rozcieńczony 50% (v/v) metanolem. Aktywność antyoksydacyjna była mierzona przy długości fali 734 nm. W przypadku metod DPPH i ABTS jako wzorzec wykorzystano kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (troloks), natomiast aktywność antyoksydacyjną przedstawiono w mg troloksu/g surowca oraz jako odpowiadający jej procent hamowania wolnych rodników (%RSA). Zdolność do redukcji jonów żelaza (FRAP) analizowano jak w poprzednich badaniach.¹⁸ Wyniki wyrażono w mg FeSO₄/g surowca. Roztwór roboczy stanowił bufor octanowy (pH 3,6) zmieszany z 10mM roztworem 2,4,6-tripirydylo-s-triazyny (TPTZ) w 40mM roztworze HCL oraz 20mM roztworem chlorku żelaza. Pomiaru absorbancji badanych ekstraktów dokonano przy długości fali 593 nm. Ogólna zawartość polifenoli (TPC) była mierzona jak opisano poprzednio.^{19,20} W oznaczeniu tym wykorzystano odczynnik Folin-Ciocalteu, przy czym wyniki wyrażono w mg kwasu galusowego (GA)/g surowca. Pomiarów absorbancji badanych ekstraktów dokonano przy długości fali 765 nm.

Wyniki zostały wyrażone jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD). Zbadano korelację Pearsona pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a ogólną zawartością polifenoli. Istotność statystyczną różnic pomiędzy poszczególnymi częściami roślin, jak również pomiędzy materiałem ekologicznym i nieekologicznym,

¹⁵ Zielonka-Brzezicka J., Nowak A., Klimowicz A., Wira D., Grzesiak K., Rędzikowska E., Wysocka D., Synowiec L., Ptak B., Bilka J., *Aktinidia chińska jako źródło prozdrowotnych antyoksydantów*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, 99(3), s. 238-244.

¹⁶ Nowak A., Maciejewska A., Duchnik W., Florkowska K., Klimowicz A., *Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (Camellia sinensis L.)*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, 99(3), s. 245-258.

¹⁷ *Ibidem*.

¹⁸ Zielonka-Brzezicka J., Nowak A., Zielińska M., Klimowicz A., *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (Rubus idaeus) i jeżyny europejskiej (Rubus fruticosus)*, „Pomeranian Journal of Life Sciences” 2016, 62(4), s. 52-59.

¹⁹ Nowak A., Zielonka-Brzezicka J., Pechaiko D., Tkacz M., Klimowicz A., *Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści Ginkgo biloba L. po zakończeniu wegetacji*, „Pomeranian Journal of Life Sciences” 2017, 63(1), s. 9-15.

²⁰ Joanna Zielonka-Brzezicka, Anna Nowak, Adam Klimowicz, Daria Wira, Karolina Grzesiak, Ewelina Rędzikowska, Daria Wysocka, Laura Synowiec, Barbara Ptak, Joanna Bilka, *op. cit.*

oceniono testem Wilcoxon. Wszystkich analiz dokonano przy użyciu programu *Statistica 12 PL*, Statsoft Software.

2. Wyniki

Aktywność antyoksydacyjną oraz ogólną zawartość polifenoli przedstawiono w Tab.ch 1-2. Wszystkie ekstrakty z badanych części rośliny wykazywały działanie przeciwutleniające, jednakże było ono zależne od części rośliny i zastosowanego rozpuszczalnika. W większości przypadków wyższą aktywnością antyoksydacyjną oraz wyższą zawartością polifenoli charakteryzowały się kwiaty w porównaniu z owocami (Tab. 1).

W przypadku metody DPPH, wyniki mieściły się w granicach od $0,60 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca dla ekstraktów przygotowanych w stężonym etanolu, podczas ekstrakcji 30 minutowej (owoce nieekologiczne) do $4,11 \pm 0,02$ mg troloksu/g surowca dla prób ekstrahowanych w stężonym metanolu przez 60 minut (kwiaty ekologiczne). Wyniki takie odpowiadały średniemu zmiataniu wolnych rodników odpowiednio 13,46% i 88,15% (Rycina 1).

Zdolność zmiatania wolnych rodników mierzona metoda ABTS, mieściła się w granicach od $0,24 \pm 0,04$ mg troloksu/g surowca dla ekstraktów przygotowanych w stężonym etanolu, podczas 15-minutowej ekstrakcji (owoce nieekologiczne) do $21,34 \pm 0,01$ mg troloksu/g surowca dla ekstraktów przygotowanych w 40% etanolu, podczas 60-minutowej ekstrakcji (kwiaty nieekologiczne), co odpowiadało zmiataniu wolnych rodników średnio 4,82% i 99,93% RSA (Rycina 1). W przypadku tej metody pomiaru, najwyższe wyniki również były obserwowane dla kwiatów.

Wszystkie badane surowce wykazywały zdolność do redukcji jonów żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} mierzone metodą FRAP. Najwyższe wartości dotyczące redukcji jonów żelaza zaobserwowano dla wyciągów przygotowanych z kwiatów nieekologicznych, wykorzystując 40% etanol do ekstrakcji trwającej 60 minut ($15,83 \pm 0,11$ mg $FeSO_4$ /g surowca). Analizując owoce tą metodą pomiaru wykazano, iż najbardziej wartościowe są owoce ekologiczne, przygotowane w stężonym metanolu podczas ekstrakcji trwającej 60 minut ($7,29 \pm 0,05$ mg $FeSO_4$ /g surowca) (Tab. 2). Analogicznie do poprzednich metod, ogólna zawartość polifenoli była najwyższa dla kwiatów w porównaniu z owocami. Mieściła się ona w granicach od $1,02 \pm 0,03$ mg GA/g surowca dla ekstraktów przygotowywanych w stężonym etanolu podczas 15 minutowej ekstrakcji dla owoców ekologicznych do $9,09 \pm 0,15$ mg kwasu galusowego/g surowca

dla ekstraktów przygotowanych w 40% etanolu w czasie 60 minut dla kwiatów ekologicznych (Tab. 2).

Tab. 3 przedstawia wartość współczynników korelacji pomiędzy aktywnościami antyoksydacyjnymi oznaczonymi różnymi metodami i ogólną zawartością polifenoli dla wszystkich badanych części surowca. W przypadku owoców, korelacja pomiędzy wszystkimi metodami była wysoce istotna ($r = 0,930 - 0,979$), podczas gdy w przypadku kwiatów, najwyższa była pomiędzy FRAP i ogólną zawartością polifenoli ($r = 0,941$) jak również pomiędzy FRAP i ABTS ($r = 0,920$) – Tab. 3.

Różnice pomiędzy aktywnością ekstraktów z owoców i kwiatów, oznaczoną poszczególnymi metodami oszacowano testem Wilcoxon. Na podstawie wyliczonego parametru stwierdzono, iż niezależnie od techniki pomiaru, różnice pomiędzy potencjałem przeciwutleniającym wyciągów sporządzonych z owoców i kwiatów bzu są istotne statystycznie. Natomiast nie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy materiałem ekologicznym i nieekologicznym.

3. Dyskusja

Zarówno kwiaty, jak i owoce bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), są materiałem wykorzystywanym w medycynie, przy czym przygotowywane z nich napary stosowane są często jako preparaty moczopędne, napotne, immunostymulujące, antybakteryjne oraz rozkurczowe. Owoce natomiast dodatkowo znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym, w produkcji między innymi galaretek, dżemów i syropów.²¹ Wielu autorów donosi, iż obydwie surowce charakteryzują się wysokim potencjałem przeciwutleniającym.^{22,23,24}

W badaniu własnym potwierdzono aktywność antyoksydacyjną kwiatów i owoców. W przypadku metody DPPH, najwyższe wyniki zaobserwowano dla metanolowych ekstraktów z kwiatów ekologicznych – średnia dla wszystkich czasów ekstrakcji wynosiła 4,08 mg troloksu/g surowca, co odpowiadało zmiataniu wolnych rodników na poziomie średnio 87,66% RSA (Tab. 1, Rysunek 1). Niższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały owoce, wśród których najwyższą wartość wykazano dla

²¹ Waszkiewicz-Robak B., Biller E., *op.cit.*

²² Gamze Duymuş H., Göger F., Hüsnü Can Başer K., *op.cit.*

²³ Veberic R., Jakobic J., Stampar F., Schmitzer V., *op.cit.*

²⁴ Dawidowicz A. L., Wianowska D., Baraniak B., *The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra L. (antioxidant properties of extracts)*. LWT „Food Science and Technology” 2006, 39, s. 308-315.

ekstraktów przygotowywanych w 40% (v/v) etanolu, zarówno dla materiału ekologicznego jak i nieekologicznego (średnia aktywność dla wszystkich czasów ekstrakcji wynosiła odpowiednio: 2,62 and 3,20 mg troloksu/g surowca). Odpowiadało to zdolności zmiatania wolnych rodników na poziomie 68,62 i 80,41% RSA (Rycina 1). Podobne, wyższe wartości zdolności antyoksydacyjnej kwiatów, w porównaniu z owocami uzyskali Dawidowicz i wsp., którzy przygotowywali ekstrakty w 80% alkoholu etylowym, stosując różne techniki i temperaturę ekstrakcji – w granicach 20-200°C oraz czas ekstrakcji 10 minut. Autorzy ci donoszą o wyższej zdolności zmiatania wolnych rodników przez kwiaty, ekstrahowane w temperaturze 100°C (94,15 %) w porównaniu z ekstrakcją w temperaturze 20°C (91,95 %). Z kolei owoce wykazywały niższą aktywność antyoksydacyjną wynoszącą 67,69 % dla 100°C oraz 50,25 % dla 20°C.²⁵ Biorąc pod uwagę zbliżone warunki ekstrakcji, w naszym badaniu uzyskano podobne wyniki. Stosując temperaturę około 22°C, czas ekstrakcji 15 minut oraz 70% alkohol etylowy, uzyskano zdolność zmiatania wolnych rodników dla ekstraktu z kwiatów nieekologicznych - 75,45 % RSA oraz w przypadku – kwiatów ekologicznych - 85,09 %RSA. Aktywność ekstraktów z owoców wynosiła odpowiednio 47,05 i 32,96 % RSA (Rycina 1). Należy jednak zaznaczyć, iż w doświadczeniu własnym stosowano także dłuższe czasy ekstrakcji (30 i 60 minut), przy których aktywność antyoksydacyjna w większości przypadków była zdecydowanie wyższa.

Buříčova i Réblova donoszą o aktywności antyoksydacyjnej, mierzonej metodą DPPH, dla ekstraktów z kwiatów bzu czarnego, na poziomie 60,8 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy dla wodnych ekstraktów, przygotowywanych w 98°C podczas ekstrakcji trwającej 20 minut oraz 13,5 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy dla ekstraktów w 96% (v/v) alkoholu etylowym, przygotowanych w temperaturze pokojowej. W pracy tej porównywano aktywność antyoksydacyjną różnych części 17 roślin leczniczych. Wśród badanych kwiatów, takich jak: kwiat bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), kwiat jasnoty białej (*Laminum album* L.), kwiatostan rumianku (*Marticaria chamomilla* L.) oraz kwiat lipy (*Tilia cordata* L.) – kwiat bzu w przypadku naparów, wykazywał podobną aktywność antyoksydacyjną (60,8 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy) w porównaniu z aktywnością antyoksydacyjną kwiatu jasnoty i lipy (odpowiednio 65,8 i 63,0 mg kwasu askorbinowego/g suchej

²⁵ *Ibidem*.

masy) oraz porównywalną z kwiatami lipy, w przypadku ekstraktów alkoholowych (13,5 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy dla kwiatów bzu oraz 14,4 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy dla kwiatów lipy). Najmniej wartościowe okazały się ekstrakty z kwiatostanu rumianku, zarówno wodne (34,8 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy), jak i alkoholowe (5,5 mg kwasu askorbinowego/g suchej masy).²⁶ Jednak należy zaznaczyć iż analizowane rośliny należały do różnych rodzin, co mogło mieć wpływ na obserwowane aktywności antyoksydacyjne. Ze względu na cenny skład, głównie zawartość witaminy C, owoce bzu czarnego często są wykorzystywane w produkcji soków, które wykazują działanie antymiażdżycowe, przeciwwirusowe, przeciwgorączkowe, jak również działanie antyoksydacyjne.²⁷ Jakobek i wsp. donoszą o aktywności antyoksydacyjnej soków z owoców bzu czarnego (62,14 μmol troloksu/ml). Autorzy porównali różne soki z czerwonych owoców, przy czym ich aktywność antyoksydacyjna wahała się od 4,07 do 72,44 μmol troloksu/ml w soku wiśniowym i soku z aronii.²⁸

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono aktywność antyoksydacyjną mierzoną metodą ABTS. Analogicznie do poprzedniej metody, silniejszą zdolność przeciwutleniającą wykazywały ekstrakty z nieekologicznych kwiatów przygotowanych w 40% etanolu (średnia z trzech czasów ekstrakcji 20,78 mg troloksu/g surowca), co odpowiadało procentowi zmiatania wolnego rodnika średnio 97,32% RSA (Tab. 1, Rycina 2). O wysokiej aktywności antyoksydacyjnej naparów z bzu czarnego, mierzonych metodą ABTS donoszą Jabłońska-Ryś i wsp. – 15.88 μM troloksu/g świeżej masy. Autorzy ci analizowali aktywność przeciwutleniającą siedmiu gatunków owoców: dzika róża (*Rosa canina* L.), jeżyna popielica (*Rubus caei* L.), bez czarny (*Sambucus nigra* L.), borówka czernica (*Vaccinium myrtillus* L.), śliwa tarnina (*Prunus spinose* L.), jarzab pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) oraz truskawka (*Fragaria ananasa* L.). Wykorzystując metodę ABTS, wykazali oni działanie przeciwutleniające badanych owoców w granicach od 5,33 μM troloksu/g świeżej masy dla śliwy tarniny do 38,75 μM troloksu/g świeżej masy dla dzikiej róży.²⁹

W badaniach własnych oceniano również zdolność do redukcji jonów żelaza (FRAP). W przypadku tej metody, wysokie zdolności redukcyjne wykazano zarówno

²⁶ Buřičová L., Réblova Z., *Czech medicinal plants as possible sources of antioxidant*, „Czech Journal of Food Sciences” 2008, 26, s. 132-138.

²⁷ Waszkiewicz-Robak B., Biller E., *op.cit.*

²⁸ Jakobek L., Šeruga M., Medividović-Kosanović M., Novak I., *Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*, „Deutsche Lebensmittel-Rundschau” 2007, 103, s. 58-64.

²⁹ Jabłońska-Ryś E., Zalewska-Korona M., Kalbarczyk J., *op. cit.*

dla kwiatów nieekologicznych, jak i ekologicznych. Najwyższy wynik zaobserwowano dla ekstraktów etanolowych (40%) przygotowanych z materiału nieekologicznego, w czasie ekstrakcji 60 minut. Wysoką zdolność do zmiatania wolnych rodników przez owoce bzu czarnego potwierdzają również Jabłońska-Ryś i wsp. oraz Perkins-Veazie i wsp.^{30,31}

Polifenole są składnikami roślinnymi wykazującymi wysoką aktywność antyoksydacyjną.³² Spożywanie soków bogatych w polifenole, między innymi z bzu czarnego, może zredukować stres oksydacyjny i stymulować funkcję komórek odpornościowych.³³ Zarówno kwiaty, jak i owoce bzu czarnego wykazują wysoką zawartość polifenoli.^{34,35,36,37} Waszkiewicz-Robak i Biller wykazali, iż kwiaty tej rośliny są lepszym źródłem tych składników w porównaniu z owocami³⁸, co potwierdziły badania własne.

W przeprowadzonym badaniu zawartość polifenoli w ekstraktach była rozbieżna, zależna od części rośliny i zastosowanego rozpuszczalnika. Ekstrakty z kwiatów charakteryzowały się wyższą zawartością polifenoli w porównaniu z ekstraktami z owoców. W badaniach Viapiany i Wesołowskiego uzyskano również wyższą zawartość polifenoli dla wodnych naparów z kwiatów bzu czarnego niż dla odpowiadających im naparów z owoców, odpowiednio średnio 27,02 i 21,8 mg GA/g suchej masy.³⁹ W badaniach własnych wartość ta mieściła się w granicach od 2,72 do 9,09 mg GA/g surowca dla ekstraktów z kwiatów i od 1,02 do 5,49 mg GA/g surowca dla ekstraktów przyrządzonych z owoców (Tab. 2).

Zawartość substancji czynnych takich jak polifenole jest ściśle skorelowana z aktywnością antyoksydacyjną.⁴⁰ W naszym badaniu, w większości przypadków, stwierdzono istotne korelacje pomiędzy metodami oznaczania aktywności antyoksydacyjnej (Tab. 3). Jest to zgodne w wynikami innych autorów, którzy

³⁰ *Ibidem.*

³¹ Perkins-Veazie S., Thomas A. L., Byers S. L., Finn C. E., *Fruit composition of elderberry (Sambucus sps.) genotypes grown in Oregon and Missouri, USA*, „Acta Horticulturae” 2015, 12(1061), s. 219-224.

³² Sadowska A., Świdorski F., Kromolowska R., *Polifenole – źródło naturalnych przeciwutleniaczy*, „Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego” 2011, s. 108-111.

³³ Jakobek L., Šeruga M., Medividović-Kosanović M., Novak I., *op. cit.*

³⁴ Mikulic-Petkovsek M., Samoticha J., Eler, Franci Stampar, Veberic R., *Traditional elderflower beverage: a rich source of phenolic compounds with high antioxidant activity*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 2015, 63(5), s. 1477-1487.

³⁵ Perkins-Veazie S., Thomas A. L., Byers S. L., Finn E. C., *op. cit.*

³⁶ Dawidowicz A. L., Wianowska D., Baraniak D., *op. cit.*

³⁷ Veberic R., Jakobec J., Stampar F., Schmitzer V., *op.cit.*

³⁸ Waszkiewicz-Robak B., Biller E., *op.cit.*

³⁹ Viapiana A., Wesołowski M., *op. cit.*

⁴⁰ Nowak A., Zielonka-Brzezicka J., Pechaiko D., Tkacz M., Klimowicz A., *op.cit.*

wykazali dodatnią korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi przy użyciu metod DPPH, FRAP i F-C dla owoców i kwiatów bzu.⁴¹

Działanie przeciwutleniające może być różne w zależności od części rośliny. W naszym badaniu z reguły kwiaty charakteryzowały się wyższą aktywnością antyoksydacyjną, w porównaniu z owocami. Dawidowicz i wsp. oraz Viapiana i Wesołowski również wykazali wyższą aktywność antyoksydacyjną i całkowitą zawartość polifenoli dla kwiatów bzu czarnego w porównaniu z owocami.^{42,43}

Wraz ze wzrostem ilości środków chemicznych stosowanych w tradycyjnym rolnictwie i wzrostem świadomości konsumentów, żywność ekologiczna stała się popularna w ostatnich latach.⁴⁴ W naszym badaniu analizowaliśmy surowiec roślinny ekologiczny i nieekologiczny, zakupiony w lokalnym sklepie zielarskim w Szczecinie, przy czym przeprowadzony test Wilcoxon nie wykazał pomiędzy nimi istotnej różnicy (Tab. 3). Do innych wniosków doszli Cebulak i wsp., którzy analizowali zawartość polifenoli i aktywność antyoksydacyjną brokuł (*Brassica oleracea* L.) ze zbioru ekologicznego i konwencjonalnego. W tym przypadku rośliny ekologiczne posiadały większą ogólną zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjną, mierzoną metodami DPPH i ABTS.⁴⁵

4. Wnioski

1. Zarówno ekstrakty z owoców jak i kwiatów bzu czarnego charakteryzują się wyraźną aktywnością antyoksydacyjną oraz znaczącą ogólną zawartością polifenoli, jednak porównując obydwie surowce bardziej wartościowe okazały się kwiaty.
2. Analizując wszystkie metody pomiaru, najwyższe wyniki aktywności antyoksydacyjnej oraz ogólnej zawartości polifenoli uzyskano z reguły stosując jako rozpuszczalnik alkohol etylowy w stężeniu 40% (v/v), 70% (v/v), a także stężony metanol.

⁴¹ Viapiana A., Wesołowski M., *op. cit.*

⁴² *Ibidem.*

⁴³ Dawidowicz A. L., Wianowska D., Baraniak B., *op. cit.*

⁴⁴ Kazimierczak R., Hallman E., Brodzka A., Rembiałowska E., *Porównanie zawartości związków polifenolowych i witaminy C w dżemach z owoców wybranych odmian porzeczki czarnej Ribes Nigrum L. z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej.* „Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering” 2009, 54(3), s. 123-129.

⁴⁵ Cebulak T., Kapusta I., Czernicka M., Zaguła G., Puchalski C., *Wartość odżywcza i prozdrowotna brokułów z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej,* „Bromatologia i Chemia Toksykologiczna” 2015, 48(4), s. 660-666.

3. Nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy materiałem roślinnym deklarowanym jako ekologiczny a materiałem bez takiej deklaracji, zarówno w przypadku kwiatów, jak i owoców.

Tab. 1. Średnie (\pm SD) aktywności antyoksydacyjne ekstraktów z owoców i kwiatów bzu czarnego uzyskane przy użyciu metod DPPH i ABTS, wyrażone jako równoważniki troloksu [mg troloksu/g surowca].

Surowiec	rozpuszczalnik (v/v)	DPPH [mg troloksu/g surowca]			ABTS [mg troloksu/g surowca]		
		czas ekstrakcji [min.]			czas ekstrakcji [min.]		
		15	30	60	15	30	60
OWOC SUSZONY KAWON	MeOH 99,8%	1,70 \pm 0,07	1,27 \pm 0,02	2,32 \pm 0,04	2,25 \pm 0,03	2,33 \pm 0,07	4,94 \pm 0,02
	EtOH 96%	0,81 \pm 0,01	0,60 \pm 0,03	0,62 \pm 0,03	0,24 \pm 0,04	0,67 \pm 0,02	0,97 \pm 0,08
	EtOH 70%	2,16 \pm 0,02	1,52 \pm 0,01	1,80 \pm 0,03	5,03 \pm 0,08	2,12 \pm 0,07	3,73 \pm 0,01
	EtOH 40%	3,30 \pm 0,02	3,16 \pm 0,03	3,16 \pm 0,02	6,83 \pm 0,03	6,91 \pm 0,06	6,59 \pm 0,07
OWOC SUSZONY ECO	MeOH 99,8%	1,60 \pm 0,04	1,67 \pm 0,01	2,91 \pm 0,02	2,31 \pm 0,06	2,48 \pm 0,09	5,85 \pm 0,06
	EtOH 96%	0,65 \pm 0,04	0,70 \pm 0,02	0,99 \pm 0,02	0,45 \pm 0,04	0,58 \pm 0,04	1,22 \pm 0,02
	EtOH 70%	1,52 \pm 0,04	2,70 \pm 0,02	2,92 \pm 0,04	2,72 \pm 0,07	5,32 \pm 0,04	5,90 \pm 0,03
	EtOH 40%	2,22 \pm 0,04	2,16 \pm 0,05	3,49 \pm 0,03	3,51 \pm 0,07	3,40 \pm 0,02	6,78 \pm 0,09
KWIAT SUSZONY KAWON	MeOH 99,8%	3,69 \pm 0,01	3,76 \pm 0,01	3,79 \pm 0,02	8,28 \pm 0,01	7,93 \pm 0,03	12,47 \pm 0,36
	EtOH 96%	2,65 \pm 0,02	1,96 \pm 0,04	3,47 \pm 0,03	3,43 \pm 0,01	3,04 \pm 0,08	4,55 \pm 0,00
	EtOH 70%	3,54 \pm 0,03	3,60 \pm 0,01	3,85 \pm 0,01	14,56 \pm 0,12	9,31 \pm 0,02	19,84 \pm 0,17

	EtOH 40%	3,21±0, 01	3,12±0, 02	3,43±0, 01	20,42±0, 49	20,58±0, 26	21,34±0, 01
KWIAT SUSZON Y ECO	MeOH 99,8%	4,04±0, 01	4,10±0, 02	4,11±0, 02	9,96±0,1 5	14,54±0, 12	17,59±0, 33
	EtOH 96%	1,99±0, 03	2,89±0, 03	3,89±0, 01	2,69±0,0 1	3,34±0,2 5	5,50±0,0 2
	EtOH 70%	3,97±0, 02	3,94±0, 01	3,96±0, 01	10,89±0, 07	12,77±0, 10	20,04±0, 09
	EtOH 40%	3,59±0, 01	3,62±0, 00	3,62±0, 01	14,66±0, 43	15,90±0, 37	21,15±0, 18

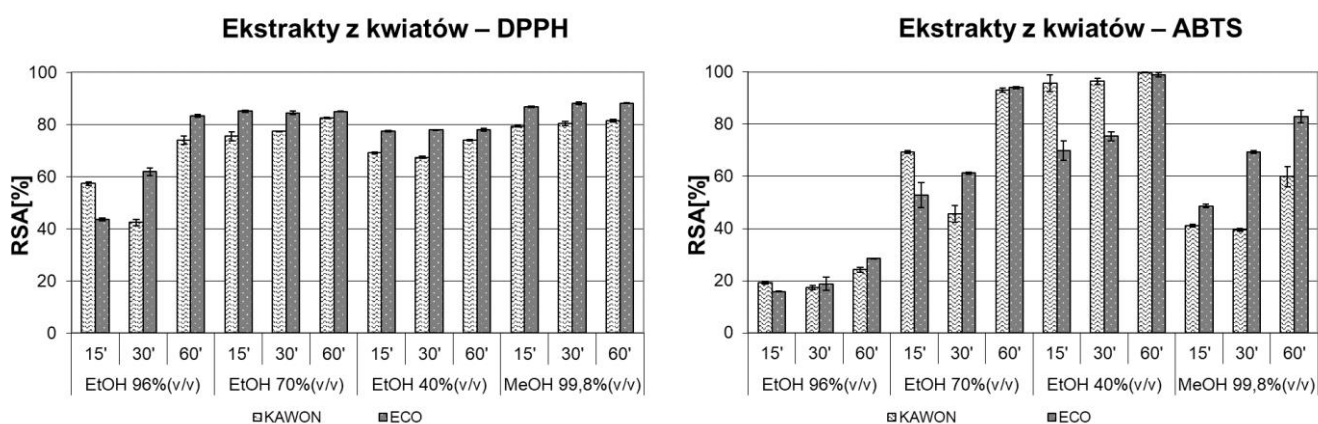
Tab. 2. Średnie (\pm SD) zdolności redukcyjne oraz całkowita zawartość polifenoli w wyciągach z owoców i kwiatów bzu czarnego oznaczone odpowiednio metodą FRAP i Folin-Ciocalteu, wyrażone jako równoważniki substancji wzorcowych [odpowiednio: mg FeSO₄/g surowca i mg kwasu galusowego/ g surowca]

		FRAP [mg FeSO ₄ /g surowca]			FOLIN-CIOCALTEU [mg kwasu galusowego/g surowca]		
Surowiec	rozpuszczalnik (v/v)	czas ekstrakcji [min.]			czas ekstrakcji [min.]		
		15	30	60	15	30	60
OWOC SUSZONY KAWON	MeOH 99,8%	2,72 \pm 0,0 5	1,84 \pm 0,1 7	4,47 \pm 0,1 9	2,16 \pm 0,0 05	1,66 \pm 0,0 17	3,15 \pm 0,0 19
	EtOH 96%	0,85 \pm 0,0 9	0,87 \pm 0,0 8	0,82 \pm 0,0 7	2,31 \pm 0,0 09	1,10 \pm 0,0 08	1,29 \pm 0,0 17
	EtOH 70%	3,35 \pm 0,1 9	1,88 \pm 0,2 1	2,68 \pm 0,0 3	2,81 \pm 0,0 19	2,03 \pm 0,0 21	2,76 \pm 0,0 10
	EtOH 40%	6,09 \pm 0,1 2	5,81 \pm 0,2 2	5,98 \pm 0,6 0	5,49 \pm 0,0 12	4,35 \pm 0,0 13	4,36 \pm 0,0 60
OWOC SUSZONY ECO	MeOH 99,8%	3,05 \pm 0,1 4	3,01 \pm 0,1 5	7,29 \pm 0,0 5	2,38 \pm 0,0 14	2,76 \pm 0,0 15	5,12 \pm 0,0 05
	EtOH 96%	0,72 \pm 0,0 7	0,99 \pm 0,0 2	1,56 \pm 0,0 4	1,02 \pm 0,0 03	1,25 \pm 0,0 06	1,81 \pm 0,0 06
	EtOH 70%	2,03 \pm 0,1 8	5,24 \pm 0,1 4	5,90 \pm 0,1 8	2,65 \pm 0,0 18	4,41 \pm 0,0 05	4,82 \pm 0,0 12
	EtOH 40%	3,19 \pm 0,0 1	3,14 \pm 0,1 8	7,10 \pm 0,2 2	3,28 \pm 0,0 07	3,10 \pm 0,0 18	5,29 \pm 0,0 22
KWIAT SUSZONY KAWON	MeOH 99,8%	10,49 \pm 0,0 11	9,20 \pm 0,1 6	14,42 \pm 0,0 05	7,21 \pm 0,0 11	6,60 \pm 0,0 16	7,33 \pm 0,0 05
	EtOH 96%	3,38 \pm 0,1 3	2,63 \pm 0,1 1	5,26 \pm 0,1 6	3,64 \pm 0,0 12	2,72 \pm 0,0 11	5,02 \pm 0,0 16
	EtOH 70%	15,08 \pm 0,0 05	9,99 \pm 0,1 3	15,68 \pm 0,0 06	8,12 \pm 0,0 05	7,20 \pm 0,0 13	9,05 \pm 0,0 06
	EtOH 40%	13,98 \pm 0,0 12	15,41 \pm 0,0 06	15,83 \pm 0,0 11	9,01 \pm 0,0 12	8,33 \pm 0,0 06	8,57 \pm 0,0 11
KWIAT	MeOH	10,47 \pm 0,0	14,92 \pm 0,0	15,08 \pm 0,0	7,23 \pm 0,0	7,70 \pm 0,0	8,30 \pm 0,0

SUSZON	99,8%	14	02	29	14	08	04
Y							
ECO	EtOH 96%	3,03±0,0 9	4,25±0,0 8	6,92±0,1 4	3,04±0, 14	4,14±0, 08	6,35±0, 06
	EtOH 70%	11,86±0, 13	14,18±0, 26	15,77±0, 06	8,66±0, 13	7,89±0, 30	8,78±0, 06
	EtOH 40%	11,76±0, 14	13,24±0, 17	13,78±0, 24	7,75±0, 14	8,54±0, 17	9,09±0, 15

Tab. 3. Korelacja pomiędzy poszczególnymi metodami pomiaru aktywności antyoksydacyjnej dla badanych części bzu czarnego.

Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej	OWOCE		KWIATY	
	współczynnik korelacji (r)	istotność statystyczna (p)	współczynnik korelacji (r)	istotność statystyczna (p)
DPPH/FRAP	0,968	p<0,0001	0,688	p=0,0002
DPPH/ABTS	0,979	p<0,0001	0,474	p=0,0192
DPPH/F-C	0,960	p<0,0001	0,764	p<0,0001
FRAP/ABTS	0,953	p<0,0001	0,920	p<0,0001
FRAP/F-C	0,961	p<0,0001	0,941	p<0,0001
ABTS/F-C	0,930	p<0,0001	0,888	p<0,0001



Ryc. 1. Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z owoców i kwiatów bzu czarnego, oznaczony metodami DPPH i ABTS, wyrażony jako % RSA.

Bibliografia:

Waszkiewicz-Robak Bożena, Biller Elżbieta, *Właściwości prozdrowotne czarnego bzu*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, nr 99(3).

Veberic Robert, Jakobic Jerneja, Stampar Franci, Schmitzer Valentina, *European elderberry (Sambucus nigra L.) rich in sugars, organic acid, antocyanins and selected polyphenols*, „Food Chemistry” 2009, nr 114.

Magrone Thea, Perez de Heredia Fatima, Jirillo Emilio, Morabito Giuseppa, Marcos Ascension, and Serafini Mauro, *Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases*, „Canadian Journal of Physiology and Pharmacology” 2013, nr 91.

Śliż Daniel, S Zgliczyński Wojciech S, Szeligowska Jowita, Rostkowska Olga, Pinkas Jarosław, *Modyfikacja zwyczajów żywieniowych w prewencji chorób cywilizacyjnych*, „Postępy Nauk Medycznych” 2016, nr 5.

Kulbacka Julita, Saczko Jolanta, Chwiłkowska Agnieszka, *Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek*, „Polski Merkurusz Lekarski” 2009, nr 27(157).

Cybul Marta, Nowak Renata, *Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych*, „Herba Polonica” 2008, nr 54(1).

Czajka Arkadiusz, *Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu*, „Nowiny Lekarskie” 2006, nr 75(6).

Jabłońska-Ryś Ewa, Zalewska-Korona Marta, Kalbarczyk Janusz, *Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits*, „Journal of Fruit and Ornamental Plant Research” 2009, nr 17(2).

Gamze Duymuş Hale, Göger Fatih, Hüsnü Can Başer Kemal, *In vitro antioxidant properties and anthocyanin composition of elderberry extract*, „Food Chemistry” 2014, nr 155.

Viapiana Agnieszka, Wesołowski Marek, *The phenolic content and antioxidant activities of infusion of Sambucus nigra L.*, „Plant Foods for Human Nutrition” 2017, nr 72.

Załęcka Aneta, Hallman Ewelina, Rembiałkowska Ewa, *Zawartość związków bioaktywnych w nowych sokach owocowych z produkcji ekologicznej* „Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering” 2013, nr 58(4).

Zielonka-Brzezicka Joanna, Nowak Anna, Klimowicz Adam, Wira Daria, Grzesiak Karolina, Rędzikowska Ewelina, Wysocka Daria, Synowiec Laura, Ptak Barbara, Bilska Joanna, *Aktinidia chińska jako źródło prozdrowotnych antyoksydantów*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, nr 99(3).

Nowak Anna, Maciejewska Anna, Duchnik Wiktoria, Florkowska Katarzyna, Klimowicz Adam, *Wpływ rozpuszczalnika na właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z zielonej herbaty (Camellia sinensis L.)*, „Problemy Higieny i Epidemiologii” 2018, nr 99(3).

Zielonka-Brzezicka Joanna, Nowak Anna, Zielińska Magdalena, Klimowicz Adam, *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (Rubus idaeus) i jeżyny europejskiej (Rubus fruticosus)*, „Pomeranian Journal of Life Sciences” 2016, nr 62(4).

Nowak Anna, Zielonka-Brzezicka Joanna, Pechaiko Danuta, Tkacz Magdalena, Klimowicz Adam, *Ocena właściwości antyoksydacyjnej liści Ginkgo biloba L. po zakończeniu wegetacji*, „Pomeranian Journal of Life Sciences” 2017, nr 63(1).

Dawidowicz Andrzej Lech, Wianowska Dorota, Baraniak Barbara, *The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra L. (antioxidant properties of extracts)*. LWT „Food Science and Technology” 2006, nr 39.

Buřičová Lucie, Réblova Zuzana, *Czech medicinal plants as possible sources of antioxidant*, „Czech Journal of Food Sciences” 2008, nr 26.

Jakobek Lidija, Šeruga Marijan, Medividović-Kosanović Martina, Novak Ivana, *Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*, „Deutsche Lebensmittel-Rundschau” 2007, nr 103.

Perkins-Veazie Penelope, L Thomas Anne, L Byers Patrick, E Finn Chad, *Fruit composition of elderberry (Sambucus spp.) genotypes grown in Oregon and Missouri, USA*, „Acta Horticulturae” 2015, nr 12(1061).

Sadowska Anna, Świdorski Franciszek, Kromołowska Rita, *Polifenole – źródło naturalnych przeciwutleniaczy*, „Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego” 2011.

Mikulic-Petkovsek Maja, Samoticha Justyna, Eler Klemen, Stampar Franci, Veberic Robert, *Traditional elderflower beverage: a rich source of phenolic compounds with high antioxidant activity*, „Journal of Agricultural and Food Chemistry” 2015, nr 63(5).

Kazimierczak Renata, Hallman Ewelina, Brodzka Aleksandra, Rembiałowska Ewa, *Porównanie zawartości związków polifenolowych i witaminy C w dżemach z owoców wybranych odmian porzeczki czarnej Ribes Nigrum L. z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej.* „Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering” 2009, nr 54(3).

Cebulak Tomasz, Kapusta Ireneusz, Czernicka Maria, Zaguła Grzegorz, Puchalski Czesław, *Wartość odżywcza i prozdrowotna brokułów z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej,* „Bromatologia i Chemia Toksykologiczna” 2015, nr 48(4).

Antioxidant properties, quantitative and qualitative profile of flavonoids in various genotypes of cereals grown in Poland

Introduction

Flavonoids are a group of organic chemical compounds found in plants. Their structure is based on three rings: A, B and C. Flavonoids differ in the number and type of substituents. Most flavonoids contain hydroxyl groups, one or more of which is usually combined with a sugar molecule to form glycosides (Gumul et al. 2005, Przybylska 2018, Przybylska-Balcerek et al. 2019). Modifications of the C-ring differentiate flavonoids to flavonols (quercetin, kaempferol), flavones (naringenin) and flavones (apigenin, luteolin) (Figure 1). Flavonoids are natural plant compounds with antioxidant activity. They are very popular in vegetables, fruits, herbs and cereals. Flavonoids are in the form of aglycons or flavonoid glycosides. In the current literature on the subject one can find information on the presence of flavonoids only in oat grain (Peterson, 2001, Gangopadhyay et al., 2016). The concentrations of antioxidant compounds in cereals grown in the temperate climate zone are determined by pathogenic microscopic fungi i.e. (*Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp.) the most frequently registered fungal pathogens are *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium notatum* and *Penicillium expansum*, which are the dominant cereal microflora (Stolarzewicz et al. 2013 Wiśniewska et al., 2014 a, b). These fungi produce secondary metabolites referred as mycotoxins, e.g. trichothenes A, trichothecenes B, zearalenone (Packer et al., 2008, Przybylska-Balcerek et al. 2019). In vitro studies have had a significant effect on the pathogenesis and production of mycotoxins. In this study, it was decided how to determine the selected bioactive compounds, which are flavonoids with antioxidant and antimicrobial properties.

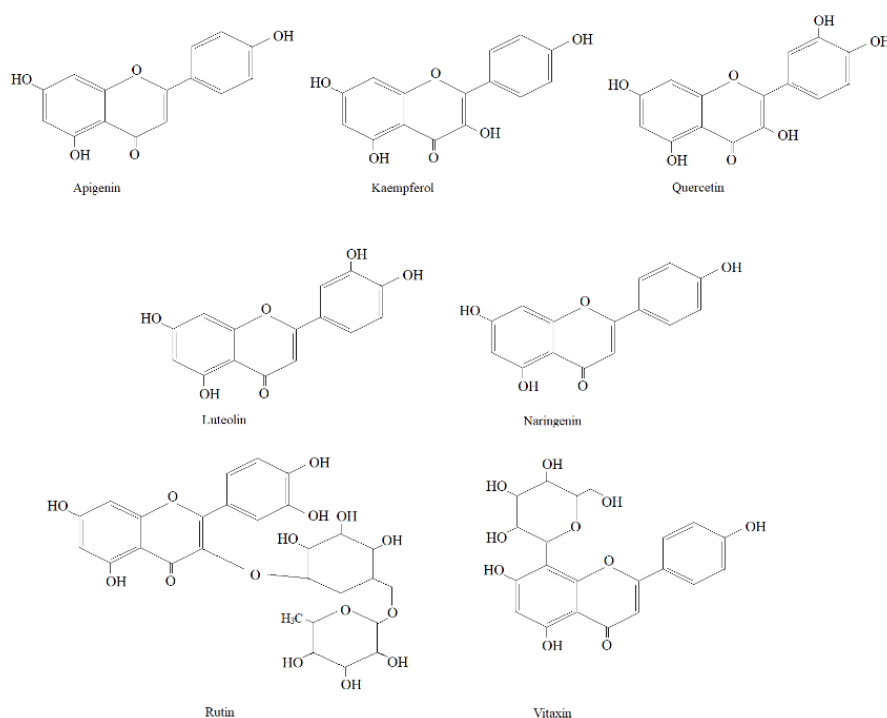


Fig.1. Selected flavonoids

Flavonoid compounds are characterized by multidirectional biological activity, which is used for therapeutic and nursing purposes of consumers as well as antimicrobial in the case of crop plants. Some flavonoids have a sealing effect on blood vessels, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial and antifungal [Kumar et al. 2011, Adaszyńska, Swarczewicz, 2013, Cushnie, Lamb 2005, Sher 2009, Saleem et al. 2010]. The mechanism and strength of their action depends on the chemical structure [Cushnie, Lamb 2005]. Apigenin and amentofalvone have a strong effect on pathogenic fungi of *C. albicans*, *S. cerevisiae* and *T. beigellii*, which has been described by Saleema [Saleem et al. 2010]. Kaempferol is an example of a comprehensive activity. This compound acts on Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi of the genus *Candida glabrata* [Cushnie, Lamb 2005, Saleem et al. 2010]. Sato et al. Studied apigenin and luteolin against ordinary *Staphylococcus aureus* strains. The results of studies by other authors indicate a synergistic effect of the combination of vancomycin with soforaflavone G [Dastidar et al. 2001]. Another metabolite of the flavonoid group is alopecuron. This compound is more potent than synthetic antibiotics. Some flavonoids inhibit the activity of *Helicobacter pylori*, which is responsible for peptic ulcer of the stomach and duodenum [Cushnie, Lamb 2005]. Some flavonoid aglycones have the ability to inhibit urease (glycosides have a weaker effect). The antioxidant activity of flavonoids is related to the structure of the molecule. The flavonoid compounds are

characterized by a diversified mechanism of antioxidant activity. As antioxidants, they can act by direct reaction with free radicals, scavenging free radicals, intensifying the dismutation of free radicals to compounds with much lower reactivity, chelation of pro-oxidative metals and by inhibiting or enhancing the action of many enzymes [Miller et al. 2008]. The antioxidant activity of flavonoid compounds is used in cosmetics. Flavonoids improve skin hydration, restore its antibacterial protective barrier, smooth the skin and stimulate the growth of its cells. They work shielding, astringent and anti-oedematous. They are also used to treat acne, blackheads and dandruff. Prevents hair loss and wrinkles [Gupta, Sharma 2006, Allemann, Baumann 2008]. Flavonoids have the effect of slowing down skin aging processes [Gupta, Sharma 2006, Allemann, Baumann 2008]. Current literature is rich in information on the flavonoid properties. These compounds are characterized by high biological activity, they are used in the prevention of many civilization, bacterial and fungal diseases. The multidirectional action of flavonoids and their derivatives gives hope for the search for new sources. It is now known that fruit and vegetables are abundant in flavonoids, but cereal grains may be an alternative to the profitability of obtaining these compounds. As cereals in Poland are grown in the largest amounts, they can also be used as raw material for the production of cosmetics and plant protection products. The aim of this work, was to determine the quantitative differences in the flavonoid profile between individual cereal species and their genotypes.

1. Material and methods

Material for analyses consisted of 211 grain samples of five cereal species, i.e. barley, oat, wheat, triticale and rye (Table 1) grown in the years 2017 and 2018 in Poland on experimental plots of Poznan Plant Breeding in Tulce, the Plant Breeding and Acclimation Institute in Radzików and the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The mass of one sample was 1 kg grain.

Tab. 1. Quantitative presentation of analysed samples of 5 cereal species

Species	Form	Number of samples	
		2017	2018
Barley	Malting	2	6
	Fodder	8	9
Oat	Naked	6	6

	Hulled	5	4
Wheat	Spring	21	44
	Winter	5	26
Triticale	Spring	8	12
	Winter	12	25
Rye	Spring	2	2
	Winter	5	3
Total		74	137

1.1. Determination of flavonoids

Samples for analyses were 0.20 g in weight. They were placed in sealed 17ml culture test tubes, where first alkaline and then acid hydrolysis were run. In order to perform alkaline hydrolysis 1 ml distilled water and 4 ml 2 M aqueous sodium hydroxide were added to test tubes. Tightly sealed test tubes were heated in a water bath at 95 °C for 30 min. After cooling (approx. 20 min) the test tubes was neutralised with 2 ml 6 M aqueous hydrochloric acid solution (pH = 2). Next the samples were cooled in water with ice. Flavonoids were extracted from the inorganic phase using diethyl ether (2 x 2 ml). Formed ether extracts were continuously transferred to 8ml vials. Next acid hydrolysis was run. For this purpose the aqueous phase was supplemented with 3 ml 6 M aqueous hydrochloric acid solution. Tightly sealed test tubes were heated in a water bath at 95 °C for 30 min. After being cooled in water with ice the samples were extracted with diethyl ether (2 x 2 ml). Produced ether extracts were continuously transferred to 8 ml vials, after which they were evaporated to dryness in a stream of nitrogen. Prior to analyses samples were dissolved in 1 ml methanol. Analyses were performed using an Aquity H class UPLC system equipped with an Waters Acquity PDA detector (Waters, USA). Chromatographic separation was performed on a Acquity UPLC® BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, particle size 1.7 µm) (Waters, Ireland). The elution was carried out in gradient using the following mobile phase composition: A: acetonitrile with 0.1% formic acid, B: 1% aqueous formic acid mixture (pH = 2). Concentrations of flavonoids were determined using an internal standard at the wavelength $\lambda = 320$ nm. Compounds were identified based on a comparison of retention times of the analysed peaks with the retention time of the standard and by adding a specific amount of the standard to the analysed samples and a repeated analysis. The detection level was 1 µg g⁻¹. Retention times of assayed acids are as follows: kaempferol 6.11 min, luteolin 11.89 min, apigenin 16.43 min, catechin 18.09 min, naringenin 31.22 min, vitexin 35.41 min, rutin 38.11 min,

quercetin 39.58 min, respectively. Recovery rates for the analysed phenolic compounds were as follows: kaempferol 86 ± 5 , luteolin $96 \pm 2\%$, apigenin $93 \pm 3\%$, catechin $89 \pm 5\%$, naringenin $88 \pm 4\%$, vitexin $95 \pm 3\%$, rutin $93 \pm 4\%$, quercetin $97 \pm 1\%$ (Przybylska-Balcerek et al. 2019).

2. Results and discussion

In this study analyses were conducted on grain samples of five cereal species grown in Poland in 2017 and 2018. In all the 211 grain samples contents of 7 flavonoids were analysed. Chemical analyzes made it possible to determine the differences in the content of bioactive compounds in the grains of various cereal species.

Contents of phenolic compounds in grain are determined e.g. by weather conditions during the vegetation season and the presence of pathogens. Analysed samples of cereal grain were not infested by microscopic fungi, which was found based on the infestation rate. In view of the above the weather may have been the factor affecting the level of flavonoids in grain.

The above observations regarding flavonoid concentrations were compared with weather conditions in 2017-2018 (Table 2). It was found that flavonoid concentrations depend mainly on weather conditions at the time of flowering of cereals. The concentration of these compounds in grains of fine grains is higher in barley forms as well as in winter forms of wheat, triticale and rye in a drier and warmer year 2018. In samples in both oat forms and in the spring forms of wheat, triticale and rye a higher average glycoside content was noted. and aglycones in the case of cereals grown in 2017, when there was a greater abundance of precipitation.

Tab. 2. Mean air temperatures and mean precipitation totals in Poland in the years 2017-2018 in the period from flowering to harvest.

Month/Year	Mean temperature [°C] in the period from flowering to harvest		Precipitation totals [mm] in the period from flowering to harvest	
	2018	2017	2018	2017
May	16.2	13.1	31.8	32.4
June	18.6	16.4	25.2	75.2
July	19.9	17.3	72.0	88.8
August	21.0	17.8	40.0	62.8
September	16.6	13.6	36.2	104.4

Literature on the subject indicates that cereal grain contain flavonoids (Shen et al., 2009), while quantitative data are not available (Dykes and Rooney, 2007). Based on previous studies, it was found that these compounds are found in cereals, with the identification of 7 flavonoids, i.e. Naringenin, vitexin, rutin, quercetin, apigenin, kaempferol and luteolin.

This study (Table 3, Table 4) showed the highest mean of total flavonoid concentrations was in grain of malting barley (in 2018: 670 mg kg⁻¹, in 2017: 470 mg kg⁻¹) and fodder barley (in 2018: 669 mg kg⁻¹, in 2017: 548 mg kg⁻¹). The lowest mean contents of glycosides and aglycones were analyzed in grain of spring triticale (in 2018: 118 mg kg⁻¹, in 2017: 132 mg kg⁻¹) and winter wheat (in 2018: 193 mg kg⁻¹, in 2017: 151 mg kg⁻¹).

Tab. 3. Concentrations of flavonoids in grain of fodder and malting barley and in grain of hulled and naked oat grown in the years 2017 and 2018.

Flavonoids	Malting barley		Fodder barley		Naked oat		Hulled oat	
	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017
Naringenin	212.3 - 305.7 255.8 b ± 33.35	143.5 - 222.7 183.1 a ± 39.61	192.0 - 303.6 235.1 b ± 38.56	161.5 - 229.7 196.3 a ± 24.38	19.4 - 159.1 65.7 a ± 19.42	51.4 - 149.3 102.8 b ± 51.41	8.2 - 69.6 30.6 a ± 8.22	14.2 - 108.9 47.7 a ± 9.52
Vitaxin	10.1 - 24.3 16.5 a ± 4.52	6.6 - 13.5 10.1 a ± 3.44	7.1 - 27.8 17.6 a ± 5.13	1.9 - 17.2 12.4 a ± 5.78	23.5 - 224.7 98.2 a ± 23.51	21.5 - 206.5 127.4 a ± 21.51	10.2 - 53.6 32.5 b ± 10.22	16.3 - 118.9 17.6 a ± 9.82
Rutin	11.5 - 25.9 17.8 a ± 4.59	7.9 - 14.3 11.1 a ± 3.19	8.5 - 29.4 18.9 a ± 5.2	3.2 - 18.2 13.4 a ± 5.62	6.6 - 55.4 31.1 a ± 6.62	36.8 - 67.3 54.5 b ± 36.81	11.5 - 50.8 29.4 a ± 11.51	21.0 - 71.6 27.2 a ± 12.81
Quercetin	128.6 - 217.7 175.8 b ± 35.93	105.7 - 141.5 123.6 a ± 17.94	117.2 - 256.8 204.3 b ± 37.04	106.3 - 190.2 170.2 a ± 25.65	2.4 - 26.8 17.2 b ± 2.41	2.8 - 15.9 8.9 a ± 2.81	1.2 - 10.6 6.1 a ± 1.21	2.4 - 29.5 16.1 b ± 8.31
Apigenin	62.9 - 89.4 71.8 b ± 9.85	43.6 - 56.6 50.1 a ± 6.51	57.6 - 91.6 67.9 b ± 11.22	49.0 - 58.3 54.9 a ± 2.54	7.7 - 17.9 14.1 a ± 7.72	3.9 - 25.2 16.6 a ± 3.91	4.7 - 24.1 11.6 a ± 4.72	2.2 - 34.6 17.1 a ± 6.11
Kaempferol	53.3 - 75.9 60.4 b ± 8.51	37.3 - 46.2 41.8 a ± 4.45	49.2 - 78.4 57.5 b ± 9.66	42.0 - 48.2 46.1 a ± 2.07	2.8 - 42.2 18.3 a ± 2.83	17.5 - 32.1 25.1 a ± 17.51	11.3 - 22.5 16.7 a ± 11.31	2.9 - 76.3 19.5 a ± 9.83
Luteolin	63.2 - 89.9 72.3 b ± 9.91	43.8 - 57.0 50.4 a ± 6.62	57.9 - 92.1 68.4 b ± 11.28	49.3 - 58.7 55.3 a ± 2.57	1.8 - 49.6 20.2 a ± 1.83	6.8 - 47.9 20.4 a ± 6.82	25.6 - 64.3 42.6 b ± 25.62	9.3 - 53.6 11.8 a ± 14.92

Tab. 4. Concentrations of flavonoids in grain of both forms of wheat, triticale and rye grown in the years 2017 and 2018.

Flavonoids	Spring wheat		Winter wheat		Spring triticale		Winter triticale		Spring rye		Winter rye	
	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017
Naringenin	30.3	29.9	18.6	33.9	21.3	30.4	38.4	39.8	20.3	21.5-53.7 37.6 a ± 16.11	2.7-73.7 38.9 a ± 29.01	38.5 - 108.9 67.7 24.16
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	55.2	61.9	64.3	59.7	27.6	37.2	79.2	89.3	39.4			
	41.6	47.9	41.4	49.5	24.3	34.8	57.3	56.9	29.7			
	a ± 6.27	a ± 10.95	a ± 12.74	a ± 8.83	a ± 1.86	b ± 2.11	a ± 12.77	a ± 20.35	a ± 9.74			
Vitaxin	36.5	5.5 - 59.2 24.4 a ± 20.65	4.3 -	8.1 -	25.5	37.7	32.8	48.1	47.2	52.2	5.6 - 31.5 21.6 a ± 11.42	45.1 - 99.2 66.4 18.64
	-		129.6	14.1	-	-	-	-	-	-		
	78.2		46.5	10.7	33.9	46.2	103.5	118.9	82.5	123.6		
	62.8		46.5	10.7	28.9	43.3	69.9	72.3	64.8	87.9		
	b ± 8.21		b ± 28.82	a ± 2.02	a ± 2.26	b ± 2.65	a ± 20.21	a ± 28.99	a ± 17.64	b ± 35.7		
Rutin	11.7	9.8 - 34.2 24.2 a ± 8.13	13.6	9.6 -	12.9	17.9	20.8	36.4	37.9	43.2	15.3 - 70.5 51.7 b ± 25.75	12.5 - 56.3 24.9 16.27
	-		36.6	-	-	-	-	-	-	-		
	29.1		42.4	27.2	16.8	22.6	64.7	71.6	49.3	51.1		
	21.2		26.8	9.4	14.7	20.5	47.9	48.1	43.6	46.6		
	a ± 4.03		a ± 9.11	a ± 1.14	a ± 1.21	a ± 11.57	a ± 14.81	a ± 5.74	a ± 4.56	a ± 25.75		
Quercetin	28.4	8.5 - 29.5 17.1 a ± 7.68	2.5 -	3.6 -	9.8 -	5.9 -	0.9 -	1.1 -	5.7 -	5.8 -	12.2 - 24.6 19.4 a ± 5.27	6.5 - 13.3 10.6 a ± 2.39
	-		29.2	8.2	12.7	7.2	19.2	13.5	15.9	14.3		
	38.1		21.3	5.6 a	11.2	6.6 a	12.2	8.9 a	10.8	10.1		
	31.6		21.3	5.6 a	11.2	6.6 a	12.2	8.9 a	10.8	10.1		
	b ± 2.3		b ± 7.52	± 1.48	a ± 0.86	± 0.42	a ± 5.21	± 5.11	a ± 5.13	a ± 4.25		
Apigenin	13.1	15.1	10.1	19.1	18.3	11.9	20.4	17.7	15.2	11.6	11.1	12.2
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27.2	27.6	99.7	29.8	23.7	14.6	27.2	21.1	21.6	17.9	118.3	34.6

	16.7 a ± 2.99	21 a ± 3.01	25.4 a ± 19.42	24.3 a ± 3.85	20.8 a ± 1.61	13.5 a ± 0.77	23.4 a ± 1.96	19.6 a ± 0.97	18.4 a ± 3.24	14.7 a ± 3.14	50.1 b ± 48.41	17.5 a ± 8.58
Kaempferol	13.7 - 43.2 34.1 b ± 4.47	10.5 - 31.9 18.7 a ± 6.78	10.7 a - 41.8 27.8 a ± 9.05	17.2 - 76.3 31.1 a ± 22.55	14.6 - 18.9 16.6 a ± 1.28	10.3 - 12.6 11.7 a ± 0.67	15.2 - 23.6 20.2 a ± 2.29	11.2 - 18.9 16.2 a ± 2.65	20.2 - 52.2 36.2 a ± 16.11	17.3 - 42.1 29.7 a ± 12.41	14.8 - 46.3 30.6 a ± 12.84	22.6 - 67.7 35.6 a ± 16.5 7
Luteolin	2.8 - 13.5 6.3 a ± 2.24	2.3 - 11.0 6.8 a ± 2.41	2.7 - 27.8 5.2 a ± 4.59	2.6 - 4.1 3.4 a ± 0.52	1.1 - 2.9 1.6 a ± 0.51	1.7 - 2.8 2.5 a - 0.35	0.8 - 4.6 2.4 a ± 1.08	0.1 - 3.4 1.6 a ± 1.19	4.4 - 9.5 6.9 a ± 2.54	3.8 - 9.2 6.5 a ± 2.73	4.2 - 22.8 13.8 a ± 7.59	3.6 - 9.8 6.8 a ± 2.11

Of the seven flavonoids identified, it was found that in the analyzed samples of malting barley and malt barley, hulled oats and spring and winter wheat, naringenin was predominant.

Barley was the first cereal tested. Based on the data presented in Table 3, regarding malting barley and malt grain from the harvest in 2018. In both cases, the total concentration of all flavonoids was statistically significantly higher than in cereals from the 2017 harvest.

Oat was the second cereal subjected to quantitative analyses of selected flavonoids. It was found that in grain of naked oat the mean concentration of all the tested glycosides and aglycones was higher in samples from 2017, except for quercetin. In turn, a different quantitative profile of flavonoids was observed in the case of hulled oat grain. Higher concentrations of vitexin, rutin and luteolin were recorded in grain from the 2018 harvest.

Wheat was the next analysed cereal (Table 4). Analysis of data concerning spring wheat grain showed that samples from 2018 contained higher concentrations of three flavonoids, i.e. vitexin, quercetin and kaempferol, while the other identified glycosides and aglycones were detected in higher amounts in samples collected in 2017. A similar trend was observed in the case of winter wheat grain.

Triticale was another examined fine-grain cereal (Table 4). The quantitative profile of flavonoids in grain of spring and winter triticale is similar; however, in both

cases higher concentrations of quercetin, apigenin and kaempferol were recorded in samples from 2018.

Rye was the last investigated cereal (Table 4). When analysing data concerning contents of flavonoids in spring rye grain statistically significantly greater concentrations of apigenin, kaempferol and luteolin were found in samples from 2018. In turn, contents of naringenin, vitexin and rutin were greater in spring rye grain from the 2017 harvest. A different profile of these compounds was presented in the case of winter rye grain. Grain samples from 2018 contained higher concentrations of rutin, quercetin, apigenin and luteolin. The samples from 2019 had higher levels of naringenin, vitexin and kaempferol.

3. Discriminant analysis

Based on the discriminant analyses it was found that 3 out of 7 flavonoids characterised the highest discriminatory power for the entire population of analysed samples (Fig.2., Fig.3).. In the case of grain of both barley forms it was naringenin and quercetin. In grain of hulled and naked oat, winter rye as well as both rye forms rutin and vitexin were the most characteristic flavonoids.

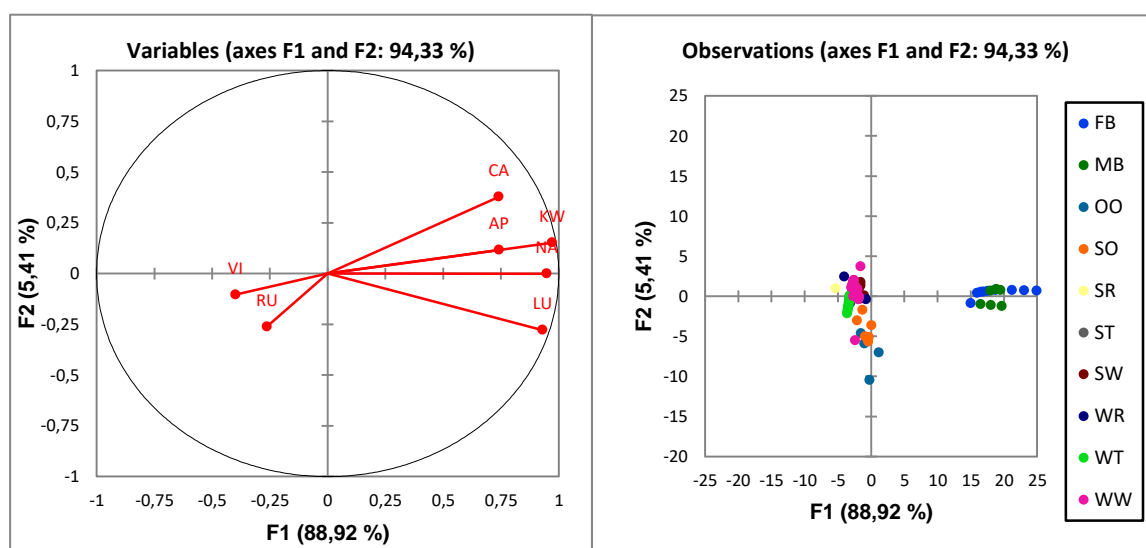


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA) of cereal species - flavonoids – 2018

- NA - naringenin; VI – vitaxin; RU – rutin; KW – quercetin; AP – apigenin; CA – kaempferol; LU – luteolin

- FB- fodder barley; MB- malting barley; OO- hulled oat; SO- naked oat; SR- spring rye; ST- spring triticale; SW- spring wheat; WR- winter rye; WT- winter triticale; WW- winter wheat

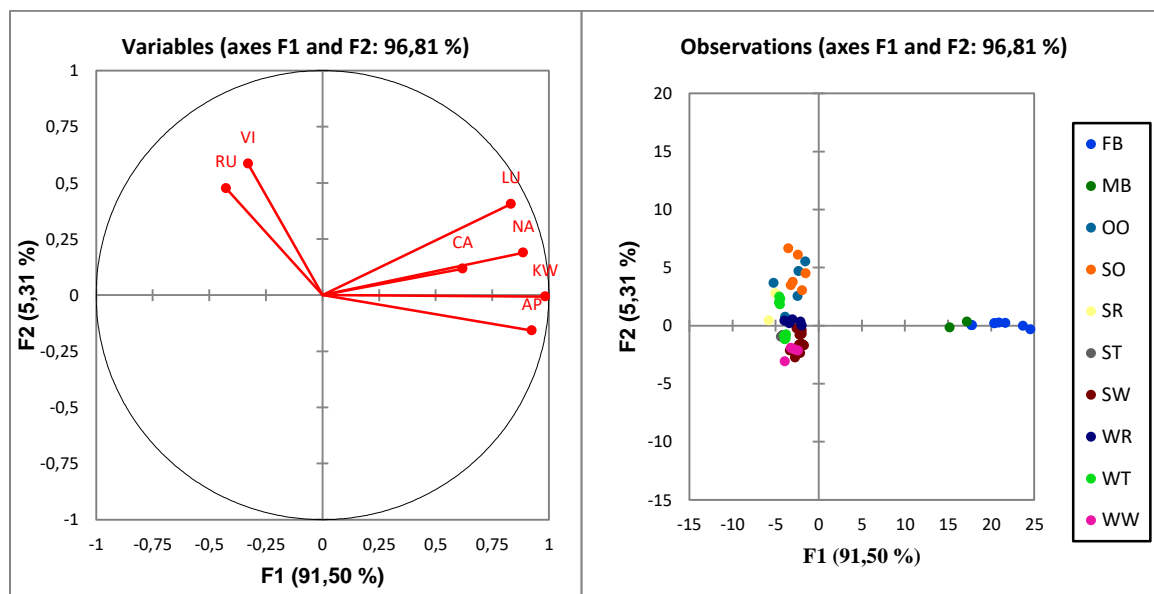


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA) of cereal species flavonoids – 2017

- NA - naringenin; VI – vitaxin; RU – rutin; KW – quercetin; AP – apigenin; CA – kaempferol; LU – luteolin
- FB- fodder barley; MB- malting barley; OO- hulled oat; SO- naked oat; SR- spring rye; ST- spring triticale; SW- spring wheat; WR- winter rye; WT- winter triticale; WW- winter wheat

Based on the results of the analysis of the influence of stress factors on various cereal species, flavonoids have been found to exist in free and conjugated forms. The concentration of flavonoids varied depending on the type of cereals. In all cereal species, flavonoids are present in very small amounts. (Gąsiorowski, 1997, Shirley, 1998, Andlauer and Furst, 1998; Tamagawa et al., 1999). Among them, flavonol monomers, dimers and trimers represent 58-68% of the total polyphenol (McMurrough, 1983). The study also recorded the lowest concentration of glycosides and aglycones in seeds of spring triticale. Przybylska (2018) in his studies showed the highest concentration of naringenin in spring barley grain. Vitxin predominated in the grain of the remaining studied cereals (Przybylska, 2018).

4. Conclusions

On the basis of the conducted research, it was found that cereal grains are a source of bioactive compounds, especially flavonoids. However, the concentration of bioactive compounds depends on several factors such as cereal species, growing conditions and weather conditions during vegetation. It can be assumed that the more favorable conditions for growing cereals, the higher the concentration of bioactive compounds. The bioactive compounds act advantageously for the plant in which they occur and for the consumer. Therefore, the possibility of using cereal grains as an alternative raw material for obtaining natural bioactive compounds is considered. Their pro-health antioxidant and antibacterial properties are desirable in food products, cosmetic preparations and plant protection products. The obtained results supplement the current literature of the subject with precise data on the flavonoid concentration in various species of fine grain cereals.

Literature:

Adaszyńska M., Swarcewicz M., *Antimicrobial properties of selected secondary plant metabolites and their application in medicine*, "Med Biol Sci" 2013, nr 1.

Allemann B., Baumann L., *Antioxidants used in skin care formulations*, "Skin Therapy Lett" 2008, nr 13.

Andlauer W., Furst P., *Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals*, "Cereal Foods World" 1998, nr 5.

Barley - chemistry and technology, Gašiorowski H., PWRiL, Poznań 1997.

Cushnie T.P.T., Lamb A.J., *Antimicrobial activity of flavonoids*, "J. Antimicrob. Agents" 2005, Nr 26.

Dastidar S.G., Mahapatra S.K., Ganguly K., Chakrabarty A.N., Shirataki Y., *Antimicrobial activity of prenylflavonones*. "In Vivo" 2001, nr 15.

Dykes L., Rooney L.W., *Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits*, "Cereal Foods World" 2007, nr 52.

Gangopadhyay N., Rai D.K., Brunton N.P., Gallagher E., Hossain M.B., *Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*hordeum vulgare*) grain*, "Food Chemistry" 2016, nr 210.

Gumul D., Korus J., Achremowicz B., *The effect of processing on antioxidant activity of plant origin materials*, "ŻNTJ" 2005, nr 4.

Gupta V.K., Sharma S.K., *Plants as natural antioxidants*, "Natural Prod. Radiance" 2006, nr 5.

Kumar B., Prasher S., Tiwari P., *A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids*, "Internat. Pharm. Sci," 2011, nr 1.

McMurrough I., Loughrey M.J., Hennigan G.P., *Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain*, "J. Sci. Food Agric." 1983, nr 34.

Miller E., Malinowska K., Gałęcka E., Mrowicka M., Kedziora J., *Rola flawonoidów jako przeciwutleniaczy w organizmie człowieka*, „Pol. Merk. Lek.” 2008, nr 144.

Packer L., Cadenas E., Davies K.L., *Free radicals and exercise: an introduction*, "Free Radic. Biol. Med." 2008, nr 44.

Peterson D.M., *Oat antioxidants*, "J. Cereal Sci." 2001, nr 33.

Przybylska A., *Profil związków biologicznie czynnych w różnych genotypach ziarna zbóż uprawianych w Polsce*, „Wydawnictwo ABADA” 2018.

Przybylska-Balcerek A., Góral T., Kurasiak-Popowska D., Stuper-Szablewska K., *Phenolic acids in various genotypes of cereals grown in Poland in the years 2017- 2018*, "Academia Journal of Medicinal Plants" 2019, nr 7/4.

Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., *Optymalizacja warunków oznaczania stężenia trichotecenów grupy A i B w ziarnie pszenicy*, „Wydawnictwo Młodzi Naukowcy” 2019.

Saleem M., Nazir M., Ali M.S., Hussain H., Lee Y.S., Riaz N., Jabbar A., *Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates*, "Nat Prod Rep" 2010, nr 27.

Shen Y., Jin L., Xiao P., Lu Y., Bao J., *Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight*, "Journal of Cereal Science" 2009, nr 49.

Sher A., *Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants*, "Goma.I.J. Med. Sci." 2009, nr 7/1.

Shirley B.W., *Flavonoids in seeds and grains: Physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis*, "Seed Sci. Res." 1998, nr 8.

Stolarzewicz I.A., Ciekot J., Fabiszewska A.U., Białecka-Florjańczyk E., *Plant and microbial sources of antioxidants*, "Advances in Hygiene and Experimental Medicine" 2013, nr 67.

Tamagawa K., Iizuka S., Ikeda A., Koike H., *Antioxidative activity of proanthocyanidins isolated from barley bran*. "J. Jap. Society Food Sci. Technol." 1999, nr 46.

Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Grzeszczak I., Bełter J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H., *Resistance of breeding lines of winter triticale to fusarium sprouts*, "Biul. IHAR: 2014" 2014, nr 271.

Wiśniewska H., Stępień Ł., Waśkiewicz A., Beszterda M., Góral T., Belter J., *Toxigenic Fusarium species infecting wheat heads in Poland*, "Cent. Eur. J. Biol." 2014, nr 9.

Ochrona zasobów torfowisk poprzez stosowanie alternatywnych podłoży w ogrodnictwie

Wstęp

Powierzchnia torfowisk na świecie oceniana jest na około 350 mln ha. W Polsce zajmują one powierzchnię około 1,2 mln ha, czyli 4% całkowitej powierzchni kraju¹. Polska zajmuje zatem 12 miejsce wśród najbardziej zasobnych krajów świata pod względem tego surowca², natomiast na tle państw Europejskich jest ona najzasobniejszym krajem.

Torf jest bazowym elementem niemal każdego podłoża używanego do uprawy roślin. Jednorazowo podczas pozyskiwania tego surowca do celów produkcji podłoża zbierana jest 2-3 cm warstwa torfu (metodą frezową). Natomiast czas przyrostu warstwy torfu to ok. 1mm rocznie. W związku z tym torf wysoki może być nazywany surowcem trudno odnawialnym.

W celu minimalizacji zużycia zasobów torfu poszukiwane są alternatywne rozwiązania zmniejszające jego nadmierną eksploatację. Dobre podłoże ogrodnicze lub dodatek do podłoża powinno charakteryzować się między innymi stabilnością takich parametrów jak pH, EC oraz posiadać zdolność do zatrzymania wody. Dzięki takim właściwościom podłoża roślina nie jest narażona na skutki związane z okresowym reżimem wodnym czy niedoborem składników odżywczych w trakcie wzrostu.

Włókno drzewne będące dodatkiem do podłoża zapewnia optymalne warunki do wzrostu i rozwoju roślin. Jego dużą zaletą jest bowiem wysoka zdolność do zatrzymania wody oraz zapewnienie stabilności pH oraz EC podłoża przez cały okres uprawy.

¹ Kiryluk A., 2013, Rola torfowisk w ochronie zasobów przyrodniczych i wodnych na obszarze powiatu białostockiego w województwie podlaskim, *Ekonomia i środowisko*, 4(47):38-50

² Pęczuła W., Stan i znaczenie torfowisk w Polsce, *Roczniki Filozoficzne / Annales De Philosophie / Annals of Philosophy*, 1996, 44(3): 177-191

1. Alternatywne podłoża w ogrodnictwie

Podłoże ogrodnicze stosowane w uprawie roślin powinno charakteryzować się optymalnymi dla wzrostu właściwościami fizycznymi, dobrą pojemnością wodną, ciepłą, wysoką buforowością oraz trwałą strukturą. Bardzo ważną determinantą wyboru podłoża jest jego atrakcyjna cena, dostępność oraz możliwość utylizacji po zakończeniu uprawy^{3,4,5}.

Na rynku dostępnych jest wiele gotowych mieszanek podłoży dostosowanych pod względem wymagań (pH, pojemność wodna, frakcja granulometryczna) do konkretnych grup roślin (podłoże do pelargonii, podłoże do hortensji, podłoże do roślin kwitnących itd.)⁶. Jednakże podstawowym komponentem niemal każdego substratu stosowanego do upraw roślin w pojemnikach jest torf wysoki. Ponadto szeroko stosowanymi alternatywnymi podłożami w uprawie roślin ozdobnych jest włókno koksowe, węgiel brunatny oraz podłoże z dodatkiem włókna drzewnego.

Włókno drzewne w ogrodnictwie ozdobnym może być stosowane jako dodatek do substratu torfowego. Włókna drzewne są wynikiem obróbki mechanicznej drewna z drzew iglastych. Charakteryzują się niską zawartością takich pierwiastków jak N, P, Mg, Na, Fe, Zn, B i Cu. Dużą zaletą jest jednak wysoka pojemność wodna wynosząca nawet do 620% wagowych⁷. Ponadto dodatek włókna drzewnego do podłoża przyczynia się do zwiększenia przestrzeni powietrznych nawet do 65% całkowitej objętości podłoża oraz usprawnia drenaż. Dużą zaletą włókien drzewnych jest ich pełna biodegradowalność lub możliwość ponownego wykorzystania. Obecnie brak jest badań dotyczących wpływu tych włókien na dynamikę wzrostu i kwitnienie roślin rabatowych.

³ Anicua-Sanchez R., Gutiérrez-Castorena M.C., Sanche Garcia S, Physical and micromorphological properties of organic and inorganic materials for preparing growing media, *Acta Horticulturae*, 2008, 779: 577-582

⁴ Blok C., Wever G. Experience with selected physical methods to characterize the suitability of growing media for plant growth, *Acta Horticulturae*, 2008, 779: 239-250

⁵ Nowak J., Nowe technologie w ogrodnictwie ozdobnym, 12: 46-81 [w:] Sitarek M., Nowak J., Wysocka-Owczarek M, Nowe technologie w ogrodnictwie, Wyższa Szkoła Ekonomiczno-Humanistyczna im. prof. Szczepana A. Pięniężka w Skierniewicach, 2011.

⁶ Op. cit.

⁷ Łata B., Stankiewicz-Kosyl M., Wińska-Krysiak M., Przewodnik do ćwiczeń z uprawy roli i nawożenia roślin ogrodniczych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 2007, s. 9-15

1.1. Wpływ rodzaju podłoża na dynamikę wzrostu

Podłoża stosowane w produkcji roślin, powinny charakteryzować się odpowiednimi właściwościami fizycznymi, chemicznymi oraz biologicznymi, ukierunkowanymi na potrzeby konkretnych rośliny. Najczęściej wykorzystywanym podłożem jest substrat torfowy, którego główną składową stanowi torf wysoki. Ze względu na swoje właściwości fizyko-chemiczne torf nadal jest uważany za najlepsze podłoże lub jego bazę. Zmniejszające się pokłady tego surowca powodują, iż poszukiwane są alternatywne rozwiązania, które zapewnią wysoką, jakość roślin przez cały okres ich uprawy.

Wpływ podłoża na dynamikę wzrostu roślin omawiany był w wielu publikacjach. Duży potencjał, jako alternatywnego podłoża został zauważony w przypadku włókien kokosowych. Podłoże na bazie tego surowca, sprawdza się bowiem bardzo dobrze w uprawie roślin warzywnych (pomidor) jak i ozdobnych (gerbera). Największą zaletą włókna kokosowego są dobre właściwości powietrzno-wodne oraz bardzo trwała struktura.

Wyniki badań dotyczących wpływu podłoża z dodatkiem włókna kokosowego, na jakość roślin przedstawili w swoich badaniach Szczepaniak i in. (2007). Obiektem badań była żurawka amerykańska '*Palace purple*' rosnąca w dużych donicach⁸. Autorzy doświadczenia zaobserwowali między innymi pozytywny wpływ podłoża na wysokość roślin. Rośliny uprawiane w podłożu torfowo-kokosowym były wyższe od tych rosnących w mieszance torfu wysokiego z glebą mineralną oraz tych z substratu torfowego.

Czuchaj i in. (2006) otrzymali podobne wyniki wskazujące na pozytywny wpływ podłoża torfowo-kokosowego^{8,9}. Rośliną badaną była również żurawka amerykańska. Badane rośliny charakteryzowały się między innymi większą liczbą liści oraz pędów w porównaniu do roślin uprawianych w substracie torfowym.

Dużym potencjałem w uprawie roślin ozdobnych odznaczają się również łuski kokosowe w podłożu. Przedmiotem badań Lisa-Krzycińskiego (1996) była pelargonja

⁸ Szczepaniak S., Czuchaj S., Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz dawki nawozu Hydrocote Typ 40 na wzrost młodych roślin Żurawki amerykańskiej (*Heuchera americana* L.), Rocznik Akademii Rolniczej w Poznaniu, 2007, 41: 207-212

⁹ Czuchaj S., Szczepaniak S., Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz dawki nawozu Hydrocote Typ 40 na wzrost młodych roślin żurawki krwistej [*Heuchera sanguinea* Engelm.], Zeszytu Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2006, 510(1): 113-118

rabatowa (*Pelargonium hortorum*) odmiany 'Susan Improved'¹⁰. Podłoże przygotowane z tego typu komponentem stwarza dobre warunki dla wzrostu i rozwoju roślin. Badania Dobrowolskiej (2010) potwierdziły pozytywny wpływ łuski kokosowej na jakość aksamitki rozpierzchłej (*Tagetes erecta*) oraz niecierpka Waleriana (*Impatiens walleriana*)¹¹. Zastosowanie łuski kokosowej spowodowało skrócenie okresu produkcji rozsady, znaczną rozbudowę systemu korzeniowego oraz znaczne przyspieszenie kwitnienia.

2. Materiał i metodyka

Materiałem badawczym była petunia ogrodowa (*Petunia x atkinsiana*) z grupy petunii kaskadowych 'PEGASUS®' w odmianie 'Dark Red'. Materiał roślinny wykorzystany w doświadczeniach został udostępniony przez firmę Volmary Polska.

Podłoże wykorzystane do doświadczeń (substrat torfowy o pH 5,5 z dodatkiem włókna drzewnego z drzew iglastych ECOFIBREX®) zostało wyprodukowane przez firmę Lasland sp. z o.o.. Przeanalizowano wpływ 10, 20 i 30 % dodatku włókna drzewnego do substratu torfowego na wzrost petunii ogrodowej 'Dark Red' (Fot.1). Przydatność podłoża z dodatkiem włókna drzewnego oceniana była zarówno na podstawie badań podłoża (zawartość wody higroskopowej) w trakcie uprawy, ocenie biometrycznej roślin, jak i stanu odżywienia roślin (analizy biochemiczne materiału roślinnego). Rośliny kontrolne podczas trwania całego doświadczenia rosły w standardowym substracie torfowym. Doświadczenie prowadzono od 14 marca 2018 roku przez ok. 4 miesiące. Doświadczenie było prowadzone w szklarni doświadczalnej należącej do Katedry Roślin Ozdobnych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

¹⁰ Lis-Krzyściń A., Zastosowanie łuski kakaowej w uprawie pelargonii rabatowej odmiany 'Susan Improved', Zeszytu Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 1996, 429: 203-207

¹¹ Dobrowolska A., Influence of the medium with addition of cocoa husk on the production of seedlings of selected species and cultivars of bedding plant, Ecological Chemistry and Engineering, 2010, 17(9):1089-1094



Fot.1. Petunia x atkinsiana 'Dark Red'. Zdjęcie własne

Pomiary biometryczne

Pomiary biometryczne (wysokość roślin, liczba liści, liczba kwiatów, średnica kwiatów, powierzchnia liści, pomiar pH, EC) zostały przeprowadzone trzykrotnie. Kombinacja w doświadczeniu obejmowała 15 roślin, natomiast do pomiarów służyło 10 losowo wybranych roślin spośród każdej kombinacji.

W ramach pomiarów biometrycznych kontrolowane było również pH oraz EC podłoża w każdej kombinacji (po 10 roślin). Odczyn podłoża oraz przewodność konduktometryczna podłoża (EC) sprawdzana była w odstępach siedmiodniowych począwszy od 21 marca (tydzień po rozpoczęciu doświadczenia) do momentu zakończenia trwania doświadczenia (3 lipca). Do pomiarów pH posłużono się przenośnym pH-metrem firmy HANNA Instruments (HI 99121), natomiast do badania EC użyto miernika EC firmy Hanna Instruments Gro Line HI 98331. Powierzchnia liści została zmierzona z użyciem skanera powierzchni liści Area Meter AM100 (ADC Bioscientific LTD).

Analizy biochemiczne

Próbki materiału roślinnego zostały pobrane dwukrotnie - 11 maja oraz 15 czerwca. Materiał roślinny stanowiły losowo pobrane liście z 10 roślin z każdej kombinacji. Blaszki liściowe zostały pokrojone w 0,5g naważki. Materiał roślinny

przechowywano w zamrażarce głębokiego mrożenia w - 85°C do czasu poszczególnych analiz.

Oznaczenie absolutnie suchej masy podłoża oraz materiału roślinnego zostało wykonane dla wszystkich odmian oraz kombinacji metodą suszarkowo-wagową wg. Szabadosa i in. (1982). Analizy absolutnie suchej masy podłoża posłużyły do obliczeń zawartości wody higroskopowej, natomiast sucha masa materiału roślinnego do analiz biochemicznych.

Analiza zawartości cukrów ogólnych została przeprowadzona przy pomocy metody Dubois i in. (1956). Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm wobec krzywej wzorcowej dla glukozy (spektrofotometr Shimadzu UV 1280).

Cukry redukujące zostały oznaczone metodą Nelsona (1944). Absorbancja mierzona była przy długości fali 520 nm wobec krzywej wzorcowej dla glukozy.

Zawartość skrobi oznaczono metodą antronową (Samotous i in. 1988). Zawartość skrobi w ekstraktach obliczono przy użyciu standardu zawierającego 2 mg glukozy w 100 ml ekstraktu. Wyniki podano w ekwiwalentach glukozy (mg/ g s.m.) powstałej po hydrolizie skrobi.

Zawartość chlorofilu oznaczono metodą Arnona i in. (1956) w modyfikacji Lichtenthalera i Wellburna (1983). Absorbancja była mierzona przy długości dwóch fal- 646, 652 nm. Kontrolę stanowił 80% aceton.

Wszystkie otrzymane wyniki opracowano przy pomocy programu statystycznego Statgraphics XVII 2017. Została wykonana dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA 2) – a średnie porównano przy pomocy testu Tukeya.

3. Wyniki

Pomiary biometryczne

Pomiary wysokości roślin (długość pędów)

Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ terminu pomiaru na wysokość roślin petunii ogrodowej (*Petunia x atkinsiana*) 'Dark Red' (Tab.1). Wraz z upływem doświadczenia średnia długość pędów wydłużała się od 17,66 cm w terminie 1 pomiarów do 27,25cm w ostatnim terminie pomiarów. W przypadku wpływu zawartości włókien drzewnych w podłożu na średnią długość pędów nie odnotowano istotnych różnic między kombinacjami.

Tab. 1. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na długość pędów petunii 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia długość pędów (cm)	*Termin pomiaru	Średnia długość pędów (cm)
0	21,34 a	1	17,66 a
10	20,87 a	2	21,93 b
20	22,57 a	3	27,25 c
30	24,33 a		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Liczba liści

W przypadku wpływu badanych czynników na liczbę liści, analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zawartości włókien drzewnych na ich liczbę (Tab.2). Rośliny kontrolne oraz rosnące w podłożu z 10 % dodatkiem włókna drzewnego posiadały największą liczbę liści. W przypadku wpływu terminu na liczbę liści odnotowano, że najwięcej liści miały rośliny w 1 terminie pomiarów (57,15), natomiast najmniej w 3 terminie (47,05).

Tab. 2. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na liczbę liści petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

*Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia liczba liści	Termin pomiaru	Średnia liczba liści
0	60,11 b	1	57,15 b
10	60,11 b	2	56,25 b
20	39,99 a	3	47,05 a
30	47,83 a		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Powierzchnia liści

Wykonana analiza statystyczna wykazała istotny wpływ terminu pomiarów na średnią powierzchnię liści (Tab.3). Statystycznie największą powierzchnią liści

charakteryzowały się rośliny w terminie 1 pomiarów. Ponadto nie wykazano istotnego wpływu dodatku włókna drzewnego w podłożu na średnią powierzchnię liści.

Tab. 3. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na powierzchnię liści petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia powierzchnia liści (mm ²)	*Termin pomiaru	Średnia powierzchnia liści (mm ²)
0	6537,2 a	1	6870,7 b
10	6198,07 a	2	6280,0 a
20	6529,47 a	3	6361,05 ab
30	6750,93 a		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Liczba kwiatów

Statycznie istotny wpływ na średnią liczbę kwiatów odnotowano w przypadku wpływu terminu (Tab. 4). Największą liczbę kwiatów odnotowano w 3 terminie pomiarów (12,8), natomiast najmniejszą liczbę w 1 terminie (4,85). Co więcej rośliny rosnące w podłożu z dodatkiem włókna drzewnego (10, 20 i 30%), charakteryzowały się większą liczbą kwiatów niż rośliny kontrolne.

Tab. 4. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na liczbę kwiatów petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia liczba kwiatów	*Termin pomiaru	Średnia liczba kwiatów
0	7,03 a	1	4,85 a
10	10,92 b	2	10,43 b
20	9,21 b	3	12,8 c
30	10,27 b		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Średnica kwiatów

Zgodnie z analizą statystyczną istotny wpływ na średnicę kwiatów miał termin pomiarów (Tab. 5). W 2 terminie pomiarów rośliny charakteryzowały się największą średnicą kwiatów (3,41 cm). Ponadto rośliny rosnące w podłożu z dodatkiem włókien drzewnych (10, 20 i 30%) charakteryzowały się niemal dwukrotnie większą średnicą (odpowiednio - 3,13cm; 3,1cm; 3,1cm) niż rośliny kontrolne (1,98 cm).

Tab. 5. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na średnicę kwiatów petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnica kwiatów (cm)	*Termin pomiaru	Średnica kwiatów (cm)
0	1,98 a	1	2,30 a
10	3,13 b	2	3,41 b
20	3,10 b	3	2,78 ab
30	3,10 b		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Analizy biochemiczne

Zawartość cukrów ogólnych

Poddane analizie statystycznej wyniki wykazały istotny wpływ terminu na średnią zawartość cukrów ogólnych (Tab.6). Większą zawartością cukrów ogólnych charakteryzowały się rośliny w 2 terminie pomiarów (123,55 mg glukozy \cdot g⁻¹s.m.) . Ponadto rośliny rosnące w podłożu z 30% dodatkiem włókien drzewnych charakteryzowały się zdecydowanie najwyższą zawartością cukrów ogólnych (147,79 mg glukozy \cdot g⁻¹s.m.).

Tab. 6. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość cukrów ogólnych w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość cukrów ogólnych (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość cukrów ogólnych (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)
0	77,15 a	1	86,19 a
10	95,57 a	2	123,55 b
20	98,97 a		
30	147,79 b		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Zawartość cukrów redukujących

Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ terminu na średnią zawartość cukrów redukujących (Tab.7). W 1 terminie pomiarów odnotowano wyższą zawartość cukrów redukujących (34,89 mg glukozy · g⁻¹s.m.). Rośliny rosnące w podłożu z dodatkiem włókien drzewnych (10, 20 i 30%) charakteryzowały się statystycznie większą zawartością cukrów redukujących w odniesieniu do kontroli.

Tab. 7. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość cukrów redukujących w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość cukrów redukujących (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość cukrów redukujących (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)
0	14,73 a	1	34,89 b
10	22,56 b	2	8,31 a
20	24,18 b		
30	24,95 b		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Zawartość skrobi

Wykonana analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zawartości włókien drzewnych w podłożu na średnią zawartość skrobi (Tab. 8). Najwyższą zawartością skrobi w materiale roślinnym charakteryzowały się rośliny rosnące w podłożu z 30% dodatkiem włókna (259,81 mg glukozy · g⁻¹s.m.) . Ponadto rośliny mierzone w drugim terminie charakteryzowały się zdecydowanie wyższą zawartością skrobi.

Tab. 8. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość skrobi w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

*Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość skrobi (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)	Termin pomiaru	Średnia zawartość skrobi (mg glukozy · g ⁻¹ s.m.)
0	198,35 b	1	174,2 a
10	141,45 a	2	217,79 b
20	184,37 b		
30	259,81 c		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Zawartość chlorofilu a, b oraz a+b

Istotnie statystyczny wpływ na zawartość chlorofilu a miał termin pomiarów (Tab. 9). W 1 terminie pomiarów odnotowano dwa razy więcej chlorofilu a niż u roślin w 2 terminie. W przypadku wpływu zawartości włókien drzewnych na średnią zawartość chlorofilu a nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między testowanymi kombinacjami.

Tab. 9. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość chlorofilu a w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość chlorofilu a (mg · g ⁻¹ s.m.)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość chlorofilu a (mg · g ⁻¹ s.m.)
0	8,7835 a	1	11,8968 b
10	8,07 a	2	5,7 a
20	8,505 a		
30	9,835 a		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Analiza statystyczna wykazała silniejszy wpływ terminu pomiarów na średnią zawartość chlorofilu a w badanych roślinach (Tab. 10). Rośliny w 1 terminie pomiarów charakteryzowały się znacząco wyższą zawartością chlorofilu b (3,03 mg · g⁻¹s.m.) od roślin w terminie 2. Nie zaobserwowano różnic w pomiarach między kombinacjami z dodatkiem włókien drzewnych.

Tab. 10. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość chlorofilu b w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość chlorofilu b (mg · g ⁻¹ s.m.)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość chlorofilu b (mg · g ⁻¹ s.m.)
0	2,39 a	1	3,03 b
10	2,38 a	2	1,89 a
20	2,4 a		
30	2,675 a		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ terminu pomiarów na średnią zawartość chlorofilu ab (Tab. 11). W 1 terminie pomiarów odnotowano wyższą zawartość chlorofilu ab w liściach (11,42 mg • g⁻¹s.m.) niż u roślin w 2 terminie. Rośliny w podłożu z 20% dodatkiem włókna drzewnego posiadały niższą zawartość chlorofilu ab w odniesieniu do pozostałych kombinacji (10,20 mg • g⁻¹s.m.).

Tab. 11. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość chlorofilu a+b w liściach petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość chlorofilu ab (mg • g ⁻¹ s.m.)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość chlorofilu ab (mg • g ⁻¹ s.m.)
0	10,55 ab	1	11,42 b
10	10,81 b	2	9,6025 a
20	10,20 a		
30	10,49 ab		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

Zawartość wody higroskopowej w podłożu

Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ terminu pomiaru na średnią zawartość wody higroskopowej w podłożu (%) (Tab. 12). W 2 terminie pomiarów odnotowano wyższą zawartość wody higroskopowej (89%). Rośliny rosnące w podłożu z 30% dodatkiem włókna drzewnego miały największą dostępność wody w podłożu (65%).

Tab. 12. Wpływ terminu pomiaru i zawartości włókien drzewnych w podłożu na zawartość wody higroskopowej w podłożu petunii ogrodowej 'Dark Red' (efekty główne).

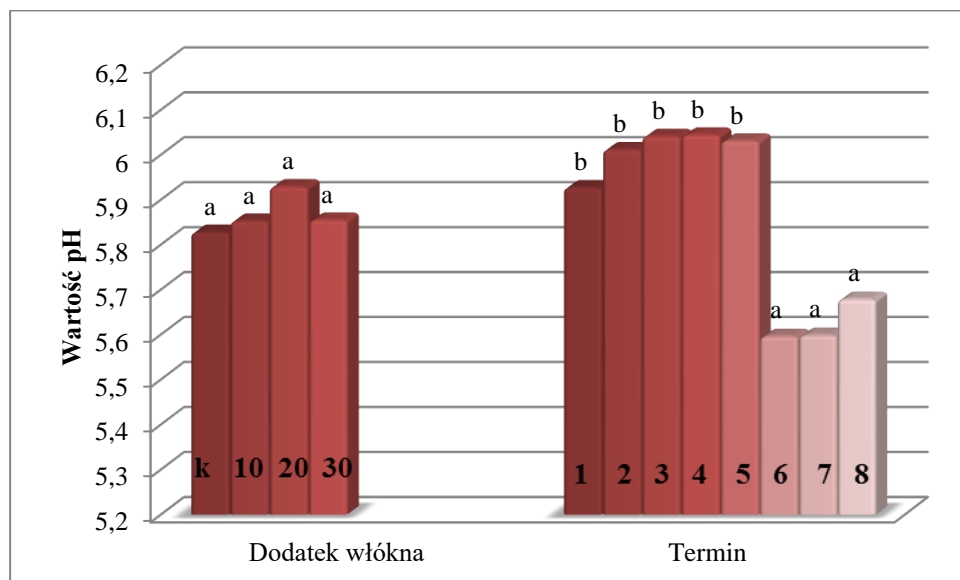
Zawartość włókien drzewnych (%)	Średnia zawartość wody higroskopowej(%)	*Termin pomiaru	Średnia zawartość wody higroskopowej (%)
0	58 b	1	61 a
10	42 a	2	89 b
20	56 b		
30	65 c		

*- silniejszy wpływ badanego czynnika na podstawie F-ratio,

× średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

pH podłoża

Analiza statystyczna wykazała, iż dodatek włókna drzewnego nie wpłynął istotnie na pH podłoża (Wyk. 1). Podłoże, w którym rosły rośliny, w terminie od 1 do 5, charakteryzowały się wyższym pH w porównaniu do pozostałych terminów pomiarów.



Dodatek włókna

k-kontrola

10- 10 % dodatek włókna drzewnego

Termin

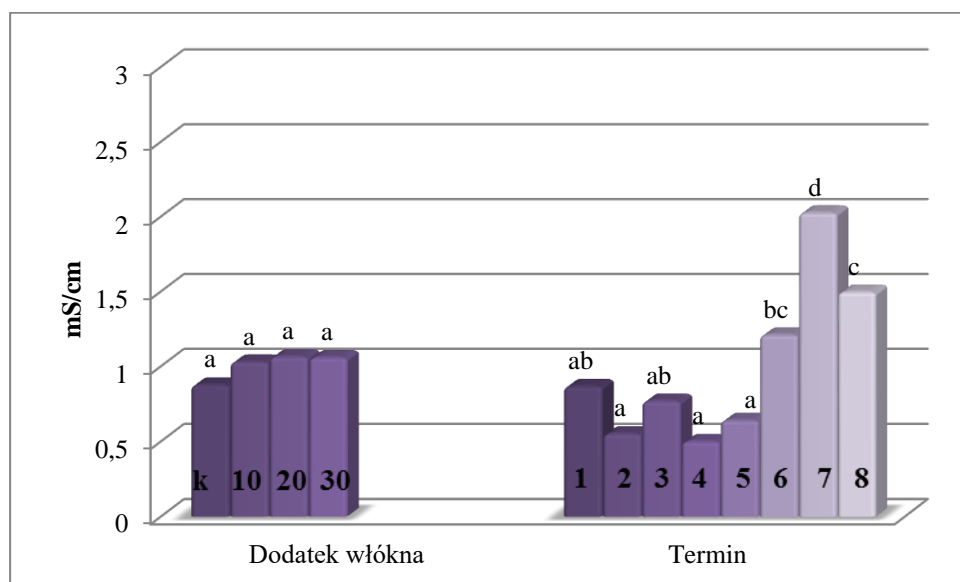
1- termin 1 pomiarów (21 marca 2018r.)

2- termin 2 pomiarów (28 marca

20- 20 % dodatek włókna drzewnego	2018r.)
30- 30 % dodatek włókna drzewnego	3- termin 3 pomiarów (4 kwietnia 2018r.)
	4- termin 4 pomiarów (18 kwietnia 2018r.)
	5- termin 5 pomiarów (25 kwietnia 2018r.)
	6- termin 6 pomiarów (8 maja 2018r.)
	7- termin 7 pomiarów (29 maja 2018r.)
	8- termin 8 pomiarów (29 czerwca 2018r.)

Wyk. 1. pH podłoża petunii ogrodowej 'Dark Red' EC podłoża

Dodatek włókna drzewnego nie wpłynął na EC podłoża (Wyk.2). Najwyższe EC podłoża zostało odnotowane w 7 terminie pomiarów (2,01 mS/cm), jednakże wciąż było ono w granicach normy. Najniższe EC podłoża odnotowano w 2, 4 oraz 5 terminie pomiarów. Nie odnotowano istotnych różnic wpływu dodatku włókna drzewnego na EC podłoża.



Dodatek włókna

k-kontrola
 10- 10 % dodatek włókna drzewnego
 20- 20 % dodatek włókna drzewnego

Termin

1- termin 1 pomiarów (21 marca 2018r.)
 2- termin 2 pomiarów (28 marca 2018r.)

30- 30 % dodatek włókna drzewnego	3- termin 3 pomiarów (4 kwietnia 2018r.)
	4- termin 4 pomiarów (18 kwietnia 2018r.)
	5- termin 5 pomiarów (25 kwietnia 2018r.)
	6- termin 6 pomiarów (8 maja 2018r.)
	7- termin 7 pomiarów (29 maja 2018r.)
	8- termin 8 pomiarów (29 czerwca 2018r.)

Wyk. 2. EC podłoża petunii ogrodowej 'Dark Red'

4. Dyskusja

Bezpośredni wpływ na parametry biometryczne oraz biochemiczne roślin ma rodzaj zastosowanego podłoża. Dlatego bardzo istotnym krokiem przed rozpoczęciem uprawy jest dobór takiego podłoża, które będzie stwarzało idealne warunki do wzrostu i rozwoju rośliny podczas całego cyklu uprawy. Bezpośredni wpływ podłoża lub dodatków na obfitość kwitnienia roślin, wysokość, liczbę liści, czy zawartość względną chlorofilów liściach były przedmiotem wielu badań^{12,13,14,15,16,17,18,19,20}. Jednakże brak jest literatury badającej wpływ dodatku

¹² Chmiel H., Wręga M., Porównanie uprawy gerbery [*Gerbera jamesonii* H.Bolus ex Hook.] w substracie torfowym i w wełnie mineralnej, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 1996, 429: 69-76.

¹³ Gworek B., Sucharda-Kozera B., Zeolity – geneza, budowa i podstawowe właściwości fizyczne, Ochrona środowiska i zasobów naturalnych, 1999, 17: 157–169.

¹⁴ Nowak J., Wpływ zeolitu jako dodatku do torfu na wzrost i jakość doniczkowych roślin, Ozdobnych, Zeszyt Naukowy Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice, 2000, 7: 277–284.

¹⁵ Poulton J. L., Bryla D., Koide R. T., Stephenson A. G., Mycorrhizal infection and high soil phosphorus improve vegetative growth and the female and male functions in tomato, New Phytologist, 2002, 154(1), 255-264.

¹⁶ Krzywy E., Iżewska A., Wołoszyk Cz., Ocena składu chemicznego i wartości nawozowej osadu ściekowego oraz kompostów wyprodukowanych z komunalnego osadu ściekowego, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2004, 499: 165-171 .

¹⁷ Gaur A., Adholeya A., Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular-mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter, Journal of Plant Nutrition, 2005, 28: 707–723.

¹⁸ Hetman J., Witek M., The effects of different substrates on flowering of kohleria (*Kohleria amabilis* Hook.), Acta agrobotanica, 2006, 59(1): 405-412.

¹⁹ Szczepaniak S., Czuchaj S., Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz dawki nawozu Hydrocote Typ 40 na wzrost młodych roślin Żurawki amerykańskiej (*Heuchera americana* L.), Rocznik Akademii Rolniczej w Poznaniu, 2007, 41: 207-212.

włókien drzewnych do podłoża na dynamikę wzrostu roślin oraz ogólny stan odżywienia rośliny (badania biochemiczne materiału roślinnego). Głównym przedmiotem badań w większości przypadków testowanych dodatków jest samo podłoże a nie materiał roślinny. Wiedza dotycząca wpływu podłoża na zawartość cukrów ogólnych, redukujących, wolnych aminokwasów czy białek rozpuszczalnych w samej roślinie jest niezwykle istotna, ponieważ świadczy o ogólnej kondycji rośliny oraz ma przełożenie na wygląd rośliny, co ma niezwykle istotny wpływ na dekoracyjność roślin rabatowych. W związku z brakiem dostępnej literatury dyskusja została ukierunkowana na wpływ różnych dodatków do podłoża i ich wpływu na poszczególne parametry biochemiczne oraz biometryczne roślin. Niniejsza praca miała na celu określenie wpływu dodatku włókien drzewnych w podłożu na wzrost roślin, parametry biochemiczne oraz sprawdzenie ich wpływu na anatomię rośliny (pęd oraz blaszka liściowa).

O dekoracyjności roślin rabatowych w głównej mierze decyduje obfitość kwitnienia, wielkość roślin (długość pędów) oraz pokrój. U petunii ogrodowej na dekoracyjność składają się takie elementy jak długość pędów, liczba kwiatów oraz liczba liści. Badane rośliny petunii ogrodowej „Dark red” rosnącej w podłożu z dodatkiem włókien drzewnych (10, 20 i 30%) charakteryzowały się pędami podobnej długości jak rośliny kontrolne. Inną zależność zaobserwowała Wróblewska i in. (2013) w doświadczeniu Szczepaniak i in. (2004) dotyczącego wpływu podłoża na wzrost nachełbka wielkokwiatowego ‘Early Sunrise’ również odnotowano wpływ rodzaju podłoża na wysokość roślin^{21,22}. Roślin rosnąc w podłożu składającego się z torfu wysokiego (kontrola) były wyższe niż te rosnące w glebie mineralnej zmieszanej z torfem wysokim (1:1).

W przeprowadzonych na potrzebę pracy badaniach, szczegółowa analiza pomiarów wykazała, iż dodatek włókien drzewnych do substratu torfowego, ma wpływ na liczbę liści. zaobserwowano z reguły mniejszą liczbę liści w roślinach rosnących w podłożu z dodatkiem włókien drzewnych (10, 20 i 30%) niż w roślinach

²⁰ Li Z.Q., Konga L.Y., Yanga L.F., Zhangc M., Caoc T., Xuc J., Wang Z.X., Lei Y., Effect of substrate grain size on the growth and morphology of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* L., Elsevier: Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters, 2012, 42(1): 81-85.

²¹ Wróblewska H., Schroeter-Zakrzewska A., Zakrzewski S., Zastosowanie kompostów z drzewnych odpadów użytkowych w uprawie pelargonii rabatowej (*Pelargonium zonale*) 'Andria', Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, 2013, 18(4):365-372

²² Szczepaniak S., Kozik E., Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz nawozów o spowolnionym działaniu na wzrost młodych roślin nachełbka wielkokwiatowego, Rocznik Akademia Rolnicza w Poznaniu, ogrodnictwo, 2004, 360, 38: 157-161

kontrolnych. Wpływ rodzaju podłoża na liczbę liści u pelargonii został przedstawiony w badaniach Ribeiro i in. (2000)²³. Rośliny rosnące w podłożu z 40% dodatkiem kompostu charakteryzowały się większą liczbą liści. Natomiast brak wpływu zastosowanego dodatku do podłoża (kompost) na liczbę liści pelargonii rabatowej (*Pelargonium x hortorum*) został odnotowany między innymi w badaniach Zawadzińskiej i in. (2007)²⁴.

Kluczową determinantą dekoracyjności roślin rabatowych jest długość i obfitość kwitnienia. W przeprowadzonym doświadczeniu udowodniono znaczący wpływ dodatku włókna drzewnego na liczbę oraz średnicę kwiatów. U petunii ogrodowej 'Dark Red' odnotowano pozytywny wpływ dodatku włókien na zwiększenie liczby kwiatów. W badaniach Wróblewskiej i in. (2013) na *Pelargonium zonale* 'Andria' odnotowano istotny wpływ 25% dodatku przekompostowanego drewna na obfitość kwitnienia²⁵. W innym doświadczeniu Wróblewskiej i in. (2014) przeprowadzonym na petunii ogrodowej (*Petunia x atkinsiana*) nie odnotowano istotnego wpływu testowanych dodatków kompostu z odpadów drzewnych na liczbę kwiatów²⁶. Jednakże w badaniach wykazano wpływ tych dodatków na średnicę kwiatu. Zdecydowanie większą średnicę kwiatów miały petunie rosnące w podłożu z dodatkiem drzewnych odpadów użytkowych. W badaniach przeprowadzonych na potrzebę niniejszej pracy również odnotowano oddziaływanie dodatku włókien drzewnych na średnicę kwiatów. W przypadku odmiany 'Dark Red' odnotowano statystycznie istotnie większą średnicę kwiatu niż u roślin kontrolnych. W przypadku pomiaru wielkość blaszek liściowych petunii ogrodowej nie zaobserwowano wpływu dodatku włókien drzewnych na ich wielkość.

Wyniki dotyczące analizy biochemicznej materiału roślinnego potwierdziły pozytywny wpływ dodatku włókien drzewnych na stan odżywiania roślin. Dodatek 10, 20 oraz 30% włókien drzewnych nie pogorszyły wyników analiz biochemicznych w

²³ Ribeiro H.M., Vasconcelos E., Dos Santos J. Q., Fertilisation of potted geranium with a municipal solid waste compost, *Bioresource Technology*, 2000, 73(3): 247-249

²⁴ Zawadzińska A., Klessa M., Wpływ podłoża z dodatkiem kompostów na wzrost i pokrój pelargonii rabatowej (*Pelargonium x hortorum* Bailey), *Rocznik Akademia Rolnicza w Poznaniu, ogrodnictwo*, 2007, 383., 41: 241-245

²⁵ Wróblewska H., Schroeter-Zakrzewska A., Zakrzewski S., Zastosowanie kompostów z drzewnych odpadów użytkowych w uprawie pelargonii rabatowej (*Pelargonium zonale*) 'Andria', *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 2013, 18(4):365-372

²⁶ Wróblewska H., Kozik E., Bernaczyk K., Wpływ zawartości makro- i mikrośladników w podłożach z udziałem kompostów otrzymanych z odpadów drzewnych na wzrost petunii ogrodowej (*Petunia x atkinsiana* D. Don.), *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 2014, 19: 191-198.

odniesieniu do kontroli a wręcz wpłynął korzystnie na większość badanych parametrów.

W podłożu z 30% dodatkiem włókien drzewnych u petunii ogrodowej 'Dark Red' odnotowano dwukrotnie wyższą zawartość cukrów ogólnych niż u roślin kontrolnych. Wynik ten najprawdopodobniej świadczył o dobrych warunkach do wzrostu i rozwoju roślin w podłożu, dzięki czemu fotosynteza mogła zachodzić intensywniej niż w przypadku pozostałych kombinacji. Zdecydowanie wyższy poziom cukrów ogólnych został zaobserwowany w 2 terminie pomiarów, gdy rośliny rosły w podłożu już 3 miesiące. Powiązanie między intensywnością zachodzenia fotosyntezy a zawartością węglowodanów w roślinie został opisany między innymi w publikacji Araya i in. (2006)²⁷. Im większa dostępność węglowodanów w roślinie tym efektywniej może zachodzić proces fotosyntezy. Jednakże jednym z determinantów efektywności przemian cukrów jest głównie temperatura²⁸.

Skrobia jest jednym z najważniejszych wielocukrów zapasowych²⁹. Remobilizacja skrobi obserwowana jest najczęściej podczas kiełkowania lub intensywnego wzrostu rośliny, gdy aparat fotosyntetyczny nie jest w stanie zaspokoić zapotrzebowania na energię. Zbyt mała ilość skrobi w roślinie powoduje obniżenie tempa wzrostu rośliny³⁰. W obecnym doświadczeniu petunia ogrodowa 'Dark Red' rosnąca w 30% dodatku włókna drzewnego charakteryzowała się najwyższą zawartością skrobi. Ponadto w terminie 2 odnotowano zdecydowanie wyższą zawartość tego wielocukru.

W przypadku zawartości chlorofilu w badanych roślinach nie zaobserwowano istotnego oddziaływania dodatku włókna drzewnego w podłożu na te parametry. W 1 terminie pomiarów liście badanych roślin charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością chlorofilu. Miało to bezpośredni związek z faktem, iż liście były zdecydowanie mniejsze niż w 2 terminie pomiarów.

Bardzo ważną cechą każdego podłoża jest jego zdolność do zatrzymania wody. W przypadku roślin rabatowych bardzo często narażone są one na trwałe jej deficyty co skutkuje obniżonym kwitnieniem, utrata liści oraz zaburzeniami

²⁷ Araya T., Noguchi K., Terashima, I., Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L., Plant and cell physiology, 2006, 47(5):644-652

²⁸ *op.cit*

²⁹ Pfister B., Zeeman, S.C., Formation of starch in plant cells. Cellular and molecular life sciences, Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14):2781–2807

³⁰ Stitt M., Zeeman S.C., Starch turnover: pathways, regulation and role in growth, Current opinion in plant biology, 2012, 15(3):282-292

biochemicznymi^{31,32,33}. Dodatek włókien drzewnych w podłożu (10, 20 oraz 30%) wpłynął korzystnie na zatrzymanie wody w przypadku petunii ogrodowej 'Dark Red'. Analizując zawartość wody w podłożu warto zwrócić uwagę na rośliny petunii ogrodowej 'Dark red', rosnących w podłożu z 30% dodatkiem włókna drzewnego, w I oraz II terminie pomiarów. Rośliny charakteryzowały się bowiem posiadaniem dużych przestworów komórkowych w liściach (dane niepublikowane) co może mieć negatywny skutek dla rośliny, ponieważ wiąże się to z szybszą utratą turgoru. Jednakże na podstawie przeprowadzonych analiz stanu odżywienia rośliny można było wywnioskować, iż rośliny rosnące w tym podłożu (30% dodatek włókna) miały największy dostęp wody (65%) oraz posiadały najwyższe niezbędne parametry świadczące o ich dobrej kondycji.

Dodatek włókna drzewnego (10, 20 oraz 30%) nie zmienił niekorzystnie pH podłoża u petunii ogrodowej 'Dark Red'. Optymalne pH polecane w uprawie petunii ogrodowej wynosi od 5,6 do 6,2³⁴. W przeprowadzonym doświadczeniu, pH podłoża u roślin z dodatkiem włókien drzewnych, utrzymywało się na poziomie od 5,69 do 5,93. W obrębie terminu od 1 do 5 u wszystkich badanych odmian, zaobserwowano znaczny wzrost pH podłoża (od 5,81 do 6,15) w odniesieniu do pozostałych terminów pomiarów. Prawdopodobnie okresowy wzrost był spowodowany wpływem wysokiej temperatury w obiekcie szklarniowym.

EC podłoża polecane do uprawy petunii ogrodowej w momencie kwitnienia nie powinno przekraczać 3,0 mS/cm³⁵. Przeprowadzone doświadczenie nie wykazało istotnego wpływu dodatku włókien drzewnych na wartości EC podłoża.

5. Wnioski

- Dodatek włókien drzewnych wpłynął pozytywnie na parametry biometryczne, biochemiczne badanych roślin.

³¹ Augé R.M., Stodola A.J., Moore J.L., Klingeman W.E., Duan X., Comparative dehydration tolerance of foliage of several ornamental crops, *Scientia horticulturae*, 2003, 98(4):511-516

³² Chyliński W.K., Łukaszewska A.J., Kutnik K., Drought response of two bedding plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007, 29(5):399

³³ Łukaszewska A., Porowska M., Chyliński K., Effect of drought and benzyldenine on scarlet salvia (*Salvia splendens* Sello) and geranium (*Pelargonium hortorum* L. H. Bail.), *Annals of Warsaw University of Life Sciences*, 2008, 29:45-52

³⁴ Smith B.R., Fisher S. R., Argo W. R., Nutrient Uptake in Container-grown *Impatiens* and *Petunia* in Response to root substrate pH and applied micronutrient concentration, *HortScience*, 2004, 39(6):1426-1431

³⁵ *Op.cit.*

- *Petunia x atkinsiana* 'Dark Red' rosnąca w podłożu z 30% dodatkiem włókien drzewnych, charakteryzowały się wyższą zawartością cukrów ogólnych, cukrów redukujących oraz skrobi.
- Dodatek włókien drzewnych wpłynął pozytywnie na zdolność zatrzymania wody w podłożu. Najwyższa zawartość wody higroskopowej została odnotowana w podłożu z 30% dodatkiem włókien drzewnych.
- Dodatek włókna drzewnego nie zmienił wartości pH oraz EC podłoża w trakcie trwania doświadczenia w stosunku do podłoża kontrolnego. Włókno drzewne w podłożu wpłynęło korzystnie na zwiększeni liczby kwiatów i ich średnicy u roślin rosnących w podłożu z dodatkiem włókien drzewnych.

Bibliografia:

Anicua-Sanchez R., Gutiérrez-Castorena M.C., Sanche Garcia P., 2008, Physical and micromorphological properties of organic and inorganic materials for preparing growing media, *Acta Horticulturae*, nr 779.

Araya T., Noguchi K., Terashima, I., 2006, Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L., *Plant and cell physiology*, nr 47(5).

Arnon D.J., Allen M.B., Whatley F., 1956, Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 20.

Augé R.M., Stodola A.J., Moore J.L., Klingeman W.E., Duan X., 2003, Comparative dehydration tolerance of foliage of several ornamental crops, *Scientia horticulturae*, nr 98(4).

Blok C., Wever G., 2008. Experience with selected physical methods to characterize the suitability of growing media for plant growth, *Acta Horticulturae*, nr 779.

Chmiel H., Wręga M., 1996, Porównanie uprawy gerbery [*Gerbera jamesonii* H.Bolus ex Hook.] w substracie torfowym i w wełnie mineralnej, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, nr 429.

Chyliński W.K., Łukaszewska A.J., Kutnik K., 2007, Drought response of two bedding plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, nr 29(5):399.

Czuchaj P., Szczepaniak S., Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz dawki nawozu Hydrocote Typ 40 na wzrost młodych roślin żurawki krwistej [*Heuchera sanguinea* Engelm.], *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2006, nr 510(1).

Dobrowolska A., 2010, Influence of the medium with addition of cocoa husk on the production of seedlings of selected species and cultivars of bedding plant, *Ecological Chemistry and Engineering*, nr 17(9).

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* nr 28.

Dyśko J, Kaniszewski S., 2016, Uprawa pomidora w matach z węgla brunatnego, Instytut ogrodnictwa w Skierniewicach

Gaur A., Adholeya A., 2005, Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular-mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter, *Journal of Plant Nutrition*, nr 28.

Gworek B., Sucharda-Kozera B., 1999, Zeolity – geneza, budowa i podstawowe właściwości fizyczne, *Ochrona środowiska i zasobów naturalnych*, nr 17.

Hetman J., Witek M., 2006, The effects of different substrates on flowering of kohleria (*Kohleria amabilis* Hook.), *Acta agrobotanica*, nr 59(1).

Khan A.G., Kuek C., Chaudhry, Khoo C.S., Hayes W.J., 2010, Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation, *Chemosphere*, nr 41.

Kiryłuk A., 2013, Rola torfowisk w ochronie zasobów przyrodniczych i wodnych na obszarze powiatu białostockiego w województwie podlaskim, *Ekonomia i środowisko*, nr 4(47).

Krzywy E., Iżewska A., Wołoszyk Cz., 2004, Ocena składu chemicznego i wartości nawozowej osadu ściekowego oraz kompostów wyprodukowanych z komunalnego osadu ściekowego, *Zeszytu Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, nr 499.

Li Z.Q., Konga L.Y., Yanga L.F., Zhangc M., Caoc T., Xuc J., Wanga Z.X., Lei Y., 2012, Effect of substrate grain size on the growth and morphology of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* L., *Elsevier: Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, nr 42(1).

Lis-Krzyściń A., 1996, Zastosowanie łuski kakaowej w uprawie pelargonii rabatowej odmiany 'Susan Improved', *Zeszytu Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, nr 429.

Łata B., Stankiewicz-Kosyl M., Wińska-Krysiak M., Przewodnik do ćwiczeń z uprawy roli i nawożenia roślin ogrodniczych, *Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*, 2007.

Nelson N., 1944, A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, nr 153.

Nowak J., 2000, Wpływ zeolitu jako dodatku do torfu na wzrost i jakość doniczkowych roślin, *Ozdobnych*, *Zeszyt Naukowy Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*, Skierniewice, nr 7.

Nowak J., Nowe technologie w ogrodnictwie ozdobnym, 12: 46-81 [w:] Sitarek M., Nowak J., Wysocka-Owczarek M., 2011, Nowe technologie w ogrodnictwie, Wyższa Szkoła Ekonomiczno-Humanistyczna im. prof. Szczepana A. Pieniążka w Skierniewicach

Pęczyła W., 1996, Stan i znaczenie torfowisk w Polsce, Roczniki Filozoficzne / Annales De Philosophie / Annals of Philosophy, nr 44(3).

Pfister B., Zeeman, S.C., 2016, Formation of starch in plant cells. Cellular and molecular life sciences, Cellular and Molecular Life Sciences, nr 73(14).

Poulton J. L., Bryła D., Koide R. T., Stephenson A. G., 2002, Mycorrhizal infection and high soil phosphorus improve vegetative growth and the female and male functions in tomato, New Phytologist, nr 154(1).

Ribeiro H.M., Vasconcelos E., Dos Santos J. Q., 2000, Fertilisation of potted geranium with a municipal solid waste compost, Bioresource Technology, nr 73(3).

Sage R.F., Kubien D. S., 2007, The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis, Plant, Cell & Environment, nr 30.

Smith B.R., Fisher P. R., Argo W. R., 2004, Nutrient Uptake in Container-grown *Impatiens* and *Petunia* in Response to root substrate pH and applied micronutrient concentration, HortScience nr 39(6).

Stitt M., Zeeman S.C., 2012, Starch turnover: pathways, regulation and role in growth, Current opinion in plant biology, nr 15(3).

Szabados L., Savoure A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, Trends in plant science, nr 15(2).

Szczepaniak S., Czuchaj P., 2007, Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz dawki nawozu Hydrocote Typ 40 na wzrost młodych roślin Żurawki amerykańskiej (*Heuchera americana* L.), Rocznik Akademii Rolniczej w Poznaniu, nr 41.

Szczepaniak S., Kozik E., 2004, Wpływ rodzaju i objętości podłoża oraz nawozów o spowolnionym działaniu na wzrost młodych roślin nachełbki wielkokwiatowego, Rocznik Akademia Rolnicza w Poznaniu, ogrodnictwo, nr. 360, 38.

Wróblewska H., Schroeter-Zakrzewska A., Zakrzewski P., 2013, Zastosowanie kompostów z drzewnych odpadów poużytkowych w uprawie pelargonii rabatowej (*Pelargonium zonale*) 'Andria', Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, nr 18(4).

Wróblewska H., Kozik E., Bernaczyk K., 2014, Wpływ zawartości makro- i mikroelementów w podłożach z udziałem kompostów otrzymanych z odpadów

drzewnych na wzrost petunii ogrodowej (*Petunia x atkinsiana* D. Don.), Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, nr 19.

Yahya Awang, Anieza Shazmi Shaharom, Rosli B. Mohamad, Ahmad Selamat, 2009, Chemical and Physical Characteristics of Cocopeat-Based Media Mixtures and Their Effects on the Growth and Development of *Celosia cristata*, American Journal of Agricultural and Biological Sciences nr 4 (1).

Zawadzińska A., Klessa M., 2007, Wpływ podłoży z dodatkiem kompostów na wzrost i pokrój pelargonii rabatowej (*Pelargonium x hortorum* Bailey), Rocznik Akademia Rolnicza w Poznaniu, ogrodnictwo, nr. 383., nr 41.

Wpływ rolnictwa na ornitofaunę

Wstęp

Kiedy rolnictwo zaczęło być praktykowane wiele tysięcy lat temu, polegało wyłącznie na pracy człowieka, przez co uprawiany obszar był niewielkich rozmiarów. Ze względu na brak migracji ludności, wykorzystywano lokalne odmiany roślin jadalnych. Wiele organizmów zaczęło przystosowywać się do bytowania na obszarach rolnych. Owady, małe ssaki oraz ornitofauna znalazły w nich bogate źródła łatwo dostępnego pokarmu, dzięki czemu mogły one zwiększać swoje populacje. Organizmy te z kolei przyciągały następne, drapieżniki, które polowały na zwierzęta, które zaczęły zamieszkiwać agrocenozy. Wiele grup ptaków zaczęło bytować w środowisku przekształconym przez człowieka i do dziś jest to dla nich miejsce do życia.

Obecnie gospodarstwa rolne zmieniają się, specjalizują oraz coraz powszechniej wykorzystują nowoczesne rozwiązania i urządzenia ze względu na rosnące zapotrzebowanie na wysokiej jakości produkty roślinne oraz wymagania klientów. Niestety takie unowocześnianie technik pracy na roli może wpływać niekorzystnie na organizmy, które tam funkcjonują. Zmiany te zachodzą bardzo dynamicznie, a zwierzęta nie mają odpowiednio dużo czasu na przystosowanie się do nowych realiów. Z tego powodu ich funkcjonowanie jest utrudnione, a w niektórych przypadkach populacje są zagrożone.

Ptaki są bardzo istotną częścią każdego środowiska, w którym występują. Stanowią one niezastąpiony element łańcucha pokarmowego, biorą udział w rozsiewaniu nasion, oczyszczają środowisko jedząc mięso martwych zwierząt, a przede wszystkim są bardzo ważnym wskaźnikiem kondycji ekosystemu.¹ Zważając na użyteczność ptaków w środowisku, warto zwrócić uwagę na to, by człowiek nie przyczyniał się do spadków w ich populacjach.

¹ Beata Duliusz: IX. Ptaki jako wskaźniki stanu środowiska

1. Rzędy ptaków występujących na terenach użytkowanych rolniczo oraz ich dwóch najczęściej spotykanych przedstawicieli na tych obszarach

1.1. Ptaki szponiaste (rząd Szponiaste, Accipitriformes)

Ptaki należące do tej grupy łączy podobny sposób zdobywania pożywienia, przez wzgląd na wykształcone przez nie przystosowania do drapieżnictwa. Ich wspólną cechą są ostre, zakrzywione szpony i haczykowato zagięty dziób, ułatwiające złapanie i przenoszenie zdobyczy. Są to ptaki o bardzo zróżnicowanej wielkości. Przedstawiciele tej grupy korzystają z terenów rolniczych w niejednakowy sposób.

Błotniak łąkowy (*Circus pygargus*, rodzina jastrzębiowate) to smukły i lekki ptak, który gnieździ się i zakłada lęgi na ziemi, szczególnie preferując uprawy ozimych zbóż oraz rzepaku. Pierwotnie bytował głównie na terenach podmokłych, obecnie jest to mniej spotykane. Gniazdo buduje z łodyg różnych roślin, pod zwykle bardzo dobrą osłoną roślinności. Obecnie w niektórych miejscach nawet 80% gniazd zakładanych jest w zbożu². Jego podstawowym pokarmem są drobne ssaki, zwłaszcza norniki. Znaczącym uzupełnieniem diety są drobne ptaki polne, duże owady oraz jaszczurki. Przez wzgląd na doskonały słuch, atakuje ofiary z niskiego lotu nad obserwowanymi obszarami pól i łąk, a drobne ptaki potrafi chwytać także w locie.

Do tej grupy zaliczają się także ptaki, które korzystają z terenów rolniczych, chociaż nie jest to ich miejsce zakładania lęgów. Myszołów zwyczajny (*Buteo buteo*, rodzina jastrzębiowate) jest średniej wielkości ptakiem, który zamieszkuje zróżnicowane środowiska, w tym nieużytki, łąki i pola z niewielkimi zadrzewieniami. Gniazdo zakłada jednak na skraju lasu, na drzewie lub w pobliżu pnia. W okresie lęgów oddala się od niego na kilka kilometrów by krążyć nad ziemią, często na odsłoniętych terenach łąk i niezaoranych pól uprawnych w celu zdobycia pożywienia. Podstawową zdobyczą są jak w przypadku błotniaka, norniki. Uzupełnieniem diety są podloty ptaków, gady oraz bezkręgowce.

² Tomiałojć L., Stawarczyk T.: Awifauna Polski. Rozmieszczenie, liczebność i zmiany. Wrocław: PTPP "pro Natura", 2003, s. 222–225.

1.2. Ptaki grzebiące (rząd Grzebiące, Galliformes)

Ptaki te, podobnie jak szponiaste, łączą wspólne cechy budowy i dostosowany do nich sposób na zdobywanie pożywienia. Charakteryzują je silne 4-palczaste nogi i mocny dziób, dzięki którym wyszukują pokarm w glebie. Są ptakami głównie średniej wielkości. Ich małe, lecz silnie umięśnione skrzydła ułatwiają im życie w zaroślach, ponieważ umożliwiają im szybki, pionowy start.

Kuropatwa zwyczajna (*Perdix perdix*, rodzina kurowate) to średniej wielkości, osiadły ptak naziemny z rodziny kurowatych, zamieszkujący otwarte tereny, w dużej mierze rolnicze. Gniazdo, które stanowi nieduże zagłębienie w ziemi, jest najczęściej dobrze ukryte na porośniętych wysoką roślinnością obszarach, w tym pasach roślinności między polami oraz w uprawach zbóż. Zimą, kuropatwy występują na uprawach ozimin zbóż i rzepaku. Podstawę ich pokarmu stanowią nasiona, zielone części roślin i bezkręgowce. Ptaki te unikają sąsiedztwa wysokich drzew, ponieważ sprzyjają pojawianiu się drapieżników. Same spędzają całe życie na ziemi, niemal nigdy nie siadając na drzewach.

Drugim przedstawicielem grupy ptaków grzebiących jest bażant zwyczajny (*Phasianus colchicus*, rodzina kurowate). Duży, zbliżony wielkością do kury domowej ptak. Zamieszkuje otwarte tereny, szczególnie pola uprawne, urozmaicone zakrzaczeniami i zadrzewieniami. Gniazdo buduje podobnie do kuropatwy, tworząc niewielkie zagłębienie w ziemi wysłane trawami i puchem, pod osłoną roślinności. Jego pożywieniem są nasiona, owoce, korzonki, a wiosną także owady. W ciągu dnia żeruje, noc spędza ukrywając się na drzewie lub w krzakach. Jest to gatunek osiadły, który nie podejmuje wędrówek, wyjątkowo może przenieść się w inną, jednak niezbyt odległą okolice.

1.3. Ptaki żurawiowe (rząd Żurawiowe, Gruiformes)

Spośród bardzo zróżnicowanej i złożonej grupy ptaków należących do rzędu żurawiniowych, wyróżnić należy dwie rodziny, do których należą ptaki najchętniej korzystające z terenów rolniczych. Chruściele obejmują wodno-błotne gatunki ptaków, które zasiedlają podmokłe łąki, trzcinowiska i zarośla przybrzeżnej strefy zbiorników wodnych. Drugą rodziną są żurawie, reprezentowane w Polsce wyłącznie przez jeden gatunek, żurawia zwyczajnego.

Derkacz zwyczajny (*Crex crex*, rodzina chruściele) to nieduży ptak, prowadzący bardzo skryty tryb życia. Większość czasu przebywa pośród gęstej roślinności i przemieszcza się głównie na piechotę, lata sporadycznie i niechętnie. Charakteryzuje go fakt, że nie jest tak związany z wodą, jak pozostałe chruściele. Zamieszkuje różnego rodzaju obszary trawiaste, o niezbyt gęstej roślinności. Najlepszym terenem są dla niego obszary łąk, poddawane użytkowaniu kośnemu, co sprawia, że jest on przywiązany do terenów użytkowanych przez człowieka. Koszenie łąk ułatwia im przemieszczanie się między roślinami, ponieważ nie muszą się przeciskać między plątaniną traw. Pomaga im także w zdobywaniu pokarmu, którym są duże owady, gdyż na skoszonych łąkach wzrasta ich ilość³. Gniazdo zakłada na ziemi, pod osłoną roślin, wygrzebuje niewielki dołek i wykładając go trawą.

Żuraw zwyczajny (*Grus grus*, rodzina żurawie) to wysoki, długonogi ptak, bardzo płochliwy i nieufny. Jego ruchy na ziemi są powolne i płynne. Na skutek wzrostu populacji i przyzwyczajania się do obecności człowieka, żyje coraz bliżej ludzi. Zakłada lęgi na zalewanych łąkach i pastwiskach, w rowach między polami i znajdujących się między nimi zabagnieniach. Gniazdo ma często postać płaskiej platformy, umiejscowione na podmokłym gruncie i często oblane dookoła wodą. Jego pożywieniem jest zarówno pokarm zwierzęcy, jak i roślinny. Są to zboża, kukurydza, zielone części roślin, jagody, a także duże owady, pajęczaki, dżdżownice czy drobne kręgowce.

1.4. Sowy (rząd Sowy, Strigiformes)

Są to drapieżne ptaki, przystosowane do nocnego polowania. Mają doskonały słuch, który pozwala im lokalizować ofiarę nawet w całkowitej ciemności, bardzo dobry wzrok poprzez umiejętność powiększania obrazu oraz ogromną ruchliwość szyi. Zamieszkują różnorodne środowiska, i choć najczęściej są to lasy, to wyróżniamy także gatunki sów, które preferują luźniejsze zadrzewienia oraz tereny rolnicze.

Pójdźka zwyczajna (*Athene noctua*, rodzina puszczykowate) to niewielka sowa, która w przeciwieństwie do większości gatunków, jest aktywna również podczas dnia. Zamieszkuje małe miejscowości w krajobrazie rolniczym z niewielką roślinnością, co

³ „Łąki półnaturalne, pastwiska ekstensywne, użytki przyrodnicze” Warszawa, Program Rolnośrodowiskowy, dr Kotowski W., 2003, s.25-26.

ułatwia jej polowanie. Jej siedlisko jest ściśle związane z obecnością pól rolniczych i łąk, ponieważ to na nich zdobywa pożywienie. Najważniejszym pożywieniem są owady oraz drobne ssaki, na podmokłych terenach także dżdżownice. Prowadzi osiadły tryb życia, nie podejmuje migracji lub nawet koczowań, zimę spędza w miejscu lęgów. Nie buduje własnego gniazda, jaja umieszcza w dziupli drzew lub na poddaszach zabudowań. Dorosłe osobniki łączą się w pary, w których pozostają do końca życia, a ponieważ prowadzą osiadły tryb życia, korzystają z jednego gniazda przez wiele lat.

Płomykówka zwyczajna (*Tyto alba*, rodzina płomykówkowate) to gatunek średniej wielkości, długonogiej sowy, o barwnym upierzeniu. Zamieszkuje osiedla ludzkie w pobliżu pól, łąk i pastwisk, będących jej terenami łowieckimi. Jest typowo nocnym, płochliwym gatunkiem. Podobnie jak pójdzka, gniazduje w starych zabudowaniach lub dziuplach drzew, czasem także w gołębnikach. Żywi się najczęściej gryzoniami takimi jak norniki, myszy i szczury.

1.5. Ptaki wróblowe (rząd Wróblowe, Passeriformes)

Rząd ten obejmuje ponad połowę wszystkich występujących dziś gatunków ptaków, o bardzo zróżnicowanych cechach. Wśród wróblowych przeważają ptaki małej lub średniej wielkości. W Polsce żyją ptaki 25 (z 80) rodzin tego rzędu, są to jednak wyłącznie przedstawiciele podrzędu śpiewających⁴. Cechą wspólną jest przystosowanie do szybkiego poderwania się do lotu dzięki zwężającym się skrzydłom. Charakterystyczne dla krajobrazu rolniczego jest paręnaście gatunków.

Skowronek zwyczajny (*Alauda arvensis*, rodzina skowronki) to najliczniej występujący ptak na polach. Zamieszkuje krajobraz rolniczy nieurozmaicony o gęsto rosnące krzewy i drzewa, taki jak pola uprawne obsiane zbożami, otwarte, porośnięte trawą pofałdowane łąki i pastwiska, tereny bezleśne. Głównym pożywieniem skowronka są owady, pająki, dżdżownice, jednak znajdziemy w ich diecie także nasiona traw i zbóż oraz zielone części roślin. Gniazdo zakłada w płytkim dołku w ziemi, wykładając je źdźbłami traw. W okresie lęgowym zachowuje nadzwyczajną ostrożność. Żeby zmylić potencjalnych wrogów, przylatujący skowronek ląduje w innym miejscu niż znajduje się jego gniazdo i wędruje do niego pieszo z pokarmem w dziobie.

⁴ Przyjmuje się podział wróblowych na dwa podrzędy: pierwowróblowce (Suboscines syn. Tyranni) - o unikatowej budowie krtani, oraz śpiewające (Oscines syn. Passeri) - o krtani lekko umięśnionej.

Świergotek łąkowy (*Anthus pratensis*, rodzina pliszkowate) jest małym, delikatnym ptakiem. Jego siedliskiem są wilgotne łąki i pastwiska, trawiaste ugory, pola uprawne, a także obniżenia w krajobrazie rolniczym. Dobrze ukryte w trawie gniazdo buduje z suchej trawy lub mchu i lekko wyściela włosiem. Ptak ten jest w głównej mierze owadożerny, żywi się małymi chrząszczami, owadami błonkoskrzydłymi, pajakami, a sporadycznie również nasionami. Pokarm zbiera z ziemi lub chwyta w powietrzu.

2. Zagrożenia dla ptaków żyjących na terenach rolniczych

Rolnictwo sprowadza na ptaki wiele zagrożeń, które mogą powodować utrudnienia w zdobywaniu przez nie pokarmu, zakładaniu lęgów, oraz odchowywaniu potomstwa. Głównym zagrożeniem dla ornitofauny jest drastyczne przekształcanie tradycyjnego krajobrazu rolniczego przez intensyfikację działań prowadzonych na roli.

Gdy pola uprawne były małe, znajdowało się między nimi wiele zadrzewień, zakrzewień oraz fragmentów naturalnych ekosystemów, zwanych miedzami. Są to miejsca, w których organizmy tworzą gniazda, oraz jest to schronienie dla tych, które żerują na polach. Intensyfikacja rolnictwa prowadzi do zwiększania terenu uprawnego. Potrzebny jest coraz większy areał, przez co karczują się lasy, wycina zadrzewienia, a także dochodzi do zaorania tak cennych dla tych zwierząt miedz. Im rolnictwo jest bardziej zbliżone do formy tradycyjnej, pozbawione mechanizacji i stosowania środków chemicznych, tym zwierzętom żyje się w takim środowisku lepiej.

2.1. Mechanizacja

Wzrost stopnia mechanizacji jest istotnym zagrożeniem dla lęgów. Zabiegi agrotechniczne prowadzone są coraz częściej z użyciem szybko poruszającego się sprzętu, mającego dużą powierzchnię działania. Wzrasta również liczba maszyn używanych na polach⁵. Obecnie, w ciągu jednego sezonu może wielokrotnie dochodzić do wielokrotnego zbioru plonów, ze względu na zmiany klimatyczne, rodzaj wysiewanych roślin, oraz stosowanie nawozów sztucznych.

⁵ „W latach 1987-2002 liczba ciągników w rolnictwie polskim zwiększyła się o 31%, kombajnów zbożowych o 74%, rozrzutników obornika o 38%, pras zbierających o 159%, kombajnów ziemniaczanych o 111%.” - Jan Pawlak „Wyposażenie rolnictwa polskiego w środki mechanizacji na tle wybranych krajów Unii Europejskiej”, 2007.

Wiele gatunków ptaków zakłada swoje gniazda na terenach uprawnych szukając tam schronienia dla potomstwa. Znaczne przyspieszenie momentu zbierania plonów skutkuje tym, że młode osobniki nie zdążą jeszcze opuścić lęgu, oraz nie będą w stanie uciec przed maszynami rolnymi. W trakcie pokosu, bardzo duży procent pisklaków znajdujących się na terenie upraw ginie.

2.2. Chemizacja rolnictwa a różnorodność biologiczna

Obecnie w rolnictwie stosuje się bardzo duże ilości nawozów sztucznych. Jest to spowodowane tym, że długotrwała uprawa danych gatunków roślin powoduje jałowienie gleby. Gdy rośliny się rozwijają, pobierają z gleby niezbędne dla nich substancje mineralne takie jak np. sole magnezu, potasu, fosforu, azotu, przez co ich zawartość w glebie spada.

Biorąc pod uwagę fakt, że wyhodowane rośliny są wywożone z pól, wszelkie minerały z roślin nie wracają do podłoża. To, że gleba szybko jałowieje powoduje fakt, że są one intensywnie gospodarowane. Dochodzi do kilkukrotnego uprawiania i zbierania plonów w ciągu roku z jednego gruntu uprawnego.

Sztuczne nawozy zawierają pierwiastki biogenne, które są niezbędne do funkcjonowania organizmów. Biogeny, które zaczynają występować w środowisku w nadmiarze stają się zanieczyszczeniami. W przypadku pól nawożonych w nieprawidłowy sposób dochodzi do spływu biogenów wraz z wodami opadowymi do zbiorników i cieków wodnych, a to powoduje ich eutrofizację. Zbyt duże nagromadzenie biogenów w wodzie powoduje silny rozwój glonów nazywany również zakwitaniem wód. Przez wzrost liczby glonów przejrzystość wód spada, co powoduje niedobory światła w głębszych warstwach zbiornika. Wynikiem tego jest obumieranie roślin naczyniowych i części glonów. Bakterie rozkładające martwą materię roślinną pochłaniają duże ilości tlenu z wody. Gdy tlenu zaczyna brakować dochodzi do beztlenowego rozkładu materii, w którego wyniku produkowany jest między innymi toksyczny siarkowodór. Procesy te prowadzą do śmierci licznych organizmów żyjących w zbiorniku.

Intensywne nawożenie mineralne pól sprawia, że dochodzi do szybkiego wzrostu oraz większego zagęszczenia łądyg zboża i traw. Jest to sytuacja niekorzystna dla ptaków, ponieważ praktycznie uniemożliwia poruszanie się ptakom naziemnym, takim jak derkacz czy kuropatwa. Dodatkowo, utrudnia ptakom lądowanie i dostęp do poziomego gruntu, gdzie zakładają gniazda i szukają pokarmu.

Zdarza się, że intensywny rozrost roślin zmusza je do porzucenia lęgu. Nawożenie uniemożliwia także rozwój chwastów, co wpływa na zmniejszenie potencjalnej bazy pokarmowej (owady żerujące na chwastach, oraz nasiona tych roślin).

2.3. Stosunki wodne

Obecnie ilość wody wykorzystywanej przez sektor rolniczy znacząco wpływa na zaburzenia stosunków wodnych na dużych obszarach lądu. Często praktykuje się również osuszanie gruntów w celu zwiększenia arealu przeznaczonego pod uprawę roślin. Niedobory wody oraz osuszanie i zasypywanie terenów, skutkują zanikaniem środowisk takich jak mokradła, bagna, torfowiska, podmokłe łąki i lasy. Są one bardzo cenne ze względów przyrodniczych, ponieważ stanowią miejsce zamieszkania dla wielu płazów i gadów, są schronieniem dla ptaków wodno-błotnych, a także rosną tam rzadkie gatunki roślin, często zagrożone wyginięciem.

2.4. Osuszanie terenów

Osuszanie czy zasypywanie występujących mokradeł oraz oczek wodnych powoduje bardzo silne zubożenie bioróżnorodności, oraz bardzo negatywnie wpływa na ptaki poprzez straty potencjalnych miejsc schronienia, miejsc lęgowych, czy zmniejszenie puli pokarmu.

3. Wpływ zagrożeń na rodziny ptaków

3.1. W XX w. populacja błotniaka łąkowego zaczęła spadać z powodu zaniku siedlisk, które preferuje, takich jak tereny podmokłe, zadrzewienia, miedze. Dodatkowo do tego procesu przyczyniła się intensyfikacja rolnictwa.

Obecnie, wyżej wymienione dalej niekorzystnie oddziałują na liczbę osobników populacji, a liczba zagrożeń się powiększa. Stosowanie toksycznych środków ochrony roślin na terenach zimowisk oraz nieumyślne niszczenie gniazd zakładanych na polach, przez zmechanizowany sprzęt rolniczy tylko pogarszają sytuację tego gatunku.

Na skutek intensywnego nawożenia łąk, tamtejsza roślinność rozwija się znacznie szybciej. Koszenie tych terenów w ciągu sezonu lęgowego może się odbywać nawet kilkakrotnie, co uniemożliwia błotniakom łąkowym zakończyć lęgi. W trakcie mechanicznej orki i pokosów, niszczone są nie tylko gniazda i lęgi, ale niekiedy

dochodzi także do śmierci wysiadujących samic. Od 41 do 98% gniazd tego ptaka jest niszczone przez maszyny rolnicze we Francji, Portugalii i Hiszpanii, a nawet 60% piskląt może ginąć pod kołami kombajnów we Francji i na Półwyspie Iberyjskim.

3.2. Największymi zagrożeniami dla populacji myszołowa są zmiany siedliskowe. Wycinanie zadrzewień śródpolnych, intensywna gospodarka leśna, oraz likwidacja nieużytków oraz miedz powoduje, że ptaki te tracą miejsca na zakładanie lęgów.

Stosowanie szkodliwych środków ochrony roślin w bliskiej odległości od roślinności, którą ten gatunek zamieszkuje wpływa niekorzystnie na jego liczebność. Dodatkowo za sprawą licznych działań w rolnictwie zmniejsza się liczba gryzoni, a co za tym idzie zmniejsza się liczba potencjalnych ofiar.

3.3. Obecne zagrożenia związane z działaniami antropogenicznymi powodują, że liczebność kuropatwy bardzo mocno spada. Zanik miedz przyczynia się do tego, że gatunek ten ma bardzo mało miejsc do schronienia na terenach rolniczych, a ponadto miedze to doskonałe miejsce do żerowania dla tego ptaka. Znacznie przyspieszone terminy pokosu sprawiają, że ptaki mają mało czasu na wyprowadzenie lęgu. Młode osobniki w obliczu zagrożenia stosują kamuflaż na tle podłoża, niestety w konfrontacji z rolniczym sprzętem mechanicznym nie jest to skuteczna metoda i często giną.

Po wielu latach stosowania środków owadobójczych mocno zredukowana jest również liczba owadów, które stanowią ważną pulę pokarmu szczególnie dla osobników młodocianych.

3.4. Derkacz jest gatunkiem ptaka, który w obecnych czasach na roli spotyka wiele zagrożeń. Są nimi przede wszystkim utraty siedlisk w trakcie sezonu lęgowego w wyniku niedostosowania terminów pokosu do fenologii gatunku oraz koszenie łąk od zewnątrz do środka, które uniemożliwia dorosłym osobnikom wyniesienie piskląt poza obszar koszenia. Problemem jest także intensyfikacja rolniczego użytkowania łąk, które powoduje ubożenie siedliska, oraz upraszczanie struktury roślinności.

3.5. Liczebność płomykówki w Polsce z roku na rok maleje, a główną przyczyną tego zjawiska jest intensyfikacja rolnictwa. Poprzez zmniejszanie terenów

pastwisk i łąk, a także ograniczenie koszenia łąk czy wypasu bydła, sowy te tracą odpowiednie dla nich tereny łowieckie. Dodatkowo stosowane w nowoczesnym rolnictwie pestycydy zatruwają tereny, powodując spadek liczby gryzoni, które są głównym pożywieniem sów. Innym negatywnym skutkiem stosowania pestycydów są zaburzenia w tworzeniu się skorupki jaj w ciele samicy, co powoduje zmniejszenie liczby potomstwa.

3.6. Główną przyczyną spadku populacji skowronka jest intensyfikacja rolnictwa, prowadząca do zaniku jego siedlisk. Składa się na to używanie środków ochrony roślin, nawozów sztucznych i trujących oprysków, a także wprowadzenie ciężkich maszyn. Na polach poddanych opryskom liczba odchowanych młodych znacznie spada w stosunku do pól nieopryskiwanych, natomiast praca maszyn prowadzi do niszczenia gniazd ukrytych w zbożu.

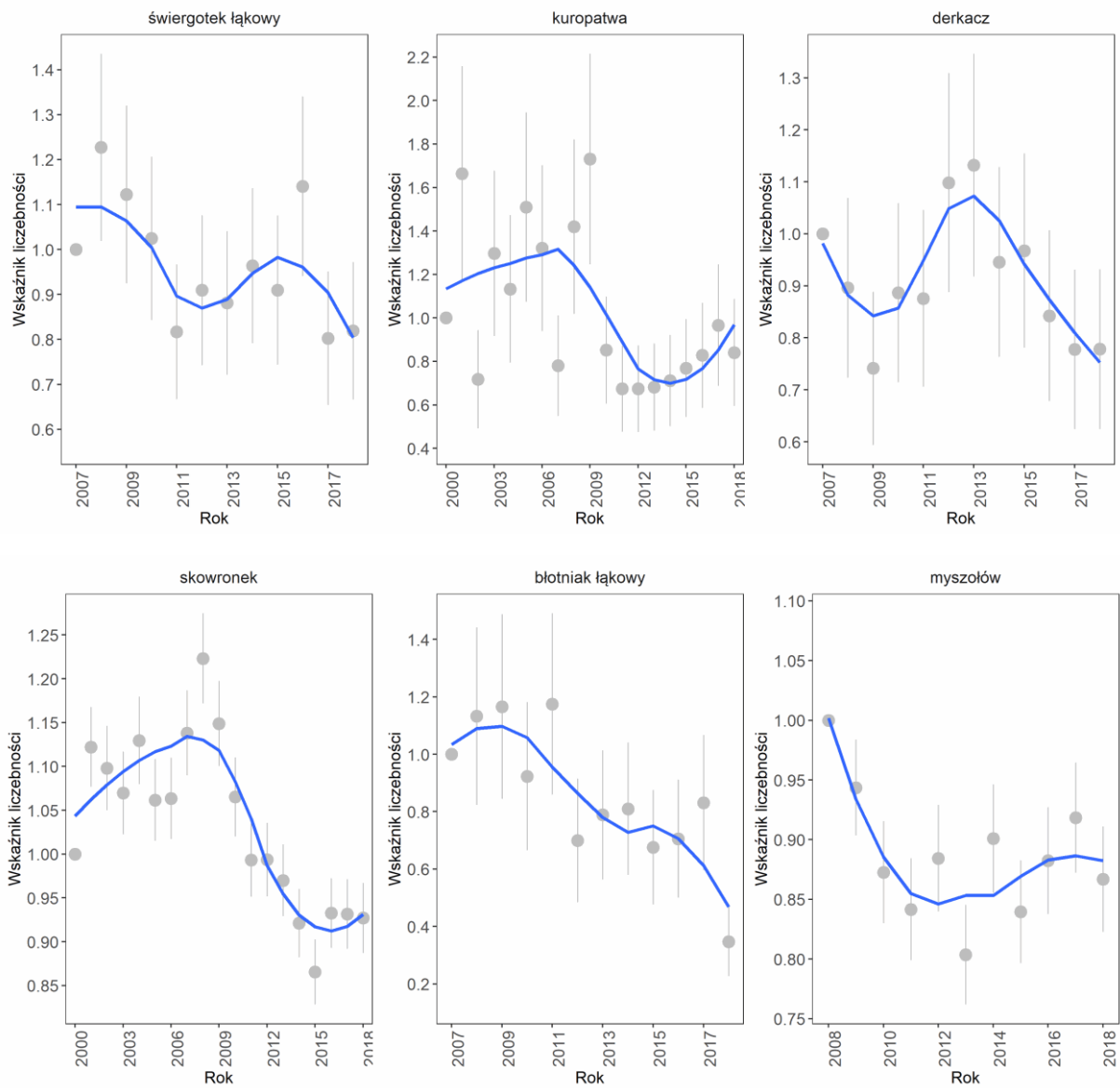
4. Podsumowanie

Współczesne rolnictwo powoduje zauważalne zmiany w liczebności wielu populacji ptaków żyjących na terenach rolniczych⁶. Największym zagrożeniem zdają się być zmiany w strukturach krajobrazu oraz mechanizacja rolnictwa wraz ze stosowaniem środków chemicznych w uprawach. Spadek populacji tak wielu ptaków ma negatywne skutki nie tylko dla ekosystemu, ale także rolników oraz mieszkańców tych terenów. Są one sprzymierzeńcami w walce ze szkodnikami, regulują populację zarówno bezkręgowców jak i gryzoni, a nawet kontrolują ilość chwastów poprzez zjadanie ich nasion.

Podstawowymi działaniami ochronnymi są: opóźnienie terminu pierwszego pokosu, koszenie od środka do zewnątrz łąki oraz zachowanie różnorodności przyrodniczej pól – nie usuwanie miedz, zadrzewień oraz oczek śródpolnych.

⁶ Wykres nr 1; Baza danych Monitoringu Ptaków Polski.

Wyk. 1. - wskaźniki liczebności ptaków krajobrazu rolniczego w określonych przedziałach czasowych.



Bibliografia:

„Atlas ptaków” część 1 i 2, Marcin Karetta, wyd. Pascal Sp. Z o.o.

Bernadetta Ebertowska, Jarosław Krogulec, Urszula Zielińska, zespół projektowy KIK/25 OTOPI: „Dola i niedola ptaków krajobrazu rolniczego”, 2010.

„Encyklopedia Britannica - Zoologia” wyd. KURPISZ S.A., 2006.

Krupiński D., Lewtak J., Kuczyński L. Krajowy Plan Ochrony Błotniaka Łąkowego. Towarzystwo Przyrodnicze „Bocian”, Warszawa, 2014.

Natalia Hałas: „Konsekwencje przemian gospodarki rolnej i transformacji krajobrazu rolniczego dla ptaków szponiastych”, KOSMOS Tom 68 Nr 1.

„Nieużytki życia – miedze i zadrzewienia”, Artykuł w ramach projektu „Bukiet z pól. Kampania informacyjno-edukacyjna na rzecz zatrzymania spadku różnorodności biologicznej w krajobrazie rolniczym”.

Paweł Nasiadka, Roman Dziedzic „Podręcznik najlepszych praktyk ochrony kuropatwy i zająca”; Warszawa, wyd. Centrum Koordynacji Projektów Środowiskowych, 2014.

„Wpływ praktyk rolniczych na ptaki”, Raport z prac przeprowadzonych w ramach projektu „Ochrona różnorodności gatunkowej cennych przyrodniczo siedlisk na użytkach rolnych na obszarach Natura 2000 w woj. lubelskim” (KIK/25) w latach 2012–2016, wyd. Ogólnopolskie Towarzystwo Ochrony Ptaków.

<http://www.monitoringptakow.gios.gov.pl/ptaki-krajobrazu-rolnego> [dostęp: 02.06.2019].

<http://www.monitoringptakow.gios.gov.pl/baza-danych> [dostęp: 02.06.2019].

Co dieta wydry *Lutra lutra* może nam powiedzieć o zmianach zachodzących w środowisku?

Wstęp

W ostatnich latach obserwujemy niekorzystne zmiany zachodzące w środowisku (w powietrzu, wodzie, glebie). Zmiany te, dotyczą również przyrody ożywionej. Zmienia się skład świata roślin i świata zwierzęcego. Gatunki rodzime wypierane są przez gatunki obce, dochodzi do krzyżowania się tych gatunków, zmian lokalnych sieci zależności troficznych, przenoszenia chorób i niszczenia rodzimych upraw i plonów¹. Wśród obcych gatunków pojawiających się w rodzimej faunie i florze występują takie, które są określane jako inwazyjne gatunki obce, tj. gatunki obce, które wywierają negatywny wpływ na rodzime gatunki, siedliska lub ekosystemy². Gatunki te występują w środowisku lądowym i wodnym. Ich obecność może być wykryta przypadkowo, w czasie prowadzenia niezależnych badań. Według Głowacińskiego i in.³ w polskiej faunie występuje ok. 300 gatunków obcych (zawleczonych lub sprowadzonych celowo przez człowieka). 134 z nich zostało uznane za inwazyjne, a 76 gatunków spośród nich za gatunki, których inwazyjność została określona jako intensywna.

Wydra (*Lutra lutra*) jest drapieżnikiem ziemnowodnym, należącym do rzędu Drapieżnych (Carnivora) i rodziny Łasicowatych (Mustelidae). Powszechnie uważana jest za gatunek wskaźnikowy stanu wód, często jest również nazywana ambasadorem czystych wód⁴. Szereg badań w kraju i za granicą wykazało, iż na występowanie tego gatunku ma wpływ stopień zanieczyszczenia chemicznego wód, niszczenie naturalnych siedlisk (regulacja brzegów cieków wodnych) a także zmniejszanie się bazy pokarmowej. Jednakże, ze względu na dużą plastyczność ekologiczną wydry nie można uznać za klasyczny gatunek wskaźnikowy⁵. Obecnie gatunek ten występuje na terenie całego kraju, zasiedlając nawet najbardziej skrajne

¹ Solarz W. *Przyczyny i skutki inwazji biologicznych na świecie i w Polsce*. Studia i Materiały CELP w Rogowie 2012, R.14.33 (4): 9-14.

² Ibidem

³ Głowaciński Z., Okarma H., Pawłowski J., Solarz W. (red.). *Gatunki obce w faunie Polski. I. Przegląd i ocena stanu*. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków 2011.

⁴ Romanowski J., Zając T., Orłowska L. *Wydra – ambasador czystych wód*. Fundacja Wspierania Inicjatyw Ekologicznych Kraków 2010.

⁵ Ibidem

siedliska, chociaż jeszcze na początku lat 90 XX w. była gatunkiem zagrożonym i znajdowała się w Polskiej Czerwonej Księdze Zwierząt⁶.

Wydra ze względu na środowisko bytowania charakteryzuje się specyficznymi zwyczajami pokarmowymi. Organizmy wodne występujące w ciekach, zbiornikach wodnych i wodach płynących oraz inne organizmy występujące w sąsiedztwie wód stanowią jej pokarm. Pod względem składu wśród ofiar wydry można wyróżnić ryby, płazy, drobne ssaki ziemnowodne a nawet ptaki, czasami również skorupiaki. Wśród ryb w zależności od charakteru wód oraz położenia geograficznego dominują rodzime gatunki należące do rodzin: karpiowatych (Cyprinidae), okoniowatych (Percidae), głowaczowatych (Cottidae), przylgowatych (Balitoridae)^{7,8,9}.

Ze względu na coraz częściej notowaną obecność inwazyjnych gatunków obcych wśród ryb w wodach na terenie Polski, można przypuszczać, iż mogą one pojawić się także w diecie wydry.

1. Materiały i metody

Badania nad zwyczajami pokarmowymi wydry przeprowadzono w oparciu o analizę jej diety, pochodzącej z terenu kompleksów stawów rybnych w Polsce Południowej. Od października 1993 r. do marca 1994 r. badania przeprowadzono na terenie 2 kompleksów stawów rybnych należących do Gospodarstwa Rybackiego „Przyborów” (stawy Książ Wielki i Pławowice) oraz Gospodarstwa Rybackiego „Rudze” (stawy Tomice). Od grudnia 2000 r. do grudnia 2001 r. materiał zbierano na terenie Rybackiego Zakładu Doświadczalnego w Zatorze (Gospodarstwa Rybackie: Spytkowice, Laskowa, Przeręb, Bugaj) a od października 2008 r. do lutego 2009 r. na terenie Spółki „Stawy Milickie” Zakład Rybacki w Potaszni. W skład RZD w Zatorze wchodzi gospodarstwa rybackie o łącznej powierzchni lustra wody 811,9 ha, złożone z blisko 200 stawów o powierzchniach od 0,04 ha do 50 ha lustra wody. Największym gospodarstwem rybackim były „Spytkowice”, które posiadały 520 ha lustra wody. Najmniejszy kompleks to „Laskowa”, którego powierzchnia lustra wody wynosiła 50 ha. Dwa pozostałe tj. „Przeręb” i „Bugaj” posiadały odpowiednio powierzchnie lustra wody o wielkości 410 ha i 206 ha.

⁶ Głowaciński Z.(red.). *Polska Czerwona Księga Zwierząt*. PWRiL, Warszawa 1992.

⁷ Brzeziński M., J. Romanowski, Ł. Kopczyński, E. Kurowicka. *Habitat and seasonal variations in diet of otters, Lutra lutra in eastern Poland*. Folia Zool. nr 55/2006, s. 337-348.

⁸ Krawczyk A. J., Skierczyński M., Tryjanowski S., *Diet of the Eurasian otter Lutra lutra on small watercourses in Western Poland*. Mammalia nr 75/2011, s. 207-210.

⁹ Kruuk H., *Otters ecology, behaviour and conservation*, Oxford University Press 2006.

Zimochowy IV Kompleksu Gądkowickiego wchodzącego w skład Zakładu Rybackiego w Potasznicy, to kompleks stawów o powierzchni lustra wody około 30 ha. Na terenie kompleksów stawów rybnych, na których przeprowadzono badania wyznaczono stałe trasy marszrut, po których poruszano się w odstępach 5-6 tygodniowych, zbierając ekskrementy wydry zlokalizowane w charakterystycznych punktach. Miejsca te nazywane są latrynami i służą one wydrze do znakowania zajmowanego terytorium¹⁰. Zebrane w terenie ekskrementy wydry były umieszczane w osobnych pojemnikach oraz opisywane. Po przewiezieniu do laboratorium przechowywano je w lodówce w temperaturze 5°C do czasu analizy. Materiał bezpośrednio przed analizą zalewano roztworem detergentu nieenzymatycznego i pozostawiano na okres 12 godzin. Po upływie tego czasu płukano go pod strumieniem bieżącej wody na sitkach o średnicy oczek 0,5 mm celem pozabawienia zanieczyszczeń. Następnie materiał suszono w temperaturze 60°C¹¹. Tak przygotowane próbki przeglądano przy użyciu lupy binokularnej starając się zidentyfikować kategorie i gatunki ofiar skonsumowanych przez wydrę. Zwierzęta należące do ssaków identyfikowano na podstawie charakterystycznych kości oraz wykorzystując ich sierść^{12,13}. Ptaki identyfikowano na podstawie budowy kości i piór¹⁴. Natomiast do identyfikacji płazów i gadów wykorzystywano ich kręgi oraz kości czaszki (*frontoparietale*) a także kości obręczy miednicy (*illeum*)^{15,16}. Ryby były rozpoznawane na podstawie kręgów, łusek i nieuszkodzonych części szkieletów charakterystycznych dla poszczególnych rodzin. Ryby karpowate (Cyprinidae) rozpoznawano na podstawie kręgów¹⁷ oraz kości gardłowych dolnych (*ossa pharyngea inferiora*)¹⁸ ryby okoniowate (Percidae) identyfikowano na podstawie kręgów oraz kości wieczka skrzelowego (*praoperculum* i *interoperculum*)¹⁹, szczupaka (*Esox lucius*) identyfikowano wykorzystując kręgi oraz łuski. Do

¹⁰ Mason C. F. and S. M. Macdonald. *Otters: ecology and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge 1986.

¹¹ Webb J.B. *Otter spraint analysis*. An Occasional Publication of the Mammal Society, London. 1976.

¹² Pucek Z. (ed.). *Klucz do oznaczania ssaków Polski*. PWN, Warszawa 1984.

¹³ Teerink B. J. *Hair of West-European mammals. Atlas and identification key*. Cambridge University Press, Cambridge 1991.

¹⁴ Webb J.B. *Otter spraint analysis*. An Occasional Publication of the Mammal Society, London. 1976.

¹⁵ Ibidem

¹⁶ Engelmann W. E., J. Fritzsche, R. Gunther and F. J. Obst. *Lurche und Kriechtiere Europas*. Neumann Verlag, Leipzig, 1985.

¹⁷ Webb J.B. *Otter spraint analysis*. An Occasional Publication of the Mammal Society, London. 1976.

¹⁸ Horoszewicz L. *Wartości kości gardłowych dolnych jako kryteriów gatunkowego oznaczania ryb karpowatych*. Rocz. Nauk Roln 1960, 75, B, 2: 238-256.

¹⁹ Libois R. M., C. Hallet-Libois and L. Lafontaine. *Le regime de la loutre *Lutra lutra* en Bretagne interieure*. Rev. Ecol. 1987a, 42: 135-144.

identyfikacji ciernika (*Gasterosteus aculeatus*) wykorzystano kość miedniczną prostą. Ryby z rodziny kozowatych (Cobitidae) oraz śliza rozpoznawano wykorzystując kręgi oraz szczęki²⁰. Wykorzystano również własny materiał porównawczy zebrany w terenie badań. Fragmenty kości, które można było jedynie przypisać do rodzin pogrupowano zgodnie z ich przynależnością.

Z dokładnością do 0,1 mm mierzono charakterystyczne części szkieletu dla poszczególnych gatunków ryb pozwalające na obliczenie długości ich ciała, przy pomocy równań regresji. W przypadku gatunków ryb z rodziny karpowatych mierzono wysokość łuku gardłowego kości gardłowych dolnych (*ossa pharyngea inferiora*), a u ryb okoniowatych mierzono wysokość kości wieczka skrzelowego (*praoperculum*), w przypadku szczupaka wysokość kręgów. Dla karpia (*Cyprinus carpio*), płoci (*Rutilus rutilus*), okonia (*Perca fluviatilis*), szczupaka, jelca (*Leuciscus leuciscus*) i kielbja (*Gobio gobio*) do określenia całkowitej długości ryby wykorzystano publikowane dane z prac^{21,22,23}, jak również niepublikowane dane (Amirowicz inf. ustna). Dla pozostałych ryb karpowatych dla określenia długości wykorzystano wzory zamieszczone w pracy Horoszewicz²⁴. Jeśli w materiale pochodzącym z 1 ekskrementu znajdowano 2 łuki gardłowe (lewy i prawy) o tej samej długości, to przyjmowano, że należą one do tego samego osobnika z rodziny karpowatych. Analogicznie postępowano w przypadku znalezienia dwóch kości wieczka skrzelowego (lewego i prawego) należących do ryb z rodziny okoniowatych.

Dla każdego terenu badań wykorzystując ilość zebranych odchodów oraz ilość zidentyfikowanych ofiar obliczono frekwencję (FO%) poszczególnych grup pokarmu lub gatunków w diecie wydry, gdzie n to liczba odchodów, w których zidentyfikowano dany gatunek, a N - całkowita liczba odchodów ($FO \% = n/N * 100$)²⁵.

²⁰ Webb J.B. *Otter spraint analysis*. An Occasional Publication of the Mammal Society, London. 1976.

²¹ Mann R. H. K. i W. R. C. Beaumont. *The collection, identification and reconstruction of lengths of fish prey from their remains in pike stomachs*. Fish. Manage. 1980, 11: 169-172.

²² Wise M. H. *The use of fish vertebrae in scats for estimating prey size of otters and mink*. J. Zool., Lond. 1980. 192: 25-31.

²³ Hallet-Libois C. *Modulations de la strategie alimentaire d'un predateur: Eco-ethologie de la predation du martin-pecheur, Alcedo atthis (L. 1758), en periode de reproduction*. Ph. D. Diss. Facultes Universitaires Notre-Dame de la Paix-Namur. 1984.

²⁴ Horoszewicz L. *Wartości kości gardłowych dolnych jako kryteriów gatunkowego oznaczania ryb karpowatych*. Rocz. Nauk Roln. 1960, 75, B, 2: 238-256.

²⁵ Bekker D.L. and B.A. Nolet. *The diet of otters Lutra lutra in the Netherlands in winter and early spring*. Lutra. 1990, vol.33:134-144.

2. Wyniki

Od października 1993 r. do marca 1994 r. na terenie Gospodarstwa Rybackiego „Przyborów” (stawy Książ Wielki i Pławowice) zebrano 211 ekskrementów wydry, na terenie Rybackiego Zakładu Doświadczalnego w Zatorze w okresie jesienno - zimowym było to 489 prób, a od października 2008 r. do lutego 2009 r. na terenie zimochowów Zakładu Rybackiego w Potasznia (IV Kompleks Gądkowicki) 202 próby.

Podstawę diety wydry na każdym stanowisku stanowiły ryby. Ich udział w ekskrementach (F%) wynosił odpowiednio „Przyborów” – 94,3%, „Zator” – 98,0%, „Potasznia” – 100%. Pozostałą część stanowiły płazy.

Ryby należące do rodziny karpiowatych były najczęściej identyfikowane w ekskrementach, na drugim miejscu była rodzina okoniowatych (Tab.1).

Tab 1. Udział poszczególnych kategorii ofiar w diecie wydry opartej na analizie ekskrementów pochodzących z terenu 3 gospodarstw rybackich w Polsce Południowej.

gatunek	Przyborów		Zator		Potasznia	
	n	FO %	n	FO %	n	FO %
brzana (<i>Barbus</i> sp.)	1	0,47	0	0	0	0
czebaczek amurski (<i>Pseudorasbora parva</i>)	52	24,64	1	0,15	27	13,37
jaź (<i>Leciscus idus</i>)	0	0	7	1,43	2	0,99
jelec (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	0	0	4	0,82	0	0
karaś (<i>Carassius carassius</i>)	2	0,95	20	4,09	8	3,96
karp (<i>Cyprinus carpio</i>)	46	21,8	41	8,38	66	32,67
kielb (<i>Gobio gobio</i>)	15	7,11	4	0,82	0	0
kleń (<i>Squalius cephalus</i>)	0	0	3	0,61	0	0
leszcz (<i>Abramis brama</i>)	2	0,95	0	0	0	0
lin (<i>Tinca tinca</i>)	18	8,53	10	2,04	24	11,88
płoc (<i>Rutilus rutilus</i>)	4	1,9	99	20,25	12	5,94
słonecznica (<i>Leucaspius delineatus</i>)	25	11,85	34	6,95	13	6,44
świnka (<i>Chondrostoma nasus</i>)	0	0	0	0	2	0,99
ukleja (<i>Alburnus alburnus</i>)	16	7,58	66	13,5	4	1,98
wzdreęga (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	2,84	0	0	4	1,98

Cyprinidae NO	99	46,92	295	60,33	128	63,37
okoń (<i>Perca fluviatilis</i>)	42	19,91	41	8,38	5	2,48
Percidae NO	26	12,32	35	7,16	13	6,44
ciernik (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	10	4,74	0	0	0	0
piskorz (<i>Misgurnus fossilis</i>)	0	0	0	0	1	0,5
szczupak (<i>Esox lucius</i>)	7	3,32	12	2,45	10	4,95
śliz (<i>Barbatula barbatula</i>)	10	4,7	0	0	0	0
Ryba NO	62	29,38	152	31,08	32	15,84

FO - % poszczególnych grup pokarmu lub gatunków w diecie wydry,
gdzie n - liczba odchodów w których znaleziono dany gatunek, a
N - całkowita liczba odchodów (FO % = $n/N \cdot 100$).

W analizowanej diecie wydry stwierdzono obecność 15 gatunków ryb na terenie każdego gospodarstwa. Liczba gatunków należących do karpiovatych występujących na terenie gospodarstw była zbliżona i wynosiła odpowiednio: „Przyborów” -11 gatunków, „Zator” -12, „Potasznia” – 10. Spośród karpiovatych, na terenie wszystkich gospodarstw występowały takie gatunki jak: czebaczek amurski (jego udział wynosił od 0,15%-24,64%), karaś (0,95-4,09%), karp (8,38-32,67%), lin (2,04-11,88%), płóc (1,9-20,25%) słonecznica (6,44-11,85%) oraz ukleja (1,98-13,5%). Okoń – przedstawiciel rodziny okoniowatych był również obecny w ekskrementach zebranych na terenie gospodarstw (2,48-19,91%), podobnie jak i szczupak, rodzina Esocidae (2,45-4,95) (Tab.1).

Obliczono wielkość ryb, które zostały ofiarami wydry, pochodzących z terenu gospodarstw rybackich. We wszystkich 3 gospodarstwach były to osobniki niewielkich rozmiarów. Na terenie GR Przyborów ich średnia długość wynosiła 6,1 cm, natomiast zakres długości wahał się od 2,8 cm (słonecznica) do 14,0 cm (karp). Największą średnią długość zanotowana u karpia (9,5 cm) natomiast najmniejszą u czebaczka amurskiego (5,1 cm). Średnia długość słonecznicy wynosiła 5,3 cm, uklei 5,5 cm, lina 5,6 cm, kiełbia 6,1 cm.

Na terenie RZD w Zatorze średnia długość ryb wynosiła 4,5 cm. Zakres długości ciał wahał się od 1,4 cm (karaś) do 14,3 cm (jaź). W przypadku karpia zakres ten wynosił od 3,3 do 9,8 cm, a najwięcej osobników (63,9%) znajdowało się w przedziale 6,0 - 6,9 cm. Przeciętna długość ciała uklei wynosiła 4,7 cm (zakres 2,2 - 11,5 cm), a płoci

4,3 cm (zakres 3,1 –10,1 cm). Jelec, kiełb i szczupak były gatunkami o największej średniej długości ciała, która wynosiła odpowiednio 9,3, 9,1 i 7,3 cm. Gatunkami o najniższej średniej długości ciała były: słonecznica (3,5 cm), świnka (3,8 cm) i karaś (4,2 cm)²⁶.

Ryby skonsumowane na terenie zimochowów w Potasznicy były osobnikami o średniej długości 6,9 cm, natomiast zakres ich długości wahał się od 1,4 cm (karaś) do 16,1 cm (płoc). Dla karpia zakres ten wynosił od 6,3 do 13,7 cm. Najwięcej osobników tego gatunku (63,2%) znajdowało się w przedziale 10,1-11,0 cm. Wielkość linów wahała się od 3,1 cm do 7,4 cm. Gatunkami o najniższej średniej długości były: jaź oraz świnka, ich średnia długość wynosiła 3,9 cm²⁷.

3. Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały wysoki udział ryb w diecie wydry w okresie jesienno – zimowym (od 94,3% do 100%), co zostało również zaobserwowane przez innych autorów na terenie naszego kraju. Jest to prawdopodobnie związane z ograniczonym dostępem w tym okresie do alternatywnych grup pokarmu^{28,29,30} a stawy hodowlane są terenami na których ten pokarm jest łatwo dostępny i występuje w dużym zagęszczeniu. Pod względem składu gatunkowego dieta wydry była do siebie zbliżona we wszystkich badanych gospodarstwach. Udział poszczególnych rodzin i gatunków ryb w diecie wynikał ze specyfiki hodowli ryb w stawach karpowych. Podstawą hodowli jest karp oraz inne gatunki ryb należące do rodziny karpowatych o znaczeniu gospodarczym, w zależności od gospodarstwa (np. jaź, karaś, lin). Oprócz nich w stawach hodowane są gatunki ryb drapieżnych np. szczupak. Udział pozostałych gatunków ryb należących do rodziny karpowatych, okoniowatych i innych w diecie wynika z ich obecności w stawach hodowlanych, do których przedostają się kanałami i dopływami oraz z ich obecności w wodach naturalnych znajdujących się w pobliżu gospodarstw.

²⁶ Wiśniowska L. *Wpływ wydry na produkcję ryb karpowatych na terenie stawów hodowlanych w rejonie Zatora*. Praca doktorska Uniwersytet Jagielloński, Kraków 2002.

²⁷ Orłowska L., Frankowska H. *Drapieżnictwo wydry na terenie zimochowów w Dolinie Baryczy*. Episteme 2013, 18. T.2: 35 – 42 .

²⁸ Klokowski J. *Otter *Lutra lutra* predation in cyprinid - dominated habitats*. Z. Säugetierkunde 1999, 64: 201-209.

²⁹ Lanszki J., S. Körmendi, C. Hancz and T. G. Martin. *Examination of some factors affecting selection of fish prey by otters (*Lutra lutra*) living by eutrophic fish ponds*. J. Zool., Lond. 2001, 255: 97-103.

³⁰ Wisniowska L. *Diet of the otter (*Lutra lutra*) in fish ponds in southern Poland*. J. Wildl. Res. 1996, 1(3): 272-277.

Wiele razy podkreślano, że wydry preferują gatunki ryb przebywające blisko brzegu w strefie litoralu, podczas gdy zdecydowanie rzadziej łowione są gatunki związane z głębszymi, otwartymi wodami^{31,32}.

W diecie wydry oprócz rodzimych gatunków ryb stwierdzono obecność czebaczka amurskiego, który jest zaliczany do inwazyjnych obcych gatunków. Jest to niewielkich rozmiarów ryba, której naturalnym środowiskiem bytowania są wody stojące i wolno-płynące Azji Południowo-Wschodniej. Na terenie naszego kraju zasiedla naturalne zbiorniki wodne, ciek i stawy rybne. Przez hodowców ryb, na stawach rybnych, uznawana jest za tzw. chwast rybi (biała ryba).

Czebaczek amurski trafił do Polski prawdopodobnie z Węgier wraz ze sprowadzonym materiałem hodowlanym w latach 90 XX r. i od tamtego czasu obserwuje się powiększanie arealu występowania tego gatunku³³. Dodatkowo do rozprzestrzeniania się czebaczka doprowadzają amatorzy wędkarze, którzy często mylą go z młodymi osobnikami amura i wpuszczają do swoich łowisk (Orłowska dane niepubl.)

Wydra jako oportunistą pokarmową konsumuje ten pokarm, który jest łatwo dostępny w danym środowisku. Ponieważ czebaczek amurski w zależności od gospodarstwa występował od 0,15 % w Zatorze, przez 13,37% w Potasznicy do prawie 25% w Przyborowie w diecie wydry to można przyjąć, iż jego udział w środowisku wodnym na tych terenach był również wysoki. Chociaż jest on gatunkiem niepożądanym w naszych wodach. Wydrę ze względu na jej zwyczaje pokarmowe i dużą plastyczność ekologiczną można uznać za bioindykatora ichtiofauny na terenie naszego kraju ponieważ jak wykazały badania jej dieta dobrze odzwierciedla zmiany jakie zachodzą w ichtiofaunie w wybranych środowiskach wodnych.

³¹ Kruuk H. *Otters ecology, behavior and conservation*. Oxford University Press 2006.

³² Orłowska L., Frankowska H. *Drapieżnictwo wydry na terenie zimochowów w Dolinie Baryczy*. *Episteme* 2013, 18. T.2: 35- 42 .

³³ Witkowski A. *NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – Pseudorasbora parva*. (www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/p/pseudorasbora-parva/pseudorasbora_parva.pdf) 2011.

Bibliografia

- Bekker D.L. and B.A. Nolet. *The diet of otters Lutra lutra in the Netherlands in winter and early spring*. Lutra. 1990. vol. 33.
- Brzeziński M., J. Romanowski, Ł. Kopczyński, E. Kurowicka. *Habitat and seasonal variations in diet of otters, Lutra lutra in eastern Poland*. Folia Zool. 2006, nr 55.
- Engelmann W. E., J. Fritzsche, R. Gunther and F. J. Obst. *Lurche und Kriechtiere Europas*. Neumann Verlag, Leipzig, 1985.
- Głowaciński Z.(red.). *Polska Czerwona Księga Zwierząt*. PWRiL, Warszawa 1992.
- Głowaciński Z., Okarma H., Pawłowski J., Solarz W. (red.). 2011. *Gatunki obce w faunie Polski. I. Przegląd i ocena stanu*. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków 2011.
- Hallet-Libois C. *Modulations de la strategie alimentaire d'un predateur: Eco-ethologie de la predation du martin-pecheur, Alcedo atthis (L. 1758), en periode de reproduction*. Ph. D. Diss. Facultes Universitaires Notre-Dame de la Paix-Namur. 1984.
- Horoszewicz L. *Wartości kości gardłowych dolnych jako kryteriów gatunkowego oznaczania ryb karpiowatych*. Rocz. Nauk Roln 1960, nr 75, B, 2.
- Kloskowski J. *Otter Lutra lutra predation in cyprinid - dominated habitats*. Z. Säugetierkunde 1999, nr 64.
- Krawczyk A. J., M. Skierczyński, P. Tryjanowski. *Diet of the Eurasian otter Lutra lutra on small watercourses in Western Poland*. Mammalia 2011, nr 75.
- Kruuk H. *Otters ecology, behaviour and conservation*. Oxford University Press 2006.
- Lanszki J., S. Körmendi, C. Hancz and T. G. Martin. *Egzamination of some factors affecting selection of fish prey by otters (Lutra lutra) living by eutrophic fish ponds*. J. Zool., Lond. 2001, nr 255.
- Libois R. M., C. Hallet-Libois i L. Lafontaine. *Le regime de la loutre Lutra lutra en Bretagne interieure*. Rev. Ecol. 1987, nr 42.

Mann R. H. K. i W. R. C. Beaumont. *The collection, identification and reconstruction of lengths of fish prey from their remains in pike stomachs*. Fish. Manage. 1980, nr 11.

Mason C. F. and S. M. Macdonald.. *Otters: ecology and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge 1986.

Orłowska L., Frankowska H. *Drapieżnictwo wydry na terenie zimochowów w Dolinie Baryczy*. Episteme 2013, nr 18. T.2.

Pucek Z. (ed.). *Klucz do oznaczania ssaków Polski*. PWN, Warszawa 1984.

Romanowski J., Zając T., Orłowska L. *Wydra – ambasador czystych wód*. Fundacja Wspierania Inicjatyw Ekologicznych Kraków 2010.

Solarz W. *Przyczyny i skutki inwazji biologicznych na świecie i w Polsce*. Studia i Materiały CELP w Rogowie 2012, R.14.33 (4).

Teerink B. J. *Hair of West-European mammals. Atlas and identification key*. Cambridge University Press, Cambridge 1991.

Webb J.B. *Otter spraint analysis*. An Occasional Publication of the Mammal Society, London. 1976.

Wise M. H. *The use of fish vertebrae in scats for estimating prey size of otters and mink*. J. Zool., Lond. 1980. nr 192.

Wisniowska L. *Diet of the otter (Lutra lutra) in fish ponds in southern Poland*. J. Wildl. Res. 1996, nr 1(3).

Wiśniowska L. *Wpływ wydry na produkcje ryb karpowatych na terenie stawów hodowlanych w rejonie Zatora*. Praca doktorska Uniwersytet Jagielloński, Kraków 2002.

Witkowski A. *NOBANIS –Invasive Alien Species Fact Sheet – Pseudorasbora parva*.
(www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/p/pseudorasbora-parva/pseudorasbora_parva.pdf) 2011.