

“Medicina Internacia Revuo estas sendependa diskutejo de tutmondaj medicinistoj. Ĝi aperas dufoje jare. La redakcio rezervas al si rajton mallongigi aŭ korekti la manuskriptojn. Reproduktoj kaj tradukoj estas permesataj nur kun indiko de la fonto.”

FROM THE EDITOR

Dear Readers,

Our MIR editorial board took another important step forward to strengthen our revue. Mr. Jan Lazur, who introduced the system which allows to submit articles for MIR digitally, took a great deal of work to adapt all citations of former MIR-editions to the requirements of POL-index, a database of scientific journals, which is very important for academic life in Poland. POL-index strives to collect information on all articles published in Polish scientific publications and citations within them. Based on this information the polish impact factor (IF) is determined, i.e. an important measure of the scientific importance of publications. To receive an IF in Poland certainly would be a great success, which might lead to being acknowledged by other international indexes.

To introduce all articles in POL-index, we ask all our authors to cite used literature according to the so-called ICMJE-recommendations (“Vancouver-Style”) from the 112th edition on, so e.g.

Smith M, Kowalski A, Johanson MK. Medicinal activity of Bacopa monnieri. Med Int Rev. 2013; 1(2): 54-62.

To finish this editorial we would like to congratulate cordially to Julinjo Farkas and Ludoviko Molnár, Hungary, who will have the pleasure to celebrate the 50th foundation anniversary of the Medical Esperanto-Group of Budapest in the coming year.

On this occasion, we would very much like to invite new authors to send their publications to MIR, and we will readily accept hints of our readers on how to further improve the quality of MIR.

*Professor Włodzimierz Opoka
Editor-in-Chief*

*Doctor Christoph Klawe
Vice-Editor-in-Chief*

*Professor Bożena Muszyńska
Vice-Editor-in-Chief*

“Medicina Internacia Revuo estas sendependa diskutejo de tutmondaj medicinistoj. Ĝi aperas dufoje jare. La redakcio rezervas al si rajton mallongigi aŭ korekti la manuskriptojn. Reproduktoj kaj tradukoj estas permesataj nur kun indiko de la fonto.”

REDAKCIAJ VORTOJ

Kara legantoj

Nia Redakta Komitato de MIR faris plian paŝon por fortigi nian revuon. La kreinto de la sistemo, kiu ebligas rete submeti artikolojn al MIR, s-ro Jan Lazur, faris tre gravan laboron kaj adaptis ĉiujn citaĵojn de pasintaj MIR-eldonoj tiel, ke ili povas enigitaj en datenbazon de sciencaj revuoj, kiu ege gravas por la akademia vivo en Pollando, la tiel nomatan POL-indekson (POL-index). La POL-indekso celas kolekti informojn pri artikoloj eldonitaj en polaj sciencaj revuoj kaj citaĵoj en ĉi tiuj artikoloj. Surbaze de la kolektitaj datenoj estos difinita la pola efikfaktoro, do mezuro de la scienca graveco de la publikaĵoj. Ricevi efikfaktoron en Pollando certe estus grava sukceso, kiu povus prepari agnoskon per aliaj internaciaj indeksoj.

Por enkonduki ĉiujn artikolojn en POL-indekson ekde de la 112-a numero de MIR ni petas ĉiujn aŭtorojn skribi citaĵojn laŭ la tiel nomitaj ICMJE-rekomendoj (“Vankuverostilo”), do ekzemple

Smith M, Kowalski A, Johanson MK. Medicinal activity of Bacopa monnieri. Med Int Rev. 2013; 1(2): 54-62.

Finante tiujn ĉi redakciajn vortojn ni elkore gratulas al gesinjoroj Julinjo Farkas kaj Ludoviko Molnár el Budapeŝto (Hungario), kiuj festas la 50-jarojn de la Budapeŝta Medicina Esperanto Fakgrupo. Samtempe ni elkore invitas novajn aŭtorojn sendi siajn artikolojn al MIR kaj atendas rimarkojn de legantoj, kiuj helpos nin plibonigi la kvaliton de MIR.

*Profesoro Włodzimierz Opoka
Ĉefredaktoro*

*Doktoro Christoph Klawe
Vic-Ĉefredaktoro*

*Profesorino Bożena Muszyńska
Vic-Ĉefredaktoro*

Medicina Internacia Revuo editorial office:

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical College,
Jagiellonian University in Kraków, Medyczna 9 Str., 30-688 Kraków, Poland

e-mail: **office@interrev.com**

Publishers:

Jagiellonian University in Kraków,
Faculty of Pharmacy
Medyczna 9 St. 30-688 Kraków, Poland

ZOZ Ośrodek UMEA SHINODA-KURACEJO
os. Alertyńskie 1-2
31-851 Kraków, Poland

e-mail: **wopoka@interrev.com**
umea@interia.pl

www: **https://umeaopoka.pl.tl**

Our readers can find us on our webpage: **www.interrev.com**

Declaration of the primary version can be found at **www.interrev.com**, or in the printed version

Editorial Board

Editor-in-chief

Professor Włodzimierz Opoka, *Poland*

Associate Professor Małgorzata

Vice-editor-in-chief

Professor Bożena Muszyńska, *Poland*

Paprocka-Borowicz, *Poland*

Doctor Christoph Klawe, *Germany*

Professor Bodnár Károly, *Hungary*

Operating Editors

Doctor Keyhan Sayadpour Zanjani,

Iran

Doctor Barbara Jasiewicz, *Poland*

Professor Jacek Sapa, *Poland*

Doctor Massimo Tusconi, *Italy*

Professor Jolanta Pytko-Polończyk,

Poland

Executive Editors

Professor Stanisław Majewski, *Poland*

Doctor Małgorzata Frankowska,

Poland

Professor E. James Lieberman, *USA*

Doctor Anna Sadakierska-Chudy,

Poland

Professor Eva Bojaghijeva, *Bulgaria*

Doctor Imre Ferenczy, *Hungary*

Professor Andrzej Kierzek, *Poland*

Doctor Jadwiga Kuciel-Lewandowska,

Poland

Professor Maciej Tešiorowski, *Poland*

Professor Ewa Poleszak, *Poland*

Technical Editor

Doctor Joanna Piotrowska, *Poland*

Professor Dariusz Adamek, *Poland*

Anna Krzywda, *Poland*

Doctor Andrzej Moniczewski, *Poland*

Type setting

Jacek Lelek, *Poland*

Professor Istvan Zupko, *Hungary*

Page makeup

Jan Lazur, *Poland*

Doctor hab. József Gál, *Hungary*

BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYPORE MUSHROOMS: *LAETIPORUS SULPHUREUS*, *FOMITOPSIS BETULINA*, AND *TRAMETES VERSICOLOR*

Oryg. Działanie biologiczne grzybów nadrewnowych: *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina* i *Trametes versicolor*

ZIĘBA Piotr ¹, KAŁA Katarzyna ², SMOLEŃ Zofia ², LAZUR Jan ², SUŁKOWSKA-ZIAJA Katarzyna ², SĘKARA Agnieszka ¹, MUSZYŃSKA Bożena ^{2*}

¹Department of Vegetable and Medicinal Plants, University of Agriculture in Kraków, Kraków, Poland

²Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

Article submitted: 11.11.2018; accepted: 20.11.2018

Abstract

Polypore mushrooms from the Basidiomycota taxon are used in medicine. *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina* and *Trametes versicolor* are species with proven antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer effects. Well-known secondary metabolites produced by woodworm mushrooms are polysaccharides, phenolic compounds, indole compounds, terpenes, vitamins and bioelements. Isolated compounds and extracts of fruiting bodies and mycelial cultures have found application in the treatment of cancer and prevention of diseases of the cardiovascular system, diabetes and microbial infections.

The aim of this work was to demonstrate a broad spectrum of biological activity of three selected species of polypore mushroom: *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina* and *Trametes versicolor*.

Keywords: *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina*, *Trametes versicolor*, biological activity of medicinal mushrooms

Wstęp

Grzyby wielkoowocnikowe są cenione za walory smakowe, aromat, wartości odżywcze oraz zawarte w nich związki aktywne biologicznie [1]. Grzyby nadrewnowe (wiele z nich to huby, więc są potocznie zwane hubami), należą do grzybów wielkoowocnikowych. W Polsce są reprezentowane przez około trzysta gatunków, w tym także jadalnych [2]. Odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów, gdzie rozkładają martwą materię organiczną i uczestniczą w obiegu materii oraz pierwiastków w przyrodzie.

Właściwości lecznicze grzybów znane były

już w starożytności i jako pierwszy opisał je Hipokrates w 400 r p.n.e [3]. Wraz z rozwojem cywilizacji pozycja grzybów w medycynie jest coraz znacniejsza. Początkowo stosowane jedynie w ludowej medycynie, szczególnie azjatyckiej, z czasem zostały docenione w krajach zachodnich. Przykładem może być polisacharyd lentinan z *Lentinula edodes* czy krestin – pozyskiwany z *Trametes versicolor*, zarejestrowane jako oficjalne leki w terapii onkologicznej [4]. Coraz bardziej doceniana jest wartość dietetyczna grzybów jadalnych i zostały one zaliczone do żywności funkcjonalnej [3, 5].

Dobrze poznanymi wtórnymi metabolitami produkowanymi przez grzyby nadrewnowe są polisacharydy, związki fenolowe i indolowe, terpeny,

*Corresponding Author: Bożena Muszyńska; muchon@poczta.fm

sterole oraz nienasycone kwasy tłuszczowe [6]. Wykorzystywane w leczeniu są ich właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, antyoksydacyjne. Wyizolowane związki oraz ekstrakty z owocników i hodowli mycelialnych znalazły zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych oraz prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy czy zakażeń drobnoustrojami [1]. Grzyby mają również zdolność pobierania i akumulowania pierwiastków ze środowiska, przez co jadalne gatunki mogą być brane pod uwagę, jako dobre źródło makro- i mikroelementów. Szczególnie istotnymi mikroelementami są miedź, cynk i żelazo, ponieważ wchodzi one w skład enzymów i regulują wiele procesów biochemicznych, koniecznych do utrzymania fizjologicznych funkcji organizmu człowieka [7,8]. Wśród makroelementów na uwagę zasługuje magnez, którego bezpośrednie działanie wazodylatacyjne może znaleźć zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego [9].

Zdolność akumulacji pierwiastków przez grzyby została udokumentowana w wielu pracach naukowych. Gromadzenie biopierwiastków w owocnikach grzybów może zostać wykorzystane w leczeniu dietetycznym ich niedoborów. Celem pracy było przedstawienie szerokiego spektrum aktywności biologicznej wybranych trzech gatunków grzybów nadrewnowych: *L. sulphureus*, *F. betulina*, i *T. versicolor*.

1. Działanie antyoksydacyjne *Laetiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina*, *Trametes versicolor*

W organizmie człowieka procesy utleniania (oksydacji) są związane z procesami metabolicznymi oraz funkcją układu odpornościowego. Cząsteczka tlenu ma charakter wolnego rodnika – zawiera dwa niesparowane elektrony i może się łączyć z innymi atomami tworząc reaktywne formy tlenu takie jak: anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, anion hydroksylowy czy nadtlenek wodoru. W trak-

cie procesów fizjologicznych reaktywne formy tlenu są wytwarzane w małych ilościach, a obecne mechanizmy ich unieczynnienia chronią komórki przed potencjalnym uszkodzeniem. Powstawanie wolnych rodników jest również indukowane przez czynniki zewnętrzne takie jak np. dym tytoniowy, ozon, sytuacje stresowe. W wysokich stężeniach wolne rodniki, które przekraczają zdolność antyoksydacyjną mechanizmów neutralizacji, reaktywne formy tlenu są szkodliwe dla organizmu człowieka i stan ten jest nazwany stresem oksydacyjnym. Mogą one wówczas upośledzać funkcję komórek poprzez uszkodzenie kwasów nukleinowych, białek lub peroksydację lipidów. Uważa się, że aktywność wolnych rodników powoduje procesy starzenia się, a także chorób neurodegeneracyjnych, nowotworów, choroby wieńcowej, zaćmy i wielu innych schorzeń. Rolę ochronną przed stresem oksydacyjnym pełnią przeciwutleniacze, które poprzez reakcję z wolnymi rodnikami, stabilizują je i znoszą ich reaktywność. Endogennymi antyoksydantami są głównie białka enzymatyczne np. peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa oraz peptydy, np. glutation o strukturze tripeptydu. Egzogennymi przeciwutleniaczami są witaminy – kwas askorbinowy, tokoferole, polifenole czy β -glukany [10].

Negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na zdrowie człowieka wraz z rosnącą liczbą czynników zewnętrznych sprzyjającym jego indukowaniu, skłania do poszukiwania nowych źródeł egzogennych antyoksydantów. W świetle badań nad składem i antyoksydacyjnymi właściwościami grzybów można wnioskować, że mogą one zmniejszać aktywność wolnych rodników. Obiecujące wydaje się wykorzystanie jadalnych gatunków grzybów, jako źródła antyoksydantów dostarczanych w diecie i pochodzących z nich preparatów.

Dużą grupą związków występujących w owocnikach oraz mycelium gatunku *L. sulphureus* są polisacharydy.

W owocnikach *L. sulphureus* (żółciak siarkowy) (Fotografia 1.) obecne są rozpuszczalne w wodzie polisacharydy.



Fotografia 1. *Leatiporus sulphuerus* (Bożena Muszyńska)

Jednym z nich jest letiporan A o strukturze rozgałęzionego galaktomannoglukanu. Wykazano jego silne działanie antyoksydacyjne. Badania wpływu letiporanu A na peroksydację lipidów potwierdziły jego znaczące działanie hepatoprotective. W przeprowadzonym eksperymencie, w którym podano letiporan szczurom z zapaleniem wątroby indukowanym chloroformem, zaobserwowano spadek stężenia markerów stresu oksydacyjnego, co potwierdziło działanie tego związku [11].

Antyoksydacyjna aktywność wodnych i alkalicznych ekstraktów otrzymanych z owocników *L. sulphureus* wynika najprawdopodobniej z obecności w nich α -glukanu [12].

Turkoglu i wsp. porównali aktywność etanolowego wyciągu z owocników *L. sulphureus* z innymi związkami o potencjale antyoksydacyjnym – α -tokoferolem i BHT (butylowany hydroksytoluen). W tym eksperymencie kwas linolenowy poddano kolejno utlenianiu w obecności ww. związków, jako przeciwutle-

niaczy. Dla wyciągu wykazano znaczącą aktywność, która wzrastała ze zwiększającym się stężeniem zastosowanego ekstraktu. Ten kierunek działania przypisuje się związkom fenolowym, których znaczną zawartość potwierdzono również w tym przypadku. W piśmiennictwie naukowym istnieją dowody na protekcyjne działanie związków polifenolowych w reakcjach utleniania lipidów. Dodatkowo wykazywane jest ich działanie antymutagenne i hamujące karcynogenezę [13]. Z kolei w innych eksperymentach wykazano, że aktywność antyoksydacyjna metanolowego ekstraktu z owocników *L. sulphureus* jest znacznie wyższa niż analogicznego wyciągu przygotowanego z mycelium. Wynik ten koreluje ze znacząco większą zawartością polifenoli w owocnikach [14].

Owocniki *Fomitopsis betulina* (białoporek brzozy) są bogate w związki o potwierdzonej aktywności antyoksydacyjnej (Fotografia 2.).

Należą do nich: β -karoten, likopen, tokoferole, kwas askorbinowy i szereg związków



Fotografia 2. *Fomitopsis betulina* (Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

z grupy flawonoidów oraz polifenoli. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a całkowitą ilością związków fenolowych w metanolowo-acetonowych wyciągach z *F. betulina* zebranego z naturalnych stanowisk w Polsce [15].

Stwierdzono, że polifenole wykazują zdolność neutralizacji wolnych rodników, zapobiegają utlenianiu lipidów oraz stabilizują związki podatne na utlenianie – w tym witaminę C [16].

W przeprowadzonym teście DPPH dla metanolowego wyciągu z owocników *F. betulina* wykazano jego zdolność do neutralizowania wolnych rodników.

W odniesieniu do wodnych ekstraktów z owocników *T. versicolor* (wrośniak różnobarwny), zawierających mieszaninę polisacharydów, związków fenolowych oraz białek, wykazano znaczące działanie antyoksydacyjne (Fotografia 3.).



Fotografia 3. *Trametes versicolor* (Piotr Zięba)

Zostało ono udowodnione na podstawie pomiaru całkowitej zdolności antyoksydacyjnej metodą DPPH (redukcji rodnika), badania hamowania peroksydacji lipidów i zdolności chelatowania jonów żelaza(II) w reakcji Fentona – rozkładu nadtlenu wodoru z uwolnieniem rodnika hydroksylowego. Wiązanie jonów w kompleksy hamuje tę reakcję i zmniejsza ilość wytwarzanych wolnych rodników. Wytworzone w reakcji rodniki mogą utleniać lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL). Powstające cząsteczki LDL-ox uszkodzają śródbłonek naczyń i prowadzą do aktywacji makrofagów, kolejno stymulując powstawanie komórek piankowatych. Uczestniczą tym samym w procesie tworzenia blaszek miażdżycowych. Wskazuje to na możliwość wykorzystania wodnych ekstraktów *T. versicolor* w prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego [17].

W owocnikach i hodowlach mycelialnych *T. versicolor* obecne są egzopolisacharydy o właściwościach antyoksydacyjnych. Udowodniono, że aktywność ta rośnie ze zmniejszającą się masą cząsteczkową. Szczególnie interesujący zdaje się być wyizolowany oraz scharakteryzowany w 2017 roku tramesan. Związek ten ma strukturę rozgałęzionego polisacharydu o masie cząsteczkowej około 23 kDa. Jest nazwany proantyoksydantem, a jego działanie polega na modyfikacji ekspresji genów uczestniczących w procesach stresu oksydacyjnego. Prawdopodobnie łączy się ze specyficznymi receptorami, które kolejno aktywują szlaki odpowiedzi antyoksydacyjnej. Ekstrakty z *T. versicolor* zawierające frakcje polisacharydowe hamują produkcję mykotoksyny – aflatoksyny B1 wytwarzanej przez *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*. Związkom tym przypisuje się wpływ na ekspresję genów odpowiadających za procesy stresu oksydacyjnego, który jest czynnikiem regulującym tworzenie toksyn przez grzyby [18, 19].

Wśród związków antyoksydacyjnych pochodzenia grzybowego znajdują się również związki fenolowe. Ustalono, że najwięcej polifenoli znajduje się w ekstraktach wodnych. Ich ilość jest niższa w ekstraktach etanolowych, na-

tomiasz metanolowe ekstrakty są najuboższe w te związki. Mechanizm aktywności antyoksydacyjnej polega na wychwycie wolnych rodników przez związki znajdujące się w ekstraktach grzybowych, a przede wszystkim związki fenolowe [19, 20].

2. Hipoglikemizujące właściwości gatunku *Laetiporus sulphureus* i *Trametes versicolor*

Cukrzyca jest schorzeniem, którego głównym objawem jest hiperglikemia. Obserwuje się ją w cukrzycy typu pierwszego, wywołanej upośledzeniem wydzielania insuliny przez trzustkę, a także w cukrzycy typu drugiego, związanej z insulinoopornością. Częstość występowania cukrzycy typu drugiego wzrasta w populacji w związku ze zmianami w stylu życia – ograniczeniem aktywności fizycznej oraz nieprawidłową dietą. Otyłość jest czynnikiem ryzyka cukrzycy, więc dążenie do zmniejszenia masy ciała jest jednym z działań prewencyjnych oraz częścią terapii w tym schorzeniu. Nieleczona lub źle leczona cukrzyca może skutkować rozwojem zagrażających życiu neuropatii, nefropatii lub angiopatii. Obecnie stosowane leki obciążone są szeregiem działań niepożądanych. Naturalne surowce o potencjale antydiabetycznym są przedmiotem licznych prac naukowych. Do tej pory ustalono, że niektóre surowce pochodzenia roślinnego i ich aktywne składniki mogą okazać się skuteczne w leczeniu cukrzycy typu II. Działanie przeciwcukrzycowe wykazano dla związków fenolowych, terpenoidów, alkaloidów występujących w świecie roślin. Wśród grzybów znane są gatunki, dla których wykazano wpływ na gospodarkę węglowodanową i lipidową, należą do nich między innymi opisowywany *L. sulphureus* i *T. versicolor* [21].

Egzopolisacharydy gatunku *L. sulphureus* wykazują działanie hipoglikemizujące. Przeprowadzono eksperyment, w którym podano szczurom podskórnie streptozocynę, a następnie doustnie egzopolisacharydy grzybowe. Zaobserwowano spadek średniego stężenia glukozy w osoczu o 43,5% w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo doszło do zmniejszenia stężenia cholesterolu i triglicerydów do zakresu normy [22]. Prawdopodobnym mechanizmem odpowiedzialnym za

uwalnianie insuliny przez egzopolisacharyd (EPS) jest wiązanie tych związków z recepto-rami dla sulfonilomocznika w komórkach β -wysp trzustkowych z następczym zamknięciem kanałów potasowych, depolaryzacją błony i napływem jonów wapnia [23]. EPS zwiększa proliferację komórek β -wysp trzustkowych oraz nasila ich regenerację, dodatkowo zwiększa aktywność enzymów o działaniu antyoksydacyjnym, takich jak: katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza glutationowa [22].

Wśród egzopolisacharydów znajdujących się w owocnikach *T. versicolor* są związki o działaniu hipoglikemizującym. Należą do nich frakcje oznaczone, jako ePS-F2-1, ePS-F3-1, ePS-F4-1, które są silnymi inhibitorami enzymu α -glukozydazy. Największą aktywność spośród nich, wykazuje frakcja ePS-F4-1. α -glukozydaza jest enzymem z grupy hydrolaz i uczestniczy w procesie rozkładu polisacharydów i oligosacharydów do monosacharydów w przewodzie pokarmowym. Zahamowanie aktywności tego enzymu skutkuje spadkiem wchłaniania glukozy w jelitach oraz zmniejszeniem glikemii, głównie poposiłkowej [24, 25].

Wpływ na gospodarkę węglowodanowo-lipidową stwierdzono dla wyizolowanego z *T. versicolor* metylowanego cyklicznego heptapeptydu – ternatyny. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach wykazano, że ternatyna podana podskórnie działa hipoglikemizująco. Ponadto zaobserwowano, że hamuje ona akumulację tłuszczu w adipocytach, wpływa na ekspresję genów regulujących lipogenezę i poprawia wątrobowy metabolizm triglicerydów. Po podaniu doustnym tego związku, zaobserwowano zmniejszenie masy podskórnej i trzewnej tkanki tłuszczowej. Działanie to może mieć znaczenie w leczeniu cukrzycy typu drugiego, w której towarzysząca otyłość nasila insulinooporność [26].

3. Aktywność przeciwzapalna *Laetiporus sulphureus* i *Fomitopsis betulina*

Zapalenie jest biologiczną odpowiedzią

organizmu na różne czynniki, takie jak uszkodzenia komórek czy zakażenia wywołane drobnoustrojami chorobotwórczymi. Reakcja zapalna przejawia się wystąpieniem między innymi gorączki, bólu, obrzęku. Te zjawiska zwiększają zdolności obronne organizmu, ale ich duże nasilenie lub długotrwałe występowanie może być niebezpieczne dla zdrowia. Przykładem jest gorączka, której wystąpienie nasila aktywność enzymów, natomiast zbyt wysoka może prowadzić nawet do zgonu. Spośród stosowanych współcześnie leków przeciwzapalnych, najpowszechniej używane niesteroidowe leki przeciwzapalne wykazują liczne skutki uboczne i ograniczenia w stosowaniu. Również glikokortykosteroidy i inne leki wykazujące aktywność przeciwzapalną są obarczone potencjalnymi działaniami niepożądanymi. Poszukiwane są zatem alternatywy dla leków o tym kierunku działania.

Znane są surowce roślinne wykazujące aktywność przeciwzapalną, ale również grzyby zostały zbadane pod względem tego profilu działania oraz zawartości substancji wykazujących potencjał przeciwzapalny [27].

W badaniach przeprowadzonych przez Alquini potwierdzono obecność w owocnikach *L. sulphureus* liniowego, nierozpuszczalnego w wodzie β -1,3-glukanu – laminaranu oraz heteropolisacharydu – fukogalaktomannanu. Heterogalaktany *L. sulphureus* mają budowę podobną do heterogalaktanów występujących w pozostałych gatunkach Basidomycota, lecz różnią się podstawnikami w łańcuchach bocznych. W owocnikach innych gatunków występują też reszty α -D-galaktopiranozolowe połączone z łańcuchem głównym wiązaniem 1 \rightarrow 6. W badanym gatunku reszty α -D-galaktopiranozolowe są podstawione przez α -L-mannopiranozylo-L-fukopiranoil, α -D-mannopiranozyl oraz reszty α -L-fukopiranoilowe w pozycji 2 i 3 [27].

Dla egzopolisacharydów grzybowych wykazano działanie przeciwzapalne. Związki te indukowane lipopolisacharydem hamują wytwarzanie mediatorów prozapalnych – tlenku azotu(II), prostaglandyny PGE₂ oraz TNF- α w komórkach mikrogleju BV2, a nie stwierdzono natomiast ich działania cytotoksycznego. Tlenek azotu(II) jest

wytwarzany przy udziale enzymu – indukowanej syntazy tlenu azotu(II) (iNOS). Ma wiele funkcji biologicznych, między innymi uczestniczy w regulacji wazodylatacji, ale jego nadprodukcja jest związana z inicjacją i utrzymaniem procesu zapalnego. Prostaglandyna E₂ jest jednym z końcowych produktów szlaku kwasu arachidonowego i powstaje przy udziale indukowanej formy enzymu cyklooksigenazy – 2 (COX-2). Aktywność COX-2 jest szczególnie nasiloną w miejscach, gdzie występuje stan zapalny objawiający się obrzękiem. Kluczowym regulatorem ekspresji genów odpowiedzialnych za szlaki indukcji zapalenia jest jądrowy czynnik NF-kB. Wykazano, że egzopolisacharydy *L. sulphureus* hamują indukowane przez LPS wytwarzanie NO, PGE₂ oraz TNF- α poprzez inhibicję szlaku NF-kB. Nadmierna ekspresja czynników prozapalnych w komórkach mikrogleju jest czynnikiem, który może wywołać uszkodzenie neuronów i w konsekwencji doprowadzić do choroby Alzheimerera, choroby Parkinsona czy stwardnienia rozsianego. W związku z aktywnością przeciwzapalną egzopolisacharydów, ich stosowanie jest obiecującą alternatywą dla współczesnych terapii chorób neurodegeneracyjnych [28].

Z gatunku *F. betulina* wyizolowano sześć biologicznie czynnych związków triterpenowych, pochodnych lanostanu – w tym kwas poliprenowy A, C. Ich działanie przeciwzapalne jest związane z hamowaniem aktywności enzymu 3- α -dehydrogenazy hydroksysteroidowej oraz cyklooksigenazy-1. Taki sam efekt obserwowano *in vivo*, w przeprowadzonym eksperymencie na grupie myszy cierpiących na zapalenie uszu. Wszystkie z badanych związków hamowały stan zapalny oraz niwelowały powstały obrzęk. Spośród analizowanych związków triterpenowych, dwa wykazywały aktywność przeciwzapalną silniejszą od indometacyny.

Dodatkowo dla tych związków stwierdzono zdolność do hamowania hialuronidazy [29].

4. Aktywność przeciwnowotworowa i zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej

Laetiporus sulphureus, Fomitopsis betulina i Trametes versicolor

Jednym z kierunków działania, które ma szczególne znaczenie dla leczenia, jest poszukiwanie związków o aktywności przeciwnowotworowej. We współczesnej medycynie chińskiej grzyby należące do *Basidiomycota* są powszechnie stosowane, jako uzupełnienie terapii przeciwnowotworowej. Dostępne są na rynku preparaty zawierające schizofylan (SGP) izolowany z *Schizophyllum commune*, lentinan z *Lentinus edodes* czy polisacharyd Krestin (PSK) i polisacharydopeptyd (PSP) z *Coriolus versicolor*.

Aktywność przeciwnowotworowa może być wynikiem bezpośredniego cytotoksycznego lub antyproliferacyjnego działania związków aktywnych na komórki zmienione nowotworowo. Jedną z cech takich komórek jest fakt, że nie są one rozpoznawane przez układ immunologiczny, zatem nie mogą być unieczynnione przez mechanizmy obronne organizmu człowieka. Dodatkowo chemioterapia obciąża układ odpornościowy, zmniejszając jego zdolności obronne jednocześnie zwiększając podatność na infekcje. W świetle tych faktów jest zasadne włączanie do terapii związków o właściwościach immunomodulujących.

Współczesne metody leczenia przeciwnowotworowego takie jak chemio- czy radioterapia są obarczone wieloma działaniami ubocznymi. Zastosowanie substancji skutecznie usuwającej działania niepożądane oraz nie wchodzącej w interakcje ze stosowanymi lekami oraz wykazującej odpowiedni profil bezpieczeństwa znacznie zwiększa standard życia chorego. Oprócz syntetycznych leków, dobre efekty przynosi stosowanie preparatów zawierających ekstrakty pozyskiwane z grzybów.

Udokumentowano wiele danych potwierdzających skuteczność tych tradycyjnie stosowanych surowców. W obliczu wzrastającej liczby nowotworów w populacji człowieka wykorzystanie grzybów daje nadzieję na znalezienie skutecznej i bezpiecznej terapii [29].

W etanolowych wyciągach z owocników *L. sulphureus* stwierdzono obecność związków triter-

penowych pochodnych lanostanu, między innymi kwasu eburonowego. Wykazano dla nich działanie cytotoksyczne, przy czym najsilniejszą aktywność przypisuje się acetylowej pochodnej kwasu eburonowego. Ma ona zdolność indukowania apoptozy poprzez aktywację kaspazy 3 oraz degradację polimerazy ADP-glukozy, enzymu uczestniczącego w procesach naprawy DNA. Przeprowadzono badania, w celu określenia mechanizmu cytotoksyczności tych związków. Komórki ludzkiej białaczki szpikowej poddano działaniu wyżej wymienionych kwasów triterpenowych i zaobserwowano obecność ciał apoptotycznych. Potwierdziło to, że działanie cytotoksyczne przebiega według mechanizmu indukcji apoptozy [30].

Z gatunku *L. sulphureus* pasożytującego na robinii akacjowej (*Robinia pseudacacia*) wyizolowano związek – letirobinę o silnym działaniu cytotoksycznym. Wnika ona do komórek nowotworowych, gdzie hamuje końcowe etapy mitozy i wywołuje apoptozę [31].

Cytotoksyczne właściwości wykazują również związki: egonol, demetoksyegonol wyizolowane z *L. sulphureus* var. *miniatur*. W warunkach *in vitro* potwierdzono ich działanie cytotoksyczne wobec ludzkich komórek raka żołądka [22].

Kolejną frakcją polisacharydów, która została wyizolowana z opisywanego gatunku są związki nierozpuszczalne w wodzie, natomiast rozpuszczalne w zasadach i są to latiglukan I o strukturze liniowego β -1,3-glukanu oraz latiglukan II i latiglukan III. W badaniach wykazano ich aktywność antyproliferacyjną oraz hamującą wzrost tkanki nowotworowej, co wskazuje na to, że gatunek ten jest obiecującym źródłem do produkcji leków przeciwnowotworowych [32]. W owocnikach obecne są także polisacharydy o strukturze α -1,3-glukanu. Badania ich karboksymetylowanych pochodnych dokumentują działanie modulujące metabolizm mitochondrialny oraz cytotoksyczny wobec komórek zmienionych nowotworowo, jednakże ich zastosowanie u człowieka wymaga dalszych badań [33].

W badaniach *in vitro* określających aktywność wyciągu eterowego z *Fomitopsis betulina* wykazano jego właściwości cytotoksyczne. Na podstawie badań z wykorzystaniem ludzkich komórek nowotworowych stwierdzono, że działa on najsilniej na komórki raka tarczycy i neuroblastomy, natomiast słabiej na komórki raka piersi, szyjki macicy i krtani. Stopień zahamowania podziałów komórkowych zwiększał się ze wzrostem dawki oraz czasu działania i następował poprzez zahamowanie fazy S cyklu komórkowego. Prawdopodobnie ten efekt działania jest związany z występowaniem w ekstrakcie związków z grupy triterpenów. W ekstrakcie wykazano obecność kwasu poliprenowego A i B i ich pochodnych oraz fitosterolu i neosterolu. Triterpeny są związkami o udowodnionym działaniu cytotoksycznym [34].

Etanolowe wyciągi z owocników *F. betulina* zostały zbadane pod względem ich aktywności przeciwnowotworowej. Wykazano, że hamują proliferację i migrację komórek nowotworowych, szczególnie komórek raka płuc. Natomiast wodne wyciągi z owocników *F. betulina* hamowały wzrost komórek raka płuca, gruczolaka okrężnicy i glejaka. W badaniach porównujących aktywność wyciągów z owocników pozyskiwanych z naturalnych siedlisk i mycelium pozyskanego metodami biotechnologicznymi, wykazano ich zbliżone działanie. Mycelia pozyskane w warunkach kontrolowanych mogą zatem być wykorzystane w celu wytwarzania standaryzowanych preparatów o aktywności porównywalnej do tych wytwarzanych z grzybów rosnących w środowisku naturalnym [35].

Oprócz związków triterpenowych, działanie przeciwnowotworowe wykazują również polisacharydy. Z owocników *F. betulina* wyizolowano polisacharydy o strukturze α -(1-3)-D-glukanu. Zbadano ich karboksymetylowane pochodne i wykazano, że upośledzają one selektywnie metabolizm mitochondrialny komórek zmienionych nowotworowo. Nie wywierają jednak wpływu na zdrowe komórki, co daje szansę na wykorzystanie ich w celowanej terapii onkologicznej [33].

Stwierdzonym działaniem ekstraktów opisywanego gatunku, które potencjalnie może zostać wykorzystane w onkologii jest hamowanie ak-

tywności metaloproteinaz (MMP). Są to enzymy, które spełniają różne funkcje biologiczne, w tym np. degradują białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Odpowiadają za utrzymanie homeostazy w tkankach organizmu, wpływając na przebieg procesu angiogenezy, embriogenezy i remodelingu. W przebiegu chorób nowotworowych, Alzheimerera oraz schorzeń układu sercowo-naczyniowego została potwierdzona nadmierna aktywność tej grupy enzymów [36]. Za hamowanie MMP przez ekstrakty z białoporka brzozonego odpowiadają związki triterpenowe (kwas poliprenowy C) oraz (E)-2-(4-hydroksy-3-metylo-2-butenylo)-hydro-chinon. W celu określenia potencjału przeciwnowotworowego ekstraktu z *F. betulina* przeprowadzono badania, w tym z udziałem zwierząt. Wykazano w nich, że ekstrakty z *F. betulina* zastosowane we wczesnym stadium choroby nowotworowej, jako leczenie uzupełniające, znacząco zmniejszyły tworzenie mikroprzerzutów i postęp choroby [37].

Związkami o aktywności przeciwnowotworowej, których obecność wykazano w gatunku *T. versicolor* są polisacharydy połączone w kompleksy z białkami [20].

Dobrze poznanym związkiem z tej grupy, obecnym w owocnikach *T. versicolor* jest polisacharydopeptyd (PSP). Część białkowa PSP składa się z dwudziestu aminokwasów, a część cukrowa ma strukturę β -glukanu [38]. Wykazuje on szereg aktywności, które mogą zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej. Należy do nich: immunomodulacja, hamowanie proliferacji komórek, blokowanie cyklu komórkowego, regulacja ekspresji genów, indukcja apoptozy komórek białaczki szpikowej oraz zmniejszenie działań niepożądanych chemioterapii. W 2011 roku opublikowano wyniki badań, w których wykazano, że PSP może być skuteczny w prewencji raka prostaty [38]. W przypadku transgenicznych myszy, których dietę wzbogacono o PSP wyizolowany z *T. versicolor* nie zaobserwowano spontanicznego rozwoju guzów raka prostaty. Udowodniono, że działanie to jest wynikiem niszczenia komórek macierzystych nowotworu

(CSC). Jest to szczególnie istotne, ponieważ komórki te, ze względu na długą żywotność, zdolność naprawy DNA oraz odporność na apoptozę, nie są niszczone podczas chemioterapii. Uważa się, że właśnie one odpowiadają za formowanie przerzutów i nawroty choroby. Zatem znalezienie skutecznego środka niszczącego komórki macierzyste może być przełomowym odkryciem prowadzącym do całkowitej remisji choroby [38, 39]. Dla PSP wykazano również działanie antyproliferacyjne. Udowodniono, że związek ten hamuje cykl komórkowy i kieruje komórki nowotworowe na szlak apoptozy oraz zakłóca przebieg fazy S cyklu komórkowego, aktywizując tym działanie leków przeciwnowotworowych takich jak: cyklofosfamid, doksorubicyna, etopozyd i kamptotecyna [40]. Dla tego związku wykazano wiele działań w zakresie immunomodulacji takich jak: aktywowanie makrofagów, przy równoczesnym nasileniu fagocytozy ciał obcych oraz aktywacji limfocytów T cytotoksycznych. Związek ten zmniejsza immunosupresyjne działanie leków przeciwnowotworowych, immunosupresję indukowaną przez guzy oraz skutki uboczne radioterapii. Działanie immunomodulujące PSP zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* i *in vivo*, a wynika ono z pobudzenia mechanizmów odporności wrodzonej oraz aktywacji transkrypcji genów kodujących cytokiny prozapalne. Na poziomie molekularnym, PSP łączy się z receptorami Toll-podobnymi, aktywując wyżej wymienione procesy. Stwierdzono, że pobudza on układ immunologiczny poprzez wzrost sekrecji cytokin (IL-2, IL-8, IL-12), interferonu γ , czynnika wzrostu granulocytów (G-CSF) oraz czynnika wzrostu makrofagów (GM-CSF).

Ważną właściwością PSP z punktu widzenia stosowania w leczeniu jest znikome działanie toksyczne. W badaniach na myszach i szczurach wykazano, że długotrwałe przyjmowanie PSP, nawet w bardzo dużych dawkach, nie wywiera działania toksycznego, nie wpływa na rozrodczość ani nie wykazuje działania mutagennego [29].

Kolejny związek białkowo-polisacharydowy, występujący w *T. versicolor*, którego budowa i funkcja jest dobrze poznana to Polisacharyd K (PSK, Krestin). W 1976 r. został oficjalnie zatwier-

dzony w Japonii jako lek przeciwnowotworowy stosowany w raku piersi, płuc i przewodu pokarmowego [20]. Ponownie zbadano jego aktywność w 1989 r, po czym zatwierdzono jego stosowanie w połączeniu z chemioterapią w przypadku raka żołądka i jelita grubego [4]. Wykazano obecność trzech podstawowych mechanizmów biologicznej aktywności tego polisacharydu. Pierwszym z nich jest bezpośrednie działanie na komórki nowotworowe, które obejmuje hamowanie proliferacji i indukcję apoptozy. W licznych badaniach przeprowadzonych na różnych liniach komórkowych wykazano, że hamująca aktywność PSK dotyczy tylko niektórych nowotworów. Szczególną wrażliwość na działanie polisacharydu wykazano wobec różnych typów białaczki i chłoniaka. Silny efekt hamujący wzrost wykazano też wobec komórek raka żołądka. Nastąpiło w nich zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 z towarzyszącym wzrostem ekspresji kaspazy 3 [4]. Udowodniono też, że PSK hamuje angiogenezę. W badaniach przeprowadzonych na szczurach oraz ludzkich komórkach śródbłonna naczyń wynika, że mechanizm ten polega na łączeniu się PSK z czynnikiem wzrostu fibroblastów. Czynnikiem ten traci wówczas zdolność indukcji proliferacji, co skutkuje zatrzymaniem procesu tworzenia naczyń. W badaniach *in vitro* wykazano również zahamowanie zdolności przetrwania dla linii komórkowych raka trzustki i żołądka. Hamujący wpływ dotyczył każdego etapu w procesie tworzenia przetrzutu [4]. Dwa kolejne mechanizmy aktywności biologicznej dotyczą regulacji funkcji układu immunologicznego. Stwierdzono, że PSK neutralizuje immunosupresyjne czynniki wytwarzane przez nowotwór, a także te indukowane chemio- lub radioterapią oraz aktywuje komórki układu immunologicznego m.in. limfocyty w sposób bezpośredni lub pośrednio przez produkcję cytokin [4].

Przeprowadzono ponad trzydzieści badań klinicznych, potwierdzających terapeutyczne właściwości wodnego wyciągu *T. versicolor* podawanego doustnie. Zastosowanie ekstraktu

spowodowało znaczną poprawę ogólnego stanu zdrowia i samopoczucia oraz wzrost wskaźnika przeżycia wśród pacjentów onkologicznych poddanych radio- i chemioterapii [41]. Frakcją odpowiedzialną za ten kierunek działania są wyżej opisane polisacharydy oraz aminokwasy.

Potwierdzono, że metanolowe wyciągi również wykazują działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych oraz zwiększają aktywność makrofagów. Związkami odpowiedzialnymi za ten typ aktywności są terpenoidy oraz polifenole [20].

5. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa *Lae- tiporus sulphureus*, *Fomitopsis betulina* i *Trametes versicolor*

Ekstrakty otrzymane z owocników grzybów oraz wyizolowane z nich związki, wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz przeciwwirusowe. Szacuje się, że obecność w owocnikach grzybów substancji o takich właściwościach wynika z mechanizmów obronnych wykształconych przez grzyby w celu przetrwania w środowisku naturalnym.

Dzięki postępowi nauki, w tym biotechnologii dysponujemy skutecznymi lekami zwalczającymi choroby pochodzenia bakteryjnego. Jednak w obliczu narastającej oporności bakterii na stosowane dotychczas antybiotyki, przedmiotem zainteresowania stają się inne związki pochodzenia naturalnego, wykazujące działanie antybiotyczne wobec organizmów chorobotwórczych [42]. Już w 1920 roku został wyizolowany aktywny związek przeciwbakteryjny – sparassol ze siedzunia sosnowego (*Sparassis crispa*). Przez kolejne dekady udało się udowodnić działanie antybiotyczne ponad dwóch tysięcy gatunków grzybów wielkoowocnikowych [43]. Aktywność ta dotyczy zarówno wyciągów z owocników jak i mycelium, a także wyizolowanych z nich związków.

W przeciwieństwie do bakteryjnych chorób zakaźnych, choroby wywołane przez wirusy i grzyby są leczone specyficznymi lekami. Mechanizm aktywności przeciwwirusowej wykazywanej przez grzyby może być związany z hamowaniem wirusowych enzymów, syntezy

kwasów nukleinowych, czy przylegania i wnikania do komórek gospodarza lub pośredni poprzez działanie immunostymulujące. Mimo istnienia szeregu związków chemicznych będących zarejestrowanymi lekami o udowodnionym działaniu przeciwwirusowym i przeciwwgrzybiczym, wciąż poszukuje się ich odpowiedników naturalnego pochodzenia. Szczególną uwagę zwraca się na wodne wyciągi, ze względu na to, że zastosowanie organicznego rozpuszczalnika, jako czynnika wytrawiającego surowiec jest niebezpieczne, a zatem niepraktyczne ze względów aplikacyjnych.

W badaniach potwierdzono działanie przeciwbakteryjne etanolowego ekstraktu z owocników oraz mycelium *L. sulphureus* wobec bakterii gram ujemnych oraz gram dodatnich. W spektrum jego działania znalazły się bakterie gram dodatnie takie jak: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *M. flavus*. Najbardziej wrażliwym szczepem okazał się *M. flavus*, natomiast *Klebsiella pneumoniae* była oporna. Aktywne wyciągi działały słabiej od komercyjnych leków, ale wciąż na poziomie kwalifikującym je jako potencjalne leki [13]. Związkami odpowiedzialnymi za ten kierunek działania są wtórne metabolity gatunku takie jak lektyny, terpeny oraz związki wielokocząsteczkowe – polisacharydy, w szczególności ich frakcja nierozpuszczalna w wodzie. Zdefiniowano również działanie przeciwdrobnoustrojowe wodnego wyciągu z owocników *L. sulphureus*. Potwierdzono działanie przeciwbakteryjne, szczególnie wobec *M. flavus* i *L. monocytogenes*. Szczególnie istotny jest wpływ badanego wyciągu na gatunek *L. monocytogenes*, który jest odporny na działanie streptomycyny, a który okazał się bardzo wrażliwy na działanie badanego wyciągu. Ten fakt może być punktem wyjścia do praktycznego zastosowania tego grzyba w terapii.

Wodny wyciąg z *L. sulphureus* wykazuje silną aktywność przeciwwgrzybiczą. Testowano jego działanie wobec grzybów, jako punkt odniesienia biorąc po uwagę siłę działania ketokonazolu. W porównaniu do leku, wyciąg

działał słabiej, lecz wciąż na poziomie wystarczającym by rozpatrywać go w kategorii obiecującego czynnika przeciwwgrzybiczego [44]. Działanie przeciwwgrzybicze wykazano również dla wodno-etanolowego wyciągu, który reprezentował aktywność przeciw *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium gladioli*, *Sclerotinia sclerotiorum* [22].

Wyciągi z *L. sulphureus* mogą znaleźć również zastosowanie w przemyśle spożywczym, jako środki konserwujące. Hamują bowiem wzrost *Aspergillus flavus* – grzyba wytwarzającego niebezpieczną, toksyczną dla człowieka mykotoksynę – aflatoksynę. Badania potwierdzające tę właściwość przeprowadzono z użyciem koncentratu pomidorowego. Koncentrat pomidorowy z dodatkiem ekstraktu etanolowego *L. sulphureus* przechowywano przez 15 dni w temperaturze 25°C. Po tym czasie nie zaobserwowano wzrostu *A. flavus* ani obecności jego zarodników w badanym materiale. Dzięki hamującemu wpływowi na wzrost mikroorganizmów, wyciągi mogą z dobrym skutkiem zastąpić sztuczne dodatki do żywności o właściwościach konserwujących [45].

Gatunek *L. sulphureus* działa także przeciwwirusowo. Udowodniono, że wodno-metanolowe wyciągi mają zdolność hamowania odwrotnej transkryptazy wirusa HIV. Enzym ten odgrywa kluczową rolę w procesie transkrypcji i zniesienie jego aktywności skutkuje zahamowaniem namnażania wirusa. Dodatkowo uważa się, że obecność polisacharydów o działaniu immunomodulującym może mieć swój udział w kształtowaniu działania przeciwwirusowego badanych ekstraktów [46].

Przeprowadzono liczne badania nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową *F. betulina*. Spośród bakterii, które wykazały wrażliwość wobec ekstraktów znalazły się: *Bacillus sp.*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*. Wrażliwymi grzybami były: *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus fumigatus*. Zbadano aktywność przeciwdrobnoustrojową trzech ekstraktów owocników *F. betulina* i wykazano zróżnicowane działanie w zależności od zastosowanego czynnika ekstra-

hującego. Ekstrakt dichlorometanowy wykazywał działanie przeciw *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Ponadto stwierdzono jego działanie przeciwko mięczakowi *Biomphalaria glabrata*, który jest żywicielem pośrednim w cyklu rozwojowym *Schistosoma mansoni* – ludzkiego pasożyta z gromady przywr. Użycie metanolu do ekstrakcji spowodowało zmniejszenie spektrum działania jedynie do *Bacillus subtilis*. Wodny wyciąg nie wykazywał aktywności przeciwbakteryjnej. Z tego powodu można zatem wywnioskować, że różne związki o różnej rozpuszczalności są odpowiedzialne za unieszkodliwianie drobnoustrojów [37, 47].

Pośród związków obecnych w tym gatunku wykazano, że za działanie przeciwdrobnoustrojowe odpowiadają związki triterpenowe – szczególnie kwas poliprenowy A. Jego skuteczność przeciwko *Mycobacterium* sp., *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* potwierdzono w badaniach *in vivo* na zwierzętach. Inną substancją o potencjale przeciwdrobnoustrojowym jest piptamina (N-benzylo-N-metylopentadecano-1-amina) o silnej aktywności wobec *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* [38, 48].

Przeciwwirusowa aktywność *in vitro* wodnego ekstraktu z *T. versicolor* wobec wirusa HIV – 1 została zdefiniowana w 1997 roku [49]. W badanym wodnym wyciągu stwierdzono obecność kompleksów białkowo-polisacharydowych PSP i PSK. Ich aktywność przeciwwirusowa wynika z trzech mechanizmów działania. Pierwszy z nich to hamowanie łączenia się wirusowego białka gp120 znajdującego się na powierzchni wirusa z immobilizowanymi receptorami CD4. W tym samym badaniu potwierdzono, że PSP i PSK są silnymi inhibitorami odwrotnej transkryptazy, kluczowego enzymu procesu replikacji. Ponadto stwierdzono, że zakłócają one proces glikozylacji białek wirusa poprzez hamowanie enzymów: β -glukozydazy i β -glukuronidazy [49]. Ekstrakt otrzymany z hodowli mycelialnych *T. versicolor* był aktywny wobec wirusa *Herpes simplex* typu 2 oraz wirusa grypy H1N1. Ekstrakt ten wykazywał najwyższą aktywność

spośród badanych gatunków *Basidiomycota* oraz charakteryzował się szerokim indeksem terapeutycznym. Przeprowadzono również badanie kliniczne, w którym wykazano, że doustne przyjmowanie ekstraktów *T. versicolor* znacząco zmniejszało częstość pojawiania się wykwitów opryszczki [50]. Dla ekstraktów wykonanych z owocników i hodowli mycelialnych *T. versicolor* wykazano zróżnicowaną aktywność przeciwbakteryjną. Ich spektrum oraz siła działania zależy w dużej mierze od rodzaju użytego czynnika wytrawiającego (woda, rozpuszczalniki organiczne lub ich mieszaniny) [5]. W badaniu aktywności przeciwbakteryjnej metanolowego ekstraktu wykonanego z owocników, zanotowano znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec G(+) bakterii, podczas gdy aktywność wobec G(-) była niższa. Związkiem odpowiedzialnym za ten efekt jest koriolin – związek seskwiterpenowy występujący w gatunkach rodzaju *Trametes* [5]. Do gatunków bakterii wrażliwych na działanie etanolowego wyciągu pozyskiwanego z owocników *T. versicolor* są: *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* [5]. W przypadku wyciągu zawierającego organiczny rozpuszczalnik dodatkowo wykazano działanie przeciwbakteryjne wobec *Bacillus subtilis* [51]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktu z *T. versicolor* została również określona w badaniach *in vivo*. Wśród bakterii stwierdzono wrażliwość szczepów: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* i *Streptococcus pneumoniae* [41].

Oprócz działania przeciwbakteryjnego dla ekstraktów z *T. versicolor* wykazano również aktywność przeciwgrzybiczą. W przekrojowych badaniach aktywności przeciwdrobnoustrojowej gatunków z *Basidiomycetes*, wykazano słabe działanie wyciągu metanolowego otrzymanego z wrośniaka różnobarwnego wobec *Aspergillus fumigatus*. Nie stwierdzono jednak jego działania przeciwko *Candida albicans* [52]. Zaobserwowano efekt przeciwdrobnoustrojowy PSP i PSK oraz wykazano zwiększone wydzielanie cytokin, głównie IL-1 oraz TNF- α [41].

6. Lekтины *L. sulphureus* – budowa i zastosowanie w lecznictwie

Lekтины są białkami, wiążącymi węglowodany w sposób specyficzny i odwracalny. Występują zarówno w roślinach jak i grzybach, uczestnicząc w wielu procesach biologicznych. W królestwie grzybów przypisuje się im między innymi takie funkcje jak: uczestnictwo w procesach wzrostu, regulacji procesów symbiozy oraz tworzenia porostów, ochronie przed działaniem związków toksycznych dla grzybów, a także aktywność w procesach kolonizacji gatunków chorobotwórczych [53].

Po raz pierwszy hemolizującą lektynę, specyficzną dla N-acetylolaktozaminy wyizolowano z owocników gatunku *L. sulphureus* w 1994 roku [54]. Ma ona budowę heterotetrameryczną, składa się z podjednostek o masie 36 i 90 kDa. Część C – końcowa łańcucha tego związku wykazuje podobieństwo do toksyny bakteryjnej MTX2 gatunku *Bacillus sphaericus* oraz toksyny (α) *Clostridium septicum* i ma właściwości hemolizujące. Natomiast część N-końcowa odpowiada za indukcję hemaglutynacji [55]. Ze względu na to, że lekтины *L. sulphureus* są homologiczne do toksyn bakteryjnych, działają w tym samym mechanizmie tworzenia *de novo* kanałów w błonach komórkowych. Uczestniczą również w tworzeniu wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych i regulują proces apoptozy, przez co są przedmiotem zainteresowania środowisk naukowych [54].

Lekтины gatunku *L. sulphureus* mogą być wykorzystane w celu wykrycia antygenów nowotworowych zawierających wolne grupy N-acetylolaktozaminy, które są specyficzne dla komórek raka płuc, tarczycy i piersi [22].

7. Działanie hipolipemizujące *Laetiporus sulphureus*

Przedmiotem zainteresowania środowisk naukowych jest również wpływ ekstraktów grzybowych oraz wyizolowanych z nich związków na gospodarkę lipidową.

Przeprowadzono badania wodnych ekstraktów otrzymanych z owocników *L. sulphureus*, w których wykazano jego działanie hipolipemizujące. W celu określenia siły działania aktywnych związków, przez cztery tygodnie podawano szczurom ekstrakt, a efekty porównano z działaniem lowastatyny [22]. Wykazano podobny efekt obniżenia stężenia cholesterolu we krwi. Mechanizm odpowiedzialny za to działanie to prawdopodobnie zahamowanie wątrobowej syntezy cholesterolu, a związek odpowiedzialny ma strukturę lowastatyny [1].

8. Aktywność prebiotyczna *Trametes versicolor*

Terminem „prebiotyki” określa się substancje, które w sposób selektywny stymulują wzrost jednego lub kilku szczepów bakterii mikroflory jelitowej. Bakterie fizjologicznie zasiedlające jelita człowieka wpływają na prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Ich działanie obejmuje nie tylko miejsce bytowania, gdzie zapobiegają stanom zapalnym jelit, infekcjom bakteryjnym i wirusowym, a także rozwojowi nowotworów. Wykazano, że obecność prawidłowo funkcjonującej flory bakteryjnej jest ściśle związana ze zmniejszeniem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego, nowotworów oraz zwiększa odporność [56].

Przeprowadzono badania *in vitro*, w których określono aktywność PSP wyizolowanego z *T. versicolor* wobec bakterii jelitowych. W tym celu wykorzystano model fermentacji mikrobiologicznej w warunkach beztlenowych. Badany PSP nasilał wzrost bakterii *Bifidobacterium* spp. oraz *Lactobacillus* spp., zmniejszał natomiast ilość *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Enterococcus*. Nie wykazano aktywności wobec *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp. oraz *Escherichia coli*. Przypuszcza się, że działanie przeciwnowotworowe PSP jest ściśle związane z jego aktywnością prebiotyczną. Może być ona wynikiem pobudzenia produkcji wtórnych metabolitów bakteryjnych o właściwościach przeciwdziałających kancerogenezie lub immunomodulującego wpływu mutualistycznych *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., których wzrost jest stymulowany przez PSP [57].

9. Wpływ β -glukanu, występującego w *Fomitopsis betulina*, na proces gojenia ran

Polisacharydy występujące w ekstraktach z owocników *F. betulina* wykazują szereg aktywności biologicznych. W najnowszych badaniach *in vitro* nad działaniem α -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glukanu wykazano, że bierze on udział w procesach regeneracji uszkodzeń nabłonków. Mechanizm działania regenerującego badanego polisacharydu polega na nasileniu migracji komórek nabłonka i przyspieszeniu procesu gojenia. Może on być skuteczny w leczeniu choroby wrzodowej lub w stanach zapalnych żołądka i jelit. Istnieją również pomysły wykorzystania tego działania w opatrunkach. Przemawia za tym zdolność przeprowadzania zolu w żel w odpowiednich warunkach temperatury i wilgotności. Opatrunki tworzące żele są stosowane w leczeniu ran ze względu na wytwarzane pod nimi wilgotne środowisko, które ułatwia proces gojenia. Jednoczesne działanie przyspieszające regenerację tkanek i zdolność do tworzenia żelu są właściwościami β -glukanu przemawiającymi za zastosowaniem ich jako składników opatrunków medycznych [58-59].

Resumo

Poliporaj fungoj de la Bazidomiceta taksono estas uzataj en medicino. Letiporo sulfura, Piptoporo betulina kaj Trametes versikolora, estas specioj kun pruvitaj antioksidaj, kontraŭinflamaj, antimikrobiaj kaj kontraŭkanceraj efikoj. Konataj malĉefaj metabolitoj produktitaj de ligno-fungoj estas polisakaridoj, fenolaj komponaĵoj, indolaj komponaĵoj, terpenoj, vitaminoj kaj kemiaj bioelementoj. Izolitaj komponaĵoj kaj ekstraktoj de fungoj kaj fungaj micelioj oni aplikis por kuraci kancerajn kaj preventado de malsanoj de la kardiovaskula sistemo, diabeto kaj mikrobaj infektoj. La celo de la laboro estis pruviti ampleksan spektron de biologia aktiveco de elektitaj tri specioj de poliporaj fungoj: Letiporo sulfura, Piptoporo betulina kaj Trametes versikolora.

References

1. Sułkowska-Ziaja, K.; Muszyńska, B.; Sałaciak, K.; Gawalska, A.; Post Fitoter 2016, 17(4), 274-281.
2. Sułkowska-Ziaja, K.; Motyl, P.; Muszyńska, B.; Firlej, A.; Post Fitoter 2015, 2, 20-27.
3. Sułkowska-Ziaja, K.; Muszyńska, B.; Gawalska, A.; Sałaciak, K.; Acta Sci Pol Hortorum Cultus 2018, 17(1), 89-98.
4. Lin, S.Y.; Chen, Y.K.; Yu, H.T.; Barseghyan, G.S.; Int J Med Mushrooms 2013, 15(3), 315-323.
5. Piętka, J.; Studia i Materiały CEPL 2016, 46, 52-62.
6. Rajewska J.; Bałasińska B.; Postepy Hig Med Dosw 2004, 58, 352-357.
7. Maehara, Y.; Tsujitani, S.; Saeki, H.; Oki, E.; Yoshinaga, K.; Emi, Y.; Morita, M.; Kohnoe, S.; Kakeji, Y.; Yano T.; Baba, H.; Surg Today 2012, 42(1), 8-28.
8. Karaman, M.; Jovin, E.; Malbaša, R.; Matavuly, M.; Popovic, M.; Phytother Res 2010, 24(10), 1473-1481.
9. Reczyński, W.; Muszyńska, B.; Opoka, W.; Smalec, A.; Sułkowska-Ziaja K.; Malec, M.; Biol Trace Elem Res 2013, 153(1-3), 355-362.
10. Mońka, I.; Wiechuła, D.; Ann. Acad. Med. Siles 2017, 71, 314-325.
11. Stern, R.B.; Solioz, M.; Krewski, D.; Agget, P.; Aw, T.C.; Baker, S.; Crump, K.; Haber, L.; Hertzberg, R.; Keen, C.; Meek, B.; Rudenko, L.; Schoeny, R.; Slob, W.; Starr, T.; J Toxicol Environ Health 2007, 10(3), 157-222.
12. Iskra, M.; Krasińska, B.; Tykarski, A.; Nacziśn Tętn 2013, 17(6), 447-459.
13. Łakomy, P.; Kwaśna, H.; Ofic Wyd MULTICO 2008, 154-155.
14. Gumińska B.; W.W., 1985.
15. Sanchez, C.; Synth Syst Biotechnol 2017, 2(1), 13-22.
16. Olennikov, D.N.; Agafonova, S.V.; Borovskii, G.B.; Penzina, T.A.; Rokhin, A.V.; (2009). Appl Biochem Microbiol 2009, 45(5), 536-543.
17. Klaus, A.; Kozarski, M.; Niksic, M.; Jakovljevic, D.; Todorovic, N.; Stefanoska I.; van Griensven, L.; Int J Food Sci Technol 2013, 64(5), 599-610.
18. Turkoglu, A.; Duru, M.E.; Mercan, N.; Kivrak I;

- Gezer, K.; *Food Chem* 2007, 101(1), 267–273.
19. Prasad, R.; Varshney, V.K.; Harsh, N.S.K.; Kumar, M.; *Int J Med Mushrooms* 2015, 17(10), 933–941.
20. Sułkowska-Ziaja, K.; Muszyńska, B.; Motyl, P.; Pasko, P.; *Int J Med Mushrooms* 2012, 14(4), 385–393.
21. Puzanowska-Tarasiewicz, H.; Kuźmicka, L.; Tarasiewicz, M.; *Bromat Chem Toksykol* 2010, 43(1), 9–14.
22. Kozarski, M.; Klaus, A.; Nikšić, M.; Vrvic', M.M.; Todorovic, N.; Jakovljevic, D.; Van Griensven, L.; *J Food Compos Anal* 2012, 26(1-2), 144–153.
23. Scarpari, M.; Reverberi, M.; Parroni, A.; Scala, V.; *PloS one* 2017, 12(8).
24. Jhan, M.H.; Yeh, C.H.; Tsai, C.; Kao, C.; Chang, C.T.; Hsieh, C.W.; *Molecules* 2016, 21(9), 1215.
25. Xu, L.; Li, Y.; Dai Y.; Peng J.; *Pharmacol Re*, 2018.
26. Hwang, H.S.; Lee, S.H.; Baek, Y.M.; Kim, S.W.; Jeong, Y.K. Won Yun, J.; *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 78(3), 419–429.
27. Muszyńska, B.; Grzywacz-Kisielewska, A.; Kała, K.; Gdula-Argasińska, J.; *Food Chem* 2018, 243(3), 373–381.
28. Otto-Buczowska, E.; Chwalba, A.; *Forum Med Rodz* 2015, 9 (6), 443–446.
29. Kobayashi, M.; Kawashima, H.; Takemori, K.; Ito, H.; *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 427(2), 299–304.
30. Singh, S.; Ernst, E.; W.W. Norton 2009, 193.
31. Jayasooriya, R.; Kang, C.H.; Seo, M.J.; Hyun Choi, Y.; Yong-Kee, J.; Gi-Young, K.; *Food Chem Toxicol* 2011, 9(11), 2758–2764.
32. Piotrowski, J.; Jędrzejewski T.; Kozak, W.; *Postepy Hig Med Dosw* 2015, 69, 91–97.
33. León, F.; Quintana, J.; Rivera, A.; Estévez, F.; Bermejo, J.; *J Nat Prod* 2004, 67(12), 2008–2011.
34. Lear, M.J.; Simon, O.; Foley, T.L.; Burkart, M.D.; Baiga, T.J.; Noel, J.P.; La Clair, J.J.; *J Nat Prod* 2009, 72(11), 1980–1987.
35. Olennikov, D.N.; Agafonova, S.V.; Borovskii, G.B.; Penzina, T.A.; Rokhin, A.V.; *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2009, 45(6), 693–697.
36. Wiater, A.; Paduch, R.; Pleszczyńska, M.; Próchniak, K.; Choma, A.; Kandefer-Szerszeń, M.; Szczodrak, J.; *Biotechnol Lett* 2011, 33(4), 787–795.
37. Kaczor, J.; Klecha, I.M.; Rzeski, W.; Paduch, R.; Zdzisińska, B.; Pożarowski, P.; Kandefer-Szerszeń, M.; *Post Fitoter* 2004, 2, 62–66.
38. Pleszczyńska, M.; Wiater, A.; Siwulski, M.; Lemieszek, M.K.; Kunaszewska, J.; Kaczor, J.; Rzeski, W.; Janusz G.; Szczodrak, J.; *World J Microbiol Biotechnol* 2016, 32(9), 151.
39. Lipka D.; Boratyński, J.; *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 62, 328–336.
40. Wu, J.M.; Doonan, B.B.; Hsieh, T.C.; Yang, Q.; Yang, X.T.; Ling, M.T.; *Int J Med Mushrooms* 2016, 18(8), 651–660.
41. Luk, S.U.; Lee, T.K.W.; Liu, J.; Lee, D.T.W.; Chiu, Y.T.; Ma, S.; Oi-Lin Ng, I.; Wong, Y.C.; Leung Chan, F.; Ling, M.T.; *PloS one* 2011, 6(5), 1–9.
42. Zonga, A.; Caob H.; Wanga, F.; *Carbohydr Polym* 2012, nr 90(4), 1395–1410.
43. Chu, K.K.; Ho, S.S.; Chow, A.H.; *J Clin Pharmacol* 2002, 42(9), 976–984.
44. Nikonorow, E.; Baraniak, A.; Gniadkowski, M.; *Post Mikrobiol* 2013, 52(3), 261–271.
45. Demir M.S.; Yamac, M.; *JABS* 2008, 2(3), 89–93.
46. Šiljegović, J.D.; Stojković, D.S.; Nikolić, M.M.; Glamočlija, J.M.; Soković, M.D.; Ćirić, A.M.; *Zb Matice srp prir nauke* 2011, 120, 299–305.
47. Petrović, J.; Glamočlija, J.; Stojković, D.S.; Ćirić, A.; Nikolić, M.; Bukvički, D.; Guerzoni M.E.; Sokovic, M.D.; *Food Chem Toxicol* 2013, 59, 297–302.
48. Milinarić, A.; Kac J.; Pohleven, F.; *Acta Pharm* 2005, 55(1), 69–79.
49. Keller, C.; Maillard, M.; Keller, J.; Hostettmann, K.; *Pharm Biol* 2002, 40(7), 518–525.
50. Schlegel, B.; Luhman, U.; Hartl, A.; Grafe, U.; *J Antibiot* 2000, 53(9), 973–974.
51. Collins, R.A.; Ng, T.B.; *Life Sci* 1997, 60(25), 383–387.
52. Krupodorova, T.; Rybalko, S.; Barshteyn, V.; *Virol Sin* 2014, 29(5), 284–290.
53. Yamac, M.; Bilgili, F.; *Pharm Biol* 2006, 44(9),

- 660-667.
54. Suay, I.; Arenal, F.; Asensio, F.J.; Angela, B.; 2000, 78(2), 129–139.
55. Varrot, A.; Soorej M.B.; Basheer, M.; Imbert, A.I.; *Curr Opin Struct Biol* 2013, nr 23(5), 678–685.
56. Mancheño, J.M.; Tateno, H.; Sher, D.; Goldstein, I.J.; In *Proteins Membrane Binding and Pore Formation* 2010, (pp. 67-80). Springer, New York, NY.
57. Tateno, H.; Goldstein, I.J.; *J Biol Chem* 2003, 278(42), 40455–40463.
58. Kapka-Skrzypczak, L.; Niedźwiecka, J.; Wojtyła, A.; Kruszewski, M.; *Pediatr Endocrinol* 2012, 18(2), 79-83.
59. Yu, Z.T.; Liu, B.; Mukherjee, P.; Newburg, D.S.; „*Trametes versicolor* Extract Modifies Human Fecal Microbiota Composition In vitro,” *Plant Foods Hum Nutr* 2013, 68(2), 107–112e i A. Ruthesb, *Int. J. Biol. Macromol*, tom 12, nr 107, 2018.

Role of TCD emboli-monitoring in evaluation of efficacy of anti-coagulant therapy in patients with nonvalvular atrial fibrillation

NOSÁL Vladimír^{1*}, KURČA Egon¹, NEHAJ Frantisek², MOKÁŇ Marian²,
JAMRIŠKOVÁ Livia², KANTOROVÁ Ema¹, KUBATKA Peter^{4,5}, STRNÁDEL Jan⁶,
GRENDÁR Marian³, SIVÁK Štefan¹

¹Neurology Clinic, Jessenius Faculty of Medicine Comenius University, Slovakia

²Ist Internal Clinic, Jessenius Faculty of Medicine Comenius University, Slovakia

³Department of Bioinformatics, Biomedical Center Martin, Jessenius Faculty of Medicine Comenius University, Slovakia

⁴Department of Medical Biology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Martin, Slovakia

⁵Division of Oncology, Biomedical Center Martin, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Martin, Slovakia

⁶Division of Molecular Medicine, Biomedical Center Martin, Jessenius Faculty of Medicine Comenius University, Slovakia

Article submitted: 30.10.2018; accepted: 02.12.2018

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is a risk factor for stroke but, despite anticoagulation therapy, the risk of stroke is not completely eliminated. We evaluated the presence of microembolic signals (MES) by TCD emboli-monitoring in AF patients receiving various anticoagulation therapies.

In total, 103 patients were divided into four therapeutic groups (receiving warfarin, dabigatran, rivaroxaban, or apixaban; 22 patients in each group) and a control group (15 patients). Common stroke risk factors were evaluated, such as arterial hypertension, ischemic heart disease, history of TIA/stroke, diabetes mellitus, and hyperlipidemia. TCD emboli-monitoring was performed on bilateral middle cerebral arteries for 45-60 minutes.

No statistically significant differences were determined regarding the presence of risk factors between all groups. We found 2 MES in the warfarin group, 1 in the rivaroxaban group, 4 in the dabigatran group, and 0 in the apixaban group. One patient had positive MES in the control group. No statistical differences were seen when the groups were compared with the control group or with each other.

TCD emboli-monitoring can be used for MES detection in patients with AF receiving anticoagulation therapy and thus for the identification of patients at high risk of stroke occurrence/reoccurrence.

Keywords: emboli-monitoring, atrial fibrillation, stroke prevention, TCD

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is a well-known independent risk factor for ischemic stroke. Approximately 70% patients with AF are 65–85 years old (1). Untreated AF increases the risk of stroke by five-fold (2,3,4). Risk of stroke in AF

patient increases with age and other risk factors. Antiplatelet therapy is not effective in primary and secondary stroke prevention in patients with AF. Preventive therapies of choice include oral anticoagulants such as warfarin, dabigatran etexylate, apixaban, rivaroxaban, and edoxaban. These drugs significantly reduce the risk of stroke in the

*Corresponding Author: Vladimír Nosal; nosal@fmed.uniba.sk

patients with AF. However, clinical trials of the novel anticoagulants suggest that, each year, 10–20% of individuals with AF suffer a stroke (5,6,7). Hence, medication significantly reduces the risk of stroke but does not eliminate it completely. Several possible reasons can be proposed as to why such anticoagulant therapy is not effective. The noncompliance of the patient might be the most important factor and should be considered initially. Other factors are the underdosing of patients, genetic resistance, and, especially in the case of warfarin, food interactions. Other important reasons of stroke recurrence might be different stroke etiologies (i.e. atherothrombosis). The identification of non-responders of anticoagulants is important, because these patients are at high risk of stroke recurrence and need special attention. Several methods are available regarding the identification of non-responders. The worst scenario is clinical identification, when a patient presents with a new stroke. Non-responders can be also identified radiologically, whereby new asymptomatic stroke is found incidentally during CT or MRI. Routine monitoring of the anticoagulation activity of novel anticoagulants is not recommended, although it is probably the best way of evaluating its effectiveness. In the case of warfarin, regular INR monitoring is needed. The efficacy of rivaroxaban, apixaban, and edoxaban can be monitored via anti-factor Xa activity evaluation. Dabigatran etexylate activity can be monitored by aPTT or, when a more precise evaluation is needed, by the ecarin clotting time (ECT).

These methods are complicated and expensive. We present here the results of our study in which transcranial ultrasound emboli-monitoring was used to detect microembolic signals in patients with nonvalvular AF treated with oral anticoagulation therapy.

Aims

The aim of our study was to determine whether positive microembolic signals (MES) occurred during TCD embolic monitoring in

patients who suffered from nonvalvular AF and who were also clinically stable on oral anticoagulation therapy. We further wish to compare the presence of MES in various groups of patients and to detect possible risk factors influencing the presence of MES.

Material and methods

Patients with nonvalvular symptomatic, asymptomatic permanent or paroxysmal AF were enrolled in the prospective clinical study during the years 2015- 2017. Patients were divided into four groups according anticoagulation type: the warfarin, rivaroxaban, dabigatran (110 mg or 160 mg), or apixaban groups. The control group consisted of patients of similar age, gender, and comorbidities but without anticoagulation therapy. Patients in the anticoagulation groups had to be stable on therapy for at least 1 month. Comorbidities such as arterial hypertension, diabetes mellitus, ischemic heart disease, hyperlipidemy, previous TIA, or stroke were noted for all patients.

The RIMED Digi-Lite™ Digital Transcranial Doppler (TCD) System with an advanced and proprietary M-Mode display and 2 channel bilateral emboli-monitoring with 2 MHz probes was used. Patients were monitored for 40-60 min. The middle cerebral artery (MCA) on both sides were manually identified at a depth of 50-55 mm. For emboli detection purposes, measurements were carried out simultaneously at two depths of same MCA with a 5-mm difference. Fast Fourier transformation with 256 points was used. Other settings were as follows: filter 100 Hz, 100 % power, and 6 kHz pulse frequency. The MES intensity level was set to 9 dB and above. Automatic MES multigate detection was followed with manual control of all patients during data post-processing. MES or artifacts were identified according to the International Consensus Group on Microembolus Detection. The criteria were: duration less than 3 ms, typical acoustic characteristics, random distribution during cardiac cycle, acoustic intensity of 9 or more dB above background noise, and unidirectional signal. All data were digitally

recorded for further analysis. As a positive finding, we considered at least one MES registered during a session.

The Pearson Chi square test with the Yates correction was used for the statistical analysis of data.

This study was approved by the local ethical committee, and all participants signed an informed consent form.

Results

In our prospective study, 103 patients were evaluated, with 22 patients being included in each of the four therapeutic groups (warfarin, rivaroxaban, apixaban, and dabigatran) and 15 patients in the control group [48 males and 55 females, with a median age of 72 years (43-89)]. Of the patients, 35 had paroxysmal AF and 55 permanent AF.

The incidence of selected comorbidities, such as arterial hypertension, ischemic heart disease, diabetes mellitus, hyperlipidemia, and history of TIA/stroke, in the study population are shown in table 1. We were found no statistically significant differences between the treatment groups or control group.

From all the subjects, 8 patients (7,7 %) had a positive MES finding during emboli-monitoring: 2 patients in the warfarin group, 4 patients in the dabigatran group (2 patients using 160 mg and 2 patients using 110 mg dabigatran), 1 patient in the rivaroxaban group, and 1 patient in the control group. No MES were found in the apixaban group. One patient with a positive MES finding in the control group had AF and was treated only with antiplatelet (clopidogrel) therapy. The Chi square test showed no significant difference in the presence of MES, when all groups were compared. We did not find a significant influence of the risk factors on the presence of MES.

Discussion

We have found positive MES in all groups except for the apixaban group. Demir et al. (8) published results of a clinical study in which the MES incidence was 32 (32%) for warfarin, 24 (36%) for rivaroxaban, and 17 (35%) for dabigatran. Apixaban was not evaluated. No statistically significant differences were seen in the incidences of MES when all groups were compared. Our results are similar, although we have determined a lower incidence of MES (from 0 % for apixaban to 18% for

Table 1. Study population characteristics, risk factors, type of AF, and presence of MES

Risk factors	warfarin n=22	rivaroxaban n=22	apixaban n=22	dabigatran n=22	control n=15
Arterial hypertension	21	20	20	22	14
Ischemic heart disease	19	17	21	21	12
Hyperlipidemia	6	7	5	8	5
TIA/Stroke	4	7	9	4	1
Diabetes mellitus	2	4	5	2	2
Type of AF					
Permanent fibrillation	15	15	11	14	1
Paroxysmal fibrillation	7	7	11	8	1
MES	2	1	0	2/2	1

dabigatran). The lower frequency of MES might be the result of statistical error because of the smaller population in our study. All subgroups of patients have a comparable presence of risk factors (arterial hypertension, TIA/stroke, diabetes mellitus, and ischemic heart disease).

The detection of MES might be an important marker of inadequate anticoagulation activity. TCD emboli-monitoring is a relatively simple and cheap diagnostic method for the identification of AF patients who, despite receiving anticoagulation therapy, are at a high risk of stroke. The therapeutic strategy in the patients with a positive MES finding is problematic. The best method is probably to change the anticoagulation therapy, followed by renewed TCD emboli-monitoring. A point worth stressing is that carotid artery disease is a risk factor for positive MES (9), and so this pathology has to be excluded before any decision can be made regarding therapy change.

Resumo

Atria fibrilacio (AF) estas riskfaktoro por apopleksio, sed malgraŭ antikoagulanta terapio, la risko de apopleksio ne estas tute forigita. Ni taksis la ĉeeston de mikroembolaj signaloj (MES) per TCD-embolo-monitorado en AF-pacientoj ricevantaj diversajn antikoagulantajn terapiojn. Entute, 103 pacientoj estis dividitaj je kvar terapiaj grupoj (ricevante warfarinon, dabigatranon, rivaroksabanon, aŭ apiksabanon; 22 pacientoj en ĉiu grupo) kaj kontrolgrupo (de 15 pacientoj). Oni taksis komunajn riskfaktorojn, kiel ekzemple arterian hipertension, iskemian kormalsanon, historion de TIA / apopleksio, diabeto kaj hiperlipidemio. TCD embolo-monitorado estis farita je la mezaj cerebraj arterioj ambaŭflanke dum 45-60 minutoj. Ne statistike signifaj diferencoj estis determinitaj koncerne la ĉeeston de riskfaktoroj inter ĉiuj grupoj. Ni trovis 2 MES en la warfarino-grupo, 1 en la grupo kun rivaroksabano, 4 en la dabigatrano-grupo, kaj 0 en la apiksabano grupo. Unu paciento havis pozitivan MES en la kontrolgrupo. Neniu statistika diferenco estis vidita kiam la grupoj estis komparitaj kun la kontrolgrupo aŭ kun la aliaj.

TCD embolo-monitorado povas esti uzata por MES-malkovro ĉe pacientoj kun AF ricevantaj antikoagulantajn terapiojn kaj tiel por identigo de pacientoj kun alta risko de apopleksio/recidivo.

Ethics

This study was approved by local Ethical Committee of the Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University. Authors declared no conflict of interest.

References

1. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Arch Intern Med. 1995; 155: 469–473.
2. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, et al. Eur Heart J. 2010; 31:2369–2429.
3. Colilla S, Crow A, Simon T, et al. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2012; 5:A2056.
4. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. Stroke. 1991; 22:983–988.
5. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. N Engl J Med. 2009; 361:1139–1151.
6. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. N Engl J Med. 2011; 365:981–992.
7. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. N Engl J Med. 2011; 365:883–891.
8. Demir S, Ozdag MF, Kendirli MT, Togrol RE. WJ Stroke Cerebrovasc Dis. 2015 Nov; 24(11):2474-7. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.06.001
9. Dittrich R., Ringelstein EB. Curr Vasc Pharmacol 2008; 6:329-334

Differential Scanning Calorimetry (DSC) in the Study of Potential Incompatibilities Between Fluconazole and Selected Pharmaceutical Excipients

Oryg. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) w badaniu potencjalnych niezgodności pomiędzy flukonazolem a wybranymi substancjami pomocniczymi

TALIK Przemysław*, HUBICKA Urszula

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Medyczna 9., 30-688 Kraków, Polska

Article submitted: 09.07.2018; accepted: 07.11.2018

Abstract

Studies of interactions between active pharmaceutical ingredients (APIs) and pharmaceutical excipients are one of the key aspects of the pre-formulation process. Potential physical and/or chemical incompatibilities may affect stability and bioavailability of the drug, and consequently, the efficacy and safety of the pharmacotherapy. The aim of this work was to show the application of the differential scanning calorimetry (DSC) method in the assessment of the possible influence of selected pharmaceutical excipients on the physical properties of fluconazole. Therefore, a set of mixtures of fluconazole with microcrystalline cellulose Vivapur 12 and 112, Vitacel M80 cellulose, Maltodextrin N, corn starch – Starch 1500, Tablettose (agglomerated α -lactose), β -cyclodextrin and xylitol were examined. The measurements were carried out using both raw materials and physical mixtures in mass ratios of 1:9, 3:7, 1:1, 7:3, 9:1. In order to show the possible influence of manufacturing processes (such as milling, wet milling, granulation, compression etc.), micronized (kneaded) and co-precipitated (from water/alcohol solutions) mixtures were prepared and examined in a 1:1 weight ratio. The analysis of the DSC curves consisted in comparing the values of the maximum temperature T_{max} as well as the shape, height and area under the endothermic peaks of the melting process.

Keywords: differential scanning calorimetry, DSC, incompatibilities, fluconazole, pharmaceutical excipients

*Corresponding Author: Przemysław Talik; mftalik@cyf-kr.edu.pl

Wprowadzenie

Stałe postaci jak tabletki, pastylki, drażetki czy granulaty, są najbardziej popularną i najczęściej wytwarzaną postacią leku [1]. Ich prawidłowe działanie farmakologiczne zależy nie tylko od fizykochemicznych właściwości aktywnych substancji farmaceutycznych (APIs), ale także od zastosowanych substancji pomocniczych [2]. Substancje pomocnicze są substancjami chemicznymi pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, a ich użycie uzasadniania brak własnego działania farmakologicznego. W stosowanych stężeniach nie mogą też wchodzić w niepożądane interakcje, które negatywnie zmieniają stabilność i trwałość leku [3]. Bardzo ważną funkcją, obok formulacyjnych, jest zastosowanie ich w technologii postaci leku, jako substancji modyfikujących uwalnianie. Adekwatny dobór jakościowy i ilościowy substancji pomocniczej pozwala kontrolować miejsce i szybkość uwalniania API, co przekłada się na jej biodostępność oraz optymalizuje terapię [1]. W praktyce farmaceutycznej, zastosowanie danego składnika leku definiowane jest konkretną funkcją i procesem technologicznym. Obecność nieodpowiedniej substancji pomocniczej może skutkować wystąpieniem niezgodności, które zmieniają profil uwalniania, przyspieszają rozkład substancji aktywnej oraz obniżają skuteczność i bezpieczeństwo farmakoterapii [3]. W dostępnej literaturze znaleźć można wiele badań pokazujących, że podczas długich i wieloetapowych procesów, takich jak mielenie, mieszanie, granulacja, kompresja i innych, możliwe są wzajemne interakcje pomiędzy nimi. [4-15]. Do wykrywania niezgodności, o których mowa, bardzo często stosuje się metody termoanalityczne, a w szczególności różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Jej zasada polega na rejestracji przebiegu zmian entalpii badanego procesu (najczęściej topnienia) w warunkach liniowo zmieniającego się

programu temperaturowego, zmierzonych dla użytych APIs, substancji pomocniczych oraz ich mieszanin fizycznych. W wyniku analizy porównawczej otrzymanych krzywych DSC można stwierdzić, czy składniki mieszanin reagują ze sobą w niższych temperaturach, czy jedynie wpływają na charakterystyki pików towarzyszących im przemian fazowych. Na wzajemne interakcje pomiędzy składnikami mieszaniny wskazuje zanik lub pojawienie się nowego pików endo- lub egzotermicznego. Cennych informacji dostarczają także zmiany w kształcie pików, wartościach ciepła badanej przemiany fazowej oraz zmiany charakterystycznych temperatur T_{onset} i/lub T_{max} opisujących ten proces.

Interpretując krzywe DSC trzeba jednakże mieć na uwadze, że zmiana powierzchni pików czy temperatur początku i maksimum badanego procesu, nie zawsze bezpośrednio wskazuje na oddziaływanie pomiędzy składnikami badanej mieszaniny. Może zdarzyć się bowiem, że obserwowane wyniki są jedynie rezultatem zmieszania składników próbki. Podobnie, trzeba zwrócić uwagę na sposób przygotowania próbek. Na przykład ucieranie w moździerzu czy też mokre mielenie, może zmieniać krystaliczności badanych substancji. W efekcie skutkuje to błędną oceną wyników. W takich przypadkach, należy otrzymane wyniki traktować jako wstępne i zalecane jest wykonanie badań potwierdzających innymi technikami instrumentalnymi. Analizę interakcji metodą DSC nie powinno się też stosować w przypadkach, gdy temperatury topnienia badanych substancji nakładają się na siebie lub gdy zachodzą efekty termiczne utrudniające interpretacje, takie jak na przykład powstawanie mieszanin eutektycznych. Zastosowanie metody DSC w ocenie możliwych niezgodności flukonazolu z substancjami pomocniczymi, było jak dotychczas przedmiotem 2 opublikowanych prac. W obydwu przypadkach analizowano wpływ tylko jednej substancji. W pierwszej z nich [16], badano właściwości fizyczne mieszanin flukonazolu i laktozy. Na krzywej DSC czystego flukonazolu, obserwowano endotermiczny pik procesu topnienia, którego tem-

peratura T_{\max} wynosiła 138,6°C. Natomiast krzywa DSC mieszaniny fizycznej flukonazolu i laktozy (1:1 w/w) wykazywała dodatkowe, nowe piki o wartościach T_{\max} w 86,1°C i 136,4°C obok piku, odpowiadającemu czystemu lekowi w temperaturze 140,2°C. Wskazuje to na chemiczną interakcję leku z laktozą. Fakt silnego oddziaływania już w temperaturze pokojowej, potwierdziły także stosowne badania dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD).

Inne badanie przeprowadzone przez Ali H. Al-Marzougi [17] metodą DSC, miało na celu prześledzenie wpływu różnych sposobów przygotowania próbek na otrzymywanie stałych kompleksów inkluzyjnych pomiędzy β -cyklodekstryną (β -CD) i trzema azolowymi lekami przeciwgrzybiczymi, wśród których był flukonazol. Sporządzono szereg próbek (w stosunku molowym 1:2) jako mieszaniny fizyczne, zagniatane, współstrącane, ogrzewane w szklanych ampułkach oraz przy użyciu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym – SC-CO₂. Endotermiczny pik topnienia czystego flukonazolu miał swoją maksymalną temperaturę w 139,2°C, natomiast czysta β -cyklodekstryna wykazywała szeroki endotermiczny efekt cieplny pomiędzy 50°C a 150°C, co odpowiadało jej dehydratacji. W przypadku mieszaniny fizycznej flukonazolu z β -CD, nie obserwowano piku topnienia flukonazolu, wskazując tym samym na silną interakcję między składnikami, polegającą na możliwym formowaniu się kompleksu inkluzyjnego lub amorfizacji. Próbki mieszanin flukonazol/ β -CD, powstałe metodą współstrącania i ogrzewania w zamkniętych ampułkach, wykazywały częściową tendencję do tworzenia kompleksów inkluzyjnych lub amorfizacji, podczas gdy próbki powstałe przez zagniatanie i przy użyciu SC-CO₂ tworzyły te kompleksy lub amorfizowały w stopniu całkowitym [17].

Celem niniejszej pracy było pokazanie zastosowania metody DSC w ocenie możliwego wpływu wybranych, innych niż to opisano w dostępnej literaturze, substancji pomocniczych na właściwości fizyczne flukonazolu. W związku z wymaganiami metody, przed-

miotem badań, obok samego leku, były: celulozy mikrokrystaliczne Vivapur 12 i 112, celuloza sproszkowana Vitacel M80, Maltodekstryna N (niskoscukrzona), skrobia kukurydziana, aglomerowana α -laktoza, β -cyklo-dekstryna oraz ksylitol. Do pomiarów używano zarówno surowy materiał jak i ich mieszaniny fizyczne w stosunkach masowych 1:9, 3:7, 1:1, 7:3, 9:1. Dla zbadania możliwego wpływu produkcyjnych procesów technologicznych (jak mielenie, mokre mielenie z następującym odparowaniem rozpuszczalnika, mieszanie, granulacja, kompresja itp.), sporządzono także mieszaniny mikronizowane oraz współstręcane z roztworu wodno-alkoholowego, w stosunku wagowym 1:1.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura i urządzenia

Krzywe DSC mieszanin flukonazolu z substancjami pomocniczymi wykonano przy pomocy różnicowego kalorymetru skaningowego Exstar 7020 SII Nano Technology, którego pracę i rejestrację danych kontrolowano programem MUSE Measurement w wersji 7.1.U. Krzywa kalibracyjna instrumentu została wykonana przy użyciu ultra czystego indu i cyny (99,9999%), według osobnej procedury przewidzianej przez producenta aparatu DSC.

Materiały użyte w badaniu

Flukonazol (fluconazolium) Slovakofarma, Hlohovec, Słowacja, Nr Serii 00/1040/01; Tabletoza (aglomerowana α -laktoza) Meggle GmbH & Co. Wasserburg, Niemcy, Nr Serii 201355N00005175; Kleptoza (β -cyklodekstryna) Roquette, Lestrem, Francja, Nr Serii 618836; Vivapur 112 (celuloza mikrokrystaliczna) J. Rettenmaier & Söhne, Weissenborn, Niemcy, Nr Serii 5611280101; Vivapur 12 (celuloza mikrokrystaliczna) J. Rettenmaier & Söhne, Weissenborn, Niemcy, Nr Serii 5601290308; Xylisorb 90 (ksylitol) Roquette, Lestrem, Francja, Nr Serii 770301; Maltodekstryna "N" (niskoscukrzona) Nowamyl S.A, Łobez, Polska; Starch 1500 (skrobia kukurydziana częściowo żelatynowana) Colorcon Ltd. Nr Serii 500075; Vi-

tacel M 80 (celuloza sproszkowana) Rettenmayer & Söhne Weissenborn, Niemcy.

szonym ciśnieniem. Osuszony osad przenoszono do tygielków pomiarowych.

Przygotowanie próbek

Mieszanki fizyczne flukonazolu z substancjami pomocniczymi w stosunkach wagowych 1:9, 3:7, 1:1, 7:3 oraz 9:1 sporządzono odważając odpowiednie ich ilości i dokładnie mieszając składniki w wytrząsarce wibracyjnej typu vortex (SI-D257 Scientific Industries Inc.).

Obok mieszanin fizycznych przygotowywano także serię mieszanin w stosunku wagowym 1:1, wykorzystując metodę zagniatania i współstrącania. Zagniatanie wykonywano w agatowym moździerzu przy użyciu pistla, po uprzednim zwilżeniu próbki metanolem; całość dokładnie rozcierano do otrzymania homogennej masy i kontynuowano, dopóki całkowicie nie odparował rozpuszczalnik.

W metodzie współstrącania, mieszaniny leku i substancji pomocniczej zostały rozpuszczone w odpowiedniej ilości roztworu wody destylowanej i metanolu (1:1 v/v), po czym przelewano je na szalki Petriego i pozostawiano do swobodnego odparowania rozpuszczalników. Proces osuszania kontynuowano w eksykatorze, pozostawiając w nim badane próbki przez okres 48 godzin nad P_4O_{10} pod zmniejszonym

Opis metody

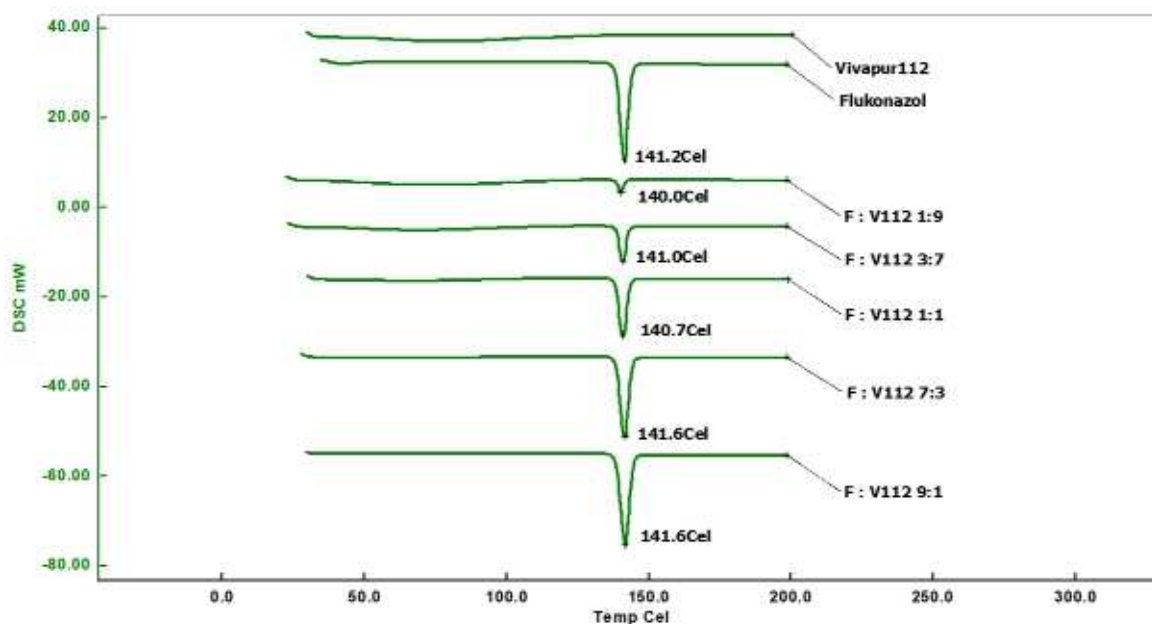
Wszystkie próbki o masach mieszczących się w przedziale 3,9-5,1 mg, były szczelnie zamykane w aluminiowych tygielkach pomiarowych o pojemności 15 μ L i średnicy 5mm. Próbkę referencyjną stanowił pusty tygiel.

Pomiary DSC rejestrowano przy szybkości grzania $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, w atmosferze azotu o szybkości przepływu 50 mL/min i w temperaturowym zakresie pomiarowym od 20°C do 200°C ; łączny czas pomiaru wynosił 18 minut.

Analiza otrzymanych krzywych DSC w kierunku możliwych interakcji została wykonana poprzez porównanie kształtu oraz wartości ciepła topnienia ΔH flukonazolu, którego miarą jest pole powierzchni endotermicznych pików, a także położenia ich temperatur maksymalnych T_{max} .

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Sporządzone mieszaniny fizyczne flukonazolu z substancjami pomocniczymi zostały zbadane zgodnie z opisanym wcześniej programem temperaturowym. Niemal wszystkie zarejestrowane krzywe DSC miały zbliżony do siebie przebieg (Vivapur 112 i 12, Vitacel M8), Rysunek 1.



Rysunek 1. Krzywe DSC mieszanin fizycznych flukonazolu z celulozą mikrokrystaliczną Vivapur 112 w różnych stężeniach. Na rysunku zaznaczono temperatury T_{max} procesu topnienia.

Jak można zaobserwować, temperatura T_{\max} endotermicznego pików procesu topnienia czystego flukonazolu wynosi $141,4^{\circ}\text{C}$ i w sposób istotny nie ulega przesunięciu w żadnym z badanych stężeń. Jednoznacznie świadczy to o braku wewnętrznych interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny. W warunkach eksperymentu, nie tworzyły się także kompleksy inkluzyjne pomiędzy flukonazolem a β -cyklodekstryną. Temperatury T_{\max} flukonazolu, zmierzone dla pozostałych mieszanin fizycznych zestawiono w Tabeli 1.

stały pik o temperaturze T_{\max} $119,3^{\circ}\text{C}$. Dalsze zwiększanie zawartości flukonazolu nie powoduje, obserwowanego wcześniej i proporcjonalnego, wzrostu pól powierzchni pików, ani zmiany jego temperatury maksymalnej, praktycznie aż do 90%. Wtedy obserwowany jest niemal dwukrotny ($59,60$ mJ/mg oraz 105 mJ/mg odpowiednio przy zawartości 80% i 90%) wzrost mierzonego endotermicznego efektu cieplnego i przesunięcie T_{\max} do $136,2^{\circ}\text{C}$. Pojawienie się takiego nowego indywiduum wskazuje na silne interakcje pomiędzy flukonazolem i Xylisorbem 90, zwłaszcza, że jest

Tabela 1. Temperatury T_{\max} procesu topnienia flukonazolu, zmierzone dla jego wszystkich mieszanin fizycznych z badanymi substancjami pomocniczymi.

<u>zawartość flukonazolu [%]</u>	<u>Vivapur 112 [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Vivapur 12 [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Vitacel M80 [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Maltodekstryna „N” [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Starch 1500 [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Xylisorb 90 [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Kleptoza [$^{\circ}\text{C}$]</u>	<u>Tabletoza [$^{\circ}\text{C}$]</u>
10	140,0	140,1	140,1	140,1	139,9	121,5	140,1	142,7
30	140,8	140,4	140,5	141,1	140,8	119,3	140,3	140,0
50	140,9	140,9	141,0	141,1	140,9	121,3	140,9	140,3
70	141,3	141,6	141,1	141,5	141,6	121,8	141,2	140,6
90	141,7	141,7	141,3	141,2	141,8	136,2	141,7	141,5
100	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4

Ponadto stwierdzono, że ciepła topnienia, którym odpowiadają pola powierzchni pików, wzrastają zgodnie ze wzrostem zawartości flukonazolu. Zmiany te mają charakter liniowy i opisane są silnym współczynnikiem determinacji R^2 , niemniej zastosowanie metody DSC w badaniach ilościowych, zostało już wcześniej szeroko omówione [18-20] i nie będzie tutaj dalej rozwijane.

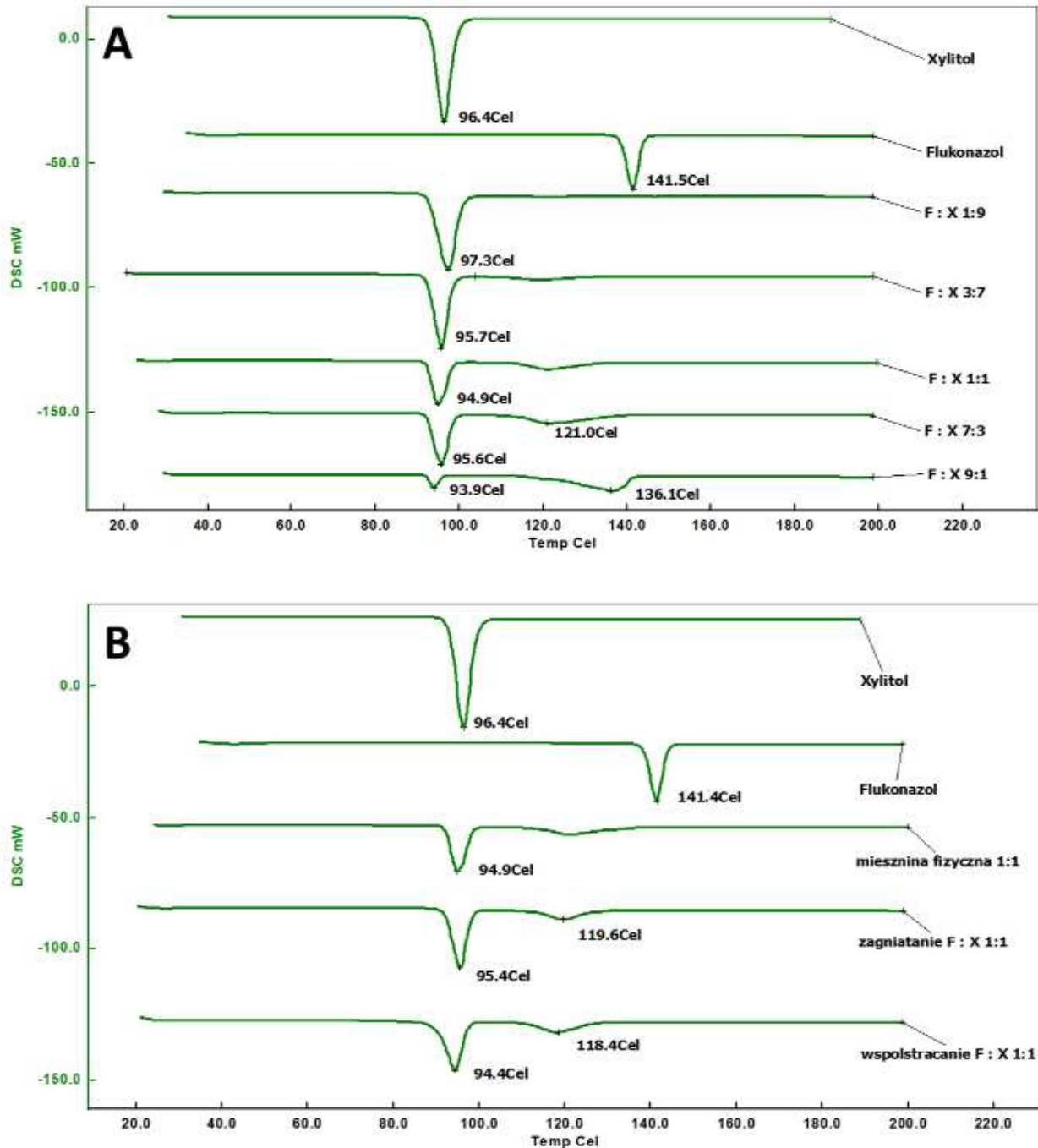
Wyjątek w tej grupie pomiarów stanowiła mieszanina fizyczna z Xylisorbem 90 (Rysunek 2A), gdzie na żadnej z krzywych nie jest widoczny pik pochodzący od flukonazolu. W zamian, przy stężeniu około 30% pojawia się słabo zaznaczony, szeroki i silnie przesunięty w kierunku temperatur niższych, nowopow-

efektem procesu samorzutnego i zachodzącego w temperaturze pokojowej. Obserwacje te można wytłumaczyć kierując uwagę na budowę strukturalną ksylitolu, który jest cukrem o 5 grupach hydroksylowych w cząsteczce. Obecność tych grup sprzyja tworzeniu się wiązań wodorowych i/lub powstawaniu oddziaływań typu van der Waalsa pomiędzy składnikami mieszaniny.

Podobnie jak w przypadku mieszanin fizycznych, na obrazach DSC próbek w stosunku wagowym 1:1, ale sporządzonych techniką mikronizowania lub współstrącania flukonazolu z Vivapurem 112 i 12, Vitacelem M80, Maltodekstryną „N”, skrobią Starch 1500 i Kleptożą nie zaobserwowano żadnych zmian, świadczących o wzajemnych interakcjach. Wartości endotermicznych

efektów cieplnych były do siebie podobne, a położenie temperatur T_{\max} i T_{onset} procesu topnienia zbliżone. Interesującą za to obserwację wnosi ponownie analiza krzywej DSC mieszaniny z Xylisorbem 90, przedstawionej na Rysunku 2B. Obserwuje się na niej nowopowstałe piki, które bez względu na sposób sporządzenia mieszaniny, charakteryzują się

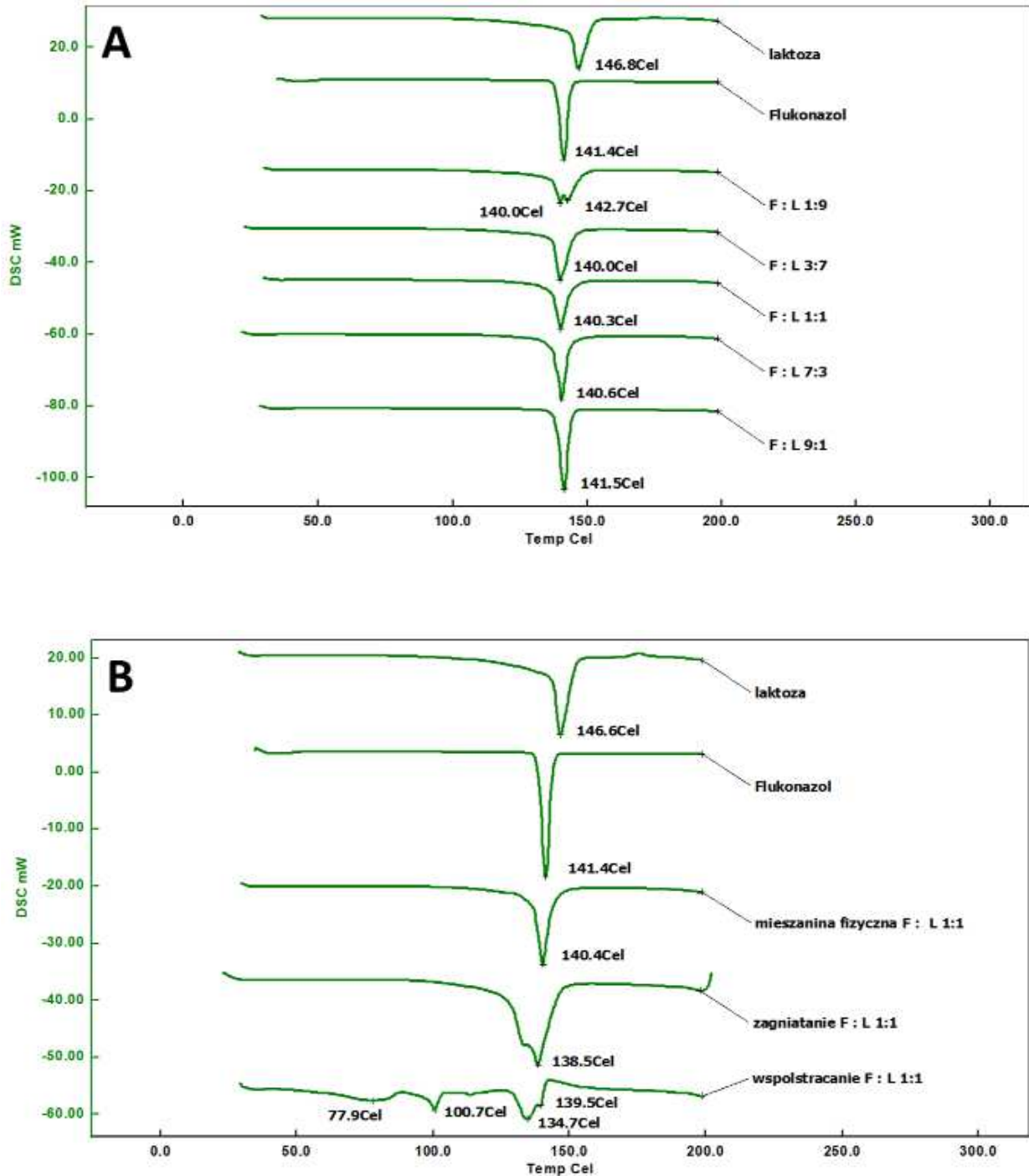
podobnymi wartościami endotermicznych efektów cieplnych (57,6 mJ/mg, 46,5 mJ/mg i 50,7 mJ/mg odpowiednio dla mieszanin fizycznych, mikronizowanych i współstrączanych) i położenia na osi temperatury (T_{\max} równe odpowiednio 94,9°C, 95,4°C oraz 94,4°C). Piki pochodzące od flukonazolu uległy całkowitemu zanikowi.



Rysunek 2. Krzywe DSC mieszanin flukonazolu z ksylitolem (Xylisorb 90). A – mieszaniny fizyczne i B – mieszaniny fizyczne, mikronizowane i współstrączone w stosunku wagowym 1:1. Na rysunku zaznaczono temperatury T_{\max} procesu topnienia.

Krzywe DSC mieszanin fizycznych flukonazolu z Tabletozą są przypadkiem, w którym zastosowanie DSC w ocenie możliwych interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny jest niemożliwe.

Dzieje się tak, ponieważ temperatury topnienia laktozy i flukonazolu są bardzo zbliżone do siebie. W obrazie DSC, pokazanym na Rysunku 3A, można to zaobserwować jako obecność jednego, wspólnego piku.



Rysunek 3. Krzywe DSC mieszanin flukonazolu z aglomerowaną α -laktozą (Tabletozą). A – mieszaniny fizyczne i B – mieszaniny fizyczne, mikronizowane i współstręcane w stosunku wagowym 1:1. Na rysunku zaznaczono temperatury T_{max} procesu topnienia.

Podobnie dzieje się dla mieszanin mikronizowanych i współstrączanych. Na Rysunku 3B pokazano zarejestrowane krzywe DSC dla tych układów, w zestawieniu z krzywą mieszaniny fizycznej. Wszystkie trzy przebiegi różnią się od siebie w znaczący sposób. Pik pochodzący od flukonazolu, zawartego w mieszaninie fizycznej, jest pojedynczy i wąski o temperaturze T_{\max} 140,3°C. Ten, który pojawił się na krzywej mieszaniny zagniatanej, jest szeroki i powstał w wyniku nałożenia się 2 procesów endotermicznych, których T_{\max} wynosiły odpowiednio 133,6°C oraz 138,5°C. Należy rozumieć, że są to piki laktozy i flukonazolu, których procesy topnienia zostały rozdzielone w warunkach eksperymentu. Natomiast w wyniku współstrączania powstały trzy endotermiczne piki: mały i szeroki o temperaturze piku w 77,9°C, znacznie węższy z T_{\max} w 100,7°C oraz duży podwójny pik z zaznaczonymi T_{\max} w 134,7°C oraz 139,3°C. O ile ostatni pik można przyporządkować, analogicznie do mieszaniny mikronizowanej, do flukonazolu i laktozy, to tożsamość pierwszych dwóch indywidualów wykracza poza możliwości interpretacyjne DSC.

WNIOSKI

Wykonano pomiary DSC czystych substancji flukonazolu oraz substancji pomocniczych i porównano je z uzyskanymi przebiegami odpowiednich mieszanin. Ich analiza została wykonana poprzez porównanie kształtów, wysokości i powierzchni endotermicznych pików DSC, a także przez porównanie położenia temperatur maksymalnych T_{\max} pików. Na krzywych mieszanin fizycznych flukonazolu z celulozami mikrokrystalicznymi Vivapur 112, Vivapur 12, Vitacel M80, Maltodekstryną N, skrobią kukurydzianą oraz β -cyklodekstryną nie zaobserwowano żadnego nowego piku, pochodzącego od nowego indywidualu chemicznego, a położenie piku flukonazolu pozostało bez zmian. Pozwala to wyciągnąć wniosek, że pomiędzy składnikami tych mieszanin nie zaszły wzajemne od-

działywania, nawet po mikronizowaniu lub współstrączaniu, które w założeniu miały symulować produkcyjne procesy technologiczne. W toku badań stwierdzono, że metoda różnicowej kalorymetrii skaningowej nie nadaje się do badań interakcji zachodzących między laktozą a flukonazolem. Mieszanina ta nie spełnia podstawowych warunków zastosowania tej techniki, polegających na tym, że temperatury topnienia poszczególnych składników powinny wystarczająco się od siebie różnić. Na krzywych DSC mieszanin flukonazolu z ksylitolem, można zaobserwować całkowity zanik piku flukonazolu i powstanie piku pochodzącego od nowego indywidualu chemicznego. Może to świadczyć o całkowitej amorfizacji flukonazolu lub też o powstaniu kompleksu z udziałem wiązań wodorowych między cząsteczkami leku a pięcioma grupami hydroksylowymi ksylitolu. Jednakże, w celu potwierdzenia natury otrzymanego nowego indywidualu chemicznego konieczne jest zastosowanie innych metod, takich jak: FTIR, IR, PXRD czy NMR.

Podsumowując należy dodać, że DSC jest metodą szybką. Łączny czas wykonania pojedynczego pomiaru, dla flukonazolu i badanych substancji pomocniczych, wynosił 18 minut. Ponadto wielką zaletą metody, w przeciwieństwie do powszechnie stosowanych technik analizy instrumentalnej, takich jak: spektrofotometryczne, elektroanalizy czy chromatograficzne, jest możliwość przeprowadzenia analizy próbki bez konieczności jej wstępnego przygotowania.

Resumo

Studioj pri interagoj inter aktivaj farmaciaj ingrediencoj (API) kaj farmaciaj helpaj substancoj estas unu el la ĉefaj aspektoj de la antaŭ-formulada procezo. Potencaj fizikaj kaj / aŭ kemiaj nekongruoj povas influi stabilecon kaj biodisponigeblecon de la drogo kaj, sekve, la efikecon kaj sekurecon de la farmakoterapio. La celo de ĉi tiu laboro estis montri la aplikon de la metodo de diferenziala kalorimetria skanado (DSC) en la taksado de la ebla influo de elektitaj farmaciaj helpaj substancoj sur la fizikaj proprajtoj de flukonazolo. Sekve, oni ekzamenis aron de miksaĵoj de flukonazolo kun mikrokristala celu-

lozo Vivapur 12 kaj 112, Vitacel M80-celulozo, Maltodekstrino N, amelo de maizo - Starch 1500, Tabletose (aglomerata α -laktozo), β -ciklodekstrino kaj ksilitolo.

La mezuradoj estis efektivigitaj per du krudaj materialoj kaj fizikaj miksaĵoj en la jenaj jenaj proporcioj de masoj de 1: 9, 3: 7, 1: 1, 7: 3, 9: 1. Por montri la eblan influon de fabrikadaj procezoj (kiel mueli, malseke mueli, granuligi, uzado de premo ktp), mikronigitaj (premkneditaj) kaj kunprecipigitaj (el akvo/alkoholaj solvaĵoj) miksaĵoj estis preparitaj kaj ekzamenitaj en 1: 1 pezo rilatumo. La analizo de la DSC-kurboj okazis komparante la valorojn de la maksimuma temperaturo T_{max} , same kiel la formon, altecon kaj areojn sub la endotermaj pintoj de la fandanta procezo.

PIŚMIENNICTWO

1. Wesołowski, M.; Laboratorium przemysłowe, 2007, 5, 28-31.
2. Wesołowski, M.; Laboratorium przemysłowe, 2007, 4, 33-36.
3. Janicki, S.; Fiebig, A.; Sznitowska, M. Red. W Farmacja stosowana. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008, p. 657-688.
4. Lin, S. Y.; Lee, C. S.; J. Inclusion Phenom. 1989, 7, 477-485.
5. Aigner, Z.; Berkesi, O.; Farkas, G.; Szabo-Revesz, P.; J. Pharm. Biomed. Anal. 2012, 57, 62-67.
6. Boldyrev, V.V.; J. Mater. Sci. 2004, 39, 5117-5120.
7. Shakhtshneider, T. P.; Boldyrev, V. V. Mechanochemical synthesis and mechanical activation of drugs. W Reactivity of Molecular Solids; Boldyreva, E.; Boldyrev, V. V., Red.; Wiley, New York, 1999, vol. 3, p. 271.
8. Bernardi, L.; Oliveira, P.; Murakami, F.; Silva, M.; Borgmann, S.; Cardoso, S.; J. Therm. Anal. Calorim. 2009, 97, 729-733.
9. Salameh, A. K.; Taylor, L. S.; J. Pharm. Sci. 2006, 95, 446-461.
10. Garg, A.; Singh, S.; Rao, V. U.; Bindu, K.; Balasubramaniam, J.; Drug Dev. Ind. Pharm. 2009, 35, 455-470.
11. Zerrouk, N.; Mennini, N.; Maestrelli, F.; Chemtob, C.; Mura, P.; Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004, 57, 93-99.
12. Tian, F.; Sandler, N.; Aaltonen, J.; Lang, C.; Saviile, D.; Gordon, K. C.; Strachan, C. J.; Rantanen, J.; Rades, T.; J. Pharm. Sci. 2007, 96, 584-594.
13. Airaksinen, S.; Karjalainen, M.; Kivikero, N.; Westermarck, S.; Shevchenko, A.; Rantanen, J.; Yliruusi, J.; AAPS PharmSciTech. 2005, 6, E311-22.
14. Yam, N.; Li, X.; Jasti, B. R.; Int. J. Pharm. 2011, 411(1-2), 86-91.
15. Monajjemzadeh, F.; Hassanzadeh, D.; Valizadeh, H.; Siah-Shadbad, M. R.; Mojarrad, J. S.; Robertson, T. A.; Roberts, M. S.; Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009, 73, 404-413.
16. Desai, S. R.; Shaikh, M. M.; Dharwadkar, S. R.; J. Therm. Anal. Calorim. 2003, 71, 651-658.
17. Al-Marzougi; A. H.; Elwy, H. M.; Shehadi, I.; Adem, A.; J. Pharm. Biomed. Anal. 2009, 49, 227-233.
18. Talik, P.; Czerniecka, E.; Hubicka, U.; Krzek, J.; Acta Pol. Pharm. 2017, 74(4), 1057-1062.
19. Talik, P.; Żuromska-Witek, B.; Hubicka, U.; Krzek, J.; Acta Pol. Pharm. 2017, 74(4), 1049-1055.
20. Talik, P.; Talik, P.; Hubicka, U.; Med Int. Rev. 2016, 27, 100-6.

LUCIUS QUINTUS CINCINNATUS LAMAR AND HIS APOPLEXY

OHRY Avi, MD*

Emeritus Professor of Rehabilitation Medicine, Sackler Faculty of medicine, Tel Aviv University & Reuth Medical and Rehabilitation Center, Tel Aviv, Israel.

Article submitted: 29.09.2018; accepted: 11.12.2018

Abstract

Judge Lucius Quintus Cincinnatus Lamar (1825-1893) became one of JF Kennedy's favourite political heroes. Lamar suffered from his first stroke in the age of 36. Searching his writings and historical material reveal that Lamar suffered also from depression, rheumatic heart disease and renal problems. Differential diagnosis of his disabilities is given together with descriptions of his ailments.

Key words: neurology, rehabilitation medicine, history of medicine

"Leave not a rack behind. We are such stuff As dreams are made on, and our little life Is rounded with a sleep. Sir, I am vexed. Bear with my weakness; my old brain is troubled. Be not disturbed with my infirmity. If you be pleased, retire into my cell And there repose. A turn or two I'll walk To still my beating mind..."

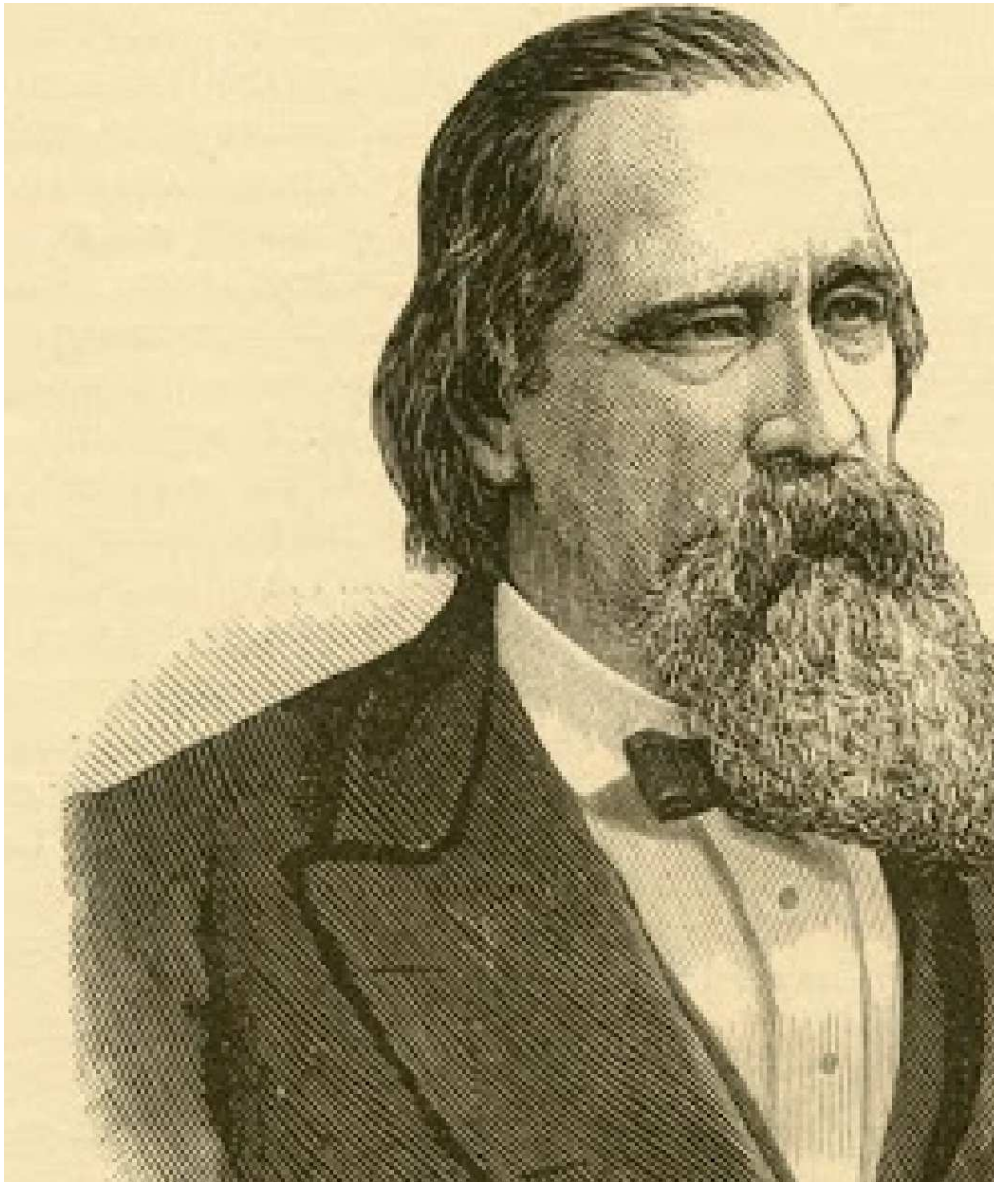
[W. Shakespeare, The Tempest , Act 4, Scene 1]

Introduction

One hundred and twenty five years ago, Judge Lucius Quintus Cincinnatus Lamar (1825-1893) died. He was one of J F Kennedy's favourite political heroes [1]. Kennedy wrote this book during his long hospitalization after spinal operation at Chelsea Naval Hospital, Massachusetts. Along his life, Kennedy had suffered from scarlet fever, back pain and Addison's disease. Lamar was a democrat from Georgia, diplomat, lawyer, judge and Lt. Colonel of the Confederation during the Civil War. Encyclopaedia Britannica [2] did not elaborate on his resignation from the military service in October 1861. Thirteen members of his

family served in the Southern army. Seven were killed. Kennedy explained why L. Lamar retired from the military service: he suffered an apoplexy at the age of 36. A stroke in the young was and still is a rare phenomenon [3]. Lamar's father suffered from depression and committed suicide when L. Lamar was nine years old. It is possible that Lamar had suffered some mental or neurological affliction since childhood. "During the Civil War, Lamar served as a lieutenant colonel of the Nineteenth Mississippi Regiment, but had to withdraw from combat because of bought of apoplexy, which had plagued him from childhood" [4]. The death of so many of his family members most probably added to his own depression [5].

*Corresponding Author: aohry@post.tau.ac.il



HON. LUCIUS Q.C. LAMAR
UNITED STATES SENATOR FROM MISSISSIPPY

Clinical descriptions

“On the evening of July 1, 1861, Lamar was in his tent about to retire, when he felt a sudden rush to his head followed by dizziness, disorientation and massive headache violent vertigo seized him and threw him to the ground unconscious, when he awoke, he was paralyzed in one side and when he tried to speak, his words were slurred and unintelligible apoplexy similar to 1859 in Paris seeking treatment to his ‘cerebral disease’ [6].

Lamar was described as a tall man, bearded, long-haired and large featured. Did he consult Charcot? I could not find any evidence for this possibility. Amazingly, J-M Charcot’s and Lamar’s life span were the same. Charcot apparently suffered from cardiac disease: his overweight, excessive smoking and sedentary life, led to his premature death. “But still, Mr. Lamar carried a burdened spirit, burdened under a sense of his unworthiness, and seeking such a cloudless comfort of soul as he had witnessed in his saintly mother and other devout Christians. Writing to his best-loved friend. Gen.

Walthall, from Memphis, in 1873, after having suffered from a severe stroke of paralysis, he thus pours out his anxious fears: 'I am a very sick man; suffer more than anybody thinks. I do not honestly expect to live twelve months. I believe that I shall go off like Yancey and Alex. Pegues before anybody suspects that much is the matter; and after all my studying about religion and striving to avail myself of its promises, I am not ready to go. I don't know what I would give for old Judge Longstreet's faith and courage. I can't say: "There is not a cloud." It is all clouds and darkness to me. I see less of God's providence, and more of evil and the supremacy of evil in this world, than I ever did in my life.' His spirits seemed to sympathize with his broken body, and for the moment allowed his faith to pass into partial eclipse" [7]. On chapter 31 we also find: "Notwithstanding Mr. Lamar's great physical strength and the ruggedness of his general health, for the last thirty-one years of his life he was more or less seriously troubled with organic weaknesses. He was never free from this embarrassment after his attack of vertigo, in Virginia, shortly subsequent to the battle of Williamsburg. In the course of this biography mention has been made in several places of this affliction, but only in the most severe instances. The less dangerous cases have been ignored, but they were frequent; and his work was all done under the consciousness that at almost any time the sudden rupture of a blood vessel in the brain might bring practically instantaneous death. However, the gravity of those attacks diminished as Mr. Lamar grew older. That of 1880 was the last of the graver sort. Still, he had a slight illness of this nature even after he was in the Cabinet, which he kept a secret; for he intensely disliked sensational reports in the papers about his health. In 1873 he wrote to Gen. Walthall that he was troubled with a renal disorder; and it is doubtful if he was ever afterwards entirely free from trouble of that nature, although there were long periods when he considered himself well, and felt so. In spite of those maladies, so great were his strength and vitality that he retained

his activity until quite late in life; and it is said of him that after he was in the Cabinet, irritated one day by a newspaper statement about his failing strength, and in order to disprove the statement to a friend, he stood under his chandelier [sic], and, leaping up straight, kicked it, being then about sixty years of age and weighing two hundred pounds. 'I am very weak, and find my breath very short after even the most moderate exercise; am subject to a constant dull headache and pains in the back of my neck and through my shoulders. Two doctors say, upon consultation, that one of the valves of my heart has ceased to act (I don't believe that); and another says that I have muscular rheumatism and a general nervous prostration. My own opinion is that I am under the lingering effects of a very obstinate and severe case of la grippe, from which I shall slowly recover. I do not feel that there is any cause to think that there is anything seriously and permanently the matter with me.' In April the collapse came. While seated upon the bench he was seized with a fit of coughing, and hemorrhages followed which were frequent and profuse and alarming for many hours. For a number of days he was confined to his bed, regarded as dangerously ill, and under active and vigilant treatment. It was during this illness that he wrote the letter to Mr. Cleveland given in the previous chapter. 'Hemorrhages, which were at the time painless and, as I then thought, harmless, left my breast sore and weak, so much so that I have to guard against any exertion, either bodily or mental. I look to the approaching October with dread, lest it find me unable to buckle on the harness for the resumption of judicial labors. My case was pronounced some time ago, by one doctor, as Bright's disease of the kidneys; but Dr. Pepper, of Philadelphia, in his diagnosis of the case, states that, while my kidneys are affected to a certain extent, it is not a case of diabetes or Bright's disease. He thinks that it is a disorder of the arterial system.' Later Mr. Lamar seemed to be improving and gathering strength. He conversed freely with Dr. Flewelling while returning home on the car, and said that his exercise made him feel like eating a good dinner. ...And soon it was evident that he was sinking. Mr. Virgin boarded a street car and went at once for Dr.

Parker, returning with the physician at about 8:40. 'He was found to be speechless and unconscious, and to the physician evidently beyond the reach of help. His head hung almost limp in the hands of one of the attendants, who was relieved by Mr. Virgin.' In this position his life passed out without a struggle, and so quietly and peacefully that those about him did not know the exact moment at which the soul took its flight." Discussion and differential diagnosis We do not know what Lamar's childhood affliction was. Beyond a kind of depression, he probably had his first "stroke" as a child. A cerebral arterial aneurysm? Psychogenic affliction? Later on, he had experienced a few more cerebral strokes, and he always slowly recovered. In the last chapter of his life, he most likely suffered from a cardiac problem and perhaps renal disease as well. Bright's disease was mentioned. Bright's disease was first described in 1827 by the English physician Richard Bright: inflammation, hemorrhages, apoplexy, convulsions, blindness and coma. He reported that he felt weakness, breathlessness, headaches, back pains, cardiac valve- and rheumatic problems, and some mental or neurological affliction. Lamar's actual renal disease is unknown. Concerning the recurrent strokes he suffered from: were they due to some kind of vasculitis (autoimmune, inflammatory)? Rheumatic cardiac valvular insufficiency? There is a possibility of a conversion reaction [8-9]. It is evident that in spite of his disability and ailments, his academic, professional and political accomplishments are astonishing. There are a few famous disabled people in history, who even before the days of modern rehabilitation medicine reached fame through their talents and dedication [10]. I doubt if it is possible to speculate soundly about the crossing point between biography, disease history and the connection of the apoplexies with antecedent episodes of depression in the case of Lamar. In fact, the diagnosis of neurasthenia was quickly taken up in Europe, especially in Germany. In the process, it gradually lost its class specificity; the neurasthenic ceased to be an aspiring Yankee and be-

came, in countries where doctors worked for the state and had working-class clientele, an artisan or booking-clerk. The stock treatment for neurasthenia was the "cure" devised by the great Philadelphia neurologist, Silas Weir Mitchell, which involved isolation, "entire rest" and "excessive feeding" with a milk diet [11]. Silas Weir Mitchell (1829–1914) was a physician, poet and writer, best known for his description of "causalgia" (complex regional pain syndrome), erythromelalgia, phantom pain and he possibly was the first to describe tendon reflexes in 1859. His erudition helped cement his friendship not only with Oliver Wendell Holmes, but with Walt Whitman, William James, and William Osler as well [12]. "Further evidence for the existence of conversion disorders in the Civil War comes from the records of the military hospital set up at Turner's Lane in Philadelphia by William A. Hammond, Surgeon-General of the Union Army, for the study and treatment of wounds and other injuries of the nervous system. There, Silas Weir Mitchell and his colleagues, George D. Morehouse and William W. Keen, described seven cases of "reflex paralysis" which were almost certainly conversion reactions. In these patients a missile wound of an extremity which had not damaged a major nerve resulted in a transient paralysis of all four limbs or an enduring weakness and sensory loss in several extremities. In one instance, a man who had been shot through the right thigh developed a loss of sensation over the entire right half of his body" [13]. Physicians that are mentioned in this article: Dr. Jean-Martin Charcot, 1825–1893, was a famous French neurologist. His works on hypnosis and hysteria made him famous around the world. More than 15 medical eponyms are named after him. He is regarded as one of the founding fathers of neuro-psychiatry. There are many eponyms named after many of his pupils. Dr. Edward Archelaus Flewellen, 1869-1910, a prominent surgeon, at one time Surgeon of the 5th Georgia Infantry Regiment and later Medical Director of the Confederate Army of Tennessee, was a cousin of Mrs Lamar. Lamar's second wife was Henrietta J. Holt, widow of General William S. Holt of Macon. His first wife was Virginia Longstreet, daughter of

Judge A B Longstreet [14-15]. Dr. William Pepper Jr., 1843 –1898, was a leader in medical education and a longtime Provost of the University of Pennsylvania. In 1891 he founded the Free Library of Philadelphia. He was professor of clinical medicine at Penn. PS “Lara Parker (b. 1938) is an American television, stage, and film actress known for her role as Angelique on the cult ABC-TV serial Dark Shadows which aired from 1966 to 1971. She was born Mary Lamar Rickey in Knoxville, Tennessee, and grew up in Memphis. Descendant of a prominent Southern family, she was a great-great-granddaughter of Lucius Quintus Cincinnatus Lamar II and a third-great-granddaughter of Augustus Baldwin Longstreet, an uncle of Confederate General James Longstreet. She received a Bachelor of Arts degree from Rhodes College and a Master of Arts degree from the University of Iowa.”

Resumo

La juĝisto Lucius Quintus Cincinnatus Lamar (1825-1893) iĝis unu el la plej favoraj politikaj herooj de J F Kennedy. Lamar estis trafita de sia unua apopleksio kiam li aĝis 36 jarojn. Traserĉante liajn tekstojn kaj historian materialon oni trovas, ke Lamar ankaŭ suferis de depresio, reŭmata kormalsano kaj renaj problemoj. Diferenciga diagnozo de liaj handikapoj estas diskutita kune kun priskriboj de liaj suferadoj.

References

1. Kennedy JF. Profiles in courage. Hamish Hamilton, London, 1965
2. Lamar LQC.; Encyclopaedia Britannica, 1960; 13: 606.
3. Adunsky A, Hershkovitz M, Rabbi R, Asher-Sivron L, Ohry A. Arch Phys Med Rehabil. 1992 ;73(9),859-62.
4. <http://www.historycentral.com/Bio/rec/LuciusLamar.html>
5. Jost K. (editor), The Supreme Court from A-Z. 2nd edition. P 254, Routledge , London & NYC, 1998.
6. Enzweller S. Oxford in the Civil War. Battle for a vanquished land. The History Press, Charleston, SC, 2010.
7. Mayes E, Lamar LQC. University of Mississippi, Nashville, Tenn. Publishing House, The Methodist Episcopal Church, South. Bakbee & Smith,; Agents. 1896. https://archive.org/stream/cu31924030911923/cu31924030911923_djvu.txt
8. Heruti RJ, Reznik J, Adunski A, Levy A. Weingarden H. Ohry A. Spinal Cord. 2002,40(7), 335-40.
9. Heruti RJ, Levy A, Adunski A, Ohry A. Spinal Cord. 2002,40(7), 327-34.
10. Ohry A. Disabil Rehabil. 2004, 26(9), 546-8.
11. Shephard B. A war of nerves. Soldiers and psychiatrists 1914-1994. Pimlico, 2002, 485 p. London.
12. Schneck JM, Mitchell SW, Holmes OW. JAMA, 1981; 246: 874-978.
13. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.175.3110&rep=rep1&type=pdf>
14. Knight LL, Georgia's Landmarks, Memorials, and Legends: Volume 2, Part 1, Pelican publishing co., Gretna 2006. 1
15. Lamar L. Schroeder-Lein GR, The Encyclopedia of Civil War Medicine.

CHANGES IN PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF DRUGS IN CRITICALLY ILL PATIENTS – PART I

Oryg. Zmiany właściwości farmakokinetycznych leków u krytycznie chorych – część I

CIOS Agnieszka^{1*}, HOŃDO Łukasz², ZIELIŃSKI Stanisław¹

¹Jagiellonian University, Medical College, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 9 Medyczna Street, PL 30-688, Kraków.

²John Paul II Hospital, 80 Prądnicka Street, PL 31-202 Kraków.

Article submitted: 02.12.2018; accepted: 25.12.2018

Abstract

The essential and the most difficult goal for the implementation of pharmacotherapy in critically ill patients is to achieve the desired pharmacological effect, while minimizing side effects of drugs. The desired pharmacodynamic effect is dependent on the concentration of a drug obtained in a target tissue. Drug concentration, in turn, depends on pharmacokinetic processes which, in this group of patients, undergo significant changes, which are often difficult to predict. These changes in pharmacokinetic properties of drugs may be caused by specific organ dysfunction, mainly liver or kidneys, and may be a consequence of an acute phase of inflammation, drug-drug interaction, or therapeutic intervention. Optimal use of drugs in patients of intensive care units requires, that physicians have a thorough understanding of the potential impact that a critical condition has on drug's absorption, distribution, metabolism and excretion.

Keywords: critically ill patients, pharmacokinetics, antibiotics, sepsis

Wstęp

Pomimo regularnego stosowania wielu leków u pacjentów w stanie krytycznym dane na temat wpływu chorób/oby na właściwości farmakokinetyczne leków są nadal w literaturze naukowej ograniczone. Stosowanie bezpiecznych i skutecznych schematów leczenia pacjentów z ciężką chorobą wymaga zrozumienia podstaw farmakokinetyki. W artykule tym dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego wpływu zmian patofizjologicznych, występujących u krytycznie chorych pacjentów, na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i eliminację leków. W zakresie wchłaniania leków omówiono zaburzenia perfuzji tkanek,

motoryki przewodu pokarmowego oraz interakcje składników odżywczych z lekami. W aspekcie dystrybucji leków zwrócono uwagę na przemieszczanie płynów w organizmie chorych krytycznie oraz zmiany w wiązaniu leków z białkami osocza. W rozdziale dotyczącym metabolizmu leków omówiono znaczenie wątrobowego przepływu krwi oraz wewnętrznego klirensu wątrobowego. Na koniec dokonano przeglądu literaturowego dotyczącego eliminacji leków u krytycznie chorych omówiono rolę i znaczenie klirensu nerkowego jako istotnego wskaźnika w tej populacji chorych. Dla potrzeb niniejszego artykułu przez pacjenta krytycznie chorego jest rozumiany pacjent po ciężkich urazach lub pacjent chorujący na ciężkie choroby uogólnione jak np. sepsa.

*Corresponding Author: Agnieszka Cios; agnieszka.cios@uj.edu.pl

Wchłanianie

Szybkość i stopień wchłaniania leku podawanego pozanaczyniowo w dużym stopniu zależy od właściwości fizykochemicznych jego cząsteczki oraz środowiska i miejsca podania. Ważnymi czynnikami wpływającymi na ten proces są takie cechy jak: wielkość molekuly, jej rozpuszczalność, stopień lipofilności, ujemny logarytm z wartości stałej dysocjacji (pKa) oraz stabilność substancji chemicznej/leczniczej. Właściwości organizmu, zmienione u pacjentów krytycznie chorych, takie jak przepływ krwi, pH i motoryka przewodu pokarmowego oraz powierzchnia wchłaniania, odgrywają także istotną rolę w procesie wchłaniania leku.

Po podaniu doustnym proces wchłaniania leku może być także zmieniony u krytycznie chorych. Obniżenie wchłaniania w takim stanie wynika ze zmniejszonej perystaltyki przewodu pokarmowego, zmian w pH treści pokarmowej, zmienionej diety, niedostatecznego ukrwienia ścian przewodu pokarmowego czy obrzęku jego błony śluzowej. Dysfunkcjom tym często towarzyszą zmiany w procesach dystrybucji, metabolizmu i eliminacji, przez co stężenie leku w miejscu działania nie osiąga wymaganych stężeń terapeutycznych. Dlatego też, u chorych w stanie krytycznym, preferowaną drogą podawania leków jest droga dożylna. Zapewnia ona całkowitą dostępność biologiczną leku, dzięki wyeliminowaniu konieczności wchłaniania substancji leczniczej przez błony biologiczne i efektu pierwszego przejścia, zachodzącego w wątrobie i w przewodzie pokarmowym. Zatem, gdy następuje konieczność zastosowania pozanaczyniowej drogi podania, współpracujący ze sobą klinicysta i farmaceuta kliniczny muszą rozważyć wszystkie zmiany zachodzące w organizmie chorego [1,2].

Zaburzenia perfuzji

Stan wstrząsu występujący często u krytycznie chorych, powoduje spadek ciśnienia tętniczego krwi, spowodowany nadmiernym rozszerzeniem naczyń pod wpływem dużej

ilości wydzielonego tlenku azotu (NO), co w efekcie prowadzi do niedotlenienia narządów. Podczas rozwoju sepsy dochodzi do nadmiernej relaksacji i zwolnienia akcji serca na skutek działania NO i wysokiego poziomu czynnika martwicy nowotworu (TNF- α - *tumor necrosis factor-alfa*). Zaburzenia hematologiczne występujące podczas sepsy, sprowadzają się głównie do wystąpienia zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC - *disseminated intravascular coagulation*). Objawia się on wydłużeniem czasów krzepnięcia, spadkiem poziomu fibrynogenu oraz poziomu płytek krwi. Ponadto, jest on także spowodowany pobudzeniem przez cytokiny zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia oraz nieprawidłowym działaniem mechanizmów antykoagulacyjnych (antytrombina III, trombomodulina). Prowadzi to do powstawania licznych, drobnych zakrzepów w naczyniach, co dodatkowo zaburza transport tlenu i wykorzystanie go przez tkanki. W wyniku tych zmian, organizm broni się przed uszkodzeniem życiowo ważnych narządów i „kieruje” krew do mózgu, serca oraz płuc, kosztem pozostałych organów takich jak: nerki, śledziona czy przewód pokarmowy. Takie przesunięcie krwi pozbawia narządy obwodowe tlenu i substancji odżywczych, co powoduje zmniejszenie stopnia wchłaniania leków z jelit, mięśni i tkanek podskórnych. W tym przypadku alternatywną drogą podania leku jest niewątpliwie droga dożylna. Wyniki badań klinicznych potwierdziły, że podskórne podawanie leku, krytycznie chorym pacjentom, odznacza się obniżoną skutecznością. Tego typu badania przeprowadzili Prilinger i wsp., którzy zaobserwowali, że po podaniu podskórnym antykoagulantów (np. enoksaparyny), uzyskano dużo niższe stężenie tego leku we krwi w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami [3]. Obniżony przepływ krwi w połączeniu ze zwiększonym zapotrzebowaniem metabolicznym, powoduje również zaburzenie funkcji przewodu pokarmowego manifestujące się obniżeniem zdolności wchłaniania leków na całej jego długości. W związku z tym przy wyborze drogi podania leku u krytycznie chorych należy wziąć pod uwagę zaburzenia perfuzji we wszystkich narządach.

Atrofia jelit

Pacjenci przebywający na Oddziałach Intensywnej Opieki Medycznej (OIOM) z powodu złego stanu zdrowia są często poddawani żywieniu pozajelitowemu. Wstrzymanie żywienia drogą jelitową jest konsekwencją zaburzonego stanu hemodynamicznego pacjenta, planowanymi zabiegami chirurgicznymi lub występującej u chorego nietolerancji żywienia dojelitowego. Należy jednak pamiętać, że dla prawidłowego funkcjonowania przewodu pokarmowego i jego proliferacji konieczny jest kontakt z pożywieniem. Dowiedziano też, że tzw. „głodowanie” (pozbawienie organizmu pokarmu) prowadzi do atrofii jelit już po trzech dniach i nie można temu zapobiec wprowadzeniem żywienia pozajelitowego. Zmiany zachodzące na powierzchni błony śluzowej jelita objawiają się zmniejszeniem wysokości kosmków jelitowych i głębokości ich mieszeków. Dysfunkcja jelit na poziomie makroskopowym wiąże się również z nieprawidłową aktywnością enzymatyczną na poziomie komórkowym. Należy przypuszczać, że u pacjentów w stanie krytycznym, u których w przebiegu choroby nastąpiło kilka dni „głodu” zaburzenie funkcjonowania komórek jelitowych może zmniejszać wchłanianie leków z przewodu pokarmowego [4].

Zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego

Po podaniu doustnym głównym miejscem wchłaniania leków jest jelito cienkie, ale obecność leków w jelicie jest uwarunkowana prawidłowym opróżnianiem żołądka. Do czynników spowalniających opróżnianie żołądkowe należą leki (np. opioidy i leki o działaniu antycholinergicznym), ale także ból, lęk, wstrząs, niedoczynność tarczycy, zapalenie otrzewnej, interwencja chirurgiczna, pokarm czy alkohol. Wzrost opróżniania żołądka obserwowany jest po zastosowaniu domperidonu, metoklopramidu, cisaprydu, propranololu, w tyreotoksykozie (zatrucie hormonami

tarczycy) i przy zwiększonej objętości płynów ustrojowych [4].

Zaburzenia fizyczne

Wprowadzenie żywienia dojelitowego ma na celu przywrócenie zdolności wchłaniania substancji w przewodzie pokarmowym. Nie powoduje to jednak wyeliminowania wszystkich zaburzeń fizycznych w organizmie, dlatego wchłanianie leków może w dalszym ciągu być zmienione. Większość leków to substancje o charakterze słabych kwasów lub słabych zasad, dzięki czemu, w zależności od pH środowiska, mogą występować one zarówno w formie cząsteczkowej jak i zjonizowanej. Postać cząsteczkowa ma charakter lipofilowy i to ona ma zdolność przenikania przez błony komórkowe organizmu. Dlatego też pH środowiska w jakim znajdzie się substancja lecznicza oraz jej wartość pKa odgrywają ważną rolę w procesie absorpcji. Klasycznym przykładem przytaczanym przez wielu naukowców jest zapewnienie kwaśnego środowiska dla prawidłowego wchłaniania leku przeciwgrzybiczego itrakonazolu podanego dojelitowo. Profilaktyka wrzodów żołądka i dwunastnicy, wymagająca stosowania antagonistów receptora histaminowego H₂ i inhibitorów pompy protonowej, powoduje podniesienie pH soku żołądkowego, co wpływa na zmianę właściwości lipofilnych innych substancji. Ryzyko zmiany pH istnieje także w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Dysfunkcja w wydzielaniu soku trzustkowego, odprowadzanego do dwunastnicy, powoduje zmiany w fizjologicznie alkalicznym środowisku panującym w początkowym odcinku jelit, przez co w tym miejscu zmniejszeniu ulega wchłanianie leków o charakterze zasadowym [5].

Innym problemem zaburzenia wchłaniania są interakcje leków podawanych wraz z żywnością dojelitową. Badania przeprowadzone przez Penrod’a i wsp. wykazały, że podawanie warfaryny jednocześnie z preparatami do żywienia dojelitowego powoduje skrócenie czasu protrombinowego. Warfaryna jest lekiem zmniejszającym krzepliwość krwi, którego mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy, zależnych od wi-

taminy K, czynników krzepnięcia, co w warunkach fizjologicznych objawia się wydłużeniem czasu protrombinowego [6]. Efekt ten prawdopodobnie jest spowodowany zaabsorbowaniem cząsteczek leku na składnikach preparatu odżywczego, przez co warfaryna nie może zostać prawidłowo wchłonięta. Inne leki, dla których udowodniono zmniejszenie wchłaniania w przypadku podawania ich z żywnością dojelitową to fenytoina, minocyklina oraz tetracyklina. Pomimo ciągłego przeprowadzanych badań nad zmianami we wchłanianiu różnych substancji leczniczych, bardzo wiele wyników nie jest jednoznacznych z punktu widzenia klinicznego, dlatego nadal aktualny jest pogląd, że podanie leku drogą dożylną jest sposobem na uzyskanie całkowitej biodostępności biologicznej leku, niezależnym od jednocześnie stosowanego żywienia do- czy pozajelitowego [7].

Dystrybucja

W najprostszym modelu farmakokinetycznym, jakim jest model jednokompartментowy, dystrybucję leku przedstawiamy następującym równaniem matematycznym [8]:

$$C = D \cdot V_d$$

w którym:

C - wartość stężenia początkowego leku podanego w bolusie dożylnym

D - dawka leku

V_d - objętość dystrybucji

Dystrybucja leku do różnych tkanek organizmu zależy od wielu czynników, takich jak: przepływ krwi, stopień jego wiązania z białkami, przepuszczalność tkanek, rozpuszczalność leku w tłuszczach, pH środowiska i pK_a leku [8]. Biorąc pod uwagę wszystkie te czynniki do rozpatrywania dystrybucji leku, należałoby wykorzystać bardziej skomplikowane modele farmakokinetyczne, jednak zaskakującym jest fakt, że uproszczony model dwukompartментowy jest wystarczający dla

bardzo wielu substancji leczniczych.

W przypadku ciężkich stanów klinicznych, występują zmiany w czynnikach odpowiadających za dystrybucję, dlatego w celu uzyskania wymaganego, terapeutycznego stężenia leku w miejscu jego działania, przy doborze podawanej dawki należy uwzględnić wszystkie te czynniki.

Zmiany pH

Często zmiany pH u ciężko chorych pacjentów są wynikiem dysfunkcji wielu różnych narządów, co przekłada się na zaburzenie oddychania, wstrząs oraz zmiany w funkcjonowaniu nerek. Jonowa postać leku nie przechodzi przez błony komórkowe, w efekcie czego dystrybucja leku może ulegać zmianie. Ponieważ jednak ciężkim chorobom towarzyszą również zmiany fizjologiczne nie można jednoznacznie stwierdzić jaki wpływ mają zmiany pH na dystrybucję leku [8].

Przemieszczanie płynów

Przemieszczanie płynów w organizmie chorego krytycznie to główna przyczyna zmian w dystrybucji leku. W uogólnionym stanie zapalnym, powodowanym najczęściej posocznicą lub wstrząsem septycznym, dochodzi do masowego uwalniania i aktywacji wielu tkankowych i miejscowych czynników zapalnych takich jak prostaglandyny, leukotrieny czy układy dopełniacza, które uszkadzają śródbłonek doprowadzając do jego zwiększonej przepuszczalności. Wzrost przepuszczalności naczyń włosowatych jest także spowodowany wpływem toksyn bakteryjnych. Wzmocniony przepięk z naczyń kapilarnych doprowadza do przechodzenia płynów ustrojowych poza łożysko naczyniowe. Wypełnianie przestrzeni śródtkankowej płynem tworzy tak zwaną „trzecią przestrzeń” (*third spacing*), którą obserwujemy jako opuchliznę kończyn, wodobrzusze czy też obrzęk płuc. Wszystkie te zjawiska tworzą „nowy” kompartment, w którym odkładać się mogą leki o charakterze hydrofilowym, przez co znacznie zwiększa się ich objętość dystrybucji, a obniża stężenie leku we krwi. Przy stosowaniu

antybiotyków u ciężko chorych pacjentów, wielokrotnie stwierdzono znacznie większą, niż przewidywana, objętość dystrybucji [5,9]. Szczególnie było to zauważalne w przypadku hydrofilnych antybiotyków aminoglikozydowych. Potwierdzają to wyniki badań, przedstawione w pracy Zaske, w których stwierdzono znaczny wzrost wartości objętości dystrybucji gentamycyny u krytycznie chorych wynoszący średnio 0,63 l/kg [10], podczas gdy wartość tego parametru u zdrowych, młodych ochotników wynosi 0,23 l/kg [11]. Zmiany farmakokinetyczne w objętości dystrybucji są bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia szczególnie w przypadku antybiotyków, których aktywność przeciwbakteryjna jest proporcjonalnie zależna od stężenia leku we krwi.

Przemieszczanie płynów w organizmie nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na zmiany w objętości dystrybucji leków. Zwiększenie objętości płynu pozakomórkowego, a tym samym zwiększenie objętości dystrybucji leków, może nastąpić w wyniku stosowania żywienia pozajelitowego czy też konieczności podawania dożylnie dużej ilości płynów.

Retencja płynów i związane z tym wzrost objętości dystrybucji leków może być efektem działania mechanizmów wyrównawczych, które uruchamiane są na skutek niewydolności serca i/lub nerek. Niewydolność nerek może także doprowadzić do obniżenia lub podwyższenia objętości dystrybucji wielu leków (tab. 1) [1,5,7].

Zmiany w objętości dystrybucji oczekiwać należy także w przypadku utraty masy tkanek. Na skutek stymulacji lipolizy i redukcji lipogenezy obniżeniu ulega masa tkanki tłuszczowej. Zmieniony jest także metabolizm białek, które pozyskiwane z mięśni szkieletowych, tkanki łącznej i trzewi, stają się źródłem energii dla organizmu. Zwiększona przemiana białek i redukcja grubości tkanki tłuszczowej doprowadzają do zmniejszenia masy ciała, co przejawia się zmniejszeniem objętości dystrybucji [5]. Dlatego lekarze klinicyści i farmaceuci kliniczni muszą być świadomi możliwych zaburzeń w objętości dystrybucji leków u pacjentów krytycznie chorych i zdawać sobie sprawę z konieczności monitorowania stężenia leków we krwi, zwłaszcza leków o wąskim indeksie terapeutycznym.

Wiązanie leku z białkami krwi

Istotny wpływ na dystrybucję leku wywierają także zmiany w stopniu jego wiązania z białkami. Zmiany te mogą być powodowane przez: podwyższenie lub obniżenie stężenia białek we krwi, współzawodnictwo o miejsce wiązania z substancjami endogennymi oraz zmiany w charakterze wiązania substancji leczniczej z białkiem [1,5,7,12,13].

U krytycznie chorych dochodzi do wzrostu stężenia białek ostrej fazy. Przedstawicielem tej grupy białek jest kwaśna α_1 -glikoproteina (AAG), która decydująco odpowiada za wiązanie zasadowych cząsteczek leków. Wzrost stężenia kwaśnej

Tabela 1. Wpływ niewydolności nerek na objętość dystrybucji różnych leków [7].

Podwyższenie objętości dystrybucji	Obniżenie objętości dystrybucji
amikacyna, azalocyлина, bretylium, cefazolina, cefonicyd, cefoksytyna, cefuroksym, dikloksacylina, erytromycyna, fenytoina, furosemid, gentamycyna, izoniazyd, klofibrat, kloksacylina, latamoksef, naproksen, sulfalen, trymetoprym, wankomycyna	chloramfenikol, digoksyна, etambutol, metycylina, pindolol

α_1 -glikoproteiny będzie skutkował obniżeniem stężenia niezwiązanej frakcji leku we krwi i w konsekwencji obniżeniem jego objętości dystrybucji [1,5,7,12].

Wahania stężenia białek we krwi mogą dotyczyć również albumin. Do obniżenia poziomu albumin dochodzi najczęściej na skutek niedożywienia, zwiększonej przepuszczalności śródbłónka naczyń kapilarnych i ucieczki białek do przestrzeni zewnątrznaczyniowej, zwiększonego katabolizmu białek, ich utraty w wyniku nieprawidłowej funkcji nerek i/lub obniżonej ich syntezy w wątrobie. Niski poziom albumin we krwi pociąga za sobą wzrost stężenia wolnej frakcji leku o charakterze kwasowym. Więcej leku może ulegać dystrybucji do tkanek, co w efekcie doprowadza do wzrostu jego objętości dystrybucji [1,5,7,9,12].

Wpływ na wiązanie leku z białkami, poza obserwowanymi zmianami poziomu białek we krwi, może mieć także współzawodnictwo środka leczniczego o miejsce wiązania z substancjami endogennymi. Na skutek nieprawidłowej czynności nerek i wątroby dochodzi do kumulacji metabolitów, które konkurują z cząsteczkami leku, wypierając je z miejsc wiązania na białkach. Np. w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby lub pierwotnej marskości żółciowej podwyższeniu może ulec poziom bilirubiny w surowicy. Bilirubina ma silne powinowactwo do albumin, co może odpowiadać za wypieranie leków o charakterze kwasowym z ich połączeń z tymi białkami [5,7].

Metabolizm

Metabolizm wątrobowy zależy głównie od trzech czynników fizjologicznych, tj. wątrobowego przepływu krwi (*HBF - hepatic blood flow*), aktywności enzymów wątrobowych i wiązania leku z białkami. Zmiany któregoś z wymienionych czynników wpływają znacznie na metabolizm wątrobowy środka leczniczego. Podstawowe równanie opisujące klirens wątrobowy ma postać [8]:

$$CL_H = Q \cdot E$$

gdzie:

CL_H - całkowity klirens wątrobowy

Q - całkowity przepływ wątrobowy

E - współczynnik ekstrakcji wątrobowej

Współczynnik E zależy od zdolności enzymów wątrobowych do metabolizowania leku oraz stopnia jego wiązania z białkami. Równanie służące do obliczenia wartości współczynnika E ma następującą postać [8]:

$$E = (f_u \cdot CL_{int}) / (Q + f_u \cdot CL_{int})$$

gdzie:

f_u - frakcja leku nie związanego z białkami

CL_{int} - wewnętrzny klirens wątroby lub maksymalna zdolność metaboliczna wątroby

Q - całkowity przepływ wątrobowy

Współczynnik E zależy od ilości leku metabolizowanego przez wątrobę i dzieli się odpowiednio na wysoki ($E > 0,7$), średni ($E = 0,3-0,7$) oraz niski ($E < 0,3$). Znajomość współczynnika E dla poszczególnych leków jest bardzo przydatna do przewidywania zmian w ich metabolizmie u pacjentów z różnego typu zaburzeniami [4].

Wątrobowy przepływ krwi

Każde zaburzenie przepływu krwi przez wątrobę wpływa na metabolizm leku, zwiększając lub zmniejszając jego dostępność do hepatocytów. Największe znaczenie ma to w przypadku leków z wysokim współczynnikiem ekstrakcji wątrobowej ($E > 0,7$), których przemiany wątrobowe ściśle zależą od przepływu krwi. Każdy lek o wysokiej wartości ekstrakcji wątrobowej wymaga określonej ilości czasu na oddysocjowanie od składników krwi, „wejścia” do hepatocytu i „poddania się” biotransformacji lub wydzieleniu z żółcią. Czynnikiem ograniczającym ten wysoko wydajny proces jest więc przepływ krwi. Przykładami leków o wysokiej i średniej ekstrakcji wątrobowej, stosowanymi u ciężko chorych pacjentów, są lidokaina, antagoniści receptorów β -adrenergicznych, morfina czy też midazolam [5,7].

U osób hospitalizowanych na OIOM-mie,

bardzo częstym schorzeniem towarzyszącym jest stan szoku septycznego, który w bardzo znaczny sposób zmienia przepływ wątrobowy, co ma szczególnie znaczenie dla leków o wysokiej ekstrakcji. W stanie hiperdynamicznych zmian, w przebiegu sepsy, wzrasta wyrzut serca i redystrybucja krwi do organów życiowo ważnych. Odwrotna sytuacja ma miejsce w późnym stadium sepsy, kiedy obniżenie przepływu krwi przez wątrobę powoduje zmniejszenie klirensu leków metabolizowanych w niej. Krwotoczne i inne postacie wstrząsu hipowolemicznego, a także zawał serca oraz niewydolność serca stanowią kolejną grupę schorzeń towarzyszących osobom w stanie krytycznym, które mogą przyspieszać spadek klirensu wątrobowego leków o wysokiej wartości współczynnika ekstrakcji [1,5,7,9].

Poza zmianami patologicznymi również istotne znaczenie w wątrobowym przepływie krwi, odgrywa też stosowana terapia. Wszelkie zabiegi kliniczne oraz politerapia są przyczyną jatrogennych zmian w przepływie krwi, czego efektem są zmiany w eliminacji substancji leczniczych o wysokiej ekstrakcji. Pomiedzy lekami zachodzi szereg interakcji, w wyniku których jedne środki lecznicze mogą powodować znaczące zmiany w metabolizmie innych leków, posiadających eliminację zależną bezpośrednio od przepływu krwi. Potwierdzono, że leki będące agonistami receptorów α -adrenergicznych takie jak fenylefryna, norepinefryna, epinefryna oraz dopamina mogą powodować skurcz żył wątrobowych, prowadząc do znacznego obniżenia przepływu krwi przez wątrobę. Leki zmniejszające opór naczyniowy, takie jak nitrogliceryna podnoszą przepływ krwi. Leki działające inotropowo dodatnio, poprzez zwiększenie objętości wyrzutowej serca, wpływają także na poprawę krążenia wątrobowego [1,5,7,9].

Wewnętrzny klirens wątrobowy

Dla wzoru: $CL_H = f_u \cdot CL_{int}$ niski poziom aktywności enzymów, słaba dyfuzja do hepatocytów i dysocjacja leków o niskiej eks-

trakcji wątrobowej najważniejszym czynnikiem odpowiadającym za metabolizm jest wiązanie z białkami i wewnętrzna aktywność metaboliczna hepatocytów (zależnie od białek krwi) oraz obniżone wydzielanie do żółci wpływają na zmiany klirensu wątrobowego. Najważniejszym procesem z wyżej wymienionych jest aktywność metaboliczna enzymów. Podobnie jak przepływ krwi przez wątrobę tak i klirens ulega znacznym zmianom w przypadku podwyższenia lub obniżenia aktywności enzymów metabolizujących leki co, może być efektem zmian patologicznych lub jatrogennych [5,7].

U krytycznie chorych pacjentów występuje znacznie podwyższony poziom hormonów stresu takich jak adrenalina, noradrenalina i kortyzol oraz białek ostrej fazy jak kwaśna AAG i białka C – reaktywnego (CRP). W ostrej fazie obserwuje się także podwyższony poziom cytokin prozapalnych (takich jak: IL-6, IL-1 β , TNF- α). W związku z tak wieloma zmianami zachodzącymi w organizmie w ostrej fazie zakażenia, prowadzone są liczne badania sprawdzające wpływ tych zmian na właściwości leku. Stwierdzono znaczne obniżenie aktywności izoenzymu P-450, co powoduje zwolnienie metabolizmu I fazy leków. Druga faza przemian metabolicznych także ulega zwolnieniu, ale nie odrywa to aż tak dużej roli jak zahamowanie reakcji fazy I. Dane te potwierdzono w badaniach farmakokinetycznych przeprowadzonych w grupie ciężko chorych, którym podawano jednocześnie klindamycynę i morfinę [4].

W przypadku innych leków u pacjentów w sytuacji podwyższonego stresu jakiemu jest poddany organizm w stanie ostrej choroby, obserwuje się ich przyspieszony metabolizm. Przykładem jest fenobarbital oraz fenytoina podawane podczas porazowego uszkodzenia mózgu chorym, u których obserwowano wzrost klirensu wątrobowego tych leków, co w konsekwencji spowodowało spadek ich stężenia we krwi. Antypiryna, lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, ulega w organizmie głównie przemianom tlenowym. Boucher i wsp. zaobserwowali u pacjentów z pourazowym uszkodzeniem mózgu zwiększenie klirensu antypiryny nawet od 14 do 207%, który

utrzymywał się przez cały okres obserwacji. Podobne badania, wykonane w grupie chorych przyjmujących lorazepam (ulegający również przemianom tlenowym), wykazały, że u większości pacjentów odnotowano zwiększony poziom klirensu tego leku [14]. Z powyższych danych wynika, że każdy lek, który ulega przemianom tlenowym, może być metabolizowany szybciej w czasie pourazowego uszkodzenia mózgu i dlatego rekomendowane jest kontrolowanie jego stężenia we krwi. U krytycznie chorych występuje wiele zmian w organizmie, które oddziałują na wątrobę i jej funkcjonowanie. Są to takie czynniki jak: stan hipoksji, obecność czynników zapalnych oraz indukcyjny lub inhibicyjny wpływ leków na aktywność enzymów wątrobowych. W stanie ciężkiej choroby, funkcja wątroby zostaje upośledzona w wyniku czego spada produkcja enzymów oraz następuje denaturacja ich białek lub zniszczenie przez czynniki zapalne, co w konsekwencji powoduje zwolnienie procesów metabolicznych I fazy [15].

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na metabolizm wątrobowy jest suplementacja żywieniowa. Wielu pacjentów w stanie krytycznym odznacza się bardzo przyspieszoną aktywnością metaboliczną i zwiększonym wydalaniem azotu. Należy w takiej sytuacji wcześniej włączyć suplementację żywieniową, zwłaszcza uzupełnianie zasobów białkowych (powinny stanowić 15-20% zapotrzebowania energetycznego) w celu złagodzenia zmian i ułatwienia pacjentowi rekonwalescencji. Podniesienie poziomu białek w diecie jest bezpośrednio związane ze zwiększeniem zdolności metabolicznej wątroby w stosunku do leków. Badania prowadzone u 9 pacjentów z poważnymi urazami głowy wykazały bezpośredni związek pomiędzy maksymalną szybkością przemian fenytoiny, a ilością przyjmowanych w diecie białek. Dla krytycznie chorych pacjentów udowodniono ścisły związek pomiędzy wzrostem klirensu, a zwiększonym zapotrzebowaniem organizmu na suplementację białek w czasie intensywnego leczenia [16].

Wiązanie leku z białkami

Zmiany zachodzące w procesie wiązania substancji leczniczej z białkami krwi, wpływają głównie na klirens leków o niskiej ekstrakcji, ponieważ substancje o wysokiej wartości ekstrakcji są całkowicie metabolizowane, niezależnie od stopnia wiązania z białkami krwi. Ogólnie można stwierdzić, że szybkość przemian substancji leczniczych o niskim współczynniku ekstrakcji jest ograniczona przez ilość wolnej frakcji leku w krążeniu ogólnym. Ze względu na to, że tylko wolny lek może dyfundować do hepatocytów, dla leków wolno metabolizowanych szybkość procesu eliminacji jest proporcjonalna do ilości ich frakcji nie związanej. Aby prawidłowo interpretować zmiany stężenia leku we krwi i efekt jego działania terapeutycznego u krytycznie chorych pacjentów, należy wziąć pod uwagę, możliwość zachodzenia zmian także w procesie wiązania leku z białkami. W prawidłowym przebiegu procesów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, zależnych bezpośrednio od ilości wolnego leku, przydatna jest więc znajomość współczynnika ekstrakcji stosowanych leków.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że u krytycznie chorych, pod wpływem silnego stresu lub urazu, spada stężenie albumin i nasila się synteza kwaśnej AAG. W wyniku tego, znacznie wzrasta wolna frakcja leków o charakterze kwaśnym, związanych przez albuminy, a maleje stężenie wolnej frakcji leków zasadowych, związanych przez AAG. W związku z tym konieczne jest monitorowanie u tych pacjentów zmian stężenia wolnej frakcji leków o wysokim stopniu wiązania z białkami oraz uwzględnienie modyfikacji ich dawkowania. Dla leków o charakterze zasadowym, przykładowo lidokaina, w celu uzyskania pożądanego efektu terapeutycznego, należałoby zwiększyć podawaną dawkę, ze względu na zwiększony poziom AAG i tym samym zwiększone wiązanie leku z tym białkiem. Przykładami leków, dla których stwierdzono znaczną zależność efektu terapeutycznego od zmian ilości wiążących je białek krwi są: fentanyl, alfentanyl, sufentanyl, remifentanyl, diltiazem,

nikardypina, werapamil, erytromycyna, haloperidol, itrakonazol, milirinon i propofol [14].

Eliminacja

Nerki są organem odpowiedzialnym za wydalanie większości leków. Eliminacja nerkowa dotyczy zarówno macierzystych cząstek leku, jak i ich metabolitów, otrzymanych na drodze przemian w wątrobie i w innych narządach. Klirens nerkowy może ulegać zmianie u krytycznie chorych pacjentów [1,13,17].

Brak prawidłowej czynności nerek doprowadzić może do kumulacji leków oraz ich metabolitów. Częstość występowania niewydolności nerek wśród pacjentów OIOM waha się w granicach 15-23%. Uszkodzenie nerek może być spowodowane: urazem, niewydolnością krążenia, zaburzeniami naczyniowymi, pierwotnymi chorobami nerek, reakcjami alergicznymi, zespołem uszkodzenia wielonarządowego, rozległymi oparzeniami, wstrząsem kardiogenym lub hipowolemicznym, niedrożnością kanalików nerkowych lub pozanerkowych dróg odprowadzających, a także stosowaniem nefrotoksycznych leków takich jak antybiotyki aminoglikozydowe, wankomycyna, cyklosporyna czy metotreksat. Niewydolność nerek, oprócz nieprawidłowej eliminacji leków, doprowadza także do utraty czynności metabolicznej, zaburzeń elektrolitowych, zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej, zaburzeń objętości płynów, stanu odżywienia, a nawet zaburzeń hematologicznych [5,7].

Wydalanie nerkowe jest wypadkową filtracji kłębuszkowej, wydzielania kanalikowego oraz resorpcji zwrotnej. Filtracja kłębuszkowa zależy od przepływu nerkowego, ciśnienia onkotycznego osocza, wielkości i ładunku cząsteczki leku oraz stopnia jego wiązania z białkami. Redystrybucja rzutu sercowego we wstrząsie, hiperdynamiczna czy hipodynamiczna faza posocznicy, stosowanie hemodynamicznie aktywnych leków, zmiany w poziomie białek krwi oraz zmiany pH występujące u krytycznie chorych mogą zmieniać fil-

trację kłębuszkową.

Wydalanie leków ulegających wydzielaniu kanalikowemu zależy od stopnia wiązania z białkami i od czasu kontaktu z miejscem wydzielania. Wydzielanie kanalikowe zależne w głównej mierze od szybkości przepływu krwi dotyczy leków o dużym powinowactwie do nośników, usuwanych prawie całkowicie z krwi podczas pojedynczego kontaktu z transporterami (np. fenytoina, warfaryna). Zredukowany nerkowy przepływ krwi będzie spowalniał ich eliminację. Zarówno filtracja kłębuszkowa jak i częściowo wydzielanie kanalikowe zależą od stopnia wiązania leku z białkami, który ulega zmianom u krytycznie chorych pacjentów. Wydaleni przez nerki podlegają tylko cząsteczki leku niezwiązanego z białkiem. W przypadku leków silnie związanych z białkami, znaczny wzrost ich wolnej frakcji doprowadzić może do wzrostu ich klirensu nerkowego i przyspieszonej eliminacji.

Część leków podlega resorpcji zwrotnej. Podczas posocznicy, na skutek zredukowanej filtracji kłębuszkowej i obniżonego przepływu moczu prawdopodobnie maleje także resorpcja zwrotna, ale to stwierdzenie nie jest dotychczas w pełni udokumentowane [5,7,9,17]. W niewydolności nerek często zachodzi konieczność zastosowania hemodializy, która znacznie zwiększa klirens nerkowy leków, wydalanych głównie na drodze eliminacji nerkowej [12].

Pacjenci z rozległymi oparzeniami

Osoby ciężko poparzone należą do grupy chorych najczęściej badanych. Wynika to z faktu, iż występuje u nich największe prawdopodobieństwo podwyższenia klirensu nerkowego leków. Spowodowane jest to młodym wiekiem pacjentów, obecnym stanem hipermetabolicznym i związanym z nim zwiększonym zapotrzebowaniem na substancje odżywcze oraz intensywną kurację nawadniającą. Dane literaturowe opisują dwa różne kierunki zmian klirensu nerkowego w tej grupie chorych. Pierwsze wskazują na istotny wzrost tego wskaźnika w porównaniu z wartościami zmierzonymi u zdrowych ochotników i osób chorych, nie będących w stanie krytycznym.

Znaczny wzrost klirensu nerkowego odnotowano dla powszechnie stosowanych antybiotyków z grupy aminoglikozydów, a także wankomycyny, ciprofloksacyny i flukonazolu. Dla antybiotyków β -laktamowych uzyskane wyniki były bardzo zróżnicowane, przy czym największy wzrost klirensu stwierdzono dla imipenemu (tab. 2) [18].

niepożądanych lub zatrucia, tak stężenia subterapeutyczne, do których przyczynia się też zwiększona objętość dystrybucji, ciężko ocenić przy łóżku pacjenta, bez dodatkowych badań farmakokinetycznych. Dlatego też tak ważne jest prowadzenie terapii monitorowanej w tej grupie pacjentów.

Tabela 2. Zmiany klirensu nerkowego leków u krytycznie chorych pacjentów w porównaniu ze zdrowymi osobami oraz chorymi nie będącymi w stanie krytycznym [18].

Populacje badanych pacjentów	Przyspieszony klirens	Brak zmian	Zwolniony klirens
Pacjenci poparzeni (n = 22)	12	7	3
Pacjenci hospitalizowani i operacyjni (n = 13)	4	6	3
Pacjenci po urazach (n = 7)	2	4	1
Wszystkie badania (n = 42)	18 (43%)	17 (41%)	7 (17%)

Dla cymetydyny i ranitydyny również wykazano podwyższony poziom tego parametru, czemu przypisuje się brak efektu przy stosowaniu tych leków w profilaktyce wrzodów wywołanych nadmiernym stresem. Nie dla wszystkich jednak leków odnotowano przyspieszenie klirensu. Takim przykładem jest morfina i jej metabolity, 3- i 6-glukuroniany, dla których szybkość eliminacji nie zmieniła się [18].

Drugi kierunek rozważań zakłada, że u osób z rozległymi poparzeniami występuje znaczne zróżnicowanie zmian klirensu nerkowego. Wyniki tych badań pokazują, że istnieją chorzy, u których eliminacja leków jest dużo szybsza oraz inni chorzy, u których zachodzi ona wolniej. Taki stan wiedzy, stwarza istotny problem w ustalaniu dawkowania leków, gdyż zachodzą możliwości uzyskania stężeń leków, odpowiednio subterapeutycznych bądź toksycznych. Jakkolwiek stężenie toksyczne jest łatwe do wykrycia po ujawnieniu się objawów

Pacjenci hospitalizowani i pooperacyjni

Kolejną, często badaną populacją, są ciężko chorzy pacjenci hospitalizowani na OIOM-ach i chorzy pooperacyjni. Grupa ta ma charakter zróżnicowany, ponieważ w jej skład wchodzi zarówno pacjenci w trakcie przebiegu infekcji bakteryjnych, jak i osoby nie zakażone. W tej grupie zauważono nieco inne zmiany w eliminacji leków, niż u osób poparzonych. Najczęściej stwierdzano brak zmian w wartości klirensu leków. Lecz istniał też drugi, niejednoznaczny pogląd donoszący o wzroście lub spadku jego wartości. Ten stan wiedzy wynikał z faktu, że badania przeprowadzono na populacjach osób w wieku podeszłym, którym dodatkowo towarzyszyły różne, inne choroby przewlekłe, czego konsekwencją było obniżenie sprawności funkcji nerek oraz zmniejszenie stopnia hipermetabolizmu i podaży płynów, w porównaniu z grupą chorych poparzonych. Podsumowując wyniki uzyskane w tej grupie chorych, stwierdzono duży stopień zróżnicowania

zmian klirensu dla poszczególnych grup leków (tab. 2). I tak ciprofloksacyna i lewofloksacyna wykazywały wyraźne zwiększenie eliminacji, podczas gdy wankomycyna – jej zwolnienie. Dla antybiotyków aminoglikozydowych nie odnotowano żadnych istotnych zmian, natomiast w grupie antybiotyków β -laktamowych odnotowano dużą różnorodność badanych wartości. Dla antybiotyków z grupy karbapenemów (imipenem) stwierdzono podwyższoną wartość klirensu nerkowego [18].

Pacjenci po ciężkich urazach

W tej grupie chorych, przeprowadzono dużo mniej badań niż na opisanych wcześniej grupach pacjentów. Jakkolwiek pod względem charakteru populacji wykazuje ona większe podobieństwo do grupy chorych z poparzeniami ze względu na młody wiek i obecny stan hipermetabolizmu, to jednak uzyskane wyniki badań dotyczące eliminacji leków są bardziej zbliżone do wartości zmierzonych u chorych hospitalizowanych na OIOM-ach i pooperacyjnych. W populacji pacjentów po ciężkich urazach, wyniki badań farmakokinetycznych antybiotyków były zróżnicowane. Np. klirens imipenemu nie wykazał znaczących zmian, natomiast eliminacja ceftazydymu była zwiększona, a aztreonamu – zmniejszona (tab. 2). Odnotowano także znaczny wzrost klirensu nerkowego dla trimetoprimu i sulfametoksazolu, co jest ważnym faktem, biorąc pod uwagę konieczność stosowania tych leków w zakażeniu szpitalnym *Stenotrophomonas maltophilia* [18].

Efektywność prowadzonej antybiotykoterapii u krytycznie chorych zależy od stopnia dokładności z jaką określona zostanie dawka leku zapewniająca terapeutycznie skuteczne, a jednocześnie bezpieczne, w danej sytuacji klinicznej, stężenie leku we krwi. Osiągnięcie tego celu jest możliwe jedynie w oparciu o indywidualizację dawkowania. Dlatego w warunkach rutynowego postępowania klinicznego istotne jest, aby wybrana metoda optymalizacji dawkowania uwzględniała z jednej strony wpływ

czynników fizjologicznych pacjenta (wiek, płeć, masa ciała), a z drugiej – towarzyszące zmiany patologiczne (zaburzenie funkcji nerek, wątroby, towarzyszące choroby), które odpowiedzialne są za obserwowane różnice międzypersoniczne w wielkości oznaczanych stężeń po podaniu standardowych dawek. Optymalizacja dawkowania leków przeciwbakteryjnych powinna również uwzględnić dane mikrobiologiczne, tj. rodzaj drobnoustrojów chorobotwórczych wywołujących zakażenie oraz ocenę ich wrażliwości na dany antybiotyk poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC).

Resumo

La esenca kaj plej malfacila celo por la efektivigo de farmakoterapio ĉe malsanuloj estantaj en la fina stadio de malsano estas atingi la deziritan farmakologian efikon, minimumigante kromefikojn de medikamentoj. La dezirata farmakodinamika efiko dependas de la koncentriĝo de medikamento akirita en la celhisto. Koncentriĝo de medikamento, siavice, dependas de farmakokinetikaj procezoj, kiuj en ĉi tiu grupo de pacientoj estas submetitaj al signifaj, ofte malfacile antaŭvideblaj ŝanĝoj. Ĉi tiuj ŝanĝoj de farmakokinetikaj proprecoj de medikamentoj povas esti kaŭzita de specifa malfunkciado de organoj, ĉefe hepato aŭ renoj, kaj ĝi eblas kiel sekvo de akra fazo de inflamo, interefiko de inter medikamentoj aŭ influo de terapio. Optimuma uzado de medikamentoj ĉe pacientoj intense prizorgitaj en malbona stadio bezonas profundan komprenon de kuracistoj de la ebla efiko je la absorbado, distribuo, metabolo kaj ekskrecio de medikamentoj.

Piŝmiennictvo

1. Power, M. B.; Clin Pharmacokin. 1998, 34, 25-50.
2. Kennedy, J. M.; Clin Pharmacokin. 1998, 35, 293-312.
3. Priglinger, U.; Delle Karth, G.; Geppert, A.; Joukhadar, C.; Graf, S.; Berger, R.; Hülsmann, M.; Spitzauer, S.; Pabinger, I.; Heinz, G.; Crit Care Med. 2003, 31, 1405-1409.
4. Boucher, B. A.; Wood, G. C.; Swanson, J.M.; Crit Care Clin. 2006, 22, 255-271.

5. De Paepe, P.; Clin Pharmacokin. 2002, 41, 1135-1151.
6. Penrod, L. E.; Allen, J. B.; Cabacungan, L. R.; Arch Phys Med Rehabil. 2001, 82, 1270-1273.
7. Charnowa, B.; Springer PWN. Warszawa 1996.
8. Orzechowska-Juzwenko, K.; Górnicki Wydawnictwo Medyczne, 2017.
9. Fry, D.; American Journal of Surgery. 1996, 172, 20- 25.
10. Zaskie, D. E.; Chin, T.; Kohls, P. R.; Solem, L. D.; Strate, R.G.; J Burn Care Rehabil. 1991, 12, 46-50.
11. Demczar, D. J.; Nafziger, A. N.; Bertino, J. S.; Antimicrob Agents Chemother. 1997, 41, 1115-1119.
12. Bugge, J. F.; Best Practice & Clinical Anaesthesiology. 2004, 18, 175-187.
13. Van Dalen, R.; Intensive Care Med. 1990, 16, 235-238.
14. Park, G. R.; Br J Anaesth. 1996, 77, 32-49.
15. Pea, F., Viale, P., Furlanut, M.; Clin Pharmacokinetic. 2005, 44, 1009-1034.
16. Boucher, B. A.; Kuhl, D. A.; Fabian, T. C.; Robertson, J. T.; Clin Pharmacol Ther. 1991, 50, 487-497.
17. Pea, F.; Clinical Pharmacokinetic. 2005, 44, 1009-1034.
18. Barletta, J. F.; Johnson, S. B.; Nix, D. E.; Nix, L. C.; Erstad, B. L.; J Trauma. 2000, 49, 869-872.

Big Data Algorithms in Medicine - Medical Competence and Critical Judgment Required?

ASTER Hans-Christoph¹, BOHRER Thomas^{2*}

¹Neurological Clinic, University Hospital Würzburg, Josef-Schneider-Straße 11, 97080 Würzburg, Germany

²Clinic for Thoracic Surgery, Klinikum Kulmbach, Albert-Schweitzer-Straße 10, 95236 Kulmbach, Germany

Article submitted: 17.12.2018; accepted: 25.12.2018

Abstract:

Every week we read about new diagnoses that can be made faster and with greater certainty by an algorithm than by a human being. This commentary is dedicated to the risks and opportunities, data monopolies, the influence of politics, and the future role of physicians.

Keywords: Artificial Intelligence, Big Data, Medicine, Algorithms, Politics, Causality

There is a gold-rush atmosphere in medicine. Once again, one looks to the West, full of expectations, toward Silicon Valley, and its utopia of the emerging capabilities of artificial intelligence. But there are also times, when the current German Minister of Health, as author of a book, represents theses such as “data protection is for healthy people” [1]. How will everyday medical life change with digitalization and what influence should doctors exert?

Every week we read about new diagnoses that can be made faster and with greater certainty by an algorithm than by a human being. While doctors have to inform themselves about current studies and guidelines in addition to their clinical work and bureaucracy is accounting for an increasing share of working time, an algorithm can fall back on enormous computing capacities. Between the years 100,000 BC and 2003, a total of 5 exabytes of data were generated worldwide; today this amount of data takes two days [2]. According to IBM, the amount of medical data doubles every 3 years and this timespan will be reduced to 73 days by 2020 [3]. In the field of oncology, with its numerous possibilities of gene therapy, algorithms can be used to find optimal therapeutic ap-

proaches much faster. But how do algorithms work?

It is worth taking a look behind the beautiful applications of companies such as IBM and Google. So-called neuronal networks, first researched playfully using examples such as chess, are fed as much data as possible, such as possible chess moves or laboratory parameters. The outcome of the game or the correct diagnosis are also entered by humans. The more data the high-performance computer receives, the better the correlation it can calculate, whereby an actual causality can never be calculated. A good example is pulmonary edema, which is diagnosed by algorithms from thoracic X-ray images [4]. Researchers found that the software in X-rays did not link the edema itself with the diagnosis, but rather pacemakers in the image. Thus, it was often correct, since patients with pacemakers often have pulmonary edema, but the connection was wrong. Based on this, Gerd Antes, head of Cochrane Germany, predicts a “descientification” of medicine by Big Data and a wrong focus on correlation instead of causality [5]. How exactly these correlations are calculated by algorithms, however, is not clear, even to computer scientists. The weights, vectors and thresholds of the paths in neural networks can no longer be re-

*Corresponding author: Thomas Bohrer; e-mail: Thomas.Bohrer@Klinikum-Kulmbach.de

constructed, if they are greater than 2×10 perceptrons (synapse in neural networks), similar to tree diagrams. The developers of algorithms therefore affectionately call these “black boxes”. Parameters can be integrated, but the algorithm decides how they are weighted in individual cases.

This can have far-reaching consequences, for example if the parameter is “cost efficiency”. Companies, such as Aspire Health in the USA, use patient information to calculate individual life expectancy [6]. The background is, that $\frac{1}{4}$ of the money spend in healthcare is used in the last year of the patient’s life. Prognosis programs could ensure, that patients, who are thought to be in the last year of their life are offered outpatient and thus more favorable therapy, instead of aggressive inpatient therapy. In Great Britain, similar software can already be used when deciding whether chemotherapy is indicated. While this can spare many patients from having to undergo futile and strenuous treatment, such decisions must be based on transparency, as to which interests have an influence on the decision. Is it the patient’s welfare and thus humanitarian interest that is in focus, or is it the fulfilment of an economic plan? Naturally, an algorithm cannot answer this question.

It is therefore not surprising that health insurance companies are very interested in the further development of such algorithms. As variables reduce an individual to a score that may deny him or her access to public services, the original idea of solidarity among health insurers is increasingly eroding. Just in time for the new basic data protection service, many health insurers assured themselves that they would be allowed to pass on data to third parties. One example of the new cooperation between health insurance companies and computer companies is the project between a German health insurance company and IBM for an electronic patient file, in which case, according to Techniker Krankenkasse (a German health insurance company), the customer does not have to agree to the transfer of his or her

data to the company providing the software [7]. While programs, such as the “Google Deep Variant”, used for gene sequencing, advertise with user-friendliness, large computing capacity and free use, the companies receive huge data sets in return. In a digital age in which data is traded as the new currency, this increasingly secures the monopoly position of software companies.

The doctor-patient relationship will also change. While the expert knowledge of physicians has been trusted up to now, in some areas algorithms are trumping this more precisely and quickly. Although this could give patients greater independence, it could also erode public trust in physicians and the doctor-patient relationship. Whereas in 1970 95% of the population still trusted doctors, by 2014 this proportion had fallen to 66% in Germany [8]. However, it has been sufficiently proven, that trust in the abilities of the treating physician has a significant influence on patient’s recovery [9].

In addition to the ethics in digitization, demanded by German Federal President Steinmeier, the digital evolution in medicine has so far been largely influenced by software companies and politics [10]. The medical profession can and should discuss the crucial questions about algorithms such as: If they can reduce physicians’ tasks, for example in diagnostic or bureaucratic areas, how will the freed-up time be used by medical doctors? Will it be used for seeing more patients, or do we get more time for each patient? Should the medical curriculum be adapted to the new requirements of the medical profession and how? What criteria are used to produce the algorithms, and to what extent are economic parameters taken into account? Where is the ethical aspect of medical practice? Physicians must play a leading role in this discussion, which sets the course for the future of the medical profession. This is beneficial not only to medical students and doctors, but above all to the addressees of all medical action: our patients.

The new Big Data technology is only a tool of the trade. It opens up good opportunities, but the danger of misuse should not be neglected. The framework conditions for digitization in medicine still have to be defined, and we as doctors should

be more involved in this discussion. Because, as the saying goes, not all that glitters is gold.

Resumo:

Ĉiusemajne ni legas pri novaj diagnozoj, kiuj povas esti faritaj pere de algoritmo pli certe kaj pli rapide ol per homo. Tiu ĉi komentario okupiĝas kun la riskoj kaj eblecoj, datenmonopoloj, la influo de politiko kaj la estonta rolo de kuracistoj.

References

1. Spahn, D., MUschenich, App vom Arzt – Bessere Gesundheit durch digitale Medizin. Herder Verlag: 2016.
2. Andrew McAfee, E. B., Big Data: The Management Revolution. Harv. Bus. Rev. 2012.
3. Alexandra Weißmann, E. D. Kognitives Assistenzsystem unterstützt Ärzte und die Transformation des Gesundheitswesens. <https://www.ibm.com/de-de/blogs/think/2016/06/10/ibm-watson-gesundheitswesen/> (accessed 23.05.18).
4. Brender, M. Bildgebende Diagnostik - Ersetzt die künstliche Intelligenz bald den Arzt. (<http://www.faz.net/aktuell/wissen/medizin-ernaehrung/bildgebende-diagnostik-ersetzt-die-kuenstliche-intelligenz-bald-den-arzt-15531347-p3.html>) (accessed 25.05.18).
5. Antes, A. L., A systematic approach to instruction in research ethics. Account Res 2014, 21 (1), 50-67.
6. Health, A. <http://aspirehealthcare.com> (accessed 18.05.18).
7. Team, I. T. B. D. "TK-Safe hat Potenzial für das gesamte Gesundheitswesen". <https://www.ibm.com/de-de/blogs/think/2018/04/24/tk-safe-gesundheitswesen> (accessed 23.05.18).
8. Blendon, R. J.; Benson, J. M.; Hero, J. O., Public trust in physicians—U.S. medicine in international perspective. N. Engl. J. Med. 2014, 371 (17), 1570-2.
9. Farin, E.; Gramm, L.; Schmidt, E. J. Behav. Med. 2013, 36 (3), 246-58.
10. Ärzteblatt Steinmeier für ethischen Umgang mit Digitalisierung. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/95154/Steinmeier-fuer-ethischen-Umgang-mit-Digitalisierung> (accessed 23.05.18).

Ethical standards

MIR's ethical standards are in accordance with the 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals', published by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/recommendations>).

Ethics approval is needed from an institution such as an Institutional Review Board (IRB) or Independent Ethics Committee (IEC), where such exist to review research projects. All work involving research on human subjects must comply with the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3>).

There should also be a declaration of the very fact that the work was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki in the published papers concerning research involving human beings.

Conflict of Interest

A conflict of interest arises when the scientific judgement relevant for the published research issue may be not in accordance with financial profit, personal preferences or professional rivalry on the side of the authors, reviewers or editors. Therefore for publication in MIR a declaration of conflicts of interest, which will be published in the case that the submitted paper is accepted, is compulsory for the authors.

FOR AUTHORS

SUBMISSION

Manuscripts in English, Esperanto, Spanish, Italian, Polish (or any other conference language), can be submitted via electronic mail or Open Journal System (OJS). Each article has to have an abstract in English or Esperanto if only one version is submitted, the second will be translated by the editors (free of charge).

FILE FORMAT

Manuscripts should be saved in native format, offered by text processing software (preferably .docx, .doc, .odt). All figures (apart from being embed in text, or marked) should be saved and submitted in native separate files (.jpeg, .cdr, .cpt, .svg, .tiff) with resolution suitable for printing typically 300 dpi (or greater) for color photographs and at least 400 dpi (or greater) for black-white and gray scale drawings.

TEXT

Layout of the manuscript should be left as simple as it is possible. Text has to be in single column format. Use Times New Roman 12 with 1.5 interline throughout the manuscript and avoid unnecessary formatting. Paragraphs have to be clearly separated from each other. Italic and bold face fonts can be used just as subscripts and superscripts etc. Options in word-processing software for text justification and word hyphenation must not be used.

Mathematical formula should be written in single line format (e.g. $(2+2)^2 / [(2*2)-2] = 2/x^{-2}$) or written in LaTeX®. Chemical formulas should be provided in a chemical drawing software format (rarely a high resolution .tif or .jpeg can be accepted but at the redaction discretion).

During publication, most of the formatting codes will be deleted and/or replaced by our editors to fit the manuscript into journal layout. All lines of text should be numbered. The maximum number of characters depends on the type of article:

Letter to the editorial board: 1000

Short article: 3000

Original publication: 6000

Review publication: 7000

TITLE

Should not be exceedingly long and should state the main research goal and methodology.

ABSTRACT

The abstract should be written in English and Esperanto, left short and state briefly research goal, results, and the most important conclusions. As *Medicina Internacia Revuo* is readily willing to accept papers from authors who speak neither Eng-

lish or Esperanto, this task might be fulfilled by the editorial board on these special occasions. References in the abstract should be avoided. Abstract should be prepared in a way allowing its presentation as a stand-alone note. The maximum number of characters is 250.

KEYWORDS

Up to six keywords can be defined, and should allow others to find the article in search forms.

REFERENCES STYLE

Vancouver, example:

Smith M, Kowalski A, Johanson MK. Medicinal activity of *Bacopa monnieri*. *Med Int Rev.* 2013; 1(2): 54-62.

INSTRUCTIONS FOR CITATIONS OF REFERENCES IN THE JOURNAL

In the text, sequential numbers of citations should be in order of appearance **(NOT ALPHABETICALLY)** in parentheses.

TABLE OF CONTENTS / ENHAVO

BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYPORE MUSHROOMS: <i>LAETIPORUS SUPHUREUS</i>, <i>FOMITOPSIS BETULINA</i>, AND <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> ZIĘBA Piotr, KAŁA Katarzyna, SMOLEŃ Zofia, LAZUR Jan, SUŁKOWSKA-ZIAJA Katarzyna, SĘKARA Agnieszka, MUSZYŃSKA Bożena.....	62
ROLE OF TCD EMBOLI-MONITORING IN EVALUATION OF EFFICACY OF ANTI- COAGULANT THERAPY IN PATIENTS WITH NONVALVULAR ATRIAL FIBRILLATION NOSÁL Vladimír, KURČA Egon, NEHAJ František, MOKÁŇ Marian, JAMRIŠKOVÁ Livia, KANTOROVÁ Ema, KUBATKA Peter, STRNÁDEL Jan, GRENDÁR Marian, SIVÁK Štefan	78
DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC) IN THE STUDY OF POTENTIAL INCOMPATIBILITIES BETWEEN FLUCONAZOLE AND SELECTED PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS TALIK Przemysław, HUBICKA Urszula.....	82
LUCIUS QUINTUS CINCINNATUS LAMAR AND HIS APOPLEXY OHRY Avi, MD.....	91
CHANGES IN PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF DRUGS IN CRITICALLY ILL PA- TIENTS – PART I CIOS Agnieszka, HOŃDO Łukasz, ZIELIŃSKI Stanisław.....	96
BIG DATA ALGORITHMS IN MEDICINE - MEDICAL COMPETENCE AND CRI- TICAL JUDGMENT REQUIRED? ASTER Hans-Christoph, BOHRER Thomas	108
FOR AUTHORS.....	112