



farmacja polska

TOM 70 · NR 6
ROK 2014
ISSN 0014-8261

czasopismo Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego

„Farmacja Polska” ukazuje się raz w miesiącu. Prenumeratorem czasopisma są farmaceuci, apteki ogólnodostępne i szpitalne, hurtownie farmaceutyczne, producenci środków farmaceutycznych i materiałów medycznych. Pismo dociera też do samorządu aptekarskiego, Naczelnej Izby Lekarskiej, okręgowych izb lekarskich, lekarzy wojewódzkich oraz niektórych bibliotek.

Cena prenumeraty krajowej na rok 2014 wynosi 233,10 zł (w tym 5% VAT), zagranicznej 200 USD. Emeryci – członkowie Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego otrzymują zniżkę 50%, toteż na blankiecie wpłaty należy podać numer emerytury.

W dziale finansowym PTFarm można nabywać pojedyncze zeszyty czasopisma. Prenumeratę należy opłacać w dowolnym banku lub urzędzie pocztowym na rachunek bankowy:

Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne
Millennium SA 29 1160 2202 0000 0000 2770 0281

Farmacja Polska zamieszcza płatne reklamy. Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść ogłoszeń.

Redakcja nie zwraca niezamówionych materiałów. Prezentowane przez autorów prace są wyrazem ich poglądów naukowych i redakcja nie ponosi za nie odpowiedzialności.

Farmacja Polska jest indeksowana w Chemical Abstracts, Analytical Abstracts, Biochemical Abstracts, International Pharmaceuticals Abstracts i EMBASE (Excerpta Medica).

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Czasopismo jest także indeksowane w Index Copernicus (ICF=9) oraz umieszczone na liście czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (3 pkt).

WSZELKIE PRAWA ZASTRZEŻONE

KOMITET REDAKCYJNY

dr hab. Iwona Arabas (Warszawa),
dr Lucyna Bułaś (Sosnowiec),
mgr Lidia Czyż (Rzeszów),
prof. dr hab. Zbigniew Fijałek (Warszawa),
prof. dr hab. Barbara Filipek (Kraków),
dr Katarzyna Hanisz (Łódź),
prof. dr hab. Renata Jachowicz (Kraków),
prof. dr hab. Roman Kaliszan (Gdańsk),
prof. dr hab. Aleksander A. Kubis (Wrocław),
dr Jadwiga Nartowska (Warszawa),
mgr Zbigniew Niewójt (Warszawa),
prof. dr hab. Krystyna Olczyk (Sosnowiec),
prof. dr hab. Daria Orszulak-Michalak (Łódź),
prof. dr hab. Jan Pachecka (Warszawa),
prof. dr hab. Janusz Pluta (Wrocław),
prof. dr hab. Wiesław Sawicki (Gdańsk),
dr hab. Agnieszka Skowron (Kraków),
dr Elwira Telejko (Białystok),
prof. dr hab. Marek Wesołowski (Gdańsk),
prof. dr hab. Witold Wieniawski (Warszawa),
dr hab. Katarzyna Winnicka (Białystok)

REDAKCJA

Redaktor naczelny: dr Bożena Karolewicz

Redaktor techniczny: Joanna Czarnecka

Korekta: Izabela Pranga

ADRES REDAKCJI

00-238 Warszawa, ul. Długa 16, tel. 22 831 02 41 w. 12

WYDAWCA

Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

Dział Wydawnictw – Redaktor prowadzący: Hanna Plata

00-238 Warszawa, ul. Długa 16

tel./faks 22 635 84 43

tel. 22 831 02 41 w. 15

Kolportaż: tel. 22 831 79 63 w. 19, 20

e-mail: wydawnictwa@ptfarm.pl, zamowienia@ptfarm.pl

Adres dla autorów: redakcja@ptfarm.pl

Strona PTFarm w Internecie: <http://www.ptfarm.pl>

ISSN 0014-8261

Skład i łamanie: Foxrabbitt Designers, www.foxrabbitt.pl

Druk: Oficyna Wydawniczo-Poligraficzna Zygmunt Siemieniak, Ząbki, tel. 22 781 51 02, faks 22 398 78 15, www.siemieniak.pl

Nakład: 5000 egz.

Printed on acid-free paper.



Spis treści

- 295 PRACA ORYGINALNA · TESTY LABORATORYJNE** · Ocena przydatności mikroplótkowego testu Ames MPF™ Penta I w porównaniu z testem wykonywanym metodą standardową zgodnie z OECD 471
Jadwiga Marczewska, Ewa Drozd, Janina Drozd, Elżbieta Anuszevska
- 299 PRACA ORYGINALNA · FARMACJA SPOŁECZNA** · Zjawisko nadużywania alkoholu wśród młodzieży studenckiej
Marlena Krawczyk
- 305 NOWE SUBSTANCJE LECZNICZE** · Ektoina – naturalny ekstraprotektant pozyskiwany z ekstremofilów. Mechanizm działania i zastosowanie w produktach leczniczych i kosmetycznych
Katarzyna Jacyszyn, Karol Nartowski, Janusz Pluta, Bożena Karolewicz
- 312 TERAPIA I LEKI** · Korzyści kliniczne płynące z pleiotropowego działania simwastatyny
Kamila Osadnik
- 316 ETYKA ZAWODOWA** · Klauzula sumienia w zawodzie farmaceuty
Malwina Gryka, Anna Piecuch, Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska

Farmacja po dyplomie

- 321 BIORÓWNOWAŻNOŚĆ** · Leki generyczne we współczesnej farmakoterapii
Tomasz Kamiński, Dariusz Pawlak
- 327 TERAPIA I LEKI** · Zaburzenia hiperpigmentacyjne skóry oraz farmakologiczne metody ich leczenia
Katarzyna Pańczyk, Anna Waszkielewicz, Henryk Marona
- 336 BOTANIKA FARMACEUTYCZNA** · Występowanie wybranych biopierwiastków o znaczeniu prozdrowotnym w grzybach wielkoowocnikowych oraz stosowane w ich oznaczaniu metody analityczne
Magdalena Zajęc, Bożena Muszyńska, Włodzimierz Opoka
- 345 PRAWO FARMACEUTYCZNE** · Rękojmia należytego prowadzenia apteki – wybrane zagadnienia administracyjnoprawne
Agnieszka Jachowicz

Table of Contents

- 295 ORIGINAL ARTICLE · LABORATORY TESTS** · Evaluation of the usefulness of microplate Ames test MPF™ Penta I in comparison with a test performed according to the standard method OECD 471
Jadwiga Marczewska, Ewa Drozd, Janina Drozd, Elżbieta Anuszevska
- 299 ORIGINAL ARTICLE · SOCIAL PHARMACY** · The phenomenon of alcohol abuse among students
Marlena Krawczyk
- 305 NEW THERAPEUTIC SUBSTANCES** · Ectoine – natural extra protectant derived from Extremophiles. Mechanism of action and ectoine application in medical products and cosmetics
Katarzyna Jacyszyn, Karol Nartowski, Janusz Pluta, Bożena Karolewicz
- 312 THERAPY AND DRUG** · The clinical benefits of the pleiotropic effect of simvastatin
Kamila Osadnik
- 316 PROFESSIONAL ETHIC** · Conscience clause in pharmacy profession
Malwina Gryka, Anna Piecuch, Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska

Postgraduate pharmacy

- 321 BIOEQUIVALENCE** · Generic drugs in current pharmacotherapy
Tomasz Kamiński, Dariusz Pawlak
- 327 THERAPY AND DRUG** · Skin hyperpigmentation disorders and pharmacological methods of their treatment
Katarzyna Pańczyk, Anna Waszkielewicz, Henryk Marona
- 336 PHARMACEUTICAL BOTANY** · Occurrence of some microelements about the importance of pro-health in mushrooms macrofungi and the analytical methods used in their analysis
Magdalena Zajęc, Bożena Muszyńska, Włodzimierz Opoka
- 345 PHARMACEUTICAL LAW** · Guarantee of proper management of the pharmacy
Agnieszka Jachowicz

Ocena przydatności mikroplatkowego testu Ames MPF™ Penta I w porównaniu z testem wykonywanym metodą standardową zgodnie z OECD 471

Jadwiga Marczevska, Ewa Drozd, Janina Drozd, Elżbieta Anuszewska

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków, Warszawa

Adres do korespondencji: Ewa Drozd, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, e-mail: e.drozd@nil.gov.pl

Wstęp

Test Ames jest jednym z referencyjnych krótko-terminowych testów przesiewowych *in vitro*, który służy do oceny potencjalnych właściwości mutagenicznych różnorodnych czynników, zarówno fizycznych, jak i chemicznych.

Test Ames polega na ocenie zdolności wywoływania przez badany związek mutacji powrotnej w komórkach auksotroficznych mutantów *Salmonella typhimurium*. Komórki bakteryjne, w których wystąpiła mutacja powrotna, w przeciwieństwie do komórek mutantów *S. typhimurium*, wykazują zdolność do rozmnażania i tworzenia kolonii na podłożu minimalnym, niezawierającym histydy. Potwierdzeniem mutagennego działania związku jest wywołanie przez niego co najmniej dwukrotnego wzrostu liczby rewertantów w stosunku do liczby rewertantów spontanicznych, powstających w sposób naturalny. Dodatkowym potwierdzeniem właściwości genotoksycznych jest wykazanie zależności typu: stężenie–odpowiedź, tzn. gdy ze wzrostem stężenia badanego związku wzrasta liczba rewertantów his⁺ na płycie.

Standardowy test Ames wykonany zgodnie z procedurą opisaną przez Maron i Ames i wytycznymi OECD 471 jest badaniem kosztownym, ze względu na dużą ilość zużywanych podłoży i płytek, oraz czasochłonnym [1].

Mikroplatkowy test Ames MPF™ Penta I firmy Xenometrix, zgodnie z oświadczeniem wytwórcy, wymaga mniejszego nakładu pracy, co najmniej 3 razy mniejszego zużycia odczynników i 6 razy mniej materiałów niż standardowy test Ames.

Evaluation of the usefulness of microplate Ames test MPFTM Penta I in comparison with a test performed according to the standard method OECD 471

Ames test is one of the reference short-term *in vitro* screening tests, used to evaluate the mutagenic potential of various factors, both physical and chemical. The aim of the study was to compare the mutagenic activity of selected compounds in the standard Ames test according to OECD 471 and in a microplate Ames test MPF™ Penta I, and to evaluate the feasibility of using the microplate test in the research carried out at the National Medicines Institute. The standard Ames test used in our laboratory is a method certified by the Polish Accreditation Centre (AB 774) and the EDQM (EDQM/MJA-032).

Keywords: mutagenic activity, Ames test, OECD 471, microplate Ames test MPF™ Penta I.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 295–298

Możliwość wykonania odczytu wyników w sposób automatyczny, jak również dostępność oprogramowania do opracowania wyników zmniejszają zakres błędów wynikający z subiektywnej oceny testu przez analityka. Dane literaturowe zawierające interpretację wyników uzyskanych w teście mikroplatkowym oraz w standardowym teście Ames nie w pełni spełniają wymagania normy PN EN ISO 17025 w zakresie oceny przydatności danej metody do stosowania [2–5].

Celem badań było porównanie aktywności mutagennej wybranych związków w standardowym teście Ames i teście mikroplatkowym Ames MPF™ Penta I oraz ocena możliwości stosowania testu mikroplatkowego w badaniach prowadzonych w Narodowym Instytucie Leków – Narodowym

Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Standardowy test Amesa jest w naszym laboratorium metodą akredytowaną przez Polskie Centrum Akredytacji (AB 774) oraz posiada atestację *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM/MJA-032). Zgodnie z wymaganiami normy PN EN ISO 17025 wprowadzenie nowej metody badawczej wymaga badań porównawczych, wykonywanych metodą referencyjną, i wykazania przydatności stosowania metody w danym laboratorium [6].

Material i metody

Material badany:

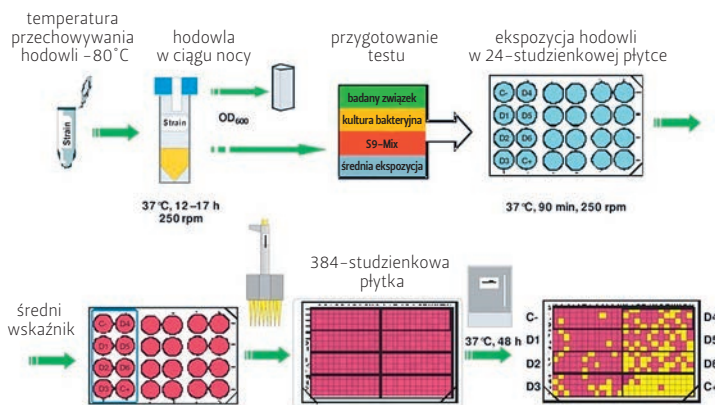
W badaniach wykorzystano związki, których aktywność mutagenna jest znana i potwierdzona w standardowym teście Amesa [1, 7, 8]. Związki te zazwyczaj są stosowane jako kontrola pozytywna aktywności mutagennej:

- 4-nitro-1,2-fenyldiamina (NPD) (Merck),
- N-tlenek 4-nitrochinoliny (NQNO) (Sigma),
- 2-aminofluoren (2-AF) (Fluka),
- 9-aminoakrydyna (9-AAc) (Sigma).

NPD i NQNO są to związki działające bezpośrednio i niewymagające aktywacji metabolicznej, natomiast działanie mutagenne 2-AF i 9-AAc ujawnia się dopiero po dodaniu frakcji metabolicznej do układu doświadczalnego.

W zaplanowanych doświadczeniach wszystkie związki były badane zarówno z frakcją, jak i bez frakcji metabolicznej, co stanowiło dodatkową kontrolę układu doświadczalnego i możliwość porównywania wyników otrzymanych w obu testach. W badaniach zastosowano wybrane związki w stężeniach poniżej i powyżej stężenia stosowanego w standardowym teście Amesa [1, 7].

test mikroplótkowy AMES



Rycina 1. Skrócony schemat wykonania testu mikroplótkowego Amesa MPF™ Penta I [wg 11]

Stężenia badanych substancji przygotowano w taki sposób, aby stężenie w mieszaninie reakcyjnej w obu testach było jednakowe.

Bakterie: *Salmonella typhimurium*, szczepy: TA98, TA100, TA1535, TA1537. Szczepy te są mutantami pokarmowymi wymagającymi do wzrostu obecności histydyny i biotyny.

Podłoża do hodowli bakterii: podłoże płynne, bulionowe (Nutrient Broth Oxoid); minimalne podłoże agarowe (*Bacto Agar Difco* z dodatkiem soli *Vogel-Bonner* oraz 40% glukozy); agar półpłynny – powierzchniowy (*Bacto Agar - Difco*), stosowane w płytkowym teście Amesa lub podłoża dostarczone w zestawie do testu Ames MPF™ Penta I do oceny mutagenności w formie mikroplótki firmy Xenometrix.

Frakcja S9 mix

W doświadczeniach z aktywacją metaboliczną badany związek i komórki bakteryjne inkubowano w obecności frakcji S9 firmy MP Biomedicals, Inc. lub frakcji S9 dołączonej do zestawu testu mikroplótkowego Ames MPF™ Penta I. Frakcja S9 zawiera aktywne enzymy zdolne do wywołania przemian biochemicznych badanych substancji.

Standardowy test Amesa

Ocenę mutagennego działania wybranych związków wykonano w oparciu o: referencyjny test Amesa zgodnie z wytycznymi OECD 471 *Guideline for testing of chemicals, Bacterial Reverse Mutation Test* oraz zgodnie z oryginalną procedurą zaproponowaną przez Maron i Ames [1, 8].

Testowe szczepy hodowano w pożywce płynnej, bulionowej, przez 18 godz., w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z wytrząsaniem. 0,1 ml hodowli bakterii i 0,1 ml substancji badanej w odpowiednim stężeniu dodawano do 2 ml półpłynnego agaru powierzchniowego zawierającego 0,05 mM biotyny i 0,05 mM histydyny i wylewano na płytkę z minimalnym podłożem agarowym. Do oznaczeń z aktywacją metaboliczną do mieszaniny reakcyjnej dodawano po 0,5 ml frakcji S9 mix. Po 48–72 godz. inkubacji w temperaturze 37°C zliczano kolonie rewertantów his⁺ na płytkach.

Wyniki testu przedstawiono jako średnią liczbę kolonii (z dwóch niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach) histydynoniezależnych rewertantów na płytce.

Zgodnie z przyjętymi kryteriami w odniesieniu do tego testu – testowana substancja jest oceniana jako mutagenna, jeżeli powoduje co najmniej podwójnie liczbę rewertantów his⁺ w stosunku do kontroli w jednym lub więcej stężeń, w co najmniej jednym szczepie, w obecności lub bez aktywacji metabolicznej [7, 10]. Dodatkowym potwierdzeniem mutagennego działania substancji jest przedstawienie

zależności typu stężenie–odpowiedź, tzn. gdy ze wzrostem stężenia substancji badanej wzrasta liczba rewertantów his⁺ na płytce. Za niemutageną uważa się substancję, która w żadnym ze szczepów *S. typhimurium* nie wywołuje co najmniej dwukrotnego wzrostu liczby kolonii rewertantów w porównaniu do liczby kolonii na płytkach kontrolnych [9].

Mikroplytkowy test Ames

Mutagenną aktywność badanych związków oceniono, stosując zestaw w formie mikroplytki Ames MPF™ Penta I, firmy Xenometrix. Test przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta testu [11].

Testowe szczepy hodowano w pożywce bulionowej, w objętości 10 ml, przez 18 godz., w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C z wytrząsaniem, a następnie zawieszono w podłożu do ekspozycji i rozlewano po 240 µl do każdego dołka, 24-dółkowej płytki zawierającej substancję w badanym stężeniu, w objętości 10 µl/dolek. Płytki inkubowano przez 90 min w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem. Po inkubacji dodano do każdego dołka 2,8 ml podłoża wskaźnikowego. Następnie przenoszono po 50 µl zawartości dołka, w odpowiednim stężeniu, do 48 dołków w płytce 384-dółkowej. Dla każdego szczepu wykonano po dwa powtórzenia. Płytki inkubowano 48–72 godz. w temperaturze 37 °C.

Komórki, w których nastąpiła rewersja mutacji będą zdolne do wzrostu w podłożu wskaźnikowym. W wyniku wzrostu bakterii pH podłoża wskaźnikowego obniża się, powodując zmianę jego barwy z fioletowej na żółtą. Dołki o zabarwieniu żółtym określane są jako dołki pozytywne.

Wzrost liczby dołków pozytywnych po ekspozycji na badany związek w porównaniu z kontrolą negatywną (dla stężenia zero) oznacza, że badany związek wykazuje działanie mutagenne w mikroplytkowym teście Ames MPF™ Penta I.

Działanie mutagenne określono na podstawie oceny wyników metodami proponowanymi przez wytwórcę testu, tj. z użyciem programu Calculation Sheet for Ames II and Ames MPF data. Version 1.3 10/2006 (rycina 1).

Wyniki i omówienie

Wykonano ocenę aktywności mutagennej wybranych związków, stosując standardowy test Ames zgodnie z OECD 471 i mikroplytkowy test Ames MPF™ Penta I firmy Xenometrix.

W tabelach 1 i 2 zestawiono wyniki oceny działania mutagennego badanych związków w zastosowanych stężeniach z frakcją i bez frakcji metabolicznej, uzyskanych w obu testach dla szczepów TA98, TA100, TA1535 i TA1537.

Porównanie wyników uzyskanych w doświadczeniach z NPD wykazuje brak zgodności pomiędzy

Tabela 1. Porównanie aktywności mutagennej NPD i NQNO (z frakcją i bez frakcji metabolicznej S9), uzyskanych w standardowym teście Ames i w mikroplytkowym teście Ames MPF™ Penta I

Badany związek µg/płytkę(µg/ml)*	Wariant	Standardowy test Ames				Ames MPF™ Penta I			
		98	100	1535	1537	98	100	1535	1537
NPD 5 (56,8)	-S9	+	-	-	+	+	-	-	+
	+S9	+	-	-	-	-	-	-	-
10 (113,5)	-S9	+	+	-	+	+	-	-	+
	+S9	+	-	-	-	-	-	-	-
20 (227,0)	-S9	+	+	-	+	+	+	-	+
	+S9	+	-	-	+	+	+	-	-
40 (454,0)	-S9	+	+	+	+	+	+	-	+
	+S9	+	+	-	+	+	+	-	-
80 (908,0)	-S9	+	+	+	+	+	+	-	+
	+S9	+	+	+	+	+	+	-	-
160 (1816,0)	-S9	+	T**	+	T	+	+	+	+
	+S9	+	+	+	+	+	+	-	-
NQNO 0,1 (1,1)	-S9	-	-	-	-	+	+	-	-
	+S9	-	-	-	-	-	+	-	-
0,25 (2,8)	-S9	+	+	-	-	+	+	-	-
	+S9	-	-	-	-	-	+	-	-
0,5 (5,7)	-S9	+	+	-	-	+	-	-	-
	+S9	-	-	-	-	+	+	-	-
0,75 (8,5)	-S9	+	+	-	-	+	-	-	-
	+S9	+	-	-	-	+	+	-	-

* w nawiasach podano stężenia substancji badane w teście MPF;

** stężenie toksyczne, obserwowano przerzedzenie murawy

Tabela 2. Porównanie aktywności mutagennej 9-AAC i 2-AF (z frakcją i bez frakcji metabolicznej S9) w standardowym teście Ames i w mikroplytkowym teście Ames MPF™ Penta I

Badany związek µg/płytkę(µg/ml)*	Wariant	Standardowy test Ames				Ames MPF™ Penta I			
		98	100	1535	1537	98	100	1535	1537
9-AAC 25 (284,0)	-S9	-	-	-	-	-	-	+	+
	+S9	-	-	-	-	-	-	-	+
50 (568,0)	-S9	-	-	-	+	-	-	+	+
	+S9	-	-	-	+	-	-	-	+
75 (852,0)	-S9	-	-	-	+	-	-	-	+
	+S9	-	-	-	+	-	-	-	+
100 (1136,0)	-S9	-	-	-	+	-	-	-	+
	+S9	-	-	-	+	-	-	-	+
2-AF 1 (11,4)	-S9	-	-	-	-	-	+	-	-
	+S9	+	-	-	-	+	-	-	-
10 (113,6)	-S9	-	-	-	-	-	+	-	-
	+S9	+	-	-	-	+	+	+	-
50 (568,0)	-S9	+	-	-	-	+	+	-	-
	+S9	+	+	-	+	+	+	+	-
100 (1136,0)	-S9	+	-	-	-	+	+	-	-
	+S9	+	+	-	+	+	+	+	+

* w nawiasach podano stężenia substancji badane w teście mikroplytkowym

testami. W obecności NQNO zgodność odpowiedzi w obu testach uzyskano dla dwóch szczepów: TA1535 i TA1537. Najlepszą zgodność wyników w obu testach uzyskano w doświadczeniach z 9-AAC. Różnicę w odpowiedzi zaobserwowano dla szczepu TA1535 przy dwóch stężeniach w badaniach z frakcją oraz w szczepie TA1537 tylko w jednym zastosowanym stężeniu.

W doświadczeniach z 2-AF uzyskano zgodne wyniki w obu testach jedynie dla szczepu TA98.

Tabela 3. Ocena aktywności mutagennej badanych związków zgodnie z wynikami uzyskanymi w standardowym teście Amesa i w mikropłytkowym teście Ames MPF™ Penta I

Badany związek	Wariant	Standardowy test Ames				Mikropłytkowy test Ames MPF™ Penta I			
		98	100	1535	1537	98	100	1535	1537
NPD	-S9	+	+	+	+	+	+	-	+
	+S9	+	+	+	+	+	+	-	-
NQNO	-S9	+	+	-	-	+	+	-	-
	+S9	-	-	-	-	-	+	-	-
9-AAc	-S9	-	-	-	+	-	-	+	+
	+S9	-	-	-	+	-	+	-	+
2-AF	-S9	-	-	-	-	-	-	-	-
	+S9	+	+	-	+	+	+	+	-

Większą liczbę zgodnych wyników uzyskano w badaniach bez frakcji metabolicznej dla szczepu TA98, TA1535 i TA1537 (94%, 78%, 89%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w badaniach z frakcją S9 (83%, 72%, 72%). Najniższą korelację uzyskanych wyników dla badanych związków w porównywalnych testach uzyskano dla szczepu TA100. W tym szczepie tylko 50% wyników bez frakcji S9 i 67% z frakcją S9 było zgodnych w obu testach.

W tabeli 3 przedstawiono porównanie aktywności mutagennej badanych związków, uzyskanej przy zastosowaniu standardowego testu Amesa i mikropłytkowego Ames test MPF™ Penta I. Jako „+” oznaczono te badania, w których uzyskano potwierdzenie aktywności mutagennej przynajmniej w jednym stężeniu badanej substancji. Brak takiego potwierdzenia określono jako „-”. Stwierdzono 100% zgodność wyników uzyskanych w badaniach z zastosowanymi związkami w obu testach, zarówno w badaniach z frakcją i bez frakcji metabolicznej, dla szczepu TA98. Dla pozostałych szczepów: TA100, TA1535, TA1537 uzyskano potwierdzenie zgodności wyników odpowiednio na poziomie 70% dla szczepu TA100 oraz 40% i 60% odpowiednio dla szczepu TA1535 i TA1537.

Porównując wyniki aktywności mutagennej uzyskane w standardowym teście Amesa i mikropłytkowym teście Ames MPF™ Penta I, stwierdzono różny poziom ich zgodności, zależny od zastosowanego szczepu i układu doświadczalnego, tj. z lub bez frakcji metabolicznej S9. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że rozbieżności wynikają z trudności w interpretacji wyników uzyskanych w teście Ames MPF™ Penta I. Brak pozytywnych dołków na płytce może sugerować zarówno brak odpowiedzi ze strony stosowanego szczepu bakteryjnego, jak również brak komórek bakteryjnych w badanym dołku, spowodowany nierównomiernym rozkładem drobnoustrojów lub toksycznością badanego związku w danym stężeniu. Test ten należy zatem poprzedzić badaniem

cytotoksyczności związków, co jest również sugerowane przez wytwórcę testu. Konieczność wstępnej oceny działania cytotoksycznego badanych związków wydłuża czas uzyskiwania wyników i zwiększa koszt testu, co czyni go znacznie mniej konkurencyjnym w odniesieniu do testu standardowego.

W standardowym teście Ames toksyczność badanych związków może być obserwowana w trakcie wykonywania testu jako przerzedzenie murawy na płytce. Problem w interpretacji wyników w teście mikropłytkowym stwarzało także określenie, jaka liczba pozytywnych dołków odpowiada prawidłowej rewersji spontanicznej.

Porównanie wyników uzyskanych w obu testach nie daje podstawy do zastąpienia standardowego testu Ames testem mikropłytkowym MPF™ Penta I. Stwierdzono dużą rozbieżność wyników aktywności mutagennej wybranych związków w kolejnych stężeniach, we wszystkich badanych szczepach. Mikropłytkowy test MPF™ Penta I może natomiast stanowić bardzo przydatne narzędzie do wstępnej oceny genotoksyczności, szczególnie przydatne we wstępnych badaniach przesiewowych nieznanymi substancjami.

Otrzymano: 2013.11.16 · Zaakceptowano: 2014.03.03

Piśmiennictwo

1. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat Res.* 1983, 113: 173-215.
2. Flückiger-Isler S., Baumeister M., Braun K., Gervais V., Hasler-Nguyen N., Reimann R., Van Gompel J., Wunderlich H.-G., Engelhardt G.: Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds, *Mutat Res.* 2004, 558: 181-197.
3. Gee P., Sommers C.H., Melick A.S., Gidrol X.M., Todd M.D., Burriss R.B., Nelson M.E., Klemm R.C., Zeiger E.: Comparison of responses of base-specific Salmonella tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study, *Mutat Res.* 1998, 412: 115-130.
4. Kamber M., Flückiger-Isler S., Engelhardt G., Jaechk R., Zeiger E.: Comparison of the AmesII and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity, *Mutagenesis* 2009, 24(4): 359-366.
5. Umbuzeiro Gde A., Rech C.M., Correia S., Bergamasco A.M., Lima Cardenette G.H., Flückiger-Isler S., Kamber M.: Comparison of the Salmonella/microsome microsuspension assay with the new Microplate Fluctuation Protocol for testing the mutagenicity of environmental samples, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2010, 51: 31-38.
6. PN-EN ISO/IEC 17025:2005/AC Oglone wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
7. Janik-Spiechowicz E.: Ujednolicona metodyka płytkowego testu Ames. Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr Jerzego Nofera. Tom VI. Aneks I, Łódź 1990: 95-116.
8. OECD Guideline for testing of chemicals 471, 21 July 1997 Bacterial Reverse Mutation Test.
9. Wysznińska K., Janik-Spiechowicz E.: Rozpoznanie i ocena poziomu zagrożenia czynnikami potencjalnie kancerogennymi w zakładach przemysłowych. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1998.
10. Chu K.C., Patel K.M., Lin A.H., Tarone R.E., Linhart M.S., Dunkel V.C.: Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutat Res.* 1981, 85: 119-132.
11. Ames MPF™ Penta I firmy Xenometrix Instrukcja stosowania. Wersja 2.5, marzec 2008.

Zjawisko nadużywania alkoholu wśród młodzieży studenckiej

Marlena Krawczyk

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Adres do korespondencji: Marlena Krawczyk, ul. Zakrzowiecka 24, 23-200 Kraśnik, e-mail: marlena-krawczyk00@wp.pl

Wstęp

Nowoczesny styl życia proponowany przez dietetyków i lekarzy w swoich zaleceniach zawiera spożycie jak najmniejszej ilości alkoholu lub jego zupełny brak w diecie. Społeczeństwo polskie tworzy szereg mitów na temat picia, a wiele osób, usiłując usprawiedliwić wypijane ilości, buduje nową ideologię, tłumaczącą istniejący fakt spożywania lub nadużywania substancji.

Mianem alkoholu nazywane są związki organiczne, które w swym składzie posiadają jedną lub więcej grup hydroksylowych połączonych atomem węgla [1]. W momencie wprowadzania substancji do organizmu człowieka w niewielkich ilościach nie powoduje ona widocznych zmian. Jeśli czynność ta będzie systematycznie powtarzana lub w przypadku szczególnej wrażliwości organizmu, nawet niewielka ilość alkoholu może stanowić problem [2].

Alkoholizm to bardzo wstydlivy problem, dlatego często towarzyszy mu stwierdzenie „własne brudy pierz we własnym domu”. Jest to najbardziej nieodpowiednie skojarzenie z problemem, który niszczy całą rodzinę [3]. Często mamy do czynienia ze zjawiskiem „dwóch basenów”, gdzie w jednym z nich jest osoba uzależniona, a w drugim jego rodzina. W momencie gdy alkoholika zalewa woda, jego najbliżsi, idąc mu na pomoc, zabierają wodę z jego basenu do swojego i tym sposobem zalewają także siebie. Tymczasem najprostszym, ale zarazem najtrudniejszym rozwiązaniem, jest opuszczenie tych basenów [4].

Społeczność studencka jest szczególną grupą, która maluje swój wizerunek na butelce alkoholu. Życie studentów często obfituje w zabawy towarzyskie, których nieodłącznym elementem staje się alkohol. Ma on wiele znaczeń: jest spożywany, aby rozluźnić kontakty międzyludzkie, zwiększyć

The phenomenon of alcohol abuse among students · Alcohol abuse is a phenomenon observed more frequently among younger age groups. Addictive substance is alcohol, which can lead to negative health effects of dietary recommendations because they contain the smallest of its quantity. Despite the broad group of addicts, alcoholism is more embarrassing problem, which according to the generally prevailing social regulations, must cope alone. Sometimes admitting to the abuse or the realization of his addiction is a difficult step, which most often alcoholics can not do solely with their own means. Which most alcoholics are unable to do so only with their own means.

The aim of the study was to detect the phenomenon of alcohol abuse among students, to know the frequency of consumption and consequences for the human body, and drinking styles characterizing individuals and types of alcohol.

The research was conducted among students of Medical University in Lublin. The group consisted of 145 people, of whom 59% were women, the remaining 41% of men. Age range of respondents included students from 19 to 26 years. Research tool was a questionnaire containing the outside of his own design questions, questions about the nature, manner and style of consumption of alcoholic substances.

Among the group of students subject to testing 95% reported alcohol consumption, the remaining 5% are abstainers. Wypijania incidence of alcoholic beverages was mostly determined by określników: common (37%) and rare (36%). Most (87%) and most (76%) wypijanym alcohol was beer.

Most students do not shun alcoholic beverages. They are often present at social events and clubs. Although consumption of large quantities of alcohol, students do not perceive themselves to the negative effects of his abuse, but some are drinking dangerously.

Keywords: alcohol, addiction, drinking styles.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 299–304

odwagę i zmniejszyć dystans, pozwolić zapomnieć o problemach lub po prostu jego celem jest wprowadzenie dobrej zabawy.

Cel, materiał i metoda badawcza

Głównym celem przeprowadzonych badań było wykrycie występowania zjawiska nadużywania alkoholu wśród studentów, poznanie częstości jego spożywania i skutków dla organizmu człowieka, a także stylów picia charakteryzujących poszczególne jednostki i rodzajów spożywanego alkoholu.

Badania zostały przeprowadzone wśród studentów Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Grupa liczyła 145 osób. Przedział wiekowy badanych studentów zawierał się od 19 do 26 lat. Respondenci byli studentami kierunków: zdrowie publiczne, ratownictwo medyczne, farmacja i stomatologia. Większość z nich pochodziła z miasta (73%), pozostali byli mieszkańcami wsi (27%).

Narzędziem badawczym była ankieta własnej konstrukcji, która zawierała 24 pytania. Dotyczyły one częstości spożywania alkoholu, jego rodzaju, miejsca, gdzie najczęściej jest wypijany, a także stylów picia i następstw nadużywania tej substancji.

Wyniki

Badaniem dotyczącym nadużywania alkoholu i określeniem stylów jego spożywania zostało objętych 145 osób, wśród których 85 (59%) stanowiły kobiety, pozostała liczba respondentów (60 osób) to mężczyźni – 41%. 62% ankietowanych było studentami w wieku od 19 do 20 lat, 30% zawierało się w przedziale wiekowym między 21 a 23 lata, pozostali (8%) byli w wieku od 24 do 26 lat. Zapytani o miejsce zamieszkania: w 73% deklarowali miasto, 27% wymieniało wieś. Spośród ogółu studentów poddanych badaniu: 13% studiowało zdrowie publiczne, 42% ratownictwo

medyczne, 7% było studentami farmacji, pozostałe 38% to studenci kierunku lekarsko-dentystycznego. Większość z ankietowanych (43%) była studentami pierwszego roku, 37% drugiego, pozostała część grupy (19%) to studenci pierwszego roku studiów drugiego stopnia.

Pierwszym pytaniem skierowanym do grupy badawczej było pytanie o spożywanie alkoholu. 95% udzieliło odpowiedzi twierdzącej, co częściej zgłaszały kobiety (60%) niż mężczyźni (40%). Nie-wielka część ankietowanych (5%) była abstynentami (tabela 1). Spośród respondentów, którzy deklarowali picie alkoholu największa część (37%) spożywała alkohol często, 36% rzadko, 15% sporadycznie, pozostałe 8% bardzo często.

Respondenci zapytani o rodzaj spożywanego alkoholu w większości wymieniali piwo (87%), wódkę (78%), wino (70%), whisky (24%), nalewkę (20%), w 19% spożywali alkohol własnej produkcji, pozostałe 14% piło inny alkohol. Rodzaj spożywanego trunku był różny, zależny od płci, co przedstawia dokładnie tabela 2. Spośród ogółu ankietowanych największa ich część preferowała piwo (76%), co częściej deklarowali mężczyźni (80%) niż płć przeciwna. W drugiej kolejności uplasowała się wódka (39%), spożywana częściej przez kobiety (K – 42%; M – 35%). Natomiast 34% ankietowanych jako najczęściej wypijany alkohol wymieniali wino, pozostali w mniejszym stopniu deklarowali częste wypijanie whisky (5%), inny rodzaj alkoholu (4%), alkohol własnej produkcji (3%), likier (1%) i nalewkę (1%).

Często w otoczeniu osób spożywających lub nadużywających alkohol są osoby, które inicjują spotkania towarzyskie. Wśród grupy badawczej 63% ankietowanych deklaruje, że zdarza się im być organizatorami spotkań i inicjatorami spożywania substancji procentowych, 11% bardzo często stwarza okazje do picia, co jest bardziej charakterystyczne dla mężczyzn (K – 8%; M – 15%), pozostali (26%) nigdy nie pełnili takiej funkcji.

Okazje do picia 57% respondentów znajduje w domu, 54% spożywa napoje procentowe na spotkaniach towarzyskich w akademiku, pozostali zabawę z alkoholem prowadzą na imprezach plenerowych (50%) i podczas spotkań rodzinnych (46%). Wśród wymienionych miejsc spożywania alkoholu najczęściej pojawia się klub (49%), wynajmowane mieszkanie (32%) i dyskoteka (28%). Dokładne zależności przedstawia tabela 3.

Studenci najczęściej alkohol spożywają w gronie znajomych (92%), nieliczni (1%) napoje alkoholowe piją w towarzystwie obcych im osób. 2% ankietowanych deklaruje, że zdarza im się pić w samotności. Spożywanie alkoholu często

Tabela 1. Spożywanie alkoholu a płć respondentów

Czy spożywasz alkohol?		Płć		Ogółem
		Kobieta	Mężczyzna	
Tak	liczebność	82	55	137
	% z czy spożywasz alkohol?	59,9%	40,1%	100,0%
	% z płć	96,5%	91,7%	94,5%
	% z ogółem	56,6%	37,9%	94,5%
Nie	liczebność	3	5	8
	% z czy spożywasz alkohol?	37,5%	62,5%	100,0%
	% z płć	3,5%	8,3%	5,5%
	% z ogółem	2,1%	3,4%	5,5%
Ogółem	liczebność	85	60	145
	% z czy spożywasz alkohol?	58,6%	41,4%	100,0%
	% z płć	100,0%	100,0%	100,0%
	% z ogółem	58,6%	41,4%	100,0%

Tabela 2. Rodzaj spożywanego alkoholu a płeć respondentów

Rodzaj alkoholu		Płeć		Ogółem
		Kobieta	Mężczyzna	
Wódka	liczebność	65	48	113
	% z czy spożywasz alkohol?	57,5%	42,5%	100,0%
	% z płeć	76,5%	80,0%	77,9%
	% z ogółem	44,8%	33,1%	77,9%
Piwo	liczebność	73	53	126
	% z czy spożywasz alkohol?	57,9%	42,1%	100,0%
	% z płeć	85,9%	88,3%	86,9%
	% z ogółem	50,3%	36,6%	86,9%
Wino	liczebność	71	32	103
	% z czy spożywasz alkohol?	68,9%	31,1%	100,0%
	% z płeć	83,5%	53,3%	71,0%
	% z ogółem	49,0%	22,1%	71,0%
Likier	liczebność	20	6	26
	% z czy spożywasz alkohol?	76,9%	23,1%	100,0%
	% z płeć	23,5%	10,0%	17,9%
	% z ogółem	13,8%	4,1%	17,9%
Nalewka	liczebność	17	12	29
	% z czy spożywasz alkohol?	58,9%	41,4%	100,0%
	% z płeć	20,0%	20,0%	20,0%
	% z ogółem	11,7%	8,3%	20,0%
Whisky	liczebność	17	18	35
	% z czy spożywasz alkohol?	48,6%	51,4%	100,0%
	% z płeć	20,0%	30,0%	24,1%
	% z ogółem	11,7%	12,4%	24,1%
Inny alkohol własnej produkcji	liczebność	10	17	27
	% z czy spożywasz alkohol?	37,0%	63,0%	100,0%
	% z płeć	11,8%	28,3%	18,6%
	% z ogółem	6,9%	11,7%	18,6%
Inny rodzaj alkoholu	liczebność	9	12	21
	% z czy spożywasz alkohol?	42,9%	57,1%	100,0%
	% z płeć	10,6%	20,0%	14,5%
	% z ogółem	6,2%	8,3%	14,5%
Nie dotyczy	liczebność	2	5	7
	% z czy spożywasz alkohol?	28,6%	71,4%	100,0%
	% z płeć	2,4%	8,3%	4,8%
	% z ogółem	1,4%	3,4%	4,8%

wiąże się z tworzeniem charakterystycznych stylów picia danej osoby. Cel wypijanej substancji jest zależny od osobistych problemów i ograniczeń jednostki. Część studentów (83%) pije po to, by osiągnąć stan relaksu i odprężenia, co skutkuje lepszą zabawą, pozwala zapomnieć o dotychczasowych niepowodzeniach i zdystansować się względem nich. Inni (31%) w alkoholu upatrują

Tabela 3. Częstość spożywania alkoholu w danym miejscu a płeć respondentów

Miejsce spożywania alkoholu		Płeć		Ogółem
		Kobieta	Mężczyzna	
Klub	liczebność	48	23	71
	% z czy spożywasz alkohol?	67,6%	32,4%	100,0%
	% z płeć	56,5%	38,3%	49,0%
	% z ogółem	33,1%	15,9%	49,0%
Stacja	liczebność	31	16	47
	% z czy spożywasz alkohol?	60,0%	34,0%	100,0%
	% z płeć	36,5%	26,7%	32,4%
	% z ogółem	21,4%	11,0%	32,4%
Akademik	liczebność	17	20	37
	% z czy spożywasz alkohol?	45,9%	54,1%	100,0%
	% z płeć	20,0%	33,3%	25,5%
	% z ogółem	11,7%	13,8%	25,5%
Imprezy rodzinne	liczebność	11	6	17
	% z czy spożywasz alkohol?	64,7%	35,3%	100,0%
	% z płeć	12,9%	10,0%	11,7%
	% z ogółem	7,6%	4,1%	11,7%
Dom	liczebność	22	13	35
	% z czy spożywasz alkohol?	62,9%	37,1%	100,0%
	% z płeć	25,9%	21,7%	24,1%
	% z ogółem	15,2%	9,0%	24,1%
Dyskoteka	liczebność	19	22	41
	% z czy spożywasz alkohol?	46,3%	53,7%	100,0%
	% z płeć	22,4%	36,7%	28,3%
	% z ogółem	13,1%	15,2%	28,3%
Imprezy plenerowe	liczebność	18	14	32
	% z czy spożywasz alkohol?	56,3%	43,8%	100,0%
	% z płeć	21,2%	23,3%	22,1%
	% z ogółem	12,4%	9,7%	22,1%
Inne	liczebność	5	2	7
	% z czy spożywasz alkohol?	71,4%	28,6%	100,0%
	% z płeć	5,9%	3,3%	4,8%
	% z ogółem	3,4%	1,4%	4,8%
Nie dotyczy	liczebność	3	4	7
	% z czy spożywasz alkohol?	42,9%	57,1%	100,0%
	% z płeć	3,5%	6,7%	4,8%
	% z ogółem	2,1%	2,8%	4,8%

zerwanie z rzeczywistością i osiągnięcie „stanu błogości”. Pozostali po spożyciu zyskują odwagę (10%) i ośmielają się do kontaktów towarzyskich (17%), część z ankietowanych „topi w szklance smutki” (9%), a nawet poszukują w niej przyjemności (10%), co częściej deklarowali mężczyźni (15%) w porównaniu do płci przeciwnej (7%).

Tabela 4. Zdrowotne następstwa spożycia alkoholu a płeć respondentów

Zdrowotne następstwa spożycia alkoholu		Płeć		Ogółem
		Kobieta	Mężczyzna	
Ból głowy	liczebność	53	31	84
	% z czy spożywasz alkohol?	63,1%	36,9%	100,0%
	% z płeć	62,4%	51,7%	57,9%
	% z ogółem	36,6%	21,4%	57,9%
Biegunka	liczebność	3	4	7
	% z czy spożywasz alkohol?	42,9%	57,1%	100,0%
	% z płeć	3,5%	6,7%	4,8%
	% z ogółem	2,1%	2,8%	4,8%
Wymioty	liczebność	13	12	25
	% z czy spożywasz alkohol?	52,0%	48,0%	100,0%
	% z płeć	15,3%	20,0%	17,2%
	% z ogółem	9,0%	8,3%	17,2%
Ból żołądka	liczebność	18	9	27
	% z czy spożywasz alkohol?	66,7%	33,3%	100,0%
	% z płeć	21,2%	15,0%	18,6%
	% z ogółem	12,4%	6,2%	18,6%
Nadwrażliwość na bodźce świetlne	liczebność	7	2	9
	% z czy spożywasz alkohol?	77,8%	22,2%	100,0%
	% z płeć	8,2%	3,3%	6,2%
	% z ogółem	4,8%	1,4%	6,2%
Nadwrażliwość na dźwięk	liczebność	12	5	17
	% z czy spożywasz alkohol?	70,6%	29,4%	100,0%
	% z płeć	14,1%	8,3%	11,7%
	% z ogółem	8,3%	3,4%	11,7%
Wzmożona potliwość	liczebność	8	4	12
	% z czy spożywasz alkohol?	66,7%	33,3%	100,0%
	% z płeć	9,4%	6,7%	8,3%
	% z ogółem	5,5%	2,8%	8,3%
Pragnienie	liczebność	48	40	88
	% z czy spożywasz alkohol?	54,5%	45,5%	100,0%
	% z płeć	56,5%	66,7%	60,7%
	% z ogółem	33,1%	27,6%	60,7%

Każda z osób spożywająca lub nadużywająca alkohol posiada swój model picia. Mogą być to małe dawki z dużą częstością lub ilość przewyższająca stan tolerancji organizmu. Jednorazowe wypijanie dużych porcji alkoholu może prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych, a nawet tragicznych skutków nadużycia. Zjawisko ryzykownego picia obserwuje się u coraz młodszych osób.

Wśród studentów ten model spożywania substancji procentowych występuje bardzo rzadko (35%), co częściej deklarują kobiety (45%) niż płeć męska (22%). Mężczyźni niestety dwukrotnie częściej niż kobiety (K – 6%; M – 12%) zaznaczają

Zdrowotne następstwa spożycia alkoholu		Płeć		Ogółem
		Kobieta	Mężczyzna	
Jadłowstręt	liczebność	13	12	25
	% z czy spożywasz alkohol?	52,0%	48,0%	100,0%
	% z płeć	15,3%	20,0%	17,2%
	% z ogółem	9,0%	8,3%	17,2%
Kołatanie serca	liczebność	7	3	10
	% z czy spożywasz alkohol?	70,0%	30,0%	100,0%
	% z płeć	8,2%	5,0%	6,9%
	% z ogółem	4,8%	2,1%	6,9%
Drżenie rąk	liczebność	13	9	22
	% z czy spożywasz alkohol?	59,1%	40,9%	100,0%
	% z płeć	15,3%	15,0%	15,2%
	% z ogółem	9,0%	6,2%	15,2%
Brak koncentracji	liczebność	18	9	27
	% z czy spożywasz alkohol?	66,7%	33,3%	100,0%
	% z płeć	21,2%	15,0%	18,6%
	% z ogółem	12,4%	6,2%	18,6%
Poczucie „rozbitcia”	liczebność	20	11	31
	% z czy spożywasz alkohol?	64,5%	35,5%	100,0%
	% z płeć	23,5%	18,3%	21,4%
	% z ogółem	13,8%	7,6%	21,4%
Inne	liczebność	4	0	4
	% z czy spożywasz alkohol?	100,0%	0%	100,0%
	% z płeć	4,7%	0%	2,8%
	% z ogółem	2,8%	0%	2,8%
Nie dotyczy	liczebność	10	8	18
	% z czy spożywasz alkohol?	55,6%	44,4%	100,0%
	% z płeć	11,8%	13,3%	12,4%
	% z ogółem	6,9%	5,5%	12,4%

nagminne ryzykowne picie. Wśród 25% ogółu respondentów, którzy rzadko obserwują u siebie jednorazowe wypijanie dużej ilości alkoholu, większość stanowiła płeć męska (K – 18%; M – 35%).

Drugim symptomem zbyt dużej ilości jednorazowego spożycia alkoholu jest objaw „urwanego filmu”. Kiedy osoba pijąca nie potrafi przypomnieć sobie fragmentu rzeczywistości dnia wczorajszego, a miejsce wspomnień zajmuje „czarna dziura”. Studenci zapytani o fakt wystąpienia takiego zdarzenia w 51% zaznaczyli odpowiedź twierdzącą. Częściej udzielali jej mężczyźni (60%) w porównaniu do kobiet (45%). Spośród ogółu grupy badawczej u 28% ankietowanych zdarzyło się być pod wpływem alkoholu na zajęciach. Natomiast 29% studentów łączyło leki z alkoholem, niektórzy nawet bardzo często (3%).

Systematyczne przyjmowanie alkoholu uzależnia i zmienia wielkość dawki koniecznej do przyjęcia w celu uzyskania pożądanego efektu. U 17% ankietowanych doszło do zjawiska zwiększenia tolerancji na alkohol, czyli ilość jego spożycia zwiększyła się. Natomiast u 14% badanych doszło do obniżenia tolerancji na alkohol, a dawka potrzebna do uzyskania oczekiwanego efektu uległa zmniejszeniu.

Spożywanie niewielkiej ilości substancji alkoholowej nie wywołuje znacznych zmian, jednak systematyczne jego przyjmowanie może prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych. Jeśli dojdzie do nadużycia, może to skutkować bezpośrednimi następstwami. Spośród nich respondenci najczęściej zgłaszają: pragnienie (61%), częściej mężczyźni (67%) niż kobiety (56%), ból głowy (58%), gdzie proporcje są odwrotne (K – 62%; M – 52%) i poczucie „rozbicia” (21%). Dokładne proporcje dotyczące następstw zdrowotnych i rozkładu według płci przedstawia **tabela 4**.

Moment trzeźwienia u osoby, która nadużyła alkoholu i rodzaj doznawanych emocji są zależne nie tylko od reakcji organizmu, ale i od charakteru jednostki. Najczęściej studenci wymieniali przyjemne doznania w związku z uwalnianiem alkoholu z ciała. 67% respondentów na drugi dzień wspomina zabawne momenty ze wspólnego uczutowania, 64% ma miłe wspomnienia, 43% nie żałuje wypitych szklanek alkoholu i śmieje się z tego. Dla 21% studentów nadużycie alkoholu prowadzi do tworzenia obietnic o dalszej abstynencji, co potwierdzają obie płcie (K – 21%; M – 20%; **tabela 5**).

Zakazane spożywanie alkoholu często prowadzi do negatywnych zachowań ze strony osoby uzależnionej. Najczęściej są to reakcje ucieczki, racjonalizowania picia i oszukiwania.

Wśród studentów najczęściej przejawianymi zachowaniami są: picie dla rozluźnienia przed wyjściem na przyjęcie, ważne spotkanie czy dyskotekę (27%), urwane filmy (12%), picie przed południem (7%) i powroty do spożywania alkoholu po dłuższych przerwach abstynencyjnych (7%). Dokładne dane z uwzględnieniem płci przedstawia **tabela 6**.

Studenci zapytani o swój stosunek do alkoholu w większości (56%) twierdzili, że piją go tylko sporadycznie i nie uważają siebie za osoby uzależnione od tej substancji. 31% spożywa alkohol często, ale nie jest to wynikiem uzależnienia. 12% nie jest uzależnionych, ponieważ w ogóle nie spożywa napojów procentowych. Tylko jedna osoba (1%) przyznała się do tego, że nadużywa trunków i czasami sama przed sobą boi się przyznać, że mogłaby być uzależniona.

Tabela 5. Następstwa trzeźwienia a płeć respondentów

Rodzaj alkoholu		Płeć		Ogółem
		Kobiety	Mężczyźni	
Wstydzisz się swojego zachowania, o którym opowiadają Ci Twoi znajomi	liczebność	9	6	13
	% z czy spożywasz alkohol?	60,0%	40,0%	100,0%
	% z płeć	10,6%	10,0%	10,3%
	% z ogółem	6,2%	4,1%	10,3%
Masz wyrzuty sumienia, że znowu piłeś/łaś	liczebność	7	5	12
	% z czy spożywasz alkohol?	58,3%	41,7%	100,0%
	% z płeć	8,2%	8,3%	8,3%
	% z ogółem	4,8%	3,4%	8,3%
Wracają problemy ze zdwojoną siłą	liczebność	2	0	2
	% z czy spożywasz alkohol?	100,0%	0%	100,0%
	% z płeć	2,4%	0%	1,4%
	% z ogółem	1,4%	0%	1,4%
Obiecujesz sobie, że już nie będziesz pił/piła	liczebność	18	12	30
	% z czy spożywasz alkohol?	60,0%	40,0%	100,0%
	% z płeć	21,2%	20,0%	20,7%
	% z ogółem	12,4%	8,3%	20,7%
Masz miłe wspomnienia z dnia wczorajszego	liczebność	56	37	93
	% z czy spożywasz alkohol?	60,2%	39,8%	100,0%
	% z płeć	65,9%	61,7%	64,1%
	% z ogółem	38,6%	25,5%	64,1%
Nie żałujesz, że piłeś/łaś i śmiejesz się z tego	liczebność	36	27	63
	% z czy spożywasz alkohol?	57,1%	42,9%	100,0%
	% z płeć	42,4%	45,0%	43,4%
	% z ogółem	24,8%	18,6%	43,4%
Wspominasz zabawne momenty ze wspólnego picia	liczebność	62	35	97
	% z czy spożywasz alkohol?	63,9%	36,1%	100,0%
	% z płeć	72,9%	58,3%	66,9%
	% z ogółem	42,8%	24,1%	66,9%
Inne	liczebność	3	0	3
	% z czy spożywasz alkohol?	100,0%	0%	100,0%
	% z płeć	3,5%	0%	2,1%
	% z ogółem	2,1%	0%	2,1%
Nie dotyczy	liczebność	5	7	12
	% z czy spożywasz alkohol?	41,7%	58,3%	100,0%
	% z płeć	5,9%	11,7%	8,3%
	% z ogółem	3,4%	4,8%	8,3%

Wnioski

W wyniku analizy przeprowadzonych badań dotyczących zjawiska nadużywania alkoholu studenci pokazali swój styl picia i zachowania z nim związane. Niemal cała badana grupa to osoby, które deklarują spożywanie alkoholu, co charakteryzuje obie płcie. Większość studentów nie jest uzależniona, piją alkohol wyłącznie dla rozluźnienia i dobrej

Tabela 6. Rodzaj zachowania względem spożywania alkoholu a płeć respondentów

Rodzaj zachowania		Płeć		Ogółem	Rodzaj zachowania		Płeć		Ogółem
		Kobiety	Mężczyźni				Kobiety	Mężczyźni	
Picie w samotności	liczebność	4	4	8	Kłamstwa dotyczące picia alkoholu	liczebność	1	5	6
	% z czy spożywasz alkohol?	50,0%	50,0%	100,0%		% z czy spożywasz alkohol?	16,7%	83,3%	100,0%
	% z płeć	4,7%	6,7%	5,5%		% z płeć	1,2%	8,3	4,1%
	% z ogółem	2,8%	2,8%	5,5%		% z ogółem	0,7%	3,4%	4,1%
Picie przed południem	liczebność	6	4	10	Powroty do picia po długich przerwach abstynencyjnych	liczebność	9	1	10
	% z czy spożywasz alkohol?	60,0%	40,0%	100,0%		% z czy spożywasz alkohol?	90,0%	10,0%	100%
	% z płeć	7,1%	6,7%	6,9%		% z płeć	10,6%	1,7%	6,9%
	% z ogółem	4,1%	2,8%	6,9%		% z ogółem	6,2%	0,7%	6,9%
Picie dla rozluźnienia przed wyjściem na przyjęcie, ważne spotkanie	liczebność	25	14	39	Urwane filmy	liczebność	9	9	18
	% z czy spożywasz alkohol?	64,1%	35,9%	100,0%		% z czy spożywasz alkohol?	50,0%	50,0%	100,0%
	% z płeć	29,4%	23,3%	26,9%		% z płeć	10,6%	15,0%	12,4%
	% z ogółem	17,2%	9,7%	26,9%		% z ogółem	6,2%	6,2%	12,4%
Chowanie alkoholu i picie w ukryciu	liczebność	3	2	5	Samodzielne podejmowanie prób poradzenia sobie z alkoholem	liczebność	1	3	4
	% z czy spożywasz alkohol?	60,0%	40,0%	100,0%		% z czy spożywasz alkohol?	25,0%	75,0%	100,0%
	% z płeć	3,5%	3,3%	3,4%		% z płeć	1,2%	5,0%	2,8%
	% z ogółem	2,1%	1,4%	3,4%		% z ogółem	0,7%	2,1%	2,8%
Unikanie rozmów na temat swojego picia	liczebność	0	1	1	Nie dotyczy	liczebność	48	28	76
	% z czy spożywasz alkohol?	0%	100,0%	100,0%		% z czy spożywasz alkohol?	63,2%	36,8%	100,0%
	% z płeć	0%	1,7%	100,0%		% z płeć	56,5%	46,7%	52,4%
	% z ogółem	0%	1,7%	0,7%		% z ogółem	33,1%	19,3%	52,4%

zabawy. Najczęściej wśród trunków pojawiają się piwo i wódka, które w gronie przyjaciół wypijane są w klubach lub na dyskotekach. Sporadycznie niektóre z osób piją samotnie.

Zdarza się, że następstwem upojenia alkoholowego jest luka w pamięci z ubiegłej nocy. Jednak zdecydowana większość nie nadużywa alkoholu w tak ryzykowny sposób. Najczęstszymi następstwami trzeźwienia są ból głowy i uczucie pragnienia. Z reguły studenci mają miłe wspomnienia z dnia wczorajszego i chętnie wspominają te najmilsze momenty, tylko dla 1/5 ankietowanych ubiegła noc

i nadużycie substancji alkoholowej jest bodźcem do przyszłych postanowień o abstynencji.

Otrzymano: 2013.11.20 · Zaakceptowano: 2014.01.10

Piśmiennictwo

1. Osiatyński W.: Alkoholizm. Grzech czy choroba?, Wyd. Iskry 2005.
2. Cierpialkowska L.: Alkoholizm: przyczyny-leczeni-profilaktyka., Poznań: Wyd. Naukowe UAM 2001.
3. Niewiadomska I., Sikorska-Głodowicz M.: Alkohol. Uzależnienia, fakty i mity, Lublin: Wyd. Gaudium 2004.
4. Wilmes D.J.: Nie alkoholowi i narkotykom, Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne 2005.

Ektoina – naturalny ekstraprotektant pozyskiwany z ekstremofilów. Mechanizm działania i zastosowanie w produktach leczniczych i kosmetycznych

Katarzyna Jacyszyn¹, Karol Nartowski^{2,3}, Janusz Pluta², Bożena Karolewicz²

¹ Instytut Kosmetologii, Wyższa Szkoła Fizjoterapii z siedzibą we Wrocławiu, Wrocław, Polska

² Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław, Polska

³ Department of Drug Delivery and Pharmaceutical Materials, School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, UK

Adres do korespondencji: Karol Nartowski, Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 211, Wrocław, Polska, e-mail: karol.nartowski@gmail.com

Wstęp

Metody ochrony produktów chemicznych, biologicznych, leczniczych i żywnościowych przed szkodliwym działaniem mikroorganizmów znane są od stuleci. Tradycyjne konserwowanie produktów żywnościowych i leczniczych opiera się na stosowaniu substancji osmotycznie czynnych, stwarzających niekorzystne warunki dla rozwoju mikroorganizmów. Mechanizm tego zjawiska związany jest z fizycznym transportem wody z wnętrza komórki bakteryjnej na drodze dyfuzji. Mikroorganizmy pozbawione w ten sposób wody, w związku z zahamowaniem procesów biochemicznych zależnych od jej dostępu, przestają się prawidłowo rozwijać i namnażać. Doskonałym przykładem tego zjawiska jest stosowanie cukru przy produkcji przetworów owocowych czy produktów leczniczych w postaci syropów oraz chlorku sodu (sól kuchenna) przy konserwacji żywności.

Opisane powyżej zjawisko nie dotyczy jednak wszystkich mikroorganizmów. Odkrycie bakterii żyjących w środowisku o wysokim zasoleniu, wysokiej temperaturze czy odpornych na inne warunki stresowe, takie jak: wysokie ciśnienie, brak wody, kwasowe, zasadowe środowisko, obecność szkodliwego promieniowania, zwróciło uwagę naukowców na poznanie biochemicznych mechanizmów pozwalających na przeżycie w ekstremalnych warunkach środowiskowych [1].

Ectoine – natural extra protectant derived from Extremophiles.

Mechanism of action and ectoine application in medical products and cosmetics

Ectoine is naturally sourced amino acid which is derived from microorganisms living in extreme environments. Due to the specific physicochemical properties which allow its interactions with water molecules ectoine is used by bacteria as the proteins and cell structures protective compound. That enables survival in the high salinity and/or high temperature environment. Due to osmoprotective properties through non-specific interactions with water molecules ectoine is increasingly used in medical products and cosmetics. Furthermore, its antioxidant action makes it frequently used compound in UV protective formulations. Patented in the last year highly efficient ectoine production method enable to lower the cost of production and may spread its use on the pharmaceutical market. The main goal of this review is to sketch the molecular mechanism of ectoine action and its protective effect on the skin and its possible application in neurodegenerative and inflammatory diseases.

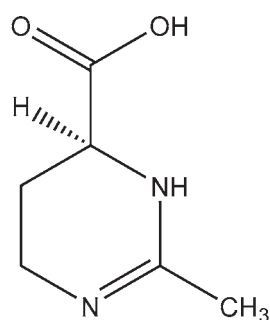
Keywords: ectoine, medical products, cosmetics.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 305–311

Jednym z mechanizmów pozwalających bakteriom halofilowym i halotolerancyjnym na przeżycie w warunkach o bardzo wysokim zasoleniu jest akumulacja niskocząsteczkowych związków organicznych (*compatible solutes*, zgodne substancje rozpuszczone, ekstremolity), których głównym zadaniem jest wyrównywanie zewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego oraz zapewnienie turgoru

komórkowego wyższego niż otoczenie [1]. Odkryta przez Galinskiego i wsp. w 1985 r. w halofilowym fototrofie *Halorhodospira halochloris* (poprzednio *Ectothiorhodospira*), żyjącym w Egipskiej Dolinie Natronu (Wadi Natrun, Dolina sody naturalnej), ektoina (kwas (4S)-2-metylo-1,4,5,6-tetrahydropirymidyno-4-carboxylowy) jest jednym z niewielu aminokwasów produkowanych przez mikroorganizmy, który zapewnia im przeżycie w niekorzystnych warunkach (**rycina 1**) [2-4]. Powyższa substancja od momentu jej odkrycia została także wyizolowana z wielu innych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych szczepów bakterii, włączając w nie mikroorganizmy wykorzystujące w procesach biochemicznych metanol oraz metylaminę, a także metanotropy [5-8]. Te ostatnie zasługują na szczególną uwagę, zwłaszcza w kontekście udziału polskich naukowców w nowatorskich metodach produkcji tego interesującego aminokwasu. Opatentowana w grudniu 2013 r. niezwykle wydajna metoda pozyskiwania ektoiny z metanotropów występujących w jednej z Lubelskich kopalń węgla kamiennego pozwala na ominięcie kosztownej 22-etapowej drogi syntezy chemicznej i obniżenie kosztów produkcji ze 188 tys. zł do 2,5 tys. zł za 1 kg substancji [3, 9, 10]. Niespotykane właściwości i szerokie spektrum potencjalnego zastosowania ektoiny sprawiają, iż globalne roczne zapotrzebowanie na tę substancję ze strony m.in. przemysłu kosmetycznego wynosi 75 tys. kg.

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie właściwości chemicznych i fizykochemicznych ektoiny w kontekście jej zastosowania w kosmetologii i produktach leczniczych o miejscowym działaniu na skórę, które w ostatnim czasie dostępne są na rynku aptecznym. Przedstawimy pokrótce molekularny mechanizm ochronnego działania tzw. *compatible solutes* na struktury komórkowe, białka i kwasy nukleinowe oraz jego efekt makroskopowy na komórki skóry, a także możliwość zastosowania ektoiny w chorobach neurodegeneracyjnych i o podłożu zapalnym (**rycina 2**). Biochemiczne i biotechnologiczne szlaki syntezy, jak i możliwości ich kontroli



Rycina 1. Struktura ektoiny

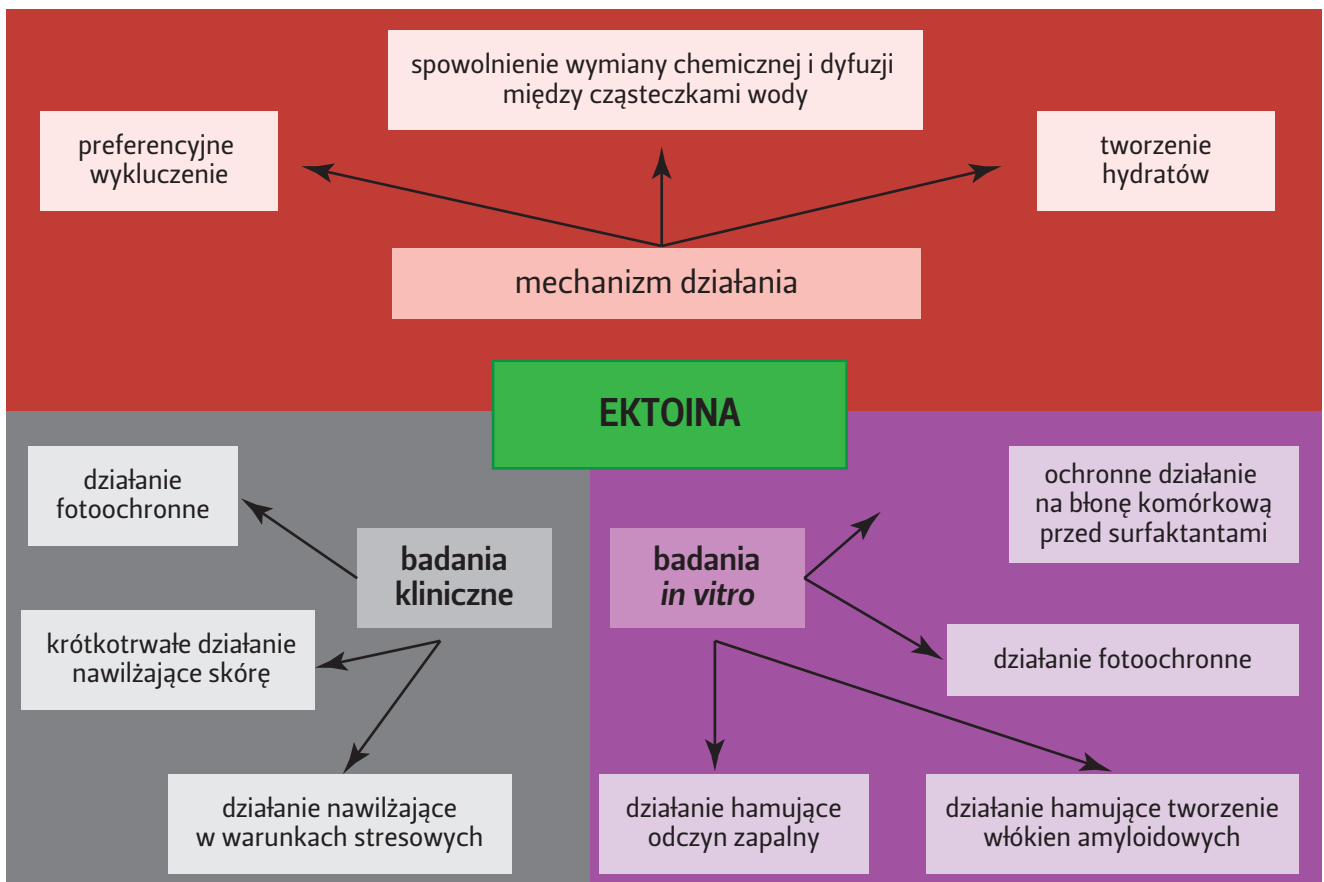
z użyciem czynników stresowych nie są w obrębie poniższej pracy poruszane, a zainteresowanych czytelników odsyłamy do dostępnych publikacji [7, 11-13]. Przegląd piśmiennictwa do powyższej pracy został dokonany poprzez wyszukiwanie w bazie danych Web of Knowledge słów kluczowych: ectoine, ectoine i cosmetology, ectoine i dermatology.

Osmoprotekcyjne działanie ektoiny na poziomie cząsteczkowym

Ektoina i jej hydroksypochodna należą do amfoterycznych związków organicznych o niskiej masie cząsteczkowej, wykazujących możliwości niekowalencyjnego wiązania cząsteczek wody tzw. osmotów. Związki tego typu są kumulowane w komórce w przypadkach zwiększonego zasolenia środowiska zewnętrznego i ich stężenie w komórce może wahać się od kilku milimoli do 1-2 moli, w zależności od zewnętrznego ciśnienia osmotycznego. Dla wielu gatunków bakterii obecność osmotolitów nie zaburza procesów metabolizmu komórkowego i nie powoduje efektów ubocznych w szerokim zakresie stężeń [14-15]. Z tego powodu związki te nazywane są „zgodnymi substancjami rozpuszczonymi”.

Ekstensywne badania nad wyjaśnieniem osmoprotekcyjnego mechanizmu działania ektoiny na makromolekuły i białkowe struktury komórkowe doprowadziły do zaproponowania modelu preferencyjnego wykluczenia (*preferential exclusion model*). Według jego założeń ekstremolity nie znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie z powierzchnią białek komórkowych, gdyż tego typu oddziaływanie jest energetycznie niekorzystne. Jednak dzięki zwiększeniu ilości cząsteczek wody w bezpośrednim sąsiedztwie białka, tzw. preferencyjnej hydratacji, można zapobiec ich denaturacji, stabilizując czwartorzędową strukturę białka. Dodatkowo aktywność enzymatyczna białek komórkowych pozostaje bez zmian, gdyż nie oddziałują one bezpośrednio z ekstremolitami [16-19].

Działanie osmoprotekcyjne dwóch aminokwasów glicyny i ektoiny na inhibitor chymotrypsyny 2 zostało przebadane przez Yu i wsp. oraz Foord i wsp. [19, 20]. W badaniach NMR w przypadku wysokiego stężenia glicyny zauważono spowolnienie procesu wymiany chemicznej pomiędzy grupami amidowymi białka, natomiast wyniki modelowania chemicznego (*molecular dynamics*) mieszaniny ektoina-woda wokół cząsteczki inhibitora chymotrypsyny 2 sugerują, iż ektoina utrzymuje wodę na powierzchni białka poprzez spowolnienie procesu dyfuzji cząsteczek wody wokół cząsteczki białka i utworzenie na jego powierzchni gęstej i uporządkowanej warstwy hydratacyjnej. Pozwala to stwierdzić, iż ektoina, chociaż nie oddziałuje bezpośrednio z makromolekułami komórkowymi, powoduje



Rycina 2. Molekularny mechanizm ochronnego działania ektoiny na struktury komórkowe

zmianę właściwości fizykochemicznych rozpuszczalnika (wody), stabilizując w ten sposób, pośrednio, czwartorzędową strukturę białek.

Suenobu i wsp., wykorzystując metody obliczeniowe (*molecular orbital calculations*), zaproponowali 10 stabilnych solwatów ektoiny w stosunku molowym 1:1 oraz jeden solwat w stosunku molowym ektoina:woda 1:4. Wykorzystując możliwość tworzenia wiązań wodorowych, autorzy wskazują na możliwość tworzenia solwatów w wyższych stosunkach molowych. To z kolei może wpływać na tworzenie stabilnych wewnątrzkomórkowych struktur supramolekularnych [21].

Struktura amfifilowa ektoiny jest dodatkową właściwością, która może wpływać na stabilizację białek wewnątrzkomórkowych. Poprawa zwilżania powierzchni makrocząstek hydrofobowych w obecności jonów obojętnych, tzw. zwitterjonów, może w tym przypadku oddziaływać na warstwę hydratacyjną, stabilizując trójwymiarową konformację białka [22]. Dodatkowo grupa OH w hydroksyektoinie według jednej z teorii może częściowo zastępować cząsteczki wody wewnątrz komórki bakteryjnej w przypadku niedoborów wody, występujących zarówno w procesach suszenia, jak i zamrażania [23].

Opisane powyżej mechanizmy zabezpieczają komórki bakteryjne przed szkodliwymi działaniami

niektórych czynników środowiska zewnętrznego, takimi jak: wysokie zasolenie, niedobór wody czy podwyższona temperatura. Są one także powszechnie stosowane przez przemysł biotechnologiczny jako metody pozyskiwania ektoiny z komórek mikroorganizmów w celu jej późniejszego użycia, głównie w kosmetycznych środkach ochronnych stosowanych na skórę.

Ochronne działanie ektoiny na białka i kwasy nukleinowe

Zaproponowane działanie ektoiny związane z modyfikacją wewnątrzkomórkowych właściwości wody pozostaje w zgodzie z doświadczalnymi wynikami badań nad ochronnym działaniem tegoż aminokwasu na struktury białkowe [14]. Nie bez znaczenia w tym przypadku jest brak wpływu ektoiny na aktywność enzymatyczną białek. Wykorzystując informacje pozyskane podczas badania bakterii, które poddane stresowi termicznemu zwiększały sekrecję ektoiny, Lippert i wsp. jako pierwsi wykorzystali ektoinę jako substancję termoprotekcyjną *in vitro* [23]. W przeprowadzonym badaniu termiczna inaktywacja dwóch enzymów, tj. fosfofruktokinazy i dehydrogenazy mleczanowej, została podwyższona o 14 °C po zastosowaniu

1M roztworu hydroksypochodnej ektoiny [23]. Jak donosi Kolp i wsp., stabilizacja czwartorzędowej struktury niektórych białek przez ektoinę zapobiega ich rozkładowi przez trypsynę i trypsynogen [18, 24]. Podobnie Bersch i wsp. dowiedli zwiększoną odporność proteolityczną przeciwciał w obecności ektoiny [25].

Nie bez znaczenia wydaje się przeciworodnikowe działanie ektoiny na struktury białkowe. Ma to szczególne znaczenie w opisanym w dalszej części pracy działaniu fotoprotekcyjnym. W badaniu przeprowadzonym przez Andersson i wsp. wykazano, iż ektoina i jej hydroksypochodna działają ochronnie na dehydrogenazę mleczanową w przypadku poddania tego enzymu katalizowanej przez metale oksydacji wolnorodnikowej [26].

Pleiotropowe działanie ektoiny na struktury komórkowe nie sprowadza się wyłącznie do białek. Dowiedziono, iż ektoina obniża temperaturę topnienia podwójnej nici DNA oraz zwiększa odporność temperaturą polimerazy DNA [27]. Co więcej, bakterie produkujące antybiotyk przeciwnowotworowy – aktynomycynę D, której mechanizm działania polega na interkalacji z kwasami nukleinowymi komórek nowotworowych, wypracowały mechanizm samoobrony przy użyciu ektoiny i jej hydroksypochodnej, uniemożliwiający interakcję tej cząsteczki z ich własnym DNA [28]. W badaniu *in vitro* wolnorodnikowe uszkodzenie mitochondrialnego DNA fibroblastów komórek skóry ludzkiej poprzez działanie promieniowania UVA zostało częściowo zahamowane także poprzez stosowanie ektoiny [29].

Działanie ochronne ektoiny na komórki skóry

Opisane w poprzednich sekcjach ochronne działanie ektoiny na komórki bakteryjne i struktury komórkowe może zostać z powodzeniem implementowane na skórę ludzką. Ze względu na to, że chroni ona organizm przed środowiskiem zewnętrznym, jest w szczególności narażona na działanie szkodliwych czynników. Efektywność warstwy rogowej jako bariery zapobiegającej nadmiernej utracie wody może zostać zakłócona przez ekspozycję na ekstremalne czynniki pogodowe, takie jak: mróz, wiatr, intensywne słońce, częste usuwanie warstwy lipidowej przy użyciu mydła czy chemicznych środków myjących, tj. surfaktantów. Wszystkie te czynniki wpływają na przyspieszone starzenie się skóry [30, 31].

Driller i wsp. udowodnili ochronne działanie ektoiny na błonę komórkową w tzw. teście czerwonych krwinek. Czynnikiem stresowym w tym badaniu jest surfaktant, który w zetknięciu z komórkami krwi niszczy ich błonę komórkową, powodując

uwolnienie czerwonego barwnika, którego stężenie wskazuje na intensywność uszkodzeń. Czerwone krwinki inkubowane z ektoiną przed zastosowaniem surfaktantów w 4 na 5 przypadków wykazały większą stabilność błony komórkowej w porównaniu z powszechnie znanym stabilizatorem błony komórkowej, tj. fosfatydylocholiną [29, 30, 32].

Ektoina została również poddana badaniom pod kątem jej zdolności fotoochronnych przed uszkodzeniami komórek wywołanych promieniowaniem UV. Stosując model skóry, wykazano, że preinkubacja ekwiwalentu skóry przez 24 godziny z ektoiną znacznie zmniejsza liczbę SBC (*sun burned cells*) – uszkodzonych promieniowaniem UV keratynocytów [32, 33]. Fotoochronne działania ektoiny udowodniono również *in vivo*. Stosując przed ekspozycją na promieniowanie UV emulsję zawierającą 1% ektoiny, odnotowano zmniejszenie apoptozy komórek Langerhansa. W ten sposób ektoina wywiera immunochronny efekt, chroniąc skórę przed szkodliwym działaniem UV [32, 34].

Co więcej, Botta i wsp., badając genotoksyczne działanie światła widzialnego (400–800nm) oraz promieniowania UVA (315–800nm) na ludzkie keratynocyty i modelu komórkowym jajnika chomika chińskiego (CHO, *Chinese Hamster Ovary*), dowiódł ochronnego działania ektoiny przeciwko obydwu typom promieniowania. W powyższym badaniu komórki na godzinę przed poddaniem irradacji promieniowaniem o określonej długości fali i natężeniu inkubowane były w roztworze ektoiny o stężeniu 0,025, 0,05, 0,01 mM, uzyskując maksymalne działanie ochronne na poziomie 92,7 i 68,9%, odpowiednio dla światła widzialnego i promieniowania UVA w połączeniu ze światłem widzialnym dla najwyższego stężenia aminokwasu. Jako kontrolę użyto komórek niepoddanych napromienianiu (kontrola negatywna) oraz komórek poddanych wyłącznie promieniowaniu (kontrola pozytywna). Podsumowując, autorzy podkreślili konieczność kompleksowej formułacji kremów chroniących przed promieniowaniem słonecznym z użyciem związków chemicznych będących tzw. wewnętrznymi składnikami ochronnymi (*internal protective compounds*), takimi jak ektoina [35].

Wpływ ektoiny na wilgotność skóry

Graf i wsp. przeprowadzili szereg badań, wykazując nawilżające działanie ektoiny na komórki skóry. W badaniu przeprowadzonym na ludzkiej skórze grupy ochotników udowodniono, iż ektoina zmniejsza przeznaskórkową utratę wody (*transepidermal water loss*, TEWL). Skórę, na którą wcześniej podawana była emulsja zawierająca: 0% (placebo), 2% i 5% ektoiny, poddano działaniu szeroko stosowanego detergentu, jakim jest laurylosiarczan

sodu. Wykazano, iż wraz ze wzrostem stężenia ektoiny w stosowanej emulsji skóra staje się mniej podatna na uszkodzenia wywołane detergentem, co w konsekwencji chroni ją przed nadmiernym odparowywaniem wody z naskórka, nawet do 40% [36].

Kolejne badanie miało na celu wykazanie nawilżającego działania ektoiny oraz jej ochronnego działania w momentach nagłego stresu wywołanego brakiem wody. W tym celu autorzy stosowali na skórę dłoni emulsje o różnej zawartości ektoiny, a następnie poddawali skórę odwodnieniu krzemionką. Badanie prowadzono na pięciu ochotnikach, przez 7 dni. Preparat kosmetyczny zawierający: 0% (placebo), 2% i 5% ektoiny nakładano dwa razy dziennie, wykonując pomiary wilgotności przy użyciu korneometru: przed rozpoczęciem badania oraz po tygodniu stosowania. Następnie w celu odwodnienia skóry nakładano żel krzemionkowy i stosowano 2-godziną okluzję, monitorując po tym czasie wilgotność skóry przez następne 24 godziny. Badanie wykazało, że ektoina nie tylko podnosi poziom nawilżenia, ale również chroni skórę przed nagłym odwodnieniem w ekstremalnych warunkach [36].

Wykazano również, iż zastosowanie ektoiny przedłuża nawilżenie skóry nawet do 7 dni po zakończeniu jej stosowania. W badaniu przeprowadzonym na pięciu ochotnikach przez 12 dni, dwa razy dziennie na skórę dłoni nakładano preparat kosmetyczny o niewielkim stężeniu ektoiny (0,5–1%). Poziom nawilżenia skóry monitorowano od 8 do 12 dnia aplikacji oraz tydzień po zaprzestaniu aplikacji do 19 dnia trwania eksperymentu. Pomiary przeprowadzane przy stałej temperaturze i wilgotności powietrza (22°C i 60%) wykazały, iż po 8 dniach stosowania odnotowano znaczące zwiększenie nawilżenia, nawet do 200% (w porównaniu z placebo), utrzymujące się do 7 dni od zakończenia aplikacji [36].

Dodatkowym aspektem badania było porównanie ektoiny i powszechnie stosowanego środka nawilżającego skórę – glicerolu pod względem możliwości tworzenia wiązań z wodą przy użyciu symulacji dynamiki molekularnej (*Molecular Dynamics*, MD). Symulacja wykazała, iż wiązania wody z ektoiną są znacznie trwalsze niż wody i glicerolu, pozwalając na molekularne wyjaśnienie obserwowanego zjawiska [36].

Potencjalne działanie protekcyjne ektoiny w chorobach neurodegeneracyjnych oraz chorobach o podłożu zapalnym

Tworzenie i odkładanie się w tkankach agregatów amyloidowych jest uważane za jedną z przyczyn powstawania chorób neurodegeneracyjnych,

tj. choroby Alzheimerera, Parkinsona czy choroby wściekłych krów. Dochodzi do tego wskutek błędnego/alternatywnego fałdowania się białek amyloidogennych, które tworzą makroskopowe włókna w warunkach stresowych, tj. podwyższonej temperaturze czy skrajnych wartościach pH [37]. Wykorzystując ochronne działanie ektoiny na struktury białkowe bakterii żyjących w ekstremalnych środowiskach, grupa pod kierownictwem Park'a przeprowadziła szereg badań potwierdzających możliwe zastosowanie ektoiny w prewencji chorób, których przyczyną jest tworzenie włókien amyloidowych.

Przełomowym odkryciem było zahamowanie procesu agregacji i tworzenia włókien insuliny w warunkach *in vitro* w obecności roztworu ektoiny o stężeniu 300 mM [37]. Jako mechanizm tego zjawiska autorzy wskazują na synergistyczny efekt zwiększenia napięcia powierzchniowego roztworu oraz preferencyjną hydratację monomerów insuliny. W tych warunkach w celu zminimalizowania energii wynikającej z interakcji pomiędzy białkiem a cząsteczkami rozpuszczalnika energetycznie korzystne dla białka wydaje się pozostanie w zwartej sferycznej postaci zamiast formowania włókien białkowych [37].

Za przyczynę powstawania choroby Alzheimerera, która obecnie dotyka ponad 10% osób w wieku powyżej 65 roku życia, uważa się tworzenie zewnątrzkomórkowych płytek i włókien amyloidowych, które odkładają się w tkance mózgowej. Przeważająca większość z nich zbudowana jest z A β amyloidopeptydu, zbudowanego z 39–42 reszt kwasowych, przy czym wersja zbudowana z 42 aminokwasów (A β 42) jest szczególnie skłonna do agregacji. Korzystając z antyagregacyjnych właściwości ektoiny dowiedzionych na przykładzie cząsteczki insuliny, Park i wsp. wykazali, iż ektoina oraz jej hydroksypochodna hamują agregację A β 42 peptydu *in vitro* i przez to są dobrymi kandydatami na substancje aktywne zapobiegające chorobie Alzheimerera. Co więcej, w tym samym badaniu dowiedziono, iż ektoina zapobiega cytotoksycznemu działaniu A β 42 peptydu na komórki nerwiaka ludzkiego, które służą jako model dla badań funkcji i różnicowania się neuronów. Wykazano, iż aktywność komórek inkubowanych z roztworem 25 μ M A β 42 peptydu zmalała o 25%, podczas gdy aktywność komórek inkubowanych wraz z 100 μ M ektoiny zmalała tylko o 3% [38].

Przyczyna powstawania choroby prionowej, wywołującej gąbczaste zwyrodnienie mózgu, nie jest do końca poznana. Badania wskazują, iż istotną rolę odgrywa tu potranslacyjna modyfikacja białka PrPc gospodarza i jego interakcje z białkiem prionowym PrPsc, które, pomimo identycznej budowy chemicznej, wykazuje izomeryzm konformacyjny,

prowadząc do polimeryzacji i tworzenia włókien amyloidowych w tkance mózgowej. Prowadzi to do obumierania komórek neuronalnych w wyniku indukowania apoptozy oraz do proliferacji i przerostu komórek glejowych. Park i wsp. wykazali, iż ektoina może być skutecznie użyta w celu zahamowania tworzenia się włókien amyloidowych *in vitro*, powstających w wyniku choroby prionowej. Co więcej, podobnie jak w przypadku A β 42 peptydu wywołującego chorobę Alzheimera, ektoina hamuje cytotoksyczne działanie białka prionowego na komórki nerwiaka ludzkiego podczas ich inkubacji z mieszaniną 2 μ M PrP i 10 μ M roztworu ektoiny [39].

Ektoina może również wpływać na hamowanie procesów zapalnych zachodzących w płucach, co zostało udowodnione w badaniach przeprowadzonych przez Sydlik i wsp. Autorzy wykazali, iż ektoina poprzez wpływ na prozapalną ścieżkę sygnalizacji komórek nabłonka płuc może hamować powstawanie zapalenia płuc indukowanego warunkami stresowymi, tj. obecnością nanocząstek węgla. Eksperyment przeprowadzono w warunkach *in vivo* na szczurach, a także *in vitro* na ludzkich i szczurzych komórkach nabłonka płuc. Badanie pokazało, iż wystąpienie zapalenia dróg oddechowych po ekspozycji na działanie nanocząstek węgla i podaniu ektoiny wystąpiło 168 godzin później w porównaniu do grupy zwierząt, której aminokwasu nie podano. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, efekt ochronny zależny był od zastosowanej dawki [40, 41].

Abdel-Aziz i wsp., powołując się na wcześniejsze doniesienia dotyczące hamowania procesów zapalnych przy użyciu ektoiny, zbadali możliwość jej zastosowania w celu leczenia nieswoistego zapalenia jelit (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD). IBD jest to grupa przewlekłych chorób układu pokarmowego, o niejasnej patogenezie i etiologii, do których zaliczamy m.in. chorobę Leśniowskiego-Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelit. Autorzy, przeprowadzając badania na szczurach, posłużyli się laboratoryjnym modelem choroby, wywołanym chemicznie. Jednej grupie zwierząt podawano ektoinę w dawce od 30 do 300 mg/kg masy ciała, natomiast drugiej grupie standardowo sulfasalazynę w dawce 300 mg/kg masy ciała. Wyniki porównano z grupami kontrolnymi – pozytywną, która nie była poddana terapii, oraz negatywną, której nie indukowano schorzenia. Badanie wykazało, iż ektoina w optymalnej dawce 100 mg/kg masy ciała wywołuje bardzo zbliżone działanie do sulfasalazyny stosowanej w trzy razy większej dawce. Wyniki histopatologiczne, tj. powierzchnia owrzodzenia oraz tzw. colon mass index, czyli stosunek masy jelita grubego do masy ciała zwierzęcia były zbliżone dla obydwu

terapii i statystycznie niższe niż u zwierząt nieleczonej. Stężenia markerów stanu zapalnego (TNF- α , IL-1 β , PGE2, LTB4, ICAM-1), w chorobowo zmienionej tkance oraz w surowicy, po zastosowaniu terapii z użyciem ektoiny i sulfasalazyny, były także zbliżone. Autorzy wskazują, iż jakkolwiek przeniesienie wyników przeprowadzonych na modelu zwierzęcym do badań klinicznych jest trudne, zastosowanie ektoiny może torować drogę dla nowej grupy substancji leczniczych stosowanych w IBD, tj. naturalnych stabilizatorów bariery jelitowej [42].

Podsumowanie

W powyższej pracy zaprezentowano molekularny mechanizm działania ektoiny – aminokwasu pozyskiwanego metodami biotechnologicznymi z bakterii zdolnych do przeżycia w ekstremalnych warunkach środowiska. Substancja ta znajduje coraz częstsze zastosowanie w ochronnych preparatach kosmetycznych i środkach leczniczych stosowanych na skórę i błony śluzowe, szczególnie w przypadku alergii oraz atopowego zapalenia skóry. Ze względu na silną aktywność wiązania wody w komórce i ochronne działanie na białkowe struktury komórkowe, ektoina może być szczególnie użyteczna w zapobieganiu przesuszania się skóry, które może prowadzić do jej przedwczesnego starzenia. Znajduje ona także coraz częstsze zastosowanie w środkach chroniących przed szkodliwym promieniowaniem słonecznym. Dodatkowo właściwości wpływające na hamowanie tworzenia włókien amyloidowych mogą znaleźć zastosowanie w przyszłości jako środek zapobiegający chorobom neurodegeneracyjnym. Co więcej, ze względu na możliwość tańszej produkcji ektoiny może stać się ona szeroko stosowanym składnikiem w preparatach kosmetycznych i parafarmaceutykach, a jej mechanizm działania nie powinien budzić wątpliwości w przypadku jej wykorzystania w formuacjach stosowanych miejscowo na skórę.

Otrzymano: 2014.04.07 · Zaakceptowano: 2014.05.11

Piśmiennictwo

1. Rothschild L.J., Mancinelli R.L.: Life in extreme environments, Nature 2001, 409(6823): 1092–101.
2. Schuh W., Puff H., Galinski E.A., Truper H.G.: The crystal-structure of ectoine, a novel amino-acid of potential osmoregulatory function. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 1985, 40(11–12):780–4.
3. <http://biotechnologia.pl/biotechnologia/artykuly/nauka-z-pasja-ektoina-jest-warta-tyle-co-zloto-rozmowa-z-prof-dr-hab-zofia-stepniewska-i-dr-agnieszka-kuzniar> (marzec 2014).
4. Galinski E.A.: Osmoadaptation in bacteria, Adv Microb Physiol 1995, 37: 272–328.
5. Kempf B., Bremer E.: Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. 1998, 170(5): 319–30.

6. Khmelenina V.N., Shchukin V.N., Reshetnikov A.S., Mustakhimov I.I., Suzina N.E., Eshinimaev B.T., Trotsenko Yu.A.: Structural and functional features of methanotrophs from hypersaline and alkaline lakes. *Microbiology* 2010, 79(4): 472–82.
7. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A.: Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs [w]: Rosenzweig A.C., Ragsdale S.W.: Methods in methane metabolism, *Methods Enzymol.* 2011, 495: 15–30.
8. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V., Eshinimaev B., Sorokin D., Fuse H., Lidstrom M., Trotsenko Y.A.: Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylobacterium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylobacterium*. *IJSEM* 2008, 58: 591–6.
9. Wolinska A., Pytlak A., Stepniewska Z., Kuzniar A., Piasecki C.: Identification of methanotrophic bacteria community in the Jastrzebie-Moszczenica Coal Mine by fluorescence in situ hybridization and PCR techniques. *Pol. J. Environ. Stud.* 2013, 22(1): 275–82.
10. Stepniewska Z., Pytlak A., Kuzniar A.: Methanotrophic activity in Carboniferous coalbed rocks. *Int. J. Coal Geol.* 2013, 106: 1–10.
11. Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A.: Regulatory aspects of ectoine biosynthesis in halophilic bacteria. *Microbiology* 2010, 79(5): 583–92.
12. Fallet C., Rohe P., Franco-Lara E.: Process Optimization of the Integrated Synthesis and Secretion of Ectoine and Hydroxyectoine Under Hyper/Hypo-Osmotic Stress. *Biotechnology and Bioengineering* 2010, 107(1): 124–33.
13. Canovas M., Pastor J.M., Argandona M., Vergas C., Nieto J.J., Iborra J.L.: Metabolic profiling of ectoine and hydroxyectoine production by *Chromohalobacter salexigens*. *New Biotechnology* 2009, 25: S341–S.
14. Galinski E.A.: Compatible solutes of halophilic eubacteria – molecular principles, water–solute interaction, stress protection. *Experientia* 1993, 49(6–7): 487–96.
15. Brown A.D.: Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 1976, 40(4): 803–46.
16. Arakawa T., Timasheff S.N.: The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 1985, 47(3): 411–4.
17. Galinski E.A., Stein M., Amendt B., Kinder M.: The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. *Comp Biochem Physiol A* 1997, 117(3): 357–65.
18. Kolp S., Pietsch M., Galinski E.A., Guetschow M.: Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim Biophys Acta Protein Proteomics* 2006, 1764(7): 1234–42.
19. Yu I., Jindo Y., Nagaoka M.: Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: Direct interaction and hydration alteration. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111(34): 10231–8.
20. Foord R.L., Leatherbarrow R.J.: Effect of osmolytes on the exchange rates of backbone amide protons in proteins. *Biochemistry* 1998, 37(9): 2969–78.
21. Suenobu K., Nagaoka M., Yamabe T., Nagata S.: Ab initio molecular orbital study on molecular and hydration structures of ectoine. *J. Phys. Chem. A* 1998, 102(38): 7505–11.
22. Schobert B., Tschesche H.: Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta* 1978, 541(2): 270–7.
23. Lippert K., Galinski E.A.: Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes – protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992 Apr, 37(1): 61–5.
24. Kolp S.P.M., Galinski E.A., Gütschow M.: Protection against proteolytic cleavage by compatible solutes. Polish–Austrian–German–Hungarian–Italian joint meeting on medicinal chemistry. Kraków 2003.
25. Bersch S.V.M., Schwarz T., Kaufmann M.: Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes. 2nd International Conference on Protein Stabilisation/Biomolecule Stabilisation, Lisbon 2000.
26. Andersson M.M., Breccia J.D., Hatti-Kaul R.: Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 32:145–53.
27. Lapidot A.I.R., Malin G.: Methods for DNA amplification and sequencing 1999.
28. Lentzen G.S.T.: Kompatible Solute: Mikrobielle Herstellung und Anwendung. Anthranikian G (ed) *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer 2005, 355–72.
29. Driller H., Bünger J., Degwert J.: The protective function of compatible solute ectoine on the skin cells and its biomolecules with respect to UV-radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Mag.* 2001, 4: 1–6.
30. Orth D.S., Appa Y.: Glycerine: a natural ingredient for moisturizing skin. W: Loden M., Maibach H.I.: *Dry skin and moisturizers*. London, CRC Press; 2000, 213–228.
31. Rabe J.H., Mamelak A.J., McElgunn P.J.S., Morison W.L., Sauder D.N.: Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 2006, 55(1): 1–19.
32. Lentzen G., Schwarz T.: Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 72(4): 623–34.
33. Buenger J, Driller H. Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 2004, 17(5): 232–7.
34. Beyer N., Driller H., Bünger J.: Ectoin—a innovative, multifunctional active substance for the cosmetic industry. *SÖFW-J.* 2000, 126: 27–9.
35. Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A.S., De Meo M.: Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B* 2008, 91: 24–34.
36. Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H.: The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. Dermatol.* 2008, 26(4): 326–333.
37. Arora A., Ha C., Park C.B.: Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Letters* 2004, 564: 121–125.
38. Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B.: Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters.* 2005, 579: 4775–4780.
39. Kanapathipillai M., Ku S.H., Girigoswami K., Park C.B.: Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106–126. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2008, 365: 808–813.
40. Sydlik U., Gallitz I., Albrecht C., Abel J., Krutmann J., Unfried K.: The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 180(1): 29–35.
41. Unfried K., Sydlik U., Peuschel H., Albrecht C., Bilstein A., Krutmann J.: The compatible solute ectoine prevents neutrophilic lung inflammation induced by environmental model nanoparticles *in vivo*. *Toxicol Lett* 2010, 196S: S67.
42. Abdel-Aziz H., Wadie W., Abdallah D.M., Lentzen G., Khayyal M.T.: Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine.* 2013, 20: 585–591.

Korzyści kliniczne płynące z pleiotropowego działania simwastatyny

Kamila Osadnik

Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biofarmacji, Sosnowiec

Adres do korespondencji: Kamila Osadnik, ul. Gwiazdy Polarnej 34/6, 44-117 Gliwice, e-mail: kamilea@poczta.onet.pl

The clinical benefits of the pleiotropic effect of simvastatin · For many years simvastatin has been used to treat hypercholesterolemia. In vitro and in vivo studies under simvastatin suggest other favorable actions of this drug such as it is well known anti-inflammatory activity that helps to maintain balance between vasoconstrictive and vasodilatory agents secreted by the endothelium. Another effect of simvastatin is inhibition prenylation of cytoplasmic proteins in osteoclasts leading to impairment of osteoclasts resorptive activity and consequently to apoptosis. This effect may in turn affect osteoporosis progression. Simvastatin possibly has also immunosuppressive properties as it reduces risk of allograft rejection in heart transplant recipients. Further studies on simvastatin may result in widening of its clinical indications and development of new form drug technologies.

Keywords: simvastatin, osteoporosis, cardiovascular disease.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 312–315

Wstęp

Simwastatyna jest najlepiej przebadaną ze wszystkich statyn. Niezaprzeczalne jest jej działanie obniżające poziom cholesterolu. Na skutek hamowania w wątrobie enzymu reduktazy HMG-CoA, który dokonuje przemiany kwasu β -hydrokso- β -metyloglutarylowego (HMG-CoA) do kwasu mewalonowego, skutecznie obniżając poziom cholesterolu zawartego we frakcjach LDL (*low density lipoproteins* – lipoproteiny o małej gęstości), VLDL (*very low density lipoproteins* – lipoproteiny o bardzo małej gęstości) oraz zwiększając ilość krążącej we krwi frakcji HDL (*high density lipoproteins* – lipoproteiny o dużej gęstości). Mechanizm ten tłumaczy się zwiększeniem w wątrobie ilości receptorów dla lipoprotein LDL, co przyspiesza katabolizm cholesterolu zawartego w tej frakcji [1, 2].

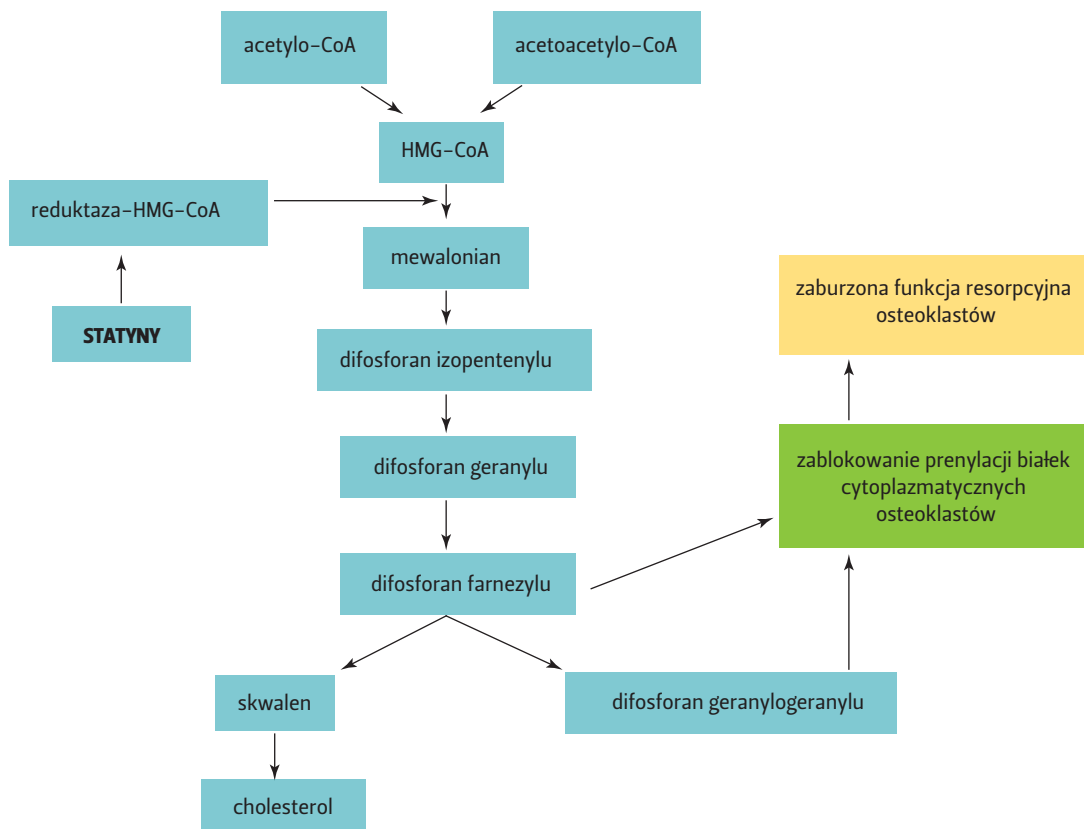
Jak pokazują wyniki badań ostatnich lat, kliniczny rezultat leczenia simwastatyną jest efektem nie

tylko jej działania hipolipemizującego, ale wynika również z innych właściwości tego farmaceutyku.

Niniejszy artykuł wskazuje na wielokierunkowe działania simwastatyny oraz wyjaśnia mechanizmy komórkowe zachodzące podczas terapii.

Terapia simwastatyną może zmniejszać prawdopodobieństwo wystąpienia osteoporozy

Istnieje ścisła zależność pomiędzy hipolipemizującym działaniem simwastatyny a jej wpływem na komórki kościogubne (osteoklasty). Blokowanie kluczowego enzymu szlaku syntezy cholesterolu obniża stężenie mewalonianu w organizmie. Mewalonian jest prekursorem pirofosforanu farnezyli i pirofosforanu geranylogeranyli. Brak tych jednostek skutkuje upośledzoną prenylacją (przyłączenie reszty farnezyliowej lub geranylogeranyliowej) białek cytoplazmatycznych (**rycina 1**). Wspomniane białka uczestniczą w procesach komórkowych osteoklastów. Regulują ich wzrost, różnicowanie, ekspresję genów, ruchliwość, montaż cytoszkieletu, rozprawdzają białka i lipidy, transportują nukleotydy [3]. Zablockowanie prenylacji białek Rho, Rac, Rab, Rap, Ras powoduje w osteoklastach hamowanie aktywności i sprzyja ich apoptozie, przez co nie dochodzi do resorpcji kości, odgrywającej kluczową rolę w osteoporozie [4, 5]. Skuteczność kościotwórczą simwastatyny testowano, podając ją różnymi drogami: w postaci mikrosfer wstrzykiwanych: domięśniowo, podskórnio, dożylnie lub w postaci skafoldów umieszczonych w kości, w miejscu objętym osteoporozą [3, 6]. Tak dobre efekty terapii celowanej tłumaczy się pobudzeniem przez simwastatynę ekspresji genów kodujących morfogenetyczne białko kości-2 (*bone morphogenetic protein 2*, BMP-2) [3]. Wiadomo, że owo białko indukuje różnicowanie komórek podścieliska szpiku w kierunku komórek kościotwórczych (osteoblastów) oraz hamuje różnicowanie komórek tłuszczowych (adipocytów). Badania



Ryc. 1. Schemat obrazujący etapy syntezy cholesterolu, miejsce działania reduktazy HMG-CoA i statyn oraz wynikający z tego efekt dla osteoklastów [1, 2, 3]

wskazują, iż simwastatyna wywiera wręcz anaboliczny wpływ na tkankę kostną. Czy możemy zatem mówić o simwastatynie jako o potencjalnym leku na osteoporozę? Chorobie, która dotyka kobiety będące w okresie pomenopauzalnym lub poddane zabiegowi wycięcia jajników, co obniża u nich stężenie estrogenu we krwi. Efektem braku tego hormonu jest zmniejszenie gęstości tkanki kostnej [7]. Chunli i współpracownicy twierdzą, że simwastatyna zwiększa ekspresję genów kodujących białka budujące receptor estrogenowy α , przez co pobudza osteogenezę. W przeprowadzonym przez nich eksperymencie, do którego zrekrutowano kobiety będące w okresie postmenopauzalnym i obciążone hipercholesterolemią, podawano codziennie doustnie 40 mg simwastatyny przez 12 miesięcy. Po tym czasie zaobserwowano u kobiet wzrost gęstości mineralizacji kręgow łędźwiowych, szyjki kości udowej oraz kości udowej, odpowiednio o 2,8%, 1,0% i 0,8% [8]. Inne badanie, przeprowadzone na szczurach, którym codziennie podawano doustnie simwastatynę, wskazuje, iż wartość siły użytej do złamania takiej kości w porównaniu do próby kontrolnej z użyciem placebo jest większa [9].

Korzystny wpływ simwastatyny na funkcjonowanie śródbłonnka naczyń krwionośnych

Śródbłonek naczyń krwionośnych pełni funkcję naczynioprotekcyjną, wytwarzając oraz metabolizując różne przekaźniki uwalniane w odpowiedzi na bodźce mechaniczne i chemiczne [10]. Śródbłonek odgrywa zatem istotną rolę w utrzymaniu stanu fizjologicznego. Uwalniane bowiem substancje pełnią funkcję przeciwzapalną i zapobiegają agregacji trombocytów oraz adhezji leukocytów, zaś tlenek azotu (NO) zapobiega obkurczeniu mięśni gładkich naczyń krwionośnych, przez co wzrasta szybkość przepływu krwi przez naczynie [11]. Gdy wytwarzanie NO jest ograniczone, śródbłonek wydziela inną substancję, tzw. śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (*endothelium derived hyperpolarizing factor*, EDHF) który odgrywa rolę kompensacyjną [10].

Z drugiej strony śródbłonek naczyń może uwalniać peroksydanty sprzyjające proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych i w ten sposób dać początek bądź wzmacniać rozwój blaszki miażdżycowej. Zachowanie zatem korzystnego

bilansu pomiędzy czynnikami prozapalnymi a przeciwzapalnymi jest istotne w utrzymaniu fizjologicznego stanu układu sercowo-naczyniowego [10].

Długo utrzymująca się dysfunkcja śródbłonna naczyń krwionośnych prowadzi do utworzenia bezpośredniego kontaktu między komórkami śródbłonka a komórkami mięśni gładkich budujących naczynia. Taki rodzaj połączenia zapewniają mostki mięśniowo-śródbłonkowe (*myoendothelial bridge*), które wpływają na: wzrost, migrację, różnicowanie i czynność komórek, a także biorą udział w regulacji parakrynej ściany naczynia [10]. Simwastatyna zmniejsza stopień adhezji komórek, wpływając na ekspresję genów kodujących adhezyjne białko komórek naczyń krwionośnych 1 (*vascular cell adhesion protein-1*, VCAM-1), międzykomórkową adhezyjną molekułę 1 (*inter cellular adhesion molecule-1*, I-CAM-1) oraz integrynę $\alpha 4\beta 1$ [12]. Ponadto, obniżając stężenie geranylogeranylu, simwastatyna dezaktywuje białko Rho, czym ogranicza adhezję molekuł do śródbłonka naczyń krwionośnych [4, 5].

Simwastatyna normalizuje również odpowiedź śródbłonka naczyń krwionośnych na acetylocholinę oraz oubainę (inhibitor $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPazy}$). Działanie to wytłumaczono uczestnictwem simwastatyny w szlaku sygnalizacji jonów wapnia. Simwastatyna, poprzez zablokowanie prenylacji białka G, blokuje kanały wapniowe, hamuje napływ jonów wapnia do środka komórki, co doprowadza do relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Badacze twierdzą, że przewlekłe przyjmowanie simwastatyny, a także podanie jej w stanach nagłych, rozkurcza mięśnie śródbłonka naczyń krwionośnych aorty oraz małych aort krezki [13].

Przeciwzapalne działanie simwastatyny

Simwastatyna zmniejsza wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak: interleukina 6, interleukina 1 β , TNF- α (*tumor necrosis factor* – czynnik martwicy nowotworów), czynnik NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) oraz hamuje reakcję ostrej fazy wywołanej przez białko C-reaktywne. Warto w tym miejscu nadmienić, że statyny hydrofilowe, takie jak prawastatyna, nie wykazują takiego działania [14–16].

Na szczęście dysfunkcja śródbłonka jest odwracalna. Poprawa czynności śródbłonka przynosi wiele korzyści terapeutycznych, takich jak: stabilizacja blaszek miażdżycowych, zwiększenie perfuzji mięśnia sercowego, skrócenie przemijającego niedokrwienia serca [10, 17].

Aktywność simwastatyny chroni naczynia krwionośne przed stanem zapalnym, pomagając utrzymać równowagę pomiędzy przekaźnikami

wydzielanymi przez śródbłonek, przez co zapobiega rozwojowi oraz odwraca patologiczne zmiany w sercu i naczyniach krwionośnych [18].

Immunomodulujące działanie simwastatyny

Donoszono także o korzyściach w stosowaniu simwastatyny u osób po przeszczepie serca. Badacze twierdzą, że simwastatyna zmniejsza aktywność cytokin w sercu, poprawia funkcje śródbłonka, ogranicza proliferację limfocytów T i zmniejsza ekspresję MHC klasy II poprzez hamowanie ekspresji INF- γ w zależności od zastosowanej dawki, co przyczyniło się do zmniejszenia ilości odrzuconych przeszczepów [19].

Zakończenie

Kliniczne efekty leczenia simwastatyną zaczynają nabierać nowego wymiaru. Do tej pory zalecana w celu obniżenia poziomu cholesterolu we krwi stanowiła jeden z najczęściej stosowanych leków w kardiologii. Obecnie wiadomo, że przeciwzapalne działanie simwastatyny wpływa korzystnie na funkcjonowanie śródbłonka naczyń krwionośnych. Ponadto w związku z poznaniem mechanizmów komórkowych zachodzących podczas terapii, zwrócono uwagę, iż simwastatyna aktywuje procesy związane z kościotworzeniem. Rozwijający się stan wiedzy nad simwastatyną może przyczynić się do rozszerzenia jej wskazań klinicznych, zaś na polu farmaceutycznym zaowocować rozwojem technologii nowych postaci leków zawierających simwastatynę. W wielu przytoczonych eksperymentach naukowcy podejmowali próbę otrzymania simwastatyny w formie leku parenteralnego. Taka praktyka budzi nadzieje osób, u których długoterminowe przyjmowanie simwastatyny w postaci tabletek doustnych wywołuje rabdomiolizę, jednakże dopiero długoterminowe badania mogą dostarczyć informacji o wyższości stosowania simwastatyny miejscowo lub domięśniowo nad obecnie stosowanymi tabletkami doustnymi [20].

Otrzymano: 2013.11.20 · Zaakceptowano: 2014.01.27

Piśmiennictwo

1. Janiec W.: Kompendium Farmakologii: Janiec W., Folwarczna J., Kaczmarczyk-Sedlak I. Leki wpływające na układ kostny. Leki wpływające na przemianę materii. Wyd.2. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2006, 350: 372.
2. Lee T.-J., Holtz W.J., Smith R.L., Alberts A.W., Gilfillant J.L.: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A Reductase Inhibitors. 8. Side Chain Ether Analogues of Lovastatin; J. Med. Chem. 1991, 34: 2474–2477.
3. Crespo J., Martinez-Gonzalez J., Rius J., Badimon L.: Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. Cardiovascular Research 2005, 67: 333–341.

4. Liu S., Bertl K., Sun H., Liu ZH., Andrukhov O., Rausch-Fan X: Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells. *Hum Cell.* 2012; 3.
5. Wu C., Liu C., Zang G., Sun H.: The effect of simvastatin on remodeling of alveolar bone following tooth extraction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 2008, 37: 170-176.
6. Ju Hyeong Jeon, Mark V. Thomas, David A. Puleo: Bioerodible devices for intermittent release of simvastatin acid; *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 340: 6-12.
7. Feldman R.: Osteoporoz. <http://www.resmedica.pl/kosci/osteoporoz> (stan z 29.09.2012).
8. Chunli S., Jingying W., Quansheng S., Xu L., Zhongqiang Ch., Qingjun M., Zhongjun L., Hongti J., Gengting D.: Simvastatin induces estrogen receptor- α in murine bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Metab.* 2008, 26: 213-217.
9. Pauly S., Luttsch F., Morawski M., Haas NP., Schmidmaier G., Wildemann B.: Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone* 2009, 45: 505-11.
10. Demenico G., Della Rocca MD., Pepine MD.: Czynność śródblonki i niepomyślne rokowanie chorób układu krążenia. *Kardiologia po Dyplomie.* 2011, 10: 14-26.
11. Curcio A., Torella D., Indolfi C.: Mechanisms of Smooth Muscle Cell Proliferation and Endothelial Regeneration After Vascular Injury and Stenting; *Circulation.* J. 2011, 75: 1287-1296.
12. Wagner B.J., Loeb S., Lindau D., Hoerzer H., Gueckel B., Klein G., Glatzle J., Rammensee H.G., Bruecher B.L., Koenigsrainer A.: Simvastatin reduces tumor cell adhesion to human peritoneal mesothelial cells by decreased expression of VCAM-1 and β 1 integrin. *Int J Oncol.* 2011, 18.
13. A'lvarez de Sotomayor M., Perrez-Guerrero C., Herrera M.D.: Effect of simvastatin on vascular smooth muscle responsiveness involvement of Ca2q homeostasis; *Eur. J. Pharm.* 2001, 415: 217-224.
14. Fraunberger P., Groene E., Groene HJ., Walli AK.: Simvastatin reduces endotoxin-induced NF- κ B activation and mortality in guinea pigs despite lowering circulating LDL cholesterol. *Shock.* 2008, 11.
15. Bao N., Ushikoshi H., Kobayashi H., Yasuda S., Kawamura I., Iwasa M., Yamaki T., Sumi S., Nagashima K., Aoyama T., Kawasaki M., Nishigaki K., Takemura G., Minatoguchi S.: Simvastatin reduces myocardial infarct size via increased nitric oxide production in normocholesterolemic rabbits. *J Cardiol.* 2009, 53: 102-7.
16. Yamasaki D., Nakamura T., Okamura N., Kokudai M., Inui N., Takeuchi K., Watanabe H., Hirai M., Okumura K., Sakaedf T.: Effects of acid and lactone forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the induction of MDR1 expression and function in LS180 cells; *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 37: 126-132
17. Heeba GH., Hassan MK., Amin RS.: Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Eur J Pharmacol.* 2009, 12.
18. Desai F., Ramanathan M., Fink CS., Wilding GE., Weinstock-Guttman B., Awad AB.: Comparison of the immunomodulatory effect of the plant sterol of the beta-sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *Int. Immunopharmacol.* 2009, 9: 153-157.
19. Kwak B., Mulhaupt F., Veillard N., Pelli G., Mach F.: The HMG-Co reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN- γ induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss Med WKLY.* 2001, 131: 41-46.
20. Pharmindex. *Kompendium leków 2006.* Wydawnictwo MediMedia International, Warszawa.

Klauzula sumienia w zawodzie farmaceuty

Malwina Gryka, Anna Piecuch, Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska

Zakład Farmacji Klinicznej i Opieki Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Anna Piecuch, Zakład Farmacji Klinicznej i Opieki Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: anna.piecuch@wum.edu.pl

Conscience clause in pharmacy profession · The right to conscientious objection, also called the conscience clause, is a proposition of a legal solution regarding situations when valid legal norms are in conflict with personal or religious beliefs that guarantees the right to refuse to fulfil a duty if such a conflict occurs. In Poland, this right refers to physicians, nurses and obstetric nurses, but it is also a subject of some pharmacists' claims. The necessity for ensuring this legal solution is indicated in the European Council Resolution 1763 (2010). The present paper is a review of selected ethical and legal aspects related to the conscience clause in the pharmacy profession. Also discussed are the most controversial medicinal products that may arouse a pharmacist's conscientious objection.

Keywords: conscience clause, conscientious objection, pharmacist, ethics.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 316–320

Wprowadzenie

W Polsce leki na receptę wydawane są wyłącznie w aptekach i punktach aptecznych [1]. Ponieważ dostęp do produktów leczniczych wydawanych z przepisu lekarza jest ograniczony, dlatego obowiązujące w Polsce akty prawne (Ustawa Prawo farmaceutyczne oraz Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 października 2002 r. w sprawie wydawania z apteki produktów leczniczych i wyrobów medycznych) ściśle definiują, kiedy farmaceuta ma prawo, a nawet obowiązek, odmowy wydania produktu leczniczego z apteki, jednak nie przewidują one sytuacji, gdy wydanie leku byłoby sprzeczne z etyką, moralnością bądź wiarą farmaceuty realizującego receptę, a tym samym niezgodne z jego sumieniem.

Art. 96 Ustawy Prawo farmaceutyczne daje aptekarzowi prawo odmowy wydania leku, jeśli jego wydanie może stanowić zagrożenie dla życia bądź zdrowia danego pacjenta. Kontrowersje wzbudzać tutaj może decyzja farmaceuty, który sam,

opierając się na własnej wiedzy, jest zobowiązany do rozstrzygnięcia, czy dany produkt może stanowić zagrożenie dla życia lub zdrowia pacjenta i jeśli farmaceuta ma takie podejrzenia, odmówić jego wydania. Czynnikiem utrudniającym farmaceutę zidentyfikowanie lub zweryfikowanie sytuacji, w których przepisana terapia może potencjalnie zagrażać życiu lub zdrowiu pacjenta, jest brak dostępu do informacji medycznych o pacjencie, takich jak: historia choroby, wskazania w jakich preparat został przepisany, informacje o innych stosowanych preparatach czy stanach, które mogą stanowić przeciwwskazania do stosowania danego produktu. Artykuł ten bywa wykorzystywany przez farmaceutów, którzy nie chcą wydawać antykoncepcji hormonalnej, szczególnie postkoitalnej, argumentując odmowę wydania produktu potencjalnym działaniem przeciwwznieźdzeniowym, które prowadzi do śmierci zarodka [2]. Należy jednak podkreślić, że zgodnie z art. 95 ust. 1 Ustawy Prawo farmaceutyczne, apteki ogólnodostępne „są zobowiązane do posiadania produktów leczniczych i wyrobów medycznych w ilości i asortymencie niezbędnym do zaspokojenia potrzeb zdrowotnych miejscowej ludności”. Apteka powinna zatem posiadać na stanie wszystkie produkty lecznicze, nawet jeśli ich wydawanie budzi sprzeciw sumienia farmaceuty. W przypadku braku określonego produktu w aptece farmaceuta ma obowiązek umożliwić nabycie preparatu w terminie ustalonym wspólnie z pacjentem [1].

W innym wypadku, powołując się na klauzulę sumienia, farmaceuta miałby prawo odmówić pacjentowi wydania produktu, który mu legalnie przysługuje i który może nabyć wyłącznie w aptece. W tym kontekście rodzą się wątpliwości, czy prawo aptekarza do sprzeciwu sumienia powinno być nadrzędne w stosunku do prawa pacjenta do swobodnego dostępu do legalnie przysługującego mu preparatu.

Klauzula sumienia

Sumienie rozumiane jest jako zdolność do moralnej oceny czynów, a w szczególności własnego postępowania. Sumienie pełni rolę wewnętrznego nakazu, jednakże jego decyzja nie jest wolna od obowiązujących reguł moralnych [3]. We współczesnym świecie rozdzźwięk między normami prawnymi a sumieniem jest często przyczyną rodzącego się wewnętrznego konfliktu, który może zostać rozwiązany „poprzez zastosowanie prawa do sprzeciwu sumienia lub poprzez pogwałcenie norm moralnych” [4]. Klauzula sumienia, inaczej prawo do sprzeciwu sumienia, pozwala pogodzić „prawną propozycję rozwiązania sytuacji, w której dochodzi do kolizji norm prawa stanowionego z normami światopoglądowymi lub religijnymi” [5] i polega na zagwarantowaniu możliwości odmowy wykonania obowiązku, z powołaniem się na przekonania religijne lub moralne. Dawniej klauzula sumienia wykorzystywana była przy odmowie wykonania służby wojskowej, dziś termin ten dotyczy głównie medycyny [6].

Klauzula sumienia stosowana jest w różnych krajach świata wobec: procederów aborcji, antykoncepcji (zwłaszcza postkoitalnej), sterylizacji, zapłodnienia pozaustrojowego, macierzyństwa zastępczego, produkcji embrionów, eutanazji i samobójstwa wspomagane [6]. W Polsce debata dotycząca sprzeciwu sumienia w zawodzie farmaceuty dotyczy przede wszystkim wydawania z aptek doustnej antykoncepcji hormonalnej, wkładek domacicznych oraz antykoncepcji postkoitalnej [2]. Każdy z wymienionych produktów wymaga recepty lekarskiej. Częstym argumentem w toczącej się dyskusji jest prawo do „wolności sumienia”, zapisane w art. 53 Konstytucji Rzeczypospolitej Polskiej, zapewniającym każdemu obywatelowi, w tym również aptekarzowi, swobodę sumienia [7]. Znaczącym punktem w dyskusji o klauzuli sumienia dla farmaceutów okazała się Uchwała Rady Europy w sprawie sprzeciwu sumienia w legalnej opiece medycznej, uchwalona w październiku 2010 r., której celem było sformułowanie zaleceń wytyczających kierunek koniecznych uregulowań obowiązującego w krajach Unii Europejskiej prawa, dotyczącego sprzeciwu sumienia w zawodach medycznych [8]. Klauzula sumienia powinna wynikać z prawodawstwa ustanowionego w danym kraju, a zatem wprowadzenie klauzuli sumienia dla farmaceutów wymaga implementacji postanowień Uchwały Rady Europy w polskim prawie. Kontrowersje związane z brakiem wprowadzenia zapisu prawnego dotyczącego klauzuli sumienia wśród farmaceutów pogłębia fakt, że istnieją akty prawne gwarantujące możliwość wykorzystania sprzeciwu sumienia w innych zawodach medycznych. Lekarze

w Polsce sprzeciw sumienia mają zagwarantowany przez Ustawę o zawodzie lekarza i lekarza dentystry z dnia 5 grudnia 1996 roku (Dz.U. 1997 nr 28 poz. 152) [9], natomiast pielęgniarki oraz położne mogą powołać się na art. 12 Ustawy o zawodach pielęgniarki i położnej z dnia 15 lipca 2011 roku (Dz.U. 2011 nr 174 poz. 1039) [10]. Prawa do sprzeciwu sumienia domagają się także farmaceuci [5].

Uchwała Rady Europy – Prawo do sprzeciwu sumienia w ramach legalnej opieki medycznej

Uchwała Rady Europy nr 1763 – „Prawo do powoływania się na klauzulę sumienia w służbie zdrowia” wytycza normy dostępu do sprzeciwu sumienia w zawodach medycznych. Uchwała ta została zatwierdzona przez Zgromadzenie Parlamentarne Unii Europejskiej 7 października 2010 r. Dokument został przegłosowany nieznaczną różnicą głosów – 56 obradujących wyraziło swoją aprobatę, natomiast 51 osób było przeciwnych [11]. Nadrzędnym celem uchwały jest ukierunkowywanie państw członkowskich Unii na ochronę życia ludzkiego, w każdym jego aspekcie, zarówno publicznym, jak i prywatnym. Należy podkreślić, iż uchwały Zgromadzenia Parlamentarnego Unii Europejskiej, które jest organem doradczym Rady Europy, nie są w żaden sposób wiążące [12].

Wspomniana uchwała nawołuje do poszanowania prawa do wolności sumienia osób, które nie chcą uczestniczyć w procedurze przerywania ciąży, eutanazji czy przyczynić się do działań, które mogą doprowadzić do śmierci embriona lub płodu ludzkiego. W myśl uchwały, osoby które odmówią udziału w tych procedurach, nie mogą być naciskane, dyskryminowane lub pociągane do odpowiedzialności za swoją decyzję. Jednocześnie Zgromadzenie Parlamentarne Rady Europy podkreśla konieczność zagwarantowania prawa do klauzuli sumienia w lokalnym prawodawstwie w taki sposób, aby zagwarantować każdemu pacjentowi dostęp do leczenia [8].

Sprzeciw sumienia farmaceutów

W Polsce dyskusja na temat sprzeciwu sumienia dla farmaceutów sprowadza się przede wszystkim do wydawania przez aptekarzy szeroko pojętych preparatów antykoncepcyjnych, w tym antykoncepcji postkoitalnej, uniemożliwiającej zagnieżdzenie się blastocysty w ścianie macicy. Poza granicami Polski wymieniane są również produkty wczesnoporonne (np. mizoprostol), preparaty wyprodukowane z linii komórkowych pochodzących z aborowanych płodów ludzkich oraz preparaty stosowane do przeprowadzenia eutanazji.

Rozpatrując sprzeciw sumienia w zawodzie farmaceuty, należy zwrócić uwagę na liczne aspekty i pytania, które pojawiają się podczas dyskusji odnoszących się do tematu. Pierwszym najczęściej komentowanym, ale również kwestionowanym jest aspekt prawny. Farmaceuta w Polsce nie ma możliwości odmowy realizacji recepty na produkt leczniczy, którego stosowanie w jego opinii jest sprzeczne z moralnością, etyką czy wyznawaną religią. Uchwała Rady Europy nr 1763 nie ma mocy wiążącej, dopóki nie zostanie implementowana do polskiego prawa. Kodeks Etyki Aptekarza RP jest typowym kodeksem korporacyjnym, który również nie ma mocy prawnej, więc mimo istniejących w nim zapisów gwarantujących wolność działania w zgodzie z sumieniem, farmaceuta nie ma praktycznej możliwości odmowy wydania produktu leczniczego, który budzi sprzeciw jego sumienia [4]. Brakuje zatem zapisu prawnego, który jednoznacznie regulowałby kwestię sprzeciwu sumienia w zawodzie farmaceuty.

W sprawie Pichon i Sajous przeciwko Francji Europejski Trybunał Praw Człowieka w Strasburgu odrzucił skargę francuskich farmaceutów skazanych wcześniej za odmowę realizacji recepty na produkty antykoncepcyjne, uznając ich skargę za bezpodstawną [13]. Aptekarze – Bruno Pichon i Marie-Liine Sajous – w pozwie przeciwko Francji twierdzili, że ich „wolność do manifestowania swojej religii została naruszona w wyniku ich skazania przez francuskie władze za odmowę wydania doustnych preparatów antykoncepcyjnych trzem kobietom” [13]. Trybunał odrzucił pozew, argumentując, że odmowa przez farmaceutę sprzedaży preparatu antykoncepcyjnego, będącego produktem dostępnym jedynie w aptece, nie ma podstaw prawnych. Jednocześnie Trybunał podkreślił, że aptekarze nie mogą dawać pierwszeństwa swoim przekonaniom nad obowiązkami wynikającymi ze specyfiki zawodu, jeśli sprzedaż antykoncepcji w aptekach jest legalna i realizacja recepty na te preparaty możliwa jest wyłącznie w aptece [14].

Zgodnie z Konwencją o Ochronie Praw Człowieka i Podstawowych Wolności „na płaszczyźnie publicznej ochronie podlegają tylko przejawy praktyki w *ogólnie uznanej formie*, np. przestrzeganie zasad dotyczących ubioru, diety, modlitw; ograniczenie takie nie występuje na płaszczyźnie prywatnej. Odmowę sprzedaży produktów antykoncepcyjnych trudno uznać za przejaw praktyki religijnej w *ogólnie uznanej formie*” [15,16]. Konwencja o Ochronie Praw Człowieka gwarantuje wolność sumienia jednostki, nie uzasadnia jednak prawa do wykorzystania „sprzeciwu sumienia” w zawodzie farmaceuty.

W dyskusji odnośnie do sprzeciwu sumienia prawa i obowiązki farmaceuty przeplatają się z prawami pacjenta. Zdrowie i dobro chorego, które są

najważniejszym celem wszystkich osób wykonujących zawody medyczne, według niektórych stawiane są na szali z poglądami aptekarza dotyczącymi moralności czy religii [17]. Znaczenie ma tutaj zarówno autonomia pacjenta, ale również autonomia farmaceuty odpowiedzialnego za realizację recept lekarskich. Zdaniem Biesagi „to nie autonomia, ale osoba jest wartością absolutną. Godności osoby nie należy redukować do jej wolności. Z wolności bowiem płyną godne i niegodne zachowania ludzkie. Kryterium dobra jest godność, a nie wolność. To poprzez szacunek do osoby szanujemy jej autonomię” [18].

Przegląd preparatów, które mogą budzić sprzeciw sumienia farmaceuty

W Polsce potrzeba wprowadzenia klauzuli sumienia dotyczy głównie preparatów antykoncepcyjnych i możliwości odmowy ich wydania przez farmaceutów, którzy używanie takich środków mogą uważać za nieetyczne, niezgodne z normami religijnymi lub zasadami moralnymi [2]. Przywoływane są również szczepionki, które powstały na bazie linii komórkowych abortowanych płodów ludzkich.

Dwuskładnikowa antykoncepcja hormonalna może powodować zmiany w budowie endometrium i zanik budowy błony śluzowej macicy, a przez to zmniejszać możliwość implantacji zarodka [19, 20]. Według Ueno zmiana grubości macicy o 1 mm skutkuje zmniejszoną możliwością implantacji zarodka [21]. Jeden z mechanizmów działania tabletek jednoskładnikowych również powoduje zmiany w budowie endometrium, które zapobiegają zagnieżdżeniu blastocysty [22].

Szczególnym przypadkiem antykoncepcji jednoskładnikowej jest antykoncepcja postkoitalna zawierająca wysokie dawki lewonorgestrelu [23,24]. Mimo że mechanizm działania antykoncepcji postkoitalnej nie został w pełni poznany, istnieją naukowe dowody potwierdzające wpływ lewonorgestrelu na różne etapy procesu zapłodnienia, rozpoczynając od oddziaływania na dojrzewające pęcherzyki Grafa, aż do zagnieżdżenia zarodka [30]. Antykoncepcja postkoitalna może powodować zahamowanie transportu i rozwoju komórki jajowej, jak również implantacji i funkcji ciała żółtego [25]. Dla farmaceutów przyjmujących medyczny i biologiczny fakt, że życie ludzkie zaczyna się w momencie połączenia komórki jajowej z plemnikiem, istotne znaczenie ma wyjaśnienie dokładnego mechanizmu działania lewonorgestrelu, a w szczególności jego wpływu na ciążę już po procesie zapłodnienia [26,27]. Jak dotąd, brak jednak dowodów naukowych potwierdzających wpływ antykoncepcji warunkowej na zakłócanie rozwoju i implantacji zarodka, a co za tym

idzie ciąży, mimo prawdopodobieństwa wpływu lewonorgestrelu na endometrium, poprzez zmniejszenie wrażliwości ściany macicy na zagnieżdżenie zapłodnionej komórki jajowej [29, 30, 28].

Światowa Organizacja Zdrowia przyjmuje definicję, zgodnie z którą poronienie może nastąpić dopiero po procesie zagnieżdżenia [29]. Przyjmując ten pogląd, nie można wskazywać na działanie wczesnoporonne antykoncepcji hormonalnej, która działa przed implantacją w ścianie macicy [30, 31].

Jeden z mechanizmów działania wewnątrzmacicznej wkładki z lewonorgestrellem może powodować atrofię endometrium [32]. Wkładka z jonami miedzi powoduje również powstanie reakcji zapalnej w obrębie endometrium, uniemożliwiającej zagnieżdżenie zapłodnionej komórki jajowej [33].

Antykoncepcja hormonalna jako produkt leczniczy

Według farmaceutów postulujących wprowadzenie do polskiego ustawodawstwa zapisu gwarantującego prawo do klauzuli sumienia, antykoncepcja hormonalna nie spełnia ustawowej definicji produktu leczniczego. W myśl art. 2 pkt 32 Ustawy Prawo farmaceutyczne – produktem leczniczym jest „substancja lub mieszanina substancji, przedstawiana jako posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne”.

Jednakże antykoncepcyjne produkty hormonalne, poza antykoncepcją postkoitalną, mogą być stosowane również w celu leczniczym (choć często poza wskazaniami zatwierdzonymi w obowiązujących charakterystykach produktów leczniczych), wpisując się tym samym w definicję produktu leczniczego zapisaną w ustawie. Dwuskładnikowa antykoncepcja hormonalna może być stosowana m.in. w celu zmniejszenia krwawień z macicy, spowodowanych mięśniakami, w przypadku obfitych krwawień miesięcznych z towarzyszącym silnym bólem, pomimo braku dowodów klinicznych stosowana jest również przy bolesnym miesiączkowaniu powodowanym przez endometriozę [34–37]. Preparaty estrogenowo-progestagenowe są stosowane w leczeniu trądziku i innych chorób androgenozależnych, z zapewnieniem ochrony antykoncepcyjnej [38, 39]. Antykoncepcja hormonalna jest również najczęściej przepisywaną formą farmakoterapii w przypadku dolegliwości związanych z zespołem napięcia przedmiesiączkowego [40].

Domaciczna wkładka antykoncepcyjna z lewonorgestrellem może hamować i odwracać rozrost

blony śluzowej macicy, w tym również rozrost atypowy oraz rozrost endometrium spowodowany stosowaniem tamoksyfenu w terapii nowotworu piersi [41].

Szczepionki na bazie linii komórkowych abortowanych płodów ludzkich

W kontekście klauzuli sumienia dla farmaceutów na szczególną uwagę zasługują szczepienia powstałe na bazie linii komórkowych abortowanych płodów ludzkich. Fibroblasty pochodzące z tkanki płucnej dwóch abortowanych płodów ludzkich stały się początkiem szczepów komórkowych, które stanowią bazę w produkcji niektórych szczepionek na różyczkę, ospę wietrzną, wirusowe zapalenie wątroby typu A, polio oraz na wściekliznę, a także szczepionek skojarzonych przeciwko śwince i różyczce oraz odrze i różyczce [42]. Aborcje przeprowadzone były w amerykańskim ośrodku the Wistar Institute w 1961 r. oraz przez brytyjski Medical Research Council w 1966 r. i nie wymagają kontynuacji aborcji do utrzymania szczepów komórkowych [42]. Najczęściej wykorzystywany przy produkcji szczepionek szczep (RA27/3) powstał w 1965 r. i został wyizolowany od zainfekowanego różyczką abortowanego płodu ludzkiego. Szczep ten cechuje się niezmienną immunogennością, niskim wskaźnikiem działań niepożądanych oraz wysoką skutecznością [42].

W odniesieniu do szczepionek należy wspomnieć o stosunku Świadców Jehowy do wszelkich szczepień, którzy, w przeciwieństwie do katolików, do lat 50. XX w. całkowicie odrzucali możliwość zaszczepienia, traktując taki zabieg jako niezgodny z prawami Jehowy [43]. Obecnie rozstrzygnięcie w sprawie szczepienia podejmowane jest indywidualnie przez poszczególnych wyznawców i nie jest w żaden sposób normowane [44].

Podsumowanie

Zawód farmaceuty, który jednocześnie jest zawodem medycznym i zawodem zaufania publicznego, znajduje się obecnie w czasie niełatwej transformacji, której ostatecznym celem jest zwiększenie znaczącej roli aptekarza w opiece nad pacjentem. Jest to trudne we współczesnym świecie, gdyż aptekarz przez wielu postrzegany jest jedynie jako sprzedawca leków, osoba która nie pełni żadnego istotnego zadania w systemie ochrony zdrowia. Farmaceuta z jednej strony zobowiązany jest do przestrzegania prawa obowiązującego w zawodzie, z drugiej zaś kodeksy etyczne wskazują na rolę sumienia i priorytetową etykę zawodu. Część pracowników aptek stoi codziennie przed dylematem, jak postępować – czy tak, aby usatysfakcjonować

pacjenta, czy też działać zgodnie ze swoim sumieniem. Nie zawsze interes pacjenta jest zbieżny z przekonaniem moralnym farmaceuty, a wprowadzając zmiany prawne, należy pamiętać, że prawo powinno chronić zarówno przekonania farmaceutów, jak również prawa pacjentów. Jednak należy podkreślić, że dyskusja na temat sprzeciwu sumienia farmaceutów ma nie tylko wymiar praktyczny, ale również filozoficzny – stawiając pytanie, czy farmaceuta jest zawodem sumienia, którego rola wykracza poza bierne zaopatrywanie ludności w leki.

Otrzymano: 2012.10.15 · Zaakceptowano: 2013.03.23

Piśmiennictwo

- Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz.U. nr 126, poz. 1381 z późn. zm.: 2002 r. nr 113, poz. 984, nr 141, poz. 1181 i nr 152, poz. 1265).
- Dziekoński J.: Sumienie w aptece, *Magazyn aptekarski* 2011, 5(94): 14–17.
- Petrozolin-Skowrońska B.: Nowa encyklopedia powszechna PWN, Warszawa, 1997, Tom 6: 115.
- Prusak M.: Sprzeciw sumienia farmaceutów, *Teologia i Moralność* 2009, 6.
- Białkowska M.: Sumienie czyste, używane, *Przewodnik Katolicki* 2011, 13.
- Pawlikowski J.: Prawo do wyrażania sprzeciwu sumienia przez personel medyczny – problemy etyczne-prawne, Wydaw. Instytut Problemów Ochrony Zdrowia, Warszawa 2009, 3.
- Biesaga T.: Klauzula sumienia w etyce medycznej, *Medycyna Praktyczna* 2008, 12: 132.
- Uchwała Rady Europy nr 1763 w sprawie klauzuli sumienia (prawo do powoływania się na klauzulę sumienia w służbie zdrowia), Dostępna w Internecie: <http://assembly.coe.int/main.asp?Link=/documents/adoptedtext/ta10/eres1763.htm> [22.04.2012].
- Art. 39 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodzie lekarza, (Dz.U. 1997 nr 28 poz. 152).
- Art. 12 ust. 2 Ustawy z dnia 15 lipca 2011 r. o zawodach pielęgniarzy i położnej, (Dz.U. 2011 nr 174 poz. 1039).
- Campbell M.: Conscientious objection and the Council of Europe, *Medical Law Review*, 2011, 19: 467–475.
- Sadowska S.: Znaczenie rezolucji Rady Europy nr 1763 w sprawie klauzuli sumienia w prawie polskim i międzynarodowym, *Życie i płodność* 2010: 7–11.
- Lamačková A.: Conscientious objection in reproductive health care: Analysis of *Pichon and Sajous v. France*, *European Journal of Health Law*, 2008, 15: 7–43.
- Orzeczenie Europejskiego Trybunału Praw Człowieka w sprawie *Pichon i Sajous przeciwko Francji*, 2001, nr 49853/99. <http://strasbourgeoisconsortium.org/document.php?DocumentID=4942> [23.04.2012].
- Konwencja o Ochronie Praw Człowieka i Podstawowych Wolności sporządzona w Rzymie dnia 4 listopada 1950 r., zmieniona następnie Protokołami nr 3, 5 i 8 oraz uzupełniona Protokołem nr 2 (Dz.U. 1993 nr 61 poz. 284).
- Wasiński M.: Wolność myśli, sumienia i wyznania na gruncie EKPCZ, *Historyczno-teoretyczne podstawy praw człowieka (konwersatorium 2011/2012)*, Część 9.
- Stanowisko Federacji na rzecz Kobiet i Planowania Rodziny w sprawie postulatów umożliwienia farmaceutom odmowy sprzedaży niektórych produktów leczniczych, Dostępne w Internecie: www.federara.org.pl [23.04.2012].
- Biesaga T.: Autonomia lekarza i pacjenta a cel medycyny, *Medycyna Praktyczna* 2005, 6: 20–24.
- Glazier A.: Combined hormonal contraception, *Women's Health Medicine* 2006, 36: 257–261.
- Webberley H., Mann M.: Oral contraception – updated, *Current Obstetrics & Gynaecology* 2006, 16: 21–29.
- Ueno J.: Ultrasonographic appearance of the endometrium in natural stimulated in vitro fertilization cycles in correlation with outcome, *Human Reproduction* 1991, 6: 901–904.
- Kubba A., Guillebaud J. et al.: Contraception, *The Lancet*, Vol. 356, 2000: 1913–1919.
- Novikova N., Weisberg E. et al.: Effectiveness of levonorgestrel emergency contraception given before or after ovulation – a pilot study, *Contraception* 2007, 75: 112–118.
- Gemzell-Danielsson K.: Mechanism of action of emergency contraception, *Contraception* 2010, 82: 404–409.
- Baird D.T.: Emergency contraception: how does it work?, op. cit., p. 32–36.
- Fenton E., Lomasky L.: Dispensing with liberty: conscientious refusal and the “morning-after pill”, *Journal of Medicine and Philosophy* 2005, 30: 579–592.
- Strong C.: Conscientious objection the morning after, *The American Journal of Bioethics* 2007, 7: 32–34.
- Durand M., Cravioto M.C. et al.: On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception, *Contraception* 2001, 64: 227–234.
- Croxatto H.B., Ortiz M.E. et al.: Mechanisms of action of emergency contraception, *Steroids* 2003, 68: 1095–1098.
- Trussell J., Jordan B.: Mechanism of action of emergency contraceptive pills, *Contraception* 2006, 74: 87–89.
- Baergen R., Owens C.: Revisiting pharmacists' refusals to dispense emergency contraception, *Obstetrics & Gynecology* 2006, 108: 127–1278.
- Stoddard A., McNicholas C. et al.: Efficacy and safety of long-acting reversible contraception, *Drugs* 2011, 71: 969–978.
- Stanford J., Mikolajczyk R.: Mechanisms of action of intrauterine devices: update and estimation of postfertilization effects, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002, 187: 1699–1708.
- Maia H., Pimentel K. et al.: Aromatase expression in the eutopic endometrium of myomatous uteri: The influence of the menstrual cycle and oral contraceptive use, *Gynecological Endocrinology* 2007, 23: 320–324.
- Zahradnik H.P., Hanjalic-Beck A. et al.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea: a review, *Contraception* 2010, 81: 185–196.
- King J.: Noncontraceptive uses of hormonal contraception, *Journal of Midwifery & Women's Health* 2011, 56: 628–635.
- Harada T., Momoeda M. et al.: Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial, *Fertility and Sterility* 2008, 90: 1583–1588.
- Collier C. N., Harper J. C. et al.: The prevalence of acne in adults 20 years and older, *Journal of American Academy of Dermatology* 2008, 58: 56–59.
- Arowojolu A. O., Gallo M. F. et al.: Combined oral contraceptive pills for treatment of acne, *The Cochrane Library* 2009, 3: 1–39.
- Freeman E.W.: Therapeutic management of premenstrual syndrome, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010, 11: 2879–2889.
- Wildermeersch D., Dhont M.: Treatment of nonatypical and atypical endometrial hyperplasia with a levonorgestrel-releasing intrauterine system, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, 188: 1297–1298.
- Zimmerman R.K.: Ethical analyses of vaccines grown in human cell strains derived from abortion: arguments and Internet search, *Vaccine* 2004, 22: 4238–4244.
- Why do Jehovah's witnesses refuse blood transfusions? – Did they also prohibit vaccinations and organ transplants? Dostępny w Internecie: <http://4jehovah.org/help-jw-no-blood.php> [27.05.2012].
- Wójtowicz A.M.: Czy transfuzja krwi i szczepionki są sprzeczne z prawem Bożym? Dostępny w Internecie: <http://www.opoka.org.pl/varia/sekty/blut.html> [31.05.2012].

Leki generyczne we współczesnej farmakoterapii

Tomasz Kamiński, Dariusz Pawlak

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Adres do korespondencji: Dariusz Pawlak, Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, e-mail: dariuszpawlak@poczta.onet.pl

Lek generyczny (lek odtwórczy, generyk) jest to lek dopuszczony do obrotu, który posiada tę samą substancję czynną co lek oryginalny, różni się natomiast może od niego rodzajem i ilością składników pomocniczych, a także niewielkimi zmianami w procesie wytwarzania samej substancji leczniczej. Podczas procedury rejestracyjnej podmiot odpowiedzialny musi wykazać przed właściwym urzędem, że rejestrowany produkt leczniczy będzie posiadał skuteczność, a także bezpieczeństwo leku oryginalnego. Generyki są produktami farmaceutycznymi wytwarzanymi po wygaśnięciu ochrony patentowej leku innowacyjnego, co skutkuje znacznym obniżeniem ich ceny rynkowej, a przez to zwiększeniem ich dostępności dla pacjentów.

Czy leki generyczne są zatem *panaceum* na wszelkie „dolegliwości” farmakoekonomiczne?

Czy coraz szersza obecność leków odtwórczych w naszych aptekach stanowi realne zagrożenie dla przemysłu farmaceutycznego i jego newralgicznej gałęzi – innowacyjności?

Głównym założeniem przyjmowania leków generycznych jest dostarczenie organizmowi danej substancji leczniczej w sposób możliwie tożsamy z lekiem oryginalnym. Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że lek generyczny musi bezwzględnie zawierać tę samą substancję czynną, w takiej samej dawce co lek innowacyjny. Twórca leku generycznego może zmienić postać substancji czynnej, w przypadku gdy ta zwiększa trwałość substancji leczniczej. Klasycznym przykładem jest utworzenie cholorowodorku danej substancji, co zapobiega jej rozkładowi i zwiększa rozpuszczalność. Należy jednak pamiętać, że każda taka zmiana nie może wpływać na działanie preparatu, co musi zostać dowiedzione w odpowiednich badaniach równoważności. Ewentualna różnica dyskwalifikuje możliwość uznania dwóch leków za zamienne i równoważne.

Kolejnymi czynnikami, które nie mogą różnić leku odtwórczego od innowacyjnego jest postać

Generic drugs in current pharmacotherapy · Generics are drugs containing the same active substance at the same dose and form as the innovative medicines, and can be produced after the expiry of patent protection for the original drug. The process of introducing a generic drug on the market is easier and does not require the conduct of clinical trials but only studies proving the identity of the reference drug. This provides an opportunity to a significant reduction in production costs, which results in lower drug prices and increase their availability to patients. Generics market is experiencing a large estimation and its value increases significantly every year. This prompts us to ask questions: What are the advantages and disadvantages associated with the use of generic drugs? What pharmacists should know about them?

Keywords: generic drug, original drug, bioequivalence, generics market.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 321–326

farmaceutyczna, dawkowanie i droga podania. Są to kryteria, w przypadku których jakiegokolwiek zróżnicowanie w sposób fundamentalny przeczą podstawowym założeniom produkcji generyków.

Nie ma innej drogi do stworzenia leku generycznego dla produktu obecnego na rynku, zawierającego przykładowo simwastatynę w postaci tabletek, jak wytworzenie preparatu simwastatyny w identycznej postaci, takiej samej dawce i spełniającej takie same wymagania bezpieczeństwa i czystości. Wysokie standardy produkcji, zgodne z wymaganiami oznakowanie opakowania czy stosowanie się do Dobrej Praktyki Produkcyjnej (*Good Manufacturing Practice*, GMP) w sposób oczywisty tyczą się w takim samym stopniu leków oryginalnych, jak i generycznych [1–3].

Patrząc na powyższe dane, nie trudno dojść do wniosku, że wytworzenie leku generycznego nie jest zadaniem prostym i szybkim. Należy zauważyć, że organizm ludzki, będący kwintesencją uporządkowania i harmonii, w sposób często

nieprzewidywalny reaguje na, wydawłoby się, nieistotne ingerencje i bodźce, co często stawia koncerny farmaceutyczne na przegranej pozycji w walce o wprowadzenie do obrotu kolejnego leku generycznego. Biorąc pod uwagę mnogość technik fizyczno-chemicznych, jakimi dysponują współczesne laboratoria oraz olbrzymie doświadczenie naukowców, należy stwierdzić, że nie jest to zadanie niewykonalne.

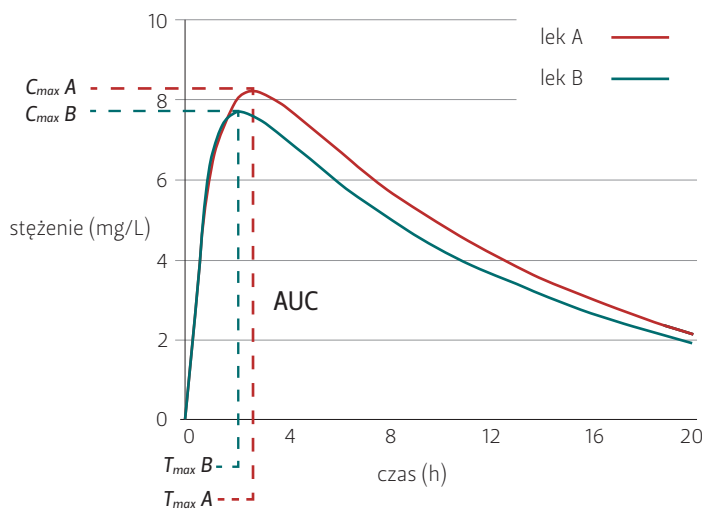
Niezbędnym warunkiem, aby produkt leczniczy został uznany za lek generyczny, jest udokumentowanie biorównoważności tego leku względem leku referencyjnego. Należy zaznaczyć, że z badania biorównoważności zwolnione są leki dobrze rozpuszczalne i dobrze przenikające przez błony biologiczne. W tym przypadku z pomocą przychodzi System Klasyfikacji Biofarmaceutycznej (*Biopharmaceutics Classification System, BPS*), który dzieli substancje na cztery grupy ze względu na ich przenikanie przez błony biologiczne i rozpuszczalność [4]. Według najnowszych badań aż 41,8% dopuszczonych leków generycznych w Stanach Zjednoczonych w latach 2000–2011 należało do grupy I – substancji dobrze rozpuszczalnych i dobrze przenikających przez błony. W grupie II zawierającej substancje lecznicze słabo rozpuszczalne, ale dobrze przenikające, znalazło się jedynie 20,9% ogólnie dopuszczonych generyków. Leki zawierające substancję czynną dobrze rozpuszczalną, ale o słabej przenikalności, tworzące grupę III, stanowiły 37,3% leków dopuszczonych do obrotu. Grupa IV nie zawiera ani jednego dopuszczonego preparatu leczniczego [5]. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration, FDA*) definiuje substancję o dobrej przenikalności – jako substancję ulegającą wchłonięciu w minimum 90%, a substancję dobrze rozpuszczalną – jako substancję, która w warunkach

in vitro odpowiadających pod względem pH i temperatury organizmowi rozpuści się w danej objętości płynu.

BCS nie uwzględnia form o modyfikowanym uwalnianiu, a także uwalniających substancję leczniczą w jamie ustnej – tabletek do ssania lub form podjęzykowych. Badaniom biorównoważności (*bioequivalence*) nie podlegają substancje podawane dożylnie i dotętniczo. Badanie biorównoważności, będące niejako drogą na skróty dla koncernów farmaceutycznych, bo pozwalające ominąć najbardziej kosztowny etap – badania kliniczne, sprowadza się do pomiaru krzywych stężeń i zobrazenia profilu farmakokinetycznego substancji aktywnej badanego „kandydata” na lek generyczny. Krzywe stężeń są oznaczane we krwi zdrowych ochotników zgodnie z procedurami badań klinicznych. Hipotetycznie idealny model badania zakłada brak maskowania ewentualnych różnic przez zmienność osobniczą. U podstaw badań biorównoważności leży teza obecna w nauce od wczesnych lat 80. XX wieku, mówiąca, iż jeżeli we krwi pacjenta znajdują się cząsteczki tej samej substancji czynnej, w tej samej ilości i o tym samym charakterze, to zawsze będą one działały w ten sam sposób. Oczywiście to stwierdzenie nie oddaje w pełni tego, jak działa lek w organizmie, ale pozwala obracać nowy punkt widzenia na badania biorównoważności. Ważnym aspektem tego badania jest fakt szukania różnic, a nie podobieństw w parametrach farmakokinetycznych. Kluczowym punktem jest znalezienie odpowiedzi na pytanie – czy wprowadzone w drogę tworzenia leku generycznego zmiany nie wpływają negatywnie na farmakokinetykę leku w odniesieniu do leku oryginalnego. Jeżeli pojawiają się zmiany, to jak duże?

Przykładowe porównanie zmian krzywych stężenia leku we krwi oraz opis parametrów obrazuje **rycina 1**.

Głównymi wartościami, które są brane pod uwagę przy ustalaniu biorównoważności, są AUC (*area under the curve*) – pole pod krzywą wykresu obrazującą stężenie leku we krwi, C_{max} – stężenie maksymalne leku we krwi oraz T_{max} – czas, w jakim stężenie maksymalne jest osiągnięte. Część lekarzy i farmakologów postuluje wprowadzenie obowiązku badania takich parametrów, jak: procentowa fluktuacja, czas plateau i ustalenie średniego czasu przebywania leku w organizmie. Według ogólnie przyjętych norm główne wartości muszą zawierać się w przedziale 80–125% w odniesieniu do wzorca, przy jednocześnie wprowadzonym węższym przedziale ufności w stosunku do wartości C_{max} , wynoszącym 90%. Należy zaznaczyć, że ów przedział zawiera w sobie różnice wynikające ze zmienności osobniczej i błędów pomiarowych [7].



Rycina 1. Przykładowy wykres podczas badania biorównoważności [6]

Ciekawym aspektem tych bardzo rygorystycznych badań jest fakt, że po analizie 2070 dokumentacji prowadzonych w latach 1996–2007 średnia różnica we wchłanianiu leków wynosi jedynie 3,45% [9]. Według badań dotyczących leków dla chorych na schizofrenię nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic, choć próby badane były zdecydowanie mniejsze. Jednak należy liczyć się z występowaniem sytuacji, kiedy firma zlecająca badania nie publikuje ich wyników ze względu na ich niepowodzenie. Dane te należy traktować w związku z tym z dużą rezerwą. Istotnym elementem podczas analizy wyników jest fakt konieczności eskrapolacji wyników ze statystycznie bardzo małej grupy badanej (n=24 lub 36) na praktycznie całą populację docelową, co stwarza ryzyko pominięcia różnic farmakogenetycznych. Nie znaczy to jednak, że powyższe badania są formalnością – wręcz przeciwnie, często są momentem za-prześcia pracy nad danym lekiem w zamierzonej postaci bądź skutkują koniecznością opracowania zupełnie nowych rozwiązań w procesie wytwarzania postaci leku.

Zdecydowanie korzystnym rozwiązaniem dla przemysłu jest omińnięcie badań *in vivo* i możliwość oceny jedynie uwalniania substancji na drodze analizy właściwości fizykochemicznych i udowodnieniu ich tożsamości z lekiem referencyjnym. Skraca to zarówno czas potrzebny na wykonanie odpowiednich badań, jak i bezsprzecznie redukuje ich koszty. Taka możliwość występuje jedynie wobec leków, w których substancja aktywna przynależy do klasy I według BCS – wyjątek stanowią postaci leku o przedłużonym uwalnianiu. W takim wypadku firma wprowadzająca lek uzyskuje wręcz komfortowe położenie ze względu na brak konieczności zaprzęgnięcia całej „machiny finansowej” towarzyszącej badaniom z udziałem zdrowych ochotników. W praktyce badanie uwalniania, zwane także badaniem dostępności farmaceutycznej, polega na obserwacji krzywej obrazującej ilość uwolnionej z tabletki substancji czynnej w punktach czasowych w warunkach mających zapewnić korelację z warunkami panującymi podczas uwalniania substancji w organizmie człowieka [10].

Przy okazji poruszania tematu równoważności leków generycznych i innowacyjnych nie sposób pominąć *Pomarańczowej Książki* – *Orange Book*, powstałej dzięki pracy zespołu pracowników FDA. Skupia ona leki uznane przez ten amerykański organ za bezpieczne i zapewniające korzyści terapeutyczne, a co istotne z punktu widzenia naszego tematu, zawiera bieżącą kategorię równoważności terapeutycznej preparatów obecnych w obrocie. Utworzenie tego „Pomarańczowego lekoskazu” jest odpowiedzią FDA na stale zwiększający

Tabela 1. Przykładowe wyniki parametrów farmakokinetycznych po doustnym podaniu metforminy w dawce 850 mg leku badanego i referencyjnego [8]

Parametr	Lek badany	Lek referencyjny
C_{max} , ng/ml	1217,38 (251,72)	1305,25 (301,06)
T_{max} , h	2,57 (0,93)	2,22 (0,94)
AUC_{0-96} , ng.h/ml	6786,81 (1410,86)	7357,10 (1808,78)
$AUC_{0-T_{max}}$, ng.h/ml	1363,49 (315,51)	1584,82 (368,75)
$AUC_{0-\infty}$, ng.h/ml	7155,75 (1440,74)	7777,08 (1896,49)
$T_{1/2}$, h	2,62 (0,40)	2,77 (0,33)
K_e , h ⁻¹	0,27 (0,04)	0,25 (0,03)

się udział leków generycznych w amerykańskim systemie zdrowotnym, który według aktualnych szacunków stanowi rynek generyków o największej wartości handlowo-dystrybucyjnej na świecie. Trzeba mieć jednak świadomość, że *Orange Book* jest wykazem skierowanym przede wszystkim do lekarzy i farmaceutów, umożliwiającym im skuteczne i w pełni racjonalnie terapeutycznie wybranie zamienników i ich stosowanie w odpowiedniej grupie pacjentów [14]. Powstanie *Pomarańczowej Książki* zdecydowało o działaniu amerykańskich lekarzy i farmaceutów, a także wprowadziło klarowne schematy postępowania, które zwiększają bezpieczeństwo terapii chorób przewlekłych. Warto też nadmienić, że w Polsce nie istnieje żaden odpowiednik *Orange Book*, który pełniłby rolę przewodnika po algorytmach postępowania dotyczących zamiany leków oryginalnych na generyczne. Stawia to farmaceutów w dosyć niekomfortowej sytuacji, dlatego że z jednej strony posiadają obowiązek proponowania tańszego zamiennika leku oryginalnego, a z drugiej są zdani tylko na własne doświadczenie (nie zawsze poparte długą praktyką) i często nieprecyzyjne informacje marketingowe dotyczące leków generycznych. W tym kontekście warto nadmienić, że to farmaceuta ponosi odpowiedzialność zawodową za dokonaną zamianę. Należy zadać zatem pytanie – czy należy zmuszać farmaceutów, aby wydawali leki generyczne w sytuacji, gdy brak im jasnych wytycznych, a odpowiedzialność za ewentualne błędy spoczywa tylko i wyłącznie na ich barkach?

Z powyższych danych można snuć przypuszczenia, że wkrótce leki generyczne będą stanowiły blisko 100% sprzedaży leków gotowych na świecie. Nic bardziej mylnego. Okazuje się, że istnieje szeroka grupa leków innowacyjnych, które zwyczajnie nie mogą bądź nie powinny zostać „odtworzone” i nie powinny być stosowane zamiennie ze względu na brak przekrojowych i pełnych badań

Tabela 2. Rynek generyków w Polsce i wybranych krajach Unii Europejskiej [18]

Kraj	Wartość rynku (mld euro)	Udział leków generycznych	Wartość rynku leków generycznych (mld euro)
Polska	4,4	65,50%	2,882
Niemcy	25,9	45,30%	11,7327
Portugalia	2,4	43,70%	1,0488
Wlk. Brytania	10,3	43,20%	4,4496
Włochy	11,8	37,70%	4,4486
Francja	21	34,90%	7,329
Grecja	3,7	31,70%	1,1729
Belgia	3,1	31,50%	0,9765
Hiszpania	10,8	30,70%	3,3156

klinicznych. Jako klasyczny przykład należy przytoczyć leki o wąskim zakresie terapeutycznym, takie jak: teofilina, warfaryna czy fenytoina.

W przypadku tych leków uzyskanie wyników biorównoważności rzędu 80–125% jest nieakceptowalne ze względu na fakt, że różnica ta może decydować o nieskuteczności terapii (80%) bądź może prowadzić do nasilenia działań niepożądanych do granic kompensacyjnych organizmu (125%), a w konsekwencji życie pacjenta może zostać zagrożone lub, w mniej pesymistycznym wariantcie, dochodzić może do nasilenia działań niepożądanych [15]. Podobne przesłanki towarzyszą lekom stosowanym w arytmii serca, lekom przeciwdrgawkowym czy hipotensyjnym. W przypadku tych leków wskazane jest podejmowanie decyzji odnośnie do terapii zgodnie z zasadami medycyny opartej na faktach (*Evidence-Based Medicine*, EBM), czyli korzystaniu z najnowszych doniesień i najświeższych badań klinicznych. Kolejnym aspektem ograniczającym stosowanie leków generycznych jest sama charakterystyka pacjenta. Istnieje grupa pacjentów, w przypadku której nie należy stosować leków odtwórczych bądź należy je stosować z dużą ostrożnością. Do tej grupy zaliczamy: niemowlęta, dzieci do 12 roku życia, kobiety w ciąży i osoby w wieku podeszłym. Jest to podyktowane zmianami farmakokinetycznymi w ich organizmie, trudnym do przewidzenia metabolizmem leków. Lekarze i farmaceuci muszą ponadto zwrócić uwagę na problem „zonglowania” generykami – zamiany jednego leku odtwórczego na drugi, co w praktyce zdarza się nader często i może prowadzić do braku stabilizacji farmakoterapii. Jest to spowodowane faktem występowania różnic nie tylko na osi *lek innowacyjny–generyk*, ale także na osi *generyk–generyk*, co powoduje jeszcze większą

rozpiętość dawek rzeczywistych, jakie otrzymuje chory. Szczególnie farmaceuci powinni mieć świadomość, że wydanie pacjentowi zamiennika leku oryginalnego musi stanowić decyzję podjętą w oparciu o wiedzę i doświadczenie, a nie wyłącznie ze względu na różnicę w cenie, czy „naciśki” marketingowe.

Jak powszechnie wiadomo, leki odtwórcze, jak sama nazwa mówi, mają bardzo wiele wspólnego z ich „lekami-matkami”. Zasadniczą różnicą jest skład jakościowy i ilościowy użytych podczas procesu produkcji substancji pomocniczych. Są to substancje stanowiące integralną część leku gotowego, nadają one pożądaną postać leku, decydują o jego parametrach aplikacyjnych, determinują właściwości fizyczne leku, zwiększają trwałość substancji leczniczej bądź też całego preparatu. Dodatkowymi funkcjami substancji pomocniczych jest nadanie przyjemnych cech organoleptycznych lub zamaskowanie drażniącego smaku i zapachu.

Warto zaznaczyć, że mogą one wpływać na szybkość uwalniania substancji czynnej z leku oraz regulować jej wchłanianie. Znaczenie substancji pomocniczych ujawnia się podczas prowadzenia przygotowań do wdrożenia nowego leku generycznego. Każdej firmie planującej wprowadzić odpowiednik leku innowacyjnego zależy, aby możliwie upodobnić swój produkt do leku referencyjnego. W laboratoriach powstaje wiele różnych kombinacji ilościowych i konfiguracji jakościowych użytych substancji pomocniczych, mających zapewnić pozytywne wyniki badań biorównoważności czy też uwalniania, zapewniając pełne bezpieczeństwo i komfort stosowania.

W praktyce jest to zadanie nader wymagające i w przypadku wielu leków odtwórczych wydaje się być problemem, który nie został w pełni rozwiązany. Jak wskazują badania, zaobserwowano zależność pomiędzy zamianą leku oryginalnego na generyczny a zwiększeniem ilości pacjentów doświadczających działań niepożądanych po zamianie leków [16].

Głównymi ogniskami skupiającymi nowo powstałe dolegliwości są: przewód pokarmowy, ze szczególnym uwzględnieniem żołądka, ośrodkowy układ nerwowy czy też reakcje nadwrażliwości. Biorąc pod uwagę fakt wzrostu ilości działań niepożądanych o blisko 30%, należy przyczyny tego stanu rzeczy szukać nie we właściwościach substancji czynnej, a zdecydowanie po stronie użytych substancji pomocniczych. Argumentem, który można przytoczyć, jest przeprowadzenie w przypadku leku oryginalnego badań klinicznych na w pełni reprezentatywnej grupie badanej, gdzie istnieje prawdopodobieństwo bliskie jedności, że dzięki szerokiemu spektrum profili osobowych i farmakogenetycznych uda się wyeliminować ze

składu substancje wywołującą niezamierzone efekty. Przyrównując zatem do powyższych prób badania biorównoważności prowadzone na nieporównywalnie mniejszej liczbie zdrowych osób, łatwo dostrzec, że wzrasta ryzyko wprowadzenia do obrotu leku zawierającego substancję pomocniczą, która może być przez część pacjentów źle tolerowana i wywoływać alergie oraz inne działania niepożądane. Teoretycznie wszystkie substancje pomocnicze są substancjami zaaprobowanymi przez odpowiednie urzędy i obecnymi w produkcji od lat, ale należy pamiętać również o takich czynnikach, jak: czystość tych substancji, użyta ich ilość czy pochodzenie, nie wspominając o możliwym wystąpieniu interakcji.

Ujawnia się w tym momencie swoisty paradoks natury ekonomicznej – pacjent, chcąc zaoszczędzić określoną sumę pieniędzy, naraża się na poniesienie dużych kosztów związanych z koniecznością leczenia zmian powstałych wskutek stosowania tańszego zamiennika. Osobną kwestią pozostaje komfort i samopoczucie pacjenta, a w szczególnych przypadkach jego zdrowie i życie. Główną rolą rzetelnego poinformowania pacjentach o możliwych korzyściach i ryzyku związanym ze stosowaniem generyków należy obarczyć farmaceutów, wszakże to przy okienku aptecznym pacjent decyduje o zakupie danego leku.

Okiem ekonomisty stosowanie leków generycznych jest dużą oszczędnością, zarówno dla pacjentów, jak i dla całego systemu ochrony zdrowia danego kraju. W Polsce szacuje się, że około 65–75% obrotu produktami leczniczymi stanowią leki generyczne, a ogólna wartość rynku wynosi blisko 20 mld złotych [17]. W Europie wskaźnik popularności leków generycznych oscyluje w okolicach 50%. Nie jest to informacja zaskakująca, biorąc pod uwagę nawet istotnie niższą cenę za lek odtwórczy. Warto podkreślić, że przeciętny Europejczyk wydaje rocznie około 430 euro na leki, a w społeczeństwie naszego kontynentu gwałtownie zwiększa się odsetek ludzi starszych. Po tej analizie uwidacznia nam się rzeczywista wartość rynku leków generycznych i możliwości jego stałego rozwoju.

Na zakończenie należy postawić zadane na początku pytanie – czy leki generyczne są zatem *panaceum* na wszelkie „dolegliwości” farmakoekonomiczne, czy też ich coraz szersza obecność w naszych aptekach stanowi realne zagrożenie dla przemysłu farmaceutycznego i jego newralgicznej gałęzi – innowacyjności?

Niestety *panaceum*, jak dotąd, jest spotykane jedynie w legendach i mitach, które są tak stare, jak cała medycyna i należy ponad wszelką wątpliwość stwierdzić, że leki generyczne nie są lekarstwem doskonałym na bolączki natury

farmakoekonomicznej. Leki odtwórcze wykazują wszakże „działania niepożądane”, które tyczą się całego przemysłu farmaceutycznego. Nie możemy zapominać o podstawowych mechanizmach gospodarczych, mówiących, że dopływ kapitału stymuluje rozwój i umożliwia odkrywanie nieznanego, co jest szczególnie istotne w sferze medycznej, a leki generyczne zdecydowanie ograniczają dochody generowane przez leki oryginalne. Wydaje się, że powstawanie koncernów produkujących jedynie leki odtwórcze w sposób nieunikniony prowadzić może do zahamowania dynamicznego rozwoju firm, których priorytetem jest innowacyjność. Trzymając się terminologii filozoficznej, należy dążyć do odnalezienia złotego środka, który pozwoli zachować bezpieczny balans pomiędzy redukcją cen leków a utrzymaniem racjonalnego poziomu finansowania sfery badawczej, która wymaga dużych nakładów finansowych i jest w wielu przypadkach zupełnie nieprzewidywalna. Bez zachowania umiaru i odpowiednich proporcji finansowych może się okazać, że przemysł farmaceutyczny podąży w ślepą uliczkę, która zakończy złotą erę rozwoju medycyny i farmacji.

Z całą pewnością leki generyczne mogą być elementem upłynniającym działania systemów ochrony zdrowotnej, ale jasno należy zaznaczyć, że nie zawsze są one wyborem korzystnym dla pacjenta, a statystyka jest bardzo brutalnym narzędziem, ale tylko w ujęciu jednostki. Bezsprzecznie w całej tej sytuacji kluczowe role pełnią lekarz i farmaceuta, od ich wiedzy, rzetelności i doświadczenia zależy w większości przypadków bilans zamiany leku oryginalnego na odtwórczy. Pamiętajmy, by te decyzje były decyzjami *stricte* terapeutycznymi, a nie marketingowymi i aby zdrowie i życie pacjenta pozostawało największą troską lekarzy i farmaceutów.

Otrzymano: 2014.05.19 · Zaakceptowano: 2014.05.28

Piśmiennictwo

1. Tschabitscher D., Platzer P., Baumgärtel C., Müllner M.: Generic drugs: quality, efficacy, safety and interchangeability. Wien Klin Wochenschr 2008, 120: 63–69.
2. Nation R.L., Sansom L.N.: Bioequivalence requirements for generic products. Pharmacol. Ther. 1994, 1–2: 41–55.
3. www.fda.gov – Abbreviated New Drug Application (ANDA): Generics. Luty/Marzec 2014 (stan z 25 marca 2014 r.).
4. Benet L.Z.: The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. J. Pharm. Sci. 2013, 102(1): 34–42.
5. Nair A., Anand O., Chun N., Conner D.P., Mehta M., Nhu D., Polli J., Yu L., Davit B.: Statistics on BCS Classification of generic drug products approved between 2000 and 2011 in the USA. The AAPS Journal 2012, 14: 664–666.
6. <http://www.sciencebasedmedicine.org/> (stan z 26 marca 2014 r.).
7. Shentu J., Zhou H., Hu X., Wu G., Wu L., Zhu M., Zhai Y., Zheng Y., Liu J.: Comparative fasting bioavailability of 2 bepotastine formulations in healthy male chinese volunteers: An open-label, randomized, single-dose, 2-way crossover study. Clin. Ther. 2014. 10.1016/j.clinthera.2014.02.020.

8. Holguin G. et al.: Bioavailability and pharmacokinetic comparison of two formulations of metformin 850 mg tablets in healthy Colombian volunteers. *Colombia Medica* 2010, 42: 1–8.
9. Barbara Davit et al.: Comparing generic and innovator drugs: A review of 12 years of bioequivalence data from the United States Food and Drug Administration. *Ann Pharmacother.* 2009, 43: 1583–1597.
10. Sznitowska M.: Sposoby oceny jakości leków generycznych – od badania uwalniania do badania biorównoważności. *Choroby Serca i Naczyń* 2011, 8(4): 209–214.
11. Telejko E.: Perindopril arginine: benefits of a new salt of the ACE inhibitor perindopril. *Curr Med Res Opin.* 2007, 23(5): 953–60.
12. NPS.org.au – (stan z 26 marca 2014).
13. <http://servier.pl/index.php/archiwum/2012/item/11735> (stan z 16 kwietnia 2014 r.).
14. Orange Book: Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations, <http://www.accessdata.fda.gov>. (stan z 25 marca 2014 r.).
15. Gallelli L., Palleria C., De Vuono A., Mumoli L., Vasapollo P., Piro B., Russo E.: Safety and efficacy of generic drugs with respect to brand formulation. *J Pharmacol Pharmacother.* 2013, 4(Suppl.1): S110–S114.
16. Kjoenniksen J, Lindbeak, M., Granas, A. G. Patients attitudes towards and experiences of generic drug substitution in Norway. *Pharm World Sci.* 2006, 28(5): 284–89.
17. IMS Analysis Poland. Polska na tle innych krajów UE. Analiza skutków wprowadzenia nowej ustawy refundacyjnej. 2010.

Zaburzenia hiperpigmentacyjne skóry oraz farmakologiczne metody ich leczenia

Katarzyna Pańczyk^{1,2}, Anna Waszkielewicz¹, Henryk Marona¹

¹ Pracownia Chemii Kosmetycznej Zakładu Chemii Bioorganicznej, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny UJ CM

² Koło Chemii Bioorganicznej przy Zakładzie Chemii Bioorganicznej

Adres do korespondencji: Katarzyna Pańczyk, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: panczyk.kasia@gmail.com

Kolor skóry pełni nie tylko rolę biologiczną, ale także społeczną i estetyczną. Świadczy on o przynależności rasowej, może sugerować występowanie niektórych jednostek chorobowych, a jednym z popularniejszych zabiegów kosmetycznych jest jego przyciemnianie lub rozjaśnianie, w zależności od aktualnie obowiązującego kanonu urody. Zawarte w naskórku barwniki z reguły pełnią funkcje ochronne, zabezpieczając przed szkodliwym wpływem promieniowania UV [1].

Decydujący wpływ na kolor skóry człowieka ma obecność barwników z grupy melanin – organicznych związków azotu wykazujących zróżnicowane zabarwienie, których występowanie potwierdzono w warstwie podstawnej naskórka, korze włosa, a nawet niektórych komórkach układu nerwowego. Spośród gamy znanych melanin istotną rolę w determinacji koloru skóry odgrywają: eumelanina – brązowoczarny barwnik posiadający właściwości ochronne przed promieniowaniem UV (głównie poprzez likwidację wolnych rodników), feomelanina – żółtoczerwony barwnik obecny głównie w naskórku osób rasy celtyckiej, niestanowiący ochrony przed promieniowaniem UV (mutagenny w teście Ames’a, pod wpływem UV staje się wolnym rodnikiem uszkadzającym komórki skóry).

Melanina produkowana jest z tyrozyny w melanocytach przy udziale enzymu tyrozinazy (**rycyna 1**). Regulacja tego procesu odbywa się na kilku głównych płaszczyznach: enzymatycznej, genetycznej, hormonalnej, biochemicznej (cytokiny) i fizycznej (natężenie promieniowania UV). Po zadziałaniu czynnika aktywującego pęcherzyki z powstałym barwnikiem transportowane są połączeniami dendrytycznymi z melanocytów do otaczających keratynocytów.

Zaobserwowano, iż zmiany zabarwienia skóry widoczne pomiędzy rasami nie wpływają z różnic

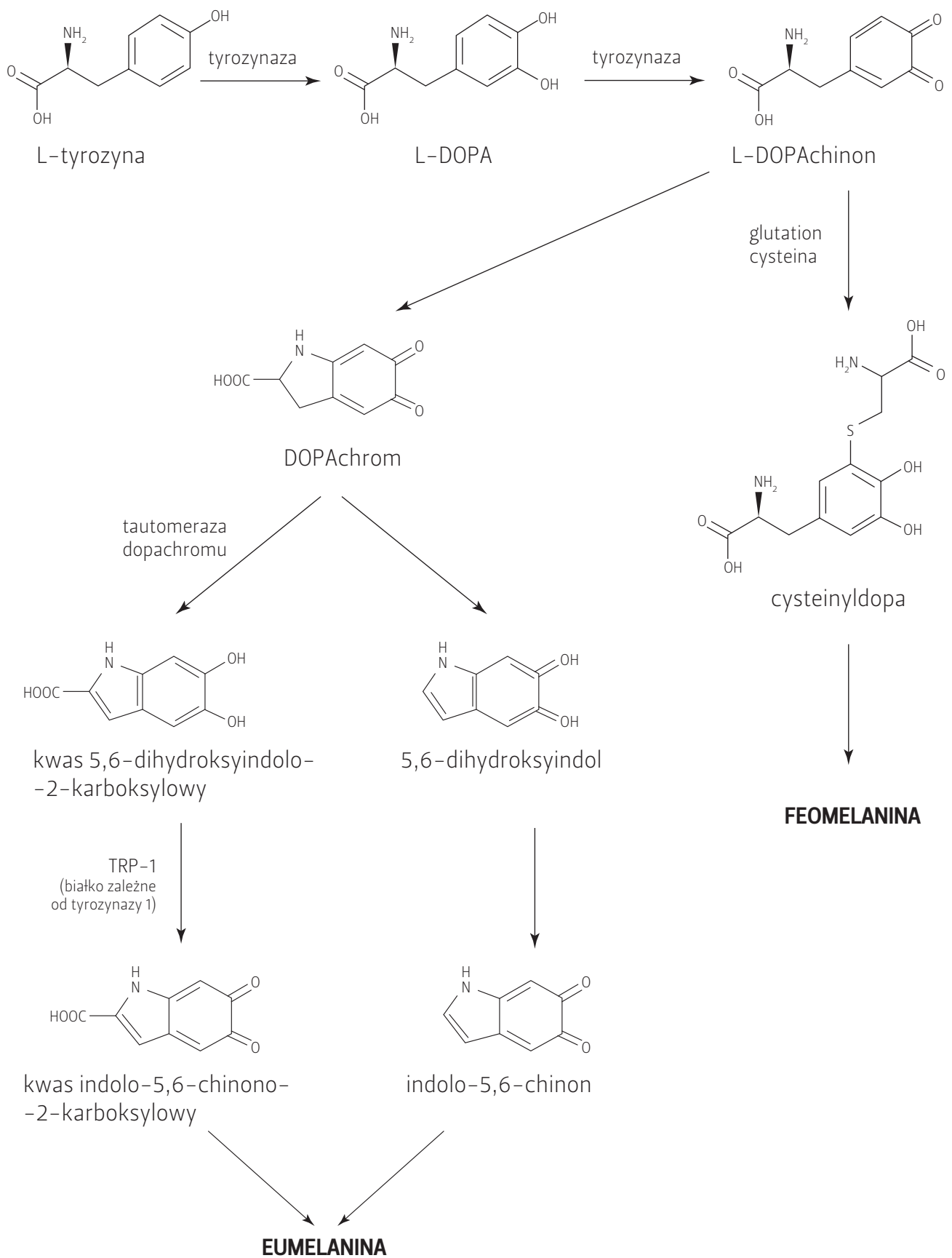
Skin hyperpigmentation disorders and pharmacological methods of their treatment · Hyperpigmentation disorders are both aesthetic and psychological issue. Among various types of hyperpigmentation, the most common are ephelides, lentigines, melasma, post-inflammatory hyperpigmentation, Riehl melanosis and phototoxic reactions. Treatment includes mechanical stain removal, topical application of pharmacological agents. The article describes the most commonly occurring disorders and characterizes the available pharmacological treatment methods. The literature review indicates that there is a wide range of depigmenting agents whose primary pharmacological target is the synthesis (especially the activity of the enzyme tyrosinase), distribution and degradation of melanin. However, clinically used treatment methods often do not show the desired therapeutic effect or carry a high risk of side effects. Discovering both effective and safe therapy of hyperpigmentation disorders is still a challenge.

Keywords: drug therapy, hyperpigmentation, melanins, monophenol monooxygenase, pigmentation.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 327–335

w ilości melanocytów ani z całkowitej zawartości obecnych w skórze melanin, która nie przekracza zazwyczaj 1%. Istotną kwestią jest natomiast rozmieszczenie komórek produkujących barwnik (w warstwie twórczej naskórka u rasy białej, na całej grubości naskórka u rasy czarnej) oraz rodzaj ich aktywności (proporcjonalnie większa ilość produkowanej feomelaniny kosztem eumelaniny u rasy białej względem rasy czarnej).

Wrodzone i nabyte nieprawidłowości w funkcjonowaniu melanocytów, jak i zaburzenia regulacji syntezy melanin, prowadzą do patologicznych zmian, objawiających się hiper- bądź hipopigmentacją skóry. W zależności od zlokalizowania złogów barwnika wyróżniamy postać naskórkową, skórną i mieszaną przebarwień. Diagnozy dokonuje się za



Rycina 1. Schemat syntezy melanin

pomocą lampy Wooda, emitującej długofalowe promieniowanie nadfioletowe. Zmiany obejmujące skórę właściwą są trudniejsze w leczeniu od tych zlokalizowanych jedynie powierzchniowo [2]. Poniżej scharakteryzowano wybrane, najczęściej występujące zaburzenia hiperpigmentacyjne i przedstawiono dostępne metody ich leczenia.

Zaburzenia przebiegające z hiperpigmentacją skóry

Piegi (*ephelides*)

W niektórych kulturach, np. wśród Azjatów, piegi uważane są za defekt kosmetyczny wymagający leczenia, jednak na terenie Europy rzadko dąży się do ich korygowania. Są to skupiska pigmentu obserwowane jako płaskie plamy o średnicy 1–2 mm na skórze twarzy, ramion, szyi i klatki piersiowej, występujące głównie u przedstawicieli rasy kaukaskiej, ale niekiedy również azjatyckiej. Piegi zwiększają swoją intensywność w okresie dojrzewania oraz sezonowo, po ekspozycji na słońce. Paradoksalnie, obszary skóry o ciemniejszej barwie zawierają około 40% mniej melanocytów w stosunku do sąsiednich regionów o jaśniejszym zabarwieniu. Komórki te są jednak większe, posiadają liczne i długie dendryty oraz zawierają więcej pigmentu. Ponadto pomiędzy liniami papilarnymi skóry objętej piegami zaobserwowano wydłużone pogrubienia naskórka oraz skupiska melanocytów w ich pobliżu i w warstwie podstawnej naskórka. Ze względu na rodzinne występowanie piegów, za ważny element warunkujący ich pojawianie się uważa się czynniki genetyczne. Dowiedziono znaczenia takich genów, jak MC1R (gen receptora melanokortyny typu 1), IRF4 (gen czynnika regulującego interferony), ASIP (gen regulacyjnego białka Agouti) i TYR (gen tyrozynazy) [3].

Plamy soczewicowate (*lentigines*)

Plamy soczewicowate są płaskimi zaciemnieniami skóry o brązowej barwie. Wielkością oraz kształtem przypominają ziarna soczewicy, czemu zawdzięczają swoją nazwę. Pojawiają się na twarzy, grzbietach dłoni i przednio-bocznej powierzchni ramion, najczęściej po 50. roku życia – dlatego bywają również nazywane plamami starczymi. Podobnie jak w przypadku piegów, ciemniejsze obszary skóry charakteryzują się wydłużeniem zgrubień naskórka pomiędzy liniami papilarnymi oraz większą ilością melanocytów w ich rejonie i w podstawnych warstwach naskórka. Komórki nie są powiększone, ale zawierają więcej mitochondriów, mają lepiej rozwiniętą siateczkę endoplazmatyczną i bardzo efektywnie transportują melanosomy do sąsiednich keratynocytów, o czym świadczą skupiska melanosomów obserwowane w keratynocytach.

Do przyczyn powstawania plam soczewicowatych można zaliczyć narażenie na poparzenia słoneczne, stosowanie niektórych leków uwrażliwiających na światło słoneczne (np. PUVA – podawanie dostwnych psoralenów w połączeniu z naświetlaniem UVA w terapii łuszczycy) oraz choroby genetyczne (np. zespół LEOPARD przebiegający z mutacją genu PTPN11 kodującego fosfatazę tyrozynową lub zespół Peutza–Jeghersa, w przypadku którego mutacji ulega gen kinazy treoninowo-serynowej STK11/LKB1) [3, 4].

Ostuda (*chloasma, melasma*)

Ostuda ma postać rozlanych, brązowych plam o nieregularnym kształcie, najczęściej zlokalizowanych symetrycznie na twarzy i szyi, rzadziej na ramionach lub w okolicy mostka. Wystąpieniu ostudy sprzyja płeć żeńska (mężczyźni stanowią ok. 10% chorych), ciemna karnacja i zamieszkanie w rejonach o wysokim natężeniu promieniowania UV. Melanocyty, których ilość może, ale nie musi być zwiększona, zawsze charakteryzują się dużym rozmiarem, uwydatnionymi dendrytami i wzmożoną produkcją barwników. Wśród głównych przyczyn powstawania ostudy wymienia się fotouszkodzenie skóry oraz zmiany hormonalne (okres ciąży, antykoncepcja hormonalna, choroby endokrynne) [5].

Hiperpigmentacja pozapalna (*post-inflammatory hyperpigmentation, PIH*)

Termin „hiperpigmentacja pozapalna” obejmuje przebarwienia powstałe w wyniku procesu zapalnego skóry. Pierwotną przyczyną zapalenia może być wiele czynników, takich jak: trądzik, alergeny lub substancje drażniące, uraz, łuszczycy, liszaj płaski, wysypka polekowa i zabiegi kosmetyczne. W obrazie histologicznym skóry widoczne są złogi melaniny – wolnej lub zgromadzonej w melanofagach. Zmiany mogą przyjmować postać zarówno naskórkową, jak i skórną bądź mieszaną. Patomechanizm powstania przebarwienia jest związany ze wzmożoną aktywnością czynników prozapalnych, cytokin i reaktywnych form tlenu, które przez stymulację wzrostu melanocytów i różnicowania dendrytów intensyfikują produkcję i transport melaniny [5]. Jako induktory tyrozynazy szczególnie istotne znaczenie mają prostaglandyny (PGF₂ i PGF_{2α}), tromboksan i leukotrieny (np. LTC₄ i LTD₄) [4].

Melanoza Riehla

Melanoza Riehla należy do kontaktowych dermatoz skóry objawiających się siateczką szaro-brązowych przebarwień, obejmujących: czoło, okolice jarzmowe i skroniowe twarzy [6]. Po raz pierwszy została zaobserwowana w 1917 r. przez Riehla u 17 kobiet, jako odpowiedź na kontakt

z barwnikiem anilinowym zawartym w pudrze do twarzy. Od lat 70. XX w. częstość zachorowań znacznie spadła ze względu na wyeliminowanie przez firmy kosmetyczne wielu alergenów ze swych produktów. Wciąż jednak składniki kosmetyków pozostają główną przyczyną występowania melanozy Riehla [7]. Potwierdzono niekorzystny wpływ takich substancji, jak: geraniol (alkohol terpenowy wykorzystywany w produkcji perfum), minoksydyl i difenylocyklopropenon (składniki preparatów przeciwko łysieniu) [8].

Odczyn fototoksyczne

Niektóre substancje podane zewnętrznie lub wewnętrznie mogą ulegać reakcjom fotochemicznym pod wpływem światła słonecznego, przede wszystkim promieniowania UVA, i prowadzić do zmian hiperpigmentacyjnych (tabela 1). Rumień i pęcherze, typowo występujące w wyniku poparzenia słonecznego, po kilku dniach przybierają ciemniejszą barwę. Charakterystycznym przykładem odczynu

fototoksycznego jest tzw. „berloque dermatitis”, wywołany stosowaniem jednego ze składników perfum – olejku bergamotowego. Zawarty w olejku 5-metoksypsoralen w połączeniu ze światłem słonecznym wywołuje hiperpigmentację skóry naśladowującą biżuterię, ze względu na typowe stosowanie perfum w okolicach szyi [5, 9]. Histopatologicznie, na obszarach objętych odczynem fototoksycznym można zaobserwować zwiększenie ilości melaniny w warstwie podstawnej i jej akumulację w melanofagach [8].

Leczenie farmakologiczne zaburzeń przebiegających z hiperpigmentacją skóry

Typowe leczenie zaburzeń hiperpigmentacyjnych obejmuje odpowiednią profilaktykę oraz zastosowanie chemicznych bądź fizycznych środków depigmentujących. Za podstawę profilaktyki, jak również konieczny element samego leczenia, uważa się stosowanie kremów z filtrem UV oraz minimalizację narażenia na promieniowanie słoneczne – jeden z czynników predysponujących do powstania przebarwień. Metody fizyczne są wciąż rozwijane i polegają na zabiegach z wykorzystaniem lasera, krioterapii ciekłym azotem lub urządzeń mechanicznie złuszczących naskórek. Podstawę terapii zaburzeń hiperpigmentacyjnych stanowią jednak metody farmakologiczne, wykorzystujące kilka głównych mechanizmów: zaburzenie syntezy melaniny, regulację wychwytu i dystrybucji melanosomów w docelowych keratynocytach oraz degradację melanosomów i melaniny (tabela 2). W przypadku terapii hiperpigmentacji pozapalnej skuteczne może okazać się również zewnętrzne podanie substancji przeciwzapalnych, np. kortykosteroidów lub ekstraktu rumiankowego [11].

Tabela 1. Przykłady leków mogących wywołać odczyn fototoksyczny [10]

Antybiotyki	– tetracykliny, fluorochinolony, kwas nalidiksowy, ceftazydim, gryzeofulwina, ketokonazol, trimetoprim, sulfonamidy
NLPZ	– ibuprofen, ketoprofen, nabumeton, naproksen, fenylbutazon, oksyfenylbutazon, aspiryna, kwas meklofenamowy
Diuretyki	– hydrochlorotiazyd, furosemid
Retinoidy	
Cytostatyki	– 5-fluorouracyl, dakarbazyna, metotreksat, winblastyna
Amiodaron	
Diltiazem	
Psoraleny	– 5-metoksypsoralen

Tabela 2. Podział stosowanych środków depigmentacyjnych według głównego mechanizmu działania

Mechanizm działania	Substancje
Zaburzenie syntezy melaniny	– inhibitory czynników transkrypcyjnych tretynoina, C2-ceramid – inhibitory glikozylacji tyrozynazy glukozamina, tunikamycyna, D-panteino-5-sulfonian wapnia – inhibitory tyrozynazy hydrochinon, arbutyna, deoksyarbutyna, hydroksyanizol, eter benzylowy hydrochinonu, N-acetylo-4-5-cysteaminofenol, kwas kojowy, kwas elagowy, ester metylowy kwasu getyzynowego, kwas azelainowy, flawonoidy – induktory degradacji tyrozynazy nienasycone kwasy tłuszczowe (linolowy, α -linolenowy) – inhibitory peroksydazy metimazol – antyutleniacze kwas galusowy, kwas askorbinowy, α -tokoferol
Regulacja wychwytu i dystrybucji melanosomów	sojowy inhibitor trypsyny, inhibitor proteazy z rodziny Bowmana-Birka, nikotynamid
Degradacja melanosomów i melaniny	hydroksykwas, retinoidy, likwirytna
Metody fizyczne	fizyczne złuszczenie naskórka, terapia laserowa

Zaburzenie syntezy melaniny

Inhibitory czynników transkrypcyjnych

Proces transkrypcji tyrozinazy oraz TRP-1 (białka zależnego od tyrozinazy 1) regulowany jest przez czynniki transkrypcyjne. Ich dezaktywacja przez środki depigmentacyjne wywołuje zahamowanie ekspresji enzymów. Przykładem substancji działających według powyższego mechanizmu jest tretynoina (kwas all-*trans*-retinowy) oraz C2-ceramid (rycina 2) [11].

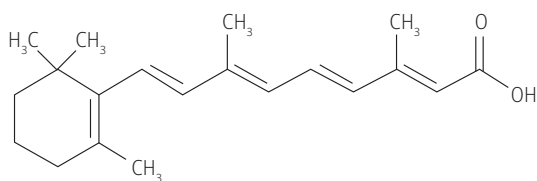
Inhibitory glikozylacji tyrozinazy

Jednym z głównych procesów przebiegających w trakcie obróbki potranslacyjnej tyrozinazy jest glikozylacja reszty asparaginowej enzymu. Zaburzenie tego procesu prowadzi do dezaktywacji lub obniżenia aktywności tyrozinazy bez zmiany samej jej ekspresji. Inhibitory glikozylacji tyrozinazy o potwierdzonej aktywności to: glukozamina, tunikamycyna, D-panteino-*S*-sulfonian wapnia [11].

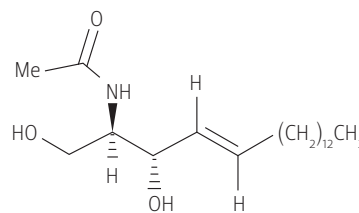
Inhibitory tyrozinazy

Inhibitory tyrozinazy są najliczniejszą grupą wśród substancji depigmentujących i najszerzej

wykorzystywaną w terapii. Typowymi przykładami substancji należących do tej grupy jest hydrochinon oraz jego pochodne – arbutyna, deoksyarbutyna, hydroksyanizol, eter benzylový hydrochinonu czy też *N*-acetylo-4-*S*-cysteaminofenol (rycina 3) [12]. Substancje te wiążą reszty histydyny występujące w centrum aktywnym enzymu, blokując jego działanie. Równie ważny mechanizm stanowi indukcja powstawania reaktywnych form tlenu, które przyczyniają się do uszkodzenia białek (m.in. tyrozinazy), a także błon lipidowych, co skutkuje degradacją melanosomów i uszkodzeniem melanocytów. Dodatkowo pochodne chinonu obniżają aktywność glutationu oraz hamują syntezę kwasów nukleinowych [13]. W Unii Europejskiej hydrochinon, ze względu na działania niepożądane, został wycofany jako kosmetyk, może być jednak nadal stosowany z przepisu lekarza. Długotrwała aplikacja zewnętrzna hydrochinonu może powodować między innymi silne podrażnienie skóry, trwale jej odbarwienie (uszkodzenie melanocytów przez reaktywne formy tlenu), a także rozwinięcie się egzogennej ochronozy. Choroba ta jest związana z obniżoną

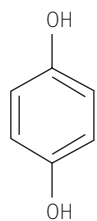


tretynoina

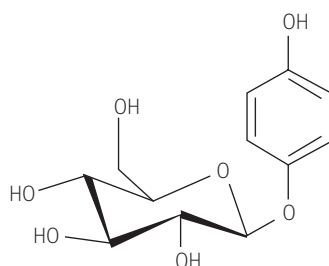


C2-ceramid

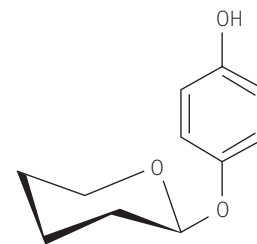
Rycina 2. Inhibitory czynników transkrypcyjnych



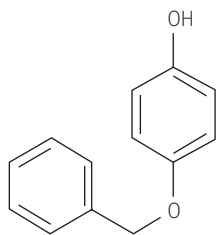
hydrochinon



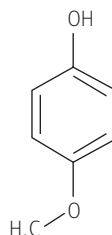
arbutyna



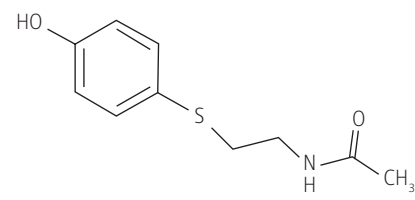
deoksyarbutyna



eter benzylový hydrochinonu



4-hydroksyanizol



N-acetylo-4-*S*-cysteaminofenol

Rycina 3. Inhibitory tyrozinazy

aktywnością oksydazy kwasu homogentyzynowego, co skutkuje lokalnym nagromadzeniem złożeń kwasu homogentyzynowego, jego polimeryzacją, a w końcowej fazie degradacją kolagenu i włókien elastycznych z towarzyszącym ciemnym zabarwieniem skóry w miejscu ogniska chorobowego [13, 14]. Pochodne hydrochinonu wykazują łagodniejszy profil działania, a ich stosowanie jest obciążone mniejszym ryzykiem działań niepożądanych [12].

Poza pochodnymi hydrochinonu w terapii wykorzystywane są także inne inhibitory tyrozynazy.

Kwasy kojowy (metabolit mikroorganizmów z rodziny *Acetobacter*, *Aspergillus*, *Penicillium*) i elagowy (naturalnie występujący w owocach jagodowych), a także ester metylowy kwasu gentyzynowego (składnik korzenia goryczki) (**rycina 4**) hamują działanie enzymu według tego samego mechanizmu [11]. Tyrozynaza należy do grupy metaloenzymów, charakteryzujących się obecnością jonów metalu w obrębie apoenzymu. Część cząsteczki inhibitora tyrozynazy tworzy kompleks z dwoma jonami miedzi, warunkującymi funkcję katalityczną enzymu [15].

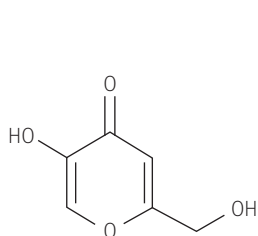
Kwas azelainowy (**rycina 5**), naturalnie występujący jako metabolit grzybów z gatunku *Pityrosporum ovale*, należy do kompetycyjnych inhibitorów tyrozynazy, które blokują dostęp tyrozyny do centrum aktywnego enzymu [11]. Kwas wykazuje również działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne ze względu na swoją zdolność do hamowania

aktywności reduktazy tioredoksyny, zaangażowanej w syntezę deoksyrybonukleotydów, być może moduluje również odpowiedź zapalną poprzez działanie na receptory PPAR γ keratynocytów [13, 16]. Pożądanymi właściwościami związku są: stosunkowo dobra tolerancja oraz efektywniejsze działanie na obszarze chorobowo zmienionym, w stosunku do zdrowej skóry [12].

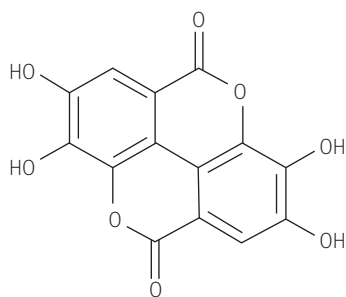
Polifenole o właściwościach hamujących aktywność tyrozynazy można ogólnie podzielić na dwie grupy, w zależności od mechanizmu interakcji z enzymem. Pochodne rezorcynolu prawdopodobnie wiążą się z centrum aktywnym tyrozynazy, natomiast pochodne katechiny posiadają właściwości chelatujące jony miedzi (**rycina 6**) [17].

Obecnie poszukuje się nowych struktur polifenolowych o właściwościach hamujących tyrozynazę, szczególnie podstawionych w pozycji 4 pochodnych rezorcynolu [17–19].

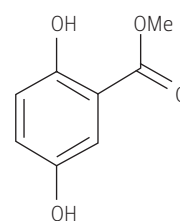
Należące do polifenoli flawonoidy stanowią zróżnicowaną grupę związków pochodzenia roślinnego, spośród których bardzo wiele wykazuje słabe właściwości depigmentacyjne. Co więcej, wyniki badań często są względem siebie sprzeczne. Przykładami mogą być: naryngenina, kwercetyna, taksyfolina lub luteolina, które wzmagają ekspresję tyrozynazy, działając jednocześnie w niektórych badaniach depigmentacyjnie [13, 20]. Istnieje jednak grupa flawonoidów o uznanej aktywności wybielającej. Należy do nich między innymi występująca w aloesie aloesyna,



kwas kojowy

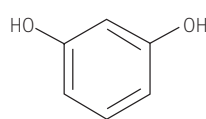
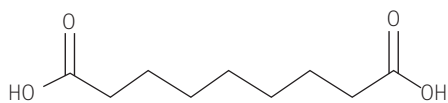


kwas elagowy

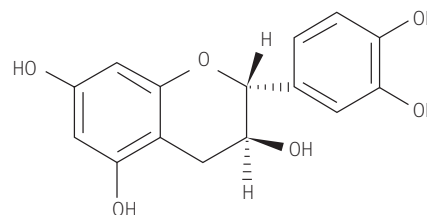


ester metylowy
kwasu gentyzynowego

Rycina 4. Inhibitory tyrozynazy



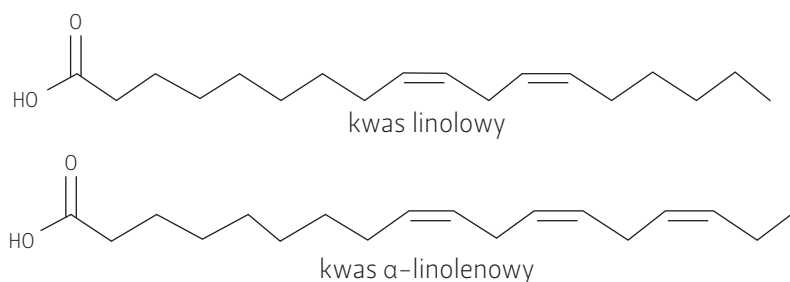
rezorcynol



katechina

Rycina 5. Kwas azelainowy

Rycina 6. Struktury rezorcynolu i katechiny



Rycina 7. Induktory degradacji tyrozynazy

obecny w czerwonym winie resweratrol i glabrydyna – substancja obecna w korzeniu lukrecji [13].

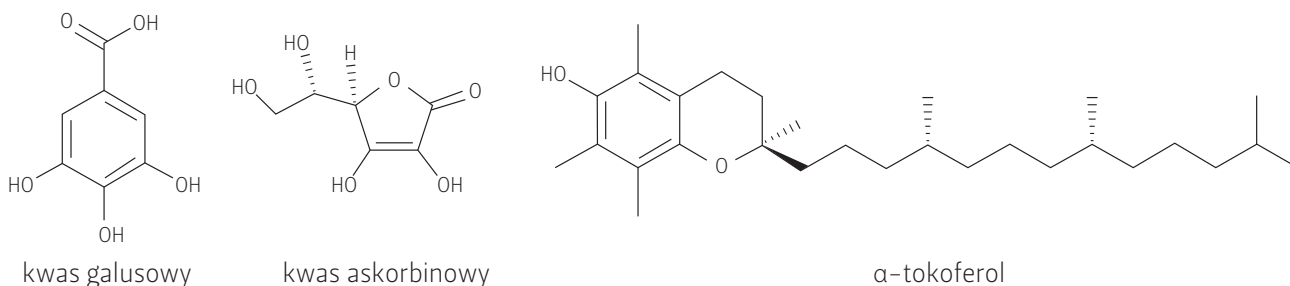
Zostało opisanych bardzo wiele substancji wykazujących aktywność hamującą tyrozynazę. Niestety tylko nieliczne z nich uważane są za skuteczne klinicznie – przede wszystkim hydrochinon i jego pochodne, a także kwas kojowy. Większość inhibitorów tyrozynazy wykazuje zbyt słabe działanie po podaniu na skórę, bywają składnikami preparatów wieloskładnikowych jako substancje wspomagające leczenie. Przyczyną może być fakt, że badania przeprowadzane są standardowo na tyrozynazie pochodzącej od grzyba *Agaricus bisporus*. Niektóre związki wykazujące obiecującą aktywność w testach posiadają słabsze właściwości hamujące wobec enzymu pochodzenia ludzkiego [17].

Induktory degradacji tyrozynazy

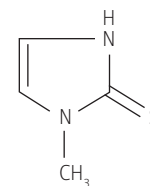
Przeciwnie działające fizjologiczne nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych zostało zaobserwowane w przypadku procesu degradacji tyrozynazy. Powstały w siateczce endoplazmatycznej enzym jest transportowany do aparatu Golgiego, gdzie przybiera dojrzałą formę, mogącą katalizować reakcje melanogenezy. Nienasycone kwasy tłuszczowe, np. kwasy linolowy i α -linolenowy (rycina 7), wzmagają proces przyłączania ubikwityny do dojrzałej tyrozyny, co powoduje jej zwrotny transport do siateczki endoplazmatycznej i indukuje proces degradacji [21, 22].

Inhibitory peroksydazy

Peroksydaza katalizuje liczne przemiany w cyklu syntezy melaniny, m.in. oksydację DOPA,



Rycina 9. Antyoksydanty

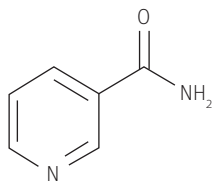


Rycina 8. Inhibitor peroksydazy: metimazol

oksydatywną polimeryzację indolowych monomerów melaniny do eumelaniny oraz polimeryzację benzotiazynowych prekursorów feomelaniny. Stosowany doustnie jako tyreostatyk metimazol (rycina 8), po podaniu powierzchniowym wykazuje właściwości hamujące aktywność peroksydazy. W konsekwencji spada ilość powstającej w melanocytach melaniny. Metimazol nie jest na razie stosowany standardowo jako środek depigmentujący, jednak jego wysoka aktywność w przypadku przebarwień opornych na hydrochinon oraz dobra tolerancja sugerują możliwość jego szerszego wykorzystania w terapii [23, 24].

Antyoksydanty

Reaktywne formy tlenu wykazują ambiwalentny wpływ na melanogenezę, mogą bowiem sprzyjać zarówno odbarwieniu, jak i hiperpigmentacji. Podwyższony poziom dysmutazy ponadtlenkowej i obniżony poziom katalazy w keratynocytach uważany jest za jedną z prawdopodobnych przyczyn zmian bielaczych. Upośledzony system antyoksydacyjny prowadzi do nagromadzenia nadtlenu w keratynocytach i jego transport przez błony do melanocytów. Z drugiej strony, nadtlenek wodoru aktywuje hydroksylazę fenyloalaninową (*phenylalanine hydroxylase* PAH), zwiększając tym samym ogólną pulę *L*-tyrozyny (substratu dla tyrozynazy), w powstawaniu której bierze udział PAH [25]. Mimo wszystko antyoksydanty bywają wykorzystywane w terapii zaburzeń hiperpigmentacyjnych. Udokumentowano działanie wybielające m.in.: kwasu galusowego, kwasu askorbinowego, α -tokoferolu oraz ich pochodnych (rycina 9),



Rycina 10. Nikotynamid

a także substancji z grupy polifenoli zawartych np. w zielonej herbacie [26–29].

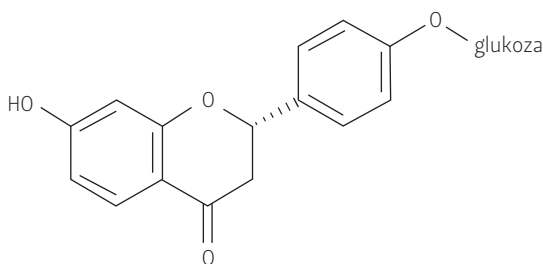
Regulacja wychwytu i dystrybucji melanosomów

Transport melanosomów do keratynocytów odbywa się poprzez fagocytozę, która jest mediowana przez zlokalizowany na keratynocytach, wrażliwy na trypsynę receptor PAR-2 (*protease-activated receptor-2*). Zawarte w soi inhibitory proteaz serynowych (do których należy między innymi trypsyna) – sojowy inhibitor trypsyny (*soybean trypsin inhibitor*, STI) i inhibitor proteazy z rodziny Bowmana-Birka (BBI) – hamują aktywność receptora. Konsekwencją jest spadek ilości fagocytowanych do wnętrza keratynocytów melanosomów oraz zmniejszona produkcja melaniny [30]. Ponadto dowiedziono protekcyjnego działania STI oraz BBI w stosunku do uszkodzeń wywołanych promieniowaniem UVB. Inhibitory proteaz serynowych są termolabilnymi białkami, wobec czego proces uzyskiwania ekstraktu z soi musi być odpowiednio przeprowadzony, tak by nie doprowadzić do denaturacji jego aktywnych składników. Ekstrakt z soi wpływa pozytywnie na skórę także dzięki zawartości izoflawonów (np. genisteiny, daidzeiny, glicyteiny) o właściwościach antyoksydacyjnych [29].

Transport melanosomów jest również celem terapeutycznym dla nikotynamidu (**rycina 10**), biologicznie aktywnej formy witaminy PP (B_3) oraz lektyn. Ich mechanizm działania nie został jednak tak dobrze poznany jak w przypadku inhibitorów proteaz serynowych [13].

Degradacja melanosomów i melaniny

Substancje złuszczone, tzw. eksfolianty, stymulują proces odnawiania naskórka, przyspieszając usuwanie keratynocytów wraz ze zgromadzoną w nich melaniną. Powierzchniowe zastosowanie takich eksfoliantów, jak kwasy owocowe (α -hydroksykwas – AHA, β -hydroksykwas – BHA, polihydroksykwas – PHA) czy retinoidy sprawia, że przebarwienia stają się bledsze i mniej widoczne. Często wykorzystywana aplikacja w postaci peelingu pozwala na intensyfikację efektu złuszczonego, wymaga jednak ostrożności



Rycina 11. Likwirytyna

ze względu na możliwość wystąpienia podrażnień. Dodatkowym mechanizmem działania kwasów jest miejscowe obniżenie pH, co prowadzi do zaburzenia optymalnego środowiska działania tyrozynazy, a w konsekwencji do zahamowania jej aktywności [11, 13]. Efekt rozjaśniający można również uzyskać, wywołując bezpośredni rozkład cząsteczki melaniny. Stosowaną substancją jest obecny w korzeniu lukrecji flawanon – likwirytyna (**rycina 11**), która swoje właściwości zawdzięcza pierścieniowi γ -pironowemu [31].

Podsumowanie

Zaburzenia barwnikowe przebiegające z hiperpigmentacją, nawet jeśli są zmianami łagodnymi, mogą stanowić dla pacjentów problem estetyczny i wymagać leczenia. Różnorodność występujących objawów skórnych i ich zmienność osobnicza utrudnia diagnostykę i prowadzi do wyróżniania licznych typów hiperpigmentacji. Do najczęściej występujących należą piegi, plamy soczewicowate, ostuda, hiperpigmentacja pozapalna, melanoza Riehla oraz odczyn fototoksyczne. Ważnym aspektem przeciwdziałania przebarwieniom jest profilaktyka, polegająca przede wszystkim na unikaniu narażenia na czynniki predysponujące, a także eliminacja przyczyny pierwotnej, jeśli hiperpigmentacja ma charakter wtórny (np. terapia zapaleń skóry). Podstawą leczenia pozostaje jednak usuwanie istniejących przebarwień. Obok wciąż doskonałych metod fizycznych (terapia laserowa, mechaniczne złuszczenie naskórka) istnieje gama aplikowanych zewnętrznie preparatów zaburzających syntezę melaniny, jej dystrybucję międzykomórkową lub wywołujących jej degradację, po które często pacjenci sięgają w pierwszej kolejności. Ze względu na wrażliwość organu, jakim jest skóra, stosowane substancje czynne często charakteryzują się jednak wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia działań niepożądanych (np. hydrochinon) lub też niską skutecznością kliniczną. Zwiększenie bezpieczeństwa terapii uzyskuje się poprzez zastosowanie niskich stężeń substancji czynnych, co prowadzi jednak do wydłużenia czasu terapii. Wiele związków z grupy flawonoidów lub antyutleniaczy wchodzi

przede wszystkim w skład preparatów złożonych, pełniąc rolę wspomagającą. Pomimo istnienia wielu substancji wybielających o zróżnicowanym mechanizmie działania, problem zarówno skutecznej, jak i bezpiecznej terapii przebarwień wciąż stanowi wyzwanie.

Otrzymano: 2014.04.17 · Zaakceptowano: 2014.05.02

Piśmiennictwo

- Noszczyk M. (red.): Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska. Wyd. 1. PZWL Warszawa, 2010, 169–177. ISBN: 978-83-200-3620-6.
- Jurkowska S., Rusin A.: Wybrane zagadnienia z biologii komórki. Aspekty kosmetyczne, Tom I. Wyd. 2. Dąbrowa Górnicza: Ośrodek Informatyczno-Badawczy „Ekoprzem”, 2005, 378–407. ISBN: 83-909-417-5-9.
- Praetorius C., Sturm R. A., Steingrimsson E.: Sun-induced freckling: ephelides and solar lentigines. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517859> (stan z 23.03.2014).
- Speeckaert R., Van Gele M., Speeckaert M. M., Lambert J., van Geel N.: The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24612852> (stan z 23.03.2014).
- Cestari T. F., Dantas L. P., Boza J. C.: Acquired hyperpigmentations. *An Bras Dermatol.* 2014, 89(1): 11–25.
- Wang L., Xu A. E.: Four views of Riehl's melanosis: clinical appearance, dermoscopy, confocal microscopy and histopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24010902> (stan z 04.04.2014).
- Tan C. H., Rasool S., Johnston G. A.: Contact dermatitis: allergic and irritant. *Clin Dermatol.* 2014, 32(1): 116–124.
- Nicolaidou E., Katsambas A. D.: Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. *Clin Dermatol.* 2014, 32(1): 66–72.
- Stulberg D. L., Clark N., Tovey D.: Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, café au lait macules, diffuse hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions. *Am Fam Physician.* 2003, 68(10): 1955–1960.
- Gould J. W., Mercurio M. G., Elmets C. A.: Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J Am Acad Dermatol.* 1995, 33(4): 551–573.
- Briganti S., Camera E., Picardo M.: Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. 2003, 16(2): 101–110.
- Parvez S., Kang M., Chung H. S., Cho C., Hong M. C., Shin M. K., Bae H.: Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. 2006, 20(11): 921–934.
- Gillbro J. M., Olsson M. J.: The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci.* 2011, 33(3): 210–221.
- Gandhi V., Verma P., Naik G.: Exogenous ochronosis after prolonged use of Topical hydroquinone (2%) in a 50-year-old Indian female. *Indian J Dermatol.* 2012, 57(5): 394–395.
- Bochet C., Gouron A., Bubacco L., Milet A., Philouze C., Réglier M., Serratrice G., Jamet H., Belle C.: Probing kojic acid binding to tyrosinase enzyme: insights from a model complex and QM/MM calculations. *Chem Commun (Camb).* 2014, 50(3): 308–310.
- Mastrofrancesco A., Ottaviani M., Aspite N., Cardinali G., Izzo E., Graupe K., Zouboulis C. C., Camera E., Picardo M.: Azelaic acid modulates the inflammatory response in normal human keratinocytes through PPARgamma activation. *Exp Dermatol.* 2010, 19(9): 813–820.
- Kolbe L., Mann T., Gerwat W., Batzer J., Ahlheit S., Schermer C., Wenck H., Stäb F.: 4-N-Butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013, 27 Suppl 1: 19–23.
- Khatib S., Nerya O., Musa R., Tamir S., Peter T., Vaya J.: Enhanced substituted resorcinol hydrophobicity augments tyrosinase inhibition potency. *J Med Chem.* 2007, 50(11): 2676–2681.
- Khatib S., Nerya O., Musa R., Shmuel M., Tamir S., Vaya J.: Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13(2): 433–441.
- Chang T. S.: An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009, 10(6): 2440–2475.
- Ando H., Wen Z. M., Kim H. Y., Valencia J. C., Costin G. E., Watabe H., Yasumoto K., Niki Y., Kondoh H., Ichihashi M., Hearing V. J.: Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem J.* 2006, 394 (Pt 1): 43–50.
- Ando H., Funasaka Y., Oka M., Ohashi A., Furumura M., Matsunaga J., Matsunaga N., Hearing V. J., Ichihashi M.: Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J Lipid Res.* 1999, 40(7): 1312–1316.
- Kasraee B., Handjani F., Parhizgar A., Omrani G. R., Fallahi M. R., Amini M., Nikbaksh M., Tran C., Hügin A., Sorg O., Saurat J. H.: Topical methimazole as a new treatment for postinflammatory hyperpigmentation: report of the first case. *Dermatology.* 2005, 211(4): 360–362.
- Malek J., Chedraoui A., Nikolic D., Barouti N., Ghosn S., Abbas O.: Successful treatment of hydroquinone-resistant melasma using topical methimazole. *Dermatol Ther.* 2013, 26(1): 69–72.
- Masaki H.: Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci.* 2010, 58(2): 85–90.
- Kim Y. J.: Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30(6): 1052–1055.
- Panich U., Tangsupa-a-nan V., Onkoksoong T., Kongtaphan K., Katsetsinsombat K., Akarasereenont P., Wongkajornsilp A.: Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch Pharm Res.* 2011, 34(5): 811–820.
- Funasaka Y., Chakraborty A. K., Komoto M., Ohashi A., Ichihashi M.: The depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *Br J Dermatol.* 1999, 141(1): 20–29.
- Leyden J. J., Shergill B., Micali G., Downie J., Wallo W.: Natural options for the management of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011, 25(10): 1140–1145.
- Leyden J., Wallo W.: The mechanism of action and clinical benefits of soy for the treatment of hyperpigmentation. *Int J Dermatol.* 2011, 50(4): 470–477.
- Amer M., Metwalli M.: Topical liquiritin improves melasma. *Int J Dermatol.* 2000, 39(4): 299–301.

Występowanie wybranych biopierwiastków o znaczeniu prozdrowotnym w grzybach wielkoowocnikowych oraz stosowane w ich oznaczaniu metody analityczne

Magdalena Zajac¹, Bożena Muszyńska², Włodzimierz Opoka¹

¹ Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

² Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Adres do korespondencji: Bożena Muszyńska, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: muchon@poczta.fm

Occurrence of some microelements about the importance of pro-health in mushrooms macrofungi and the analytical methods used in their analysis

Currently there is a considerable increase in consumer interest in edible species of mushrooms. Their frequent occurrence as a component of the diet makes the monitoring of their qualitative and quantitative bio elemental composition more important. Micronutrients accumulated in mushrooms from environment, play role as enzymes components/activators, and can be found in mushrooms pigment structures. This study discusses the occurrence of microelements such as Se, Zn, Cu, Mg and Fe in fruiting bodies of popular edible mushrooms. Tested fungal species showed following concentrations of discussed micronutrients: selenium (0.5–20 mg/kg dry weight), zinc (25–200 mg/kg dry weight), copper (<25–200 mg/kg dry weight), magnesium (<25–125 mg/kg dry weight) and iron (<50–400 mg/kg dry weight). Analytical methods most commonly applied to analysis of microelements in mushroom spectroscopic methods: Atomic Absorption Spectrometry, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Atomic Fluorescence Spectrometry and electrochemical methods, for example anodic and cathodic stripping voltammetry and other methods such as Neutron Activation Analysis.

Keywords: edible mushrooms, selenium, zinc, copper, magnesium, iron, micronutrients, macronutrients.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 336–344

Ciągle rosnące zainteresowanie konsumentów jadalnymi gatunkami grzybów oraz ich wykorzystanie jako składnika diety powoduje konieczność monitorowania składu jakościowego i ilościowego biopierwiastków zawartych w ich

owocnikach. Biopierwiastki akumulowane z otoczenia przez grzyby pełnią w nich rolę jako składniki enzymów bądź są ich aktywatorami, a także można je znaleźć w strukturze barwników tych organizmów. W niniejszym opracowaniu omówiono występowanie w owocnikach popularnych grzybów jadalnych następujących biopierwiastków: selen (Se), cynku (Zn), miedzi (Cu), magnezu (Mg) i żelaza (Fe). W badanych gatunkach grzybów jadalnych stwierdzono zawartości omawianych biopierwiastków w następujących stężeniach: selen (0,5–20 mg/kg suchej masy [s.m.]), cynk (25–200), miedź (25–200), magnez (25–125) oraz żelazo (50–400). Wśród wielu metod analitycznych najczęściej stosowanymi w analizie biopierwiastków w grzybach są metody spektroskopowe: absorpcyjna spektrometria atomowa (*Atomic Absorption Spectrometry*, AAS), emisyjna spektrometria atomowa ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*, ICP – AES), spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, ICP – MS), atomowa spektrometria fluorescencyjna (*Atomic Fluorescence Spectroscopy*, AFS) wykorzystywana jest również neutronowa analiza aktywacyjna (*Neutron Activation Analysis*, NAA) oraz anodowa i katodowa voltamperometria stripingowa (*Anodic Stripping Voltammetry*, ASV; *Cathodic Stripping Voltammetry*, CSV).

Dostarczenie dziennej dawki mikro- oraz makroelementów jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Istotne jest

również zapewnienie odpowiedniej równowagi pomiędzy nimi, a także optymalnej dawki przyjmowanych składników mineralnych ze względu na to, że zarówno ich nadmiar, jak i niedobór może być dla organizmu człowieka szkodliwy. Udowodniono, że źle zbilansowane stężenie składników mineralnych w diecie ma wpływ na rozwój chorób układu naczyniowo-sercowego, cukrzycy, osteoporozy, a także niektórych chorób nowotworowych [1–3]. Mimo łatwego dostępu do produktów spożywczych bogatych w mikro- i makroelementy oraz produkty wzbogacane w te składniki, nadal występują nieprawidłowości w bilansowaniu codziennej diety. Niedobory te dotyczą m.in. cynku, magnezu, miedzi i selenu [4, 5]. Są to pierwiastki, które ze względu na swoje właściwości antyoksydacyjne oraz udział w licznych szlakach metabolicznych zasługują na szczególną uwagę. Podejmowane próby hodowania grzybów wzbogacanych w biopierwiastki, tak jak to ma już miejsce w przypadku pieczarki, wydaje się być dobrym kierunkiem badań, który w przyszłości zapewni dostęp do diety bogatej w naturalne składniki, w tym biopierwiastki.

Grzyby, organizmy eukariotyczne stanowiące osobne królestwo, występują na ziemi w szacunkowej liczbie ok. 10 milionów gatunków, z czego opisano 1,5 miliona. Współcześnie według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa opisano 1350 gatunków grzybów jadalnych. Więcej niż 700 gatunków posiada znaczące działanie farmakologiczne. W pierwszych doniesieniach dotyczących leczniczego działania grzybów w czasach starożytnych opisywano gatunki chińskiego „grzyba wiecznego życia” (*Gonoderma lucidum*), japońskiego „grzyba długiego życia” (*Lentinula edodes*), a także meksykańskiego „grzyba bogów” (*Psilocybe semilanceolata*). Lecznicze właściwości grzybów wykorzystywane były znacznie częściej w medycynie ludowej Chin, Japonii czy Malezji niż w Europie. W Europie po raz pierwszy opisane były one dopiero w IV w. p.n.e. przez Hipokratesa [6, 7]. Pomimo ogromnego (organizmy kosmopolityczne) rozpowszechnienia grzybów, stanowią one zbyt rzadki składnik diety człowieka oraz pozostają nadal niedocenianym źródłem pokarmowym i leczniczym. W ostatnich latach obserwuje się jednak rosnącą konsumpcję grzybów jadalnych [8–10]. Na podstawie licznych analiz składu chemicznego, w tym zawartości biopierwiastków, można stwierdzić, że grzyby stanowią wartościowe źródło niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju składników [7]. Szczególnie wysoka zdolność grzybów jadalnych do akumulacji pierwiastków (wielokrotnie wyższa niż w przypadku roślin) jest powodem wzmózonych analiz oraz publikowania informacji na ich temat [11]. Właściwości przeciwnowotworowe i antyoksydacyjne grzybów

leczniczych wiążą się m.in. z ich zdolnością do akumulacji w ich owocnikach znacznych ilości selenu, cynku, magnezu, żelaza i miedzi.

Biopierwiastki w wybranych gatunkach grzybów jadalnych

Selen

Selen jest pierwiastkiem znajdującym się w 16 grupie układu okresowego. Z wodorem tworzy słaby kwas beztlenowy, a w reakcji z tlenem tworzy tlenki, które są bezwodnikami kwasowymi. Jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania, a także rozwoju organizmów żywych. Pierwiastek ten występuje w znaczących ilościach w glebie, dzięki czemu istnieje możliwość wchłaniania, kumulowania i wiązania w połączenia organiczne jego jonów i soli przez grzyby i rośliny [12]. Kumulacja selenu w glebach cechuje się dużą zmiennością; w przypadku gleb bogatych jest to ok. 5 mg/kg s.m., natomiast w powierzchniowych warstwach gleby przeciętnie jest to poniżej <0,5 mg selenu/kg s.m. [13, 14]. Zakres tolerancji selenu w organizmie człowieka pomiędzy dawką terapeutyczną a dawką szkodliwą jest niewielki. W tabeli 1 przedstawione zostały zalecane wartości dobowego zapotrzebowania na selen [15].

Selen odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek odpornościowych człowieka. Niedobór selenu może prowadzić do zahamowania odpowiedzi immunologicznej, co skutkuje zwiększeniem podatności na infekcje bakteryjne i wirusowe. Selen jest istotnym czynnikiem w walce z wolnymi rodnikami, co wynika z jego obecności w strukturze dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Mechanizm działania w tym przypadku polega na ograniczeniu lub inhibicji biosyntezy prostaglandyn i immunoglobulin, a także prowadzić może do zmniejszenia aktywności limfocytów T, komórek NK i makrofagów [16–18]. Niedobór selenu powoduje przedwczesne urodzenia, małe masy noworodków, a nawet poronienia. Na rynku farmaceutycznym pojawiło się wiele preparatów zawierających ten pierwiastek. Są to głównie preparaty wielowitaminowe i wielomineralowe. Selen wchodzący w ich skład

Tabela 1. Dobowe zapotrzebowania na selen [15]

Grupa ludności	Zapotrzebowanie na selen (µg/doba)
Niemowlęta	15–20
Dzieci	20–30
Chłopcy	40–55
Mężczyźni	45–55
Dziewczęta	40–55
Kobiety	55
Kobiety w ciąży	60

Tabela 2. Zawartość selenu w wybranych gatunkach grzybów jadalnych [mg/kg s.m.] [20]

Gatunek	Zawartość mg/kg s.m.	Źródło
<i>Agaricus arvensis</i>	2–5	[21]
<i>Agaricus campestris</i>	5–10	[22]
<i>Agaricus silvicola</i>	1–2	[21,23]
<i>Boletus edulis</i>	5–>20	[21,22]
<i>Boletus badius</i>	<0,5	[23]
<i>Boletus reticulatus</i>	10–20	[22]
<i>Cantharellus cibarius</i>	<0,5	[23]
<i>Leccinum scabrum</i>	1–2	[23]
<i>Lycoperdon perlatum</i>	2–10	[22]
<i>Macrolepiota procera</i>	1–10	[21]
<i>Suillus granulatus</i>	1–5	[21]
<i>Tricholoma terreum</i>	1–2	[21]

na ogół występuje w postaci selenianu(IV) sodu, ale również i drożdży selenowych. Są to produkty przygotowane na bazie drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i *ovarium* z wbudowanym w procesie biotechnologicznym jonem Se^{2-} w struktury aminokwasów białek drożdżowych. Selen zawsze występuje w owocnikach grzybów jadalnych. Szczegółowe dane odnośnie do zawartości tego pierwiastka dotyczą około 200 gatunków grzybów jadalnych z 21 rodzin [19]. Zawartość selenu w owocnikach grzybów jadalnych zależy od gatunku oraz



Fotografia 1. Borowik szlachetny – *Boletus edulis*

w warunków glebowych. W tabeli 2 podano zawartość selenu w wybranych gatunkach grzybów jadalnych.

W przypadku wymienionych gatunków grzybów jadalnych stężenie selenu mieści się w granicach 0,5 do 20 mg/kg s.m. Wśród nich najwyższe stężenie selenu oznaczono w przypadku Borowika szlachetnego (*Boletus edulis*) (fotografia 1) oraz Borowika usiatkowanego (*Boletus reticulatus*). W dziko rosnących pieczarkowatych zawartość selenu wynosiła 5 $\mu\text{g/g}$ s.m., w pozostałych gatunkach nie mniej niż 1 $\mu\text{g/g}$ s.m. Rekordowe stężenie 400 mg/kg s.m. oznaczono w owocnikach Bielaczka koziołnogiego (*Albatellus prescaprae*) [12].

Dla porównania żywność pochodzenia roślinnego zawiera od 0,017 do 0,12 $\mu\text{g/g}$ s.m selenu, przykładowo w warzywach od $6,2 \cdot 10^{-3}$ do $8,9 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/g}$ s.m., natomiast owoce ze względu na obecność skrobi praktycznie nie zawierają tego pierwiastka. Wyższe zawartości selenu oznaczono w rybach morskich i owocach morza (0,56 do 2,00 $\mu\text{g/g}$ s.m.) [19]. Należy podkreślić, że grzyby jadalne są najlepszym źródłem pokarmowym tego pierwiastka ze względu na jego wysokie zawartości w ich owocnikach.

Cynk

Lecznicze właściwości cynku były już znane w Starożytnym Rzymie, kiedy to za panowania cesarza Augusta rudy cynku przykładano na skórę i na okolice oczu w miejscach zmienionych stanem zapalnym. Cynk jest metalem znajdującym się w 12 grupie układu okresowego. W organizmie człowieka jest ok. 2–4 g cynku i występuje prawie we wszystkich tkankach, tj.: w skórze, wątrobie, nerkach i śledzionie, a największa jego ilość znajduje się w kościach (30% całkowitej zawartości) i mięśniach (55%). Jest pierwiastkiem egzogennym dostarczającym do organizmu człowieka wraz z pokarmem. Wchłania się głównie w jelicie cienkim. Jego transport przez błonę jelita ułatwia kwas pikolinowy, który jest czynnikiem wiążącym i transportującym ten biopierwiastek [24]. W tabeli 3 przedstawiono aktualne dobowe zapotrzebowania na cynk.

Udowodnione jest, że potencjalna rola cynku w leczeniu depresji polega na modulowaniu wrażliwości receptorów glutaminowych typu NMDA, niezbędnych do właściwego działania leków przeciwdepresyjnych. Cynk pełni w organizmie człowieka liczne funkcje: jest aktywatorem enzymów, m.in. dezaminazy histydynowej katalizującej reakcję deaminowania, arginazy biorącej udział w cyklu mocznikowym, lecytynazy rozkładającej lecytynę, dipeptydazy: glicyloglicynowej, glicyloleucynowej czy tripeptydazy rozkładających peptydy. Ponadto wchodzi w skład takich enzymów, jak: anhidraza węglanowa katalizująca odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego HCO_3^- z wody i ditlenku węgla, dehydrogenaza mleczanowa katalizująca

Tabela 3. Dobowe zapotrzebowanie na cynk [15]

Grupa ludności	Zapotrzebowanie na cynk (mg/doba)
Niemowłeta	3
Dzieci	3–5
Chłopcy	8–11
Mężczyźni	11
Dziewczęta	8–9
Kobiety	8
Kobiety w ciąży	11–12

ostatni etap szlaku glikolitycznego, dehydrogenaza jabłczanowa, która bierze udział w cyklu Krebsa, dehydrogenaza glutaminianowa katalizująca reakcję przekształcenia L-glutaminianu w α -ketoglutaran i jon amonu, dehydrogenaza etanolowa przyspieszająca przekształcanie etanolu w aldehyd octowy, fosfataza alkaliczna katalizująca defosforylację estrów fosforanowych, karboksypeptydaza hydrolizująca C-końcowe wiązanie peptydowe czy polimeraza RNA biorąca udział w transkrypcji. Cynk wchodzi również w skład aminoacylo-tRNA syntetaz – enzymów biorących udział w aktywacji aminokwasów. Udowodniona jest również istotna rola cynku w procesach immunomodulujących. Ponadto jest to pierwiastek niezbędny do prawidłowego wzrostu czy utrzymywania właściwej struktury skóry i błon śluzowych [25]. W tabeli 4 przedstawiono zawartość cynku w wybranych gatunkach grzybów jadalnych.

Tabela 4. Zawartość cynku w wybranych gatunkach grzybów [mg/kg s.m.] [20]

Gatunek	Zawartość [mg/kg s.m.]	Źródło
<i>Agaricus arvensis</i>	75–100	[21]
<i>Agaricus campestris</i>	75–200	[22, 26]
<i>Agaricus silvicola</i>	75–150	[21, 26]
<i>Boletus badius</i>	25–200	[26, 28]
<i>Boletus edulis</i>	75–200	[21, 22, 26]
<i>Boletus pinophilus</i>	50–125	[26]
<i>Cantharellus cibarius</i>	50–100	[27]
<i>Leccinum scabrum</i>	25–75	[26]
<i>Lycoperdon perlatum</i>	150–200	[22]
<i>Macrolepiota procera</i>	50–100	[26]
<i>Suillus granulatus</i>	50–75	[21]
<i>Tricholoma terreum</i>	50–125	[28]

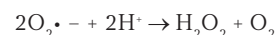
W przypadku wyżej wymienionych gatunków grzybów jadalnych zawartość oznaczonego cynku waha się w zakresie 25–200 mg/kg s.m. Wśród nich najlepszym źródłem cynku jest Purchawka chropowata (*Lycoperdon perlatum*), w której zawartość cynku mieści się w zakresie 150–200 mg/kg s.m. Dobrym źródłem tego pierwiastka są także: Pieczarka łąkowa (*Agaricus campestris*), Borowik szlachetny (*Boletus edulis*), Czubajka kania (*Macrolepiota procera*) (fotografia 2), Podgrzybek brunatny (*Boletus badius*) czy Koźlarz babka (*Leccinum scabrum*) (fotografia 3).

**Fotografia 2.** Czubajka Kania – *Macrolepiota procera***Fotografia 3.** Koźlarz babka – *Leccinum scabrum*

Miedź

Miedź jest mikroelementem, metalem należącym do 14 grupy układu okresowego. Pierwiastek ten jest składnikiem centrum aktywnego wielu enzymów, a wraz z cynkiem jest w strukturze dysmutazy ponadtlenkowej (*Superoxide Dismutase*, SOD). Dysmutaza ponadtlenkowa stanowi metaloenzym, który uczestniczy w zasadniczym mechanizmie ochronnym przed toksycznym działaniem wolnych rodników w organizmie człowieka, katalizuje reakcje rozkładu anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku diwodoru i tlenu cząsteczkowego. SOD katalizuje reakcję przekształcenia cytotoksycznego anionorodnika

ponadtlenkowego $O_2\cdot^-$ w nadtlenek diwodoru i tlen wg poniższej reakcji:



W tabeli 5 przedstawiono wartości dziennego zapotrzebowania na miedź. Enzym SOD występuje w dwóch formach: wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Wewnątrzkomórkowa odmiana enzymu zlokalizowana jest w cytoplazmie, a jej centrum aktywne stanowi miedź i cynk [29]. Miedź jest również niezbędna do metabolizmu żelaza oraz syntezy hemu, bierze udział w wytwarzaniu wiązań krzyżowych kolagenu i elastyny, syntezie melaniny, utrzymaniu struktury keratyny, a także jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego [15]. W tabeli 6 zestawiono zawartość miedzi w wybranych gatunkach grzybów jadalnych. Wśród wyżej wymienionych gatunków grzybów jadalnych zawartość miedzi mieści się w zakresie 25–200 mg/kg s.m. Najwyższą zawartość miedzi odnotowano w *Purchawce chropowatej*, a także *Czubajce kani*, u których kumulacja tego pierwiastka sięga 100–200 mg/kg s.m. Wymienione grzyby stanowią dobre źródło miedzi i mogą stanowić uzupełnienie diety w ten pierwiastek.

Tabela 5. Dobowe zapotrzebowania na miedź [15]

Grupa ludności	Zapotrzebowanie na miedź (mg/doba)
Niemowlęta	0,2–0,3
Dzieci	0,3–0,7
Chłopcy	0,7–0,9
Mężczyźni	0,9
Dziewczęta	0,7–0,9
Kobiety	0,9
Kobiety w ciąży	1,0

Tabela 6. Zawartość miedzi w wybranych gatunkach grzybów jadalnych [mg/kg s.m.] [20]

Gatunek	Zawartość [mg/kg s.m.]	Źródło
<i>Agaricus arvensis</i>	25–50	[21]
<i>Agaricus bisporus</i>	25–125	[26]
<i>Agaricus silvicola</i>	100–200	[26]
<i>Boletus edulis</i>	<25–75	[21, 26]
<i>Boletus badius</i>	25–75	[26, 28]
<i>Boletus pinophilus</i>	<25–75	[26]
<i>Cantharellus cibarius</i>	25–75	[26, 27]
<i>Hygrophorus eburneum</i>	25	[27]
<i>Lycoperdon perlatum</i>	100–200	[30]
<i>Macrolepiota procera</i>	150–>200	[26, 30]
<i>Suillus granulatus</i>	25–50	[21]
<i>Tricholoma terreum</i>	25–50	[21, 31]

Tabela 7. Dobowe zapotrzebowania na magnez [15]

Grupa ludności	Zapotrzebowanie na magnez (mg/doba)
Niemowlęta	30–70
Dzieci	80–130
Chłopcy	240–410
Mężczyźni	400–420
Dziewczęta	240–360
Kobiety	310–320
Kobiety w ciąży	400–360

Magnez

Magnez to metal występujący w drugiej grupie układu okresowego. W organizmie człowieka należy do grupy makroelementów i dzienne zapotrzebowanie organizmu człowieka na ten pierwiastek wynosi ok. 20–350 mg [32]. Dystrybucja magnezu w organizmie człowieka przedstawia się następująco: 60% jest w układzie kostnym w postaci związków nieorganicznych magnezu, 39% wewnątrzkomórkowo w mięśniach i 1% zewnątrzkomórkowo w pozostałych tkankach organizmu, w tym we krwi. Zarówno u dzieci, jak i dorosłych magnez wchłaniany jest z przewodu pokarmowego w 15–35%. Stopień wchłaniania magnezu zależy od obecności spożywanego białka, błonnika, a także przyjmowanych fitynianów i fosforanów(V). Niedobór tego pierwiastka prowadzi do istotnych zaburzeń, takich jak: zwiększona pobudliwość nerwowo-mięśniowa, osłabienie organizmu, łatwe męczenie się, skurcze mięśni kończyn, a także bardzo często do zaburzeń rytmu serca (objawy, takie jak: skurcze dodatkowe, migotanie przedsionków, częstoskurcz komorowy i migotanie komór, drżenie powiek i warg) [32, 33]. W tabeli 7 zestawiono dzienne zapotrzebowanie na magnez z uwzględnieniem płci oraz wieku. W tabeli 8 zaprezentowano wartości magnezu w wybranych gatunkach grzybów jadalnych.

Wśród wyżej wymienionych gatunków grzybów jadalnych zawartości magnezu mieszczą się

w zakresie 25–125 mg/kg s.m. Najlepszym źródłem tego biopierwiastka są: Borowik szlachetny, w którym zawartość magnezu sięga 75–125 mg/kg s.m., a także Czubajka kania.

Żelazo

Dzienne zapotrzebowanie na ten pierwiastek zależy od wieku i płci człowieka, mieszcząc się w zakresie 7–27 mg/dobę. Najwyższe zapotrzebowanie na żelazo obserwuje się u kobiet w ciąży. Około 75% przyswojonego żelaza znajduje się w metabolicznie aktywnych związkach, takich jak: hemoglobina, mioglobina, transferyna. W wyniku niedoboru tego pierwiastka obserwuje się obniżenie jego stężenia w tkankach, a także niedokrwistość, zmiany w śluzówce, zaburzenia termoregulacji ciała, obniżenie sprawności fizycznej, obniżenie odczuwania bodźców sensorycznych; niedobór żelaza istotnie wpływa również na obniżenie odporności organizmu [45, 46]. Ponadto żelazo odgrywa istotną rolę w szpiku kostnym, gdzie wykorzystywane jest do syntezy hemoglobiny w erytrocytach. Wpływa także na metabolizm cholesterolu i przyczynia się do detoksykacji organizmu. Bogatym źródłem żelaza są: wątroba cielęca, natka pietruszki, rośliny strączkowe, spirulina [15]. W tabeli 9 przedstawiono dzienne zapotrzebowanie na żelazo z podziałem na płeć oraz wiek. W tabeli 10 zestawiono wartości żelaza w wybranych gatunkach grzybów jadalnych.

W przypadku wyżej wymienionych gatunków grzybów jadalnych zawartość żelaza waha się w zakresie 50–400 mg/kg s.m. Wśród nich najlepszym źródłem żelaza jest Pieczarka dwuzarodnikowa, w której zawartość żelaza wynosi 200–400 mg/kg s.m. Dobrym źródłem tego pierwiastka są także: Gaska ziemistoblaszkowa (*Tricholoma terreum*) oraz Podgrzybek brunatny. W literaturze opisano również gatunki grzybów, w których zawartość żelaza sięga 500 mg/kg s.m., wśród jadalnych gatunków jest to np. Opieńka miodowa (*Armillaria mellea*).

Metody analityczne stosowane w analizie biopierwiastków w grzybach wielkoowocnikowych

W celu przygotowania próbek do analizy wykonuje się w odpowiednich warunkach mineralizację materiału grzybowego, a następnie dokonuje się oznaczenia różnymi metodami instrumentalnymi.

Spektroskopia atomowa

W analizie z użyciem spektroskopii wykorzystuje się zjawiska pochłaniania lub emitowania promieniowania elektromagnetycznego.

Tabela 8. Zawartość magnezu w wybranych gatunkach grzybów [mg/kg s.m.] [20]

Gatunek	Zawartość [mg/kg s.m.]	Źródło
<i>Agaricus arvensis</i>	75–100	[21]
<i>Agaricus bisporus</i>	25–50	[28]
<i>Boletus appendiculatus</i>	25–75	[21]
<i>Boletus badius</i>	<25	[8, 28]
<i>Boletus edulis</i>	75–125	[21]
<i>Calvatia utriformis</i>	25–50	[34]
<i>Cantharellus cibarius</i>	<25	[27]
<i>Leccinum scabrum</i>	<25	[8]
<i>Lepista nuda</i>	<25–75	[21, 28]
<i>Macrolepiota procera</i>	75–125	[28]
<i>Suillus granulatus</i>	75–100	[21]
<i>Tricholoma terreum</i>	<25–125	[21, 28]

Tabela 9. Dobowe zapotrzebowania na żelazo [15]

Grupa ludności	Zapotrzebowanie na żelazo (mg/doba)
Niemowlęta	0,3
Dzieci	7–10
Chłopcy	10–12
Mężczyźni	10
Dziewczęta	15
Kobiety	10–18
Kobiety w ciąży	27

Tabela 10. Zawartość żelaza w wybranych gatunkach grzybów [mg/kg s.m.] [19]

Gatunek	Zawartość [mg/kg s.m.]	Źródło
<i>Agaricus bisporus</i>	200–400	[28]
<i>Boletus badius</i>	50–300	[8, 28]
<i>Boletus edulis</i>	<50	[22]
<i>Cantharellus cibarius</i>	100–150	[27]
<i>Leccinum scabrum</i>	<50	[8]
<i>Lepista nuda</i>	50–400	[27, 28]
<i>Lycoperdon perlatum</i>	50–150	[22]
<i>Suillus luteus</i>	<50	[22]
<i>Tricholoma terreum</i>	200–300	[28]

W wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z wolnymi atomami otrzymuje się, zarówno w przypadku absorpcji, jak i emisji, widmo liniowe. Spektroskopię dzieli się na: absorpcyjną, emisyjną, fluorescencyjną oraz spektroskopię mas. Absorpcyjna spektrometria atomowa (*Atomic Absorption Spectrometry*, AAS) i emisyjna spektrometria atomowa (*Atomic Emission Spectrometry*, AES) są często stosowane rutynowo do oznaczania pierwiastków w różnym materiale

biologicznym, w tym w grzybach [49]. Dużą zaletą obu metod jest krótki czas pojedynczego oznaczenia i możliwość prowadzenia zautomatyzowanych oznaczeń seryjnych.

Metody, w których wykorzystuje się plazmę wzbudzoną indukcyjnie zapewniają bardzo skuteczny sposób wzbudzania i umożliwiają otrzymanie bogatego widma oznaczanych pierwiastków. W celu analizy biopierwiastków w materiale grzybowym stosuje się emisyjną spektrometrię atomową ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (*Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*, ICP-AES), oraz stosując ten sam sposób wzbudzania w zestawieniu ze spektrometrem mas, oznacza się jony wielu pierwiastków (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS). Przewagą tej grupy metod jest krótki czas analizy, a także możliwość oznaczania kilku pierwiastków równocześnie. Do bardzo czułych metod należy również atomowa spektrometria fluorescencyjna (*Atomic Fluorescence Spectroscopy*, AFS) należąca do metod emisyjnych. Wymienione metody są szeroko stosowane do analizy biopierwiastków w grzybach [35, 37–41, 49].

Woltamperometria stripingowa – anodowa i katodowa

Woltamperometria stripingowa, anodowa (*Anodic Stripping Voltammetry*, ASV) i katodowa (*Cathodic Stripping Voltammetry*, CSV) jest wysoce czułą metodą elektrochemiczną umożliwiającą oznaczenie jakościowe i ilościowe biopierwiastków oraz niektórych związków organicznych. Na szczególną uwagę zasługuje jedna z technik woltamperometrii stripingowej – różnicowa impulsowa anodowa woltamperometria stripingowa

(*Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*, DP ASV). Ze względu na jej wyjątkowo dużą czułość jest przydatna do oznaczania pierwiastków śladowych w materiale biologicznym, ponieważ w określonych warunkach próg detekcji może sięgać 10^{-12} M i mniej. Na uwagę zasługuje również fakt, że w jednym cyklu pomiarowym można oznaczyć kilka pierwiastków obok siebie. Z tego względu metoda SV znalazła również zastosowanie w analizie biopierwiastków w grzybach wielkoowocnikowych [42].

Neutronowa analiza aktywacyjna

Metoda neutronowej analizy aktywacyjnej (*Neutron Activation Analysis*, NAA) opiera się na przemianie trwałego jądra atomowego w jądro radioaktywne, co dzieje się w procesie napromieniania neutronami. Jest to metoda charakteryzująca się wysoką dokładnością i rzetelnością analizy, niskimi progami detekcji oraz możliwością identyfikacji wielu pierwiastków. Czułość metody pozwala na oznaczenie składu pierwiastkowego i izotopowego w zakresie stężeń 1–0,01 ppm. Umożliwia także analizę ultraśladowych stężeń pierwiastka w próbkach, które w procesie przygotowania do analizy narażone są na zanieczyszczenie. Metoda ta również znalazła zastosowanie w analizie biopierwiastków w grzybach [43, 44]. Wspomniane metody cechuje wysoka selektywność i bardzo duża czułość, stąd stosowanie ich do oznaczania biopierwiastków w materiale biologicznym, w tym grzybowym, jest w pełni uzasadnione.

Podsumowanie

Grzyby jadalne stanowią dobre źródło biopierwiastków niezbędnych do życia oraz o właściwościach leczniczych i antyoksydacyjnych, takich jak: selen, cynk, miedź, magnez i żelazo. W przypadku selenu zawartość mieści się w granicach 0,5 do 20 mg/kg s.m. Największe ilości tego biopierwiastka oznaczono w gatunku Borowika szlachetnego oraz Borowika usiatkowanego (**fotografia 4**). Zawartość cynku mieści się w przedziale 25–200 mg/kg s.m. Wśród badanych gatunków grzybów wielkoowocnikowych najlepszym źródłem cynku jest Purchawka chropowata, w której zawartość cynku mieści się w zakresie 150–200 mg/kg s.m., natomiast w owocnikach grzybów jadalnych od poniżej 25 do 200 mg/kg s.m. Najlepszym źródłem tego pierwiastka są owocniki Purchawki chropowatej, a także Czubajki kani, w których akumulacja miedzi sięga 100–200 mg/kg s.m. Borowik szlachetny spośród grzybów jadalnych jest najbogatszym źródłem magnezu (75–125 mg/kg s.m.), zbliżone ilości



Fotografia 4. Borowik usiatkowany – *Boletus reticulatus*

tego pierwiastka stwierdzono także w Czubajce kani. We wszystkich omawianych gatunkach grzybów jadalnych zawartość magnezu wahała się pomiędzy 25–125 mg/kg s.m.

Do oznaczenia biopierwiastków w grzybach wielkoowocnikowych stosuje się nowoczesne metody analityczne z wykorzystaniem najnowocześniejszych aparatów stosowanych w analizie instrumentalnej. Wśród nich najczęściej z powodzeniem stosuje się metody spektroskopowe: absorpcyjną spektrometrię atomową, emisyjną spektrometrię atomową ze wzbudzeniem w plazmie sprężonej indukcyjnie, spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie, atomową spektrometrię fluorescencyjną. Wykorzystywana jest również neutronowa analiza aktywnościowa oraz różne techniki voltamperometrii strippingowej.

Otrzymano: 2014.04.09 · Zaakceptowano: 2014.04.23

Piśmiennictwo

- Bolesławska I., Przysławski J., Schlegel-Zawadzka M., Grzymiński M.: Zawartość składników mineralnych w całodziennych racjach pokarmowych kobiet i mężczyzn stosujących dietę tradycyjną i „optymalną” – analiza porównawcza, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 4(65): 303–311.
- Knypl K.: Znaczenie magnezu oraz wapnia w schorzeniach układu krążenia. *Przewodnik Lekarza*, 2004, 11: 44–48.
- Olejniczak T., Opala T., Woźniak J.: Osteoporoza – epidemiologia, patogenezę, diagnostykę i leczenie. *Przewodnik Lekarza*, 2000, 9: 39–47.
- Bolesławska I., Przysławski J.: Ocena poziomu spożycia wybranych mikroelementów występujących w całodziennych racjach pokarmowych mieszkańców Wielkopolski. W: *Żywność a zdrowie interakcje. Materiały Konferencji Naukowej*, 2005, Kraków.
- Jablonska E., Gromadzinska J., Klos A., Bertrand J., Skibniewska K., Darago A., Wasowicz W.: Selenium, cynk i miedź w diecie Polaków. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, 31: 259–265.
- Rajewska J., Bałasinska B.: Związki biologicznie aktywne zawarte w grzybach jadalnych i ich korzystny wpływ na zdrowie. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2004, 58: 352–357.
- Muszyńska B., Sułkowska-Ziaja K., Ekiert H.: Główne grupy związków i pierwiastki z aktywnością biologiczną w wybranych gatunkach grzybów z taksonu Basidiomycota. *Farmacja Polska*, 2010 66(11): 804–814.
- Rudawska M., Leski T.: Macro- and microelements contents in fruiting bodies of wild mushrooms from Notecka forest in west-central Poland. *Food Chemistry*, 2005, 92: 499–506.
- Alonso J., Garcia M. A., Perez-Lopez M., Melgar M. J.: The concentration and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44: 180–188.
- Falandysz J., Szymczyk K., Ichihshi H., Bielawski L., Gucia M., Frankowska A.: ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Additives and Contaminants*, 2001, 6: 503–515.
- Mleczecki M., Magdziak Z., Goliński P., Siwulski M., Stuper-Szablewska K.: Concentrations of minerals in selected edible mushrooms species growing in Poland and their effect on human health. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2013, 12(2): 203–214.
- Falandysz J., Lipka K.: Selen w grzybach. *Rocznik Państwowego Zakładu Higieny*, 2006, 57(3): 217–233.
- Frankenberg W.T.Jr., Engberg R.A.: *Environmental Chemistry of Selenium*, Marcel Decker Inc., New York, 1998, USA.
- Kabata-Pendias A., Pendias H.: *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, 1994, Warszawa.
- Jarosz M. (red.): *Normy żywienia populacji polskiej – nowelizacja*. Instytut Żywności i Żywienia, 2012, Warszawa.
- Zagrodzki P.: Selen, a układ odpornościowy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2004, 58: 140–149.
- Arthur J.R., McKenzie R.C., Beckett G.J.: Selenium in the immune system. *Journal of Nutrition*, 2004, 133: 1457–1459.
- Jackson M.J., Broome C.S., McArdle F.: Marginal dietary selenium intakes in the UK: are there functional consequences? *Journal of Nutrition*, 2003, 133: 1557–1559.
- Muszyńska B., Sułkowska-Ziaja K., Malec M.: Właściwości lecznicze i kosmetyczne drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen). *Postępy Fitoterapii*, 2013, 1: 54–63.
- Kalac P.: Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000–2009. *Food Chemistry*, 2010, 122: 2–15.
- Tuzen M., Sesli E., Soylak M.: Trace element levels of mushroom species from East Black Sea region of Turkey. *Food Control*, 2007, 18: 806–810.
- Borovicka J., Randa Z.: Distribution of iron, cobalt, zinc and selenium in macrofungi. *Mycological Progress*, 2007, 6: 249–259.
- Szynkowska M. I., Pawlaczyk A., Albinska J., Paryczak T.: Comparison of accumulation ability of toxicologically important metals in caps and stalks in chosen mushrooms. *Polish Journal of Chemistry*, 2008, 82: 313–319.
- Dąbrowska E., Szynaka B., Kulikowska-Karpińska E., Łapińska J.: Wpływ cynku na obraz ultrastrukturalny ślinianki podżuchwowej u szczura. *Czasopismo Stomatologiczne*, 2008, 61: 704–710.
- Pasternak K.: *Biopierwiastki w praktyce medycznej*. Wydawnictwo Naukowe Akapit, Lublin, 2000.
- Alonso J., Garcia M. A., Pérez-López M., Melgar M. J.: The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44: 180–188.
- Ouzuni P. K., Veltsistas P. G., Paleologos E. K., Riganakos K. A.: Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20: 480–486.
- Isildak Ö., Turkekul I., Elmastas M., Aboul-Enein H. Y.: Bioaccumulation of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms. *Analytical Letters*, 2007, 40: 1099–1116.
- Czajka A.: Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Nowiny Lekarskie*, 2006, 75: 582–586.
- Svoboda, L., Chrástný V.: Levels of eight trace elements in edible mushrooms from a rural area. *Food Additives and Contaminants*, 2008: 25, 51–58.
- Demirbas A.: Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. *Food Chemistry*, 2001, 75: 453–457.
- Bancerz B., Duś-Zuchowska M., Cichy W., Matusiewicz H.: Wpływ magnezu na zdrowie człowieka. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2012, 7(6): 359–366.
- Abbott LG, Rude RK.: Clinical manifestations of magnesium deficiency. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 1993, 19: 314–22.
- Turkekul I., Elmastas M., Tuzen M.: Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry*, 2004, 84: 389–392.
- Benbrahim M., Denaix L., Thomas A. L., Balet J., Carnus J. M.: Metal concentrations in edible mushrooms following municipal sludge application on forest land. *Environmental Pollution*, 2006, 144: 847–854.
- Compton R.G., Banks C.E.: *Understanding Voltammetry*, World Scientific, 2009.
- Chojnacka A., Falandysz J.: Mineral composition of yellow-cracking bolete (*Xerocomus subtomentosus* (L.) Quélet). *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2007, 60: 337–340.
- Chudziński K., Falandysz J.: Multivariate analysis of elements content of Larch Boletus (*Suillus grevillei*). *Chemosphere*, 2008, 73: 1230–1239.
- Jamnická G., Bucinová K., Havranová I., Urban A.: Current state of mineral nutrition and risk elements in a beech ecosystem situated near the aluminium smelter in Žiar nad Hronom, Central Slovakia. *Forest Ecology and Management*, 2007, 248: 26–35.
- Kowalewska I., Bielawski L., Falandysz J.: Some metal, phosphorus, and their bioaccumulation factors in red aspen bolete (*Leccinum rufum*) from the Lubelska Upland. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2007, 40: 153–158.
- González A., Llorens A., Cervera M. L., Armenta S., de la Guardia M.: Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 2007, 115: 360–364.
- Piech R., Szłószarczyk M., Opoka W., Paczosa-Bator Baś, Krzek J., Muszyńska B.: Application of hanging copper amalgam drop electrode for voltammetric determination of selenium content in fruiting bodies of selected mushrooms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. Manuscript ID: 840885.

43. http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka_polska/Rozdzialy/rozdzial_013.pdf.
44. Borovicka, J., Randa, Z.: Distribution of iron, cobalt, zinc and selenium in macrofungi. *Mycological Progress*, 2007, 6: 249–259.
45. Randa, Z., Soukal, L., Mizera, J.: Possibilities of the short-term thermal and epithermal neutron activation for analysis of macromycetes (mushrooms), *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2005, 264: 67–76.
46. Gawęcki J, Hryniewiecki L.: *Żywnie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000, Warszawa.
47. Krzysik M., Biernat J., Grajeta H.: Wpływ wybranych składników odżywczych pożywienia na funkcjonowanie układu odpornościowego, Cz. II. Immunomodulacyjne działanie witamin i pierwiastków śladowych na organizm człowieka, *Advances in Clinical and Experimental Medicin*, 2007: 16: 123–133.
48. Tymiński Z., Myslek – Laurikainen Bogumiła.: Zastosowanie neuronowej analizy aktywacyjnej NAA do identyfikacji materii pochodzenia kosmicznego na ziemi, *Acta Societatis Methetoritcae Polonorum*, 2009,1.
49. Reczyński W., Muszyńska B., Opoka W., Smalec A., Sulkowska – Ziaja K.: Comparative Study of Metals Accumulation in Cultured In Vitro Mycelium and Natural Grown Fruiting Bodies of *Boletus Badius* and *Cantharellus Cibarius*. *Biological Trace Element Research*, 2013, 153: 355–362.

Rękojmia należytego prowadzenia apteki – wybrane zagadnienia administracyjnoprawne

Agnieszka Jachowicz

Katedra Prawa Administracyjnego i Nauki Administracji, Wydział Prawa i Administracji, Uniwersytet Łódzki

Adres do korespondencji: Agnieszka Jachowicz, ul. Kopcińskiego 8/12, 90-232 Łódź, e-mail: jachowicz.a@gmail.com

Farmaceuci, w związku z sprawowaniem profesji polegającej na wykonywaniu określonych zadań publicznych istotnych z punktu widzenia ochrony interesu publicznego, zaliczani są do grupy zawodów zaufania publicznego [1–4]. Zgodnie z utrwalonym w orzecznictwie stanowiskiem Trybunału Konstytucyjnego, „(...) zawód zaufania publicznego to zawód polegający na obsłudze osobistych potrzeb ludzkich, wiążący się z przyjmowaniem informacji dotyczących życia osobistego i zorganizowany w sposób uzasadniający przekonanie społeczne o właściwym dla interesów jednostki wykorzystywaniu tych informacji przez świadczących usługi” [5, 6]. Nie ulega wątpliwości, że farmaceuci, świadcząc usługi farmaceutyczne wyszczególnione w Ustawie Prawo farmaceutyczne oraz Ustawie o izbach aptekarskich, odgrywają szczególną rolę w realizacji zadań z zakresu ochrony zdrowia publicznego [7, 8]. Z tego względu wykonywaniu zawodu farmaceuty powinno towarzyszyć realne zaufanie publiczne, na które składają się takie czynniki, jak: przekonanie o wykonywaniu zadań z dobrej woli i w dobrej wierze, przekonanie o właściwej motywacji, należytej staranności czy przestrzeganiu wartości istotnych z punktu widzenia sprawowanej profesji [5]. Jednym z kluczowych elementów przynależności zawodu farmaceuty do grupy zawodów zaufania publicznego jest powołanie i funkcjonowanie niezależnego samorządu zawodu farmaceuty, odpowiedzialnego m.in. za reprezentowanie zawodu farmaceuty i obrony jego interesów, troska o zachowanie godności i niezależności zawodu, kodyfikowanie, krzewienie i strzeżenie zasad etyki i deontologii zawodowej oraz sprawowanie pieczy i nadzoru nad wykonywaniem zawodu [9].

Wśród farmaceutów szczególną rolę ustawodawca przypisuje kierownikowi apteki. Stosownie do art. 88 i 94 ust. 4a Prawa farmaceutycznego, w aptecę ogólnodostępnej musi być ustanowiony

Guarantee of proper management of the pharmacy · Guarantee of proper management of the pharmacy is one of the most essential legal instrument, necessary both to obtain an authorization for running a pharmacy and for the pharmacists to be able to operate a pharmacy as its manager. The guarantee leads a key role in providing the proper level of pharmaceutical services and warrants that its manager complies the required legal regulations. Guarantee of proper management of the pharmacy was in detail discussed in the literature and jurisdiction. However, as can be seen, the use of the principles in the subject of obtaining the guarantee still causes difficulties among the pharmacists, pharmaceutical self-government and pharmaceutical inspection.
Keywords: pharmacies, pharmacists, licensure, pharmacy, expert testimony.

© Farm Pol, 2014, 70(6): 345–350

kierownik apteki, którym może być farmaceuta posiadający co najmniej 5-letni staż pracy w aptece lub 3-letni staż pracy w aptece, w przypadku gdy posiada specjalizację z zakresu farmacji aptecznej, dający rękojmię należytego prowadzenia apteki. Mimo że przepisy Prawa farmaceutycznego nie stanowią tego wprost, nie ulega wątpliwości, że kierownik apteki powinien posiadać rękojmię należytego prowadzenia apteki przez cały okres pełnienia funkcji kierownika. Tym samym przywołany przepis powinien być interpretowany szeroko, bez wprowadzania ograniczeń co do możliwości sprawdzenia rękojmi jedynie na etapie wydawania zezwolenia na prowadzenie nowej apteki [10].

Pojęcie rękojmi należytego prowadzenia apteki nie posiada definicji ustawowej, ale zgodnie z poglądem utrwalonym w orzecznictwie sądów administracyjnych, ustalając jego znaczenie, można skorzystać z dorobku doktryny w przedmiocie rękojmi należytego wykonywania zawodu. Naczelny Sąd Administracyjny wielokrotnie zwracał uwagę,

że orzecznictwo dotyczące rękojmi należytego wykonywania poszczególnych zawodów może być stosowane przy ogólnej wykładni pojęcia „rękojmi”, przy jednoczesnym uwzględnieniu specyfiki każdego z zawodów i odpowiednim zróżnicowaniu kryteriów ocennych [10–12].

Pojęcie rękojmi przyznawanej kierownikowi apteki nie jest rozumiane jednolicie na gruncie przepisów farmaceutycznych [13]. Przykładowo, Ustawa o izbach aptekarskich wymaga uzyskania rękojmi należytego wykonywania zawodu, podczas gdy Ustawa Prawo farmaceutyczne posługuje się kategorią rękojmi należytego prowadzenia apteki. Pomimo różnych sformułowań, można przyjąć, że w obydwu przypadkach mamy do czynienia z tą samą instytucją prawną, mającą na celu zapewnienie odpowiedniego poziomu świadczenia usług farmaceutycznych. Warto również zauważyć, że rękojmia jako pojęcie prawne i prawnicze funkcjonuje na gruncie prawa cywilnego, jednak jego znaczenie różni się od pojęcia rękojmi w kontekście gwarancji należytego wykonywania zawodu [14]. W literaturze i orzecznictwie rękojmia należytego wykonywania zawodu jest definiowana jako „uroczyste poręczenie, zagwarantowanie, zapewnienie, że z racji posiadanych cech zawód zaufania publicznego (...) będzie wykonywany prawidłowo” [15]. Jest również rozumiana jako ogół cech osobistych oraz całość zachowań zdarzeń i okoliczności składających się na wizerunek osoby zaufania publicznego, na której nie ciążyą żadne zarzuty podważające jej wiarygodność [15–17].

Z przedstawionych definicji wynika zatem, że na istotę pojęcia rękojmi składają się dwa elementy: cechy charakteru osoby wykonującej określony zawód zaufania publicznego oraz jej dotychczasowe zachowanie. Ponieważ wykonywanie zawodów zaufania publicznego, czyli także zawodu farmaceuty, wiąże się z dodatkowymi zobowiązaniami, takimi jak np.: przestrzeganie norm etyki zawodowej, konieczność złożenia ślubowania o szczególnej treści, szczególnie charakter uzyskanego wyższego wykształcenia i specjalizacji, ustawodawca ma prawo dodatkowo uzależnić możliwość uzyskania dokumentu potwierdzającego prawo do wykonywania tego zawodu od spełnienia określonych warunków, w tym do wymagania posiadania przymiotu nieskazitelnego charakteru oraz rękojmi należytego wykonywania zawodu [5, 6].

Można przyjąć, że istota rękojmi, w tym rękojmi należytego prowadzenia apteki, obejmuje swoim przedmiotem dwa kluczowe elementy: kwalifikacje moralne oraz zawodowe kierownika apteki. Przez kwalifikacje moralne należy rozumieć takie przymioty zainteresowanej osoby oraz jej dotychczasowe zachowanie, które świadczą o jej nieskazitelnym charakterze. W ocenie Naczelnego Sądu

Administracyjnego zaliczamy do nich cechy wartościujące daną osobę w sferze etyczno-moralnej, takie jak: uczynność, pracowitość, uczciwość, zarówno w życiu prywatnym, jak i zawodowym, poczucie odpowiedzialności za własne słowa i czyny, stanowczość, odwaga cywilna, samokrytycyzm czy umiejętność zgodnego współżycia z otoczeniem [18, 19].

Badając kwalifikacje moralne farmaceuty, oceniane jest również jego dotychczasowe zachowanie, czyli postępowanie w trakcie i w związku z wykonywaniem zawodu aptekarza. Zgodnie ze stanowiskiem prezentowanym w doktrynie, postępowanie to powinno odpowiadać nie tylko ocenom moralnym i etycznym, ale przede wszystkim powinno gwarantować prawidłowe wykonywanie funkcji kierownika apteki. Zgodnie z Kodeksem Etyki Aptekarza Rzeczypospolitej Polskiej, aptekarza obowiązują, wypracowane przez pokolenia, zasady etyki ogólnoludzkiej, które zobowiązują go do przestrzegania praw człowieka i dbania o godność zawodu. Naruszeniem tej godności jest każde zachowanie aptekarza podważające zaufanie do zawodu, w szczególności wykraczające poza dobro nadrzędne, jakim jest dobro pacjenta.

Pojawia się tym samym kolejne pytanie, w jaki sposób okręgowe izby aptekarskie powinny ustalać, czy dotychczasowe zachowanie farmaceuty podważyło jego wizerunek jako osoby zaufania publicznego. Powyższa przesłanka ma charakter wartościujący, jednak musi opierać się na określonych dowodach. Tym samym nie może być ona dowolna, gdyż jej zgodność z prawem podlega dodatkowej kontroli sądowo-administracyjnej [20, 21]. Przy ocenie dotychczasowego zachowania okręgowe izby aptekarskie powinny brać pod uwagę, czy farmaceuta nie został skazany prawomocnym wyrokiem sądu za przestępstwa lub wykroczenia popełnione w związku z wykonywaniem zawodu oraz czy nie został wobec niego wydany wyrok sądu dyscyplinarnego [22]. Zdaniem M. Kuleszy, za negatywną przesłankę przy ocenie rękojmi mogą być uznane tylko takie działania farmaceuty, które w postępowaniu dyscyplinarnym zostaną jednocześnie uznane za delikt zawodowy, chyba że przepis szczególny uzna je za przeszkodę wykonywaniu zawodu albo gdy zakaz wykonywania zawodu lub funkcji zostanie orzeczony sądowo. Dopiero udowodnione naruszenie przez aptekarza przepisów prawa powszechnie obowiązującego lub zasad deontologii zawodowej stanowi podstawę do uznania, że kandydat na kierownika apteki nie daje rękojmi jej należytego prowadzenia. W konsekwencji, brak rękojmi kierownika apteki jest następstwem braku nieskazitelnego charakteru i dotychczasowego zachowania, ocenianych z uwzględnieniem zasad deontologii zawodowej [15, 23]. Podobne stanowisko zajął Wojewódzki Sąd Administracyjny w Warszawie, który

potwierdził, że „(...) podważenie zasady domniemania dawania rękojmi należytego prowadzenia apteki przez każdego farmaceutę posiadającego prawo wykonywania zawodu i spełniającego warunki formalne wskazane w art. 88 ust. 2 p.f. może być obalone przez orzeczenie sądu dyscyplinarnego. Dopiero prawomocny wyrok sądu dyscyplinarnego mógłby stanowić podstawę do uznania, że dana osoba nie daje rękojmi należytego prowadzenia apteki” [24]. W konsekwencji, jeżeli kandydat na kierownika apteki nie był nigdy ukarany dyscyplinarnie, nie ma podstaw do stwierdzenia, że nie daje on rękojmi należytego prowadzenia apteki.

Rękojmi przyznawanej kierownikom aptek nie należy utożsamiać wyłącznie z określonymi cechami charakteru, ponieważ na jej istotę składa się również wiarygodność w sferze zawodowej, szczególnie ważna dla osób wykonujących zawód zaufania publicznego ze względu na podniosły charakter sprawowanej profesji [19]. Dbając o odpowiedni poziom wykształcenia ich przedstawicieli, ustawodawca wprowadził reglamentację dostępu do omawianej grupy zawodowej. Ograniczenia te wyrażają się m.in. w obowiązku potwierdzenia posiadanych kwalifikacji czy umiejętności, a w przypadku farmaceutów (dodatkowo) w uzyskaniu prawa wykonywania zawodu [25]. Wspomniany dokument jest wydawany przez okręgową radę aptekarską, a w przypadku obywateli państw członkowskich Unii Europejskiej – Naczelną Radę Aptekarską, na wniosek zainteresowanego aptekarza. Warunkiem uzyskania prawa wykonywania zawodu jest m.in. posiadanie odpowiednich kwalifikacji wskazanych w Ustawie o izbach aptekarskich, stanu zdrowia pozwalającego na wykonywanie zawodu farmaceuty (potwierzonego orzeczeniem lekarskim), korzystanie z pełni praw publicznych czy posiadanie pełnej zdolności do czynności prawnych. Samorząd aptekarski bada również, czy dany farmaceuta wykazuje nienaganną postawę etyczną i czy swym dotychczasowym zachowaniem daje rękojmię prawidłowego wykonywania zawodu farmaceuty, w szczególności – czy nie był on prawomocnie skazany za umyślne przestępstwo przeciwko życiu lub zdrowiu. O ile weryfikacja kompetencji zawodowych aptekarza nie budzi wątpliwości, pojawia się jednak pytanie, w jaki sposób izby aptekarskie przy wydawaniu prawa wykonywania zawodu powinny dokonywać oceny jego dotychczasowego zachowania. Ponieważ warunkiem rozpoczęcia pracy w aptece jest uprzednie uzyskanie prawa wykonywania zawodu, samorząd aptekarski może sprawdzić jedynie przebieg stażu i wydać opinię na podstawie oceny wystawionej przez jego opiekuna.

Kwalifikacje zawodowe farmaceuty sprawdzane są również w trakcie postępowania o wydanie rękojmi dla kierownika apteki, przy czym okręgowe

izby aptekarskie nie powinny weryfikować ponownie jego wykształcenia, gdyż zostało to uczynione na etapie wydawania prawa wykonywania zawodu. Izby badają jednak, czy spełniony został obowiązek podnoszenia kwalifikacji zawodowych. Ustawodawca zobowiązał farmaceutów do aktualizacji posiadanego zasobu wiedzy oraz stałego dokształcania się w zakresie nowych osiągnięć nauk farmaceutycznych poprzez uczestnictwo w szkoleniach ciągłych [26]. Za każde szkolenie aptekarze otrzymują tzw. punkty edukacyjne, rozliczane w pięcioletnich okresach edukacyjnych, weryfikowane następnie w postępowaniu o stwierdzenie rękojmi należytego prowadzenia apteki. Niedopełnienie powyższego obowiązku lub rażący brak wiedzy lub umiejętności potrzebnych do należytego wypełniania zadań kierownika apteki stanowi przesłankę do odmowy wydania zaświadczenia o rękojmi [27]. Konieczność podnoszenia kwalifikacji zawodowych przez farmaceutów nie budzi wątpliwości. Jako osoby wykonujące zawód zaufania publicznego muszą oni dostosowywać swoją wiedzę do zmieniającego się poziomu nauki i techniki, w celu należytej ochrony zdrowia i życia pacjentów. Ponieważ rękojmię prawidłowego wykonywania zawodu może dawać jedynie osoba posiadająca wiedzę zweryfikowaną w trybie przewidzianym prawem, Naczelny Sąd Administracyjny uznał odpowiednie kwalifikacje za jedną z najważniejszych przesłanek badanych w postępowaniu w sprawie rękojmi [28]. Odmienne stanowisko zaprezentował Sąd Najwyższy, który uznał, że przepisy Prawa farmaceutycznego oraz Ustawy o izbach aptekarskich na tyle szczegółowo statuują warunki stawiane kandydatom na kierownika apteki, że poszerzenie tego katalogu o dodatkowe wymogi należy uznać za niedopuszczalne [29]. Taki charakter Sąd Najwyższy przypisał m.in. obowiązkowi udokumentowania sposobu realizacji obowiązku edukacyjnego. Należy jednak zwrócić uwagę, że Sąd Najwyższy mógł dokonać błędnego utożsamienia obowiązku edukacyjnego wskazanego w art. 89e Prawa farmaceutycznego z tokiem zdobywania wyższego wykształcenia farmaceutycznego [30]. Nie budzi wątpliwości zasadność odstąpienia od sprawdzenia umiejętności oraz wiedzy kandydata na kierownika apteki, skoro przepisy Prawa farmaceutycznego wskazują, że kierownikiem apteki może być jedynie osoba posiadająca odpowiednie kwalifikacje do wykonywania zawodu farmaceuty. Udział w szkoleniach ciągłych służy natomiast dalszemu podnoszeniu kwalifikacji, rozwijaniu zainteresowań naukowych i aktualizacji wiedzy, które są szczególnie istotne w tak dynamicznej branży, jaką jest farmacja. Zapewniają one także wysoki standard usług farmaceutycznych świadczonych w aptekach oraz dają pacjentom możliwość dostępu do jak najlepszej opieki farmaceutycznej.

Na gruncie obecnie obowiązujących przepisów ustawodawca przewiduje dwa tryby postępowania w sprawie rękojmi dla kierowników aptek, w zależności od tego, czy z wnioskiem występuje podmiot ubiegający się o nowe zezwolenie na prowadzenie apteki, czy też sam zainteresowany, gdy następuje zmiana na stanowisku kierownika apteki już działającej.

Niezależnie od trybu postępowania rękojmie są wydawane w formie uchwały przez okręgowe izby aptekarskie. W przypadku kierownika nowej apteki wydanie rękojmi następuje w trybie art. 106 k.p.a. Podmiot ubiegający się o zezwolenie na prowadzenie apteki, o czym była już mowa, jest zobligowany do zatrudnienia osoby odpowiedzialnej za prowadzenie apteki, dającej rękojmię jej należytego prowadzenia. We wniosku o wydanie zezwolenia na prowadzenie apteki składanym do wojewódzkiego inspektora farmaceutycznego podmiot ubiegający się o to zezwolenie wskazuje m.in. imię i nazwisko osoby, która będzie pełniła funkcję kierownika apteki, a następnie jej kandydatura jest oceniana przez właściwą okręgową izbę aptekarską, działającą na podstawie art. 7 Ustawy o izbach aptekarskich. Stosownie do przywołanego przepisu, samorząd aptekarski jest odpowiedzialny za współdziałanie z organami administracji publicznej, związkami zawodowymi i samorządami zawodowymi oraz innymi organizacjami społecznymi w sprawach związanych z wykonywaniem zawodu i innych dotyczących farmacji, a mających wpływ na ochronę zdrowia publicznego. Powyższe zadanie wykonuje m.in. poprzez wydawanie opinii w sprawach udzielania lub cofania zezwoleń na prowadzenie aptek lub hurtowni. W związku z powyższym, wojewódzki inspektor farmaceutyczny może wydać decyzję w przedmiocie zezwolenia na prowadzenie nowej apteki ogólnodostępnej wyłącznie po zajęciu stanowiska przez samorząd aptekarski. Nie ulega wątpliwości, że opinie wydawane przez okręgowe izby aptekarskie w toku omawianego postępowania mogą dotyczyć wyłącznie kwestii związanych z osobą jej kierownika. Wojewódzki inspektor farmaceutyczny, zwracając się do okręgowej rady aptekarskiej, wnosi jedynie o wydanie opinii w sprawie stwierdzenia rękojmi należytego prowadzenia apteki dla kandydata na kierownika wskazanego przez podmiot ubiegający się o wydanie zezwolenia [31]. Tym samym dokument wydany przez okręgową izbę aptekarską nie powinien odnosić się do innych kwestii dotyczących apteki, takich jak np. zasadność jej otwarcia. Każda opinia wyrażona przez okręgową izbę aptekarską, poza oceną kierownika apteki, będzie miała w takich przypadkach charakter niewiążący i nie powinna mieć wpływu na decyzję wojewódzkiego inspektora farmaceutycznego. W myśl art. 106 §5 k.p.a., zajęcie stanowiska przez organ następuje w drodze

postanowienia, na które służy zażalenie do organu wyższej instancji. Pojawia się tym samym pytanie, kto powinien być uprawniony do złożenia zażalenia do Naczelnej Rady Aptekarskiej. Stroną toczącego się postępowania jest bowiem podmiot ubiegający się o zezwolenie na prowadzenie apteki, a nie farmaceuta oceniany przez samorząd aptekarski. W doktrynie zwraca się jednak uwagę, że uprawnienie to powinno przysługiwać także zainteresowanemu farmaceucie, gdyż jest on osobą, której dane rozstrzygnięcie dotyczy merytorycznie, a zatem powinien mieć możliwość jego weryfikacji w postępowaniu przed organem odwoławczym lub sądem [23]. Kwestią sporną w praktyce pozostaje również charakter prawny omawianej opinii. Pojawiają się bowiem wątpliwości, czy stanowisko samorządu aptekarskiego należy uznać za wiążące dla wojewódzkiego inspektora farmaceutycznego. Zarówno Prawo farmaceutyczne, jak i Ustawa o izbach aptekarskich nie rozstrzygają powyższej kwestii. Należy zatem przyjąć, że wojewódzki inspektor farmaceutyczny jest zobowiązany do zapoznania się z przygotowaną opinią i na jej podstawie dokonania oceny i podjęcia decyzji w przedmiocie wydania zezwolenia na prowadzenie apteki lub jego odmowy. Stanowisko samorządu aptekarskiego nie jest bowiem zgodą ani porozumieniem, lecz oceną stanu faktycznego, które powinno zostać rozpatrzone przez wojewódzkiego inspektora farmaceutycznego w oparciu o zasadę prawdy obiektywnej. Opinia okręgowej izby aptekarskiej będzie stanowić jedynie materiał dowodowy, wykorzystany w toczącym się postępowaniu zgodnie z zasadą swobodnej oceny dowodów.

W przypadku zmiany na stanowisku kierownika apteki postępowanie w sprawie rękojmi prowadzone jest w trybie art. 217 k.p.a. W myśl przywołanego przepisu, organ administracji publicznej wydaje zaświadczenie na żądanie osoby ubiegającej się o zaświadczenie, jeżeli urzędowego potwierdzenia określonych faktów lub stanu prawnego wymaga przepis prawa lub gdy osoba ubiega się o zaświadczenie ze względu na swój interes prawny w urzędowym potwierdzeniu określonych faktów lub stanu prawnego. Zaświadczenie jest zatem dokumentem potwierdzającym w sposób urzędowy istniejący już stan faktyczny lub prawny, w tym posiadane umiejętności czy kompetencje.

Podsumowując, można przyjąć, że rękojmia należytego prowadzenia apteki i należytego wykonywania zawodu aptekarza jest przymiotem przysługującym każdemu farmaceucie, gwarantującym, że odznacza się on zespołem cech wartościujących w sferze etycznej oraz wysokim poziomem profesjonalizmu, zapewniającym świadczenie usług farmaceutycznych zgodnie z obowiązującymi przepisami i wymogami, a ocena samorządu aptekarskiego powinna ograniczać się jedynie do stwierdzenia, czy

istnieją negatywne przesłanki wyłączające rękojmię, czy też nie [20, 23].

Praktyka pokazuje, że sporną kwestią pozostaje pytanie, czy kierownik apteki, który otrzymał już rękojmię należytego prowadzenia apteki, każdorazowo przy zmianie miejsca pracy i obejmowaniu funkcji kierownika w nowej aptece powinien ponownie ubiegać się o wydanie zaświadczenia przez okręgową izbę aptekarską. Obecnie kandydat na kierownika apteki za każdym razem przed rozpoczęciem pracy w nowej aptece występuje do okręgowej izby aptekarskiej i, w mojej ocenie, należy przyjąć, że jest to sprzeczne z zasadą domniemania posiadania rękojmi przez kierownika apteki. Ponieważ, o czym była już mowa, kierownik apteki powinien posiadać rękojmię należytego prowadzenia apteki przez cały okres pełnienia funkcji kierownika, odpowiednia uchwała okręgowej izby aptekarskiej jest dokumentem wymaganym przez wojewódzkiego inspektora farmaceutycznego w toku postępowania w przedmiocie zmiany na stanowisku kierownika apteki. Rola okręgowych izb aptekarskich powinna ograniczać się jedynie do wydania dokumentu, np. w formie zaświadczenia, a nie uchwały jak obecnie. Wydanie uchwały wymaga bowiem udziału okręgowej rady aptekarskiej oraz zwołania posiedzenia, podczas którego farmaceuta ubiegający się o rękojmię jest przepytany z podejmowanych przez siebie zadań. Moim zdaniem przedstawiona procedura nie znajduje zasadności w świetle zasady domniemania posiadania rękojmi przez kierownika apteki. Okręgowe izby aptekarskie prowadzą bowiem rejestry zarówno szkoleń ciągłych odbytych przez farmaceutów, jak i rejestr postępowań dyscyplinarnych. Nie ma zatem potrzeby dodatkowej weryfikacji kwalifikacji moralnych i zawodowych kierownika apteki. W przypadku wątpliwości ze strony organów nadzoru farmaceutycznego bądź Narodowego Funduszu Zdrowia, mają one możliwość wystąpienia do odpowiedniej okręgowej izby aptekarskiej z zapytaniem, czy kandydat na kierownika apteki był karany dyscyplinarnie lub z wnioskiem o wydanie zaświadczenia w tym przedmiocie. Warto zwrócić uwagę na pozytywną w mojej ocenie praktykę stosowaną przez niektóre z oddziałów wojewódzkich Narodowego Funduszu Zdrowia, które podczas składania informacji o zmianie na stanowisku kierownika apteki nie żądają przedstawienia rękojmi tego kierownika. Oddziały wojewódzkie Narodowego Funduszu Zdrowia uznają bowiem, że to kierownik apteki oraz podmiot prowadzący aptekę ponoszą odpowiedzialność za zgodne z prawem funkcjonowanie apteki, czyli również za zapewnienie, że funkcję kierownika apteki pełni farmaceuta posiadający wymagane kwalifikacje. Za świadome wprowadzenie w błąd podmiotu administracji

państwowej, wobec podmiotu prowadzącego aptekę oraz jej kierownika mogą więc zostać wyciągnięte odpowiednie sankcje administracyjne, m.in. w postaci obowiązku zwrotu refundacji wypłaconej w okresie pełnienia funkcji kierownika apteki przez osobę niedającą rękojmi jej należytego prowadzenia.

Jak pokazuje praktyka, rękojmia często jest traktowana jako narzędzie w rozgrywkach pomiędzy podmiotami prowadzącymi aptekę a samorządem aptekarskim. Jest ona wykorzystywana w celu utrudnienia podjęcia pracy na stanowisku kierownika apteki lub uniemożliwienia prowadzenia apteki przez określony podmiot czy przedsiębiorcę. W szczególności negatywnie należy ocenić opiniowanie postępowania farmaceutów jako naganne i sprzeczne z zasadami deontologii zawodowej bez wcześniejszego postępowania dyscyplinarnego i orzeczenia sądu aptekarskiego. Warto również zwrócić uwagę na sprzeczną z art. 24 k.p.a. praktykę, aby członkami komisji wydającej zaświadczenie w sprawie rękojmi byli farmaceuci będący jednocześnie właścicielami aptek. Może wówczas dochodzić do sytuacji, w których odmowa wydania rękojmi będzie spowodowana chęcią ochrony własnych interesów członków komisji. Tym samym rękojmie stają się przyczyną sporów pomiędzy przedsiębiorcami prowadzącymi apteki oraz organami izb aptekarskich, a także narzędziem wykorzystywanym przez członków samorządu zawodowego aptekarzy w celach osobistych bądź zawodowych. Należy pamiętać, że izba aptekarska została powołana z mocy prawa do reprezentowania zawodowych, społecznych i gospodarczych interesów farmaceutów. Jej organy nie mogą zatem wykorzystywać przyznanych im uprawnień do załatwiania indywidualnych spraw swoich członków.

Rękojmia należytego prowadzenia apteki jest jedną z kluczowych instytucji w zakresie funkcjonowania aptek. Daje ona gwarancję, że farmaceuci zapewniają odpowiednią dbałość o zdrowie publiczne, a poszczególnym pacjentom należyta opiekę farmaceutyczną. Jest ona również narzędziem pozwalającym zweryfikować, czy przestrzegane są standardy należytego wykonywania zawodu zaufania publicznego. Rękojmia należytego prowadzenia apteki nie może być jednak wykorzystywana jako instrument w rozgrywkach politycznych pomiędzy przedsiębiorcami oraz przedstawicielami samorządu aptekarskiego.

Otrzymano: 2014.04.14 · Zaakceptowano: 2014.04.24

Przypisy

1. Szerzej na temat zawodów zaufania publicznego zobacz m.in.: A. Krasnowolski, Zawody zaufania publicznego, zawody regulowane oraz wolne zawody. Geneza, funkcjonowanie i aktualne problemy, listopad 2013 r.

2. M. Kulesza: Zawód zaufania publicznego [w:] Zawody zaufania publicznego a interes publiczny – korporacyjna reglamentacja versus wolność wykonywania zawodu. Materiały z konferencji zorganizowanej przez Komisję Polityki Społecznej i Zdrowia Senatu RP przy współudziale Ministerstwa Pracy i Polityki Społecznej pod patronatem Marszałka Senatu RP przy współudziale Ministerstwa Pracy i Polityki Społecznej pod patronatem Marszałka Senatu RP Longina Pastusiaka, 8 kwietnia 2002 r., Warszawa 2002 r., str. 149 i nast.
3. J. Hausner, D. Długosz: Tezy w sprawie zawodów zaufania publicznego [w:] Zawody zaufania publicznego ..., str. 119 i nast.
4. M. Tabernacka: Pojęcie zawodu zaufania publicznego, Acta Universitatis Wratislaviensis nr 2663, str. 302 i nast.
5. Por. np.: wyrok Trybunału Konstytucyjnego z 2 lipca 2007 r., K 41/05, LEX nr 299957.
6. Wyrok Trybunału Konstytucyjnego z 7 maja 2002 r., SK 20/02, 54063.
7. Ustawa z 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2008 r. nr 45, poz. 271 ze zm.).
8. Ustawa z 19 kwietnia 1991 r. o izbach aptekarskich (t.j. Dz. U. z 2008 r. nr 136, poz. 856 ze zm.).
9. Zobacz art. 1 oraz art. 7 ustawy o izbach aptekarskich.
10. Wyrok Wojewódzkiego Sądu Administracyjnego w Warszawie z 12 lipca 2012 r., VI SA/Wa 160/12, LEX nr 1277043.
11. Zobacz np.: wyrok Naczelnego Sądu Administracyjnego z dnia 02 października 1986 r., IV SA 311/86.
12. Wyrok Wojewódzkiego Sądu Administracyjnego w Warszawie z 12 lipca 2012 r., VI SA/Wa 159/12, LEX nr 1230739.
13. W szczególności Prawa farmaceutycznego oraz Ustawy o izbach aptekarskich.
14. Por. np. dział II Kodeksu cywilnego – rękojmia za wady, rozumiana jako określona odpowiedzialność, gwarancja sprzedającego względem kupującego.
15. Wyrok Wojewódzkiego Sądu Administracyjnego w Warszawie z 27 stycznia 2009 r., VI SA/Wa 2011/08 LEX nr 519851.
16. Wyrok Naczelnego Sądu Administracyjnego z 13 sierpnia 1999 r., II SA 879/99, LEX nr 46610.
17. Wyrok Naczelnego Sądu Administracyjnego z 20 kwietnia 2001 r., II SA 959/00, LEX nr 75544.
18. Wyrok Naczelnego Sądu Administracyjnego z 5 kwietnia 2001 r., II SA 725/00, LEX nr 53476;
19. Wyrok Wojewódzkiego Sądu Administracyjnego w Warszawie z dnia 16 lutego 2007 r., VI SA/Wa 2089/06, LEX 318029.
20. M. Kulesza, Opinia prawna odnośnie do rękopisem należytego prowadzenia apteki, Warszawa 2004 r., http://www.katowice.oia.pl/uploads/attachment/1488_2004_05_17_rekojmia_kulesza.pdf.
21. Zobacz też wyrok Sądu Najwyższego z 4 listopada 1998 r., III RN 84/98, LEX nr 35591.
22. Naczelna Rada Aptekarska stoi na stanowisku, że przesłanką negatywną, która może świadczyć o braku rękopisem należytego prowadzenia apteki jest karalność za przestępstwa gospodarcze lub związane z wykonywaniem zawodu.
23. M. Kulesza: Opinia prawna dla Związku Pracodawców Aptecznych PharmaNET w sprawie prawnych aspektów udziału samorządu aptekarskiego w procesie oceny rękopisem należytego prowadzenia apteki oraz kryteriów sprawowania tej oceny, Warszawa 2012 r., http://www.efarmtargi.pl/files/opinia_prawna.pdf (05.03.2014 r.).
24. Wyrok Wojewódzkiego Sądu Administracyjnego w Warszawie z 8 stycznia 2014 r., VI SA/Wa 212/13.
25. Wyrok Trybunału Konstytucyjnego z 19 kwietnia 2006 r., K 6/06, LEX nr 189582.
26. Art. 89e Prawa farmaceutycznego.
27. Stanowisko NRA z 14 stycznia 2007 r. w sprawie postępowania przy stwierdzaniu rękopisem należytego prowadzenia apteki, <http://nia.org.pl/news/482/1/stanowisko-nra-w-sprawie-postepowania-przy-stwierdzaniu.html> (05.03.2014).
28. Wyrok Naczelnego Sądu Administracyjnego w Warszawie z 14 lutego 2007 r., II GSK 294/06, LEX nr 313845.
29. Wyrok Sądu Najwyższego z 5 czerwca 2013 r., III ZS 8/13, Legalis nr 666756.
30. Zaskarżona do Sądu Najwyższego uchwała Okręgowej Rady Aptekarskiej, jako jedno z kryteriów ocenianych w trakcie wydawania rękopisem, wskazywała na obowiązane rozliczenia zakończonego okresu edukacyjnego.
31. Zobacz załącznik nr 4 do Procedury Głównego Inspektora Farmaceutycznego w sprawie udzielania zezwoleń na prowadzenie apteki ogólnodostępnej.