

Katarzyna Morawska-Staszak

**WPŁYW SUPLEMENTACJI KREATYNĄ NA CAŁKOWITY
POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY ORAZ WYDOLNOŚĆ
PSYCHO-FIZYCZNĄ U PACJENTÓW Z PRZEWLEKŁYMI
SCHORZENIAMI WĄTROBY**

Rozprawa doktorska

Pracownia Chemii Żywności i Żywienia Człowieka

Katedry Chemii i Biochemii Klinicznej

Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor:

Dr hab. n. med. Grzegorz Mielcarz, prof. UM

Kierownik Pracowni Chemii Żywności i Żywienia Człowieka

Poznań 2012

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy.....	4
1. WSTĘP.....	5
1.1. Etiologia wybranych schorzeń wątroby.....	5
1.1.1. Pierwotna marskość żółciowa.....	5
1.1.2. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby	6
1.1.3. Alkoholowa choroba wątroby.....	8
1.1.4. Marskość wątroby.....	11
1.2. Wpływ kreatyny na przemiany metaboliczne i potencjał antyoksydacyjny organizmu.....	13
1.2.1. Kreatyna.....	13
1.2.2. Stres oksydacyjny.....	16
1.2.3. Rola miedzi, cynku i selenu jako antyoksydantów w organizmie.....	19
2. CEL PRACY.....	25
3. MATERIAŁ I METODY.....	26
3.1. Grupa badana chorych z przewlekłymi chorobami wątroby i grupa porównawcza.....	26
3.2. Metodyka badań laboratoryjnych.....	27
3.2.1. Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego do badań.....	27
3.2.2. Oznaczenia miedzi, cynku i selenu w osoczu metodą bezpłomieniowej atomowej spektroskopii absorpcyjnej.....	27
3.2.3. Ilościowe oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego surowicy metodą FRAP.....	31
3.2.4. Badania wysiłkowe – test marszowy.....	32
3.2.5. Testy pamięciowe oceniające zdolności poznawcze umysłu.....	37

3.2.5.1.	Test losowego generowania liczb RNG.....	37
3.2.5.2.	Test krótkotrwałej pamięci werbalnej postępującej.....	38
3.2.5.3.	Test krótkotrwałej pamięci werbalnej wstecznej.....	38
3.2.5.4.	Test pamięci przestrzennej wykonywanych ruchów – postępujący.....	39
3.2.5.5.	Test pamięci przestrzennej wykonywanych ruchów – wsteczny.....	39
3.2.5.6.	Test pamięci długotrwałej.....	39
3.2.5.7.	Test matematyczny.....	40
3.3.	Ocena statystyczna wyników.....	41
4.	WYNIKI.....	42
4.1.	Profil kliniczny badanych grup pacjentów.....	42
4.2.	Zmiany stężeń selenu, cynku i miedzi w badanych grupach.....	43
4.3.	Zmiany całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w badanych grupach.....	46
4.4.	Wyniki badań wysiłkowych w badanych grupach.....	48
4.5.	Wyniki testów pamięciowych oceniających zdolności poznawcze umysłu.....	52
5.	DYSKUSJA WYNIKÓW.....	59
6.	WNIOSKI.....	68
7.	STRESZCZENIE.....	69
8.	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	70
9.	PIŚMIENNICTWO.....	71
10.	SPIS RYCIN	79
11.	SPIS TABEL	81

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AIH – autoimmunologiczne zapalenie wątroby

ADH – dehydrogenaza alkoholowa

ALDH – dehydrogenaza aldehydu octowego

RFT – reaktywne formy tlenu

C.H.pA - marskość wątroby poalkoholowa

PBC – pierwotna marskość żółciowa wątroby

FRAP - zdolność osocza do redukcji żelaza(III) (*Ferric Reducing Ability of Plasma*)

EIA – badanie immunoenzymatyczne

6 MWT – sześciominutowy test marszowy

MET – równoważnik metaboliczny

RNG – test losowego generowania liczb

FVR – pamięć werbalna postępująca

BVR – pamięć werbalna wsteczna

FSR – pamięć przestrzenna postępująca

BSR – pamięć przestrzenna wsteczna

Cu,Zn-SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

GSH – Px – peroksydaza glutationowa

TPTZ – 2,4,6,-tripirydył-s-triazyna

Cr – kreatyna

CP – fosforan kreatyny

1. WSTĘP

1.1. Etiologia wybranych schorzeń wątroby

1.1.1. Pierwotna marskość żółciowa (PBC)

Pierwotna marskość żółciowa należy do przewlekłych, postępujących, cholestazycznych chorób wątroby. Procesy zapalne, najprawdopodobniej o podłożu autoimmunologicznym doprowadzają w efekcie do utrudnienia odpływu żółci, włóknienia, co w konsekwencji doprowadza do marskości żółciowej wątroby, objawów jej niewydolności i nadciśnienia wrotnego. Wyniki badań biochemicznych wskazują na wzrost parametrów cholestazy (podwyższona aktywność ALP lub GGTP-trwająca co najmniej 6 miesięcy), podwyższenie stężenia immunoglobulin, głównie IgM, obecność przeciwciał AMA, w tym głównie AMA-M2 w mianie co najmniej 1:40 lub innych przeciwciał anty - Sp100 i anty - Gp210 (glikoproteiny otoczki jądrowej), charakterystyczny jest też obraz morfologiczny wątroby /biopsja wykonywana jednak tylko w sytuacjach wątpliwych, u pacjentów bez AMA/ z procesem destrukcyjnym i zapaleniem wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych małego i średniego kalibru, naciekami zapalnymi w postaci grudek i ziarniniaków wokół przewodów żółciowych, odczynem zapalnym w przestrzeniach wrotnych, bliznowaceniem i przebudową marską.

Przeciwciała AMA wykrywa się u ok. 90-95 % chorych, swoistość tych przeciwciał określa się na 95-98%. U 20-50% chorych wykrywa się nieswoiste przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) i przeciwciała przeciw mięśniom gładkim a także autoprzeciwciała reagujące z antygenami błony jądrowej, np. anty Sp100-swoiste, ale o niskiej czułości.

Destrukcja przewodów żółciowych następuje na skutek immunologicznej reakcji krzyżowej spowodowanej podobieństwem epitopów antygenowych białek organizmu do epitopów czynników sprawczych. Istnieją doniesienia o możliwej patogenetycznej roli zarówno bakterii, np. *Escherichia coli* i wirusów należących do *Betaretroviridae* a także związków chemicznych, które mogą indukować powstanie przeciwciał wykazujących powinowactwo do dehydrogenazy pirogronianowej (PDC-E2) cholangiocytołów.

Terapia opiera się na łagodzeniu skutków cholestazy i zahamowaniu progresji choroby. Lekiem z wyboru jest kwas ursodeoksycholowy, którego skuteczność w leczeniu jest jednak ograniczona. Stosuje się też leki zwalczające uporczywy świąd, wyrównuje niedobory witamin i wapnia. Pacjenci z powikłaniami marskości wątroby są kwalifikowani do przeszczepu wątroby, a ryzyko nawrotu pierwotnej marskości wynosi 30-50%, jednak przebieg schorzenia jest łagodny.

1.1.2. Autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AIH)

AIH należy do grupy autoimmunologicznych chorób wątroby, do której należą także pierwotna marskość żółciowa i pierwotne, stwardniające zapalenie dróg żółciowych. Jest przewlekłą, postępującą chorobą, w większości dotyczącą kobiet i rozpoznawaną na podstawie obecności biochemicznych / wysokie aktywności aminotransferaz / i histologicznych cech zapalenia wątroby – martwiczo-zapalnym uszkodzeniem hepatocytów, hipergammaglobulinemii z przewagą IgG, krążących autoprzeciwciał przy braku dowodów na wirusowe zapalenie. Typ AIH jest uzależniony od rodzaju stwierdzanych w surowicy krwi przeciwciał - o typie I mówimy, gdy

występują przeciwciała przeciwjądrowe ANA i przeciw mięśniom gładkim ASMA i rzadsze- przeciwartynowe-AAA, przeciw rozpuszczalnemu antygenowi wątrobowemu SLA oraz przeciw cytoplazmie neutrofilów ANCA. Typ II charakteryzują przeciwciała przeciw mikrosomom wątroby i nerki LKM-1 i przeciw antygenowi cytozolowemu hepatocytów LC-1.

„Autoimmunologiczne ” oznacza przewlekły proces zapalny, którego przebieg kliniczny może mieć jednak również przebieg ostry lub nadostry . Czynniki stymulujące układ immunologiczny/wirusy bądź leki/ mogą wyzwolić proces autoimmunizacyjny. Główną rolę w patomechanizmie AIH stanowi błędna prezentacja autoantygenów. Krzyżowa reakcja immunologiczna związana z brakiem rozróżniania determinantów antygenowych wirusów lub leków od własnych poprzez pobudzenie proliferacji limfocytów cytotoksycznych prowadzi do niszczenia zarówno czynników wyzwalających proces zapalny jak i hepatocytów prezentujących własne antygeny.

Dowodzono, że ryzyko rozwoju AIH jest zwiększone u osób z antygenami MHC klasy I i II. Interesującym zjawiskiem występującym u wielu chorych w okresie poprzedzającym zastosowanie leczenia immunosupresyjnego jest naprzemienny przebieg choroby z okresami zaostrzeń i poprawy, wskazujący na istnienie mechanizmów usiłujących powstrzymać zmienioną reakcję układu odpornościowego skierowaną przeciwko własnym antygenom wątroby i leżącą u podstawy rozwoju choroby.

Histologiczna ocena bioptatu wątroby /pobieranego w wątpliwych przypadkach/ wykazuje charakterystyczne zmiany. Są nimi nacieki zapalne przestrzeni wrotnych i obwodowych stref płacików wątrobowych z komórek plazmatycznych i limfocytów T, ogniskowa martwica hepatocytów, obrzęk komórek, cytoplazma z cechami zwyrodnienia balonowatego, a także włóknienie przeszłowe.

W leczeniu AIH skuteczne są klasyczne glikokortykosteroidy, ale też tiopuryny - azatiopryna czy jej pochodna - 6-merkaptopuryna. Uzyskanie całkowitej remisji choroby nie kończy leczenia, konieczna jest terapia podtrzymująca przez 2-4 lata.

Ostateczną formą leczenia pacjentów ze schyłkową marskością na tle AIH jest przeszczep wątroby, jednak nawet w przeszczepie może dojść do nawrotu choroby.

1.1.3. Alkoholowa choroba wątroby

Rozwój postępujących chorób wątroby tj. alkoholowego zapalenia wątroby i marskości jest ściśle uzależnione od całkowitej ilości spożytego alkoholu w ciągu całego życia .

Postępujące uszkodzenie wątroby wywołane alkoholem prowadzi do kluczowej zmiany patologicznej jaką jest stłuszczenie, alkoholowe zapalenie wątroby lub marskość. Może ono przybierać różne postaci: od bezobjawowych łagodnych zmian, po ciężką chorobę ze wszystkimi objawami i powikłaniami niewydolności wątroby. Czynniki dodatkowe biorące udział w uszkodzeniu wątroby to także płęć /alkoholowa choroba wątroby częściej rozwija się u kobiet/, zakażenia wirusowe/wirusy hepatotropowe/, leki - /amiodaron, estrogeny/ czy stan odżywienia.

Rozpoznanie alkoholowej choroby wątroby zdecydowanie potwierdzają następujące wyniki badań: wzrost GGTP, ASPAT /ALAT / powyżej 1 , często 2/ i wzrost MCV .

U prawie wszystkich osób pijących duże ilości alkoholu dochodzi do rozwoju stłuszczenia wątroby. U 20-30 % / wg kliniki i badań sekcyjnych/ dochodzi do alkoholowego zapalenia wątroby lub marskości .

Alkohol jest wchłaniany przez błonę śluzową na całej długości przewodu pokarmowego w drodze prostej dyfuzji. Około 80 % spożytego alkoholu jest

metabolizowane w wątrobie. Inne narządy tj. żołądek, jelita oraz nerki w procesie utleniania alkoholu biorą jedynie udział w niewielkim stopniu. Eliminacja następuje także z wydychanym powietrzem (1 – 3%) i moczem (1%).W wątrobie alkohol etylowy jest utleniany w cytoplazmie hepatocyta, przy udziale dehydrogenazy alkoholowej/ADH/, a także przy pomocy enzymów mikrosomalnych i katalazy peroksysomalnej. Toksyczny aldehyd octowy pod wpływem dehydrogenazy aldehydu octowego/ALDH/ jest metabolizowany do kwasu octowego.

Metabolizm alkoholu

Alkohol → aldehyd octowy → kwas octowy

utlenianie w cytozolu hepatocyta

Kwas octowy jest uwalniany z komórek do krwi i metabolizowany w tkankach obwodowych. Główny szlak prowadzi przez ADH (dehydrogenaza alkoholowa – główny izoenzym klasy I). Inna droga to mikrosomalny system utleniania poprzez cytochrom

P 450 określany jako CYP2E1. Uczestniczy on w utlenianiu alkoholu jedynie przy wysokich stężeniach. Z kolei głównym enzymem odpowiedzialnym za utlenianie aldehydu octowego jest jego dehydrogenaza ALDH (izoenzym I), której głównym źródłem są mitochondria.

Wśród mechanizmów zaproponowanych w celu wyjaśnienia patogenezy alkoholowego uszkodzenia wątroby wymienia się :bezpośrednie działanie hepatotoksyczne i pośrednie - polegające na tworzeniu wolnych rodników tlenowych, pobudzeniu układu odpornościowego i uszkodzeniu bariery jelitowej. Nadprodukcja wolnych rodników,

powstałych wskutek uaktywnienia enzymów mikrosomalnych, zmian w mitochondriach i uwolnienia zjonizowanego żelaza z komórek powoduje uszkodzenia błon komórkowych /peroksydacja wielonienasyconych lipidów/ i uszkodzenia DNA. Utlenianie lipidów skutkuje także powstaniem innych toksycznych związków, jak np. dialdehyd malonowy /MDA/, który odgrywa rolę w syntezie kolagenu wątrobowego. Wykazane zaburzenia syntezy S-adenozylometioniny-prekursora glutationu-wpływają na deficyt fosfatydylocholiny (przeciwutleniacza błon komórkowych). Nadmierna produkcja NADH – zredukowanej postaci dinukleotydu nikotynamidoadeninowego podczas przemiany etanolu powoduje zaburzenie równowagi oksydoredukcyjnej w komórce hepatocyta i w efekcie prowadzi do supresji utleniania mitochondrialnego, wzrostu syntezy wolnych kwasów tłuszczowych, trójglicerydów i mleczanów w wątrobie, mobilizuje żelazo ferrytynowe, które jest katalizatorem w procesie produkcji rodników hydroksylowych z nadtlenu. Większe zużycie tlenu przez wątrobę u alkoholików nasila stłuszczenie hepatocytów, włóknienie i zmiany martwiczo-zapalne. Kolejne mechanizmy hepatotoksyczności etanolu i aldehydu octowego związane są :

- z deficytem energetycznym /brak możliwości wykorzystania energii z przemian alkoholu z powodu zaburzeń funkcji mitochondriów i nierównowagi oksydoredukcyjnej/
- z toksycznością aldehydu octowego w zakresie białek - inaktywacji enzymów, zaburzeń funkcji szkieletu cytoplazmatycznego i siateczki wewnątrzplazmatycznej
- z uszkodzeniem DNA
- uszkodzeniem mitochondriów
- z endotoksemią – wzrost przepuszczalności jelitowej bariery śluzówkowej zwiększa przepuszczalność jelita dla endotoksyn, które promują produkcję prozapalnych cytokin - TNF- α , IL-1, 6 i 8.

-z mechanizmami immunologicznymi - kompleksy rodników acetaldehydowych lub hydroksylowych prowadzą do powstania nowych antygenów, co indukuje powstanie przeciwciał przeciwjądrowych, wzrost stężenia g-globulin i IgA.

- z włóknieniem – wywołanym przez pobudzenie komórek gwiaździstych /kom. Ito/ przez aldehyd octowy i niektóre cytokiny, a także poprzez obecność np. TGF- β , którego źródłem są pobudzone komórki Browicza-Kupffera czy śródbłonek.

Postacie kliniczne alkoholowej choroby wątroby to: stłuszczenie, zapalenie alkoholowe i marskość. Podstawą leczenia alkoholowej choroby wątroby jest abstynencja alkoholowa, wsparcie psychologiczne i wyrównywanie niedoborów białkowo-energetycznych.

1.1.4. Marskość wątroby

Istnieje szerokie spektrum klinicznych postaci marskości od nieznacznych objawów do zagrażających życiu. Najczęstszą przyczyną marskości w Polsce jest zakażenie HBV i HCV oraz alkoholowa choroba wątroby. Najczęstsze objawy marskości to osłabienie, brak łaknienia, spadek masy ciała (niezauważalny z powodu wodobrzusza i obrzęków). Żółtaczka i stany podgorączkowe to typowe objawy niewyrównanej marskości. Do następstw niewydolności wątroby i nadciśnienia wrotnego zalicza się splenomegalię, wodobrzusze i obrzęki, krwotok z żyłaków przełyku i żołądka, encefalopatię i skłonność do krwawień z powodu spadku poziom czynników krzepnięcia. Inne objawy to także rumień dłoniowy, pajęczki naczyniowe, teleangiektazje, przykurcz Dupuytrena, feminizacja u mężczyzn będąca wynikiem atrofii jąder, zaburzenia metabolizmu androgenów i estrogenów, samoistne zapalenie otrzewnej i rozwój zespołu wątrobowo-nerkowego, a także zaburzenia neurologiczne i psychiatryczne.

Ze względu na upośledzoną funkcję hepatocytów, w surowicy krwi stwierdzić można – obniżone stężenie albuminy, wydłużony czas protrombinowy i hiperbilirubinemię. W ocenie histopatologicznej włóknienie ocenić można stosując jedną z wielu skal, np. 4-st. skalę Metavir. Pośrednią metodą oceny włóknienia wątroby jest elastografia USG, oceniająca elastyczność /sztywność/ wątroby po zastosowaniu fali ultradźwiękowej.

Leczenie marskości wątroby polega na leczeniu powikłań nadciśnienia wrotnego : krwawienia z żyłaków przełyku, wodobrzusza, zespołu wątrobowo-nerkowego, samoistnego bakteryjnego zapalenia otrzewnej, encefalopatii wątrobowej. Rokowanie zależy od wydolności metabolicznej wątroby i powikłań nadciśnienia wrotnego. Skala Childa lub MELD są stosowane do określenia rokowania w schorzeniach prowadzących do niewydolności wątroby (głównie w marskości) i konieczności przeszczepienia wątroby.

1.2. Wpływ kreatyny na przemiany metaboliczne i potencjał antyoksydacyjny organizmu.

1.2.1. Kreatyna

Kreatyna – kwas metyloguanidynoowy – $C_4H_9N_3O_2$ → to fizjologicznie aktywna substancja nieodzowna do skurczu mięśni. Zawartość w organizmie to około 120 do 140 gramów, z czego 98 % zmagazynowane jest w mięśniach. Związany z fosforanem tworzy zapasową formę fosforanów bogatoenergetycznych. W warunkach fizjologicznych, głównie w czasie wysiłków beztlenowych - fosforan kreatyny pełni istotną rolę w restytucji ATP w organizmie. Fosforan kreatyny obecny w mięśniach, będących w spoczynku występuje w ilości 3-4 razy większej niż ATP, jest głównym źródłem bezpośredniej energii dla skurczu mięśni.

Jeśli stężenie komórkowe kreatyny znacznie się zwiększy pojawia się efekt zmęczenia.

Synteza kreatyny odbywa się w wątrobie i nerkach. W przypadku przewlekłych stanów zapalnych tych narządów może dochodzić do zaburzeń syntezy endogennej kreatyny i jej deficytu w organizmie.

Uszkodzenie wątroby wywołane przez ostre i przewlekłe stany zapalne wątroby prowadzić mogą do nieprawidłowej pracy mięśni i osłabienia niektórych funkcji mózgu.

W przebiegu stanów zapalnych wątroby poziom kreatyny w osoczu oraz aktywność fosfokinazy kreatynowej jest zwykle podwyższony.

Poziom fosfokreatyny może ulec gwałtownemu spadkowi w czasie aktywnej pracy mózgu, podczas gdy poziom ATP pozostaje relatywnie stały.

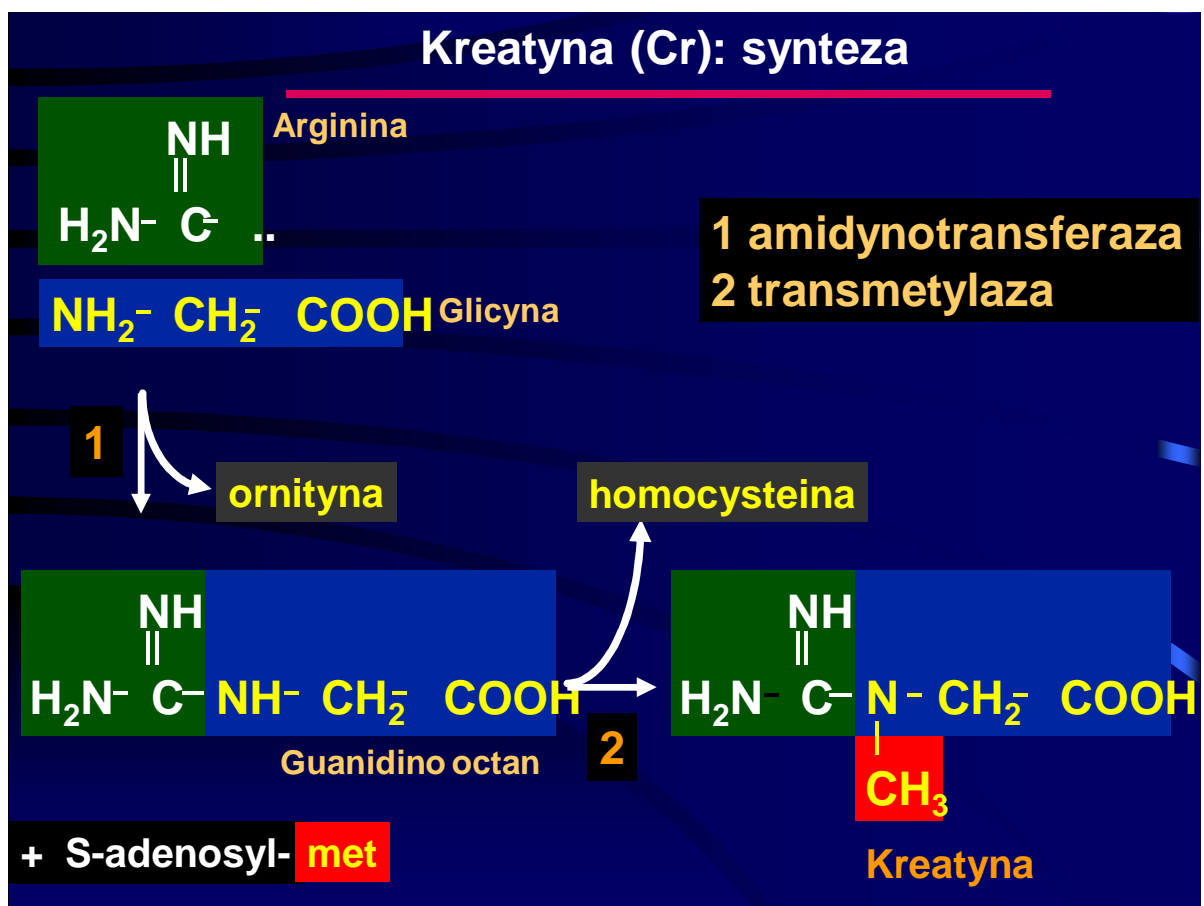
Prawidłowe dzienne wymagania żywieniowe oraz ilość endogennie syntetyzowanej kreatyny wynoszą 2 gramy. Suplementacja kreatyną nie prowadzi do zagrożeń zdrowotnych i brak doniesień o jej negatywnych skutkach zdrowotnych. Poza kluczową rolę kreatyny

w metabolizmie energetycznym skurczu mięśni może ona wpływać też na procesy energetyczne zachodzące podczas pracy mózgu. ATP w mózgu jest silnie buforowane przez reakcje przeniesienia wysokoenergetycznego fosforanu z fosfokreatyny na ADP z udziałem kinazy kreatynowej.

W biosyntezie kreatyny biorą udział: glicyna, arginina, metionina.

Przeniesienie grupy guanidynowej z argininy na glicynę, formując guanidinoocetan

(glikocyjaminę) zachodzi w nerce. Biosynteza kreatyny kończy się w wątrobie reakcją metylacji glikocyjminy przy udziale S-adenozylometioniny.

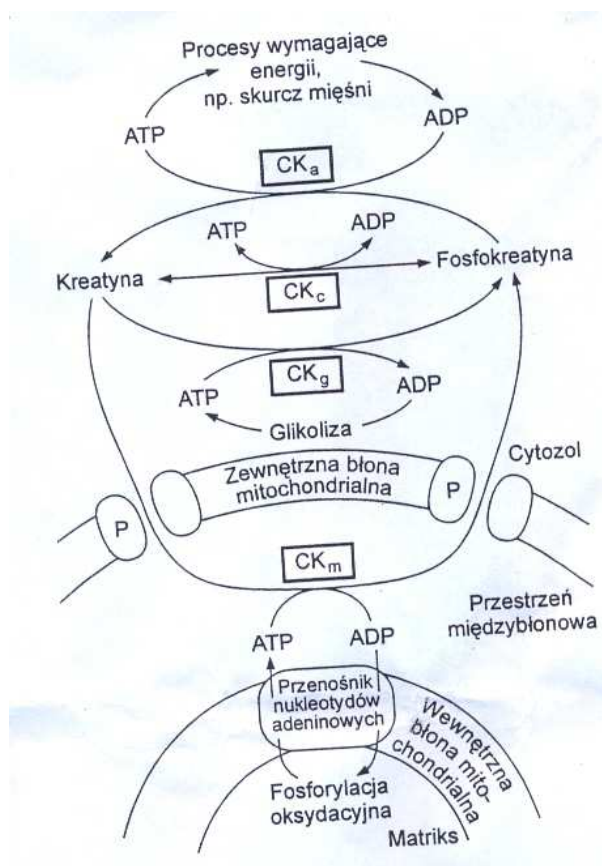


Podstawowym źródłem kreatyny są ryby i czerwone mięso.

Dla wegetarian i wegan jedynym źródłem tego składnika jest synteza endogenna. Organizm ludzki gromadzi kreatynę w dwóch postaciach : wolnej i sfosforylowanej. Dorosły mężczyzna o masie około 76 kg posiada około 120 gram kreatyny z czego 95 % jest w mięśniach szkieletowych, w tym 60 – 70 % to fosfokreatyna, 30-40 % wolna kreatyna a około 5 % znajduje się w mięśniach gładkich, sercu, mózgu i jądrach.

Układ kreatyna – fosfokreatyna działa jako dynamiczny system transportu fosforanu bogatoenergetycznego z mitochondriów w aktywnych tkankach : mięśniu sercowym lub mięśniach szkieletowych.

Fosfokreatyna pełni w tym systemie rolę buforu energetycznego. Izoenzymy kinazy kreatynowej będące w przestrzeni międzybłonowej katalizują reakcje przeniesienia na kreatynę fosforanu bogatoenergetycznego z ATP. Powstała w tej reakcji fosfokreatyna jest następnie transportowana do cytozolu, gdzie może być użyta do tworzenia pozamitochondrialnego ATP potrzebnego do procesów wymagających energii np. skurczu mięśni.



Istnieją prace analizujące wpływ suplementacji kreatyny na procesy myślowe i pamięciowe. Jedną z nich jest praca z uniwersytetu z Sydney z 2006 r., z której wynika, że doustna suplementacja kreatyną polepsza wyniki testów na inteligencję i pamięć.

Aktywność mózgu może wzrosnąć po dostarczeniu mu paliwa np. glukozy lub tlenu. Podobną rolę w ww. pracy odgrywa kreatyna (dzięki znaczącej roli jaką odgrywa ona w homeostazie energetycznej organizmu człowieka).

Wykazano, że kreatyna ma działanie neuroochronne a także to, że suplementacja kreatyny zmniejsza zmęczenie umysłu i zmniejsza zapotrzebowania mózgu na tlen (Watanabe – 2002).

Badanie wykazało, że zastosowanie ustnej suplementacji kreatyną wpłynęło na poprawne funkcjonowanie mózgu. Wykazano to poprzez testy na inteligencję i testy pamięciowe.

Kolejna praca (Neurology 2006r.) dowodzi korzystnego wpływu suplementacji kreatyną u chorych z rozpoznaną płasawicą Huntingtona. W pracy tej dowiedziono, że podawanie 8 g na dobę kreatyny przez 16 tygodni jest dobrze tolerowane i bezpieczne. Poziom kreatyny w osoczu krwi i mózgu u grupy badanej wzrósł i spadł po zaprzestaniu suplementacji.

Ponadto osoczowy poziom 8- hydroksy 2- deoksyguanozyny (8OH201G- wskaźnik oksydacyjnego uszkodzenia DNA) spadał u leczonych kreatyną.

1.2.2. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny to niekontrolowany wzrost stężeń reaktywnych metabolitów tlenu. Może on mieć groźne konsekwencje. Wiemy dziś, że jest on elementem składowym molekularnych mechanizmów wielu chorób, takich jak miażdżyca, cukrzyca, choroba nowotworowa, że może przyczyniać się do uszkodzenia serca i mózgu w zawałach, do uszkodzenia przeszczepionych narządów. Mechanizm szkodliwego działania wielu ksenobiotyków wiąże

się z wytworzeniem w komórkach reaktywnych form tlenu (RFT). Na tym polega między innymi szkodliwe działanie dymu tytoniowego i alkoholu. Reakcje reaktywnych form tlenu mają swój wkład także w procesy starzenia się komórek. Poznanie mechanizmów działania RFT stwarza możliwości ingerencji w choroby, w których rozwoju związki te uczestniczą. Wolne rodniki to atomy lub cząsteczki zdolne do samodzielnego istnienia mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów.

Wolne rodniki charakteryzuje wysoka reaktywność, zazwyczaj szybko wchodzi w reakcje z wieloma różnymi cząsteczkami. W komórkach ciała ludzkiego najważniejszym komórkowym źródłem wolnych rodników a raczej RFT jest łańcuch oddechowy, w którym na drodze procesu jednoelektronowego dochodzi do redukcji tlenu. W jego wyniku dochodzi do powstania anionorodnika nadadtlenkowego. Jest to najważniejsze źródło rodników nadadtlenkowych w większości komórek aerobowych.

W łańcuchu oddechowym za te procesy odpowiada dehydrogenaza NADH i ubichinon, których zredukowane formy wchodzi w jednoelektronową reakcję z tlenem tworząc nadadtlenki. To konkurencyjna reakcja w stosunku do właściwych reakcji tych elementów łańcucha oddechowego.

Organizmy żywe zawierają enzymy katalizujące rozkład anionorodnika nadadtlenkowego i nadadtlenku wodoru, należą do nich: dysmutaza nadadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, a także inne.

Najważniejsze skutki stresu oksydacyjnego to : inaktywacja niektórych białek, wzmożony katabolizm nukleotydów adeninowych, wzrost szybkości peroksydacji lipidów, uszkodzenie mitochondriów, spadek poziomu ATP i glutationu, zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia, wzrost przepuszczalności i depolaryzacja błon komórkowych, uszkodzenie DNA (kwasy nukleinowe), rozpad krwinek czerwonych, zmiana własności antygenowych komórek i starzenie się komórek.

Zatrucia wieloma ksenobiotykami prowadzące do degeneracji i martwicy wątroby uwarunkowane są ciągiem reakcji wolnorodnikowych zapoczątkowanych przez metaboliczne przemiany tych związków w mikrosomach hepatocytów. Uważa się powszechnie, że istotnym elementem uszkodzenia wątroby przez związki hepatotoksyczne jest peroksydacja lipidów ale także możliwy jest inny mechanizm np. wchodzenie w cykle red-oks i wytwarzanie dużych ilości RFT, które atakują nie tylko lipidy.

Powszechnie uważa się, że wysiłek fizyczny jest korzystny dla zdrowia. Nagły intensywny wysiłek jednak może uszkadzać mięśnie. Biochemicznie stwierdzić można po takim wysiłku nadmierną kumulację wapnia w siateczce śródplazmatycznej komórek mięśni szkieletowych.

Ta aktywować może proteazy sarkoplazmy, co w efekcie może doprowadzić do utraty integralności sarkolemy i uwolnienia do osocza krwi enzymów cytoplazmatycznych takich jak kinaza kreatynowa, β -glukouronidaza, dehydrogenaza mleczanowa i ASPAT, co istotnie obserwuje się w następstwie intensywnego wysiłku.

Oprócz innych czynników rolę w uszkodzeniu mięśnia w czasie wysiłku odgrywają też RTF. Wzmaga się peroksydacja lipidów, zużywają się antyoksydanty, zwłaszcza glutation i witamina E.

RFT pośredniczą również w uszkodzeniach mięśni wywołanych skrajnie odmienną sytuacją – zupełnym brakiem ruchu. Unieruchomienie prowadzi do atrofii, któremu towarzyszy stres oksydacyjny, ponieważ w nieruchomym mięśniu wzmaga się peroksydacja lipidów i rośnie stężenie utlenionej formy glutationu.

Jony metali przejściowych, w tym jony żelaza są wolnymi rodnikami (ponieważ są tworami mającymi niesparowany elektron na orbicie walencyjnej).

Żelazo jest niezbędnym składnikiem organizmów żywych, jego niedobór wywołuje anemię. Jest potrzebne do syntezy hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów, katalazy i innych białek hemowych i niehemowych.

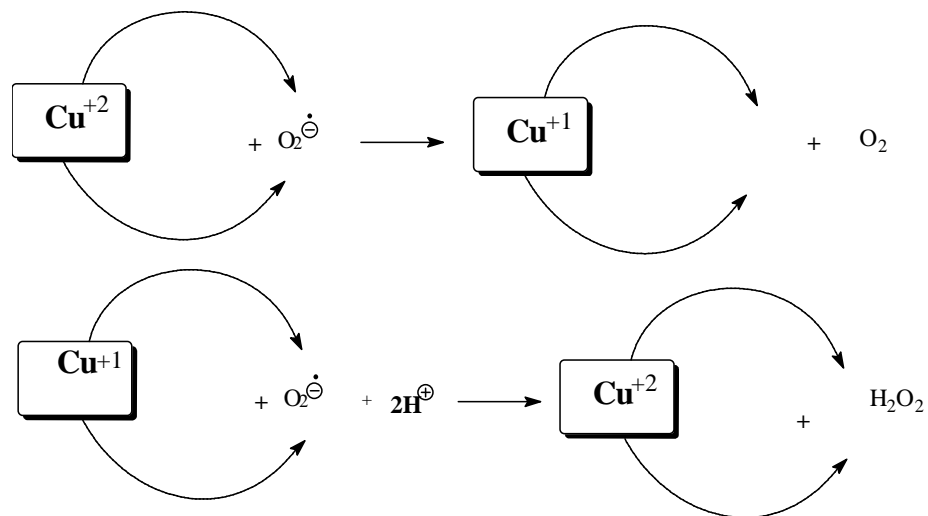
Regulacja poziomu żelaza w organizmie odbywa się przez regulację wchłaniania.

Ciało człowieka zawiera około 4,5 grama żelaza, krąży w osoczu głównie związane z transferyną.

Żelazo może występować na różnych stopniach utlenienia, co oznacza możliwość jego utleniania w reakcji z tlenem lub nadtlenkiem wodoru i redukcji przez inne substancje, a tym samym katalizowania przez niego reakcji prowadzących do powstania RFT (reaktywnych form tlenu).

1.2.3. Rola miedzi, cynku i seleniu jako antyoksydantów w organizmie

Miedź jest zawarta w około 20 enzymach biorących udział w procesach redukcyjno - oksydacyjnych. Do najbardziej jednak znanych, klasycznych „zmiataczy” RFT należy Cu,Zn-SOD (miedziowo-cynkowa dysmutaza nadadtlenkowa - Cu,Zn-SOD) usuwająca powstały z tlenu anionorodnik nadadtlenkowy, który jest jedną z form RFT. Dzięki temu nie dochodzi między innymi do uszkodzeń nadadtlenkowych zasad purynowych w DNA. Oksydaza lizylova jest również enzymem zawierającym miedź. Odpowiada ona za wiązania krzyżowe w elastynie i kolagenie. Prawidłowe działanie tego enzymu w organizmie wiąże się z właściwym stanem naczyń krwionośnych. Niedobór miedzi w organizmie występujący w dłuższym okresie czasu, może się wiązać z obniżoną aktywnością tych enzymów wpływając na rozwój chorób nowotworowych i układu krążenia. Nadmiar cynku w diecie prowadzi do obniżonej absorpcji miedzi z dietą, poprzez kompetencyjny wobec cynku mechanizm wchłaniania miedzi w jelicie cienkim. Mechanizm „zmiatania” RFT przez antyoksydant pierwszej linii obrony, jakim jest Zn,Cu-dysmutaza nadadtlenkowa przedstawia poniższy schemat dezaktywacji anionorodnika nadadtlenkowego:



Istnieją dowody na antyoksydacyjne działanie dysmutazy Zn,Cu- SOD w układach biologicznych *in vivo* i *in vitro* (Freeman 1985, Taylor 1988, Prohaska 1991).

Chociaż wiele doniesień potwierdza obniżoną aktywność Cu,Zn-SOD podczas deficytu miedzi w organizmie spowodowanym niewłaściwą dietą, to badania immunologiczne sugerują, że apoenzym tego enzymu nie zmienia się (Chung 1998, Dameron 1987).

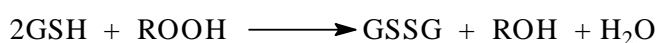
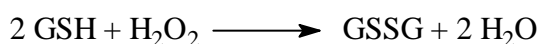
„Zmiananie” wolnych rodników przez Cu,Zn-SOD powstających w okresie tzw. „stresu oksydacyjnego” zapobiega peroksydacji lipidów i w konsekwencji uszkodzeniu błon komórkowych. Tego typu uszkodzenia komórek mogą zachodzić w wątrobie i prowadzić do przewlekłych chorób tego narządu. Mogą także np. uszkadzać endothelium co może powodować szereg patologicznych procesów, w wyniku których dochodzi do rozwoju blaszki miażdżycowej i rozwoju miażdżycy.

Dysmutaza ponadtlenkowa (Zn,Cu-SOD)

Cu,Zn-dysmutaza ponadtlenkowa występuje w cytozolu. Początkowo wyizolowano identyczne z Cu,Zn-SOD białka, które nosiły różne nazwy z powodu braku znajomości ich funkcji enzymatycznej: z krwi – erytrokuperina, z wątroby – hepatokuperina, z mózgu cerebrokuperina. Ciężar cząsteczkowy dysmutazy ponadtlenkowej wynosi 32000. Składa się ona z dwóch identycznych podjednostek. Zawiera jeden atom Cu^{+2} i jeden atom Zn^{+2} w podjednostce (Fridovich 1975), położone blisko siebie w cząsteczce białka. Obydwa jony Cu^{+2} i Zn^{+2} są wiązane przez tę samą resztę histydynową enzymu oraz prawdopodobnie biorą udział zarówno w procesie wiązania substratu, jak i procesie przeniesienia elektronu. Reakcja enzymatycznej dysmutacji anionu nadtlenkowego zachodzi w dwóch etapach: w pierwszej reakcji anionorodnik ponadtlenkowy jest utleniany do tlenu cząsteczkowego, a jon miedzi jest redukowany Cu(I), w drugiej reakcji jon Cu(I) jest utleniany do Cu(II) a anionorodnik ponadtlenkowy jest redukowany do nadtlenu wodoru (Mielcarz 1998). Powstający nadtlenek wodoru jest rozkładany przez peroksydazę glutationową (selenozależną).

Peroxydaza glutationowa

Selen jest pierwiastkiem, który występuje w peroksydazie glutationowej, enzymie kontrolującym rozkład nadtlenu wodoru (należy również do RFT). Enzym ten katalizuje utlenianie zredukowanego glutationu do formy utlenionej (redukując nadtlenek wodoru do wody):



Zredukowany glutation chroni błonę lipidową i inne składniki komórki poprzez rozkład hydroksynadtlenków lipidowych R_1OOH .

Całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu (Total Antioxidant Status-TAS);

FRAP – Ferric Reducing Ability of Plasma)

Organizm człowieka posiada mechanizmy obronne polegające na przeciwstawianiu się powstawaniu wolnych rodników oraz zapobieganiu ich niszczyielskim skutkom. Suma wszystkich procesów prowadzących do utylizacji wolnych rodników, czy wręcz niedopuszczenia do ich powstania w organizmie nazywa się **całkowitym potencjałem antyoksydacyjnym organizmu** (Demirel 2010, Olah 2010, Bacic-Vrca 2005, Antebi 2004).

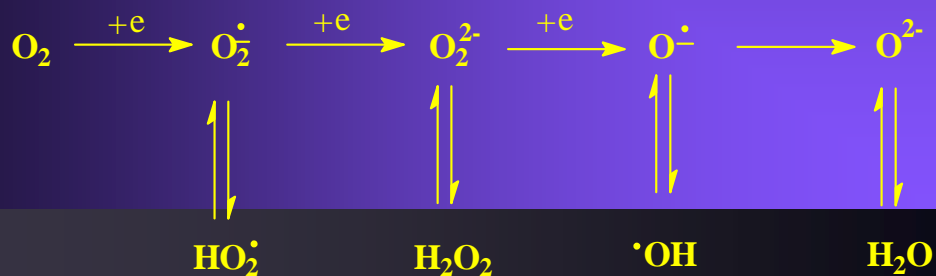
Na całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu składają się trzy linie jego obrony.

Pierwszą linię stanowią enzymy antyoksydacyjne, drugą związki biologicznie czynne (np. kreatyna), a trzecią enzymy naprawcze DNA.

Enzymy antyoksydacyjne zawierające w swej cząsteczce istotne dla życia biopierwiastki czyli Cu i Zn, należą do I-szej linii obrony antyoksydacyjnej organizmu. Ich ewentualny deficyt w organizmie prowadzi do obniżenia całkowitego potencjału antyoksydacyjnego organizmu. Antyoksydanty z tej grupy stanowią podstawową barierę obniżającą tworzenie się wolnych rodników (tzw. „zmiatacze” wolnych rodników). Do tego układu enzymów oprócz Cu,Zn-SOD należy oksydaza cytochromowa, selenozależna peroksydaza glutationowa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) a także białko osocza zawierające miedź – ceruloplazmina (ogranicza dostępność Fe^{2+} w osoczu, a tym samym zmniejsza możliwość tworzenia się rodnika wodorotlenowego w reakcji Fentona i Haber-Weissa).

Reaktywne Formy Tlenu

■ Reakcja Fentona i Habera - Weisa



Do antyoksydantów drugiej linii obrony należą substancje bezpośrednio spełniające funkcje antyoksydacyjne i zapobiegające amplifikacji związków wolnorodnikowych. Należą tu związki chemiczne, które działają w środowisku hydrofilowym i hydrofobowym.

Działanie antyoksydantów drugiej linii obrony polega na bezpośredniej reakcji oksydoredukcyjnej, w której obie cząsteczki np. RFT tracą właściwości prooksydacyjne (ulegają redukcji) np. kwas askorbinowy reagując z anionorodnikiem nadadtlenkowym dezaktywuje jego działanie jako rodnika przekształcając jednak witaminę C w kwas dehydro-L-askorbinowy, który traci biologiczne właściwości witaminy C.

Najważniejsze antyoksydanty II linii obrony przedstawiono na rycinie poniżej:

Antyoksydanty drugiej linii obrony

Środowisko hydrofilowe:

- Polifenole
- Glutation
- Witamina C
- Kwas moczowy
- Kreatynina
- Karnozyna
- Kwas fitynowy
- Melatonina

Środowisko hydrofobowe:

- Witamina E
- Karotenoidy
- Bilirubina, biliwerdyna
- Pochodne estronu i estradiolu
- Cholesterol
- Witamina D₂ i D₃

Badanie wpływu I-szej linii obrony antyoksydacyjnej (należą tu biopierwiastki: Cu, Zn i Se) oraz drugiej linii obrony antyoksydacyjnej (należy tutaj kreatyna) na przebieg chorób cywilizacyjnych (w tym przewlekłych chorób wątroby) oraz ich udziału w całkowitej zdolności organizmu do obrony antyoksydacyjnej organizmu wydaje się celowym w badaniu etiopatogenezy przewlekłych chorób wątroby.

2. CEL PRACY

1. Ocena stężeń cynku, miedzi, selenu oraz możliwa współzależność stężeń tych biopierwiastków od całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby.
2. Ocena wpływu tygodniowej suplementacji monohydratem kreatyny na stężenie Zn, Cu, Se oraz całkowity potencjał antyoksydacyjnego osocza u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby.
3. Ocena wpływu suplementacji hydratem kreatyny jako związku ergogenicznego na poprawę wydolności fizycznej u chorych z obniżonymi parametrami czynnościowymi wątroby.
4. Ocena wpływu suplementacji hydratem kreatyny na zdolności pamięciowe i poznawcze u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Grupa badanych chorych z przewlekłymi chorobami wątroby

Badaniami objęto 15 kobiet i 12 mężczyzn ze zdiagnozowanymi przewlekłymi chorobami wątroby. Pacjenci byli hospitalizowani w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Średni czas trwania choroby wynosił trzy lata. Chorzy charakteryzowali się klinicznie następującymi jednostkami chorobowymi: osiemnaście osób – C.H.pA (marskość wątroby poalkoholowa), sześć osób – AIH (autoimmunologiczne zapalenie wątroby), 3 osoby - PBC (pierwotna marskość żółciowa wątroby).

Zakres wieku badanych osób wynosił 33 – 70 lat. Zgodę na prowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna przy Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W pierwszym tygodniu badań chorzy otrzymywali placebo (skrobia ziemniaczana). W następnym tygodniu ci sami chorzy otrzymywali kreatynę (Cr) w postaci hydratu kreatyny (Degussa Food Ingredienst, Niemcy). Zastosowana dawka kreatyny wynosiła 20g /dzień przez okres jednego tygodnia (Harris R.C., 1992). Dzienną dawkę podzielono na cztery porcje po 5g i rozpuszczono w 250 ml wody. Spożywano ją w ciągu dnia w następujących odstępach czasowych: rano, w południe, popołudniu oraz wieczorem.

3.2. Metodyka badań laboratoryjnych

3.2.1. Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego do badań

Od badanych pacjentów pobrano na czczo około 17 ml krwi z żyły łokciowej do probówek zawierających wersenian sodowy (K_3EDTA) jako antykoagulant (Monovette, Sarsted). Krew poddawano wirowaniu przez 10 minut z siłą odśrodkową 800g. Otrzymane osocze zbierano do probówek i w stanie zamrożonym (-80^0C) przechowywano dla oznaczeń mikroelementów (Cu, Zn, Se) oraz oznaczenia całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza, które oznaczono metodą FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*).

3.2.2. Oznaczenia miedzi, cynku i selenu w osoczu, metodą bezpłomieniowej atomowej spektroskopii absorpcyjnej

Do przeprowadzenia wszystkich oznaczeń w badanym materiale biologicznym wykorzystano aparat do bezpłomieniowej spektroskopii absorpcyjnej Perkin-Elmer Zeeman 3030 wyposażonym w piec grafitowy HGA-600 i automatyczny podajnik próbek AS-40 (rycina 1). Jako materiałów referencyjnych dla sprawdzenia krzywych wzorcowych oznaczanych biopierwiastków w surowicy krwi, użyto Seronom Trace Elements Serum (Nycomed Pharma As) a także sproszkowane tkanki mięśniowe zwierząt (IAEA, Vienna Austria) i wątrobę wołową (National Bureau of Standards 1577a). Wszystkie oznaczenia przeprowadzono stosując technikę analityczną dodawania standardu do próby. Każdy pomiar powtarzano trzykrotnie. W przypadku oznaczeń miedzi w osoczu krwi stosowano rozcieńczenie próby 1+9 uwzględniając dodatek albuminy do sporządzanych roztworów standardowych w celu wyrównania różnic lepkości pomiędzy osoczem i standardem.

Roztworem rozcieńczającym był 3% roztwór HNO_3 . Dla oznaczeń cynku w osoczu krwi stosowano rozcieńczenie próby 1+25. Roztworem rozcieńczającym był tutaj 0.1 M NH_4Cl w 0.05M buforze fosforanowym o pH 7,0. Przy oznaczaniu cynku celem uniknięcia zanieczyszczeń spowodowanymi obecnością śladowych ilości oznaczanych pierwiastków w rozcieńczalniku, koniecznym okazało się przepuszczenie rozcieńczalnika przez kolumnę z żywicą jonowymienną typu Chelex-100. Wymiary kolumny: 100 x 15 mm. Objętość podawanej próby do kuwety grafitowej (z platformą Lvov'a) próby wynosiła 20 μl .

W przypadku oznaczenia selenu próby rozcieńczano w stosunku 1:3 wodą spektralnie czystą z dodatkiem 1% Tryton X. Zastosowano modyfikatory chemiczne usprawniające właściwy proces demineralizacji i atomizacji zachodzącej w kuwecie grafitowej. Chemiczny skład 1 litra tego roztworu modyfikacyjnego był następujący: 1g azotanu srebra, 2g azotanu miedzi(II), 2g azotanu magnezu i 4ml 65% roztworu kwasu azotowego.

Wszystkie roztwory: standardowe, rozcieńczalnik, próby surowicy i roztwór modyfikujący wprowadzono do kuwety grafitowej przy pomocy automatycznego podajnika próbek AS- 40.

Optymalny program suszenia, spopielenia i atomizacji roztworów próbek ustalono eksperymentalnie. Dokonano trzykrotnych powtórzeń dla każdej próby. Błąd metody wynosił 3-5%. Warunki instrumentalne dla oznaczeń miedzi, cynku i wapnia przedstawiają poniższe tabele:



Rycina 1. Aparat do pomiarów atomowej spektroskopii absorpcyjnej *Perkin-Elmer Zeman 3030*

Tabela 1. Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń miedzi

Pierwiastek: Cu Długość fali (nm):324.8 Szczelina (nm): 0.7 Kuweta grafitowa z Lvov'a platformą					
Maksymalna moc grzania Zatrzymanie gazu (argonu) w czasie atomizacji					
Numer Operacji	Temperatura pieca (°C)	Czas (sek)		Przepływ gazu (ml/min)	Odczyt
		Dochodzenie	Trzymanie		
1	120	50	30	300	-
2	900	25	25	300	-
3	2100	0	5	0	*
4	2700	1	6	300	-
5	20	1	5	300	-

Tabela 2. Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń cynku

Pierwiastek: Zn	Długość fali (nm): 213.9	Szczelina (nm): 0.7	Kuweta grafitowa z Lvov'a platformą		
Maksymalna moc grzania	Zatrzymanie gazu (argonu) w czasie atomizacji (odczytu)				
Numer Operacji	Temperatura pieca (°C)	Czas (sek)		Przepływ gazu (ml/min)	Odczyt
		Dochodzenie	Trzymanie		
1	90	10	1	300	
2	110	10	1	300	
3	400	20	20	300	
4	2100	1	2	120	*
5	2500	1	2	300	
6	20	1	10	300	

Tabela 3. Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń selenu

Pierwiastek: Zn	Długość fali (nm): 196.0	Szczelina (nm): 0.7	Kuweta grafitowa z Lvov'a platformą		
Maksymalna moc grzania	Zatrzymanie gazu (argonu) w czasie atomizacji (odczytu)				
Numer Operacji	Temperatura pieca (°C)	Czas (sek)		Przepływ gazu (ml/min)	Odczyt
		Dochodzenie	Trzymanie		
1	150	20	80	300	
2	500	15	20	300	
3	500	1	30	300	
4	1200	10	20	300	
5	1200	1	3	0	
6	2100	0	5	0	*
7	2650	1	5	300	
8	20	1	10	300	

3.2.3. Oznaczanie ilościowe potencjału antyoksydacyjnego w surowicy metodą „FRAP”

Metoda FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), koncentruje się na oznaczeniu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza. Wykorzystuje się zdolności redukcyjne osocza do redukcji Fe^{+3} do Fe^{+2} . Reakcja przebiega w zakresie niskiego pH = 3.6 z powstaniem kolorowego niebiesko-fioletowego kompleksu Fe^{+2} -tripirydyl-s-triazyna (TPTZ). Absorbancja tego barwnego kompleksu jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 535 nm.

Przeprowadzono modyfikację tej metody z wykorzystaniem czytnika płytek firmy Labsystem Plate Reader (Szwecja). Pozwoliło to na oszczędność odczynników i zwiększenie szybkości wykonywanych analiz. Całkowita objętość mieszaniny reagującej wraz z objętością osocza wynosiła 340 μl . Użycie czytnika płytek zamiast tradycyjnego spektrofotometru UV-VIS, pozwoliło dokonać jednoczesnego pomiaru maksymalnie 80 próbek.

Mieszaninę reagującą sporządzono przez zmieszanie:

- 25 ml buforu octanowego o pH = 3,6
- 2,5 ml TPTZ (10 mmol/l)
- 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l)

Mieszaninę tę należy sporządzić bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiaru absorbancji. Roztwór mieszaniny należy inkubować w temperaturze 37°C w wyrząsarce izotermicznej Camlan Microtherm Shaker Model CVS 7487. Okres inkubacji powinien wynosić minimum 50minut.

Po naniesieniu standardowych roztworów na płytkę EIA, nanosimy 80 próbek osocza wraz z mieszaniną reagującą. Pomiaru dokonujemy przy $\lambda = 600\text{nm}$, Wstępne wytrząsanie płytki przed pomiarem wynosi 5 sek. z częstotliwością nastawioną na: *medium*.

Otrzymane wyniki są obliczane komputerowo z wykorzystaniem oprogramowania firmy Labsystem. Statystykę wyników przedstawiono z wykorzystaniem testu *t-studenta* dla zmiennych nie powiązanych.

3.2.4. Badania wysiłkowe – test marszowy

Badania wydolności fizycznej u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby przeprowadzono w oparciu o test 6 minutowego marszu – 6MWT (ang. *6 Minute Walk Test*), zwany także testem marszowym lub testem korytarzowym. Test ten stosowany jest głównie do określenia tolerancji wysiłku u chorych na choroby układu oddechowego oraz u osób z chorobami układu krążenia (Stoch-Uzciwek 2006). Test można wykonać po wyznaczeniu prostego odcinka drogi o długości 30 metrów, na którym istnieje twarde podłoże. Dystans marszu powinien być oznaczony. Na trasie co 3 metry powinny znajdować się znaczniki odległości. Do wykonania testu konieczne jest też posiadanie stopera, pulsoksymetru, ciśnieniomierza lekarskiego, źródła tlenu oraz kwestionariusza Borga, pozwalającego na subiektywną (przez pacjenta) ocenę stopnia duszności i zmęczenia (tak zwana skala Borga). Nie jest wymagane a jedynie zalecane, posiadanie sprzętu do reanimacji w miejscu przeprowadzania testu. Przed rozpoczęciem testu badany odpoczywa w pozycji siedzącej przez 10 minut. Do 2 godzin przed wykonaniem testu nie powinien wykonywać intensywnych wysiłków, badanie powinno być wykonane na czczo lub po lekkim posiłku. Wówczas wykonuje się wstępne pomiary ciśnienia tętniczego, tętna, saturacji. W przypadku braku przeciwwskazań do wykonania testu, instruuje się badanego, że w trakcie badania powinien chodzić własnym tempem, nie wolno mu podbiegać, ale może zwolnić lub się

zatrzymać. Celem badania jest przejście jak najdłuższego odcinka, a nie osiągnięcie tego w jak najlepszym czasie.

W trakcie testu ocenia się: długość marszu, średnią prędkość marszu, wydatek energetyczny wyrażony w równoważnikach metabolicznych (MET). Rejestruje się także liczbę przerw w trakcie testu i ich długość, ocenia się nasilenie duszności i zmęczenia w skali Borga. Określa się także saturację w trakcie wykonywania testu i po jego zakończeniu. Z uwagi na to, że badany sam narzuca tempo wysiłku, w trakcie badania może odpocząć, badanie jest bezpieczne. Może być wykonywane u osób starszych a nawet chorych z organicznym uszkodzeniem mięśnia sercowego. Według zaleceń ATS (*American Thoracic Society*) przy jego wykonaniu nie jest konieczna obecność lekarza.

W dotychczasowych badaniach związanych z szacowaniem wysiłków fizycznych stosowano kilka kryteriów ich klasyfikowania. Sposób wykorzystujący procesy metaboliczne odnosił się do klasyfikacji wysiłków za pomocą jednostek MET (ang. metabolic energy task), czyli wskaźnika wielokrotności podstawowej przemiany materii, gdzie przykładowo marsze i spacerzy sklasyfikowane były na poziomie 3 jednostek MET (Bronikowski, 2005).

MET – równoważnik metaboliczny [*metabolic equivalent*] jest jednostką spoczynkowego poboru tlenu [np. 3,5 ml O₂ na kilogram masy ciała na minutę], który uzyskuje się, dzieląc VO₂ (w ml/min) przez iloczyn masy ciała (w kg) x 3,5. Liczbę 3,5 przyjmuje się jako wartość odpowiadającą zużyciu tlenu w spoczynku i wyraża w mililitrach O₂ na kilogram masy ciała na minutę.

Porównując różne sposoby klasyfikacji wysiłków, wartości przekładano na poziom VO₂max, przyjmując, że 1 MET równał się poborowi tlenu na poziomie 3,5 ml/min/kg. Dla przykładu wysiłki związane z uprawianiem siatkówki lub jazdy konnej klasyfikowane są na poziomie

4,5 MET, pływanie 6 jednostek MET a wyczerpujące energetycznie biegi przełajowe na poziomie 8 jednostek MET.

Przy przeliczaniu wydatku energetycznego podczas testu marszowej jednostki MET, korzystano z następującego wzoru:

$$[(\text{średnia prędkość marszu w km/godz}) \times 1,667 + 3,5] / 3,5$$

Subiektywna ocena intensywności wysiłku odczuwanego przez pacjenta jest na ogół wiarygodnym wskaźnikiem względnego zmęczenia. W klinicznej ocenie natężenia wysiłku bardziej użyteczna od częstotliwości rytmu serca jest skala Borga odczuwania wysiłku. Osoba poddana wysiłkowi sama ocenia jego intensywność według 20-stopniowej skali. Skala ta skonstruowana jest w ten sposób, że u młodych osób wskaźnik po pomnożeniu przez 10 odpowiada częstości skurczów serca. Choć istnieją pewne różnice w bieżącej ocenie zmęczenia przez ludzi, to wydaje się, że ocena ta w kolejnych próbach jest stała. W ten sposób skala Borga może pomóc lekarzowi w ocenie stopnia zmęczenia w poszczególnych próbach oraz w wiązaniu stopnia zmęczenia w czasie próby ze zmęczeniem odczuwanym podczas wykonywania codziennych czynności. Tabela 4 wskazuje na zależność pomiędzy dusznością i zmęczeniem odczuwanym subiektywnie przez chorego w czasie próby wysiłkowej. U ludzi z przewlekłymi chorobami układu krążenia, oddechowego a także wątroby subiektywne uczucie zmęczenia występuje już przy nie wielkich obciążeniach fizycznych.

Tabela 4. Skala kategorii duszności stosowana do oceny nasilenia odczuwanej przez chorego duszności i zmęczenia w czasie próby wysiłkowej

Skala Borga	Duszność	Zmęczenie
0	nie występuje	nie występuje
0.3	-	-
0.5	krańcowo słaba	zauważalne
1.	bardzo słaba	
1.5		
2	słaba	lekkie
2.5		
3	umiarkowane	
4		
5	silna	znaczne
6		
7	bardzo silna	
8		
9		
10	krańcowo silna	maksymalne
11		
.....	absolutnie maksymalna	możliwie największe

Przeciwwskazania do przeprowadzenia próby wysiłkowej:

bezwzględne:

- Świeże zmiany w spoczynkowym EKG sugerujące zawał serca lub inny ostry epizod sercowy
- Świeży zawał serca
- Niestabilna dusznica bolesna
- Nieopanowane komorowe zaburzenia rytmu
- Nieopanowane przedsionkowe zaburzenia rytmu, które upośledzają czynność serca
- Blok przedsionkowo-komorowy III stopnia
- Ostra niewydolność serca
- Znaczne zwężenie zastawki aortalnej
- Podejrzenie lub potwierdzony tętniak rozwarstwiający aorty
- Aktywne zapalenie lub podejrzenie zapalenia mięśnia serca lub zapalenia osierdzia
- Zakrzepowe zapalenie żył lub skrzepliny w jamach serca
- Świeży epizod zatorowy, układowy lub płucny
- Ostra infekcja
- Nasilone zaburzenia psychiczne

względne:

- Spoczynkowe rozkurczowe krwi >120 mm Hg lub spoczynkowe skurczowe ciśnienie krwi > 200 mm Hg
- Umiarkowanie ciężka wada zastawkowa serca
- Potwierdzone zaburzenia elektrolitowe (hipokaliemia, hipomagnezemia)
- Rozrusznik serca o stałej częstotliwości pobudzeń

- Częste lub złożone dodatkowe pobudzenie komorowe
- Kardiomiopatia, w tym przerostowa
- Niestabilna choroba metaboliczna (np. cukrzyca, tyreotoksykoza lub obrzęk śluzowaty)
- Przewlekła choroba infekcyjna (np. mononukleozą, AIDS)
- Choroby nerwowo-mięśniowe, mięśniowo-szkieletowe lub reumatoidalne, które ulegają zaostrzeniu w wyniku wysiłku
- Zaawansowana lub powikłana ciąża

3.2.5. Testy pamięciowe oceniające zdolności poznawcze umysłu

Testy pamięciowe oparto na wcześniej opublikowanych badaniach (Mc Morris T., Mielcarz G., 2008). Obejmowały one grupę testów pamięciowych mających na celu określenie ilościowe zdolności poznawczych u ludzi.

3.2.5.1. Test losowego generowania liczb

(RNG – Random Number Generation):

Test oparto na programie komputerowym opracowanym przez Towes J. i Neil D, 1998.

Test polega na zdolności badanej osoby do tworzenia maksymalnego rozproszenia ciągu liczb od 1 - 9. Osoba badana zostaje poinformowana , aby unikać jakiegokolwiek formy organizacji podawanych liczb np. ciągu kolejnych liczb 1, 2, 3, itd., ciągu liczb parzystych lub nieparzystych, podawania po sobie kolejnych liczb skrajnych ciągu, itp. Liczby podawane są

co jedną sekundę (z użyciem metronomu). Efektywność tego testu jest wykazana poprzez pomiar trzech parametrów: RNG (ogólna zdolność do losowego generowania randomizacji liczb), R – (redundancy), stopień zredukowania liczb (zbyteczność) ograniczająca randomizację oraz A-(adjacency), określa stopień przyległości podawanych liczb. Zestaw liczb jest poddany obróbce komputerowej z wykorzystaniem programu RGCalc (Towse & Neil, 1998).

3.2.5.2. Test krótkotrwałej pamięci werbalnej, postępującej:

Osoba badana powtarza zasłyszany ciąg liczb, który podaje odpytujący instruktor. Instruktor ma liczby zapisane na karcie w postaci kolejnych wierszy. W pierwszym wierszu znajdują się trzy liczby, w drugim cztery liczby, w trzecim cztery itd. W każdym następnym wierszu przybywa jedna dodatkowa liczba. Instruktor odczytuje liczby z szybkością jedna liczba na sekundę. Jeśli w danym rzędzie nastąpi pomyłka należy powtórzyć ten ciąg liczb i jeśli powtórnie powtórzy się błąd, przerwać. Osoba badana otrzymuje w rzędzie np. trzecim pięć punktów.

3.2.5.3. Test krótkotrwałej pamięci werbalnej - wstecznej:

Test podobny do ostatniego z tym, że osoba badana musi podawać ciąg liczb w odwróconej kolejności w stosunku do ciągu liczb jaki podaje instruktor. Punktacja jest podobna jak w teście powyżej, np. za trzeci poprawnie podany wiersz liczb otrzymuje się pięć punktów.

3.2.5.4. Test pamięci przestrzennej wykonanych ruchów – postępującej:

Instruktor pokazuje osobie badanej ponumerowany zestaw ośmiu klocków. Numeracja klocków jest widoczna tylko dla instruktora. Instruktor dotyka wskaźnikiem poszczególnych klocków wg numeracji na liście jaką ma do dyspozycji. Osoba badana powinna wskazać poszczególne klocki, w tej samej kolejności co instruktor. Liczba wskazań wzrasta stopniowo podobnie jak w poprzednich testach. Punktacja zależy od prawidłowej ilości i kolejności wskazanych ruchów.

3.2.5.5. Test pamięci przestrzennej wykonanych ruchów – wstecznej:

Przebiega podobnie jak powyższy test pamięci wzrokowej ruchu postępującego z tym, że osoba badana powinna wskazać poszczególne klocki w odwrotnej kolejności co instruktor, zachowując odwrotny ciąg wskazań dla całkowitej liczby wykonanych przez instruktora ruchów. Liczba wskazań wzrasta stopniowo podobnie jak w powyższym teście. Punktacja zależy od maksymalnej uzyskanej prawidłowej ilości i odwrotnej kolejności wskazanych ruchów.

3.2.5.6. Test pamięci długotrwałej:

Test ten polega na zdolności do zapamiętywania wcześniej oglądanych obrazów. Osoba badana ogląda serię dziesięciu fotografii z przypisanymi do każdej fotografii nazwy zawodu (na odwrocie fotografii). Ma do dyspozycji pięć minut aby zapamiętać twarze i przypisane im zawody. Po dwudziestu minutach przerwy (w tym czasie prowadzone są inne

zajęcia, np. rozwiązywane testy), badana osoba powraca i tym razem spośród dwudziestu fotografii wybiera te, które widziała uprzednio. Musi poznać nie tylko właściwą osobę ale również podać jej prawidłowy zawód. Za zgodność otrzymuje punkt.

3.2.5.7. Test matematyczny:

Test polega na możliwie szybkim i precyzyjnym wykonywaniu działania matematycznego kolumny liczb. Badana osoba otrzymuje zestaw dziesięciu arkuszy matematycznych. Na każdym arkuszu znajduje się kolumna dziesięciu dwucyfrowych liczb, które należy zsumować w możliwie najkrótszym czasie. Punktacji podlega zarówno precyzja wykonanych działań matematycznych jak i czas konieczny do wypełnienia wszystkich dziesięciu arkuszy matematycznych.

3.3. Ocena statystyczna wyników:

Wyniki przedstawione w pracy a dotyczące badań właściwości antyoksydacyjnych organizmu oraz badań wysiłkowych, wykazywały rozkład normalny, co stwierdzono przy pomocy testu Kołmogorova – Smirnowa. Dla oceny wyników stosowano testy porównania wariancji oraz średnich t-Studenta i Cohrana-Coxa. Przyjęto istotność różnic od poziomu $p < 0.05$.

Ocenę punktacji przeprowadzonych testów pamięciowych przeprowadzono z wykorzystaniem testów *post-hoc* (po fakcie), zwanych testami wielokrotnych porównań, stosowanych po fakcie stwierdzenia za pomocą analizy wariancji braku równości między średnimi. Jeżeli analiza wariancji wykaże istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi grupami, należy przeprowadzić dalsze testy, mające odpowiedzieć na pytanie, które z porównywalnych populacji są odpowiedzialne za odrzucenie hipotezy zerowej. Chcemy wiedzieć, które ze średnich różnią się między sobą, a które są równe. Dlatego stosuje się specjalne testy *post-hoc*. W naszych badaniach wykorzystano test LSD [ang. Least Significance Difference – LSD] R.A. Fishera, nazywany inaczej testem NIR (najmniejszych istotnych różnic). Dowiadujemy się, które ze średnich różnią się między sobą istotnie statystycznie, a które są równe. Stosuje się go do średnich uporządkowanych niemalejąco.

4. WYNIKI

4.1. Profil kliniczny badanych grup pacjentów

Tabela 5 przedstawia charakterystykę kliniczną pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby, którzy uczestniczyli w projekcie badawczym. W okresie prowadzonych badań pacjenci przebywali na oddziale Kliniki Gastroenterologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

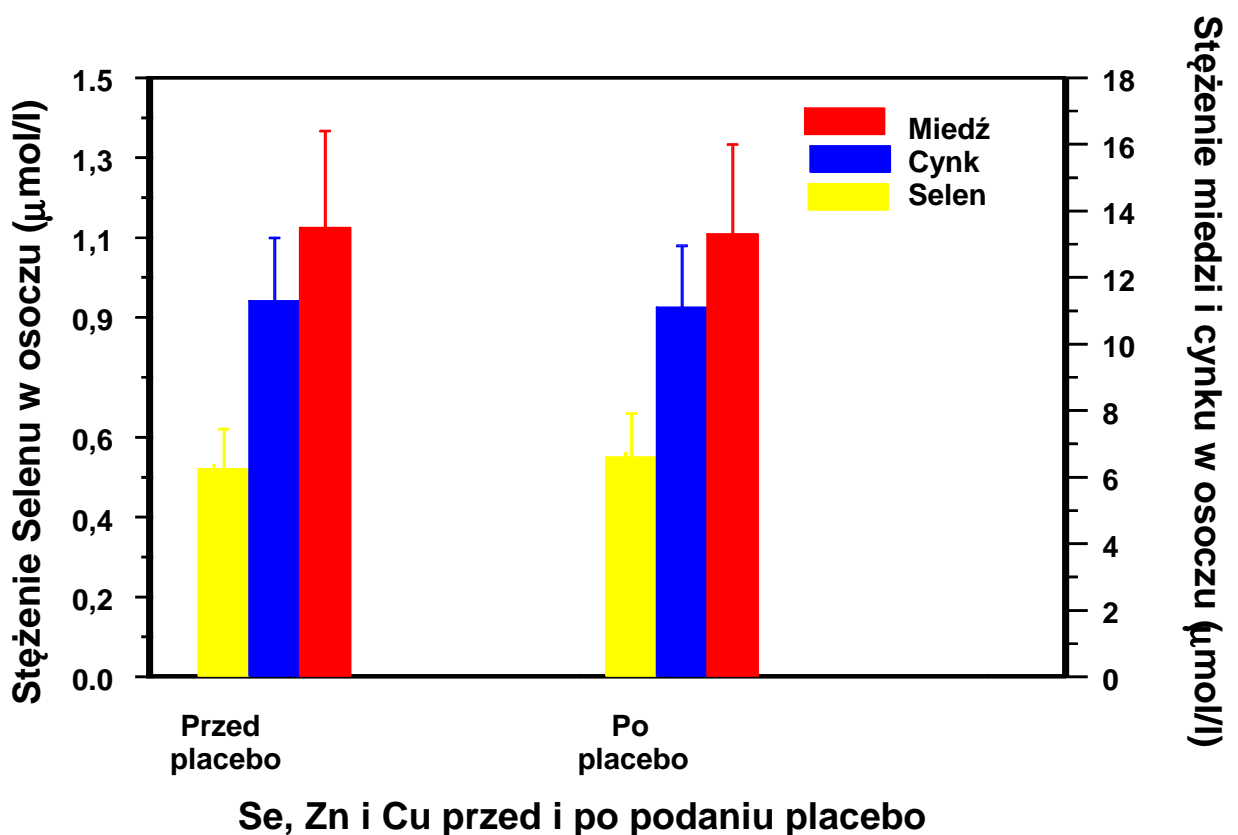
Tabela 5. *Profil kliniczny pacjentów poddanych badaniom z przewlekłymi chorobami wątroby.*

Rodzaj grupy badanej	Wiek	Płeć	Typ choroby wątroby	Średni czas trwania choroby
Grupa chorych po podaniu placebo	33 – 70	15 kobiety 12 mężczyzn	18-C.H.pA 6-AIH 3-PBC	3 lata
Grupa chorych po suplementacji kreatyną (5x4g dziennie)	33 – 70	15 kobiety 12 mężczyzn	18-C.H.pA 6-AIH 3-PBC	3 lata

4.2. Zmiany stężeń selenu, cynku i miedzi w badanych grupach

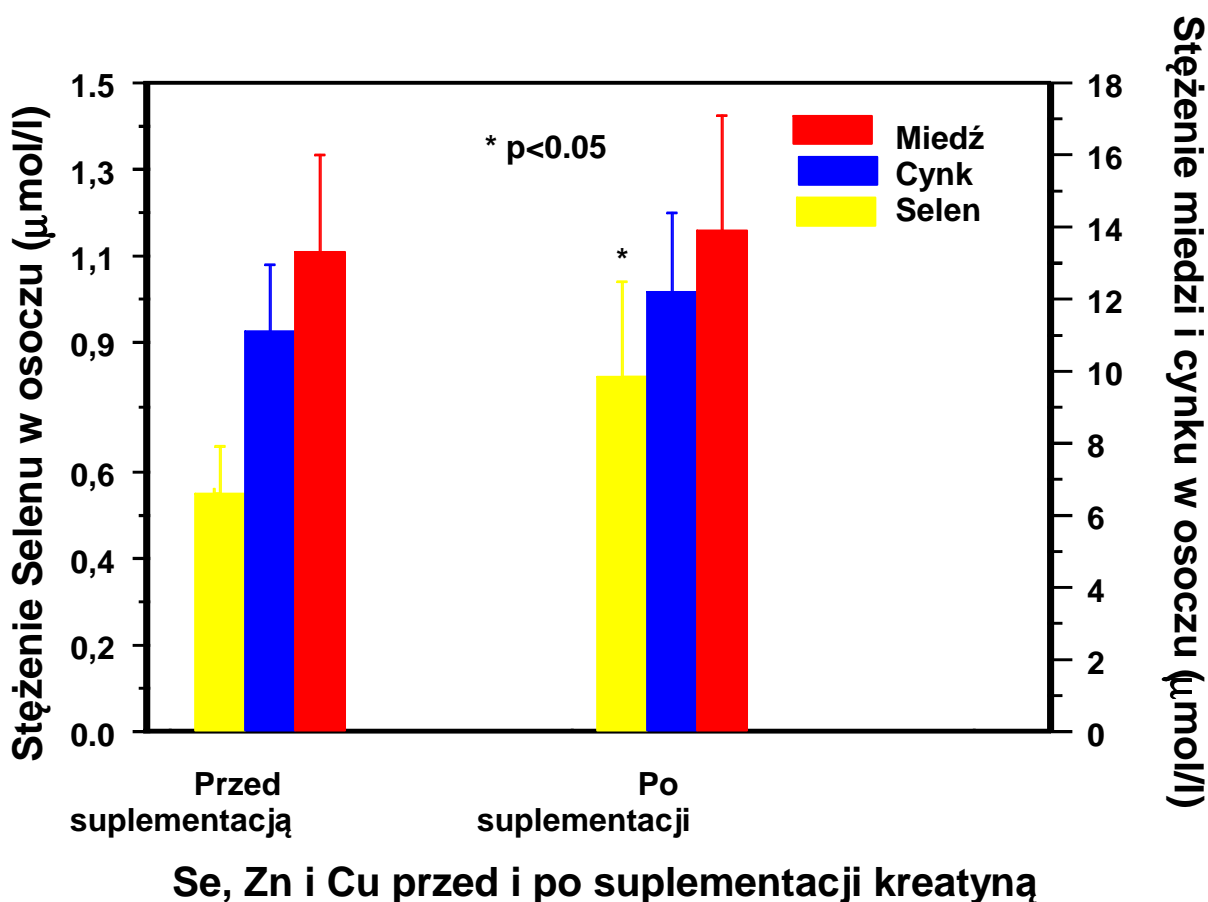
Rycina 2 przedstawia zmiany stężeń biopierwiastków w osoczu krwi u chorych przed i po podaniu placebo. Stężenia wszystkich badanych biopierwiastków w osoczu tzn. miedzi, cynku i selenu nie uległy statystycznie znaczącym zmianom w czasie podawania skrobi jako placebo przez okres jednego tygodnia.

Rycina 2. Stężenie biopierwiastków: miedzi, cynku i selenu w osoczu krwi u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podaniu placebo.



Rycina 3 przedstawia zmiany stężeń selenu, cynku i miedzi po tygodniu suplementacji kreatyną. Nie zaobserwowano zmian w stężeniach cynku i miedzi, natomiast suplementacja hydratami kreatyny w okresie tygodnia wpłynęła znamienne na podwyższone stężenie selenu w osoczu badanych osób ($p < 0.05$). Przez cały okres badań osoby suplementowane kreatyną jak i po podaniu placebo pozostawały na tej samej diecie. Wynikłą różnicę w stężeniu selenu wiązać należy z gromadzoną w tkankach mięśniowych kreatyną. Selen również związany jest białkami zawartymi w mięśniach, tzw. selenoproteinach. Wzajemne oddziaływanie kreatyny i selenu, sprzyja absorpcji selenu w jelicie cienkim i wzrostowi jego stężenia w osoczu. Stężenia miedzi i cynku w grupie chorych przed podaniem placebo utrzymywały się odpowiednio na poziomie 12 – 17 $\mu\text{mol/L}$ i 10.5 – 14 $\mu\text{mol/L}$ i nie odbiegały swoją średnim stężeniem od przeciętnego stężenia dla ludzi zdrowych, [Jakubowski, 1996].

Rycina 3. Stężenie biopierwiastków: miedzi, cynku i selenu w osoczu krwi u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną.

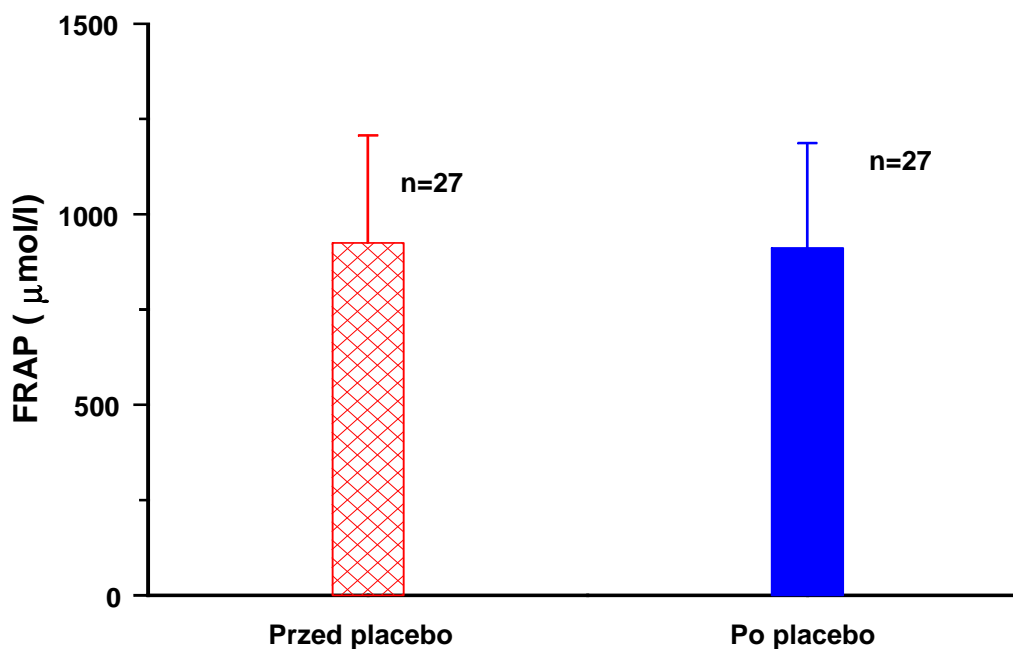


Stężenie selenu w osoczu krwi u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby charakteryzowało się niską zawartością selenu w porównaniu do wartości referencyjnych [Jakubowski, 1996]. U ludzi zdrowych zakres stężeń selenu w surowicy krwi wynosi 0.8 – 2 μmol/L. Jak przedstawia rycina 3 suplementacja kreatyną spowodowała podwyższenie stężenia selenu do zakresu dolnych wartości referencyjnych dla ludzi zdrowych (0.8 – 1.3 μmol/L).

4.3. Zmiany całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w badanych grupach

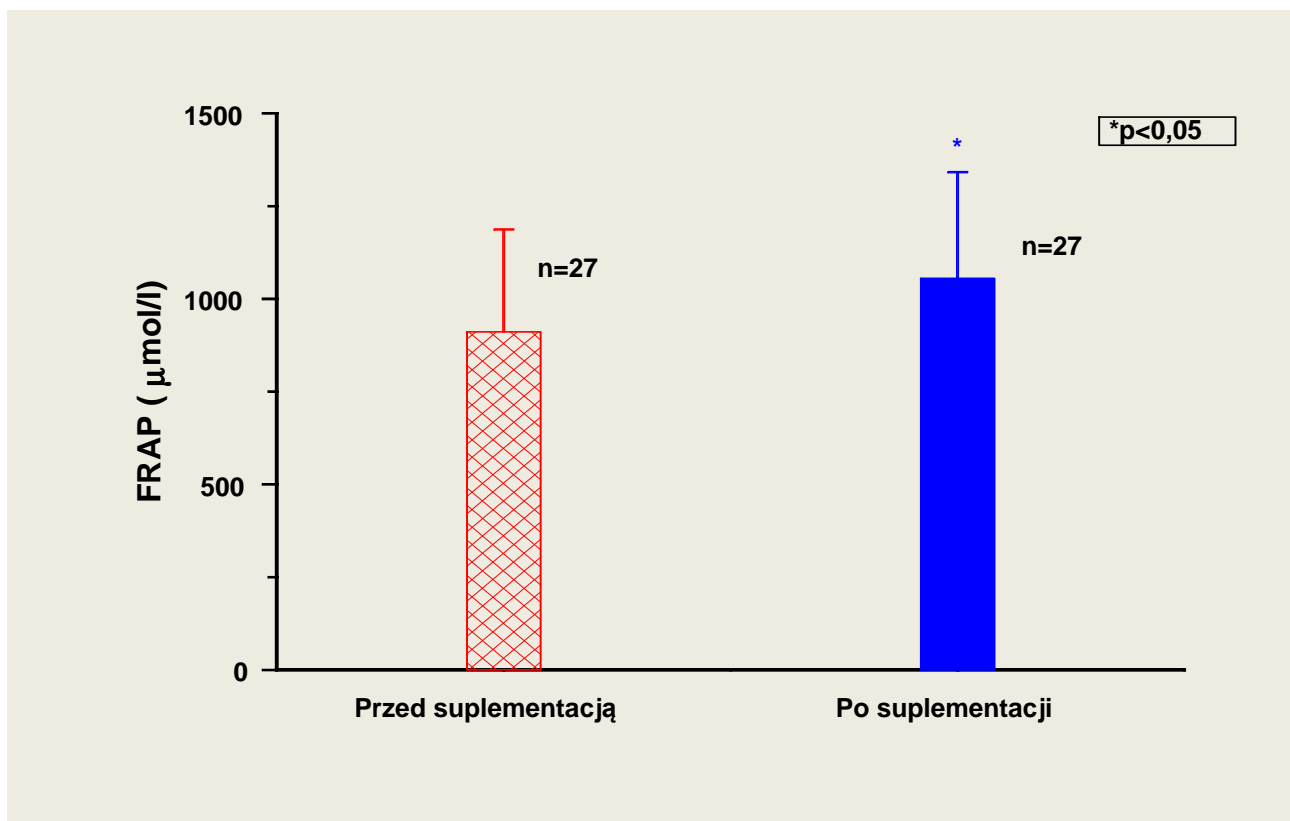
Rycina 4. przedstawia zmiany w całkowitym potencjale antyoksydacyjnym osocza u badanych pacjentów po doustnym podaniu placebo, który stanowiła skrobia. Skrobię podawano pacjentom podobnie jak kreatynę w czterech równych porcjach po 5 gram, w następujących odstępach czasowych: rano, w południe, popołudniu oraz wieczorem. Nie zaobserwowano znamiennej statystycznie zmian w całkowitym potencjale antyoksydacyjnym osocza w okresie tygodnia podawania placebo. Potencjał ten u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby kształtował się w zakresie 750 do 1200 $\mu\text{molFe/L}$. Zakres ten jest niższy niż w populacji ludzi zdrowych [Benzie, 1996].

Rycina 4. Porównanie zmian całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podaniu placebo (przed i po tygodniowym doustnym pobieraniu 20 g skrobi dziennie).



Fosforan kreatyny zaliczany jest do antyoksydantów [G. Bartosz, 2007]. Jego właściwości antyoksydacyjne potwierdziły wyniki badań przedstawione na rycinie 5. Po tygodniu suplementacji hydratami kreatyny, całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby wzrósł zmiennie $p < 0.05$. Średnia wartość potencjału antyoksydacyjnego po tygodniu suplementacji kreatyną wzrosła do 1100 $\mu\text{molFe/L}$. Jest to wartość wyższa aniżeli w populacji ludzi zdrowych wg. badań Benzie, 1996. Z przedstawionych wyników na rycinach 3 i 5 wynika współzależność pomiędzy wzrostem stężenia selenu i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u suplementowanych kreatyną pacjentów. Wzrost stężenia selenu w osoczu związany jest z bardzo dobrze znaną aktywnością enzymu peroksydazy glutationowej. Enzym ten należy do pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej organizmu „zmiatając” wolne rodniki leżące u podstaw etiopatologii wielu chorób, w tym przewlekłych chorób wątroby [G. Bartosz, 2007]

Rycina 5. Porównanie zmian całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną (przed i po tygodniowym doustnym pobieraniu 20 g kreatyny dziennie).



4.4. Wyniki badań wysiłkowych w badanych grupach (test marszowy)

Tabele 6 i 7 przedstawiają wyniki testu marszowego po tygodniowym podawaniu placebo oraz po tygodniowym okresie suplementacji monohydratem kreatyny. W okresie otrzymywania placebo nie stwierdzono znamienne statystycznych różnic w poprawie sprawności fizycznej chorych. Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny wpływ tygodniowej suplementacji monohydratem kreatyny na sprawność fizyczną u ludzi z przewlekłymi schorzeniami wątroby. Sześciominutowa próba marszowa wykazała możliwość wydłużenia przebytego dystansu marszu o 15%. Różnica ta w stosunku do okresu przed suplementacją hydratem kreatyny była znamienne istotna ($p<0.001$). W grupie placebo stwierdzono brak

znamiennej różnicy w długości przebytego dystansu drogi w czasie trwania sześciominutowego testu marszowego.

Tabela 6. Wyniki próby marszowej u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby po podaniu placebo

Rodzaj pomiaru	Próba marszowa – przed placebo		Próba marszowa – po placebo	
	przed pomiarem	po pomiarze	przed pomiarem	po pomiarze
Całkowity dystans [m]	-	281 ± 95	-	278 ± 90
Zmęczenie w skali Borga (1-10 pkt)	0	0.8 ± 0.1	0	0.8 ± 0.1
Częstość akcji serca (uderzeń na minutę)	78 ± 8	85 ± 9	75 ± 9	81 ± 9
Ciśnienie krwi – skurczowe	153 ± 7	150 ± 8	149 ± 6	154 ± 8
rozkurczowe (mm Hg)	76 ± 8	77 ± 9	76 ± 9	77 ± 9
Szybkość chodu (km/godz.)	-	2.9 ± 0.9	-	2.8 ± 0.9
Wydatek energetyczny (MET)	-	2.2 ± 0.4	-	2.3 ± 0.4

Zmęczenie występujące w czasie wykonywania testu oszacowano na podstawie dziesięciopunktowej skali Borga (tabela 4) jako zmęczenie zauważalne. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy grupą placebo a grupą suplementowaną hydratami kreatyny. Zwiększoną wydolność organizmu po suplementacji kreatyną charakteryzuje znamienne istotna ($p < 0.005$) różnica w szybkości chodu. Zwiększa się ona o 14% w stosunku do grupy placebo. Dokonywane w czasie sześciominutowego testu marszowego takie parametry fizjologiczne jak wysycenie krwi tlenem, ciśnienie krwi i częstość akcji serca nie różniły się statystycznie w obu badanych grupach. Oznacza to, że pacjenci z przewlekłymi schorzeniami wątroby nie wydatkowali jakiejś dodatkowej energii organizmu w czasie trwania testu marszowego, a uzyskana poprawa wydolności fizycznej odbyła się dzięki zwiększonej resyntezie ATP spowodowanej suplementacją hydratami kreatyny. Wydatek energetyczny mierzony w jednostkach MET (jednostka podstawowego spoczynkowego zużycia tlenu odpowiadająca ok. 3.5 ml/min/kg) podczas testu marszowego pozostawał na niezmiennym poziomie w obu badanych grupach (placebo i po suplementacji hydratami kreatyny).

Tabela 7. Wyniki próby marszowej u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną.

Rodzaj pomiaru	Próba marszowa - przed suplementacją kreatyną		Próba marszowa - po suplementacji kreatyną	
	przed pomiarem	po pomiarze	przed pomiarem	po pomiarze
Całkowity dystans [m]	-	278 ± 90	-	320 ± 101**
Zmęczenie w skali Borga (1-10 pkt)	0	0.8 ± 0.1	0	0.8 ± 0.1
Częstość akcji serca (uderzeń na minutę)	78 ± 8	81 ± 9	75 ± 9	86 ± 7
Ciśnienie krwi – skurczowe	153 ± 7	154 ± 8	149 ± 6	153 ± 9
rozkurczowe (mm Hg)	76 ± 8	77 ± 9	76 ± 9	77 ± 8
Szybkość chodu (km/godz)	-	2.8 ± 0.9	-	3.2 ± 1.0*
Wydatek energetyczny (MET)	-	2.3 ± 0.4	-	2.4 ± 0.6

4.5. Wyniki testów pamięciowych oceniających zdolności poznawcze umysłu

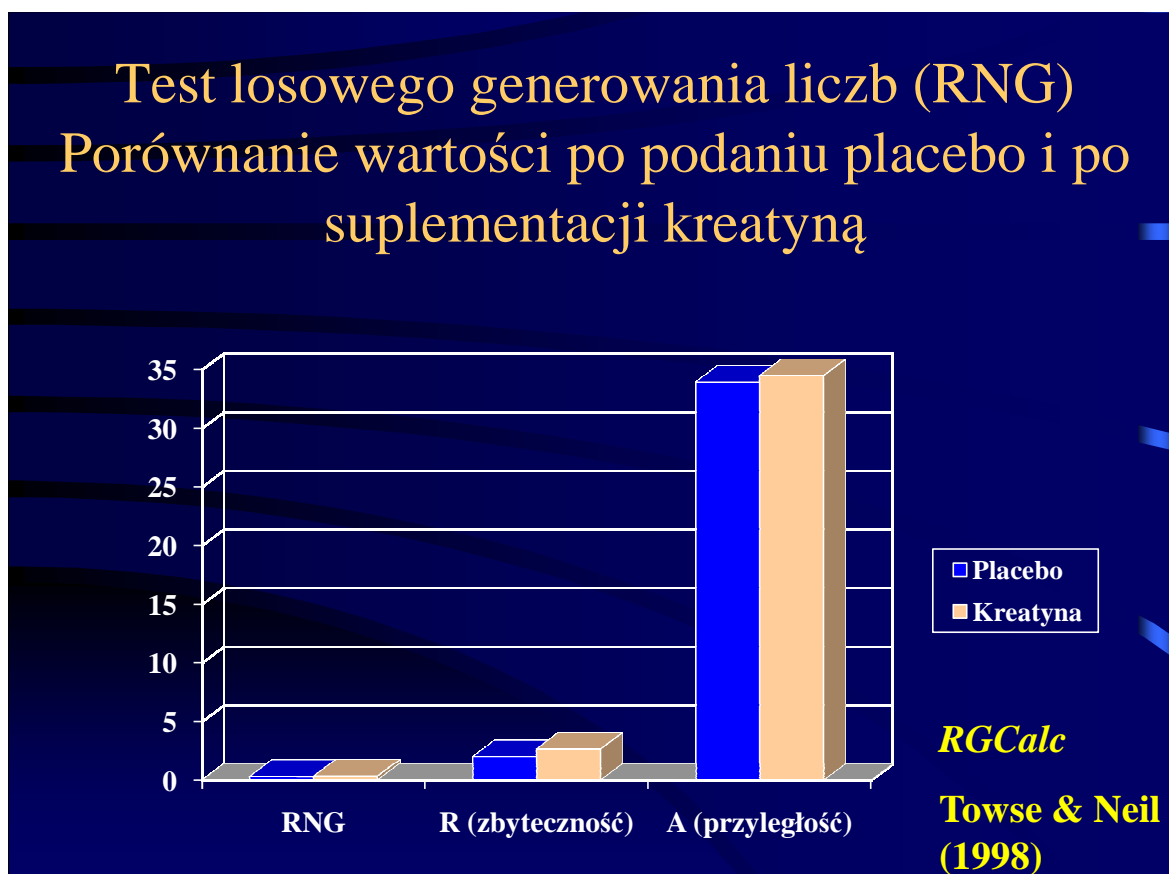
Ryciny 6 do 9 przedstawiają wyniki testów pamięciowych oceniające zdolności poznawcze pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. Test losowego generowania liczb (RNG – Random Number Generation), nie wykazał znamienych statystycznie różnic zarówno w grupie po podaniu placebo jak i w grupie suplementowanej hydratami kreatyny. Tabela 8 przedstawia wyniki po przeprowadzeniu testu RNG .

Tabela 8. Wyniki testu losowego generowania liczb dla grupy po podaniu placebo i grupy po podaniu kreatyny, Wartości punktacji: średnia \pm odchylenie standardowe.

	Grupa po podaniu placebo	Grupa po podaniu kreatyny
RNG	0.30 \pm 0.11	0.33 \pm 0.07
R	1.98 \pm 1.31	2.64 \pm 2.01
A	33.91 \pm 18.13	34.46 \pm 11.51

Test RNG przeprowadzono korzystając za zgodą autorów z programu komputerowego dla obliczeń RNG opracowanego przez Towse J.N, Neil D. w 1998 roku. Wykazano tu brak istotności różnic przeprowadzonego testu ((RNG, p=0.08; R - zbyteczność, p = 1.09; A - przyległość, p=0.35).

Rycina 6. Porównanie wyników testu RNG u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podaniu placebo i po suplementacji kreatyną.



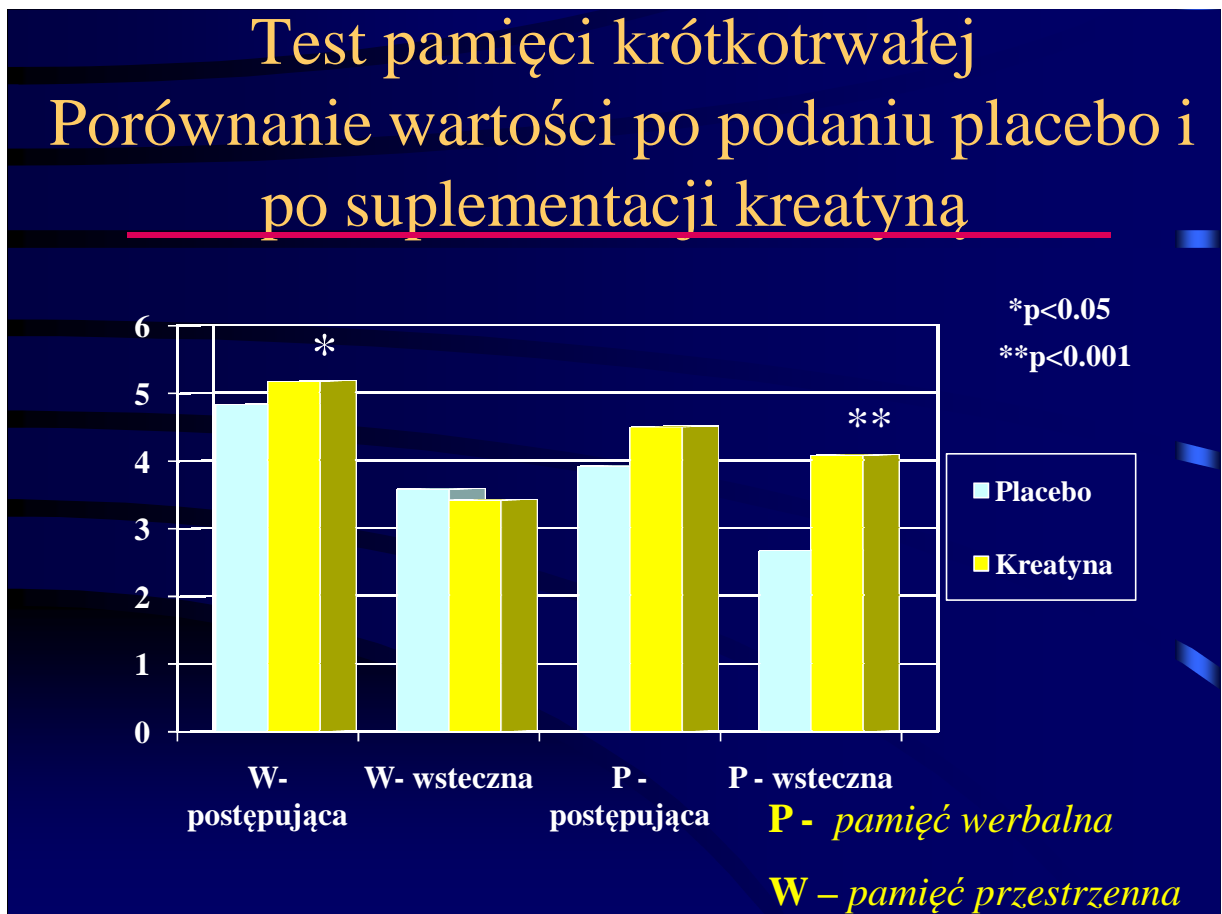
Poprawę właściwości poznawczych organizmu badanych pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby uzyskano w zakresie testów oceniających ich pamięć krótkotrwałą werbalną oraz krótkotrwałą przestrzenną. Tabela 9 i rycina 7 przedstawiają punktację otrzymaną w wyniku przeprowadzonych testów werbalnych i przestrzennych.

Tabela 9. Wyniki punktacji testu FVR i BVR (werbalnego postępującego i werbalnego wstecznego) oraz FSR i BSR (przestrzennego postępującego i przestrzennego wstecznego) dla grupy po podaniu placebo i po suplementacji kreatyną. Wartości punktacji: średnia \pm odchylenie standardowe.

	Grupa placebo	Grupa kreatyny
FVR	4.83 \pm 0.58	5.17 \pm 0.72*
BVR	3.58 \pm 2.35	3.42 \pm 1.24
FSR	3.92 \pm 1.51	4.50 \pm 1.00
BSR	2.67 \pm 2.06	4.08 \pm 0.79**

Otrzymane wyniki wskazują na znamienne poprawę pamięci werbalnej postępującej (FVR), ($F_{2,22} = 3.67$ i $p=0.04$) po suplementacji kreatyną. Przeprowadzony test post hoc LSD wykazał w warunkach prowadzonego eksperymentu brak wpływu suplementowanej kreatyny na poprawę pamięci werbalnej wstecznej (BVR), ($F_{2,22} = 0.36$ i $p = 0.70$). Także brak było poprawy pamięci u pacjentów w zakresie prowadzonych badań pamięci przestrzennej postępującej (FSR), ($F_{2,22} = 1.53$ i $p = 0.24$). Jednakże nastąpiła wysoce znamienne poprawa pamięci przestrzennej wstecznej (BSR), ($F_{2,22}=13,72$, $p<0.001$) w grupie chorych po suplementacji kreatyną.

Rycina 7. Porównawcze zestawienie wyników testu oceniającego krótkotrwałą pamięć werbalną (postępującą i wsteczną) oraz pamięć przestrzenną (postępującą i wsteczną) u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podaniu placebo i suplementowanej kreatyny.

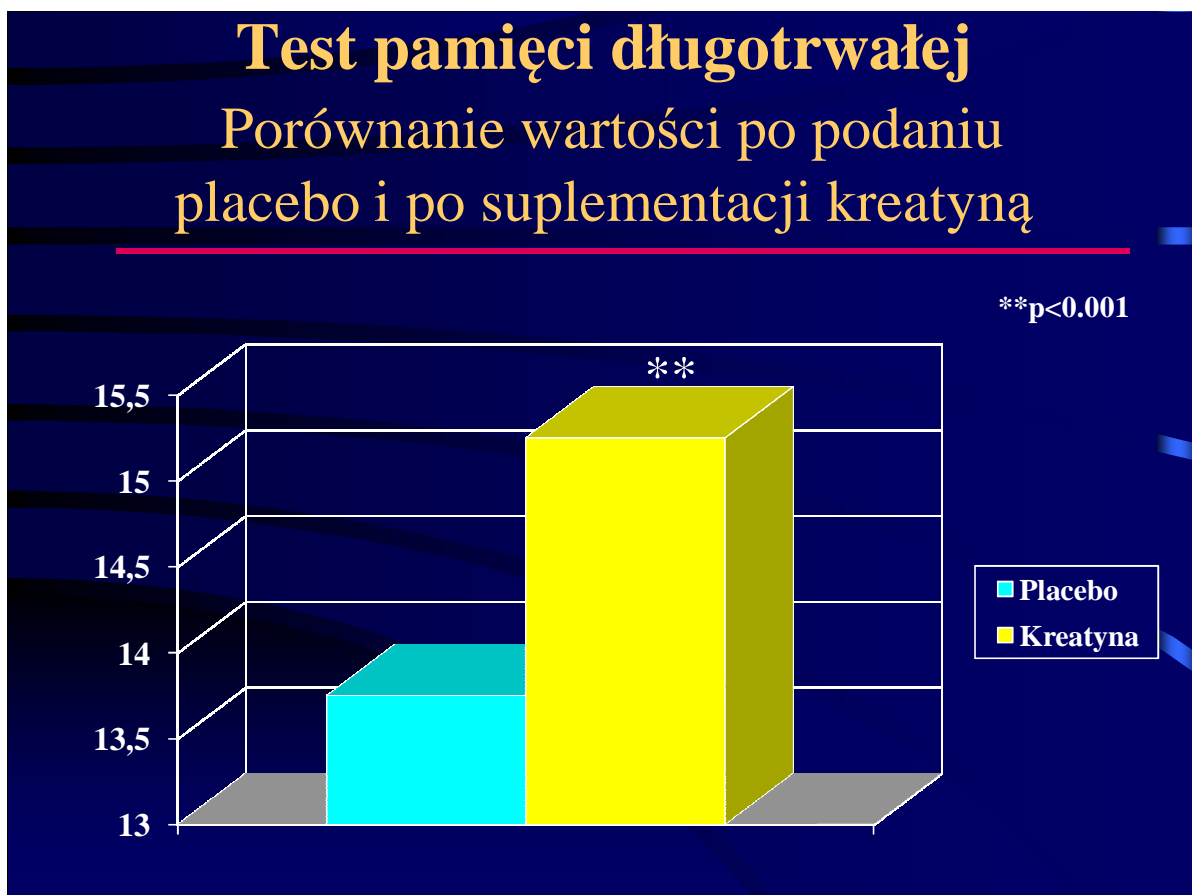


Wyniki testu, w którym badano pamięć długotrwałą przedstawione są w tabeli 10 oraz na rycinie 8. Post hoc test wykazał znamienne wysoki wpływ kreatyny u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby na poziom zapamiętywania długotrwałego ($F_{2,22} = 6.254$, $p = 0.007$). W przypadku tego testu skuteczność oddziaływania kreatyny na pamięć była wyższa aniżeli w pozostałych testach w warunkach prowadzonego eksperymentu.

Tabela 10. Wyniki punktacji testu pamięci długotrwałej dla grupy po podaniu placebo i po suplementacji kreatyną u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby (średnia \pm SD). * $p < 0.005$

Grupa placebo	Grupa kreatyny
13.75 \pm 5.17	15.25 \pm 5.15*

Rycina 8. Porównanie wyników testu oceniającego pamięć długotrwałą u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podaniu doustnym placebo i tygodniowej suplementacji kreatyną.

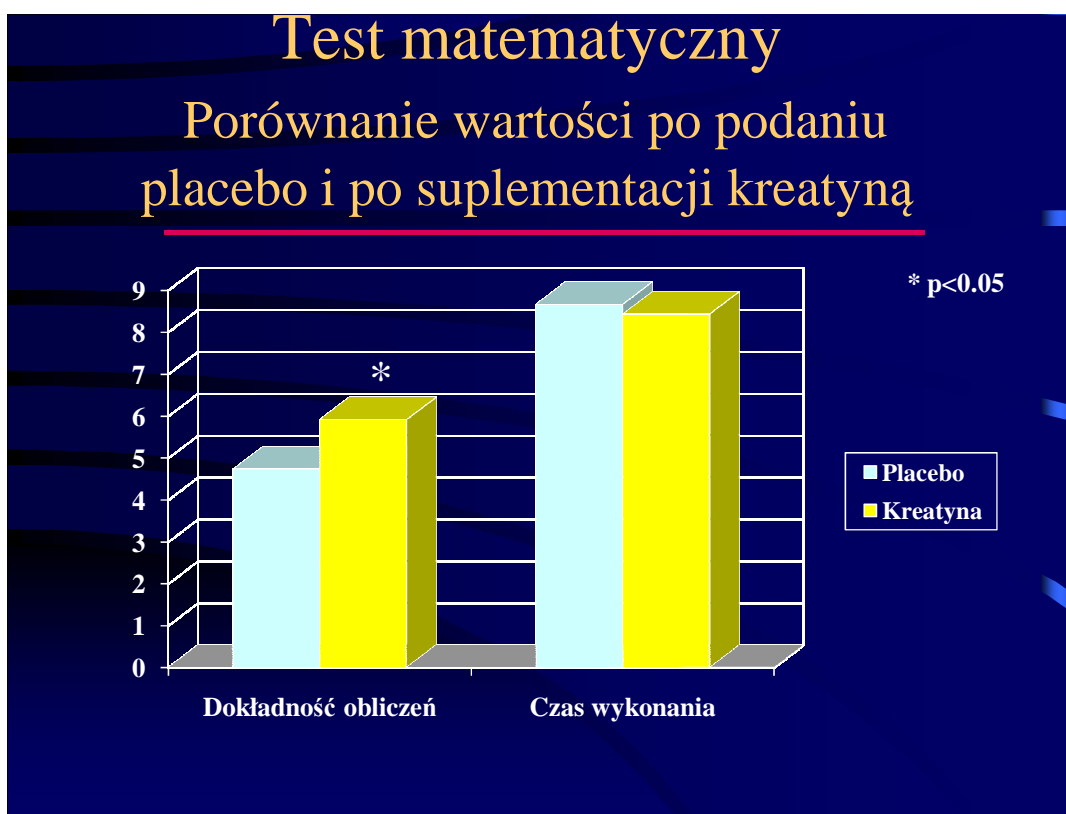


Ostatnim z przeprowadzonych testów badających zdolności poznawcze organizmu był test arytmetyczny. Wyniki tego testu nie wykazały znamienego wpływu na czas sumowania ciągu liczb poddanych obliczeniom przez badane osoby, jednakże zanotowano istotnie dodatni wpływ na precyzję dokonywanych obliczeń. Post hoc test wykazał brak istotności w odniesieniu do czasu ($F_{2,222} = 2.13$, $p = 0.15$), oraz istotną znamienność ($F_{2,222} = 3.69$, $p = 0.04$) w przypadku porównania dokładności dokonywanych obliczeń. Wyniki przeprowadzonych badań podane są w tabeli 11 oraz na rycinie 9.

Tabela 11. Wyniki punktacji testu pamięci oceniającego precyzję oraz czas dokonywanych obliczeń matematycznych, dla grupy po podaniu placebo i pacjentów suplementowanych kreatyną (średnia \pm SD). * $p < 0.05$

	Grupa placebo	Grupa kreatyny
Precyzja	4.73 \pm 2.76	5.91 \pm 3.27*
Czas obliczeń (minuty)	8.66 \pm 4.60	8.43 \pm 2.89

Rycina 9. Porównanie wyników testu matematycznego oceniającego zdolność do wykonywania prostych obliczeń matematycznych u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podawaniu doustnym placebo i tygodniowej suplementacji kreatyną



5. Dyskusja Wyników

W syntezie kreatyny w organizmie uczestniczą bezpośrednio trzy aminokwasy: glicyna, arginina oraz metionina. Pierwszą reakcją jest transamidynacja z utworzeniem guanidynoocjanu (glikocyjaminy), która zachodzi na w nerkach. W wątrobie natomiast zachodzi końcowy etap syntezy kreatyny polegający na metylacji glikocyjaminy przy udziale aktywnej metioniny (Murray R.K, 1994). Fosforan kreatyny należy do grupy związków zwanych fosfagenami, stanowiących zapasową formę fosforanów bogatoenergetycznych działający w mięśniach jako bufor, w warunkach obniżonego ATP.

Zsyntetyzowana kreatyna jest transportowana drogą krwi do mięśni i mózgu, gdzie jest fosforylowana do fosfokreatyny. Podwyższone stężenia kreatyny w surowicy spotykamy w stanach wyniszczenia, martwicy lub zaniku mięśni i ten wzrost nie jest związany z zaburzeniem czynności nerek (Dembińska-Kieć A., 2002).

Założeniem niniejszej pracy była hipoteza zakładająca, że u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby może dochodzić do obniżonej syntezy kreatyny w wątrobie. Zastosowanie suplementacji kreatyną może zwiększyć dostępność ATP w mięśniach i mózgu wpływając bezpośrednio na zwiększenie zdolności organizmu do wysiłku psycho-fizycznego.

Jeżeli chodzi o aspekty prawne i etyczne to suplementacja kreatyną jest legalna w myśl przepisów antydopingowych dla sportowców, ale stosowana w nadmiernych dawkach w celu sztucznego i nieuczciwego podniesienia sprawności fizycznej może być uważana za nieetyczną. Wiele sportowych drużyn w Stanach Zjednoczonych stosuje suplementację kreatyną (Williams, 1999).

Niezwykle istotną kwestią w niniejszym projekcie badawczym była dawka kreatyny. W większości badań dotyczących ergogenicznych skutków suplementacji kreatyną zalecano

dawki 20-30 g dziennie, spożywane w 4 – 5 równych porcjach przez 5-7 dni (M.H. Williams, R.B. Kreider, J.D. Branch, 1999). Najczęściej stosowaną formą suplementu był monohydrat kreatyny podawany doustnie jako proszek rozpuszczony w napojach.

W niniejszym projekcie zastosowałam dawkę 20 g dziennie kierując się badaniami szczegółowymi R.C. Harrisa (1992) i Hultmana (1996). Udowodnili oni, prowadząc oznaczenia zawartości kreatyny w mięśniach, że całkowite wysycenie organizmu kreatyną może zachodzić przy maksymalnej dawce 4 x5 g dziennie przez okres tygodnia, przy średniej dawce 4 x 3 g/dzień przez 10 dni i przy obniżonej dawce 1-2 x 3/dzień przez okres 20 dni. Przedłużanie suplementacji poza przewidziany okres nie powodowało zwiększenia jej wysycenia organizmu jak również nie zwiększało efektów fizjologicznych. Ze względu na określony okres pobytu pacjentów w szpitalu zdecydowałam się na stosowanie dawki podwyższonej w możliwie najkrótszym okresie tzn. przez jeden tydzień.

U pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby istnieje możliwość niedostatecznej jej syntezy w organizmie (Ipsiroglu 2001, Mayhew 2002). Suplementacja kreatyną może podnieść u tych chorych ogólnoustrojową pulę kreatyny ułatwiając powstawanie CP (fosfokreatyna). Zasoby mięśniowe CP mogą ulegać rozkładowi i uwalniać energię dla szybkiej resyntezy ATP (adenozyno trójfosforan). ATP i CP mogą dostarczać energii organizmowi dla wysiłków krótkotrwałych, trwających w przybliżeniu 5 -10 s maksymalnego wysiłku (VO_2max). Wynika to z mechanizmu beztlenowej restytucji ATP wspomaganą przez CP, będącego donorem grupy fosforanowej dla ADP.

Poprawa wydolności fizycznej pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby jest sprawą niezwykle ważną. W tej grupie chorych dochodzi często do osłabienia mięśni i ogólnej wydolności fizycznej. W surowicy krwi występuje podwyższone stężenie kreatyny,

uwalnianej z uszkodzonych komórek mięśniowych (X.M.Li, 2006) i podwyższonej aktywności fosfokinazy kreatynowej (C. Hartman 2006; J. Narbutt 2005).

Istnieje bogata literatura dotycząca suplementacji kreatyną w celu poprawy wydolności organizmu do zwiększonych wysiłków krótkotrwałych u ludzi zdrowych, szczególnie sportowców (Bemben 2005, Kreider 2003, Mendes 2002, Bennett 2001). Brak jest natomiast prac dotyczących wpływu suplementacji kreatyną u ludzi z przewlekłymi chorobami wątroby. Istotne jest, że nie stwierdzono niekorzystnego wpływu suplementacji kreatyną w dawce 20 g/dzień na funkcje wątroby, nerek lub komórek mięśniowych (Robinson 2000).

Wpływ kreatyny na poprawę wydolności fizycznej u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby badałam poprzez zastosowanie sześciominutowego testu marszowego. Chorzy pokonywali określony dystans na korytarzu w dowolnym dla siebie tempie. Nie zanotowano różnic w ciśnieniu krwi, częstości akcji serca oraz w uczuciu zmęczenia, mierzonego w skali Borga, pomiędzy grupą placebo a grupą suplementowaną kreatyną. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost szybkości chodu ($p < 0.005$) a także długość przebytego dystansu ($p < 0.001$), która wzrosła o ok.15%.

Kreatyna jak i produkt jej metabolizmu kreatynina, należą do niskocząsteczkowych antyoksydantów hydrofilowych, które chronią środowisko wodne komórek (Bartosz 2003). Suplementacja kreatyną może wpływać na zwiększenie puli antyoksydantów obecnych w organizmie. Badania profesora Piero Sestili z University of Urbino we Włoszech dowodzą, że kreatyna poprzez neutralizację nadtlenków i tlenków azotu, w hodowlach tkankowych ochrania mitochondrialne DNA, chociaż nie uczestniczy w naprawie już uszkodzonego DNA. Efekt antyoksydacyjny zależy od zwiększonej obecności wolnej kreatyny wewnątrz komórki, co ma miejsce w przypadku jej suplementacji. Obecność kreatyny w organizmie korzystnie wpływa także na ciśnienie osmotyczne i transport energetyczny (Sestili 2010, Sestili 2006).

Lawler (2002) w swych badaniach wykazał bezpośredni wpływ kreatyny na redukcję RFT, wynika z tego, że jej suplementacja może podwyższać całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu. Korzystny wpływ suplementacji kreatyny na organizm zauważa Venderley (2006) obserwując dietę sportowców będących na diecie wegetariańskiej. Występuje tu wysoki efekt antyoksydacyjny spowodowany wysoką zawartością witamin w tej diecie przy korzystnym ergogenicznym i antyoksydacyjnym wpływie kreatyny. Całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu zabezpiecza organizm, zgodnie z teorią wolnych rodników, przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu (RFT). Istnieje wiele prac wiążących patogenezę chorób wątroby z obniżonym potencjałem antyoksydacyjnym (Salem 2003, Park 2005, Ismail 2010). Niektórzy autorzy uważają, że na etiopatologię przewlekłych chorób wątroby ma wpływ deficyt niektórych molekularnych składników pożywienia np. Peres (2011) i Feranchak(2005), wiążą rozwój wirusowego zapalenia wątroby z deficytem witaminy A u dzieci. Taylor (2005) wiąże nieprawidłowy stan odżywienia u dzieci i przypadki anoreksji z rozwojem przewlekłych chorób wątroby. U osób nadużywających alkoholu wpływ obniżonego potencjału antyoksydacyjnego w organizmie może sprzyjać rozwojowi przewlekłych chorób wątroby w większym stopniu niż sam alkohol (Panagaria 2007).

W moich badaniach całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS – *Total Antioxidant Status*), wyznaczyłam metodą FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), poprzez pomiar stężenia jonów żelaza dwuwartościowego w osoczu, którego ilość jest współzależna od obecności wszystkich antyoksydantów w osoczu (w tym również witamin antyoksydacyjnych i kreatyny). Otrzymane wyniki badań FRAP po tygodniu suplementowania hydratami kreatyny wykazały znamienne podwyższenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza

u badanych pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby ($p < 0.05$). Należy zaznaczyć,

że uzyskana średnia wielkość FRAP była większa u tych chorych aniżeli u zdrowych ludzi z chińskiej populacji w badaniach prowadzonych przez autora metody FRAP (Benzie 1996).

W swojej rozprawie doktorskiej postanowiłam zbadać związek pomiędzy całkowitym potencjałem antyoksydacyjnym a biopierwiastkami będącymi kofaktorami enzymów antyoksydacyjnych pierwszej linii obrony organizmu przeciwko atakowi wolnych rodników, w szczególności RFT.

Do najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych pierwszej linii należą: superdysmutaza – Zn,Cu oraz peroksydaza glutationowa. W enzymach tych kofaktorami są biopierwiastki: cynk, miedź i selen. Poza tym wiele oksydaz zawiera również miedź. Postanowiłam zbadać stężenie tych biopierwiastków w surowicy badanych pacjentów. Metabolizm miedzi, cynku i selenu zachodzi głównie w wątrobie. Zaistniało podejrzenie, że w przewlekłych chorobach wątroby może dojść do zaburzeń tego metabolizmu, co skutkować będzie obniżoną aktywnością tych enzymów antyoksydacyjnych (Mielcarz 2000). Wyniki badań potwierdziły korzystny wpływ suplementacji kreatyną na wzrost stężenia selenu w osoczu krwi ($p < 0.05$). Nie zaobserwowaliśmy natomiast zmian w stężeniu miedzi i cynku w wyniku suplementacji. Należy zaznaczyć, że w okresie pobytu w szpitalu i prowadzonych tam badań, pacjenci pozostawali na takiej samej diecie, bez możliwości dodatkowej suplementacji tymi biopierwiastkami. Zmianę poziomu mikroelementów antyoksydacyjnych podczas różnego rodzaju testów wysiłkowych obserwowano wcześniej. Kaczmarek (1999) stosował suplementację preparatem „Protection Zellaktiv” by zapobiec obniżeniu cynku i selenu w organizmie podczas stosowania obciążeń fizycznych. Margaritis (1997) badał wpływ suplementacji samym selenem na mitochondrialną oksydazę cytochromową pod wpływem długotrwałych obciążeń fizycznych u młodych zdrowych ludzi. Nie zauważono istotnego wpływu na aktywność tego enzymu, spostrzegając jednak adaptację organizmu do wysiłku

poprzez wytworzenie nowych włókien mięśniowych typu I według MHC. Brak jest doniesień literaturowych odnoszących się do ludzi nie uprawiających systematycznych obciążeń treningowych a przy tym z przewlekłymi chorobami wątroby. Istnieją prace wiążące etiopatogenezę marskości wątroby z obniżeniem cynku i miedzi (Gonzales-Reimers 2002) i enzymami antyoksydacyjnymi (Abul 2002). Prace dotyczące systemu antyoksydacyjnego organizmu podczas wirusowego zapalenia wątroby połączonego z nadmierną konsumpcją alkoholu nie są jednoznaczne. Gonzales-Reimers (2009) stwierdza podwyższony poziom MDA(malonodialdehyd) świadczący o ataku wolnych rodników na organizm, ale nie stwierdza zmian w stężeniach Se, Zn i Cu w osoczu podobnie jak Bogden (1984).

Aaseth (1986) i Zima (2001) zauważają obniżenie Se i Zn wraz z obniżoną aktywnością peroksydazy glutationowej w alkoholowej marskości wątroby oraz u osób nadużywających alkoholu. Należy przypuszczać, że potrzebne są dalsze badania uwzględniające bardziej szczegółowy status żywieniowy pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby poddanych badaniom. Pacjenci z deficytem tych biopierwiastków i kreatyny, bardziej będą podatni na suplementację kreatyną lub mikroelementami, gdyż organizm chce jak najszybciej wrócić do warunków pełnej homeostazy.

W ostatnich latach zauważono wpływ kreatyny na pracę mózgu u ludzi. W roku 2003 Rae , po raz pierwszy opublikowała pracę przedstawiającą korzystny wpływ suplementacji kreatyną na poprawę właściwości poznawczych mózgu u 45 młodych wegetarian. Wyniki tych badań, kontrolowanych przez grupę placebo były bardzo zachęcające i w testach inteligencji i pamięciowych wykazały znamienne podwyższoną sprawność mózgu wynikającą ze zwiększonej w nim puli energetycznej ATP, będącej skutkiem suplementacji kreatyną. W innym projekcie z innym zespołem badawczym ta sama

autorka (Rae, Scott 2003) w badaniach rezonansowych mózgu i testach oceniających zdolności poznawcze i inteligencję u dzieci (6-13 lat) i dorosłych (22-26 lat) udowodniła, że istnieje korelacja pomiędzy zawartością ADP w mózgu a testami na inteligencję IQ i testami na zdolności poznawcze u dzieci i osób dorosłych. W następnym roku w USA przeprowadzono eksperyment na modelu zwierzęcym i stwierdzono ochronne działanie suplementu kreatyny na możliwość wystąpienia niedokrwienia mózgu w wyniku np. udaru. Zaleca się profilaktyczne podawanie kreatyny u pacjentów z ryzykiem wystąpienia udaru mózgu (Zhu 2004). Podobne wnioski dotyczące ochronnego oddziaływania suplementacji kreatyną na system nerwowy wyciągają Pena-Altamira (2005), Bender (2006) i Leuzzi (2000). W 2005 roku Berneburg opublikował pracę dowodzącą, że suplementacja kreatyną może hamować mutagenezę mitochondrialnego DNA, odpowiedzialnego za neurodegenerację, normalny i przedwczesny (promieniowanie UV) proces starzenia się skóry. W roku 2007 zespół autorów (McMorris, Mielcarz) w ramach wspólnych badań, w których również uczestniczyłam, badał wpływ suplementacji kreatyną na właściwości poznawcze i pamięciowe u ludzi w podeszłym wieku (70 – 88 lat).

W moim projekcie badawczym, suplementowano kreatyną grupę ludzi z przewlekłymi chorobami wątroby przez okres jednego tygodnia. Grupa badana przed i po suplementacji kreatyną została poddana testom poznawczym i pamięciowym. Wyniki potwierdziły pozytywny wpływ kreatyny na większość testów poznawczych i pamięciowych.

Pierwszym przeprowadzonym testem u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby był test losowego generowania liczb RNG (wg. Towse & Neil 1998). Sprawiał on pacjentom najwięcej trudności, choć z pozoru wydawał się być najłatwiejszym. Suplementacja kreatyną choć wykazywała na indywidualną poprawę wyników u niektórych pacjentów w stosunku do grupy placebo, nie wykazała jednak znamienych statystycznie różnic pomiędzy obiema

grupami. Podobny wynik otrzymał McMorris (2007) u ludzi w podeszłym wieku suplementowanych kreatyną. Natomiast w testach pamięci krótkotrwałej werbalnej znaleziono znamienne poprawę pamięci w teście werbalnym postępującym, tzn. takim, w którym pacjent musiał zapamiętywać ciąg liczb w postępującej po sobie kolejności. Brak było takiej znamienności w przypadku pamięci werbalnej wstecznej, gdzie trzeba było odtwarzać ciąg liczb w kolejności odwrotnej do podawanej przez lektora. Sun (2005) tłumaczy to zjawisko angażowaniem innych obszarów mózgu niż w przypadku pamięci krótkotrwałej postępującej.

W przypadku pamięci krótkotrwałej przestrzennej otrzymałam znamienne poprawę tej pamięci w przypadku pamięci przestrzennej wstecznej. McMorris zanotował poprawę tej pamięci w obu przypadkach postępującym i wstecznym. Różnice występujące pomiędzy pamięcią krótkotrwałą werbalną i przestrzenną Brugger (1997) tłumaczy mniejszymi obciążeniami dla pracy mózgu w przypadku pamięci przestrzennej, gdyż badany pacjent cały czas ma obraz przestrzenny wykonywanych przez lektora ruchów przed sobą, co w mniejszym stopniu angażuje obszar pamięci krótkotrwałej. Smith & Jonides (1999) zauważają, że w pamięć przestrzenną jest zaangażowana prawa półkula a w pamięć werbalną krótkotrwałą lewa półkula mózgowa, co również może wpływać na wynik końcowy testu.

Ostatnimi z przeprowadzonych testów pamięciowych były: test pamięci długotrwałej i test matematyczny. Test pamięci długotrwałej wykazał znamienne wysoki wzrost po tygodniowej suplementacji kreatyną. W trakcie przeprowadzania tego testu zaangażowana jest prawa półkula mózgowa (McMorris 2007) podobnie jak w przypadku testu przestrzennego pamięci krótkotrwałej. Test tego typu wymaga dużej energii w obrębie hipokampa (drobna struktura nerwowa, umieszczona w płacie skroniowym kory mózgowej kresomózgowia).

Test matematyczny był trudnym testem dla wielu pacjentów. Znotowano jedynie znamienne wzrost dokładności wyników, ale bez różnic czasowych przeprowadzonych obliczeń.

Wyjaśnieniem wpływu kreatyny na procesy pamięciowe jest wzmożona resynteza ATP w mózgu. Jest pewne, że ludzie w starszym wieku lub schorowani (w tym chorzy na przewlekłe choroby wątroby) wymagają więcej energii dla przeprowadzenia tego testu niż ludzie młodzi (Behzadi 2005, Toescu 2005). Jako końcowy wniosek należy stwierdzić pozytywny wpływ suplementacji kreatyny na procesy poznawcze badane w niniejszej rozprawie. Należy jednak zaznaczyć, że ograniczona liczba badanych osób i dość krótki (jeden tydzień) czas suplementacji maksymalną dawką kreatyny, nie może w sposób jednoznaczny wykluczyć również korzystnego wpływ kreatyny na wyniki testu losowego generowania liczb RNG.

W podsumowaniu całości przeprowadzonych badań należy podkreślić wielostronnie korzystny wpływ suplementacji kreatyną u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby.

Nastąpiła nie tylko korzystna poprawa wydolności fizycznej (sześciominutowy test marszowy), ale nastąpił równocześnie wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza, co podniosło odporność organizmu na działanie stresu oksydacyjnego wynikającego ze szkodliwego działania wolnych rodników. Nowością tej pracy jest stwierdzenie korzystnego wpływu suplementacji kreatyną na własności poznawcze mózgu poprzez poprawę procesów zapamiętywania. Wpływ ten jest uwarunkowany zdolnością mózgu do bardziej wytężonej pracy poprzez zwiększoną resyntezę ATP.

5. WNIOSKI

1. Stężenia biopierwiastków cynku i miedzi w osoczu u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby nie odbiegają zakresem stężeń od wartości referencyjnych dla ludzi zdrowych w przeciwieństwie do selenu które wykazują obniżone wartości.
2. Doustne suplementowanie monohydratem kreatyny pacjentów w okresie jednego tygodnia, skutkuje podniesieniem stężenia selenu w osoczu do wartości mieszczących się w zakresie referencyjnym dla ludzi zdrowych .
3. Suplementacja monohydratem kreatyny powoduje wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza w grupie badanych chorych.
4. Suplementacja monohydratem kreatyny wpływa na poprawę wydolności fizycznej w grupie chorych z przewlekłymi chorobami wątroby.
5. Suplementacja monohydratem kreatyny ma istotny wpływ na poprawę zdolności poznawczych organizmu poprzez wzrost pamięci werbalnej, przestrzennej i długoterminowej.

6. STRESZCZENIE

Badaniom poddano pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. Kreatyna jest syntetyzowana w wątrobie i nerkach mając wpływ na procesy energetyczne i antyoksydacyjne organizmu. Przewlekłe choroby wątroby mogą powodować jej obniżoną syntezę w organizmie. Przeprowadzono suplementację monohydratem kreatyny przez okres jednego tygodnia dawką 20g dziennie w czterech oddzielnych porcjach. Wyniki porównano z grupą placebo. Stanowiła ją ta sama grupa pacjentów otrzymujących skrobię przez okres jednego tygodnia. Oceniono wpływ kreatyny na całkowity poziom antyoksydacyjny osocza oraz zmianę stężeń biopierwiastków pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej: miedzi, cynku i selenu. Badaną grupę pacjentów poddano testowi wysiłkowemu. Oceniano długość i szybkość przebytego dystansu w sześciominutowym teście marszowym. Wpływ kreatyny na procesy poznawcze w mózgu oceniono stosując zestaw testów pamięciowych dla pamięci krótko i długotrwałej. Otrzymane wyniki badań upoważniają do stwierdzenia korzystnego wpływu suplementacji kreatyną na wydolność psychofizyczną organizmu pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. Po okresie suplementacji wzrósł całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu. Wśród biopierwiastków pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej istotny wzrost stężenia zanotowano tylko w przypadku selenu. Stężenie miedzi i cynku w osoczu pozostawało bez zmian. Nastąpiła poprawa wydolności fizycznej badanych pacjentów poprzez znamienne wzrost przebytego dystansu i szybkości chodu w teście marszowym. Korzystny wpływ kreatyny na procesy energetyczne w mózgu stwierdzono poprzez wzrost pamięci krótko i długotrwałej. Podsumowując należy stwierdzić, że suplementacja hydratem kreatyny wywiera istotny wpływ na poprawę wydolności psychofizycznej u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby oraz podnosi ich odporność na wystąpienie skutków stresu oksydacyjnego.

7. SUMMARY.

Patients with chronic liver disease were investigated. Creatine is synthesized in liver and kidney and has influence on energy and antioxidant processes in the body. Creatine synthesis can be decreased during chronic liver disease. Patients were supplemented daily with creatine monohydrate 20g per day in four portions during one week. The results were compared with placebo group. It was the same group of patients supplemented with daily 20g starch. Creatine influence on total antioxidant status and changes in plasma copper, zinc and selenium concentration were investigated. These microelements belong to primary antioxidant defense system. The creatine supplemented group was put to physical effort assessment. The distance and speed were assessed in six minutes march test. Influence of creatine supplementation on brain cognitive performance in patients with chronic liver disease was investigated using short and long memory tests. The obtained results can conclude that creatine monohydrate supplementation has a beneficial effect on psycho-physical efficiency in patients with chronic liver disease. Between microelements in primary antioxidants defence system only concentration of selenium was significantly increased. Copper and zinc plasma concentration were unchanged. Physical efficiency was increased in six minutes march test. The difference in distance and speed was significantly increased. In conclusion, can be say that creatine monohydrate supplementation in patients with chronic liver disease has a beneficial effect on increased level of psycho-physical efficiency and can protect better organism against oxidant stress.

8. PIŚMIENNICTWO

- **Aaseth J., Smith-Kielland A., Thomassen Y.:** *Selenium, alcohol and liver diseases.* 1986, 18(1), 43-47
- **Abul H.T., Mathew T.C., Abul F., Al-Sayer H., Dashti H.M.:** *Antioxidant enzyme level in the testes of cirrhotic rats.* Nutrition, 2002, 18(1), 56-59
- **Antebi H., Mansoor O., Ferrier C., Tetegan M., Morvan C., Rangaraj J., Alcindor LG.:** *Liver function and plasma antioxidant status in intensive care unit patients requiring total parenteral nutrition: comparison of 2 fat emulsions.* Jpen: Journal of Parenteral & Enteral Nutrition. 28(3):142-8, 2004.
- **Bacic-Vrca V., Skreb F., Cepelak I., Mayer L., Kusic Z., Petres B.:** *The effect of antioxidant supplementation on superoxide dismutase activity, Cu and Zn levels, and total antioxidant status in erythrocytes of patients with Graves' disease.* Clinical Chemistry & Laboratory Medicine. 2005, 43(4):383-8,
- **Bartosz G.:** *Druga twarz tlenu.* 2003. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003
- **Behzadi Y., Liu T.T.:** *An arterio lar compliance model of cereblral blond flow responses to neutral stimulus.* Neuroimaging, 2005, 25, 1100-1111.
- **Bemben M.G., Lamot H.S.:** *Creatine supplementation and exercise performance: recent findings.* Sports. Med., 2005, 35(2), 107-125
- **Bender A., Koch W., Elstner M., Schombacher Y., Bender J., Moeachl M., Gekeler F., Muller-Myhsok B., Gasser T., Tatsch K., Klostock T.:** *Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo controlled randomized pilot trial.* Neurology, 2006, 67(7), 1262-1264.

- **Bennett T., Bathalon G., Armstrong D., Martin B., Coll R., Beck R., Barkdull T., O'Brien K., Deuster P.A.:** *Effect of creatine on performance of militarily relevant tasks and soldier health.* Mil. Med., 2001, 166(110), 966-1002
- **Benzie I.F.F., Strain J.J.:** *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay.*, 1996, Anal. Chem., 239, 70 -76
- **Berneburg M, Gremmel T, Kurten V, Schroeder P, Hertel I, von Mikecz A., Wild S., Chen M., Declerc L., Matsui M., Ruzicka T., Kurtmann J.:** *Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences.* J. Invest. Dermatol., 2005, 125(2), 213-20
- **Bogden J.D., Al-Rabiai S., Gilani S.H.:** *Effect of chronic ethanol ingestion on the metabolism of copper, iron, manganese, selenium and zinc in an animal model of alcoholic cardiomyopathy.* J. Toxicol. & Environment. Health, 1984, 14(2-3), 407-417.
- **Brugger O.:** *Variables that influence the generation of random sequences: An update.* Perceptual and Motor skills, 1997, 84, 627-661.
- **Bronikowski M.:** *Dwa razy 90 minut czy cztery razy 45 minut? – czyli pytanie o kondycję i kierunek rozwoju szklanego wychowania fizycznego w Polsce.* Medycyna Sportowa Vol. 21, Nr 2, 2005, 128-134.
- **Chung K, Romero N., Tinker D., Keen C.L., Amemiya K., Rucker R.:** *Role of copper in the regulation and accumulation of superoxide dismutase and metallothionein in rat liver.* J. Nutr., 1988, 118, 859-865
- **Dameron C.T., Harris E.D.:** *Regulation of aortic Cu,Zn-superoxide dismutase with copper.* Biochem. J., 1987, 248, 663-672
- **Dembińska-Kieć A., Noskalski J.W.:** *Diagnostyka Laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Wyd. Urban & Partner, Wrocław 2002.

- **Demirel G., Uras N., Celik I.H., Aksoy H.T., Oguz S.S., Erdeve O., Erel O., Dilmen U.:** *Comparison of total oxidant/antioxidant status in unconjugated hyperbilirubinemia of newborn before and after conventional and LED phototherapy: A prospective randomized controlled trial.* Clinical & Investigative Medicine - Medecine Clinique et Experimentale. 33(5):E335-41, 2010.
- **Feranchak A.P., Gralla J., King R., Ramirez R.O., Corkill M., Narkiewicz M.R., Sokol R.J.:** *Comparison of indices of vitamin A status in children with chronic liver disease.* Hepatology, 2005, 42(4), 782-792.
- **Freeman B.A., Turrens J.F., Mirza Z., Crapo J.D., Young S.L.:** *Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase.* Fed., Proc., 1985, 44, 2591-2595.
- **Fridovich I.:** *Superoxide dismutases.* Annu. Rev. Biochem., 1975, 44, 147-152.
- **Gonzales-Reimers E., Aleman-Vals, M.R., Barroso-Guerrero F., Santolaria-Fernandez F., Lopez-Lirola A., Garcia-Valdecasas C.R.:** *Hair zinc and copper in chronic alcoholics.* Biol. Trace Elem.Res, 2002, 85(3), 269-275
- **Gonzales-Reimers E., Martin-Gonzales M.C., Aleman-Vals M.R., de la Vega-Pietro M.J., Galindo-Martin L., Abreu-Gonzales P., Santolaria-Fernandez F.:** *Relative and combined effects of chronic alcohol consumption and HCV infection on serum zinc, copper and selenium.* Biol. Trace. Elem. Research, 2009, 132(1-3), 75 – 84
- **Gutkowski K., Hartleb M.:** “ *Autoimmunologiczne zapalenie wątroby*”, Gastroenterologia, praca zbiorowa pod red. A. Dąbrowskiego, wyd. Medical Tribune Polska, 2008

- **Harris R.C., Soderlung K., Hultman E.:** *Elevation of creatine in resting and exercised muscle in normal subjects by creatine supplementation.* Clin. Scien., 1992, 83, 367 – 372
- **Hartman C., Berkowitz D., Eschah-Adiv O., Hino B., Rimon N., Satinger I., Kraoz T., Shamir R.:** *Long-term lamivudine therapy for chronic hepatitis in children unresponsive to interferon.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 2006, 43,4,494-498
- **Ipsiroglu O.S., Stromberger C., Ilas J., Hoger H., Muhl A., Stockler-Ipsiroglu S.:** *Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species.* Life-Sci., 2001,69(15), 1805-1815
- **Ismail N.A., Okasha S.H., Dhawan A. , Abdel-Rahman A.O., Shaker O.G.:** *Antioxidant enzyme activities in hepatic tissue from children with chronic cholestatic liver disease.* Saudi J. Gastroenterol., 2010, 16(2), 90 – 94.
- **Jakubowski Z., Kabata J., Kalinowski L., Szczepańska-konkel M., Angielski S.:** *„Badania laboratoryjne w codziennej praktyce”,* 1996, Wyd. Mak Med., Gdańsk, 81, 211.
- **Kaczmarek M., Wjicki J., Samochovec L., Dutkiewicz T., Sych Z.:** *The influence of exogenous antioxidants and physical exercise on some parameters associated with production and removal of free radicals.* Pharmazie, 1999, 54(4), 303 -306.
- **Kreider R.B., Melton C., Rasmussen C.J., Greenwood M., Lancaster S., Cantler E.C., Milnor P., Almada A.L.:** *Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes.* Mol. Cell. Biochem., 2003, 211(1-2), 95-104.
- **Lawler J.M., Barnes W.S., Wu G., Song W., Demaree S.:** *Direct antioxidant properties of creatine.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002,290(1), 47-52

- **Leuzzi V., Bianchi M.C., Tosetti M., Carducci C., Cerquiglini C.A., Cioni G., Antonozzi I.:** *Brain creatine depletion: guanidinoacetate methyltransferase deficiency (improving with creatine supplementation).* Neurology, 2000, 55(9), 1407-1409.
- **Li X.M., Meng Y.X., Duan Z. H., Hou W.:** *Characteristic of acid-base balance In patients with chronic severe hepatitis: analysis of 126 cases.* ZHONGUA-YI-XUE-ZA-ZHI, 2006, 86(30), 2131- 2133
- **Margaritis I., Tessier F., Prou E., Marconnet P., Marini J.F.:** *Effects of endurance training on skeletal muscle oxidative capacities with and without selenium supplementation.* J. Trace Elem. Med. Biol., 1997, 11(1), 37-43.
- **Mayhew D.L., Mayhew J.L., Ware J.S.:** *Effects of long-term creatine supplementation on liver and kidney functions in American college football players.* Int. J. Sport. Nutr. Exerc/ Metab., 2002, 12(4), 453-460
- **McMorris T., Mielcarz G., Harris R.C., Swain J.P., Howard A.N.:** *Creatine supplementation and Cognitive Performance in elderly individuals.* Aging Neuropsychol. & Cognition, 2007, 14, 517-528.
- **Mendes R.R., Tirapegui J.:** *Creatine: the nutritional supplement for exercise – current concepts.* Arch. Latinoam. Nutr., 2002, 52(2), 117-127.
- **Mielcarz G.:** *Stan miedzi w organizmie i jego wpływ na rozwój chorób układu krążenia,* Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 1998, Poznań
- **Mielcarz G., Barinow-Wojewódzki A., Linke K., Morawska-Staszak K., Harris R.C, McMorris T., Howard A.:** *Wpływ suplementacji kreatyną na wydolność wysiłkową i potencjał antyoksydacyjny u ludzi w podeszłym wieku(Effect of creatine supplementation on physical performance and antioxidant status in elderly people.* Polish Journal of Human Nutrition and Metabolism, 2005, XXXII, 1299-1303.

- **G. Mielcarz., K. Linke., K. Morawska-Staszak., A. Barinow-Wojewódzki.:** „*Wpływ suplementacji kreatyną na wydolność wysiłkową i zdolność poznawczą u ludzi z przewlekłym zapaleniem wątroby*”, (2007), *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, XXXIV, nr1/2, str. 486 – 491
- **Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.:** *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1994.
- **Narbutt J., Lesiak A., Kwiecień A., Sysa-Jędrzejowska A., Kuydynowicz A.J.:** *Zmiany rzekomotwardzinowe w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia wątroby. Opis przypadku. Przegl. Lek.*, 2005, 62,5,314 – 317
- **Olah M., Koncz A., Feher J., Kalmanczhey J., Olah C., Balogh S., Nagy G. Bender T.:** *The effect of balneotherapy on C-reactive protein, serum cholesterol, triglyceride, total antioxidant status and HSP-60 levels.* *International Journal of Biometeorology.* 2010, 54(3):249-54,
- **Panagria N., Varma K., Nijhawan S., Mathur A., Rai R.R.:** *Quality of live and nutritional status In alcohol addicts and patients with chronic liver disease.* *Tropical Gastroenterol.*, 2007, 28(4), 171-175.
- **Park K.S., Jang B.K., Kwon K.M., Chung W.J., Cho K.B.:** *Antioxidant status In nonalcoholic steatohepatitis.* *Korean J. Hepatol.*, 2005, 11(2), 135-143
- **Pena-Altamira E., Crochemore C., Virgili M., Contestabile A.:** *Neurochemical correlates of differential neuroprotection by long-term dietary creatine supplementation.* *Brain Res.*, 2005, 1058(1-2), 183-188.
- **Prohaska J.R.:** *Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats.* *J. Nutr.*, 1991, 121, 355-367

- **Peres W.A., Chaves G.V., Goncalves J.C., Ramalho A., Coelho H.S.:** *Vitamin A deficiency in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease.* British J. Nutr., 2011, 106(11), 1724-1731.
- **Rae C., Digney A.L., McEwan S.R., Bates T.C.:** *Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial.* Proc. Biol. Sci. (2003), 270(1529), 2147-2150.
- **Rae C., Scott R.B., Lee M., Simpson J.M., Hines N., Paul C., Anderson M., Karmiloff-Smith A., Styles P., Radda G.K.:** *Brain bioenergetics and cognitive ability.* Dev. Neurosci., 2003, 25(5), 324-331,
- **Salem T.A., El-Refaei M.F., Badra G.A.:** *Study of antioxidant enzymes level and phagocytic activity in chronic liver disease patients.* Egypt. J. Immunology, 2003, 10(1), 37-45
- **Sestili P.:** *Creatine as an antioxidant.* Creatine report from Cambridge Meeting "Creatine in Health, Medicine and Sport", 2010, Cambridge, Downing College, UK
- **Sestili P., Martinelli C., Bravi G., Piccoli G., Curci R., Battistelli M., Falceri E., Agostini D., Gioacchini A.M., Stocchi V.:** *Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity.* Free. Radi. Biol. Med., 2006, 40(5), 837-849
- **Smith E.E., Jonides J.:** *Neuroscience – storage and executive processes in the frontal lobes.* Science 1999, 283, 1657-1661.
- **Stroch-Uczciwek A., Plewa M., Nowak Z.:** *Przydatność sześciominutowego testu marszowego w ocenie tolerancji wysiłkowej pacjentów po pomostowaniu naczyń wieńcowych (CABG).* Fizjoterapia 2006; 14(2):3-10

- **Sun X.W., Zhang X.C., Chen X.C., Zhang P., Bao M., Zhang D.R., Chen J., He S.:** *Age dependent brain activation during forward and backward digit recall revealed by fMRI.* Neuroimage, 2005, 26, 36-47.
- **Taylor C.G., Bettger W.J., Bray T.M.:** *Effect of dietary zinc and copper deficiency on the primary free radical defence system in rats.* J. Nutr., 1988, 613, 118-124
- **Taylor R.M., Dhawan A.:** *Assessing nutritional status in children with chronic liver disease.* J. Gastroenterol. & Hepatology, 2005, 20(12), 1817 -1824
- **Toescu E.C.:** *Normal brain ageing: models and mechanisms.* Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences, 2005, 360, 2347-2354
- **Towse J.N., Neil D.:** *Random generation of numbers: a search for underlying processes.* European Journal of Cognitive Psychology, 1998, 9, 381 – 400
- **Venderley A.M., Campbell W.W.:** *Vegetarian diets: nutritional considerations for athletes.* Sports. Med., 2006, 36(4), 293-305
- **Watanabe A., Kato N., Kato T.:** *Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation,* Neurosci. Res., 2002, 42, 279-285
- **Williams M.H.:** *Granice wspomagania.* Wyd. Medicina Sportiva, Kraków, 1999
- **Williams M.H., R.B. Kreder, J.D. Branch.:** *Creatine the Power Supplement,* Wyd. Human Kinetics, USA
- **Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkovska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P.:** *Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases.* J. Biomed. Science, 2001, 8(1), 59-70.
- **Zhu S., Li M., Figueroa B.E., Liu A., Stavrovskaya I.G., Pasinelli P., Beal M.F., Brown R.H., Krista B.S., Ferrante R.J., Friedlander R.M.:** *Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in Mice.* J. Neurosci., 2004, 24(26), 5909 – 5912.

9. SPIS RYCIN

- Ryc.1.** *Aparat do pomiarów atomowej spektroskopii absorpcyjnej Perkin-Elmer Zeman 3030*
- Ryc.2.** *Stężenie biopierwiastków: miedzi, cynku i selenu w osoczu krwi u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie placebo.*
- Ryc.3.** *Stężenie biopierwiastków: miedzi, cynku i selenu w osoczu krwi u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną.*
- Ryc.4.** *Porównanie zmian całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie placebo (przed i po tygodniowym doustnym pobieraniu 20 g skrobi dziennie).*
- Ryc.5.** *Porównanie zmian całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną (przed i po tygodniowym doustnym pobieraniu 20 g kreatyny dziennie).*
- Ryc.6.** *Porównanie wyników testu RNG u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie placebo i suplementowanej kreatyną.*
- Ryc.7.** *Porównawcze zestawienie wyników testu oceniającego krótkotrwałą pamięć werbalną (postępującą i wsteczną) oraz pamięć przestrzenną (postępującą i wsteczną) u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie placebo i suplementowanej kreatyną.*
- Ryc.8.** *Porównanie wyników testu oceniającego pamięć długotrwałą u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podawaniu doustnym placebo i tygodniowej suplementacji kreatyną.*

Ryc.9. *Porównanie wyników testu matematycznego oceniającego zdolność do wykonywania prostych obliczeń matematycznych u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie po podawaniu doustnym placebo i tygodniowej suplementacji kreatyną*

10. SPIS TABEL

Tab. 1. *Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń miedzi.*

Tab.2. *Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń cynku.*

Tab.3. *Program atomizacji w kuwecie grafitowej dla oznaczeń selenu.*

Tab.4. *Skala kategorii duszności stosowana do oceny nasilenia odczuwanej przez chorego duszności i zmęczenia w czasie próby wysiłkowej.*

Tab. 5. *Profil kliniczny pacjentów poddanych badaniom z przewlekłymi chorobami wątroby.*

Tab.6. *Wyniki próby marszowej u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie przyjmującej placebo*

Tab.7. *Wyniki próby marszowej u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby w grupie suplementowanej kreatyną.*

Tab.8. *Wyniki testu losowego generowania liczb dla grupy kontrolnej, placebo i po podaniu kreatyny, Wartości punktacji: średnia \pm odchylenie standardowe.*

Tab.9. *Wyniki punktacji testu FVB i BVR (werbalnego postępującego i werbalnego wstecznego) oraz FSR i BSR (przestrzennego postępującego i wstecznego) dla grupy kontrolnej, placebo i po podaniu kreatyny, Wartości punktacji: średnia \pm odchylenie standardowe.*

Tab.10. *Wyniki punktacji testu pamięci długotrwałej dla grupy pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby (średnia \pm SD). * $p < 0.005$*

Tab.11. Wyniki punktacji testu pamięci testów oceniających precyzję oraz czas dokonywanych obliczeń matematycznych, dla grupy pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby (średnia \pm SD). * $p < 0.05$