

(06)

Ocena wpływu systemowej chemioterapii stosowanej w leczeniu raka sutka na aktywność lizozymu zawartego we łzach – doniesienie wstępne

The estimation of systemic chemotherapy treatment administered in breast cancer on lysozyme activity in tears – preliminary report

Katarzyna Wojciechowska¹, Piotr Jurowski¹, Marzena Więckowska-Szakiel², Barbara Różalska²

¹ Klinika Okulistyki i Rehabilitacji Wzrokowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Roman Goś

² Zakład Biologii Zakazów Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego
Kierownik: prof. dr hab. n. biol. Barbara Różalska

Streszczenie:

Cel pracy: ocena działania cytostatyków stosowanych w leczeniu raka sutka na aktywność lizozymu zawartego we łzach w zależności od czasu trwania chemioterapii.

Materiał i metodyka: 8 kobiet leczono wg schematu chemioterapii: docetaksel z dokсорubicyną. U 4 pacjentek zastosowano schemat CMF – obejmował on cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl. Aktywność lizozymu zawartego we łzach chorych oceniano za pomocą pomiaru średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii *Micrococcus lysodeicticus*.

Wyniki: oba schematy zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego wpłynęły w sposób istotny statystycznie na zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu bakterii *M. lysodeicticus* zarówno po I cyklu leczenia, jak i po II. W przypadku schematu chemioterapii – CMF – po II cyklu leczenia obserwowano całkowity brak aktywności lizozymu we łzach badanych pacjentek (zerowa średnica strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów).

Wnioski: systemowa chemioterapia stosowana w leczeniu raka piersi wpływa na zmniejszenie aktywności lizozymu zawartego we łzach, co może skutkować zwiększoną zachorowalnością na infekcje bakteriami Gram-dodatnimi powierzchni oka.

Słowa kluczowe:

lizozym, łzy, chemioterapia, rak piersi.

Summary:

Purpose: Estimation of cytostatics influence used in breast cancer treatment on lysozyme activity in human tears depend on time of treatment.

Material and methods: 8 women were treated at the base of chemotherapy schema: docetaxel with doxorubicin and 4 women treated with schema CMF: cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil. Lysozyme activity in tears was assessed by measurement of diameter zone of *Micrococcus lysodeicticus* growth inhibition.

Results: It was revealed that both chemotherapy schema caused statistically significant reduction of diameter zone of *M. lysodeicticus* growth inhibition, after first and second course of chemotherapy treatment. After second chemotherapy course CMF schema induced loss of lysozyme activity in patient's tears (zero mm of *M. lysodeicticus* diameter zone growth inhibition).

Conclusions: Systemic chemotherapy administered in breast cancer induce reduction of lysozyme activity in tears, that may cause higher morbidity of ocular surface infections caused by Gram-positive bacteria.

Key words:

lysozyme, tears, chemotherapy, breast cancer.

Wstęp

Lizozym (muramidaza) został odkryty przez Alexandra Fleminga w 1922 r. Jest białkiem kationowym o ciężarze 14,4 kDa – jednym z mechanizmów nieswoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Należy do enzymów z grupy hydrolaz, które rozkładają w mureinie ściany komórkowej bakterii wiązania B – 1,4-glikozydowe między cząsteczkami kwasu N-acetylmuraminowego a N-acetyloglukozaminą. Występuje w ziarnistościach granulocytów, monocytów, makrofagów. Jego obecność wykazano w większości płynów tkankowych: krwi, ślinie, śluzie

nosa, łzach, soku żołądkowym, mleku, nasieniu, żółci (1). Lizozym wykazuje aktywność głównie wobec bakterii Gram-dodatnich.

Dla oka podstawową linią obrony przed drobnoustrojami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego jest nieuszkodzona spojówka, która w warunkach fizjologicznych stanowi fizyczną barierę. Jej powierzchnia jest stale splukiwana przez film łzowy, który zawiera naturalne substancje przeciwbakteryjne, w tym oprócz lizozymu także immunoglobuliny – głównie IgA, białka układu dopełniacza, betalizynę, laktoferynę (1-3).

Szczególnie istotny w wytwarzaniu lizozymu jest nabłonek wyściełający gruczoł łzowy i przewody wyprowadzające łzy. Według niektórych autorów obecność w tych komórkach drobin lizozymu potwierdza fakt, że w komórkach nabłonka gruczołu łzowego zachodzi czynny proces produkcji enzymu (4).

Stężenie lizozymu we łzach wynosi 1–2 mg/ml i jest wyższe niż w surowicy krwi (4). Wykazano, że do zmniejszenia aktywności tego enzymu w płynie łzowym dochodzi m.in.: w zespole suchego oka, zapaleniu rogówki spowodowanym wirusem typu Herpes, w jaglicy, u palaczy tytoniu, w toczniu układowym oraz w pierwszych dniach po operacji zaćmy (4-6).

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. W ciągu roku w Polsce rejestrowanych jest około 12000 nowych zachorowań (7). Większość kobiet zgłasza się do lekarza, gdy nowotwór jest w zaawansowanym stadium, kiedy oprócz chirurgicznego usunięcia guza konieczne jest zastosowanie chemo- lub hormonoterapii uzupełniającej. Rodzaj terapii zależy od wielu czynników, takich jak: stopień zaawansowania klinicznego nowotworu, stan regionalnych węzłów chłonnych, stopień złośliwości histologicznej, wiek chorej, stan receptorów steroidowych i receptora HER2 (7). Cele chemioterapii uzupełniającej (adiuwantowej) to zniszczenie potencjalnie istniejących mikroprzerzutów i zmniejszenie prawdopodobieństwa nawrotu nowotworu. Metodę chemioterapii paliatywnej stosuje się u chorych, których nie można wyleczyć całkowicie, można jedynie przedłużyć ich życie i poprawić jego jakość. W leczeniu cytostatykami stosuje się polichemioterapię, czyli programy leczenia wieloma lekami, które są podawane dożylnie co 3–4 tygodnie (7). Chemioterapia systemowa ma zasięg ogólnoustrojowy – działa toksycznie na komórki nowotworowe, ale także niekorzystnie na komórki prawidłowe, zwłaszcza te, które szybko się dzielą, np. szpiku, nabłonka przewodu pokarmowego, gonad. Objawy uboczne po chemioterapii są powszechne i dotyczą zmian w przewodzie pokarmowym, sercu, płucach, szpiku kostnym, układzie nerwowym czy immunologicznym.

W dostępnym piśmiennictwie – zarówno polskim, jak i zagranicznym – stosunkowo mało jest danych na temat okulistycznych powikłań po chemioterapii, szczególnie tych, które dotyczą jakościowych i ilościowych zaburzeń filmu łzowego. Brak w dostępnej literaturze prac dotyczących aktywności lizozymu we łzach u chorych poddanych chemioterapii skłonił autorów do podjęcia takiego tematu badań.

Cel

Celem badań była ocena wpływu cytostatyków stosowanych w leczeniu raka sutka na aktywność lizozymu zawartego we łzach u pacjentek leczonych według dwóch schematów chemioterapii: schemat I – docetaksel z doksorubicyną, schemat II – cyklofosfamid z metotreksatem i 5-fluorouracylem.

Material i metody

Do badania włączono 12 pacjentek (próbki też z 24 oczu) zakwalifikowanych do systemowej chemioterapii z powodu raka sutka. Wykluczono kobiety, u których przed chemioterapią rozpoznano zespół suchego oka, stosujące leki zmniejszające produkcję łez oraz chorujące na cukrzycę. Próbkę też pobierano przed rozpoczęciem leczenia oraz po cyklach chemioterapii – pierwszym i drugim – tj. w odstępach 3-tygodniowych.

Płyn łzowy do badań pobierano za pomocą jałowych pasków bibuły „Tear Flo” (Rose Stone Enterprises), które na 3 minuty umieszczano w worku spojówkowym obojga oczu. Nasączone łzami paski zamykano w probówce Eppendorf i do czasu wykonania badania przechowywano w temperaturze -20°C. Pomiar aktywności lizozymu we łzach wykonywano po zebraniu próbek od wszystkich chorych, po dwóch cyklach chemioterapii, tj. po ok. 8 tygodniach od pierwszego badania. Z hodowli macierzystej *Micrococcus lysodeicticus* wykonywano posiewy redukcyjne na podłoża hodowlane na płytce z podłożem agarowym z dodatkiem 2% odwióknionej krwi baraniej i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Za pomocą nefelometru przygotowywano zawiesiny *M. lysodeicticus* (gęstość zawiesiny 3 x 10⁶ k/ml). Z tak przygotowanej zawiesiny próbki po 100 µl wysiewano za pomocą głaszczki na płytki z podłożem agarowym z dodatkiem 2% odwióknionej krwi baraniej. Następnie w jałowych warunkach na płytki układano po 6 krążków wyciętych z pasków bibuły „Tear-Flo”, które wcześniej nasączone łzami pacjentek, oraz krążek kontrolny z nasączony lizozymem (Sigma, USA) o stężeniu 5 mg/ml. Tak przygotowane płytki z wysianymi drobnoustrojami i nałożonymi krążkami bibuły inkubowano wieczkiem do góry przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Aktywność lizozymu oceniano po 24 godzinach poprzez pomiar średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych *M. lysodeicticus*. Punkt odniesienia stanowił roztwór lizozymu o stężeniu 5 mg/ml.

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników zastosowano nieparametryczny test analizy wariancji (ANOVA) rang Friedmana.

Wyniki

Średni wiek badanych kobiet wynosił 62 lata (od 51 do 69 lat).

Stopień klinicznego zaawansowania nowotworu klasyfikował się między IIA a IV.

U 7 chorych zastosowano chemioterapię uzupełniającą, u 5 – paliatywną.

U 8 pacjentek zastosowano leczenie docetakselem z doksorubicyną (schemat chemioterapii I), u 4 pacjentek – cyklofosfamidem z metotreksatem i 5-fluorouracylem (schemat chemioterapii II).

Wykaz danych do wykresu			
cykl chemioterapii	średnica (± odchylenie standardowe) średnica strefy zahamowania wzrostu bakterii <i>M. lysodeicticus</i> pod wpływem lizozymu (mm)		
	przed chemioterapią	po I cyklu chemioterapii	po II cyklu chemioterapii
docetaksel, doksorubicyna	12 ± 0.73	11,44 ± 0.63	11,13 ± 0.62
cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl-CMF	12,13 ± 1,13	10,63 ± 1,3	0 ± 0

Ryc. 1. Średnica strefy zahamowania wzrostu bakterii *Micrococcus lysodeicticus* w zależności od rodzaju zastosowanej chemioterapii i rodzaju cyklu leczenia.

Fig. 1. *Micrococcus lysodeicticus* diameter zone growth inhibition after different types and courses of chemotherapy.

Nr pacjenta/ Patient's number	Średnica strefy zahamowania wzrostu bakterii/ <i>Micrococcus lysodeicticus</i> (mm)/ <i>Micrococcus lysodeicticus</i> diameter zone growth inhibition (mm)		
	przed chemioterapią/ before chemotherapy	po I cyklu chemioterapii/ after I chemotherapy course	po II cyklu chemioterapii/ after II chemotherapy course
1	11	11	11
	12	12	11
2	12	11	11
	13	11	11
3	12	11	11
	12	12	12
4	11	11	11
	12	11	11
5	12	12	10
	12	11	11
6	11	11	11
	13	12	11
7	12	11	11
	13	12	11
8	11	11	11
	13	13	13
Średnia ± odchylenie standardowe/ Mean ± standard deviation	12 ± 0,73	11,44 ± 0,63	11,13 ± 0,62

Tab. I. Wyniki pomiaru średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii *M. lysodeicticus* pod wpływem lizozymu zawartego we łzach chorych leczonych wg schematu chemioterapii docetaksel z doksorubicyną.

Tab. I. Results of measurements of *M. lysodeicticus* diameter zone of growth inhibition due to tears lysozyme in patients treated with chemotherapy: docetaxel with doxorubicin.

Nr pacjenta/ Patient's number	Średnica strefy zahamowania wzrostu bakterii <i>Micrococcus lysodeicticus</i> (mm)/ <i>Micrococcus lysodeicticus</i> diameter zone growth inhibition (mm)		
	przed chemioterapią/ before chemotherapy	po I cyklu chemioterapii/ after I chemotherapy course	po II cyklu chemioterapii/ after II chemotherapy course
1	12	11	0
	13	11	0
2	12	10	0
	13	10	0
3	11	11	0
	13	12	0
4	10	8	0
	13	12	0
Średnia ± odchylenie standardowe/ Mean ± standard deviation	12,13 ± 1,13	10,63 ± 1,3	0 ± 0

Tab. II. Wyniki pomiaru średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii *M. lysodeicticus* pod wpływem lizozymu zawartego we łzach chorych leczonych wg schematu chemioterapii CMF – cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl.

Tab. II. Results of measurements of *M. lysodeicticus* diameter zone of growth inhibition by tears lysozyme in patients treated with chemotherapy: cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil.
Średnia ± odchylenie standardowe/ Mean ± standard deviation

Wyniki pomiarów średnicy strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów *M. lysodeicticus* pod wpływem lizozymu z łez pobranych od chorych kobiet, które leczono według powyżej przedstawionych schematów, w zależności od czasu trwania chemioterapii przedstawiają tabele I, II oraz rycina 1.

Oba zastosowane schematy chemioterapii wpłynęły w sposób istotny statystycznie na zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów (schemat I – $p = 0,0002$, schemat II – $p = 0,0002$). Zmniejszenie aktywności lizozymu we łzach było istotne statystycznie ($p < 0,05$) zarówno po I, jak i po II cyklu leczenia, niezależnie od przyjętego schematu leczenia.

Omówienie

Działania niepożądane systemowej chemioterapii mogą wywołać wiele niekorzystnych zmian w narządzie wzroku zarówno w przednim odcinku oka, jak i w tylnym (8-10). Objawy uboczne cytostatyków, które wpływają na film łzowy, przedstawiono w tabeli III.

Cytostatyki/ Cytostatic	Okulistyczne objawy uboczne/ Ocular side-effects
Metoreksat/ Methotrexate	zadrażnienie spojówek, zapalenie brzegów powiek, zmniejszenie odruchowego wydzielania łez, zespół suchego oka, obniżenie pH łez/ conjunctivitis, blepharitis, reduction of reflective tears secretion, dry eye syndrom, decrease of tears pH
Cyklofosfamid/ Cyclophosphamide	łzawienie, zespół suchego oka/ epiphora, dry eye syndrom
5-fluorouracyl/ 5-Fluorouracil	łzawienie, zadrażnienie spojówek, zapalenie brzegów powiek, zapalenie rogówki, światłowstręt, zwężenie dróg łzowych/ epiphora, conjunctivitis, blepharitis, keratitis, photophobia, lacrimal tracts stenosis
Docetaksel/ Docetaxel	zwężenie dróg łzowych, łzawienie, zapalenie spojówek/ lacrimal tracts stenosis, epiphora, conjunctivitis
Doksorubicyna/ Doxorubicin	łzawienie, zapalenie spojówek/ epiphora, conjunctivitis

Tab. III. Działania niepożądane chemioterapii, które mogą wpływać na ilościowy i jakościowy skład łez u badanych pacjentek (9-13).

Tab. III. Side-effects after chemotherapy which may have an influence on tears quality and quantity in examined patients (9-13)

Do zmniejszenia strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów pod wpływem lizozymu zawartego we łzach doszło w wyniku leczenia według obu schematów – zarówno I, jak i II. Obniżanie się aktywności enzymu może być spowodowane tym, że cytostatyki toksycznie wpływają na szybko dzielące się komórki nabłonka gruczołu łzowego (11-13). Negatywne oddziaływanie leków przeciwnowotworowych na niektóre tkanki i narządy następuje w różnych fazach leczenia – wczesnej lub późnej. Fakt, że do znacznego obniżenia aktywności lizozymu we łzach chorych z badanych grup doszło już po pierwszym cyklu chemioterapii, niezależnie od rodzaju stosowanego schematu leczenia, stanowi silny argument, który przemawia za twierdzeniem, że toksyczność cytostatyków wobec gruczołu łzowego jest wczesnym powikłaniem. Szczególną uwagę zwraca brak zahamowania wzrostu bak-

terii *M. lysodeicticus* po drugim cyklu leczenia wg schematu II. Wskazuje ona na całkowity zanik aktywności lizozymu w przypadkach kumulacji toksycznego efektu działania trzech cytostatyków w nabłonku gruczołu łzowego. Ponadto metoreksat stosowany w leczeniu wg schematu II powoduje znaczne obniżenie pH łez z prawidłowego 7,2 do 6,5. Taka zmiana kwasowości płynu łzowego skutkuje podrażnieniem i odruchowym łzawieniem (9). Konsekwencją jest znaczny wzrost objętości wydzielanych łez oraz pogorszenie ich składu i stabilności. Dochodzi do wzrostu zawartości wody we łzach, zmniejsza się natomiast wydzielanie pozostałych składników takich jak białka, elektrolity i lizozym. Nadmierna ilość wydzielanych łez, które nie utrzymują się odpowiednio długo na powierzchni rogówki, charakteryzowana jest jako „plączące suche oko” (2,9).

W przypadku schematu I chemioterapii również uzyskano statystycznie istotne zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu bakterii pod wpływem lizozymu zawartego we łzach badanych pacjentek, ale znacznie mniejsze niż w przypadku schematu II. Należy sądzić, że kumulacja dwóch cytostatyków działa mniej toksycznie na nabłonek gruczołu łzowego niż terapia, w skład której wchodzi trzy leki. Ponadto objawem ubocznym docetakselu, który wchodzi w skład schematu II, jest polineuropatia – między innymi powoduje ona upośledzenie czucia rogówkowego. Jego obniżenie zaburza sprzężenie zwrotne z gruczołem łzowym, w efekcie zmniejsza odruchowe wydzielanie łez i – co z tego wynika – powoduje obniżenie aktywności lizozymu (9-11).

Nie można również wykluczyć negatywnego wpływu chemioterapeutyków na aktywność pozostałych składowych łez o działaniu przeciwdrobnoustrojowym takich jak: laktoferyna, białka układu dopełniacza czy immunoglobuliny.

Klinicznym efektem obniżenia aktywności lizozymu we łzach może być wyższa zachorowalność na infekcje narządu wzroku spowodowane przez patogeny Gram-dodatnie.

W warunkach fizjologicznych na rzęsach, skórze powiek i w worku spojówkowym znajdują się szczepy bakterii, które u osób z prawidłową odpornością nie powodują infekcji. Liczebność populacji bakterii oraz ich wirulencja w worku spojówkowym wzrastają, kiedy produkcja łez jest zmniejszona, mają one nieprawidłowy skład, czy nastąpił zastój w ich wydzielaniu.

Do bakterii Gram-dodatnich kolonizujących skórę powiek, rzęsy, worek spojówkowy należą przede wszystkim: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*. Można się więc spodziewać, że u pacjentów w trakcie chemioterapii częściej będą występowały infekcje wywołane przez te szczepy bakterii, np.: zapalenie brzegów powiek, spojówek i rogówki, przedprzegrodowe zapalenie tkanek oczodołu czy zapalenie wnętrza gałki ocznej po urazach przebijających i/ lub chirurgii wewnątrzgałkowej.

Podsumowanie

Chemioterapia stosowana w leczeniu raka sutka zmniejsza aktywność lizozymu zawartego we łzach (schemat I) lub może być przyczyną braku jego aktywności w późniejszych cyklach, szczególnie jest to widoczne w trakcie leczenia według schematu II, w skład którego wchodzi trzy cytostatyki (schemat II).

Istotny spadek aktywności lizozymu może się wiązać ze zwiększoną zapadalnością na choroby infekcyjne powierzchni oka powodowane głównie przez bakterie Gram-dodatnie.

Wnioski

1. Systemowa chemioterapia stosowana w leczeniu raka sutka hamuje aktywność lizozymu zawartego we łzach.
2. Zmniejszenie produkcji lizozymu we łzach jest zależne od czasu trwania leczenia cytostatykami.

Piśmiennictwo:

1. Stankiewicz A, Mikita A: *Fizjologia i patologia filmu łzowego w przebiegu zespołu suchego oka*. Klinika Oczna 1998, 100, 323-329.
2. Zagórski Z, Naumann G, Watson P: *Choroby rogówki, twardówki i powierzchni oka*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2008, 138-144.
3. Jacobi C, Dietrich T, Cursiefen C: *Das trockene Auge*. Ophthalmologie 2006, 103, 9-17.
4. Khalil H, Keizer R, Bodelier V: *Secretory IgA lysozyme in tears of patients with Graves ophthalmopathy*. Docum Ophthalmol 1989, 72, 329-334.
5. Boersma H, Van Bijsterveld O: *The lactoferrin test for the diagnosis of keratoconjunctivitis sicca in clinical practice*. Ann Ophthalmol 1987, 19, 152-154.
6. Saari K, Aine E, Posz A: *Lysozyme content of tears in normal subject and in patients with external eye infections*. Graefe's Arch for Clin and Experim Ophthalmol 1983, 221, 86-88.
7. Miniewicz W: *Ocena wpływu chemioterapii nowotworów złośliwych na narząd wzroku ze szczególnym uwzględnieniem oceny widzenia barwnego z zastosowaniem testu Farnswortha-Munsela 100-Hue w modyfikacji Smith Pokorny*. Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych, Biblioteka Główna Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 1999, sygn. R3336.
8. Krzakowski M: *Onkologia kliniczna*. Wydawnictwo Borgis, Warszawa, 2006, 164-178.
9. Doroshow J, Gershon G, Locker i wsp.: *Ocular irritation from high-dose methotrexate therapy: pharmacokinetics of drug in the tear film*. Cancer 1981, 48, 2158-2162.
10. Schmid K, Kornek G, Scheithauer W i wsp.: *Update on ocular complications of systemic cancer chemotherapy*. Surv Ophthalmol 2006, 51, 19-38.
11. Al-Tweigeri T, Nabholz J, Mackey J i wsp.: *Ocular toxicity and cancer chemotherapy*. Cancer 1996, 78, 1359-1373.
12. Vizek M, Oster M: *Ocular side effects of cancer chemotherapy*. Cancer 1982, 49, 1999-2002.
13. Eisman A, Flanagan J, Brooks A i wsp.: *Ocular surface, ocular adnexal and lacrimal complications associated with the use of systemic 5-fluorouracil*. Ophthal Plast Reconstr Surg 2003, 19, 216-224.

Praca wpłynęła do Redakcji 15.07.2011 r. (1314)

Zakwalifikowano do druku 31.12.2011 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

lek. med. Katarzyna Wojciechowska
Klinika Okulistyki i Rehabilitacji Wzrokowej
ul. Żeromskiego 113
90-549 Łódź
email: kasia2w@poczta.onet.pl

Polskie Towarzystwo Okulistyczne

e-mail: pto@pto.com.pl