

Sławomir A Pancewicz¹, Elżbieta Skrzydlewska²,
Teresa Hermanowska-Szpakowicz¹, Anna Stankiewicz², Anna Śniecińska²
Maciej Kondrusik¹, Joanna Zajkowska¹, Renata Świerbińska¹

STĘŻENIE WITAMIN A, E ORAZ C W SUROWICY KRWI OSÓB
POSIADAJĄCYCH PRZECIWCIAŁA PRZECIWKO
BORRELIA BURGDORFERI – BEZ OBJAWÓW ZAKAŻENIA
– DONIESIENIE WSTĘPNE

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji AMB
Kierownik: Teresa Hermanowska-Szpakowicz
²Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej AMB
Kierownik: Elżbieta Skrzydlewska

U 117 leśników w surowicy krwi oznaczano stężenie witamin A, E i C. Stwierdzono znamienne niższe stężenia witaminy A i E w surowicy krwi osób posiadających przeciwciała przeciwko B. burgdorferi. Najniższe stężenie tej witaminy stwierdzono u osób posiadających jednocześnie przeciwciała IgM i IgG. Natomiast stężenie witaminy C w surowicy krwi osób serologicznie dodatnich nie różniło się istotnie w porównaniu z osobami serologicznie ujemnymi. Uzyskane wstępne wyniki sugerują, iż stężenie witamin A i E w surowicy krwi osób zakażonych krętkiem B. burgdorferi może mieć wpływ na rozwój choroby z Lyme.

Słowa kluczowe: borelioza z Lyme, Borrelia burgdorferi, witamina A, witamina E, witamina C

Key words: Lyme borreliosis, Borrelia burgdorferi, vitamin A, vitamin E, vitamin C

WSTĘP

Borelioza z Lyme (krętkowica kleszczowa, Lyme disease, Lyme borreliosis) jest przewlekłą, wieloukładową chorobą odzwierzęcą, przenoszoną przez kleszcze, wywołaną przez krętek *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* określanych jako *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Wywołują boreliozę u ludzi, ssaków i ptaków, z tym że *B. afzelii* najczęściej bywa wykrywana u gryzoni a *B. garinii* u ptaków (1). Symptomatologia boreliozy z Lyme jest bardzo bogata. Choroba może powodować wielosystemowe uszkodzenia różnych narządów i układów. Najczęściej rozpoznawanymi postaciami boreliozy z Lyme są rumień wędrujący, zapalenie stawów oraz neuroborelioza (1,2).

Naturę zakażenia krętkiem *B. burgdorferi* i sposób w jaki się ono objawia determinują liczne czynniki zależne zarówno od samego patogenu, jak i zakażonego organizmu. Podkreśla się między innymi zróżnicowaną wrażliwość na zakażenie, różną zdolność do elimi-

nacji bakterii przez mechanizmy obronne gospodarza jak również wpływ odpowiedzi immunologicznej na rozwój procesów patologicznych (2). Nieliczne prace wskazują na udział witamin w rozwoju choroby z Lyme (3,4).

Celem pracy była ocena stężenia witamin A, E i C u pracowników nadleśnictwa zakażonych krętkiem *B. burgdorferi*.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 117 pracowników nadleśnictw północno-wschodniej Polski. U 39 ze 117 badanych pracowników nadleśnictwa w wieku od 15 do 56 lat ($x = 40,97$) nie stwierdzono obecności w surowicy krwi przeciwciał przeciw *B. burgdorferi*. Osoby serologicznie ujemne wyodrębniono jako grupę kontrolną (grupa 1). W grupie 78 osób (grupa 2) w wieku od 18-63 ($x = 43,07$) lat, stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał przeciw *B. burgdorferi*. Wśród nich u 13 stwierdzono obecność przeciwciał IgM, u 42 obecność przeciwciał IgG i u 23 osób przeciwciała IgM+ IgG. Przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* w klasie IgM i IgG w surowicy krwi wykrywano stosując test immunoenzymatyczny ELISA, przy użyciu zestawu *Borrelia recombinant IgM i IgG*, firmy Biomedica (Austria). W chwili badania żadna z osób nie wykazywała objawów zakażenia krętkiem *Borrelia burgdorferi*, ani objawów klinicznych późnego stadium boreliozy. Stężenie witamin: A i E w surowicy krwi oznaczano metodą RP-HPLC z detekcją spektrofotometryczną metodą *De Leenheer* i wsp. w modyfikacji *Vatassery* i wsp., a kwasu askorbinowego metodą RP-HPLS z detekcją spektrofotometryczną wg *Ivanovic* i wsp. (5,6,7). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem pakietu statystycznego Statistica 6,0 PL 9. W obliczeniach przyjęto poziom istotności $p < 0,05$ jako znamienne statystycznie.

WYNIKI

W grupie kontrolnej (grupa 1) stężenie witamin wynosiło: witaminy A od 0,59 do 2,74 $\mu\text{M/l}$ ($x = 1,6 \mu\text{M/l}$); witaminy E od 15,62 – 30,17 $\mu\text{M/l}$ ($x = 23,63 \mu\text{M/l}$) i witaminy C od 71,27 do 114,36 $\mu\text{M/l}$ ($x = 87,72 \mu\text{M/l}$) (tab I).

Stężenie witaminy A w grupie 78 pracowników posiadających w surowicy krwi przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* było znamienne niższe niż w grupie 1 i wynosiło od 0,03 do 2,74 $\mu\text{M/l}$ ($x = 1,41 \mu\text{M/l}$). Wśród 13 osób, u których stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał w klasie IgM stężenie witaminy A ($x = 1,62 \mu\text{M/l}$) nie różniło się istotnie w porównaniu z grupa kontrolną ($x = 1,6 \mu\text{M/l}$). Natomiast stężenie witaminy A w grupie osób posiadających przeciwciała IgG ($x = 1,26 \mu\text{M/l}$) lub IgM+IgG ($x = 1,22 \mu\text{M/l}$) było znamienne niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem witaminy A a wiekiem badanych osób (tab I).

Stężenie witaminy E w grupie 78 osób mających przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* było znamienne niższe niż w grupie 1 i wynosiło od 10,03 do 32,10 $\mu\text{M/l}$ ($x = 20,87 \mu\text{M/l}$). Wśród 13 osób posiadających przeciwciała w klasie IgM jej stężenie ($x = 18,73 \mu\text{M/l}$) było znamienne niższe w porównaniu z grupa kontrolną ($x = 23,63 \mu\text{M/l}$). Także w grupie osób posiadających przeciwciała w klasie IgG ($x = 20,09 \mu\text{M/l}$) lub IgM+IgG ($x = 18,81 \mu\text{M/l}$) było ono znamienne niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano zależności między stężeniem witaminy E w surowicy krwi a wiekiem badanych osób (tab. I).

Tabela I. Stężenie witamin w surowicy krwi badanych osób i analiza korelacji pomiędzy stężeniem witamin a wiekiem badanych.
 Table I. Vitamin serum concentration of analysed patients and analysis of correlations between vitamin concentration and age of patients

	Wiek		Vit.A µMm/L			Vit E µM/L			Vit C µM/L			Grupa 1 vs Grupa 2			Wiek vs stężenie witamin			
	Min-max	\bar{x}	SD	Min-max	\bar{x}	SD	Min-max	\bar{x}	SD	Min-max	\bar{x}	SD	Vit.A p=	Vit.E p=	Vit.C p=	Vit.A p=	Vit.E p=	Vit.C p=
	Grupa 1 n = 39																	
	15-56	40,97	9,89	0,59-2,74	1,6	0,552	15,62-30,17	23,63	4,49	71,27-114,36	87,72	8,99						
	Grupa 2 n = 78																	
	15-63	43,07	10,11															
IgM n=13					1,62	0,55		18,73	3,65		85,37	13,07	0,833	0,001*↓	0,850			
IgG n=42					1,26	0,53		20,09	4,95		88,19	9,87	0,014*	0,001*↓	0,850			
IgM+G n=23					1,22	0,58		18,81	4,01		88,05	19,90	0,009*↓	0,0002*↓	0,394			
Razem n=78				0,03-2,74	1,41	0,57	10,03-32,10	20,87	4,88	12,02-119,04	87,69	12,42	0,013*↓	0,00001*↓	0,815	0,2	0,114	0,191

* istotność statystyczna $p < 0,05$ – statistical significance
 ↓ obniżenie stężenia witamin – decrease concentrations of vitamins

Stężenie witaminy C w grupie 78 osób, u których stwierdzono przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* wynosiło od 12,02-119,04 $\mu\text{M/l}$ ($x = 87,69 \mu\text{M/l}$) i nie różniło się istotnie od jej stężenia wykazanego w grupie kontrolnej ($x = 87,72 \mu\text{M/l}$). Również stężenie witaminy C w grupie 13 osób posiadających przeciwciała w klasie IgM ($x = 85,37 \mu\text{M/l}$), przeciwciała IgG ($x = 88,19 \mu\text{M/l}$) oraz IgM+IgG ($x = 88,05 \mu\text{M/l}$) nie różniło się znamienne w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem witaminy C w surowicy krwi a wiekiem badanych osób (tab. I).

DYSKUSJA

System immunologiczny chroni człowieka przed różnymi czynnikami zakaźnymi: bakteriami, grzybami, wirusami i pasożytami. Stan odżywienia jest ważnym czynnikiem przyczyniającym się do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Sugeruje się, że niedobór aminokwasów, mikroelementów: głównie cynku (Zn), miedzi (Cu), żelaza (Fe), seleniu (Se), kwasu foliowego, witamin: B6, B12, C, E, A i E powoduje osłabienie funkcjonowania układu immunologicznego i może być przyczyną zwiększonej wrażliwości na zakażenie jak również zwiększać ryzyko zachorowań na niektóre choroby nowotworowe (8,9,10,11,12). *Flecher* i wsp. w badaniu, które objęło 1214 osób w wieku od 75 do 84 lat, nie wykazali wpływu stężenia w surowicy krwi antyoksydantów (alfa-tokoferolu, beta-karotenu i retinolu) na umieralność w badanej populacji. Wykazali, że stężenie witaminy C w badanej populacji było obniżone i jedynie stężenie tej witaminy korelowało ze wskaźnikiem umieralności w badanej populacji (13).

Witamina A jest niezbędna do prawidłowego różnicowania tkanek, nabłonków, procesów reprodukcji, mielinizacji, widzenia oraz prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Brak jej w organizmie wynika najczęściej z niedoborów pokarmowych i wiąże się ze zwiększoną podatnością na choroby zakaźne (7,8,12). Niedobór witaminy A indukuje i nasila proces zapalny (4). Witamina A bierze również udział w procesach obronnych przed działaniem reaktywnych form tlenu (10,11). Podawanie witaminy A może powodować zmniejszenie stanu zapalnego poprzez jej wpływ na układ immunologiczny i wpływ na integralność nabłonków. *Cantorna* i wsp. wykazali, że niedobór witaminy A u myszy zakażonych krętkiem *B. burgdorferi*, korelował z ciężkością przebiegu zapalenia stawów. Stwierdzono, iż u myszy mających najniższe stężenie retinolu zapalenie stawów rozwijało się wcześniej i przebiegało ciężiej niż u myszy mających najwyższe stężenie witaminy A. Można więc sądzić, iż witamina A może łagodzić ostre zapalenie stawów (4).

Przeprowadzone własne badania są zgodne z obserwacjami *Cantorny* i wsp. W grupie osób wykazujących w surowicy krwi obecność przeciwciał przeciwko krętkom *B. burgdorferi* wykazano znamienne obniżenie stężenia witaminy A w porównaniu z grupą kontrolną. Najniższe stężenie stwierdzono w grupie osób posiadających w surowicy zarówno przeciwciała w klasie IgM jak i IgG. Jedynie u osób mających przeciwciała klasy IgM stężenie witaminy A było porównywalne do stężenia u osób niezakażonych krętkiem *B. burgdorferi*. Może to sugerować, że zakażenie krętkiem *B. burgdorferi* powoduje stopniowe obniżanie się stężenia witaminy A w organizmie. Może to wskazywać, że powstający niedobór witaminy A jest jednym z czynników sprzyjających rozwojowi boreliozy z Lyme.

Witamina E – α -tokoferol jest najważniejszym fizjologicznym antyoksydantem hydrofobowym chroniącym błony komórkowe. Witamina E hamując utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest stabilizatorem błon komórkowych i lizosomalnych. U człowieka niedobór witaminy E powoduje skrócenie czasu życia erytrocytów, zaburzenia neurologiczne i choroby mięśni oraz zaburzenia funkcjonalne układu odpornościowego, a dynamika stanu redukcyjno-oksydacyjnego witaminy E w błonach biologicznych obrazuje stres oksydacyjny będący konsekwencją wielu procesów chorobowych. (9,11,14,15) Witamina E zapobiega peroksydacji lipidów i rozwojowi miażdżycy tętnic. *Panczenko-Kresówka* i wsp. stwierdzili, iż suplementacja witaminami antyoksydacyjnymi: C, A i E, chorych z niedokrwienna chorobą serca obniża stężenie nadtlenków lipidów we krwi, co świadczyło o spowolnieniu procesów peroksydacji lipidów i wpływało korzystnie na przebieg choroby (16). W uzyskanych wynikach zwraca uwagę znamienne niższe stężenie witaminy E w surowicy krwi osób posiadających przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* w porównaniu z grupą kontrolną. Najniższe średnie stężenie witaminy E wykazano u pracowników mających przeciwciała klasy IgM a najwyższe u osób posiadających przeciwciała klasy IgG. Może to sugerować, że zakażenie krętkiem *B. burgdorferi* jest przyczyną obniżenia stężenia witaminy E w organizmie i to obniżone stężenie utrzymuje się przez długi czas. Może to wskazywać na udział witaminy E w rozwoju boreliozy z Lyme.

Witamina C jest transportowana do wnętrza większości komórek jako kwas askorbinowy lub w formie utlenionej jako dehydroascorbinian (DHA), który jest następnie szybko redukowany i jako askorbinian (witamina C) gromadzony w komórce. Witamina C jest uważana za ważny antyoksydant płynów pozakomórkowych w organizmie, jak również istotny dla ochrony antyoksydacyjnej wewnątrz komórek. Jest kofaktorem enzymów zaangażowanych w syntezę kolagenu, nurotransmitterów i karnityny (17,18). Uważa się, że witamina C zmniejsza stres oksydacyjny, blokuje peroksydację lipidów i poprawia funkcje immunologiczne komórek (11). Spełnia również rolę modulatora cytokinowej ścieżki przenoszenia sygnału. *Bowie i O'Neill* wykazali, że witamina C hamuje zależną od TNF aktywację NF-kappa B (19). *Cárnamo* i wsp. stwierdzili, że witamina ta hamuje ścieżkę przenoszenia sygnału indukowaną przez GM-CSF, IL-3 i IL-5. Wewnątrzkomórkowe stężenie witaminy C wpływa również na inne funkcje GM-CSF, np. GM-CSF jest prozapalną cytokiną odgrywającą istotną rolę w reumatoidalnym zapaleniu stawów, tak więc hamując GM-CSF witamina C pełni rolę czynnika przeciwzapalnego (20).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, iż stężenie witaminy C u osób posiadających przeciwciała w klasie IgM i IgG przeciwko *B. burgdorferi* nie różniła się istotnie od jej stężenia w grupie kontrolnej. Chociaż stężenie witaminy C u osób z obecnością przeciwciał w klasie IgM, a więc we wczesnej fazie zakażenia krętkiem, były niższe ($x = 85,37 \mu\text{M/l}$) niż w grupie kontrolnej ($87,72 \mu\text{M/l}$), to ten spadek stężenia witaminy C nie wykazywał znamienności statystycznej.

Przeprowadzone wstępne badania wskazują, że zakażenie krętkiem *B. burgdorferi* może powodować obniżenie stężenia witamin A i E w surowicy krwi badanych, utrzymujące się jeszcze w późnej fazie zakażenia, nie ma natomiast wpływu na stężenie witaminy C.

WNIOSKI

1. Wykazano znamienne niższe stężenia witaminy A w surowicy krwi osób zakażonych krętkiem *B. burgdorferi*. Najniższe stężenie tej witaminy stwierdzono u osób posiadających w surowicy krwi jednocześnie przeciwciała klasy IgM i IgG.
2. W surowicy krwi osób zakażonych krętkiem *B. burgdorferi* stwierdzono znamienne niższe stężenie witaminy E w porównaniu z grupą kontrolną. Najniższe jej stężenie wykazano we wczesnej fazie zakażenia.
3. Stężenie witaminy C w surowicy krwi osób zakażonych krętkiem *B. burgdorferi* nie różniło się istotnie od jej stężenia w surowicy krwi osób zdrowych.
4. Uzyskane wstępne wyniki sugerują, iż stężenie witamin A i E w surowicy krwi osób zakażonych krętkiem *B. burgdorferi* może mieć wpływ na rozwój choroby z Lyme.

S Pancewicz, E Skrzydlewska, T Hermanowska-Szapkowicz, A Stankiewicz, M Kondrusik, M Zajkowska, S Grygorczuk

VITAMIN A, E AND C SERUM CONCENTRATION OF PATIENTS SHOWING ANTIBODIES ANTI-BORRELLIA BURGDORFERI PRESENCE – NON-SYMPTOMATIC CARRIERS

SUMMARY

To estimate vitamin A, E and C serum concentrations among forestry workers showing antibodies against *Borrelia burgdorferi* presence.

Vitamins A, E and C concentrations were evaluated in 117 sera of forestry workers. 78 persons aged 18-63 ($x=43.07$) showed antibodies against *Borrelia burgdorferi* presence. In this group 13 persons showed presence of IgM, 42 persons with IgG and 23 with IgM and IgG. Control group consisted of 39 persons aged 18–56 years ($x=40.97$), with no detectable anti-Borrelia burgdorferi antibodies in serum. Serologic diagnosis was performed with use of ELISA kit - Borrelia rekombinat IgM, IgG (Biomedica, Austria). Vitamins A and E serum concentrations were detected by RP-HPLC method with spectrophotometric detection (De Leenheet and co.). Vitamin C was detected by RP-HPLS method with spectrophotometric method (Ivanovic and co.). Obtained results were statistically analysed.

Significantly lower of vitamin A and E serum concentration of persons with anti-borrelia antibodies presence. The lowest concentration was observed in group showing presence of IgM and IgG. No significant difference in vitamin C serum concentration in examined groups was observed.

These results may suggest that low serum concentrations of vitamin A and E may have influence on *Borrelia burgdorferi* infection development.

PIŚMIENNICTWO

1. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999;12:633-53.
2. Sigal LH. Lyme disease: A review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. Ann Rev Immunol 1997;15:63-92.
3. Cantorna MT, Hayes CE. Vitamin A deficiency exacerbates murine Lyme arthritis. J Infect Dis 1996;174:747-51.

4. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine model of human arthritis. *J Nutrition* 1998;128:68-72.
5. De Leenheer A, De Bevere V, De Ruyter M.G, i in. Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC. *J Chromatogr* 1979;11:350-357.
6. Vatassery GT, Brin MF, Fahn S, i in. Effect of high doses of dietary vitamin E on the concentration of vitamin E in several brain regions, plasma, liver and adipose tissue of rats. *J Neurochem* 1988;51:621-623.
7. Ivanovic D, Popvic A, Radulovic D, i in. Reversed phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamin in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 1999;18:999-1004.
8. Armeni T, Principato G, Quiles JL, i in. Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction—two different ways of modulating stress. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35(2):181-91.
9. Chau N, Tebi A, Creton C, Belbraouet S, i in. Relationship between plasma retinol and infectious diseases the elderly. A case-control study. *Ann Nutr Metab* 2000; 44: 256-62.
10. Ito Y, Wakai K, Suzuki K, i in. JACC Study Group. Serum carotenoids and mortality from lung cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort (JACC) study. *Cancer Sci* 2003;94(1):57-63.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; 1999.
12. Villamor E, Mbise R, Spiegelman D, i in. Witamin A supplements ameliorate the adverse effect of HIV, malaria and diarrheal infection on child growth. *Pediatrics* 2002;109:E6.
13. Fletcher AE, Breeze E, Shetty PS Antioxidant vitamins and mortality in older persons: findings from the nutrition add-on study to the Medical Research Council Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(5):999-1010.
14. Noaman E, Zahran AM, Kamal AM, Omran MF. Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defense system: biochemical assessment and modification. *Biol Trace Elem Res* 2002;86(1):55-64.
15. Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, i in. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control* 2003;14(6):513-8.
16. Panczenko-Kresowska B, Ziemiański S, Rudnicki S, i in. Wpływ witamin C i E oraz β -karotenu na procesy peroksydacyjne u osób z niedokrwioną chorobą serca. *Pol Merk Lek* 1998;4:12-15.
17. Rumsey Sc, Daruwala R, Al.-Hasani H, i in. Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275: 28246-253.
18. Washko PW, Yachui W, Levinet M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 1993;268:15531-35.
19. Bowie AG, O'Neill LA. Vitamin C inhibits Nf-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2000;165:7180-88.
20. Cárcamo JM, Bórquez-Ojeda O, Golde DW. Vitamin C inhibits granulocyte macrophage-colony-stimulating factor-induced signaling pathways. *Blood* 2002;99:3205-12.

Otrzymano: 30.09.2004 r.

Adres autorów:

Dr hab. Sławomir A Pancewicz
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Akademii Medycznej w Białymstoku
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok
(85) 740 95 14