

Dominik Strzelecki, Jolanta Rabe-Jabłońska

Zmiana parametrów elektrookulograficznych u chorych na schizofrenię leczonych glicyną. Wyniki prospektywnego badania otwartego

A change of electro-oculographic parameters in patients with schizophrenia treated with glycine. Data from prospective open-label study

Klinika Zaburzeń Afektywnych i Psychotycznych, I Katedra Psychiatrii UM w Łodzi. Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Rabe-Jabłońska
Correspondence to: Dr n. med. Dominik Strzelecki, Centralny Szpital Kliniczny, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 042 675 72 13, faks: 042 675 74 03, e-mail: strzeleckidomin@poczta.onet.pl

Manuskrypt wysłany do publikacji opracowano na podstawie badania zaakceptowanego przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przeprowadzonego zgodnie ze standardami Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku.

Manuscripts submitted for publication have been reviewed by the Ethics Committee of Medical University of Lodz and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Glicyna jest niekompetycyjnym koagonistą receptora NMDA, jonotropowego receptora układu glutaminianergicznego. W licznych badaniach wykazano jej korzystny wpływ na pierwotne objawy negatywne schizofrenii. Główna hipoteza badawcza zakłada związek między objawami negatywnymi schizofrenii a zaburzeniami ruchów gałek ocznych. **Celem pracy** była ocena zmiany w zakresie ruchów gałek ocznych wskutek dołączenia glicyny w dawce 0,8 g/kg m.c./dobę *per os* do dotychczasowego leczenia lekami przeciwpsychotycznymi. **Material i metody:** Dwudziestu ośmiu chorych na schizofrenię z dominującymi objawami negatywnymi ukończyło 6-tygodniowe prospektywne badanie typu otwartego, podczas którego podawano im doustnie glicynę (maksymalnie 60 g/dobę). Na początku i końcu badania wykonano pacjentom badania ruchów gałek ocznych (testy śledzenia, sakadowy i antysakadowy) oraz dokonano oceny nasilenia objawów schizofrenii przy pomocy PANSS. **Wyniki:** Po 6-tygodniowym okresie stosowania glicyny obserwowano istotne zmniejszenie liczby popełnianych błędów w teście antysakadowym ($p < 0,05$). Ponadto odnotowano istnienie korelacji między poprawą wyników w teście antysakadowym a nasileniem objawów negatywnych w badanej grupie ($p < 0,05$). Zaobserwowano istotną poprawę współczynnika nadążania przy prędkości obiektu 29°/s. **Wnioski:** Glicyna w zastosowanej dawce może korzystnie wpływać na ruchy gałek ocznych wyraźnie zaburzone w schizofrenii, co zdaje się potwierdzać z jednej strony powiązanie objawów negatywnych z patologią okoruchową, z drugiej zaś korzystne działanie glicyny na objawy negatywne wyrażone poprzez mniejszą liczbę błędów w teście antysakadowym.

Słowa kluczowe: schizofrenia, objawy negatywne, glicyna, układ glutaminianergiczny, test antysakadowy, testy elektrookulograficzne

Summary

Glycine is a noncompetitive co-agonist of NMDA receptor, ionotropic receptor of glutamatergic brain system. Numerous studies indicated its advantageous effects on the primary negative symptoms of schizophrenia. The main research hypothesis assumes a correlation between negative symptoms of schizophrenia and eye movement abnormalities. The article is aimed at evaluation of a change within eye movements in result of glycine at a dose of 0.8 g/kg bm/day *per os* added to the hitherto applied treatment with antipsychotics. **Material and methods:** Twenty eight patients with schizophrenia with predominant negative symptoms completed a 6-week prospective open-label study, during which they were given glycine *per os* (no more than 60 g/24 h). At the beginning and at the end of the study the patients had

their eye movements tested (eye pursuit tracking, saccadic and antisaccadic tasks) and the changes of schizophrenia symptoms was evaluated using PANSS. **Results:** After 6-weeks' use of glycine, a significant decrease in the number of errors in antisaccadic task was observed ($p < 0.05$). Moreover there is a correlation between an improvement of results in antisaccadic task (fewer errors) and amelioration of negative symptomatology in the examined group after use of glycine ($p < 0.05$). A significant improvement of the gain at the object's speed of 29°/s was also observed. **Conclusions:** Glycine in the applied dose may advantageously affect the eye movements, clearly disturbed in schizophrenia, which seems to confirm on the one hand the correlation of negative symptoms with oculomotor pathology, on the other hand – advantageous effects of glycine on negative symptoms expressed by a lower number of errors in antisaccadic task.

Key words: schizophrenia, negative symptoms, glycine, glutamatergic system, antisaccadic task, electro-oculographic test

ZABURZENIA RUCHÓW GAŁEK OCZNYCH W SCHIZOFRENII

Na występowanie zaburzeń ruchów gałek ocznych u pacjentów chorujących na schizofrenię zwrócono uwagę już na początku ubiegłego stulecia. Pierwsza publikacja dotycząca tej problematyki pochodzi z 1908 roku⁽¹⁾. Obecne poszukiwania koncentrują się na ustaleniu, które układy neuroprzekaźnikowe oraz okolice mózgu są odpowiedzialne za te nieprawidłowości. Próbuje się ponadto łączyć obecność zaburzeń okoruchowych z poszczególnymi grupami objawów psychozy (np. negatywnymi, poznawczymi). W latach 70. XX wieku zaproponowano traktowanie zaburzeń płynnych ruchów gałek ocznych jako marker schizofrenii (występują u 40-80% chorych). Stanowisko to nie uzyskało powszechnej akceptacji, ponieważ zaobserwowano obecność zaburzeń ruchów gałek ocznych u zdrowych klinicznie krewnych osób ze schizofrenią (25-40%), co wskazuje na genetyczne uwarunkowanie zjawiska, jednocześnie wykluczając swoistość objawu dla samej tylko schizofrenii⁽²⁾. Co więcej, zaburzenia okoruchowe o podobnej charakterystyce opisano także u części chorych z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej, a nawet w populacji osób zdrowych (do 10%)^(3,4).

Za utrzymywanie obrazu obiektu w dołku centralnym plamki żółtej siatkówki odpowiedzialne są dwa współpracujące ze sobą ruchy gałki ocznej:

1. płynny ruch śledzenia (*smooth pursuit movements*), precyzyjnie i płynnie naprowadzający obraz obiektu na plamkę;
2. skokowy ruch sakadowy (*saccadic movements*), umożliwiający szybkie umieszczenie obrazu na plamce.

Podstawowym ruchem u osób zdrowych jest ruch śledzenia, w schizofrenii obserwuje się jego znaczne upośledzenie. Zmniejszony jest również stosunek prędkości ruchu oka do prędkości obiektu (współczynnik nadążania – WN, ang. *gain*). Zaburzenia obserwuje się podczas śledzenia poruszającego się przedmiotu (zwolnienie ruchu śledzenia i jego sakadyzacja) oraz podczas testu sakadowego przy fiksacji na nagle pojawiającym się obiekcie pozostającym w bezruchu^(5,6). Z pogłębionych obserwacji wynika, iż zaburzenia okoruchowe w największym stopniu korelują z nasileniem pierwotnych (nie wtórnych) objawów negatywnych psychozy, co związane jest z osłabionymi funkcjami kognitywnymi, pamięcią operacyjną, a także funkcjami wykonawczymi. U 73% badanych z wyraźnymi nieprawidłowościami w teście antysakadowym opisano zaniki

EYE MOVEMENT ABNORMALITIES IN SCHIZOPHRENIA

The occurrence of eye movement abnormalities in patients with schizophrenia was indicated as early as at the beginning of the last century. The first publication on this issue comes from 1908⁽¹⁾. The current search is focused on establishing which neurotransmitter systems and brain areas account for such changes. Furthermore, some attempts are made at associating the presence of oculomotor disturbances with individual groups of psychosis symptoms (e.g. negative, cognitive). During the 70's of the 20th century it was suggested that smooth eye movement disorders be treated as a marker of schizophrenia (they occur in 40-80% of patients). This approach was not widely accepted because the presence of eye movement disorders was observed in clinically healthy relatives of patients with schizophrenia (25-40%), which points to genetically conditioned phenomena, simultaneously excluding the specificity of the symptom for schizophrenia itself⁽²⁾. Moreover, oculomotor disorders bearing similar characteristics were described also in patients with diagnosed bipolar affective disease, and even in healthy population (up to 10%)^(3,4).

The following two synergic eye movements account for the maintenance of the object's image in the central fovea of the retinal macula lutea:

1. smooth pursuit movements, precisely and smoothly leading the object's image onto the macula lutea;
2. saccadic movements enabling a fast placement of the image on the macula lutea.

The basic movement in healthy persons is the pursuit movement. In schizophrenia, it is found to be considerably impaired. The ratio of the eye movement speed to the object's speed (gain) is also disturbed. The disorders are observed while pursuing the moving object (slowed down pursuit movement and its saccadization) as well as during the saccadic task at fixation on the suddenly appearing stationary object^(5,6). More extensive observations indicate that oculomotor abnormalities are most strongly correlated with the increase of primary (not secondary) negative symptoms of psychosis, which is associated with decreased cognitive functions, working memory, as well as executory functions. In 73% of patients with evident changes in antisaccade task, some atrophies within the frontal cortex were described in

w obrębie kory czołowej w badaniu tomograficznym^(7,8). Bardziej nasilone nieprawidłowości dotyczą ruchów oka prawego, co jest wyrazem zaburzeń lateralizacji mózgowej występujących w schizofrenii. Wraz z postępem choroby obserwowane jest pogłębianie się zaburzeń okoruchowych⁽⁹⁾. Powszechnie uważa się, że wiąże się to z narastaniem tzw. deficytu związanego z istotą schizofrenii, nie zaś ze stosowaniem leków przeciwpsychotycznych.

Dysfunkcja płatów czołowych jest w świetle obecnej wiedzy odpowiedzialna za obecność objawów negatywnych schizofrenii, jak również zaburzeń ruchów gałek ocznych. Korzystając z powyższych obserwacji, podejmuje się próby wielopłaszczyznowego spojrzenia na symptomatologię schizofrenii, także z wykorzystaniem badań neurofizjologicznych. Dzięki temu można, jak się wydaje, lepiej ocenić nasilenie objawów negatywnych i monitorować zmiany w ich nasileniu, np. wskutek podjętego leczenia.

WPLYW LEKÓW PRZECIWPSCYCHOTYCZNYCH NA RUCHY GAŁEK OCZNYCH

Pierwsze badania w tym zakresie dotyczą klasycznych neuroleptyków (KN). Ich wyniki skłaniały do przyjęcia tezy o niewielkim wpływie leków przeciwpsychotycznych na zaburzenia okoruchowe u chorych na schizofrenię⁽⁹⁻¹²⁾. KN mogą również upośledzać wykonywanie testu^(13,14), np. poprzez wpływ antycholinergiczny. Wraz z wprowadzeniem do leczenia leków przeciwpsychotycznych II generacji (LPIIG) założenie to powoli ewoluuje⁽¹⁵⁾. Dostępne są pierwsze wyniki badań sugerujące pozytywny wpływ LPIIG i zmniejszenie liczby nieprawidłowości w badaniach neurofizjologicznych. Za wyjątkowo czułe narzędzie badawcze w tym zakresie uznaje się test antysakadowy⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Ostatnie doniesienia mówią o korzystniejszym wpływie LPIIG, szczególnie rysperydonu^(12,16), co tłumaczy się jego antagonistycznym działaniem na receptor 5-HT₂ i pośrednio na przekaznictwo dopaminergiczne w obrębie kory przedczołowej oraz słabymi właściwościami antycholinergicznymi. Nieco mniej korzystne efekty przynosić ma stosowanie olanzapiny^(16,19).

POSTULOWANA ROLA GLICYNY W NORMALIZACJI RUCHÓW GAŁEK OCZNYCH U PACJENTÓW CHORUJĄCYCH NA SCHIZOFRENIĘ

Zgodnie z teoretycznymi założeniami hipoglutaminianergicznej (albo hipoNMDA) hipotezy schizofrenii⁽²⁰⁾ podjęto próby stymulacji transmisji w obrębie tego układu⁽²¹⁾. Z uwagi na wysokie ryzyko wywołania efektu cytotoksycznego nie stosuje się terapii kwasem glutaminowym (nadaktywność układu glutaminianergicznego, prowadzącą do uszkodzenia komórek nerwowych, zaobserwowano w chorobach neurodegeneracyjnych⁽²²⁾). Do spowodowania pobudzenia poprzez receptor NMDA prócz obecności kwasu glutaminowego i zmiany napięcia błonowego niezbędna jest glicyna⁽²³⁾. Jest to aminokwas o najprostszej budowie i szerokim rozpowszechnieniu. Będąc podstawowym

MRI^(7,8). More severe changes are found in the right eye movements, which points to lateralization abnormalities occurring in schizophrenia. While the disease progresses, the oculomotor disorders become more severe⁽⁹⁾. Admittedly, this is related to an increased deficit connected with the brain changes in schizophrenia and not with the use of antipsychotics.

According to the current knowledge, the frontal lobes dysfunction accounts for the presence of negative symptoms of schizophrenia, as well as abnormalities of eye movements. Basing on the above observations, some attempts of multiplanar approach to schizophrenia symptomatology are made, also using neurophysiological studies. Therefore, as it seems, we should better evaluate an increase of negative symptoms and monitor the changes in their increase, e.g. in result of the undertaken treatment.

THE EFFECTS OF ANTIPSYCHOTICS ON EYE MOVEMENTS

The first studies on this issue refer to typical neuroleptics (TN). Their results inclined us to adopt a thesis about a slight impact of antipsychotics on oculomotor disorders in patients with schizophrenia⁽⁹⁻¹²⁾. TN may also impair the performance of task^(13,14), e.g. by anticholinergic effects. Along with introduction of atypical antipsychotics (AAP), this assumption slowly evolves⁽¹⁵⁾. The first available results of studies imply a positive impact of AAP and better outcome in neurophysiological examinations. An exceptionally sensitive research device in his area is the antisaccadic task⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Recent reports enhance a more advantageous impact of AAP, especially risperidone^(12,16), which is accounted for by its antagonistic effects on receptor 5-HT₂ and indirectly on dopaminergic transmission within the prefrontal cortex and poor anticholinergic properties. Somewhat less advantageous effects are those of olanzapine^(16,19).

POSTULATED ROLE OF GLYCINE IN NORMALISATION OF EYE MOVEMENTS IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

Pursuant to theoretical assumptions of hypoglutamatergic (or hipoNMDA) hypothesis of schizophrenia⁽²⁰⁾, some attempts were made to normalise glutamatergic transmission⁽²¹⁾. Due to a high risk of inducing cytotoxic effects, no therapy with glutamic acid is applied (hyperactivity of glutamatergic system, leading to excitotoxicity and neuron damage is observed in neurodegenerative diseases⁽²²⁾).

To induce stimulation through NMDA receptor, apart from glutamic acid and a change of membranous tension, glycine is needed⁽²³⁾. This amino acid is characterised by the simplest structure and extensive prevalence. As the basic transmitter of glycinergic neurons, it belongs to typical neurotransmitters. Furthermore, it fulfils the function of co-agonist and modulator, among others within the glutamatergic system.

Modulator places of receptor NMDA *in vivo* are not completely saturated with glycine, and augmentation increasing

przebiegiem neuronów glicynergicznych, zaliczany jest do klasy I neurotransmiterów. Pełni ponadto funkcję koagonisty i modulatora, m.in. w obrębie układu glutaminianergicznego. Miejsca modulatorowe receptora NMDA *in vivo* nie są w pełni wysycane glicyną, a augmentacja zwiększająca to wysycenie powoduje pożądany wzrost transmisji glutaminianergicznej. W dotąd opublikowanych badaniach zwrócono uwagę na korzystny wpływ działania glicyny na objawy występujące w schizofrenii, szczególnie zaś na objawy negatywne⁽²⁴⁾. Udokumentowano zmniejszenie nasilenia zaburzeń funkcji płatów czołowych osiągnięte poprzez zastosowanie glicyny, obserwowano bowiem zmniejszenie nasilenia objawów negatywnych. Korzystne wyniki badań elektrookulograficznych dodatkowo wspierałyby założenia teorii hipoglutaminianergicznej schizofrenii.

Ilości glicyny zawarte w przeciętnej diecie (ok. 2 g/dobę) nie mają wpływu na zwiększenie stężenia aminokwasu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Z kolei doustne podawanie wysokich dawek glicyny (nawet kilkadziesiąt gramów na dobę) powoduje wzrost jej stężenia w osoczu⁽²⁵⁾ oraz płynie mózgowo-rdzeniowym⁽²⁶⁾. Opisywana metoda terapeutyczna uznawana jest za bezpieczną, co potwierdziły badania kliniczne. Nawet maksymalne wysycenie receptora glicyną nie powoduje efektu cytotoxycznego. Ponadto glicyna nie powodowała wystąpienia objawów niepożądanych istotnie częściej niż placebo, jest dobrze tolerowana, także wtedy, gdy stosuje się ją długookresowo i w dużych dawkach⁽²⁴⁾.

MATERIAŁ I METODY

GRUPA BADANA (TABELA 1)

Do prospektywnego badania typu otwartego zakwalifikowano 32 chorych na schizofrenię (wg ICD-10) z dominującymi objawami negatywnymi. Dwadzieścia osiem osób uczestniczyło w projekcie do końca oraz miało wykonane badania elektrookulograficzne, tej grupy dotyczy dalsza analiza.

Najważniejszym kryterium kwalifikacyjnym (prócz odpowiedniej diagnozy psychiatrycznej) był stabilny stan psychiczny chorych oraz brak zmian leczenia przeciwpsychotycznego przez przynajmniej 3 miesiące (KN i/lub LPIIG), co ustalano w oparciu o dokumentację medyczną. Siedmiu pacjentów leczono KN (sulpiryd – 2, perazylna – 2, zyklopentyksol – 1, flupentyksol – 1, perfenazylna – 1), 14 pacjentów otrzymywało LPIIG (olanzapina – 5, rysperydon – 5, klozapina – 4), a 7 pa-

this saturation causes the desired increase in glutamatergic transmission. The hitherto published studies draw attention to advantageous effects of glycine on symptoms occurring in schizophrenia, especially on negative symptoms⁽²⁴⁾. In actually published studies normalisation of function of frontal lobes and decrease of negative symptoms due use of glycine was described. Advantageous results of electro-oculographic tests would additionally support assumptions of the hypoglutamatergic theory of schizophrenia.

The amounts of glycine contained in an average diet (approx. 2 g/day) do not contribute to an increase in the concentration of the amino acid in the cerebrospinal fluid.

On the other hand, the administration of high doses of glycine causes an increase of its concentration in plasma⁽²⁵⁾ and the cerebrospinal fluid⁽²⁶⁾. The described therapeutic method is regarded to be safe, as has been confirmed by clinical studies. Even the maximum saturation of receptor with glycine does not cause cytotoxic effects. Besides, glycine did not induce any adverse effects significantly more frequently than placebo, it is well tolerated even in long period terms and in high doses⁽²⁴⁾.

MATERIAL AND METHODS

EXAMINED GROUP (TABLE 1)

Thirty-two patients with schizophrenia (ICD-10) with predominant negative symptoms signed informed consent prior to their inclusion in the project and were qualified for the prospective study of an open type. Twenty-eight persons participated in the project till it was completed and underwent electro-oculographic tests, and this group was covered by the further analysis.

The most important qualifying criterion (apart from a respective psychiatric diagnosis) was the patients' stable mental status and antipsychotic treatment, which was not changed at least for 3 months which was established basing on the medical documentation. Seven patients were treated with TN (sulpiride – 2, perazine – 2, zuclopenthixol – 1, flupentixol – 1, perphenazine – 1), 14 patients with AAP (olanzapine – 5, risperidone – 5, clozapine – 4) and 7 patients with neuroleptics from both groups (olanzapine + sulpiride – 3, olanzapine + flupentixol – 2, olanzapine + perphenazine – 1, risperidone + haloperidol – 1). For 6 weeks the patients were given glycine *per os* at a dose of 0.8 g/kg bm/3 doses. All patients were aged be-

Parametr Parameter	Średnia Mean	Mediana Median	Zakres Range	SD
Wiek Age	32,32	29,5	20-50	8,82
Długość trwania psychozy Duration of psychosis	8,39	5,0	1,0-24,0	6,87
Ilość hospitalizacji Hospitalisations	2,28	2,0	0,0-6,0	1,46

Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy (n=28)

Table 1. Characteristics of study group (n=28)

cientów przyjmowało leki z obu grup (olanzapina + sulpiryd – 3, olanzapina + flupentysol – 2, olanzapina + perfenazy-na – 1, rysperydon + haloperidol – 1). Przez 6 tygodni pacjenci przyjmowali glicynę doustnie – 0,8 g/kg m.c. w 3 dawkach podzielonych. Wiek żadnej z badanych osób nie przekraczał 50 lat, uniknięto dzięki temu wpływu procesów starzenia się na ruchy gałek ocznych. Podczas wizyt 2 tygodnie przed i po podawaniu glicyny dodatkowo obserwowano stan psychiczny pacjentów. Badania elektrookulograficzne przeprowadzano dwukrotnie – przed rozpoczęciem stosowania glicyny oraz po 6 tygodniach jej podawania. Równolegle badano pacjentów psychiatrycznie i oceniano przy pomocy PANSS, w tym podskali objawów negatywnych.

Spośród osób, które nie ukończyły badania (4 kobiety), jedna została wycofana ze względu na spontaniczne pogorszenie (objawy zespołu paranoidalnego) po pierwszej wizycie, przed rozpoczęciem leczenia glicyną. Druga pacjentka po włączeniu glicyny skarżyła się na silne wymioty, trzecia po kilku dawkach glicyny zaczęła odczuwać nadmierną sedację, czwarta nie miała wykonanych badań EOG pod koniec badania.

PREPARAT GLICYNY

Stosowana w badaniu glicyna (krystalizat) została zakupiona w firmie MERCK Germany KGaA (25-kilogramowe opakowania), w katalogu producenta oznaczona jest symbolem 5.00190 [zaznaczono zgodność z farmakopeą europejską (5. edycja), brytyjską (2004) i amerykańską⁽²⁷⁾]. Była ona następnie ważona w porcjach odpowiednich dla masy ciała (0,8 g/kg m.c./dobę/3 dawki). Pacjenci otrzymywali aminokwas w polietylenowych woreczkach i byli instruowani o porach i sposobie przyjmowania środka (rozpuszczanie w ok. 1/2 szklanki wody, względnie soku pomarańczowego, trzy razy dziennie).

METODY OCENY ZABURZEŃ GAŁEK OCZNYCH

Test wahadła (test śledzenia)

Badania elektrookulograficzne (EOG) zostały przeprowadzone przy użyciu czterokanałowego aparatu firmy Toennies Nystagliner (wersja 2.41), rejestrującego ruchy każdej gałki ocznej oddzielnie. Aparat ten posiada wzmacniacz sygnałów prądu stałego, co pozwala rejestrować w sposób dokładny położenie gałki ocznej w czasie realizowanego ruchu oraz przedstawić dane ilościowe w formie wykresów i wyliczeń niezbędnych do oceny parametrów. Pacjent z głową unieruchomioną na podgłówku ma za zadanie podążać wzrokiem za obiektem (biały punkt na czarnym tle), stale utrzymując na nim wzrok. Aby zapobiec dekoncentracji i zmęczeniu pacjenta, między kolejnymi próbami robiono krótką przerwę. Elektrody Ag/AgCl umieszczano bocznie i przyśrodkowo do każdego oka. Rejestrowano oczopląs samoistny przy oczach otwartych i zamkniętych oraz test śledzenia, który polegał na obserwacji świetnego punktu na ekranie umieszczonym w odległości 100 cm przed pacjentem na wysokości jego wzroku. Test śledzenia przeprowadzono dla przewidywanego, sinusoidalnego

low 50, therefore the effects of ageing process on eye movements were avoided. On additional visits 2 weeks before and after glycine augmentation mental state was assessed.

Electro-oculographic tests were carried out twice – before the use of glycine and 6 weeks after its administration. Simultaneously, the patients were examined and evaluated with PANSS, including a subscale of negative symptoms.

Of those persons, who did not complete the study (4 women), one was withdrawn due to a spontaneous relapse of psychosis (paranoid syndrome symptoms) after the first additional visit, before the treatment with glycine was launched. The second one complained of severe vomiting after glycine, the third one after a few doses of glycine suffered from an excessive sedation, whereas the fourth one did not undergo any EOG tests at the end of the study.

GLYCINE FORMULATION

Glycine (crystallizate) used in the study was bought at MERCK Germany KGaA (25 kilogram packages), marked in the producer's catalogue by symbol 5.00190 [conforming with European pharmacopeia (5th edition), British (2004) and American⁽²⁷⁾]. It was subsequently weighed in portions appropriate for the body weight (0.8 g/kg bm/24 h/3 doses). The patients were given amino acid in small polyethylene bags and were instructed about the time and methods of taking the drug (dissolution in approx. 1/2 glass of water or orange juice three times a day).

METHODS OF EVALUATION OF EYE MOVEMENT DISORDERS

Eye pursuit tracking test

Electro-oculographic tests (EOG) were carried out using a four-channel apparatus Toennies Nystagliner (version 2.41), registering the movements of each eye separately. This apparatus has a direct current signals amplifier, which allows to precisely register the eye's position during the movement and to present the quantitative data in form of diagrams and calculations indispensable for evaluation of parameters. The patient with his head immobilised on a bolster is asked to track the object by watching it (white point against a black background) all the time. To prevent the patient's deconcentration and fatigue, a short break was made between consecutive trials. Electrodes Ag/AgCl were placed laterally and medially to each eye. A spontaneous nystagmus was registered with open and closed eyes, as well as the eye pursuit test, which consisted in observation of a light point on the screen placed at a distance of 100 cm in front of the patient at the eyesight height. The eye pursuit test was carried out for the predictable, sinusoidal target, i.e. the light point moving on the screen consecutively with the frequency of 30 Hz, 40 Hz and 50 Hz (i.e. the speed of 29, 38 and 49°/s) to the left or right. This test evaluated the gain (G) for speeds 29, 38 and 49°/s (G₂₉, G₃₈ and G₄₉), which is expressed by the ratio between the eye speed and the object's speed. Gain

go celu, którym był punkt świetlny poruszający się na ekranie kolejno z częstotliwością 30, 40 i 50 Hz (tj. prędkości 29, 38 i 49°/s) w lewo i prawo. W teście tym oceniano współczynnik nadążania (WN, ang. *gain*), dla prędkości 29, 38 i 49°/s (WN₂₉, WN₃₈ i WN₄₉), który wyrażony jest stosunkiem prędkości gałki ocznej do prędkości obiektu. Współczynnik ten wynosi 1, kiedy prędkość gałki ocznej jest równa prędkości celu. Im bardziej gałka oczna nie nadąża za celem, tym bardziej współczynnik nadążania maleje.

Test sakadowy

Test sakadowy wykonywano, stosując nagle pojawiający się świetlny punkt, który zmieniał położenie z amplitudą 15° w lewo i prawo od centralnego punktu ekranu. W teście tym oceniano maksymalną prędkość, latencję, czas trwania sakady oraz współczynnik rozkojarzenia pozycji – dokładność ruchu obu gałek ocznych. Przed każdym zapisem powtarzano kalibrację. Zapisy nieprawidłowe lub wątpliwe powtarzano.

Test antysakadowy

Test antysakadowy od strony technicznej skonstruowany jest podobnie, modyfikacja w porównaniu z testem sakadowym polega na tym, że pacjent ma za zadanie kierować wzrok w **przeciwną** stronę do obiektu pojawiającego się na brzegach ekranu. Wymaga to zaangażowania dodatkowych procesów kognitywnych, często wyraźnie zaburzonych w schizofrenii (pamięć operacyjna). Antysakada wykonana jest błędnie, gdy wzrok zamiast w stronę przeciwną odruchowo wędruje w stronę pojawiającego się obiektu (rys. 1). Podstawą oceny jest współczynnik błędnych antysakad (WBA) wyliczany jako stosunek błędnie wykonanych antysakad do wszystkich antysakad prowokowanych na ekranie. Badania elektrookulograficzne prowadzono w Pracowni Zaburzeń Układu Równowagi Szpitala Klinicznego nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi.

METODY STATYSTYCZNE

Dane analizowano statystycznie przy użyciu metod opisu i wnioskowania. Normalność rozkładów oceniano testem Shapiro-Wilka. Ponieważ większość rozkładów danych nie spełniała warunków wymaganych dla rozkładów normalnych, do oceny zależności używano współczynnika korelacji tau Kendalla. Poziom istotności współczynników korelacji testowano statystyką Z. Obliczono dwustronne wartości p: wartości $p > 0,05$ uznawano za nieistotne statystyczne. Analiz dokonano z użyciem zestawu statystycznego (SPSS dla Windows 12.0, Statistical Package for Social Science, Chicago Il. 1989-2003).

WYNIKI

Uzyskane wyniki wskazują, że pacjenci po 6-tygodniowym okresie przyjmowania glicyny popełniali istotnie mniej błędów w teście antysakadowym (-23,5%, $p < 0,05$). Obserwowano również zmienną statystycznie poprawę współczynnika nadążania przy prędkości 29°/s. Świadczy to o poprawie funkcji kontroli ruchu oczu (usprawnieniu pamięci operacyjnej i funkcji poznawczych).

amounts to 1 when the eye speed equals the target's speed. The more the eye does not gain the target, the more the gain decreases.

Saccadic task

The saccadic task was carried out using a suddenly appearing light point which changed its position with 15 deg. amplitude to the left and right from the screen's central point. This task evaluated the maximum speed, latency, duration of saccade and accuracy of the movement of both eyes. Calibration was repeated before each record. Incorrect or dubious records were repeated.

Antisaccadic task

The antisaccadic task in technical terms is constructed similarly, the modification as compared to the saccadic task consists in that the patient is asked to direct his eyes in the **opposite** direction to the object appearing on the screen edges. This requires an involvement of additional cognitive processes as working memory, often clearly disturbed in schizophrenia (working memory). The antisaccade is performed erroneously when the eyes instead of the opposite direction wander towards the appearing object (fig. 1). A basis of evaluation is the coefficient of errors in antisaccadic task (EAT) calculated as a quotient of erroneously made antisaccades to all antisaccades provoked on the screen. Electro-oculographic tests were carried out at the Laboratory of Equilibrium Disorders, N. Barlicki Clinical Hospital No 1 in Łódź.

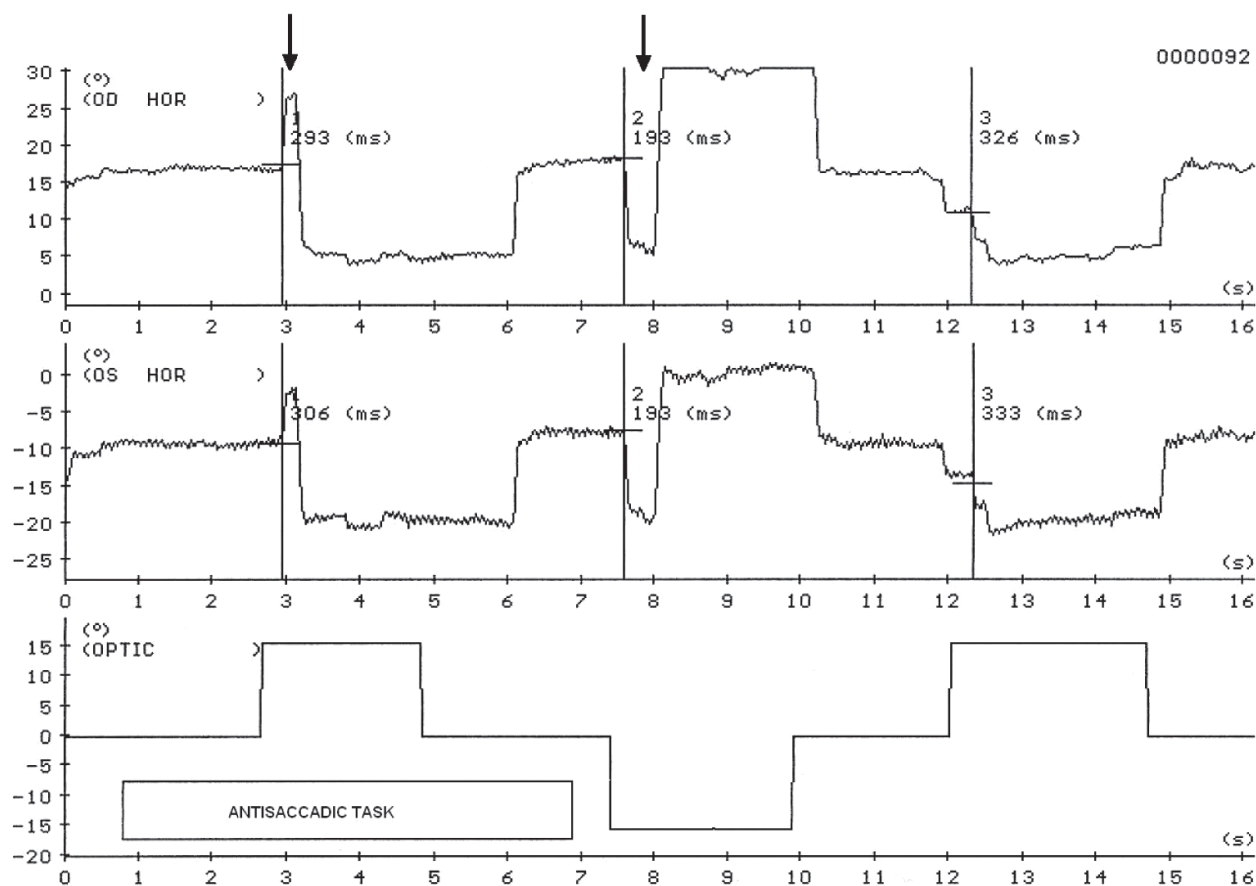
STATISTICAL METHODS

Data was analysed statistically using description and inference methods. Normality of distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test. Kendall tau correlation coefficient was used to estimate associations because most of the data distributions did not meet normality assumption. The significance of correlation coefficients was tested using Z statistics. Two-tailed p values were calculated: values $p > 0.05$ were considered statistically not significant. Analyses were performed using statistical package (SPSS for Windows 12.0, Statistical Package for Social Science, Chicago Il. 1989-2003).

RESULTS

The obtained results indicate that the patients after 6 weeks of glycine treatment made significantly fewer errors in the anti-saccadic task (-23.5%, $p < 0.05$). Moreover, a statistically significant improvement of gain at 29°/s speed was observed. This indicates an improvement of the eye movement control function and improvement of working memory and cognitive functions.

A more precise evaluation did show a correlation between decrease of negative symptoms severity and improvement in anti-saccadic task ($p = 0.048$), in the examined group. Correlation between changes in anti-saccadic task and total PANSS score didn't achieve a significant level (table 3).



Dwie nieprawidłowe antysakady zaznaczono strzałkami, ostatnia antysakada jest wykonana poprawnie. W dolnym rzędzie przedstawiono kierunki poruszania się obiektu. W nieprawidłowo wykonanych antysakadach ruch oczu i obiekt mają ten sam kierunek (kierunek powinien być przeciwny).
Two wrong antisaccades are pointed by arrows, last antisaccade is correct. In lowest raw movements directions of object. In incorrect antisaccades eye movements have the same direction as object (should be opposite).

Rys. 1. Test antysakadowy

Fig. 1. Antisaccadic task

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań ruchów gałek ocznych w badanej grupie.

Dokładniejsza ocena ewentualnej zależności wyników testu antysakadowego i poprawy klinicznej w zakresie objawów negatywnych i tym samym wpływu glicyny na symptomatologię negatywną bezpośrednio i pośrednio (test antysakadowy) wykazała istotną korelację między zmianami w nasileniu wymienionych objawów w badanej grupie pacjentów ($p=0,048$). Z kolei korelacja między zmianą w teście antysakadowym i całkowitą punkcją PANSS nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (tabela 3).

OMÓWIENIE

U pacjentów z rozpoznaniem schizofrenii, szczególnie z dominującymi objawami negatywnymi, zaburzenia ruchów gałek ocznych występują często. Próbowano nawet wykorzystać badania okulo graficzne jako element procesu diagnostycznego (objawy jako tzw. marker endofenotypowy), co nie znalazło szerszego zastosowania. Najnowsze obserwacje ponownie zwracają uwagę na przydatność okulometrii, a szczególnie testu antysakadowego, w ocenie obrazu klinicznego, a nawet ryzyka rozwoju psychozy⁽²⁷⁾.

DISCUSSION

In patients with schizophrenia, especially with severe negative symptoms, the eye movement disturbances occur frequently – insufficient frontal lobes function cause both negative and oculographic symptomatology. Some attempts were even made to use EOG tests as an element of the diagnostic process (symptoms as the so called endophenotypic marker), which has not become widely applicable. The latest observations again draw attention to the usefulness of oculometry, especially antisaccadic task, in evaluation of the clinical picture, or even a risk of the development of psychosis⁽²⁷⁾.

The study was designed as an prospective open-label study without control group and has all restrictions of that type of projects, but pharmacotherapy was not changed during the study, therefore glycine seems to be the only evident factor which can affect the eye movements. The nature of oculometric tests (included into electrophysiological tests) considerably confines the researcher's subjective evaluation; it is based on evaluation of numerical parameters and diagrams generated by the apparatus. In the evaluated group the patients exhibit-

Parametr Parameter	Wizyta 1. Visit 1		Wizyta 2. Visit 2		Różnica Difference		% zmian % of changes	p
	Średnia Average	SD	Średnia Average	SD	Średnia Average	SD		
WN_29 G_29	0,468	0,15	0,508	0,13	0,039	0,09	8,4	p<0,05
WN_38 G_38	0,464	0,19	0,489	0,14	0,025	0,1	5,4	ns
WN_49 G_49	0,442	0,17	0,462	0,14	0,020	0,11	4,5	ns
V_Odw V_Abd	147,7	47,1	148,8	32,5	1,1	34,5	0,7	ns
V_Prz V_Add	167,6	37,7	172,7	36,1	5,1	24,4	3,0	ns
Odw_Dokł Abd_Prec	48,5	13,6	49,1	9,8	0,6	9,6	1,3	ns
Prz_Dokł Add_Prec	47,2	10,5	50,1	9,8	2,9	11,7	6,1	ns
Latencja Latency	182,9	34,6	187,2	44,4	4,3	37,0	2,4	ns
Czas_Sak Sac_Time	105,5	15,0	104,4	7,1	-1,1	13,1	-1,0	ns
WBA EAT	0,32	0,273	0,245	0,215	-0,075	0,182	-23,5	p<0,05

WN_29, WN_38, WN_49 – współczynniki nadążania dla prędkości 29, 38 i 49°/s; V_Odw – prędkość odwodzenia [°/s]; V_Prz – prędkość przywodzenia [°/s]; Odw_Dokł – dokładność odwodzenia [%]; Prz_Dokł – dokładność przywodzenia [%]; Latencja – czas latencji [ms]; Czas_Sak – czas trwania sakady [ms]; WBA – współczynnik błędnych antysakad
G_29, G_38, G_49 – gain for speeds 29, 38 and 49°/s; V_Abd – abduction speed [°/s]; V_Add – adduction speed [°/s]; Abd_Prec – abduction precision [%]; Add_Prec – adduction precision [%]; Latency – latency time [ms]; Sac_Time – saccade time [ms]; EAT – errors in antisaccadic task coefficient

Tabela 2. Wyniki badań ruchów gałek ocznych w badanej grupie
Table 2. Results of eye movements tests in the examined group

Badanie było zaprojektowane jako otwarte, wszyscy pacjenci przyjmowali leki przeciwpsychotyczne i glicynę (brak grupy kontrolnej), co utrudnia jednoznaczną ocenę wpływu glicyny na objawy negatywne. W okresie badania nie dokonywano zmian farmakoterapii, przyjmowanie glicyny wydaje się zatem jedynym wyraźnym czynnikiem mogącym wpływać na ruchy gałek ocznych. Charakter badań okulometrycznych (zaliczanych do badań elektrofizjologicznych) w znacznym stopniu ogranicza subiektywną ocenę badacza, bazuje na ocenie parametrów liczbowych i wykresów generowanych przez aparaturę. W ocenianej grupie pacjenci wykazywali wyraźne zaburzenia ruchów gałek ocznych, mieli wyraźne trudności podczas wykonywania testów sakadowego i antysakadowego, ale sam ruch nadążania również istotnie odbiegał od obserwowanego u osób bez rozpoznania schizofrenii (niski WN, sakadyzacja). Średnie wyniki uzyskiwane w badanej grupie w poszczególnych testach okoru-

ed evident abnormalities of eye movements, they found it quite difficult to perform the saccadic and antisaccadic tasks, but the also gain movement also significantly deviated from that observed in patients with diagnosed schizophrenia (low gain, saccadization). The average results obtained in the examined group in respective oculomotor tests deviate from the values for healthy people, described e.g. in the Polish literature⁽⁶⁾. Within 6 weeks of glycine treatment, between visits 1 and 2 the gain was statistically significantly improved in the test of smooth eye movements at the object's speed of 29°/s. This indicates an increased precision of eye movements and better fixation of the image on the macula lutea with the contribution of oculomotor muscles and not through the movement over the head. Literature indicates that the described changes may point to decreased primary negative symptoms of schizophrenia⁽²⁸⁾.

Korelacja Correlation	Tau	Z	p
ΔPANSS-N & ΔWBA ΔPANSS-N & ΔEAT	0,264547	1,975627	0,048
ΔPANSS-T & ΔWBA ΔPANSS-T & ΔEAT	0,172941	1,291519	0,196

Tabela 3. Korelacja między zmianami w zakresie symptomatologii negatywnej (ΔPANSS-N), całkowitą punktacją PANSS (ΔPANSS-T) a zmianą współczynnika błędnych antysakad (ΔWBA) między obiema wizytami
Table 3. Correlation between changes in negative symptomatology (ΔPANSS-N), total PANSS score (ΔPANSS-T) and changes of errors in antisaccadic task (ΔEAT) during study

chowych odbiegają od opisywanych w polskim piśmiennictwie wartości dla osób zdrowych⁽⁶⁾.

Stwierdzono, że podczas 6 tygodni leczenia glicyną, między 1. i 2. wizytą doszło do istotnej statystycznie poprawy wskaźnika nadążania (*gain*, WN) w badaniu płynnych ruchów gałek ocznych przy prędkości obiektu 29°/s. Świadczy to o zwiększeniu dokładności ruchów gałek ocznych i lepszej fiksacji obrazu na płamce żółtej z udziałem mięśni okoruchowych, nie zaś poprzez ruch głową. Z piśmiennictwa wynika, że opisane zmiany mogą świadczyć o zmniejszeniu się nasilenia pierwotnych objawów negatywnych schizofrenii⁽²⁸⁾.

W teście antysakadowym, który uznawany jest za najbardziej swoisty dla pierwotnych objawów negatywnych, mierzony odsetek popełnionych błędów w czasie stosowania koagonisty receptora NMDA poprawił się w sposób istotny statystycznie ($p < 0,05$). Wyniki uzyskane podczas wizyty 2. jednoznacznie wskazują na lepsze radzenie sobie z testem antysakadowym i na poprawę funkcjonowania pamięci operacyjnej, co może odpowiadać poprawie funkcjonowania kory przedczołowej wskutek wzrostu pobudzenia glutaminianergicznego wywołanego glicyną^(8,16,17). W badanej grupie wykazano istotną korelację między zmianą nasilenia współczynnika błędnych antysakad i objawów negatywnych ($p < 0,05$), co potwierdza i wspiera podstawową hipotezę badania o istnieniu zależności między objawami negatywnymi i zaburzeniami ruchów gałek ocznych wyrażonymi w teście antysakadowym.

Test sakadowy był oceniany na podstawie wskaźnika nadążania, co pozwoliło na określenie jakości wykonania zadania. Podczas wizyty 2. nie zaobserwowano znamiennej poprawy ($p > 0,05$) w porównaniu z badaniem wyjściowym, co obserwowano w piśmiennictwie także w przypadku rysperydonu i innych leków przeciwpsychotycznych⁽¹⁶⁾. W badaniu nie dokonano podziału ze względu na zastosowane leczenie – badana grupa była zbyt mała, by zmiany osiągnęły poziom istotności statystycznej. Stosowanie glicyny było bezpieczne, pojedynczy pacjenci relacjonowali występowanie nudności i wymiotów, które można było zmniejszać, łącząc roztwór glicyny z sokami owocowymi (cytrynowym, pomarańczowym).

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Diefendorf A.R., Dodge R.: An experimental study of the ocular reactions of the insane from photographic records. *Brain* 1908; 31: 451-489.
2. Hutton S.B.: Improved antisaccade performance in schizophrenia with risperidone. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002; 72: 429.
3. Holzman P.S.: Eye movements and the search for the essence of schizophrenia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000; 31: 350-356.
4. Sweeney J.A., Luna B., Haas G.L. i wsp.: Pursuit tracking impairments in schizophrenia and mood disorders: step-ramp studies with unmedicated patients. *Biol. Psychiatry* 1999; 46: 671-680.
5. Everling S., Fischer B.: The antisaccade: a review of basic research and clinical studies. *Neuropsychologia* 1998; 36: 885-899.

In the antisaccadic task, which is acknowledged, to be one of the most specific for the primary negative symptoms, the measured percentage of errors made was significantly improved while NMDA receptor co-agonist was applied ($p < 0.05$). The results obtained during visit 2 explicitly indicate a better coping with antisaccade task and an improvement of working memory functions, which may be tantamount to improved functioning of the prefrontal cortex in result of glutamatergic stimulation increase induced by glycine^(8,16,17). Correlation between improvement in antisaccadic task and lower score in negative symptoms PANSS subscale ($p < 0.05$) confirms and support this hypothesis.

The saccade task was evaluated based on the gain movement, which allowed to determine the quality of the performance. During visit 2, no significant improvement was observed ($p > 0.05$), as compared to the initial task, which was observed in literature also in case of risperidone and other antipsychotics⁽¹⁶⁾. Within the study no division was made in view of the applied treatment: the examined group was too small, therefore the changes did not reach any statistical significance level.

The use of glycine was safe, a few patients reported some nausea and vomiting which could be decreased with the combination of glycine solution with fruit (lemon, orange) juices.

6. Józefowicz-Korczyńska M., Łukowski M.: Analiza zapisów ENG testów wzrokowo-okoruchowych u osób zdrowych w różnym wieku. *Otolaryngol. Pol.* 2006; 60: 45-50.
7. Schulze K., MacCabe J.H., Rabe-Hesketh S. i wsp.: The relationship between eye movement and brain structural abnormalities in patients with schizophrenia and their unaffected relatives. *J. Psychiatr. Res.* 2006; 40: 589-598.
8. Tu P.C., Yang T.H., Kuo W.J. i wsp.: Neural correlates of antisaccade deficits in schizophrenia, an fMRI study. *J. Psychiatr. Res.* 2006; 40: 606-612.
9. Crawford T.J., Haeger B., Kennard C. i wsp.: Saccadic abnormalities in psychotic patients. II. The role of neuroleptic treatment. *Psychol. Med.* 1995; 25: 473-483.
10. Crawford T.J., Haeger B., Kennard C. i wsp.: Saccadic abnormalities in psychotic patients. I. Neuroleptic-free psychotic patients. *Psychol. Med.* 1995; 25: 461-471.
11. Flechtner K.M., Steinacher B., Sauer R., Mackert A.: Smooth pursuit eye movements of patients with schizophrenia and affective disorder during clinical treatment. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2002; 252: 49-53.
12. Hutton S.B., Crawford T.J., Gibbins H. i wsp.: Short and long term effects of antipsychotic medication on smooth pursuit eye tracking in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 2001; 157: 284-291.
13. Müller N., Riedel M., Eggert T., Straube A.: Internally and externally guided voluntary saccades in unmedicated and medicated schizophrenic patients. Part II. Saccadic latency, gain, and fixation suppression errors. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1999; 249: 7-14.
14. Straube A., Riedel M., Eggert T., Müller N.: Internally and externally guided voluntary saccades in unmedicated and medicated schizophrenic patients. Part I. Saccadic velocity. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1999; 249: 1-6.
15. Ettlinger U., Kumari V.: Pharmacological studies of smooth pursuit and antisaccade eye movements in schizophrenia: current status and directions for future research. *Current Neuropharmacology* 2003; 1: 285-300.

16. Burke J.G., Reveley M.A.: Improved antisaccade performance with risperidone in schizophrenia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002; 72: 449-454.
17. Calkins M.E., Curtis C.E., Iacono W.G., Grove W.M.: Antisaccade performance is impaired in medically and psychiatrically healthy biological relatives of schizophrenia patients. *Schizophr. Res.* 2004; 71: 167-178.
18. Nkam I., Thibaut F., Denise P. i wsp.: Saccadic and smooth-pursuit eye movements in deficit and non-deficit schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2001; 48: 145-153.
19. Nieman D.H., Bour L.J., Linszen D.H. i wsp.: Neuropsychological and clinical correlates of antisaccade task performance in schizophrenia. *Neurology* 2000; 54: 866-871.
20. Strzelecki D., Rabe-Jabłońska J.: Rola zaburzeń funkcji układu glutaminianergicznego w patogenezie schizofrenii. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 2004; 4: 4-11.
21. Olney J.W., Newcomer J.W., Farber N.B.: NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 1999; 33: 523-533.
22. Lawlor B.A., Davis K.L.: Does modulation of glutamatergic function represent a viable therapeutic strategy in Alzheimer's disease? *Biol. Psychiatry* 1992; 31: 337-350.
23. Mayer M.L., Westbrook G.L.: The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1987; 28: 197-276.
24. Tuominen H.J., Tiihonen J., Wahlbeck K.: Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Res.* 2005; 72: 225-234.
25. Leiderman E., Zylberman I., Zukin S.R. i wsp.: Preliminary investigation of high-dose oral glycine on serum levels and negative symptoms in schizophrenia: an open-label trial. *Biol. Psychiatry* 1996; 39: 213-215.
26. D'Souza D.C., Gil R., Cassello K. i wsp.: IV glycine and oral D-cycloserine effects on plasma and CSF amino acids in healthy humans. *Biol. Psychiatry* 2000; 47: 450-462.
27. Nieman D., Becker H., van de Fliert R. i wsp.: Antisaccade task performance in patients at ultra high risk for developing psychosis. *Schizophr. Res.* 2007; 95: 54-60.
28. Hong L.E., Avila M.T., Adami H. i wsp.: Components of the smooth pursuit function in deficit and nondeficit schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2003; 63: 39-48.

Informacja dla autorów!

Chcąc zapewnić naszemu czasopismu „Psychiatria i Psychologia Kliniczna” wyższą indeksację MNiSW i Index Copernicus, zwracamy się do autorów o dopełnienie poniższych warunków podczas przygotowywania pracy do publikacji:

- Praca oryginalna powinna być poprzedzona streszczeniem zawierającym **od 200 do 250 słów**, a praca poglądowa i kazuistyczna – **od 150 do 200 słów**.

Streszczeniu pracy oryginalnej należy nadać budowę strukturalną:
wstęp, materiał i metoda, wyniki, wnioski.

- Liczba **słów kluczowych** nie może być mniejsza niż 5.
Słowa kluczowe nie powinny być powtórzeniem tytułu.
Najlepiej stosować słowa kluczowe z katalogu MeSH.

– **Praca oryginalna** winna zawierać elementy:
wstęp, materiał i metoda, wyniki, omówienie, wnioski, piśmiennictwo.

- **Piśmiennictwo** powinno być ułożone w **kolejności cytowania**.

Pełny Regulamin ogłaszania prac znajduje się na stronie 221.