Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej oraz inżynierii materiałowej

Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej oraz inżynierii materiałowej

Redakcja:
Beata Zdunek
Marcin Szklarczyk

Lublin 2016

Recenzenci:

- dr hab. inż. Ryszard Kulig
- dr hab. Roman Paduch
- dr inż. Beata Świeczko-Żurek
- dr Robert Świder
- dr Agnieszka Bartoszek
- dr Mariola Janiszewska
- dr n. farm. Marcin Dziedzic
- dr Marek Błaszczak
- dr Łukasz Grabowski
- dr Aneta Ptaszyńska

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Olszówka

Projekt okładki:
Paulina Szymczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o.

ISBN 978-83-65598-26-4

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp z. o. o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Tomasz Wandtke, Adrian Krajewski, Arkadiusz Goede
Terapia genowa w niedoborze α-1-antytrypsyny 7

Anna Cwynar, Alicja Janicka, Tomasz Wybranowski
Właściwości fluorescencyjne białek 21

Adrian Krajewski, Edyta Simińska, Arkadiusz Goede
Cykliny i kinazy zależne od cyklin
– nie tylko regulatory cyklu komórkowego 31

Paulina Dudko, Andrzej Junkuszew
Metylacja DNA 41

Piotr Stępień, Paula Musiał
miRNA w leczeniu bólu 53

Adrian Krajewski, Maciej Gawroński, Arkadiusz Goede
miRNAs – znane cząsteczki w nieznanej roli 66

Karol Nowosad, Piotr Stępień, Paula Musiał
CRISPR-Cas9 nowe narzędzie inżynierii genetycznej 76

Martyna Bednarczyk, Katarzyna Walkiewicz, Paweł Kozieł,
Urszula Mazurek, Małgorzata Muc-Wierzgoń
Podstawy molekularne autofagii 88

Łukasz Kręcidło, Teresa Krzyśko-Łupicka
Geny warunkujące produkcję mykotoksyn u grzybów strzępkowych
obecnych w magazynach zbożowych 106

Robert Karpiński, Beata Górniak, Jakub Szabelski, Mirosław Szala
Charakterystyka i podział materiałów szewnych 123

Robert Karpiński, Beata Górniak, Jakub Szabelski, Mirosław Szala
Historia chirurgii i materiałów szewnych 135

Marta Kozak, Paweł Sobczak, Kazimierz Zawiślak
Ocena wybranych właściwości fizycznych aglomeratów z mieszanek
roślinnych na bazie nasion soi 145

Izabela Wrona, Artur Wójcik
Praktyczne zastosowania materiałów w stanie nadprzewodzącym 156

Adrian Dubicki
Technologie i metody wytwarzania indywidualnych implantów kostnych... 169

Anna Kamińska, Zdzisław Pakowski, Robert Adamski
Analiza deformacji powierzchni żelu krzemionkowego suszonego konwekcyjnie 183

Paulina Karpeta, Adam Mokshaha-Zarzycki, Roksana Tomanek, Justyna Wilińska
Zastosowanie terpolimeru w otrzymywaniu implantów z estradiolem metodą ekstruzji..... 194

Indeks autorów 206

Tomasz Wandtke[1], Adrian Krajewski[2], Arkadiusz Goede[3]

Terapia genowa w niedoborze α-1-antytrypsyny

1. Wstęp

Alfa-1-antytrypsyna (AAT) to glikoproteina ostrej fazy z frakcji alfa-1-globulin o ciężarze molekularnym 52kDa i długości 394 reszt aminokwasowych [1, 2]. AAT to jeden z najsilniejszych krążących w osoczu inhibitorów proteaz serynowych zaliczany do nadrodziny serpin [2]. Białko to produkowane jest głównie w wątrobie przez hepatocyty, a także w mniejszym stopniu przez komórki epitelialne jelit, neutrofile oraz makrofagi pęcherzykowe [3-7]. AAT wykazuje aktywność hamującą wobec wielu różnych enzymów i mediatorów prozapalnych, w tym głównie wobec elastazy pochodzenia neutrofilowego uwalnianej w wyniku reakcji zapalnej, ale także wobec takich białek jak: proteinaza-3, katepsyny, kaspaza-3 oraz alfa-defensyny [2].

Niedobór Alfa-1-antytrypsyny (AATD) to genetyczna choroba monogenowa po raz pierwszy opisana przez Larella i Erikssona w roku 1963 [8, 9]. Częstsze występowanie stanów zapalnych w obrębie dolnych dróg oddechowych oraz wczesny rozwój rozedmy płuc, a także u części chorych (<10%) symptomatyczna choroba wątroby, to typowe objawy charakterystyczne dla AATD [10]. Aktualnie podejrzewa się, że wzrost prawdopodobieństwa wystąpienia takich jednostek chorobowych jak rozstrzenie oskrzeli, astma a nawet zapalenie naczyń krwionośnych także jest powiązane z występowaniem defektu genetycznego powodującego AATD [10-13]. Prawidłowy poziom krążącej w osoczu AAT u zdrowych osób waha się między 15 a 30μM [2]. Spadek prawidłowo działającej AAT w osoczu poniżej 11μM skutkuje wzrostem prawdopodobieństwa wystąpienia objawów choroby płuc wywołanej lokalną degradacją tkanki łącznej [1, 2].

[1] tomasz_wandtke@wp.pl, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, www.cm.umk.pl
[2] krajewski.adrian@wp.pl, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, www.cm.umk.pl
[3] arkadiusz_goede@wp.pl, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, www.cm.umk.pl

Terapia genowa wydaje się być niezwykle atrakcyjnym rozwiązaniem w leczeniu AATD. W wariancie suplementacyjnym, mającym na celu podwyższenie poziomu AAT w osoczu, jej zastosowaniu sprzyja stosunkowo niewielka długość sekwencji kodującej AAT, a także fakt że może ulegać ona sekrecji z dowolnej komórki odkąd wiadomo, że białko to przejawia swoją aktywność w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Przeprowadzono dotychczas wiele prób z zastosowaniem wirusowego (wektory gammaretrowirusowe, adenowirusowe, lentiwirusowe i inne) i niewirusowego transferu genów. Niektóre z prowadzonych analiz osiągnęły status badań klinicznych, które nadal trwają [9].

Część z prób leczenia AATD przewiduje wykorzystanie połączenia techniki suplementacyjnej terapii genowej z techniką supresyjną, co ma istotne znaczenie szczególnie u pacjentów, którzy przejawiają objawy wątrobowe wynikające z akumulacji nieprawidłowej, zmutowanej formy AAT w hepatocytach. Rozwiązanie takie ma na celu jednoczesne podniesienie poziomu prawidłowo funkcjonującej AAT w osoczu oraz rozłożenie nieprawidłowej formy AAT skumulowanej w hepatocytach odpowiadającej za ich uszkodzenie [14].

W dalszej części artykułu zostanie dokonany przegląd aktualnych osiągnięć oraz perspektyw przed jakimi stoi terapia genowa AATD. Pewna część uwagi zostanie poświęcona także badaniom klinicznym wykorzystującym zdobycze terapii genowej w próbach leczenia tego schorzenia.

2. Terapia genowa AATD

Szczegółowy obraz kliniczny AATD został wielokrotnie opisany w wielu opracowaniach I nie jest tematem przewodnim tego opracowania. W celu zapoznania się z tym zagadnieniem, zaleca się sięgnąć po odpowiednie, wskazane przez autorów, pozycje literaturowe [12, 15].

Jedynym sposobem leczenia AATD zaaprobowanym przez Amerykańską Agencję ds. żywności i leków (FDA) jest aktualnie tzw. terapia zastępcza, polegająca na cotygodniowych dożylnych iniekcjach rekombinowanych preparatów AAT. Odkąd potwierdzono, że stosowane rozwiązanie pozwala osiągać protekcyjne stężenia AAT (11μM) w surowicy, terapie tego rodzaju uznano za efektywną i chroniącą przed rozwojem chorób płuc wynikających z AATD. Prezentowane rozwiązanie jest klasyczym przykładem terapii suplementacyjnej, mającej na celu zrekompensować deficyt AAT w krwioobiegu. Jednak konieczność cotygodniowego podawania drogich preparatów przez cały okres życia osoby chorej jest znaczącym ograniczeniem dla powszechnego stosowania tego rozwiązania. Co więcej, o ile zastosowanie terapii suplementacyjnej umożliwia podniesienie poziomu AAT w surowicy do poziomów ochronnych

dla płuc, to metoda ta nie pozwala na leczenie pojawiającej się u części osób choroby wątroby (homozygoty ZZ) wynikającej z akumulacji niepoprawnie sfałdowanych cząsteczek AAT w hepatocytach. Nie istnieje aktualnie żaden, poza przeszczepem wątroby, przyczynowy sposób leczenia AATD. Jego przeprowadzenie z reguły sprzyja poprawie rokowania, jednocześnie chroniąc przed późniejszym rozwojem rozedmy płuc.

Brak leczenia przyczynowego, znaczny koszt terapii suplementacyjnej o charakterze objawowym, jej krótkotrwały efekt, a u części pacjentów z objawami choroby wątroby całkowity brak nieinwazyjnych perspektyw terapeutycznych stał się przyczyną poszukiwania nowych, skuteczniejszych i wydajniejszych sposobów leczenia AATD. Jednym z obiecujących rozwiązań są techniki suplementacyjnej i/lub supresyjnej terapii genowej. W dalszej części tego rozdziału zostaną przedstawione najważniejsze kierunki badań podjęte w terapii genowej AATD.

2.1. Transfer wirusowy

Znakomita większość przeprowadzonych badań mających na celu wykorzystać techniki terapii genowej w leczeniu AATD została oparta o transfer terapeutycznych fragmentów kwasów nukleinowych do wnętrza komórek docelowych za pomocą modyfikowanych wektorów wirusowych. Najliczniejsze z badań przeprowadzono z użyciem rekombinowanych wektorów wirusowych opartych na szkielecie wirusów towarzyszących adenowirusom (*Recombinant adeno-associated virus* – rAAV). W mniej licznych, ale nie mniej ważnych badaniach podjęto także próby wykorzystania wektorów retrowirusowych, lentiwirusowych, adenowirusowych.

2.1.1. Retrowirusy

Pierwsze z doniesień o możliwym wykorzystaniu technik terapii genowej w leczeniu AATD sięgają 1986 roku. Blisko 30 lat temu Ledley oraz Woo po raz pierwszy zaproponowali model terapeutyczny oparty o retrowirusowy transfer genu ludzkiej AAT (hAAT). W warunkach hodowli in vitro uzyskali ekspresję hAAT w zainfekowanej wektorem linii komórkowej mysich fibroblastów (NIH3T3), stwarzając tym samym perspektywy dla przyszłych eksperymentów oraz dając nadzieję na terapię o charakterze zastępczym [16]. Rok później Garver i współpracownicy udowodnili, że transfer genu hAAT z udziałem wektora retorwirusowego pN2-FAT, skutkował produkcją przez mysią linię komórkową ψ2/FAT glikozylowanej, zdolnej do hamowania elastazy neutrofilowej i stabilnej formy tego białka. Autorzy po raz pierwszy zasygnalizowali możliwość zastosowania opisanej metody do modyfikacji poza organizmem komórek progenitorowych szpiku kostnego pacjentów z AATD, a następnie ich autologicznego przeszczepu w celu naprawy defektu genetycznego [17].

Transfer retrowirusowy genu AAT w próbach in vivo prowadzonych na psich modelach zwierzęcych, okazał się jednak tylko częściowo skuteczny. Model zaproponowany przez Kay i wspólpracowinków opierał się na izolacji psich hepatocytów oraz ich następczej hodowli i transdukcji w warunkach in vitro wektorem retrowirusowym LNCX niosącym gen AAT. Ich ponowna transplantacja skutkowała stosunkowo krótką ekspresją AAT, efektami ubocznymi podjętej terapii, w tym w części przypadków także śmiercią zwierząt [18]. W wielu badaniach mających na celu wykorzystanie technik terapii genowej w leczeniu m.in. SCID-X1, udowodniono szkodliwy pronowotworowy wpływ wektorów retrowirusowych, przejawiający się zjawiskiem mutagenezy insercyjnej skutkującej rozwojem chorób nowotworowych [19]. Jest to aktualnie jeden z głównych czynników ograniczających badania nad ich szerszym wykorzystaniem w terapii.

2.1.2. Adenowirusy

Problem mutagenezy insercyjnej przed jakim stawiały nośniki retrowirusowe, został rozwiązany przez nie integrujące się z genomem komórki docelowej wektory adenowirusowe. Lemarchand i współpracownicy dowiedli że transfer genu dla AAT do komórek żyły pępowinowej w warunkach ex vivo z wykorzystaniem tego typu wektora (zmodyfikowany adenowirus typu 5 niezdolny do replikacji) jest niezwykle skutecznym rozwiązaniem, odkąd stwierdzono w odczynie Northern Blot obecność mRNA dla tego genu, a testem ELISA potwierdzono obecność AAT w perfuzacie na poziomie 13ug/ml. Pespektywa terapii genowej AATD z wykorzystaniem komórek o charakterze endotelialnym, wydawała się szczególnie atrakcyjną receptą ze względu na znaczną ich ilość w ludzkim organizmie i tym samym potencjalnie wynikającą z tego zwielokrotnioną syntezę deficytowego białka [20]. Skuteczny transfer genu AAT z udziałem wektorów adenowirusowych potwierdza także kilka innych doniesień. Prawidłową ekspresję białka uzyskano także w warunkach in vivo na modelach zwierzęcych. Zastosowanie wektorów adenowirusowych pozwalało na uzyskanie przejściowej ekspresji AAT w dwóch kluczowych dla AATD miejscach: w komórkach pochodzących z dróg oddechowych (model szczurzy) oraz w hepatocytach (model mysi) [21, 22].

Jednak zaleta wektorów adenowirusowych polegająca na ich niezdolności do integracji z genomem komórki, okazała się także ich wadą. Niezdolność do zapewnienia stałej ekspresji białka, zmuszała do wielokrotnej aplikacji terapeutycznego nośnika. Adenowirusy, jak i wektory powstałe na ich bazie w konsekwencji okazały się silnie immunogenne, dlatego też jak w przypadku wektorów retrowirusowych odstąpiono od dalszego rozwoju tego systemu w leczeniu AATD.

2.1.3. Wirusy towarzyszące adenowirusom (AAV)

AAV to jednoniciowe wirusy DNA zaliczane do rodziny *Parvoviridae* [23]. Niewątpliwą zaletą AAVs jest brak patogenności, gdyż jak dotąd nie poznano żadnych poważnych jednostek chorobowych będących wynikiem ich działalności. W przeciwieństwie do retrowirusów i wektorów skonstruowanych na ich bazie, rekombinowane wektory AAV praktycznie w ogóle nie integrują się z genomem komórki docelowej co eliminuje ryzyko przypadkowej onkogennej mutagenezy insercyjnej [19, 24]. Ponadto, rAAVs posiadają zdolność do długiego utrzymywania się w komórce docelowej, a także co jest ich największą niepodważalną zaletą, wykazują zdolność do infekowania komórek dzielących się jak i tych które już podziałom nie podlegają [25, 26]. Jako nośniki genów terapeutycznych idealnie spełniają swoje zadanie także dlatego, iż wydaje się że nie są zdolne, w przeciwieństwie do wektorów adenowirusowych, do indukcji odpowiedzi cytotoksycznej, a jedyna reakcja układu odpornościowego przejawia się w produkcji przeciwciał neutralizujących cząsteczki tych wirusów [27, 28].

Wszystkie wymienione czynniki sprawiły, że rekombinowane wektory oparte na wirusach towarzyszących adenowirusem (rAAV) okazały się w próbach leczenia AATD rozwiązaniem stosunkowo najskuteczniejszym, ale także i bezpieczniejszym od pozostałych. Eksperymenty terapeutyczne prowadzone z ich udziałem często skupiają się na optymalizacji ekspresji leczniczego transgenu, której wydajność wydaje się być zależna od takich czynników jak: serotyp wektora AAV, promotor pod kontrolą którego znajduje się transgen, sposób i docelowe miejsce podaży czy obecność przeciwciał neutralizujących będąca wynikiem wcześniejszej ekspozycji na określony serotyp wirusa AAV [25, 26, 29-35].

Jedne z najwcześniejszych doniesień o wykorzystaniu rekombinowanych wektorów AAV w próbach terapii AATD pochodzą z roku 1998. Eksperymenty prowadzone przez Song i wsp. zakładały wprowadzenie rAAVs niosących gen dla hAAT do komórek mysich mięśni szkieletowych za pomocą wektorów w których transgen znajdował się pod kontrolą promotora dla wirusa CMV. Tak podjęte działania pozwalały na osiągnięcie 4-tygodniowej, stosunkowo zadowalającej ekspresji transgenu, jednak przy bardzo dużej podaży cząsteczek wirusowych (co najmniej $5x10^{10}$) [29]. Stosunek wielkości organizmów: człowiek/mysz zmusił ten sam zespół do optymalizacji metody na rzecz redukcji ilości wprowadzanych nośników niosących gen terapeutyczny, w celu uniknięcia ewentualnej odpowiedzi odpornościowej. Optymalizacja metody polegająca na 10-krotnie mniejszej podaży tych samych nośników do żyły wrotnej w celu modyfikacji mysich hepatocytów zapewniała podobny poziom

ekspresji AAT w surowicy co transdukcja mysich komórek mięśniowych. Co ważne, zwierzęta nie wykazywały żadnych efektów ubocznych w trakcie prowadzonej terapii [30].

Podobnie jak w przypadku terapii AATD stosowanej od 1989 roku polegającej na podaży oczyszczonej rekombinowanej AAT do krwiobiegu, tak i w opisanych wyżej przypadkach, tylko niewielki odsetek (<3%) AAT zsyntetyzowanej w zmodyfikowanych komórkach dociera do płuc, gdzie wymagane jest jej faktyczne działanie [25]. Ponadto ryzyko zapalenia wątroby powodowanego administracją znacznej ilości cząstek AAV do żyły wrotnej, jak raportowano w przypadkach prób terapii genowej hemofilii B, skłoniły do poszukiwania metod podaży wektorów AAV bezpośrednio do płuc gdzie faktycznie niezbędna jest aktywność AAT [31]. Flotte podjął podobne starania jak Song i wsp. udowadniając, że wprowadzenie wektorów kodujących hAAT opartych na szczepie AAV2 jest skuteczne u myszy także po podaniu dotchawiczym [32]. Także zaproponowana przez zespół Zhang i wsp. genetyczna modyfikacja ustalonej linii mysich makrofagów J774A.1 za pomocą wektora pAAV-CB-A1AT kodującego hAAT (fuzyjny promotor wirusa CMV i Beta-aktyny) i następcze ich dotchawicze wprowadzenie pozwalało na osiągnięcie u myszy, terapeutycznych stężeń AAT w płucach [25]. Następna z kolei, doopłucnowa droga podaży po raz pierwszy została zaproponowana przez De i wsp. Porównanie wydajności zastosowania wektorów AAV2 i AAV5 u myszy przyniosło informacje o blisko 10-krotnie wyższej obecności AAT w surowicy oraz w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym w przypadku zastosowania serotypu AAV5. Zastosowana metoda pozwalała na uzyskanie wysokiej (stężenie 1,5 razy większe od uznawanego stężenia terapeutycznego) i długotrwałej (powyżej 40 tygodni) ekspresji AAT w surowicy [31]. Doopłucnowa droga podania wektora wirusowego w leczeniu AATD przyniosła szereg korzyści: dużą dostęp-ność białka terapeutycznego dla struktur znajdujących się w obrębie klatki piersiowej, możliwość zastosowania mniejszej dawki terapeutycznego nośnika niż w przypadku iniekcji dożylnej i co z tego wynika, mniejsze ryzyko efektów ubocznych w tym odpowiedzi zapalnej wynikającej z obecności wektora wirusowego [33].

Kolejnym problemem jaki postanowiono przezwyciężyć w terapii genowej AATD z udziałem AAV były mechanizmy odpornościowe. Badania przeprowadzone przez Halbert i wsp. na myszach i psach dowiodły, że stosowanie niektórych wektorów AAV (AAV6) w terapii AATD może prowadzić do odpowiedzi immunologicznej i szybkiego zniesienia terapeutycznego efektu wektora wirusowego nawet w warunkach immunosupresji [36]. Ponadto, przypuszcza się, że blisko 80% ludzi zostało zainfekowanych w czasie życia serotypami AAV2 i AAV5, czego

wynikiem jest obecność przeciwciał neutralizujących. Wymienione wektory są najczęściej wykorzystywanymi nośnikami genów w próbach terapii genowej AATD z udziałem zwierząt. Limberis i Wilson skonstruowali wektor oparty na wirusie AAV2/9, który był zdolny do wydajnej transdukcji mysich komórek epitelialnych układu oddechowego i syntezy hAAT, a także ominięcia w znacznej mierze wpływu przeciwciał neutralizujących. Wykonane analizy wykazały, że obecność AAT w mysiej surowicy charakteryzowała się 60-krotnie wyższym poziomem niż jak miało to miejsce w przypadku wektora opartego na wirusie AAV5, a przeciwciała pojawiające się po pierwszej aplikacji nośnika niosącego transgen obniżały jego ekspresje przy następnej podaży tylko o 10%. Co więcej wektor pozwalał na osiągniecie stabilnej i bardzo długiej bo 9-miesięcznej ekspresji AAT, co może być dowodem jego zdolności do transdukcji komórek progenitorowych w obrębie układu oddechowego [26]. Aby uniknąć w przyszłych próbach klinicznych wpływu wyprodukowanych przed podażą wektora przeciwciał De i wsp. wykonując badanie przesiewowe z wykorzystaniem 25 wirusów AAV zidentyfikowali serotyp AAVrh.10 rzadko obecny u ludzi, który okazał się także niezwykle wydajnym narzędziem ekspresyjnym. Wykorzystując wcześniej opracowany model doopłucnowej podaży wektorów terapeutycznych, udowoniono że użycie wektora opartego na wirusie AAVrh.10 u myszy przynosiło blisko 300% większą ekspresję AAT niż w przypadku klasycznie stosowanych dotąd wektorów opartych na wirusie AAV5 [34]. Wykorzystując skonstruowany wektor ten sam zespół zaprojektował szerokie badanie przedkliniczne mające na celu ocenę potencjału nośnika oraz bezpieczeństwa jego stosowania w grupie 280 myszy oraz 36 ssaków z rzędu naczelnych. Doopłucnowa administracja nośnika pozwalała na detekcję mRNA dla AAT u naczelnych przez 12 miesięcy od podaży, przy jednoczesnym braku poważniejszych objawów ubocznych prowadzonej terapii [35].

Wykazane w wielu badaniach nad AATD: zdolność do skutecznej i długotrwałej transdukcji różnych komórek oraz bezpieczeństwo stosowania wynikające z optymalizacji nośników opartych na wirusach AAV stały się powodem ich wykorzystania w badaniach klinicznych.

2.2. Supresyjna terapia genowa choroby wątroby wynikającej z AATD

Niedobór AAT to dziedziczna choroba, która nie zawsze manifestuje swoje objawy tylko z układu oddechowego. W części przypadków, najczęściej u dzieci, brak aktywności protekcyjnej AAT dla płuc może wynikać nie tyle ze zmniejszenia syntezy AAT, co nieprawidłowej jej syntezy i fałdowania, a ostatecznie akumulacji w hepatocytach, czemu zawsze towarzyszy uszkodzenie wątroby [37].

W przeważającej części eksperymenty angażujące techniki terapii genowej w leczeniu AATD skupiają się na zapewnieniu prawidłowego

stężenia AAT w płucach. Istnieje natomiast bardzo mało doniesień na temat potencjalnych prób genoterapeutycznych leczenia choroby wątroby, wymagających usunięcia zakumulowanych, błędnie sfałdowanych cząsteczek AAT z hepatocytów.

Nieliczne doniesienia informują o możliwym wykorzystaniu w tym celu interferencji RNA, a w części przypadków także rybozymów w celu wyciszenia ekspresji wadliwych genów u homozygot ZZ na etapie potranskrypcyjnym. Część z tych doniesień informuje o równoległej możliwości odtworzenia protekcyjnego poziomu AAT w surowicy [14, 37-41].

Cruz i wsp. aplikując transgenicznym myszom zdolnym do ekspresji Z-AAT drogą iniekcji do żyły wrotnej, rekombinowany wektor AAV8-3X-siRNA kodujący jednocześnie trzy różne cząsteczki siRNA skierowane przeciw niewielkim regionom eksonów 2, 3 i 4 mRNA dla Z-ATT, osiągnęli blisko 3-krotny spadek poziomu krążącej Z-AAT w surowicy oraz zahamowanie akumulacji nowych monomerów nieprawidłowego białka w hepatocytach zwierząt doświadczalnych [38]. Z kolei Li i wsp. rozszerzyli zamysł poprzedników, o opcję suplementacyjną, mającą na celu obok wyciszenia ekspresji wadliwego genu, równoległe odtworzenie protekcyjnych dla płuc poziomów prawidłowej AAT w surowicy. W tym celu użyto wektora AAV8/shRNA-AAT-opt kodującego równolegle: wyciszające gen Z sekwencje shRNA oraz prawidłowo funkcjonującą M-AAT, której sekwencja została zoptymalizowana w taki sposób aby nie podelgać wyciszeniu przez cząsteczki indukujące proces interferencji. Podobnie jak u poprzedników próby prowadzono na mysich modelach w warunkach in vivo [39].

Wśród metod postulowanych za potencjalnie skuteczne w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji wadliwych genów ująć należy wykorzystanie rybozymów. Podobnie jak w przypadku wektorów indukujących interferencję RNA, użycie w ustalonej linii komórkowej raka wątroby nośnika retrowirusowego kodującego: swoisty wobec wadliwych form Z-AAT rybozym oraz zoptymalizowany gen dla AAT niepodatny na jego działanie, pozwalało na jednoczesne zahamowanie ekspresji wadliwej formy genu i wzrost stężenia formy funkcjonalnej białka [40].

3. Terapeutyczne próby kliniczne AATD prowadzone w oparciu o transfer genów

Do dnia dzisiejszego w rejestrze of the U.S. National Institutes of Health figuruje ponad 50 doniesień o trwających lub zakończonych badaniach klinicznych powiązanych z AATD, natomiast tylko trzy z nich dotyczą prób wykorzystania technik terapii genowej.

Wcześniej przedstawione walory rekombinowanych wektorów opartych na wirusach AAV sprawiły, że jako jedyne z pośród przedstawionych w tym opracowaniu rozwiązań osiągnęły status środka potencjalnie

przydatnego w badaniach klinicznych [19, 24-27, 42]. Przeprowadzone dotąd w I i II fazie tych prób analizy, potwierdziły wcześniej obserwowane w modelach zwierzęcych, bezpieczeństwo ich stosowania [2, 43, 44] .

Oba wymienione badania kliniczne opierały się na wirusowym transferze genu hAAT do komórek mięśniowych osób homo- lub heterozygotycznych pod względem występowania allelu Z i ewentualnie innego warunkującego rozwój AATD. Podstawowa różnica w ich przeprowadzeniu polegała na zastosowaniu różnych nośników genu terapeutycznego oraz ich dawek [2, 43-45].

W pierwszym z badań zapoczątkowanym w roku 2004 i zaprojektowanym przez T.R. Flotte, które jak dotąd osiągnęło I fazę, wykorzystano wektor rAAV2-CB-hAAT. Niestety, tylko u 1 z 12 osób poziom M-AAT oscylował przejściowo niewiele ponad poziomem wykrywalności [43, 45].

Nieco lepsze rezultaty przyniosło kolejne uruchomione w 2006 roku badanie, które do dnia dzisiejszego osiągnęło II etap. W jego początkowej fazie zaproponowano użycie innego nośnika genu terapeutycznego: rAAV1-CB-hAAT. Badanie to miało na celu określić u dziewięciu pacjentów z AATD podzielonych na trzy grupy, poza bezpieczeństwem terapii, także dawki wektora niezbędne do osiągnięcia poziomów terapeutycznych M-AAT. Przy zastosowaniu dawek $2.2x10^{13}$ oraz $6.0x10^{13}$ u części uzyskano stałą ekspresję M-AAT powyżej progu detekcji. Jednak, co trzeba zaznaczyć, wynosiła ona tylko 0,1% wartości terapeutycznej [44]. W roku 2010 uruchomiono drugą fazę badania. Zastosowano w niej inną metodę produkcji wektora niż w fazie pierwszej – wykorzystano system komplementacji ludzkiego wirusa opryszczki. Dalsze analizy wykazały, że poziom ekspresji M-AAT był wyraźnie zależny od dawki wektora i przy najniższej zastosowanej ilości nośnika wirusowego ($6.0x10^{11}$ cząstek/kg) był dwukrotnie wyższy niż u uczestników pierwszej fazy badania [2].

Dane zebrane w przeprowadzonych dotychczas badaniach klinicznych potwierdzają bezpieczeństwo stosowania nośników wirusowych opartych swoją strukturą na wirusach AAV1 oraz AAV2. Konieczne są jednak dalsze prace nad optymalizacją tych metod, odkąd obserwowane poziomy ekspresji M-AAT są wielokrotnie niższe od minimalnych wymaganych stężeń terapeutycznych.

4. Podsumowanie

AAT to jeden z najsilniejszych krążących we krwi inhibitorów proteaz serynowych, którego dziedziczny niedobór prowadzi do groźnych następstw: wczesnego rozwoju rozedmy płuc, a w części przypadków także uszkodzenia wątroby. Osiągalna od 1989 roku terapia AATD polegająca na cotygodniowych dożylnych infuzjach oczyszczonej AAT jest droga i uciążliwa dla pacjenta, dlatego wciąż poszukuje się nowych, tańszych, skuteczniejszych i trwalszych rozwiązań terapeutycznych.

Terapia genowa od dłuższego czasu stwarza atrakcyjną alternatywę dla metod konwencjonalnych. Transfer ludzkiego genu AAT i/lub cząsteczek hamujących ekspresję jej wadliwych form z wykorzystaniem wektorów wirusowych różnego rodzaju, przynosi w modelach zwierzęcych obiecujące rezultaty. Ze względu na swoją niepatogenność oraz sporadyczną integrację z genomem komórki docelowej, szczególnie wektory AAV, stanowią potencjalnie użyteczne narzędzie suplementacyjnej i supresyjnej terapii genowej w AATD. Liczne walory AAV sprawiły, że jako jedyne zostały wykorzystane dotychczas w badaniach klinicznych angażujących techniki terapii genowej. Jednak, pomimo że ich zastosowanie okazało się bezpieczne, poziom ekspresji wprowadzanego za ich pomocą do mięśni transgenu AAT pozostawał na bardzo niskim poziomie, dalekim od minimalnego stężenia terapeutycznego. Uzyskane w próbach klinicznych wyniki zmuszają do optymalizacji zastosowanych rozwiązań.

Pomimo niezadowalających poziomów ekspresji AAT notowanych w przytoczonych badaniach klinicznych, znaczny profil bezpieczeństwa stosowanych rozwiązań powinien zachęcić do dalszego rozwoju metod terapii genowej w leczeniu AATD zgłoszona na Konferencję musi uzyskać pozytywne recenzję pracowników naukowych niebędących współautorami pracy. Komitet Organizacyjny odpowiedzialny jest za wybór recenzentów oraz przekazanie ich wskazówek i uwag do autora korespondencyjnego pracy. Autorzy odpowiadają za dostarczenie poprawionego dzieła do publikacji.

Literatura

1. Dickens J.A., Lomas D.A. *Why has it been so difficult to prove the efficacy of alpha-1-antitrypsin replacement therapy?* Insights from the study of disease pathogenesis, Drug Des Devel Ther, 5 (2011), s. 391-405
2. Flotte T.R., Trapnell B.C., Humphries M., Carey B., Calcedo R., Rouhani F., Campbell-Thompson M., Yachnis A.T., Sandhaus R.A., McElvaney N.G., Mueller C., Messina L.M., Wilson J.M., Brantly M., Knop D.R., Ye G.J., Chulay J.D. *Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing α1-antitrypsin: interim results*, Hum Gene Ther, 22 (2011), s. 1239-1247
3. Cichy J., Potempa J., Travis J. *Biosynthesis of α1-proteinase inhibitor by human-derived epithelial cells*, J Biol Chem, 272 (1997), s. 8250-8255
4. Venembre P., Boutten A., Seta N., Dehoux M.S., Crestani B., Aubier M., Durand G. *Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells*, FEBS Lett, 346 (1994), s. 171-174
5. Geboes K., Ray M.B., Rutgeerts P., Callea F., Desmet V.J., Vantrappen G. *Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in the human small intestine*, Histopathology, 6 (1982), s. 55-60

6. Paakko P., Kirby M., du Bois R.M., Gillissen A., Ferrans V.J., Crystal R.G. *Activated neutrophils secrete stored alpha-1 antitrypsin*, Am J Respir Crit Care Med, 154 (1996), s. 1829-1833
7. Cohen A.B. *Interrelationships between the human alveolar macrophage and alpha-1-antitrypsin*, J Clin Invest, 52 (1973), s. 2793–2799.
8. Laurell C.B., Eriksson S. The electrophoretic α1-globulin pattern of serum in α1-antitrypsin deficiency, COPD, 10 (2013), s. 3-8.
9. Mueller C., Flotte T.R. Gene-Based Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency, Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 10 (2013), s. 44-49.
10. Keeler A.M., Flotte T.R. *Cell and gene therapy for genetic diseases: inherited disorders affecting the lung and those mimicking sudden infant death syndrome*, Hum Gene Ther, 23 (2012), s. 548-556
11. King M.A., Stone J.A., Diaz P.T., Mueller C.F., Becker W.J., Gadek J.E. *α1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT*, Radiology, 199 (1996), s. 137-141
12. Eden E., Mitchell D., Mehlman B., Khouli H., Nejat M., Grieco M.H., Turino G.M. *Atopy, asthma and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency*, Am J Respir Crit Care Med., 156 (1997), s. 68-74
13. Griffith M.E., Lovegrove J.U., Gaskin G., Whitehouse D.B., Pusey C.D. *C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and the P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele*, Nephrol Dial Transplant, 11 (1996), s. 438-443
14. Mueller C., Tang Q., Gruntman A., Blomenkamp K., Teckman J., Song L., Zamore P.D., Flotte T.R. *Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles*, Mol Ther, 20 (2012), s. 590-600
15. Chorostowska-Wynimko J., Niżankowska-Mogilnicka E. *Zasady postępowania diagnostycznego i opieki nad chorymi z wrodzonym niedoborem alfa-1 antytrypsyny*, Pneumonol Alergol Pol, 78 (2010), s. 348-355
16. Ledley F.D., Woo S.L. *Molecular basis of alpha 1-antitrypsin deficiency and its potential therapy by gene transfer*, J Inherit Metab Dis, 9 (1986), s. 85-91
17. Garver R.I. Jr, Chytil A., Karlsson S., Fells G.A., Brantly M.L., Courtney M., Kantoff P.W., Nienhuis A.W., Anderson W.F., Crystal R.G. *Production of glycosylated physiologically "normal" human alpha 1-antitrypsin by mouse fibroblasts modified by insertion of a human alpha 1-antitrypsin cDNA using a retroviral vector*, Proc Natl Acad Sci U S A, 84 (1987), s. 1050-1054
18. Kay M.A., Baley P., Rothenberg S., Leland F., Fleming L., Ponder K.P., Liu T., Finegold M., Darlington G., Pokorny W. *Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (1992), s. 89-93
19. Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G.P., Soulier J., Lim A., Morillon E., Clappier E., Caccavelli L., Delabesse E., Beldjord K., Asnafi V., MacIntyre E., Dal Cortivo L., Radford I., Brousse N., Sigaux F., Moshous D., Hauer J., Borkhardt A., Belohradsky B.H., Wintergerst U., Velez M.C.,

Leiva L., Sorensen R., Wulffraat N., Blanche S., Bushman F.D., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*, J Clin Invest, 118 (2008), s. 132-3142
20. Lemarchand P., Jaffe H.A., Danel C., Cid M.C., Kleinman H.K., Stratford-Perricaudet L.D., Perricaudet M., Pavirani A., Lecocq J.P., Crystal R.G. *Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (1992), s. 6482-6486
21. Rosenfeld M.A., Siegfried W., Yoshimura K., Yoneyama K., Fukayama M., Stier L.E., Pääkkö P.K., Gilardi P., Stratford-Perricaudet L.D., Perricaudet M. *Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo*, Science, 252 (1991), s. 431-434
22. Siegfried W., Rosenfeld M., Stier L., Stratford-Perricaudet L., Perricaudet M., Pavirani A., Lecocq J.P., Crystal R.G. *Polarity of secretion of alpha 1-antitrypsin by human respiratory epithelial cells after adenoviral transfer of a human alpha 1-antitrypsin cDNA*, Am J Respir Cell Mol Biol, 12 (1995), s. 379-384
23. Muzyczka N., Berns K.I. *Parvoviridae*: *The viruses and their replication. w* Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). *Fundamental virology*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2 (2001), s. 1089-1121
24. Grieger J.C., Samulski R.J. *Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications*, Adv Biochem Eng Biotechnol, 99 (2005), s. 119-145
25. Zhang D., Wu M., Nelson D.E., Pasula R., Martin W.J. *Alpha-1-antitrypsin expression in the lung is increased by airway delivery of gene-transfected macrophages*, Gene Ther, 10 (2003), s. 2148-2152
26. Limberis M.P., Wilson J.M. *Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered*, Proc Natl Acad Sci U S A, 103 (2006), s. 12993-12998
27. Chirmule N., Propert K., Magosin S., Qian Y., Qian R., Wilson J. *Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans*, Gene Therapy, 6 (1999), s. 1574-1583
28. Hernandez Y.J., Wang J., Kearns W.G., Loiler S., Poirier A., Flotte T.R. *Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model*, J Virol, 73 (1999), s. 8549-8558
29. Song S., Morgan M., Ellis T., Chesnut K., Wang J., Brantly M., Muzyczka N., Byrne B.J., Atkinson M., Flotte T.R. *Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95 (1998), s. 14384-14388
30. Song S., Embury J., Laipis P.J., Berns K.I., Crawford J.M., Flotte T.R. *Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors*, Gene Ther, 8 (2001), s. 1299-1306
31. De B., Heguy A., Leopold P.L., Wasif N., Korst R.J., Hackett N.R., Crystal R.G. *Intrapleural administration of a serotype 5 adeno-associated virus coding for alpha1-antitrypsin mediates persistent, high lung and serum levels of alpha1-antitrypsin*, Mol Ther, 10 (2004), s. 1003-1010

32. Flotte T.R. *Recombinant adeno-associated virus gene therapy for cystic fibrosis and alpha(1)-antitrypsin deficiency*, Chest, 121 (2002), s. 98-102
33. Heguy A., Crystal R.G. *Intrapleural 'outside-in' gene therapy: therapeutics for organs of the chest via gene transfer to the pleura*, Curr Opin Mol Ther, 7 (2005), s. 440-453
34. De B.P., Heguy A., Hackett N.R., Ferris B., Leopold P.L., Lee J., Pierre L., Gao G., Wilson J.M., Crystal R.G. *High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses*, Mol Ther, 13 (2006), s. 67-76
35. Chiuchiolo M.J., Kaminsky S.M., Sondhi D., Hackett N.R., Rosenberg J.B., Frenk E.Z., Hwang Y., Van de Graaf B.G., Hutt J.A., Wang G., Benson J., Crystal R.G. *Intrapleural administration of an AAVrh.10 vector coding for human α1-antitrypsin for the treatment of α1-antitrypsin deficiency*, Hum Gene Ther Clin Dev, 24 (2013), s. 161-173
36. Halbert C.L., Madtes D.K., Vaughan A.E., Wang Z., Storb R., Tapscott S.J., Miller A.D. *Expression of human alpha1-antitrypsin in mice and dogs following AAV6 vector-mediated gene transfer to the lungs*, Mol Ther, 18 (2010), s. 1165-1172
37. Zern M.A., Ozaki I., Duan L., Pomerantz R., Liu S.L., Strayer D.S. *A novel SV40-based vector successfully transduces and expresses an alpha 1-antitrypsin ribozyme in a human hepatoma-derived cell line*, Gene Ther, 6 (1999), s. 114-120
38. Cruz P.E., Mueller C., Cossette T.L., Golant A., Tang Q., Beattie S.G., Brantly M., Campbell-Thompson M., Blomenkamp K.S., Teckman J.H., Flotte T.R. *In vivo post-transcriptional gene silencing of alpha-1 antitrypsin by adeno-associated virus vectors expressing siRNA*, Lab Invest, 87 (2007), s. 893-902
39. Li C., Xiao P., Gray S.J., Weinberg M.S., Samulski R.J. *Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins*, Proc Natl Acad Sci U S A, 108 (2011), s. 14258-14263
40. Ozaki I., Zern M.A., Liu S., Wei D.L., Pomerantz R.J., Duan L. *Ribozyme-mediated specific gene replacement of the alpha1-antitrypsin gene in human hepatoma cells*, J Hepatol, 31 (1999), s. 53-60
41. Duan Y.Y., Wu J., Zhu J.L., Liu S.L., Ozaki I., Strayer D.S., Zern M.A. *Gene therapy for human alpha1-antitrypsin deficiency in an animal model using SV40-derived vectors*, Gastroenterology, 127 (2004), s. 1222-1232
42. Song S., Witek R.P., Lu Y., Choi Y.K., Zheng D., Jorgensen M., Li C., Flotte T.R., Petersen B.E. *Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice*, Hepatology, 40 (2004), s. 918-924
43. Brantly M.L., Spencer L.T., Humphries M., Conlon T.J., Spencer C.T., Poirier A., Garlington W., Baker D., Song S., Berns K.I., Muzyczka N., Snyder R.O., Byrne B.J., Flotte T.R. *Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alphal-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults*, Hum Gene Ther, 17 (2006), s. 1177-1186
44. Brantly M.L., Chulay J.D., Wang L., Mueller C., Humphries M., Spencer L.T., Rouhani F., Conlon T.J., Calcedo R., Betts M.R., Spencer C., Byrne

B.J., Wilson J.M., Flotte T.R. *Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy*, Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (2009), s. 16363-16368

45. Flotte T.R., Brantly M.L., Spencer L.T., Byrne B.J., Spencer C.T., Baker D.J., Humphries M. *Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults*, Hum Gene Ther, 15 (2004), s. 93-128

Terapia genowa w niedoborze α-1-antytrypsyny

Streszczenie

Niedobór α-1-antytrypsyny to choroba genetyczna przejawiająca się jakościowym bądź ilościowym osoczowym niedoborem głównego inhibitora elastazy neutrofilowej. Rezultatem niedoboru α-1-antytrypsyny jest przedwczesny rozwój rozedmy płuc, a także zależnie od mutacji w genie SERPINA1, i/lub symptomatycznej choroby wątroby skutkującej jej nieodwracalnym uszkodzeniem. Brak jest aktualnie przyczynowych metod leczenia tego niedoboru. Terapia genowa wydaje się stanowić atrakcyjną alternatywę dla aktualnie stosowanej terapii o charakterze suplementacyjnym. Jak dotąd, udowodniono zróżnicowaną skuteczność prób tego rodzaju, wykorzystując m.in. wektory retrowirusowe, adenowirusowe oraz nośniki oparte na genomach wirusów towarzyszących adenowirusom. Te ostatnie, ze względu na swoją niepatogenność oraz indukcje tylko humoralnej odpowiedzi immunologicznej, zostały wykorzystanie w pierwszych próbach klinicznych. Wyniki tych prób, choć wykazywały zadowalający profil bezpieczeństwa metody, charakteryzowały się niską skutecznością, co skłania do kontynuowania badań i optymalizacji metody na rzecz poprawy jej wydajności.

Słowa kluczowe: niedobór α-1-antytrypsyny, terapia genowa, wirusy towarzyszące adenowirusom,

Gene therapy of α-1-antitrypsin deficiency

Abstract

α-1-antitrypsin deficiency is a genetic disorder manifesting by a qualitative or quantitative deficiency of the main inhibitor of neutrophil elastase. The result of α-1-antitrypsin deficiency is the early development of pulmonary emphysema, and also depending on the mutation in the gene SERPINA1, and/or symptomatic liver disease resulting in its irreversible damage. Currently, there are no causal treatment methods of this deficiency. Gene therapy seems to be an attractive alternative for current supplementation therapy. Efficacy of varied attempts with use of, inter alia, retroviral, adenoviral and adeno-associated viral vectors have been proven. Adeno-associated viral vectors, due to their lack of pathogenicity and induction of only a humoral immune response have been used in the first clinical trials. The results of these tests, however revealed a satisfactory safety profile, were also characterized by very low efficiency, what leads to need of further research and optimization of the method.

Keywords: α-1-antitrypsin deficiency, gene therapy, adeno-associated viruses,

Anna Cwynar[1], Alicja Janicka[2], Tomasz Wybranowski[3]

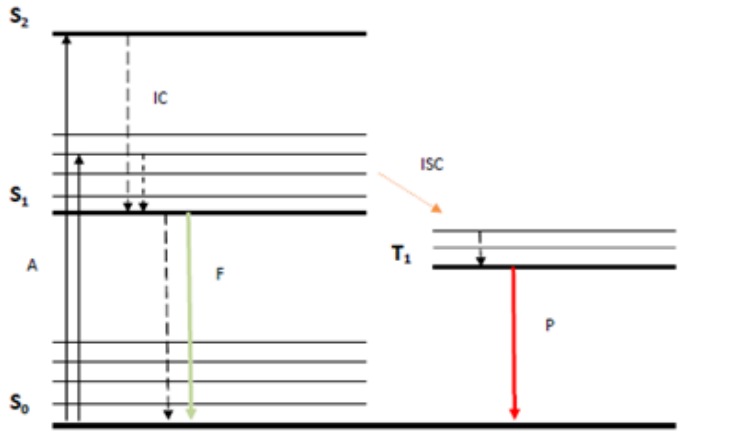
Właściwości fluorescencyjne białek

1. Wstęp

Wprowadzony w 1888 roku przez E. Wiedemana termin luminescencja oznacza emisję światła, które zostało wywołane przez inne czynniki niż wzrost temperatury źródła promieniowania. Można wyróżnić kilka rodzajów luminescencji w zależności od sposobu jej powstawania: chemiluminescencja, fotoluminescencja, elektroluminescencja, krystaloluminescencja czy tryboluminescencja. Fotoluminescencja jest rodzajem luminescencji wywołanej pochłanianiem przez cząsteczki promieniowania elektromagnetycznego. Fotoluminescencję dzielimy na fluorescencję i fosforescencję. Zjawiska te bardzo łatwo można przedstawić graficznie za pomocą diagramu Jabłońskiego (Rys. 1). Aleksander Jabłoński (1898-1980) to wybitny polski fizyk, profesor UMK w Toruniu. Prowadził badania dotyczące optyki atomowej i molekularnej. W 1936r. w czasopiśmie Physik została opublikowana pierwotna wersja jego diagramu [1-3].

Spektroskopia fluorescencyjna jest metodą często stosowaną w badaniach białek. Z analizy widm fluorescencyjnych danej cząsteczki białkowej oraz z ich zależności od różnych czynników środowiskowych (takich jak pH, temperatura, lepkość) można wyciągnąć szereg ciekawych wniosków np. na temat struktury przestrzennej białka czy oddziaływania z innymi cząsteczkami. Białka zawdzięczają swoje właściwości fluorescencyjne obecności w łańcuchu polipeptydowym aromatycznych aminokwasów – tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny [1-4].

[1] anna.cwynar@vp.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej
[2] alicjajanicka@wp.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Studenckie Koło Naukowe Biofizyki przy Zakładzie Biofizyki
[3] tomwyb@cm.umk.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Studenckie Koło Naukowe Biofizyki przy Zakładzie Biofizyki



Rys.1. Diagram Jabłońskiego [opracowanie własne]

Właściwości cząsteczek w stanach elektronowo wzbudzonych (diagram. Jabłońskiego, promieniste i bezpromieniste procesy dezaktywacji stanów). Stany elektronowe: S0 – stany singletowe, T – stan trypletowy; procesy promieniste: A – absorpcja, F – fluorescencja, P – fosforescencja; procesy bezpromieniste: IC – konwersja wewnętrzna, ISC – przejście między-systemowe.

2. Zjawisko fluorescencji

Wszystkie cząsteczki charakteryzują się posiadaniem odpowiednich dla siebie poziomów elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. Energia elektronowa jest ściśle związana z położeniem elektronów oraz z odległością pomiędzy jądrami atomów. Energia oscylacyjna związana jest ze zbliżaniem bądź oddalaniem się atomów, z których zbudowana jest cząsteczka. Natomiast energia rotacyjna związana jest z wykonywaniem ruchów obrotowych cząsteczki [1-3].

W wyniku absorpcji kwantu cząsteczka przechodzi ze stanu podstawowego S0 na wysokoenergetyczny stan wzbudzony i przeważnie jest to nie pierwszy, ale wyższy poziom oscylacyjny danego wzbudzonego stanu elektronowego. Czas przebywania cząsteczki w stanie wzbudzonym jest niezwykle krótki. Może ona powrócić do stanu podstawowego na różne sposoby. Mogą być to przejścia promieniste lub bezpromieniste. Cząsteczka w stanie wzbudzonym ulega relaksacji oscylacyjnej (przejście bezpromieniste) i przechodzi do najniższego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego S1. Następnie może ulec bezpromienistej konwersji wewnętrznej i przejść bezpośrednio do stanu podstawowego S0 o tej samej multipletowości lub przejść do stanu S0 promieniście, emitując energię kwantu hv. Kiedy przejście S1-S0 związane jest z emisja promieniowania

mamy wówczas do czynienia ze zjawiskiem fluorescencji. Cały proces trwa od 10-9 do 10-8 s. [1, 3].

Zgodnie z prawem zachowania energii wartość energii pochłoniętej powinna być równa wartości energii wyemitowanej. Jednak widma absorpcji i fluorescencji tego samego związku chemicznego nie są sobie równe. Widmo fluorescencji jest przesunięte w kierunku fal o większej długości. Przyczyną tego zjawiska jest przejście elektronów, nie z osiągniętego podczas wzbudzenia poziomu oscylacyjnego, ale z najniższego poziomu oscylacyjnego stanu S1. Foton wyemitowany podczas przejścia ze stanu S1 do stanu S0 ma zatem mniejszą energię niż foton wzbudzający. Przesunięcie widma fluorescencji w kierunku dłuższych fal elektromagnetycznych wobec widma absorpcji nosi nazwę przesunięcia Stokes'a i stało się podstawą prawa luminescencji. Ze wzbudzonego stanu singletowego, cząsteczka może przejść na wzbudzony stan tripletowy T1 o innej multipletowości. Jest to tak zwane przejście międzysystemowe. Przejścia promieniste między stanami o różnej multipletowości np. T1-S0 są wzbronione i wiążą się z dłuższym czasem życia cząsteczek w stanie wzbudzonym. Cząsteczka przebywa we wzbudzonym stanie tripletowym tak długo dopóki, pomimo zakazu spinowego, nie powróci promieniście do stanu podstawowego S0. Zjawisko to nosi nazwę fosforescencji i trwa dłużej niż 10-8 s. Po odcięciu źródła światła wzbudzającego świecenie fosforescencyjne trwa o wiele dłużej niż fluorescencyjne [1-4].

Najbardziej istotnymi parametrami opisującymi dany proces dezaktywacji stanu wzbudzonego jest jego wydajność kwantowa i czas życia. Wydajność kwantowa fluorescencji zdefiniowana jest jako stosunek ilości fotonów wyemitowanych w procesie przejścia promienistego ze stanu S1 do S0 do ilości fotonów pochłoniętych w procesie absorpcji. Czas życia stanu wzbudzonego określa średni czas, w którym cząsteczka fluoroforu pozostaje w stanie wzbudzonym przed powrotem do stanu podstawowego. Jest on odwrotnie proporcjonalny do prawdopodobieństwa rozpadu stanu [5].

2.1. Spektroskopia czasowo-rozdzielcza

Zastosowanie rozdzielczej w czasie mikroskopii fluorescencyjnej umożliwia pomiar czasów życia fluorescencji. Metoda ta polega na wzbudzaniu próbki impulsem światła i rejestrowaniu zaniku intensywności fluorescencji [1].

Natężenie fluorescencji maleje z upływem czasu wykładniczo, mechanizm ten opisuje funkcja:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \tag{1}$$

gdzie:

I_0 – natężenie fluorescencji w chwili t=0 (w chwili przerwania wzbudzenia)

T – średni czas życia fluorescencji, po którym natężenie fluorescencji maleje e-krotnie

I(t) – zanik intensywności fluorescencji

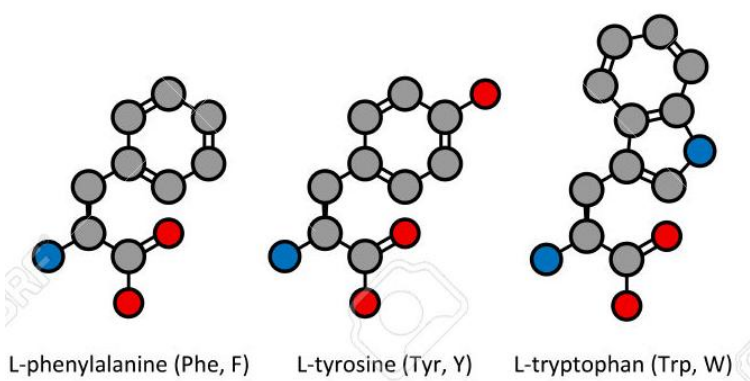
Dla większości fluoroforów czasy życia fluorescencji (czasy życia stanu S_1) są rzędu 10-10 -10-8s. W przypadku fosforescencji, będącej procesem zabronionym ze względu na reguły wyboru, czasy życia mogą osiągać wartości rzędu sekund, a wydajności kwantowe procesu rzadko przekraczają wartość 10 – 6 [6].

3. Właściwości fluorescencyjne białek

Niektóre substancje wśród związków biologiczne czynnych posiadają w swojej budowie tzw. fluorofor, czyli grupę funkcyjną zdolną do absorpcji energii o określonej długości fali, a później do wyemitowania światła. Do grupy substancji zdolnych do fluorescencji należą między innymi [6]:

- aminokwasy aromatyczne: tryptofan, tyrozyna, fenyloamina
- zasady nukleinowe w DNA i RNA: adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl
- barwniki roślinne: chrofile, bakteriochlorofile i karotenoidy
- witaminy i hormony: np. ryboflawina

Naturalnymi fluoroforami występującymi w białkach są aromatyczne reszty aminokwasowe: fenyloalanina (Phe), tyrozyna (Tyr) i tryptofan (Trp) (Rys. 2.) [7].



Rys. 2. Wzory strukturalne chromoforów występujących w białkach

Fluorescencja tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny przypada na zakres bliskiego ultrafioletu. Maksimum absorpcji i emisji aromatycznych reszt ww. aminokwasowych przedstawiono w Tab. 1.

Tabela 1. Maksima absorpcji i emisji aromatycznych reszt aminokwasowych [1]

	Maksimum absorpcji	Maksimum emisji
Fenyloalanina	260 nm	282 nm
Tyrozyna	275 nm	304 nm
Tryptofan	295 nm	353 nm

Decydującą rolę dla fluorescencji białek odgrywają reszty tryptofanu. Fluorescencja pochodząca od tyrozyny jest w znacznym stopniu wygaszona, przede wszystkim w wyniku bezpromienistego rezonansowego przeniesienia energii między tyrozyną a tryptofanem. Natomiast emisję pochodzącą od fenyloalaniny obserwuje się w niewielu przypadkach [6, 8].

3.1. Właściwości emisji fluorescencji tryptofanu

Reszta tryptofanowa znalazła szerokie zastosowanie w szeregu badań wykorzystujących metody fluorescencyjne, które zawdzięcza swoim szczególnymi właściwościom, takim jak [9, 10]:

- wysokiej wydajność kwantowej procesu fluorescencji wynoszącej 0.13 w wodzie w 23ºC;
- wysokiemu molowemu współczynniku absorpcji;
- dużemu przesunięciu widma emisji w stosunku do pasma absorpcji;
- czułości własności fluorescencyjnych na polarność mikrootoczenia;
- niskiej częstości występowania w składzie aminokwasowym białek, co ułatwia interpretację danych pomiarowych;
- zdolności do selektywnego wzbudzenia w paśmie absorpcji powyżej 295 nm. W tym zakresie wzbudzaniu nie ulegają reszty fenyloalaniny i tyrozyny;
- wysokiej anizotropii fluorescencji, przydatnej do badania procesów dyfuzji rotacyjnej makrocząsteczek;
- wyjątkowej wrażliwość na procesy kontrolowanego dyfuzyjnie bimolekularnego gaszenia fluorescencji. Reszta tryptofanowa w stanie wzbudzonym jest efektywnym donorem elektronów uczestniczących w tych procesach.

Fluorescencja tryptofanu pochodzi od obecnego w jego budowie pierścienia indolowego. Maksimum emisji fluorescencji tryptofanu występuje przy ok. 355 nm w roztworze wodnym o pH obojętnym. Wartość ta jest uzależniona od polarności mikrootoczenia fluoroforu, co w przypadku protein jest determinowane lokalizacją reszty tryptofanowej w przes-

trzennej strukturze cząsteczki. Fluoroforu usytułowany na powierzchni białka, wyeksponowanego do środowiska, posiada maksimum emisji nie odbiegające od wartości wymienionej wyżej. W przypadku gdy reszty tryptofanowe zlokalizowane są w hydrofobowym wnętrzu matrix białkowego dochodzi do przesunięcia maksimum fluorescencji w kierunku fal krótszych. Wyniki badań dotyczące czasowo-rozdzielczych właściwości emisji fluorescencji tryptofanu pokazują, iż w zdecydowanej większości przypadków, zarówno w roztworze wodnym jak i w białkach, jest ona wysoce heterogeniczna. Oznaczając czasy życia fluorescencji tryptofanu przeważnie korzysta się z modelu zakładającego eksponencjalny rozpad stanów wzbudzonych fluoroforu. Model zakładający monoeksponencjalny zanik natężenia fluorescencji białka w czasie spełniony jest w stosunkowo rzadkich przypadkach [9, 10].

Tryptofan w roztworze wykazuje heterogeniczną fluorescencję, którą niekiedy staje się niemożliwa do opisania nawet jako suma epsponencjalnych składników. W roztworze o pH 7 tryptofan występuje w formie jonu obojnaczego z uprotonowaną grupą aminową – NH_3^+ i zjonizowaną grupą karboksylową $–CO_2^-$. W takich warunkach środowiskowych zanik fluorescencji tryptofanu staje się dwueksponencjalny z czasami życia 3.1 ns i 0.53 ns. Widma emisyjne odpowiadające tym dwóm składowym różnią się od siebie w istotnym stopniu. Krótkożyciowa składowa charakteryzuje się widmem emisyjnym przesuniętym w stronę fal krótszych z maksimum przy ok. 335 nm, z kolei składowa długożyciowa posiada maksimum przy ok. 350 nm. Istnienie dwóch czasów życia fluorescencji tłumaczy się występowaniem rotamerów – izomerów rotacyjnych tryptofanu. Spowodowane jest to możliwością rotacji bocznych grup tryptofanu wokół wiązania Cα – Cβ. Dodatkowym utrudnieniem wpływającym na obraz fluorescencji reszt tryptofanowych w białkach jest fakt występowania szeregu procesów wpływających na właściwości emisyjne fluoroforu. Wyróżnić można przede wszystkim oddziaływania z pozostałymi resztami łańcucha polipeptydowego uwarunkowane strukturą przestrzenną najbliższego mikrootoczenia chromoforu oraz dynamiczne procesy prowadzące do dezorganizacji tej struktury w nanosekundowej skali czasowej [9-11].

3.2. Fluorescencja grup prostetycznych

Fluorescencja białek może pochodzić nie tylko z łańcuchów bocznych aminokwasów, ale również od niebiałkowych składników protein – grup prostetycznych. Porfiryny należą do typowych grup prostetycznych, które wykazują silną emisję światła w długofalowym zakresie światła widzialnego. Energia oraz wydajność kwantowa tej emisji jest zależna od rodzaju jonu centralnego, w mniejszym stopniu od obecności dodatkowego liganda aksjalnego. Większość jonów metali otwartopowłokowych wygasza fluorescencję tetra pirolu [12].

3.3. Wkorzystanie pomiarów emisji do oceny wiązania jonu metalu przez porfiryny

Porfiryny stanowią bardzo ważną grupę naturalnie występujących związków, które biorą udział w różnych ważnych procesach biologicznych takich jak np. transportu tlenu, fotosynteza czy rożne przemiany katalityczne. Porfiryny to pochodne porfiny. Podstawową strukturę makrocyklu porfinowego tworzy 16 atomów w tym cztery atomy azotu. Porfinę można opisać jako makrocykliczne związki, utworzone z czterech pierścieni pirolowych, połączonych jednowęglowymi mostkami metinowymi. Zastąpienie dwu atomów wodoru w porfirynie na kation metalu prowadzi do powstania metaloporfiryny. Do najbardziej powszechnych metaloporfiryn należą związki Fe, Co, Zn, Ni. Przykładami porfiryn o szczególnym znaczeniu w układach biologicznych są hem i chlorofile. Addycja centralnego jonu metalu do cząsteczki protoporfiryny IX, determinuje dalsze przekształcenie porfiryny albo w kierunku hemu, albo chlorofili. Witamina B12 to kompleks kobaltu zawierający ligand korynowy, o strukturze zbliżonej do porfiryny [13, 14].

Żelazoprotoporfiryna, czyli hem to grupa prostetyczna wszystkich hemoprotein, do których należą hemoglobiny, mioglobina, cytochromy i niektóre enzymy takie jak katalaza oraz peroksydaza. Chlorofile i feofityny (chlorofile pozbawione centralnego atomu magnezu) występują w aparacie fotosyntetycznym [13, 14].

Zdolność metaloporfiryn do wiązania gazów znalazła zastosowanie w konstruowaniu sensorów zbudowanych z filmu porfiryny na powierzchni metalu lub półprzewodnika. Właściwości porfiryn znalazły również zastosowanie przy wytwarzaniu baterii słonecznych oraz w katalizie chemicznej. Ma to związek z intensywną absorpcją promieniowania widzialnego przez porfiryny. Związki kompleksowe zawdzięczają swą barwę przejściom elektronowym z udziałem elektronów d metalu. Przejścia między orbitalami d są wzbronione ze względu na symetrię i charakteryzują się małą intensywnością. W przypadku kompleksów porfirynowych, widma absorpcyjne są zdominowane przez intensywne pasma odpowiadające przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ w ligandzie porfirynowym [13].

W naturalnych układach biologicznych inercja jonu metalu prowadząca do utworzenia metaloporfiryny następuje na etapie, w którym pierścień tetrapirolowy jest już w pełni ukształtowany. Ze względu na szczególną sztywności pierścienia makrocyklicznego oddziaływującego z biopolimerami wiązanie jonu centralnego jest znacznie utrudnione. Tworzenie kompleksu wymaga więc uczestnictwa wyspecjalizowanych enzymów – chelataz. Zakłada się, że ich aktywność związana jest ze zdolnością przejściowej deformacji makrocykla. Dla szeregu jonów metali obserwuje

się samorzutne tworzenie kompleksów z ligandami tetrapirolowymi w roztworach. Śledzenie tych reakcji jest łatwe dzięki możliwości wykorzystania technik spektroskopii optycznych UV-vis. Obok zmian absorpcji wyrażających się m.in. w przesunięciu pasma Soreta i pasm Q zauważalne są wyraźne zmiany właściwości emisyjnych porfiryny. Wiązanie metalu powoduje przesunięcie pasma a w wielu przypadkach całkowite wygaszenie fluorescencji [13].

4. Białko zielonej fluorescencji GFP

Green fluorescent protein – czyli GFP, jest białkiem pochodzącym z meduzy *Aquorea victoria*. To nieduże (25,9 kDa) fluorescencyjne białko, występujące naturalnie u meduzy *Aequorea victoria*, odkryli już w 1962 r. Shimomura i wsp., jednak jako znacznik biologiczny znalazło zastosowanie dopiero 30 lat później. GFP świeci na zielono w ultrafiolecie. Złożone jest z 238 aminokwasów o strukturze beta-harmonijek tworzących strukturę beta-baryłki, w środku której znajduje się chromofor zbudowany z trzech aminokwasów Ser65-Tyr66-Gly67 poddanych posttranslacyjnej cyklizacji i oksydacji [15, 16].

Rys. 3. Fluorescencyjna meduza – *Aequorea victoria* [17]

Zastosowanie białka zielonej fluorescencji GFP w biologii komórki rozpoczęło rozwój technologii znaczników fluorescencyjnych. Główną zaletą zastosowania GFP jest możliwość obserwacji białek, kompleksów oraz określonych fragmentów chromosomów w żywej komórce w czasie rzeczywistym. GFP nie tylko pozwala na badanie żywych układów, ale również ulega w nich ekspresji. Niestety GFP i jego pochodne nie są toksyczne dla bakterii i organizmów eukariotycznych. Ponadto wadą GFP jest tendencja do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów, przeważnie w wyższych temperaturach, a fuzja z GFP może zaburzać strukturę natywną analizowanego białka, prowadząc do zmiany jego funkcjonalności i lokalizacji [15, 16].

5. Podsumowanie

Właściwości fluorescencyjne białek są wynikiem obecności w łańcuchach polipeptydowych trzech aminokwasów: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny. Fluorescencja białek zależy od ich struktury, warunków środowiska oraz oddziaływań z innymi cząsteczkami. Wygaszanie fluorescencji jest bardzo często obserwowane podczas tworzenia kompleksów białko-ligand. Efekt ten jest wykorzystywany do oceny struktury przestrzennej białka. Białka fluorescencyjne GFP stanowią nieocenione narzędzie w biologii molekularnej. Umożliwiają badanie układów żywych, obserwacje lokalizacji molekuły w komórce oraz jej zmian konformacyjnych pod wpływem czynników środowiskowych.

Literatura

1. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer. (2006), USA
2. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2010
3. Jóźwiak Z., Bartosz G. *Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005
4. Atkins P.W. *Postawy chemii fizyczne.*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009
5. Drozdowska V., *Badanie zmienności widm fluorescencyjnych powierzchniowych wód morskich metodą lidarową,* Rozprawa Doktorska, 2005, s. 11-12
6. Suppan P. *Chemia i światło*, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 1997
7. http://pl.123rf.com/photo_32093642_aminokwasy,-struktury-chemiczne:-glicyna,-alanina,-walina,-leucyna,-izoleucyna,-seryna,-treonina,-cy.html
8. Bryszewska M., Leyko W. *Biofizyka dla biologów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997
9. Krętel A. *Biarsenical probes for specific and multifunctional modification of proteins*, Postępy Biochemii, 60 (2014), s. 102-110
10. Chen R.F, Knutson J.R, Ziffer H., Porter D. *Fluorescence of tryptophan dipeptides: correlations with the rotamer model,* Biochemistry, 30 (1991), s. 5184-5195
11. James T. Callis V, Callis P.R. *Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins,* Biophysical Journal. 80 (2001), s. 2093-2109
12. http://www2.if.uj.edu.pl/pl/ZF/qnog/tutorials/MgrGrzegorzGlaczynski.pdf
13. Pasiewicz-Sokół A. *Synteza i badania właściwości fizykochemicznych wybranych pochodnych tetra-aryloporfiryn,* Rozprawa Doktorska, 2010, s. 8, 9, 22
14. Żak I. *Chemia medyczna,* Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001, s. 297-306
15. Donczew M., Gindal K., Zakrzewska-Czerwińska J., Jakimowicz D. *Solving the mysteries of the bacterial cell – application of novel techniques in fluorescence microscopy*, Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej. 65 (2011), s. 114-123
16. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/advanced-chemistryprize2008.pdf
17. http://www.nature.com/news/1999/991208/full/news991209-7.html

Właściwości fluorescencyjne białek

Streszczenie

Fotoluminescencja jest rodzajem luminescencji wywołanej pochłanianiem przez cząsteczki promieniowania elektromagnetycznego. Fotoluminescencję dzielimy na fosforescencję i fluorescencję . Fluorescencja jest szybkim procesem fotofizycznym, zachodzącym w czasie ~10^8 s. Obecność w łańcuchu polipeptydowym białka aromatycznych aminokwasów: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny powoduje, iż białko to ma właściwości fluorescencyjne. Reszty tryptofanu odgrywają decydującą rolę dla fluorescencji białek. Fluorescencja pochodząca od tyrozyny jest w znacznym stopniu wygaszona, w wyniku bezpromienistego rezonansowego przeniesienia energii między tyrozyną a tryptofanem. W niewielu przypadkach możemy zaobserwować emisję pochodzącą od fenyloalaniny. Spektroskopia fluorescencyjna jest metodą często stosowaną w badaniach białek. Z analizy widm fluorescencyjnych danej cząsteczki białkowej oraz z ich zależności od różnych czynników środowiskowych można wyciągnąć szereg ciekawych wniosków np. na temat struktury przestrzennej białka czy oddziaływania z innymi cząsteczkami.

Słowa kluczowe: spektroskopia fluorescencyjna, aminokwasy aromatyczne, tryptofan

The fluorescent properties of proteins

Abstract

Photoluminescence is a type of luminescence caused by the absorption of particles of electromagnetic radiation. Photoluminescence is divided into phosphorescence and fluorescence. Fluorescence is a fast photo -physical process, that occurs in ~ 10^{-8} s. The presence of the protein polypeptide concatenation of the aromatic amino acids: tryptophan, tyrosine and phenylalanine gives the protein fluorescent properties. Tryptophan residues play a decisive role for the protein fluorescence. Fluorescence derived from tyrosine is substantially extinguished, mainly due non-radiative resonance energy transfer between tryptophan and tyrosine. In a few cases we can observe the emission derived from phenylalanine. Fluorescence spectroscopy is a method commonly used in the study of proteins. The analysis of the fluorescence spectra of the protein molecules and their dependence on various environmental factors can draw a number of interesting conclusions for example on the spatial structure of the protein or interaction with other molecules.

Key words: fluorescence spectroscopy, aromatic acids, tryptophan

Adrian Krajewski[1], Edyta Simińska[2], Arkadiusz Goede[3]

Cykliny i kinazy zależne od cyklin – nie tylko regulatory cyklu komórkowego

1. Wprowadzenie

Choroba nowotworowa, w bardzo dużym uproszczeniu, jest zaburzeniem wynikającym z niesprawności systemów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Ze względu na swoją kluczową rolę w progresji cyklu, cykliny jak i kinazy zależne od cyklin (CDKs, Cyclin Dependent Kinases), stanowią bardzo ważny element, którego dokładne poznanie przybliża nas do odpowiedzi, czym tak naprawdę jest proces nowotworowy i w jaki sposób komórka wymyka się spod kontroli mechanizmów zabezpieczających przed nadmierną proliferacją. Nowe badania wskazują, że białka, których kanoniczną funkcją jest regulacja cyklu komórkowego, biorą udział także w wielu innych, zróżnicowanych procesach, które opowiadają za utrzymanie homeostazy komórkowej. Cykliny jak i kinazy, mogą wpływać na ekspresję genów działając jako czynniki transkrypcyjne, utrzymują stabilność genomu pośrednicząc w naprawie uszkodzeń DNA, a nawet wpływają na procesy związane z metabolizmem. Niniejszy rozdział ma na celu przedstawienie niektórych, niezwiązanych bezpośrednio z procesem kontroli cyklu komórkowego, funkcji jakie mogą pełnić kinazy cyklinozależne i cykliny.

2. Regulacja cyklu komórkowego

Od właściwego przebiegu cyklu komórkowego, zależy prawidłowe funkcjonowanie komórek i ich podział, w wyniku którego – w przypadku jednokomórkowców – powstają nowe organizmy, natomiast niezliczone podziały w organizmach wielokomórkowych, prowadzą do rozwoju skomplikowanych struktur tworzących tkanki i narządy. Cykl komórkowy, to seria ściśle kontrolowanych, następujących po sobie zdarzeń,

[1] Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; krajewski.adrian@wp.pl
[2] Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
[3] Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

odpowiedzialnych, za prawidłowy podział komórki macierzystej na dwie komórki potomne. Zasadniczo, eukariotyczny cykl komórkowy, można podzielić na cztery fazy – fazę G1, S, G2 i M. Punkty G1, S i G2 wspólnie określa się jako interfazę. Ponadto, wyróżnia się jeszcze fazę G0, kiedy to komórka po fazie G1 nie decyduje się na dalszą progresję cyklu i przechodzi w stan spoczynkowy. W fazie G1 dochodzi do wzrostu komórki oraz gromadzenia sygnałów mitogennych i antyproliferacyjnych, których działanie powoduje przejście komórki do fazy S lub zatrzymanie w fazie G0. W fazie S, następuje replikacja materiału genetycznego oraz synteza niezbędnych do tego białek. Faza G2 będąca przerwą pomiędzy fazą S i M, jest czasem, w którym komórka przygotowuje się do podziału na dwie komórki potomne w fazie M [1]. Przejście z jednej fazy cyklu komórkowego do drugiej, odbywa się pod kontrolą ogromnej ilości białek, czuwających nad tym, aby wszystkie procesy przebiegały w ściśle określonej kolejności i w odpowiednim czasie. Punkty w których komórka upewnia się, czy wszystkie warunki niezbędne do przejścia z jednej fazy cyklu do drugiej zostały spełnione nazywane są punktami kontrolnymi (ang. checkpoints). Wyróżniamy 4 punkty kontrolne: punkty G1/S i G2/M, których aktywacja zapobiega rozpoczęciu przez komórkę procesów syntezy DNA i mitozy oraz wewnętrzne punkty kontrolne fazy S i M nadzorujące przebieg dwóch wymienionych powyżej zdarzeń [2]. W punkcie kontrolnym G1/S sprawdzana jest integralność materiału genetycznego oraz stan metaboliczny komórki. W momencie wykrycia uszkodzenia DNA, dalsza progresja cyklu komórkowego, jest zatrzymywana i uruchamiane są procesy mające na celu naprawę DNA, a jeżeli zmiany są na tyle poważne, że okazuje się to niemożliwe, komórka kierowana jest na drogę apoptozy [3]. Wewnętrzny punkt kontrolny fazy S odpowiada, za zwolnienie tempa w jakim poruszają się widełki replikacyjne, w przypadku pojawienia się fizycznych uszkodzeń DNA w trakcie replikacji. W czasie punktu kontrolnego G2/M, dochodzi do sprawdzenia wierności kopii DNA, co ma na celu upewnienie się, że nowopowstałe komórki pozbawione będą błędów, które mogą doprowadzić do śmierci komórki, bądź zainicjować proces nowotworzenia. Proces mitozy, który składa się z dwóch następujących po sobie zdarzeń: kariokinezy, czyli podziału jądra komórkowego oraz cytokinezy – podziału cytoplazmy wraz z organellami, jest kontrolowany przez wewnętrzny punkt kontrolny fazy M tzw. punkt kontroli wrzeciona podziałowego. Jest on niezbędny do tego, aby istniała pewność, co do prawidłowego połączenia chromosomów z wrzecionem mitotycznym i ich odpowiedniej segregacji [4]. Za prawidłową, w pełni zsynchronizowaną progresję, przez kolejne etapy cyklu komórkowego odpowiadają setki białek, połączonych ze sobą niezwykle złożoną siecią wzajemnych odziaływań, których natura nie jest w pełni poznana. Wydaje się jednak, że kluczową rolę w procesie przejścia komórki przez kolejne fazy cyklu komórkowego odgrywają kompleksy kinaz cyklinozależnych (CDKs) oraz

cyklin, białka supresorowe z rodzin INK: $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ and $p19^{INK4d}$ oraz inhibitory kinaz z rodziny Cip/Kip: $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$ [5]. Kinazy cyklinozależne, należą do grupy kinaz serynowo-treoninowych, które katalizują progresję cyklu komórkowego. Aktywacja każdej kinazy, zachodzi w innym punkcie cyklu komórkowego, a odbywa się ona poprzez związanie odpowiedniej podjednostki zwanej cykliną, która fosforyluje treoninę w miejscu aktywnym białka. Ilość kinaz w komórce w czasie cyklu komórkowego nie ulega większym zmianom, a modyfikacja ich aktywności zależy od stężenia właściwej dla danej CDK cykliny. To właśnie cyklicznym wahaniom stężenia cykliny zawdzięczają swoją nazwę. Cykliny możemy podzielić, na cykliny fazy G1 (cyklina D, wiążąca się z CDK4/6), cykliny G1/S (cyklina E – CDK2), cykliny S (cyklina A – CDK2/1) i cykliny fazy M (cyklina B – CDK1) [1]. Cykl rozpoczyna się, gdy komórka znajdująca się w fazie stacjonarnej otrzymuje wewnętrzny lub zewnętrzny sygnał do rozpoczęcia proliferacji. Wówczas, w wyniku działania czynników wzrostu, gwałtownie zwiększa się stężenie cykliny D1, która przy udziale białek z rodziny Cip/Kip (będących jednocześnie inhibitorami CDK2), wiąże się z kinazami CDK4 i CDK6. Aktywny kompleks fosforyluje białko pRB unieczyniając je. Niektywne pRb uwalnia związany z nim czynnik transkrypcyjne E2F, który uczynnia geny kodujące białka niezbędne do przejścia w fazę S m. in. cykliny E1 i E2, cyklinę A i CDK2. CDK2 w aktywnym kompleksie z cykliną E, całkowicie inaktywują białko pRB, poprzez jego hiperfosforylację, co jeszcze bardziej zwiększa aktywność E2F maksymalizując ekspresję genów dla cyklin A i B. Fosforylacji ulegają także białka odpowiedzialne, za modyfikację histonów, replikację i naprawę DNA oraz duplikację centrosomu. Rosnące stężenie cykliny A, pozwala na przejście z fazy G1 do S, dodatkowo w celu uniknięcia powtórnej replikacji, już powielonego materiału genetycznego, degradacji ulega cyklina E. W jej miejsce z CDK2 wiąże się z cyklina A, a aktywny kompleks powoduje fosforylację czynnika E2F co skutkuje ponownym związaniem go przez białko Rb. W czasie trwania fazy G2, degradacji ulega kompleks CDK2-cyklina A, natomiast cyklina B, łączy się z CDK1, tworząc tak zwany czynnik promujący mitozę MPF (ang. Mitosis Promoting Factor). Aktywność tego kompleksu skutkuje fosforylacją wielu białek, które są zaangażowane w procesy niezbędne do przepro-wadzenia mitozy, takie jak kondensacja chromatyny, przerwanie otoczki jądrowej, utworzenie wrzeciona podziałowego i segregacja chromosomów. Zanim rozpocznie się mitoza, cyklina B jest ubikwitynowana i degradowana, na drodze proteasomalnej. Po zakończonej mitozie, komórka pozostaje w fazie G0 lub po otrzymaniu kolejnego sygnału mitogennego rozpoczyna kolejny cykl komórkowy [6].

3. Udział cyklin i CDKs w procesach innnych niż regulacja cyklu komórkowego

3.1. Naprawa DNA

Jak już wcześniej wspomniano, cykl komórkowy podzielony jest punktami restrykcyjnymi w których komórka sprawdza prawidłowość wszystkich procesów i gotowość do przejścia w kolejną fazę. W przypadku wystąpienia nieprawidłowości, różnorakie regulatory powodują zatrzymanie proliferacji. Ostatnie badana pokazują, że cykliny, inhibitory kinaz i same kinazy mogą w sposób bezpośredni modulować procesy związane z naprawą DNA i zachowaniem integralności genomu. W przypadku zablokowania się widełek replikacyjnych, cyklina E1 ulega akumulacji, co zapobiega oddysocjowaniu białka Cdc6, co z kolei promuje aktywację Chk1 i inicjację szlaku naprawy DNA związanej ze stresem replikacyjnym [7]. Z kolei cyklina D1 bierze udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA (DSBs – double strand breaks), rekrutując Rad51, który z kolei aktywuje szlak naprawy DNA związany z homologiczną rekombinacją. Ponadto podwójne pęknięcia mogą zostać naprawione na drodze niehomologicznego łączena końców (NHEJ – *non-homologous end-joining*) [8]. Takie działanie cykliny D1 jest uniezależnione od aktywności CDKs, a same kinazy są również zaangażowane w procesy naprawy. Cdk1 w komórkach drożdży fosforyluje białka Sae2 i Dna2, co inicjuje pierwszy etap homologicznej rekombinacji, czyli wycięcie DNA na końcach 5’ oraz bierze udział we wstępnym etapie wyboru odpowiedniej ścieżki naprawy DNA [9,10]. Zależne od cyklu komórkowego fluktuacje w aktywności Cdk1 mogą tłumaczyć, dlaczego homologiczna rekombinacja wymagająca obecności dwóch chromatyd siostrzanych, ma miejsce w fazie G2/M, gdzie w fazie G1 mechanizmem naprawy jest NHEJ. Stosunkowo niedawno odkryto znaczącą rolę regulatorów cyklu w naprawie pęknięć DNA w neuronach. Postmitotyczne komórki neuronów przechodzą z fazy G0 do G1 w celu aktywacji NHEJ. Przejście z fazy spoczynkowej kontrolowane jest przez kompleks Cdk3/cyklina C, który fosforyluje Rb. Ta modyfikacja jest wystarczająca do przejścia fazy G1, jednakże nie umożliwia wejścia w fazę S, co mogłoby skutkować zainicjowaniem procesu apoptozy. Ze względu na dużą żywotność neuronów, narażone są one na powstawanie uszkodzeń indukowanych m.in. przez wolne rodniki, dlatego też efektywna ich naprawa jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania tych komórek. Opisany mechanizm może być zatem swoistym wentylem ubezpieczeństwa, pozwalającym na naprawę uszkodzeń, bez groźby skierowania komórki na ścieżkę śmierci [11]. Kompleks Cdk9/cyklina K odziałuje z białkami Atr i Atrip i klaspiną, redukując zapadnięcia się widełek replika-

cyjnych w przypadku ich zablokowania. Ponadto Cdk12/cyklina K regulują transkrypcję niektórych genów zaangażowanych w naprawę DSBs [12, 13]. Nieprawidłową ekspresję Cdk12 obserwuje się m.in w raku jajnika [14]. Coraz więcej danych wskazuje na ogromną rolę cykliny F w procesach związanych z naprawą DNA i utrzymaniem stabilności genenomu. Cyklina F jest pierwszym białkiem w którym zidentyfikowano domenę F-box. Od pozostałych cyklin odróżnia ją fakt, że nie posiada ona swojego katalitycznego partnera w postaci kinazy cyklinozależnej [15]. Cyklina F stanowi funkcjonalną podjednostkę kompleksu SCF biorącego udział w ubikwitynacji różnych celów molekularnych. Jednym z nich jest RRM2 (ribonucleotide reductase family member 2), która jest niezbędna do funkcjonowania reduktazy rybonukleotydowej (RNR). RNR jest odpowiedzialna za konwersję rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów, co jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu replikacji DNA oraz jego naprawy. RRM2 jest ubikwitynowana nastepnie degradowana w fazie G2 w celu zachowania odpowiedniej puli dNTP [16]. Badania wykazały, że gdy RRM2 nie ulega degradacji, co osiągnięto wyciszając ekspresję cykliny F lub wprowadzając do komórek formę RRM2 odporną na cyklinę F, w znaczący sposób zwiększa się częstotliwość występowania mutacji i niestabilności genomowych. Ponadto uszkodzenia DNA generowane przez różne czynniki, m.in. doksorubicynę, promieniowanie UV, promieniowanie gamma, czy kamptotecyne, powodowały zależną od ATR, zmniejszoną ekspresję cykliny F i akumulację RRM2. Co ważne, nieprawidłowa eliminacja cykliny F, zapobiegała indukowanej uszkodzeniem DNA akumulacji RRM2, opóźniała naprawę DNA i uwrażliwiała komórki na dalsze uszkodzenia, co wszystko razem promowało śmierć komórki. Fenotyp ten zanikał w momencie wprowadzenia odpornych na degradację form RRM2 [16].

3.2. Regulatory cyklu a zmiany epigenetyczne

Część białek biorących udział w regulacji cyklu komórkowego, może wpływać także na ekspresję genów poprzez modulowanie procesów epigenetycznych. Cdk1 i Cdk2 zwiększają aktywność kompleksu PRC2 (Polycomb repressive complex 2), odgrywającego kluczową rolę w globalnym wyciszeniu transkrypcji poprzez metylację histonu H3K27. Cdk1 i Cdk2 powodują ufosforylowanie treoniny 350 w podjednostce kompleksu PRC2 – Ezh2 (Enhancer of zeste homolog 2), co skutkuje zwiększoną efektywnością metylotransferazy i skuteczniejszym wyciszeniem transkrypcji. Najwyższą aktywność wspomniane kinazy wykazują w fazie S i M, zatem zwiększenie efektywności metylacji w tym okresie powoduje pewność, że wzór metylacji histonów, po kolejnym podziale komórkowym,

będzie wiernie odtworzony na nowopowstałej nici DNA [17,18]. Z kolei inne doniesienia mówią o tym, że fosforylacja treoniny znajdującej się w pozycji 487, wywiera zupełnie odwrotny wpływ na działanie podjednostki Ezh2, uniemożliwiając jej połączenie z innymi komponentami kompleksu PRC2, m. in. Hotair i Xist, odpowiedzialnymi za rozpoznawanie metylowanego loci. Skutkiem tego była zmniejszona ilość metylowanego histonu H3K27 i indukcja różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych [19]. Z kolei cyklina D1 wraz z Cdk4 znacząco zwiększała metylację histonów H3 i H4, poprzez fosforylację białka Mep50, która zwiększała aktywność kompleksu Mep50/Prmt5 (Protein arginine methyltransferase 5) [20].

3.3. Regulatory cyklu jako czynniki transkrypcyjne

Białka cyklu komórkowego mogą regulować proces transkrypcji oddziałując bezpośrednio z chromatyną lub białkami zaangażowanymi w proces przepisywania informacji genetycznej do mRNA. Jednym z najlepszych przykładów takiej aktywności jest opisany w pierwszej części szlak Rb/E2F. Ponadto, kompleksy kinaz i cyklin mogą regulować działanie RNA polimerazy II, poprzez fosforylowanie jej końca karboksylowego (CTD – carbonyl terminal domain) [22-24]. Kontrola transkrypcji odbywa się w analogiczny sposób do nadzoru nad cyklem komórkowym. Na proces transkrypcji składa się seria następujących po sobie zdarzeń, które wymagają ścisłej kontroli i upewnienia się, czy poprzedni etap został prawidłowo przeprowadzony. Udział cyklin i kinaz w fosoforylacji CTD polimerazy, został odkryty już pod koniec lat osiemdziesiątych, a późniejsze doniesienia, dotyczące nowych cyklin i kinaz, przyniosły kolejne dane na temat kontroli transkrypcji przez te białka. Niedawno odkryta cyklina K wraz z Cdk12 i Cdk13 pośredniczą w procesie fosforylacji CTD. Największym wyzwaniem w kolejnych latach jest zidentyfikowanie tego, w jaki sposób wzór fosforylacji CTD ma przełożenie na regulowanie aktywności polimerazy [12, 21]. O ile kontrola cyklu komórkowego jest wielopoziomowa i zaopatrzona w szereg mechanizmów kompensacyjnych, wydaje się, że brak cyklin i kinaz zaangażowanych w kontrolę transkrypcji jest letalny na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego. Taką prawidłowość zaobserwowano w przypadku Cdk7, Cdk8, cykliny H, cykliny K, czy cykliny T2 [22-24]. Poza zaangażowaniem w procesy bezpośrednio związane z transkrypcją, cykliny i kinazy mogą modulować aktywność innych szlaków transkrypcyjnych. Przykładem takiego szlaku może być Wnt/β-katenina. Kontroluje on wiele procesów rozwojowych i jego nieprawidłowe działanie wiązane jest z występowaniem wielu chorób w tym nowotworów. W nowotworach jelita obserwuje się utratę funkcji supresora APC, co

skutkuje nadekspresją β-kateniny. Udało się ustalić, że hiperaktywacja β-kateniny koreluje z proliferacją komórek nowotworowych i aktywnością Cdk8 [25] . Szczegóły procesu nie zostały jeszcze do końca poznane, ale możliwe, że Cdk8 stanowi część komleksu mediującego w który zaangażowane są jeszcze cyklina C, MED12 i MED13 [26]. Poza modulowaniem szlaku w jądrze komórkowym, regulatory cyklu komórkowego mogą wpływać na szlak Wnt w cytoplazmie. W ten proces zaangażowan jest kompleks Cdk14/cyklina Y, która oddziaływując z koreceptorem Wnt – Lrp6 i powodując wzmocnienie transdukcji sygnału. W tym przypadku również notuje się jednoczesne wzmocnienie sygnału i wzrost poziomu ekspresji cykliny Y [27]. Cykliny i kinazy mogą wpływać na transkrypcję również niezależnie od siebie. Cykliny D1-3 biorą udział w regulacji różnicowania się ludzkich pluripotentnych komórek macierzystych. Cykliny te rekrutują korepresory transkrypcji, kompleksy koaktywatorów, do genów odpowiadających za różnicowanie się do ektodermy, mezodermy, czy neuroektodermy. Aktywność tych cyklin powoduje zablokowanie szlaków transkrypcji odpowiedzialnych za różnicowanie się w kierunku ektodermy, natomiast promuje ekspresję czynników warunkujących powstawanie neuroektodermy [28] .

3.4. Regulacja metabolizmu

Badania nad cyklinami w kontekście regulacji metabolizmu prowadzone są od stosunkowo niedawna. W hodowli *in vitro* często stosowanym modelem są komórki wątrobowe, ze względu na dużą liczbę ścieżek metabolicznych jakie mają miejsce w hepatocytach. W czasie syntezy glikogenu w wątrobie, Cdk5/p35 została zidentyfikowana jako element pośredniczący w aktywacji syntazy glikogenowej, która odpowiada za polimeryzację glukozy do glutationu [29]. Biosynteza lipidów stymulowana jest przez insulinę, co z kolei powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego Srebp-1c. Badania wskazują, że fosforylacja Srebp-1c przez cdk8/cyklinę C może blokować ścieżkę lipidogenezy poprzez udział w ubikwitynacji i degradacji tego czynnika [30]. Ponadto w lipidogenezę zaangażowana jest cyklina D, która powoduje jej inhibicję działając na dwa inne czynniki transkrypcyjne: ChREBP (carbohydrate response element-binding protein) oraz hnf4α (hepatocyte nuclear factor 4α). Istnieje hipoteza, mówiąca o tym, że białka cyklu komórkowego mogą w ten sposób zwiększać zapasy glukozy w celu wykorzystania jej w czasie gdy zapotrzebowanie na nią wzrośnie, gdy komórki zaczną proliferować [31].

4. Podsumowanie

Im więcej wiemy o cyklinach i kinazach cyklinozależnych, tym bardziej staje się jasne, że ich zaangażowanie w kontrolę cyklu komórkowego jest tylko jedną z wielu funkcji pełnionych przez te białka. To powoduje, że działanie tych białek należy traktować kompleksowo, ze świadomością, że prawidłowa proliferacja zależy nie tylko od zdarzeń bezpośrednio powiązanych z podziałami komórkowymi, ale także od wielu innych czynników składających się razem na ogólnie pojętą homeostazę. Ilość nowych danych jakie udało się zdobyć o nowych funkcjach pełnionych przez te białka, a także stale powiększająca się wiedza dotycząca cyklin i CDKs powoduje, że te elementy regulacyjne cyklu komórkowego, jeszcze przez długi czas będą przedmiotem badań, pozwalających na lepsze zrozumienie procesów zachodzących we wszystkich komórkach.

Literatura

1. Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., Cascante M. *Targeting cell cycle regulation in cancer therapy*, Pharmacology & Therapeutics., 138 (2013), s. 255-271
2. Stalińska L., Ferenc T. *The role of TGF-beta in cell cycle regulation*, Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej, 2005, s. 441–449
3. Medema R.H., Macůrek L. *Checkpoint control and cancer*, Oncogene. 31 (2012), s. 2601-2613
4. Manchado E., Guillamot M., Malumbres M. *Killing cells by targeting mitosis*, Cell Death & Differentiation, (2012), s. 369-377
5. Blachly J.S., Byrd J.C., Grever M. *Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of chronic lymphocytic leukemia*, Seminars in Oncology. 43 (2016), s. 265-273
6. Malumbres M., Barbacid M. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nature Reviews. Cancer. (2009), s. 153-166
7. Lu X., Liu J., Legerski R.J. *Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S phase arrest*, The Journal of Biological Chemistry. 284 (2009), s. 35325-35337
8. Jirawatnotai S., Hu Y., Michowski W., Elias J.E., Becks L., Bienvenu F., et al. *A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers*, Nature. 474 (2011), s. 230-234
9. Chen Y.-J.J., Dominguez-Brauer C., Wang Z., Asara J.M., Costa R.H., Tyner A.L., et al. *A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK*1, Journal of Biological Chemistry. 284 (2009), s. 30695-30707
10. Huertas P., Cortés-Ledesma F., Sartori A.A., Aguilera A., Jackson S.P., *CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination*, Nature. 455 (2008), s. 689-692
11. Tomashevski A., Webster D.R., Grammas P., Gorospe M., Kruman I.I. *Cyclin-C-dependent cell-cycle entry is required for activation of non-*

homologous end joining DNA repair in postmitotic neurons, Cell Death and Differentiation. 17 (2010), s. 1189-1198
12. Blazek D., Kohoutek J., Bartholomeeusen K., Johansen E., Hulinkova P., Luo Z., et al. *The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes*, Genes Development. 25 (2011), s. 2158-2172
13. Yu D., Zhao R., Hsu E., Cayer J., Ye F., Guo Y., et al. *Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response*, EMBO Reports. (2010), s. 876-882
14. Bell D,, Berchuck A., Birrer M., Chien J., Cramer D., Dao F., et al. *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*, Nature, 2011, s. 609-615.
15. Fung T.K., Siu W.Y., Yam C.H., Lau A., Poon R.Y. *Cyclin F is degraded during G2-M by mechanisms fundamentally different from other cyclins*, Journal of Biological Chemistry. 277 (2002), s. 35140-35149
16. Angiolella V. D', Donato V., Forrester F.M., Jeong Y.-T.T., Pellacani C., Kudo Y., et al. *Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair*, Cell. 149 (2012), s. 1023-1034
17. Chen S., Bohrer L.R., Rai A.N., Pan Y., Gan L., Zhou X., et al. *Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2*, Nature Cell Biology. 12 (2010), s. 1108-1114
18. Zeng X., Chen S., Huang H. *Phosphorylation of EZH2 by CDK1 and CDK2: a possible regulatory mechanism of transmission of the H3K27me3 epigenetic mark through cell divisions*, Cell Cycle. 10 (2011), s. 579-583
19. Wei Y., Chen Y.-H.H., Li L.-Y.Y., Lang J., Yeh S.-P.P., Shi B., et al., *CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*, Nature Cell Biology. 13 (2011), s. 87-94
20. Aggarwal P., Vaites L.P., Kim J.K., Mellert H., Gurung B., Nakagawa H., et al. *Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase*, Cancer Cell. 18 (2010), s. 329-340
21. Bartkowiak B., Liu P., Phatnani H.P., Fuda N.J., Cooper J.J., Price D.H., et al. *CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1*, Genes Development. 24 (2010), s. 2303-2316
22. Ganuza M., Sáiz-Ladera C., Cañamero M., Gómez G., Schneider R., Blasco M.A.A., et al. *Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion*, EMBO Journal. 31 (2012), s. 2498-2510
23. Westerling T., Kuuluvainen E., Mäkelä T.P., *Cdk8 is essential for preimplantation mouse development*, Molecular Cell Biology. 27 (2007), s. 6177-6182
24. Patel S.A., Simon M.C. *Functional analysis of the Cdk7.cyclin H.Mat1 complex in mouse embryonic stem cells and embryos*, Journal of Biological Chemistry. 285 (2010), s. 15587-15598
25. Zhao J., Ramos R., Demma M. *CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation*, Oncogene. 32 (2013), s. 3520-3530

26. Knuesel M.T., Meyer K.D., Bernecky C., Taatjes D.J. *The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function*. Genes Devevelopment, 23 (2009), s. 439-451
27. Davidson G., Niehrs C. *Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling*, Trends in Cell Biology. 20 (2010), s. 453-460
28. Pauklin S., Madrigal P., Bertero A., Vallier L. I*nitiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D*, Genes Development. 30 (2016), s. 421-433
29. Tudhope S.J., Wang C.-C.C., Petrie J.L., Potts L., Malcomson F., Kieswich J., et al. *A novel mechanism for regulating hepatic glycogen synthesis involving serotonin and cyclin-dependent kinase-5, Diabetes.* 61 (2012), s. 49-60
30. Zhao X., Feng D., Wang Q., Abdulla A., Xie X.-J.J., Zhou J., et al. *Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1*, The Journal of Clinical Investigation. 122 (2012), s. 2417-2427
31. Hanse E., Mashek D., Becker J., Solmonson A., Mullany L., Mashek M., et al. *Cyclin D1 inhibits hepatic lipogenesis via repression of carbohydrate response element binding protein and hepatocyte nuclear factor 4α*, Cell Cycle. (2012), s. 2681-2690

Cykliny i kinazy zależne od cyklin – nie tylko regulatory cyklu komórkowego

Streszczenie

Prawidłowa regulacja cyklu komórkowego jest podstawowym warunkiem pozwalającym na zrównoważony rozwój tkanek i organów. Kluczowymi białkami odpowiadającym za kontrolę tego procesu są cykliny oraz kinazy cyklinozależne. Poza zaangażowaniem w cykl komórkowy białka te mogą modyfikować działanie wielu różnych szlaków molekularnych. Niniejsza praca przedstawia udział cyklin i kinaz cyklinozależnych w procesach komórkowych, niezwiązanych bezpośrednio z ich kanoniczną rolą.

Słowa kluczowe: cykliny, kinazy cyklinozależne, cykl komórkowy, transkrypcja, naprawa DNA

Cyclins and cyclin-dependent kinases – not only cell cycle regulators

Abstract

A proper regulation of the cell cycle is fundamental for balanced development of tissues and organs. The cyclins and cyclin dependent kinases are the key regulators of these process. Beyond the involvement in the cell cycle regulation, these proteins can modify a lot of molecular pathways. Current review presents the role of cyclins and cyclin dependent kinases in processes different from its canonical role.

Keywords: cyclins, cyclin-dependent kinases, cell cycle, transcription, DNA repair

Paulina Dudko[1], Andrzej Junkuszew[2]

Metylacja DNA

1. Wstęp

W ssaczych jądrach komórkowych znajduje się DNA w postaci chromatyny, która jest dynamiczną strukturą reagującą na bodźce docierające do komórki z zewnątrz co w konsekwencji reguluje dostęp do DNA. Najbardziej podstawową jednostką strukturalną budującą chromatynę jest nukleosom, którego mobilność jest regulowana poprzez kowalencyjne modyfikacje histonów w komórce. Modyfikacje te połączone są z każdym procesem wymagającym dostępu do komórkowego DNA takimi jak replikacja, transkrypcja czy też naprawa [1]. Wyniki badań na drożdżach pokazują, że pozycja nukleosomu nie jest warunkowana jedynie przez pojedynczy czynnik, ale decyduje o niej grupa czynników takich jak maszyna transkrypcyjna, remodelowanie nukleosomów, sekwencja DNA oraz białka wiążące DNA [2]. Jednak na początku rozwoju genetyki naukowcy zajmowali się jedynie genami, ponieważ to one kodują strukturę I-rzędową białek, czyli sekwencję aminokwasów w białku. Jednak wraz z rozwojem badań odkryto, że istnieją inne białka, które mogą odgrywać bardzo ważną rolę w regulacji ekspresji genów poprzez regulowanie dostępności DNA w procesie transkrypcji. Odkrycie to spowodowało rozwój nowej gałęzi biologii molekularnej – epigenetyki [3]. Jednym z pierwszych mechanizmów epigenetycznych, którym zaczęli zajmować się naukowcy, był proces metylacji DNA. Potwierdzono, że metylacja bierze udział w kilku procesach takich jak wyciszanie genów pojedynczej kopii w czasie normalnego rozwoju i rozwoju nowotworu, ale także w wyciszaniu elementów powtarzalnych. Istnieją także inne mechanizmy epigenetyczne, na przykład zależące od modyfikacji histonów, które zostały już wyjaśnione i w związku z tym przypuszcza się, że istnieje kilka sposobów aby epigenetycznie wyciszyć geny. Do najważniejszych cech epigenetycznie wyciszonych genów należy zaliczyć ich stabilność oraz to, że dziedziczą one somatycznie wyciszoną ekspresję nie powodując trwałej zmiany

[1] dudko.paulina @gmail.com, Katedra Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa Rolniczego, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www. up.lublin.pl
[2] andrzej.junkuszew@up.lublin.pl, Katedra Hodowli Małych Przeżuwaczy i Doradztwa Rolniczego, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www. up.lublin.pl

w sekwencji zasad i można spowodować aby powróciły do stanu funkcjonalnego [4]. Procesy takie jak m. in. metylacja czy też modyfikacje kowalencyjne histonów są kontrolowane przez procesy epigenetyczne, które regulują dostęp do DNA [5]. Do najważniejszych cech epigenomu można zaliczyć to że odpowiada za regulację genomu, w porównaniu do genomu jest zmienny, a także zależy od rodzaju i wieku komórki. Także wpływ na niego mają docierające do komórki sygnały fizjologiczne, środowiskowe czy też patologiczne, nadaje tożsamość komórkom oraz decyduje o ekspresji genów.

2. Mechanizmy epigenetyczne

W skład epigenomu wchodzi chromatyna oraz jej modyfikacje, a także modyfikacje w obrębie pierścieni cytozyny w obszarach wysp CpG [6]. U ssaków epigenetyczne modyfikacje obejmują 2 główne grupy: modyfikacje histonów oraz metylację DNA [7].

Modyfikacje histonów odgrywają istotną rolę w wielu procesach manipulacji i ekspresji DNA. Opierają się na dwóch głównych mechanizmach: w jednym z nich modyfikacja lub modyfikacje mają bezpośredni wpływ na strukturę chromatyny. Natomiast w drugim dochodzi do regulacji modyfikacji (pozytywnej lub negatywnej) poprzez wiązanie cząsteczek efektorowych [8]. Modyfikacje mogą także wpływać na zmianę struktury chromatyny w wyniku łączenia się, mogących wystawać, N-końcowych aminokwasów z ogona histonu z sąsiednim nukleosomem. Natomiast w histonach rdzeniowych zachodzi wiele modyfikacji potranslacyjnych, z których najlepiej poznane są acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja i metylacja [7, 8].

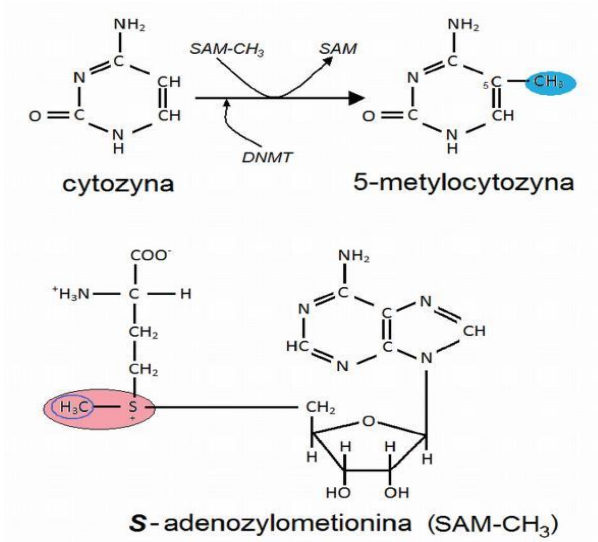
W procesie acetylacji histonów dochodzi do acetylacji lizyny. Proces ten jest katalizowany przez antagonistyczne działanie dwóch rodzin enzymów – acetylotransferazy histonów (HAT – *histone acetylotransferase*) i deacetylazy histonów (HDAC – *histone deacetylase*) [9]. Rolą acetylotransferazy jest neutralizacja ładunku dodatniego lizyny, poprzez przeniesienie grupy acetylowej na grupę aminową lizyny, reakcja ta przebiega z udziałem acetyloCoA. Powoduje to osłabienie oddziaływań pomiędzy DNA a histonami [10]. Fosforylacja, podobnie jak acetylacja, jest procesem dynamicznym. Modyfikacji tej ulegają głównie aminokwasy takie jak seryna, treonina czy tyrozyna na N-końcowym ogonie histonu. Dodawanie i usuwanie tej modyfikacji jest kontrolowane przez kinazy i fosfatazy [11]. Reakcja ta polega na przeniesieniu przez kinazę grupy fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową aminokwasu o określonym łańcuchu bocznym, co powoduje zwiększenie ładunku ujemnego histonów, a w konsekwencji zmianę struktury chromatyny [12]. Ubikwityna jest

peptydem złożonym z 76 aminokwasów, która jest przyłączana do lizyny histonów w wyniku działania trzech enzymów E1-aktywującego, E2-koniugującego i E3- ligującego. Proces ten jest znacznie większą zmianą niż modyfikacje kowalencyjne [13]. W przypadku procesu metylacji histonów ulegają jej łańcuchy boczne lizyny i argininy, ale proces ten nie powoduje zmiany ładunku histonów [8]. Katalizatorem reakcji jest metylotransferaza histonów (HLMT – *histone lysine methyltransferase*), która w większości przypadków powoduje metylację wewnątrz ogonów N-końcowych [14, 15]. Natomiast w metylacji argininy biorą udział metylotransferazy I i II [16]. Ponadto możemy wyróżnić jeszcze ADP-rybozylację (mono- lub poli-), która polega na przyłączeniu do reszt argininy i glutaminianu w histonach cząsteczki ADP-rybozy, która pochodzi od NAD+ (dinukleotydu adeninowego nikotynamidu), który jest mediatorem wielu reakcji oksydoredukcyjnych. Proces ten jest odwracalny, ale niewiele jak dotąd wiadomo o jego funkcji. W konsekwencji modyfikacje takie jak acetylacja i fosforylacja powodują zmniejszenie ładunku dodatniego histonów, co powoduje że oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy histonami a DNA mogą być rozrywane. To z kolei prowadzi do powstania mniej zwartej struktury chromatyny i prawdopodobnie ułatwia dostęp do DNA, np. w procesie transkrypcji [17]. W wyniku ubikwitynacji do nukleosomu zostają przyłączone bardzo duże cząsteczki, co prawdopodobnie powoduje zmiany wewnątrz nukelosomu i/lub oddziaływania z innymi kompleksami chromatyny. Do zmian nie powodujących dezorganizacji struktury chromatyny należy metylacja histonów. Zmiany które powoduje są niewielkie i nie powodują zmiany ładunku histonów [8].

Oprócz modyfikacji chromatyny jako nici DNA, cząsteczka DNA ulega modyfikacji poprzez przyłączanie grup metylowych (-CH3) do 5. węgla pierścienia cytozyny, co prowadzi do powstania metylocytozyny. Metyalcja DNA należy do poreplikacyjnych zmian epigenetycznych, których główną rolą jest zmiana funkcji lub ekspresji genu. Proces ten jest katalizowany przez enzymy DNA-metylotransferazy, dla których substratami są dinukleotydy CpG [6,18,19]. DNA wielu organizmów od bakterii do zwierząt w swoim genomie zawiera zasady, które są modyfikowane grupą metylową. Do najczęstszych produktów metylacji należą N6-metyloadenina (m6A), C5-metylocytozyna (m5C) i N4-metylocytozyna (m4C). U Eucaryota występuje tylko C5-metylocytozyna, u Procaryota N4-metylocytozyna zaś N6-metyloadenina występuje u Procaryota i u bezkręgowców (niższe Eucaryota) [21].

3. Metylotransferazy w procesie metylacji

U *Eucaryota* metylacja cytozyny jest przeprowadzana po procesie replikacji z wykorzystaniem enzymu DNA-metylotransferazy i S-adenozylometioniny jako donora grupy metylowej [22, 23].



Rysunek 1. Mechanizm metylacji cytozyny w miejscu C5 przez metylotransferazę DNMT [20]

DNA-metylotransferaza jest białkiem, którego masa cząsteczkowa wynosi około 200 kDa. Zawiera ona na końcu C domenę o aktywności katalitycznej, a na końcu N domenę, która wiąże się z DNA i oddziałuje z kompleksem białek zaangażowanych w replikację. Aktywność tego enzymu jest zmienna i zależy od rodzaju komórki i fazy cyklu komórkowego (najwyższa jest w fazie S) [24,25]. Jego rolą jest także metylacja de novo podwójnej nici DNA oraz hemimetylacja podczas replikacji pojedynczej nici DNA. Metylacja cytozyny przebiega w trzech etapach:

I. Kowalencyjne wiązanie enzymu z resztą cytozyny w DNA

II. Przeniesienie grupy metylowej (-CH3) z S-adenozylometioniny na cytozynę

III. Rozerwanie wiązania enzym-DNA co skutkuje uwolnieniem enzymu i S-adenozylohomocysteiny (SAH) i powstaniem 5-metylocytozyny [22, 26].

Do tej pory zidentyfikowano cztery izoformy DNA-metylotransferaz. DNMT1, która uczestniczy w metylacji zachowawczej oraz przekazuje stały profil metylacji podczas podziałów komórkowych [27]. DNMT2, która nie posiada właściwości katalitycznych, jej funkcja nie została

jeszcze poznana. W metylacji de novo podczas embriogenezy oraz procesie różnicowania się komórek biorą udział DNA-metylotransferazy 3A i 3B. Ostatnią izoformą jest DNMT3L, która zwiększa powinowactwo DNA do pozostałych metylotransferaz, ale nie ma funkcji katalitycznych [28].

4. Rola metylacji

Głównym celem metylacji jest regulacja ekspresji genów, dlatego też miejsca, w których genom jest metylowany, nie są przypadkowe. Metylacji nie ulegają geny odpowiedzialne za podstawowe funkcje komórki tzw. house keeping genes, które są cały czas aktywne transkrypcyjnie [29]. Natomiast procesowi temu ulegają jedynie cytozyny, znajdujące się w obrębie sekwencji CpG. Komórki eukariotyczne zawierają 60-80% metylowanej cytozyny w obrębie wysp CpG i każda z nich ma charakterystyczny wzór metylacji DNA, który jest przekazywany komórkom potomnym podczas replikacji [30, 31]. Po replikacji grupy metylowe są przyłączane do nici potomnej w tych samych miejscach, w których były przyłączone na nici matczynej. Dzięki temu jest zachowany oryginalny wzór metylacji, ponieważ dwie cząsteczki potomne są tak samo zmetylowane jak cząsteczka rodzicielska, jest to metylacja zachowawcza [26].

Do procesów, w których metylacja odgrywa ważną rolę można zaliczyć: imprinting rodzicielski (piętno genomowe, piętno rodzicielskie) proces ten prowadzi do zróżnicowanej ekspresji alleli niektórych genów pochodzących od matki i od ojca. Do tej poru poznano około 30 genów, których ekspresja zależy od tego czy znajdują się na allelu pochodzącym od ojca lub od matki. Ważną cechą piętna rodzicielskiego jest to, że są dziedziczone podczas podziałów komórkowych i odwracalne podczas gametogenezy [19, 32]. Kolejnym procesem jest inaktywacja chromosomu X u samic ssaków łożyskowych, u których występują dwa chromosomy X. Inaktywacja jednego z nich ma na celu wyrównanie ekspresji genów położonych na chromosomach płciowych. W stadium wczesnego zarodka oba chromosomy są aktywne, jednak w późniejszej fazie rozwoju embrionalnego dochodzi do losowej inaktywacji jednego z nich, a zmiana ta jest przekazywana podczas podziałów mitotycznych [19]. Metylacja DNA odgrywa także ważną rolę w regulacji ekspresji genów oraz modulacji struktury chromatyny. Proces ten prowadzi zazwyczaj do wyciszenia ekspresji genów, co spowodowane jest zmianą struktury chromatyny na skondensowaną, nieaktywną (heterochromatynę) [19]. Duży wpływ metylacja DNA ma na rozwój nowotworu, gdzie dochodzi do zmiany epigenotypu komórki. Może dojść do takich zmian jak: hipometylacja genów normalnie zmetylowanych (globalna i lokalna), gdzie dochodzi do demetylacji regionów promotorowych onkogenów, co skutkuje nadmierną

stymulacją proliferacji komórkowej [33]. Hipermetylacja, do której dochodzi w regionach wysp CpG, które nie są zmetylowane, co w konsekwencji powoduje wyciszenie genów supresorowych [33]. Kolejną zmianą jest tranzycja m5C-tymina. C5-metylocytozyna częściej ulega deaminacji w porównaniu do cytozyny. Reakcja deaminacji m5C powoduje powstanie tyminy, natomiast cytozyny prowadzi do powstania uracylu. Powstanie tyminy nie jest korzystne, ponieważ nie jest ona usuwana i jest mutagenna, powodując nieprawidłowe łączenie guaniny z tyminą. Natomiast uracyl jest usuwany z DNA z wykorzystaniem enzymu glukozylazy uracylowej [18, 34]. Ponadto występuje także metylacja „non-CpG" w komórkach nowotworowych, jest to zmiana niezwiązana z wyspami CpG, w której prawdopodobnie biorą udział DNMT3A i DNMT3B [18].

5. Metody analizy epigenomu

Wykorzystanie technik biologii molekularnej umożliwia analizę metylacji całego genomu ale także poszczególnych genów. Techniki wykorzystywane do badania metylacji w całym genomie, wymagają dużych ilości DNA, dlatego nie mają zastosowania do analizy biomarkerów [35].

Metody analizy metylacji DNA można sklasyfikować według takich kryteriów jak:

1) zakres analizy w materiale biologicznym (genom, pojedyncze geny);
2) rodzaj zastosowanej techniki:
   - cięcie enzymami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację (w połączeniu z hybrydyzacją lub PCR);
   - metody hybrydyzacji (Southern blot, mikromacierze);
   - PCR (jakościowy i ilościowy) [36].

Pierwsze metody analizy metylacji wykorzystywały technikę Southern blot oraz cięcie enzymami restrykcyjnymi w połączeniu z reakcją PCR. Hybrydyzacja metodą Southern polega na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację, które nie są w stanie rozpoznać zmetylowanych sekwencji wysp CpG, co pozwala na określenie ogólnego stopnia metylacji wysp CpG [37]. Do wad tej techniki należy zaliczyć stosunkowo dużą ilość DNA wymaganą do analiz (5µg lub więcej), co powoduje zmniejszenie użyteczności badań w metylacji w linii płciowej żeńskiej oraz nad implantacją zarodka [38]. Drugą metodą, która opiera się na hybrydyzacji są mikromacierze. W technice tej jednoniciowy DNA (ssDNA) zostaje unieruchomiony na nylonowej membranie, a następnie poddany hybrydyzacji w odpowiednich warunkach. Sondy oligonukleotydowe, które są specyficzne dla sekwencji zmetylowanych i niezmetylowanych, są unieruchamiane na membranie, a do roztworu hybrydyzmcyjnego dodawany jest wodorosiarczyn sodu, powodujący modyfikację

produktu PCR. Gdy genomowe DNA lub produkt PCR unieruchomione są na membranie, wtedy są one wstępnie modyfikowane roztworem wodorosiarczynu sodu oraz cięte enzymami restrykcyjnymi, a sondy oligonukleotydowe znajdują się w roztworze. Sygnał hybrydyzacyjny wykrywany jest najczęściej przez chemiluminescencję [39].

Wśród metod jakościowych wyróżnia się:

MSP (MS-PCR, Methylation specyfic PCR) jest to reakcja, która wymaga modyfikacji DNA za pomocą wodorosiarczynu sodu ($NaHSO_3$), który powoduje deaminację cytozyny w jednoniciowym DNA, która ulega przekształceniu do uracylu. Następnie produkt reakcji z wodorosiarczynem sodu jest poddawany reakcji PCR, z wykorzystaniem dwóch par starterów. Jedna para starterów rozpoznaje metyalcję w wyspie CpG i traktuje 5-metylocytozynę jako cytozynę. Natomiast druga para rozpoznaje sekwencję niezmetylowaną tego fragmentu, w której cytozyna uległa konwersji do uracylu i jest rozpoznawana jako uracyl/tymina. Reakcja zachodzi z jedną parą starterów i w ten sposób otrzymuje się informację czy dany fragment jest zmetylowany czy nie. Analiza przeprowadzana jest poprzez porównanie produktów poddanych sekwencjonowaniu [40]. Kolejną metodą jest BGS (Bisulfite Genome Sequencing- sekwencjonowanie genomu potraktowanego bisulfidem) metoda ta opiera się na reakcji ssDNA z tiosiarczanem sodu. W wyniku tej reakcji cytozyna ulega deaminacji do uracylu. Następnie przeprowadzana jest reakcja PCR, podczas której dochodzi do przekształcenia się uracylu do tyminy. I podobnie jak w metodzie MSP 5-metylocytozyna jest amplifikowana jako cytozyna, a produkty reakcji są poddawane sekwencjonowaniu, w celu określenia miejsc metylacji [41]. Do metod jakościowych należy także MCA-RDA (Methylated CpG Amplification-Representational Difference Analysis – amplifikacja metylowanych wysp CpG połączona z klonowaniem), w metodzie tej amplifikuje się fragmenty DNA zawierające wyspy CpG, a następnie klonuje się je metodą RDA. W pierwszym etapie wybraną sekwencję trawi się dwoma enzymami restrykcyjnymi, które są izoschizomerami, a także mają różną wrażliwość na metylację rozpoznawanej sekwencji CCCGGG. Jako pierwszy wykorzystuje się enzym SmaI, który tnie sekwencje niezmetyolwane i pozostawia tępe końce. Następnie wybrany fragment poddaje się działaniu endonukleazy XmaI, która rozpoznaje sekwencje zmetylowane i, w porównaiu do SmaI, pozostawia lepkie końce, do których przyłączane są adaptery i całość poddawana jest reakcji PCR, a analizy dokonuje się poprzez subtraktywną hybrydyzację [36]. Ostatnią opisywaną techniką jest RLGS (*Restriction Landmark Genomic Scanning* – skanowanie miejsc restrykcyjnych specyficznych dla metylacji), metoda, która pozwala na analizę tysięcy nieoznakowanych wysp CpG w całym genomie. Na początku genomowe DNA jest trawione enzymem restrykcyjnym wrażliwym na

metylacje np. NotI, który rozpoznaje sekwencje bogate w CpG. Następnie strawione DNA jest znakowane radioaktywnie i ponownie trawione np. EcoRI. Tak przygotowana próbka poddawana jest elektroforezie z trzecim enzymem restrykcyjnym. DNA rozdziela się na żelu poliakrylamidowym, podczas elektroforezy dwuwymiarowej [42].

Do metod ilościowych można zaliczć: MethyLight, która jest wysokowydajną techniką analizy metylacji DNA, która wykorzystuje fluorescencję i real-time PCR i pozwala na ilościowe określenie metylacji wysp CpG. W pierwszym etapie matrycę traktuje się wodorosiarczanem sodu, a następnie poddaje amplifikacji. Do amplifikacji wykorzystuje się startery oraz specjalną sondę (TaqMan), która jest wyznakowana barwnikiem fluoroscencyjnym na końcu 5' (najczęściej wykorzystywana jest 6-karboksyfluoresceina) i wygaszaczem na końcu 3' (TAMRA). W trakcie procesu amplifikacji sonda związana z matrycą jest cięta przez polimerazę, w wyniku czego zostaje uwolniony reporter, którego fluorescencja zostaje zmierzona przez detektor laserowy. Sygnał fluorescencji jest wprost proporcjonalny do liczby amplifikowanych sekwencji [40, 43]. Kolejną techniką jest QAMA (Quantitative analysis of methylated alleles – ilościowa analiza metylowanych alleli), która jest to nowszą modyfikacją real-time PCR, gdzie wykorzystywane są sondy TaqMan wiążące się zgodnie z technologia MGB (Minor Groove Binder). W metodzie tej sondy są wysoko specyficzne zaprojektowane odpowiednio dla sekwencji zmetylowanej i niezmetylowanej oraz znakowane dwoma barwnikami fluorescencyjnymi – VIC i FAM. Reakcja zachodzi jednoetapowo co pozwala uzyskać wysoką wydajność podczas oceny metylacji, znacznie skraca czas analizy, a także zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia. Do wad należy zaliczyć brak możliwości rozpoznawania sekwencji częściowo zmetylowanych, a także utrudnione wiązanie się sondy do miejsc polimorficznych oraz zawierających mutacje [40,43]. Bardzo czułą metodą jest Heavy-Methyl, która pozwala oznaczać poziom zmetylowanego DNA w próbkach o bardzo niskim stężeniu. Technika ta także jest modyfikacją real-time PCR i wykorzystuje się oligonukleotydowe blokery, przyłączane do matrycy w pozycji 3' wiązania startera, które są zaprojektowane do sekwencji niemetylowanej, a ich obecność sprawia, że startery nie mogą się przyłączyć, co uniemożliwia amplifikację. Przy ilościowym zastosowaniu tej techniki stosowana jest znakowana sonda [40, 44]. Technika COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis- metoda bisulfidowa połączona z analizą restrykcyjną) jest metodą bisulfidową, która wykorzystuje różnice w długości fragmentów restrykcyjnych pomiędzy DNA zmetylowanym i niezmetylowanym oraz pozwala na ilościową analizę poziomu metylacji DNA w określonych loci. W technice tej wykorzystywana jest reakcja z tiosiarczanem sodu, która powoduje konwersję cytozyny w tyminę,

a metylocytozyny w cytozynę. W rezultacie powstają nowe miejsca restrykcyjne lub zostają zachowane istniejące. Następnie przeprowadzana jest reakcja PCR, z wykorzystaniem starterów nie odróżniających alleli zmetylowanych od niezmetylowanych, która amplifikuje pożądaną sekwencję. Startery projektuje się tak, żeby nie zawierały dinukleotydów CpG. Frakcja powstałych cząsteczek zawiera nowopowstałe lub zachowane dinukleotydy CpG, które są procentowym odzwierciedleniem metylacji DNA [36, 42]. Ostatnią opisywaną metodą jest technika pomiaru globalnej metylacji DNA wzorowana na metodzie ELISA. Jest to nowopowstała technika wzorowana na teście ELISA, w której wykorzystywane są przeciwciała i reakcja kolorymetryczna. Wykorzystuje się tutaj możliwość wiązania zmetylowanego DNA z białkami. Poziom metylacji określa się względem zmetylowanej kontroli. Analizę przeprowadzana się za pomocą specjalnego zestawu, który zawiera wszystkie niezbędne odczynniki. Do zalet tej metody należy zaliczyć krótki czas i niski koszt analizy, stosunkowo niewielkie ilości DNA, nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu oraz radioaktywnych izotopów [36].

6. Podsumowanie

Badania nad epigenomem są prowadzone wielokierunkowo i mają ogromny zasięg. Jednak jest to dopiero początek drogi pozwalającej opisywać złożone mechanizmy regulacji epigenetycznej ważnych funkcji genomu. Aby móc dokładniej zrozumieć rolę metylacji cytozyny oraz modyfikacji histonów w trakcie normalnego rozwoju osobniczego, a także w trakcie choroby, należy przeprowadzić większą ilość badań oraz udoskonalić metodologię.

Obecnie do wykrywania metylacji DNA mogą być wykorzystywane różnorodne techniki. Stopień metylacji DNA można określić zarówno jakościowo jaki i ilościowo wykorzystując do tego celu chociażby techniki o wysokiej wydajności czy też hybrydyzację in situ z użyciem przeciwciał antymetylocytozynowych, ale cały czas powstają nowe techniki umożliwiające analizę nowych miejsc metylacji w całym genomie. Praktyczne zastosowanie wiedzy o epigenomie może mieć szerokie zastosowanie np. w przypadku deregulacji pojedynczych genów, która następuje chociażby przy przywróceniu aktywności genów supresorów nowotworzenia, które zostały wyciszone przez metylację, ale także w przypadku genów, które kodują czynniki transkrypcyjne lub DNA-metylotransferazy. Wprowadzenie technologii epigenetycznych do diagnostyki i leczenia niesie ze sobą ogromny potencjał zarówno dla chorych jak i lekarzy [45, 46].

Literatura

1. Zentner G.E., Henikoff S. *Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications,* Nature Structural & Molecular Biology, 20(3) (2013), s. 259-266
2. Segal E., Stuhrl K. *Determinants of nucleosome positioning*. Nature Structural & Molecular Biology, 20 (2013), s. 267-273
3. Mai A., Massa S., Rotili D., Cerbara I., Valente S., Pezzi R., Simeoni S., Ragno R. *Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy.* Medicinal Research Reviews, 25 (2005), s. 261-309
4. Rodin S.N., Prakhomchuk D.V., Riggs A.D.. *Epigenetic Changes and Repositioning Determine the Evolutionary Fate of Duplicated Genes*. Biochemistry (Moscow), 70(5) (2005), s. 559-567
5. Editorial. *The dynamic epigenome.* Nature Structural & Molecular Biology 20 (2014), s. 258
6. Szyf M. *DNA Methylation and Demethylation as Targets for Anticancer Therapy.* Biochemistry (Moscow), 70(5) (2005), s. 533-549
7. Bernstein B.E., Meissner A., Lander E.S. *The Mammalian Epigenome.* Cell, 128(4) (2007), s. 669-681
8. Bannister A.J., Kouzarides T. *Regulation of chromatine by histone modifications*. Cell Research, 21(3) (2011), s. 381-395
9. Xhemalce B, Dawson MA, Bannister AJ. *Histone modifications* In: Meyers R, ed. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. John Wiley and Sons; 2011, s. 11
10. Parthun M.R. *Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase.* Oncogene, 26 (2007), s. 5319-5328
11. Oki M, Aihara H, Ito T. *Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases.* Subcellular Biochemistry, 41 (2007), s. 319-336
12. Hu S., Xie Z., Onishi A., Yu X., Jiang L., Lin J., Rho H.S., Woodard C., Wang H., Jeong J.S., Long S., He X., Wade H., Blackshaw S., Qian J., Zhu H. *Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling*. Cell, 139 (2009), s. 610-622
13. Hershko A, Ciechanover A. *The ubiquitin system.* Annual Review of Biochemistry, 67(1998), s. 425-479
14. Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature, 406 (2000), s. 593-599
15. Tamaru H., Zhang X., McMillen D., Singh P.B., Nakayama J., Grewal S.I., Allis C.D., Cheng X., Selker E.U. *Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in Neurospora crassa*. Nature Genetics, 34 (2003), s. 75-79
16. Bedford M.T, Clarke S.G. *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Molecular Cell, 33 (2009), s. 1-13
17. Kouzarides T. *Chromatin modifications and their function*. Cell, 128 (2007), s. 693-705
18. Sulewska A., Niklińska W., Kozłowski M., Minarowski Ł., Naumnik W., Nikliński J, Dąbrowska K., Chyczewski L. *DNA methylation in states of*

cell physiology and pathology. FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA, 45(3) (2007), s. 149-158
19. Łukasik M., Karmalska J., Szutowski M.M., Łukaszewicz J. *Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu.* BIULETYN Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 2 (2009), s.13-18
20. http://www.phmd.pl/fulltxthtml.php?ICID=924953
21. Azhikina T.L., Sverdlov E.D. *Study of Tissue-Specific CpG Methylation of DNA in Extended Genomic Loci.* Biochemistry (Moscow), 70(5) (2005), s. 596-603
22. Smith S.S. *Biological implication of the mechanism of action of human DNA (cytosine-5)methylotransferase.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 49 (1994), s. 65-111
23. Jones P.A. 1996. *DNA methylation errors and cancer*. Cancer Research, 53, s. 2463-2467
24. Tajima S., Suetake I. *Regulation and function of DNA methylation in vertebrates.* The Journal of Biochemistry, 123(6) (1998), s. 993-999
25. Fabianowska-Majewska K. *Rola metylacji DNA w procesie kancerogenezy*. Acta Haematologica Polonica, 31(4) (2000), s. 399-406
26. Kostka G., Urbanek K. *Metylacja DNA – alternatywny mechanizm chemicznej kancerogenezy.* ROCZN. PZH, 56(1) (2005), s. 1-14
27. Chuang L.S., Inn H.I., Koh T.W., Ng H.H., Xu G., Li B.F. *Human DNA (cytosine-5) methylotransferase-PCNA complex as a target for p21 WAF1.* Science, 277 (1997), s. 1996-2000
28. Ooi S.K.T., O'Donnell A.H., Bestor T.H. *Mammalian cytosine methylation at a galance*. Journal of Cell Science, 122 (2009), s. 2787-2791
29. Ballestar E., Esteller M. *The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing*. Carcinogenesis, 23 (2002), s.1103-1109
30. Singal R., Ginder G.D. *DNA Methylation*. Blood, 93 (1999), s. 4059-4070
31. Worm J., Guldberg P. *DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising traget for anticancer therapy.* Journal of Oral Pathology and Medicine, 31(8) (2002), s. 443-449
32. Salozhin SV1, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. *Methylation of DNA-one of the major epigenetic markers.* Biochemistry (Mosc), 70 (5) (2005), s. 525-532
33. Jabłońska J., Jesionek-Kupnicka D. *Zmiany epigenetyczne w nowotworach*. Onkol. Pol., 7(40) (2004), s. 181-185
34. Hattman S. *DNA-Adenine Methylation in lower Eucaryotes.* Biochemistry (Moscow), 70(5) (2005), s. 550-558
35. Brena R.M., Huang T.H., Plass C. *Quantitative assessment of DNA methylation: Potential aplications for disease , diagnosis, classification and prognosis in clinical settings.* Journal of Molecular Medicine, 84 (2006), s. 365-377
36. Gryzińska M., Andraszek K., Strachecka A., Błaszczak E. *Detekcja zmetylowanej cytozyny w DNA.* Przegląd hodowlany, 5-6 (2012), s. 3-6
37. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.* PNAS, 93 (1996), s. 9821-9826
38. Moore T. *Southern analysis using methyl-sensitive restriction enzyme.* Methods in Molecular Biology, 181 (2001), s. 193-203

39. Zhou D., Qiao W., Yang L., Lu Z. *Bisulfite-modified target DNA array for aberrant methylation analysis.* Analytical Biochemistry, 351 (2006), s. 26-35
40. Borkowska P. *Metody analizy epigenomu w oparciu o technikę PCR.* Lab-all.com, (2011)
41. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. *Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters.* Nucleic Acid Research, 29(13) (2001), e65
42. Dahl Ch., Guldberg P. *DNA methylation analysis techniques*. Biogerontology, 4 (2003), s. 233-250
43. Sulewska A., Niklińska W., Kozłowski M., Minarowski Ł., Nikliński J, Dąbrowska K., Chyczewski L. *Detection of DNA methylation in eucaryotic cells*. FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA, 45(4) (2007), s. 315-324
44. Cottrell S.E., Distler J., Goodman N.S., Mooney S.H., Kluth A., Olek A., Schwope I., Tetzner R., Ziebarth H., Berlin K. *A realtime PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers.* Nucleic Acids Research, (2004). .32:e10
45. Fraga M.F., Esteller M. *DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications*. BioTechniques, 33 (3) (2002), s. 632-649
46. Szpecht-Potocka A. *Zdrowy i chory „gorset" DNA, czyli medyczne aspekty epigenetyki.* Kosmos, 53 (2004), s. 281-293

Metylacja DNA

Streszczenie
Powszechnie znane jest zjawisko kodowania informacji poprzez określone ułożenie deoksyrybonukleotydów w łańcuchu DNA, jednak istnieje również kodowanie informacji poprzez strukturę chromatyny. Informacja zakodowana w ten sposób może być, podobnie jak informacja zawarta w sekwencji DNA, utrzymywana i przekazywana w trakcie kolejnych podziałów komórkowych. Jednym z najbardziej znanych i najlepiej przebadanych zmian epigenetycznych jest metylacja DNA, która odpowiada za mechanizm regulacji ekspresji genów. Wzór metylacji jest ustalany podczas embriogenezy i przekazywany różnicującym się komórkom i tkankom. Jednak może dojść do zmian w jego wzorze na skutek działanie różnych czynników. Na początku badania koncentrowały się na określeniu ogólnego poziomu metylacji, jednak obecnie bada się metylację specyficznych sekwencji DNA. Aktualnie istnieje wiele metod, które umożliwiają określenie metylacji DNA zarówno jakościowo jak i ilościowo.
Słowa kluczowe: DNA, metylacja, epigenom

DNA methylation

Abstract
Commonly known phenomenon of encoding information through a specific location deoxyribonucleotides in the DNA chain, but there is also the encoding of information through chromatin structure. Information encoded in this manner may be, as the information contained in the DNA sequence, maintained and passed on during subsequent cell division. One of the best known and most studied epigenetic changes is DNA methylation, which is responsible for the regulatory mechanism of gene expression. Methylation pattern is established during embryogenesis and passed differentiating cells and tissues. However, this may lead to changes in the formula due to various factors. At the start of the test focus on defining the overall level of methylation, however, is currently examining the methylation of specific sequences of DNA. Currently, there are many methods that allow the determination of DNA methylation both qualitatively and quantitatively.
Keywords: DNA, methylation, epigenome

Piotr Stępień[1], Paula Musiał[2]

miRNA w leczeniu bólu

1. Wstęp

W 1957 roku Francis Crick sformułował hipotezę mówiącą o tym, że przepływ informacji genetycznej następuje od DNA poprzez RNA do białka. Założenie to nazywane jest centralnym dogmatem biologii molekularnej, z którego wynika m.in., że geny kodują białka. Pełnią one funkcję strukturalną i katalityczną oraz regulują procesy zachodzące we wszystkich komórkach, zarówno u mikroorganizmów jak i u ssaków. W przypadku organizmów złożonych, powyższa koncepcja nie jest zachowana. Genom organizmów eukariotycznych złożony jest nie tylko z sekwencji kodujących białka, ale również tzw. niekodujących. Przez długi okres czasu sekwencje niekodujące białka uważano za cząsteczki nagromadzone w trakcie ewolucji, które powstawały podczas procesów kształtujących geny. Jak dotąd, udowodniono, że omawiane molekuły biorą udział w wielu procesach organizmów wyższych. Pełnią znaczącą rolę w degradacji mRNA, kontroli struktury chromosomów, regulacji transkrypcji i alternatywnego *splicingu* oraz ekspresji białek. Liczba poznawanych cząsteczek ncRNA (ang. *Non-coding* RNA, ncRNA) stale rośnie, lecz wśród wszystkich rodzajów ncRNAs, grupa miRNA (ang. miRNA – *micro ribonucleic acid*) stanowi zbiór molekuł najlepiej przebadanych. miRNA stanowią dużą część cząsteczek, które istotnie wpływają na rozwój układu nerwowego, jak i jego funkcjonowanie w warunkach fizjologicznych i patologicznych. W ostatnim czasie, znacząco wzrosło zainteresowanie połączeniami miRNA a bólem patologicznym. Taki rozwój zdarzeń jest zrozumiały, biorąc pod uwagę wzrost zapadalności społeczeństwa na choroby cywilizacyjne, którym ból przewlekły nieustępliwie towarzyszy. Dla naukowców cząsteczki miRNA mogą być cennym narzędziem do badania transkrypcyjnych i translacyjnych mechanizmów chronicznego bólu. Odpowiednia manipulacja ekspresją i funkcją pojedynczego miRNA *in vivo*, może dostarczyć nam możliwość wpływania jednocześnie na kilka mediatorów w skomplikowanym szlaku bólu. W niniejszej

[1] piotr.stepien@interia.pl, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu , Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
[2] pp.auula17@gmail.com, Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

rozprawie chciałbym przybliżyć rolę miRNA w zjawisku bólu oraz wynikające z nich możliwości wykorzystania ich jako molekuły terapeutyczne [1].

2. Zjawisko bólu

2.1. Definicja bólu

Według Międzynarodowego Towarzystwa Badania Ból (ang. IASP – *International Association for the Study of Pain*) ból definiowany jest jako „nieprzyjemne doznanie czuciowe i emocjonalne, związane z aktualnym, potencjalnym czy też domniemanym uszkodzeniem tkanek, a także opisywanym przez chorego w kategoriach takiego uszkodzenia" [2]. Wielu naukowców uważa, że ból jest jednym ze stanów motywacyjnych organizmu, jak na przykład: głód czy lęk. Funkcję jaką przypisuję się bólowi jest alarmowanie organizmu przed uszkodzeniem lub jest sygnałem informacyjnym o rozpoczynającym lub rozwijającym się procesie chorobowym [3]. Złamaniu kości lub dotknięciu gorącej powierzchni towarzyszy ból ostry, a chorobom nowotworowym czy zapaleniom stawów towarzyszy ból chroniczny, który jest trudniejszy do zlokalizowania i leczenia [4]. Dzięki wielu badaniom naukowców lepiej poznaliśmy anatomiczne i funkcjonalne podłoże zjawiska bólu, jednakże nadal pozostaje wiele nierozstrzygniętych bądź nieznanych kwestii [5].

2.2. Fizjologia bólu

Zjawisko bólu powstaje w wyniku zadziałania na organizm bodźca nocyceptywnego. Działanie na organizm ludzki bodźca bólowego powoduję powstanie impulsów, które przekazywane są do wyższych poziomów układu nerwowego za pomocą komórek nerwowych tworzących układ nocyceptywny. Receptory nocyceptorowe, biorące udział w odbieraniu bodźców bólowych są wolnymi zakończeniami nerwowymi, zaliczanymi do grupy receptorów jonotropowych. Receptory wrażliwe na substancje modulujące ból klasyfikuję się do receptorów metabotropowych [4]. Proces nocycepcji, pozwala organizmowi na odbiór bodźców szkodliwych, poprzez ich neuronowy proces przetwarzania. Impulsy bólowe przekazywane są do rogu grzbietowego (znajdującym się w ośrodku rdzenia kręgowego) poprzez komórkę zwojową znajdującą się w zwoju rdzeniowym. W rogu grzbietowym impulsy bólowe przekazywane są do neuronu II rzędu, którym podążają do ośrodka w pniu mózgu. W tej części ośrodkowego układu nerwowego realizowane jest czucie bólu powolnego. Impulsy bólu szybkiego dochodzą neuronem III rzędu do okolicy czuciowej kory mózgu. Dzięki temu mechanizmowi czucie bólu jest uświadamiane [6]. Cechą charakterystyczną receptorów bólowych jest ich

wysoki próg pobudliwości oraz brak ich adaptacji do bodźca. W wyniku tego czucie bólu nie podlega procesowi habituacji, co sprawia że nie jesteśmy w stanie zapomnieć o doznaniu bólu. Kompensowane jest to istnieniem bardzo ważnego systemu hamowania bólu [5].

2.3. Układy hamowania bólu

Ośrodki tłumiące ból zmniejszają intensywność natężenia odczuwanego bólu. Proces redukowania wrażliwości bólowej nazywany jest analgezją [2]. Komórki nerwowe układu ośrodkowego oraz obwodowego wytwarzają endogenne opiaty, które pełnią istotną rolę w pomniejszaniu bólu [6]. Endorfiny działają na receptory opioidowe, znajdujące się we wszystkich strukturach układu tłumiącego. Stymulacja receptora opioidowego powoduje uaktywnienie związanego z nim białka G typu hamującego i zatrzymanie enzymu cyklazy adenylanowej, czego konsekwencją jest ograniczenie procesów metabolicznych w neuronach. Jest to jeden ze sposobów działania endorfin, ponieważ mogą one doprowadzić także do otwarcia kanałów potasowych, co przyczynia się do wypływu jonów potasu z komórki i hiperpolaryzacji błony komórkowej. Obydwa schematy działania peptydów opioidowych prowadzą do hamowania przekazywania impulsów bólowych w neuronach [3]. W organizmie ludzkim występują także inny układy biorące udział w modulacji czucia bólu, jak na przykład: układ serotoninergiczny, noradrenergiczny czy GABA-ergiczny [6]. Wymienione wyżej układy są w stanie zredukować ból o niskim natężeniu, jednakże w momencie występowania w organizmie ludzkim bólu o silniejszym natężeniu wymagane jest zastosowanie odpowiednich farmaceutyków w celu zlikwidowania jego objawów [7].

2.4. Leczenie bólu

Najpopularniejszym związkiem wykazującym podobne działanie do endomorfin jest morfina. Opium jest alkaloidem, otrzymywanym z soku niedojrzałych makówek maku lekarskiego, wykazującym silne działanie przeciwbólowe. Jest niezwykle skutecznym środkiem przeciwbólowym, jednakże stosowanie go niesie ze sobą możliwość uzależnienia od niego organizmu. Kolejną niekorzyścią stosowania morfiny jest fakt że, organizm z czasem jego stosowania nabiera do niego coraz to większej tolerancji. W celu uzyskania pożądanego efektu, wymagane jest stosowanie coraz to większych dawek morfiny [3, 7]. W obecnym momencie na szeroką skalę stosuje się nowoczesne nienarkotyczne środki przeciwzapalne czy, przeciwbólowe. Wśród nich najpopularniejszymi są: aspiryna (kwas acetylosalicylowy), paracetamol (acetaminofen) czy niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. NSAIDs – *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*).

Szeroka grupa tych leków wykazuje słabsze działanie, aczkolwiek nie uzależnia organizmu w takim stopniu jak morfina. Należy pamiętać, że pomimo zalet stosowania tych lekarstw, długotrwałe ich zażywanie może doprowadzić do uzależnienia organizmu oraz przyczynić się do groźnych powikłań np. żołądkowo-jelitowych [7].

Obecnie, największe wyzwanie w leczeniu bólu stanowi leczenie bólu przewlekłego utrzymującego się przez co najmniej sześć miesięcy. Pomimo uzyskania wielu informacji na temat obwodowych jak i centralnych mechanizmów przewlekłego bólu, użycie tej wiedzy do klinicznych terapii tego rodzaju bólu pozostaje problematyczne. Wydaję się że, główną przyczyną jest istnienie wielu mediatorów oraz szlaków sygnalizacji, mających wpływ na powstawanie przewlekłego bólu oraz wysoki stopień redundancji funkcjonalnej między nimi. Mało prawdopodobnym staje się fakt, iż pojedyncza cząsteczka, może być stosowana jako skuteczny terapeutyk farmakologiczny w leczeniu przewlekłego bólu. Ważnym wydarzeniem w kontekście leczenia zjawiska bólu było pojawienie się miRNA, jako kluczowych regulatorów potranskrypcyjnych ze zdolnością do modyfikacji ekspresji wielu cząsteczek mRNA i odpowiadającym im białek. Cząsteczki miRNA uważa się za ważne składowe różnych aspektów układu nerwowego, począwszy od jego rozwoju do chorób neurodegeneracyjnych [8]. Informacje uzyskane z badań nad cząsteczkami miRNA w odniesieniu do zjawiska bólu sprawiają, że zainteresowanie nimi jako potencjalnymi molekułami terapeutycznymi wzrasta z roku na rok.

3. miRNA

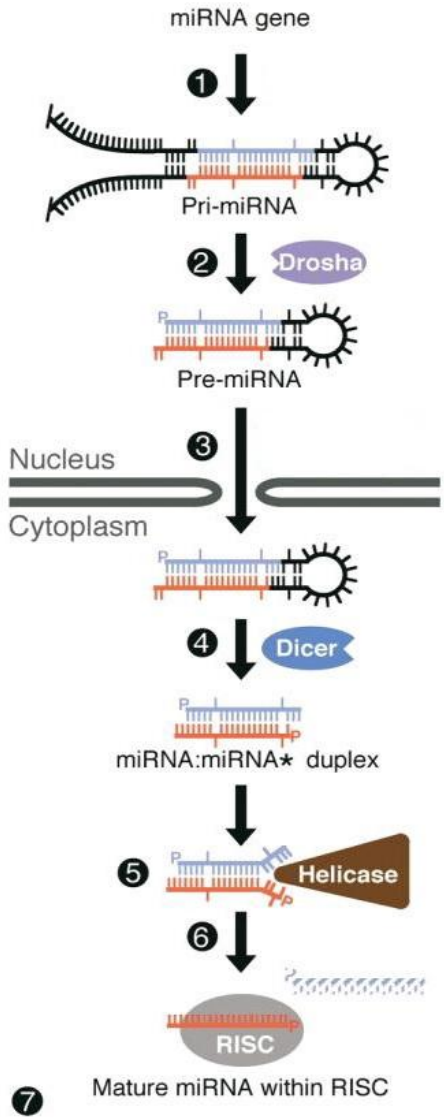
3.1. Ogólna charakterystyka miRNA

MikroRNA to rodzina małych, niekodujących RNA, które jak dotychczas wzbudziło wśród naukowców największe zainteresowanie z pośród wszystkich klas endogennych małych RNA. Występują one we wszystkich organizmach roślinnych jak i zwierzęcych. Wykazano ich istnienie u jednokomórkowych pierwotniaków, a także u organizmów bardziej złożonych między innymi u ludzi. Fakt ten nasuwa nam na myśl przypuszczenie, że mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem miRNA funkcjonował już u wczesnych eukariontów [9]. Do obecnej chwili wszystkie poznane miRNA, to jednoniciowe cząsteczki o średniej długości 22 nukleotydów (od 19 do 25 nt) posiadające na końcu 5’ resztę fosforanową i grupę hydroksylową na 3’ końcu. Ilość kopii miRNA w komórkach jest znacznie większa w porównaniu do ilości kopii mRNA oraz są znaczniej bardziej odporne na degradację niż cząsteczki mRNA. Odkryte i opisane miRNA tworzą zupełnie nową klasę niekodujących cząsteczek, które

nadały nowy wymiar w zrozumieniu działaniu regulacji genów. W świetle najnowszych badań, wiemy że miRNA mają dużą zdolność kontrolowania ekspresji niejednego genu poprzez regulację aktywności odpowiednich mRNA. Fakt ten może posłużyć nam jako podstawa do znalezienia skutecznej metody leczenia bólu z wykorzystaniem odpowiedniego rodzaju miRNA. Każda komórka zawiera zróżnicowany profil miRNA, nadekspresja danego genu miRNA może powodować jej nieprawidłowe funkcjonowanie [10].

3.2. Biogeneza miRNA

Fakt, że naukowcy zdołali wyjaśnić mechanizm biogenezy miRNA, przybliżył nas do wyjaśnienia przyczyn powstawania wielu groźnych chorób oraz daje nadzieję na rozwikłanie wielu z nich. Proces biosyntezy cząsteczek miRNA ma swój początek w jądrze komórkowym. MiRNA są syntetyzowane kilkuetapowo, pierwszym etapem biogenezy jest synteza pir-miRNA (rys.1). Powstające pri-miRNA tworzą strukturę spinki do włosów (ang. *hairpin*) składającej się z dwuniciowego fragmentu zakończonego jednoniciową pętlą. Końce takich cząsteczek zazwyczaj nie są do siebie komplementarne, tworząc jednoniciowe odcinki flankujące. W drugim etapie syntezy cząsteczek miRNA, pri-miRNA przetwarzane są przez jądrową rybonukleazę do pre-miRNA. Enzymem o aktywności Rnazy III, która tnie dwuniciowe pri-miRNA dając krótsze pre-miRNA jest *Drosha*. Enzym ten jest głównie zlokalizowany w jądrze komórkowym. Efektywność działania enzymu *Drosha* zależy od rozmiaru końcowej pętli i regionów flankujących miejsca cięcia. Krótsza pętla oraz mutacje w sekwencjach flankujących mogą przyczynić się do zmniejszenia lub całkowitego braku cięcia pri-miRNA przez *Drosha*. Enzym ten tnie cząsteczki pri-miRNA na około 70 nukleotydowe pre-miRNA o strukturze spinki do włosów. Powstałe molekuły posiadają na końcu 5’ resztę fosforanową i około 2 nt koniec 3’ z wolną grupą hydroksylową. Pre-miRNA transportowane jest z jądra komórkowego do cytoplazmy przez błonę jądrową. Dalsze etapy biosyntezy miRNA zachodzą w cytoplazmie [11]. Kolejnym etapem jest cięcie pre-miRNA w cytoplazmie przez enzym *Dicer*. Enzym ten podobnie jak *Drosha* należy do grupy enzymów o aktywności RNAz III. Wynikiem tego cięcia jest powstanie około 22 nukleotydowego dsRNA, w którym na końcu 3’ znajdują się dwa niesparowane nukleotydy. W dupleksie tym znajduje się miRNA, z którego powstanie końcowa cząsteczka miRNA oraz komplementarna do niej nić miRNA*. Następny etap polega na rozpleceniu dupleksu miRNA/miRNA* przez enzym helikazę. Później następuje włączenie jednej pojedynczej nici miRNA do kompleksu RISC (ang. RISC- *RNA-Induced Silencing Complex*). Druga nić jest uwalniana i degradowana [11, 12].

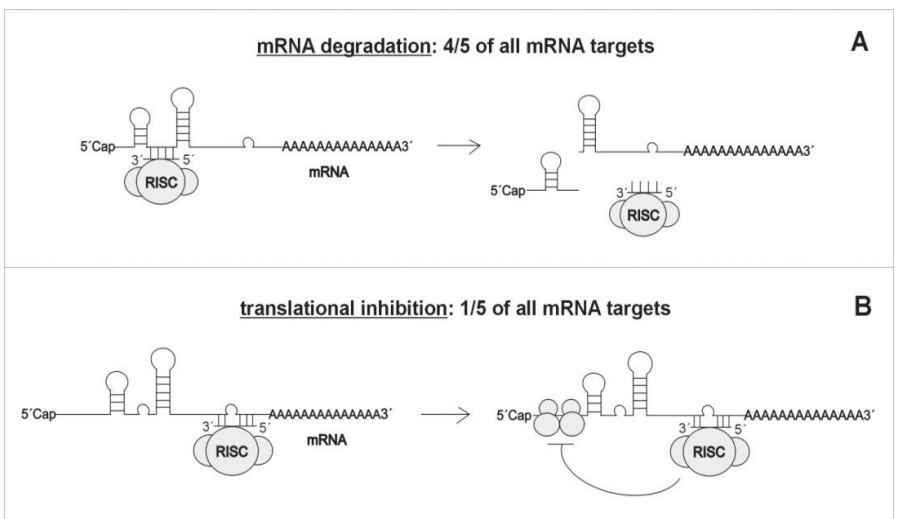


Rys. 1 Schemat biogenezy miRNA [12 zmodyfikowano]. Kolejnymi numerami oznaczono: 1 – synteza pri-miRNA, 2 – powstawanie pre-miRNA, 3 – transport pre-miRNA do cytoplazmy, 4 – powstawanie dsRNA, 5 – rozplecenie dsRNA, 6 – powstawanie kompleksu RISC, 7 – aktywny kompleks RISC

Aktywne miRNA w RISC jest gotowe do wykonywania swoich funkcji. Głównym działaniem miRNA jest specyficzne przyłączanie się do całkowicie (lub częściowo) komplementarnych odcinków danej cząsteczki mRNA, oddziaływają w ten sposób na jej stabilność i translację [10].

3.3. Mechanizmy działania miRNA

Najnowsze badania wskazują na interesujący fakt, dotyczący możliwości regulacji ekspresji mRNA poprzez aktywacje ich translacji, co jak się okazuje istotnie zwiększa potencjał regulatorowy cząsteczek miRNA [13]. Jednakże w tym rozdziale, przedstawione zostaną mechanizmy działania miRNA prowadzące do zahamowania syntezy białka. Kompleks RISC może obniżać ekspresje genów poprzez dwa potranskrypcyjne mechanizmy: degradacje mRNA lub inhibicję translacyjną (rys. 2).



Rys. 2 Schemat posttranskrypcyjnych mechanizmów działania miRNA [16]. (A) Degradacja mRNA; (B) Inhibicja translacji mRNA

Wybór posttranskrypcyjnego mechanizmu nie jest determinowany przez miRNA, a przez docelową cząsteczkę, która ma podlegać temu mechanizmowi. W zależności od tego jak duża jest komplementarność cząsteczek mRNA/miRNA będzie zależało jaki mechanizm będzie zachodził. Aby mógł zajść jeden z tych dwóch mechanizmów, odcinek co najmniej 2-8 nukleotydów końca 5' miRNA, musi być komplementarny do cząsteczki mRNA. Oprócz komplementarności pomiędzy miRNA i mRNA, kilka innych czynników zostało zidentyfikowanych jako mających wpływ na działanie miRNA. Należą do nich proces metylacji, zjawisko polimorfizmu

genów czy ich translokacji. W kompleksie RISC znajdują się białka wykazujące aktywność nukleaz, helikaz oraz białka umożliwiające wiązanie się z dsRNA. Głównym miejscem przyłączania się tego kompleksu są komplementarne sekwencje w regionie 3' UTR (ang. *untranslated region*) mRNA. Ważnym białkiem znajdującym się w tym kompleksie jest białko regulatorowe *Ago2* należące do rodziny białek *Argonaute*. Warto podkreślić, że białka z tej rodziny mają zdolność przyłączania RNA, które rozpoznają docelowy gen i przy ich pomocy degradują go lub blokują jego ekspresję [14, 15, 16]. Deadenylacja i późniejsza degradacja cząsteczki mRNA będzie zachodziła gdy miRNA będzie prawie 100% komplementarna do mRNA. Degradacja mRNA jest głównym mechanizmem regulacji ekspresji genów przez miRNA (rys. 2 A) [14, 16]. Duża część cząsteczek miRNA posiada jedynie komplementarny region około 2-8 nukleotydów końca 5'. Taki odcinek nukleotydów zwany jest regionem *seed*. MiRNA charakteryzujące się posiadaniem takie regionu względem danego mRNA powodują jego inhibicję translacji [15]. Zdając sobie sprawę, że proces translacji składa się z 3 etapów: inicjacji, elongacji oraz terminacji należy zwrócić uwagę że, do inhibicji translacji dochodzi głównie na etapie inicjacji. Jednakże nie jest to jedyna droga przeprowadzania inhibicji, ponieważ część badań dostarcza nam informacji że zahamowanie syntezy białka może również dojść na etapie elongacji [17]. Koncentrując się na etapie inicjacji, jedną z możliwości inhibicji translacji na tym etapie jest przyłączenie się kompleksu RISC w pobliżu końca 5' mRNA, w wyniku czego kompleks preinicjacyjny nie ma możliwości przyłączenia się do mRNA [18]. Rozpatrując natomiast pozostałe możliwości, cząsteczki miRNA mogą zablokować prawidłowy proces składania rybosomu lub przyłączyć się do ogona poliA w wyniku czego uniemożliwią wiązanie się PABP (ang. PABP – *PolyA Binding Protein*) do mRNA i ten schemat działania przedstawiony jest na rys. 2 B [16]. Nie ulega wątpliwości, że cząsteczki miRNA wykazują specyficzność tkankową, to znaczy odpowiadają za profil ekspresji genów danej komórki. Cząsteczki miRNA biorąc udział w regulacji ekspresji genów mają wpływ na wiele procesów biologicznych zachodzących w organizmach żywych. Jak wynika z przeprowadzonych badań, pewne grupy cząsteczek miRNA, poprzez regulację ekspresji genów neuronów wpływają na ich wzrost, aktywność oraz plastyczność synaps, co pozwala nam sądzić, że mogą one znacząco wpływać na przewodzenie sygnału nerwowego [10].

4. miRNA a zjawisko bólu

Duża ilość cząsteczek miRNA występująca w układzie nerwowym, posiada szeroki zasięg działania na komórkowe mechanizmy regulacyjne oraz utwierdzają nas w przekonaniu, że mikroRNA wykazują plejotropie

względem rozpoznawania docelowego genu [19]. Tak więc, zmieniona ekspresja białka jest cechą charakterystyczną dla bólu chronicznego i przyczynia się do rozwoju długoterminowej nadpobudliwości nocyceptywnych neuronów obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego. Przyczyną takiej modyfikacji układu nerwowego jest także, zmiana ekspresji cząsteczek sygnałowych, transmiterów, kanałów jonowych oraz struktury białek. Fakt, że cząsteczki miRNA są molekułami, które uczestniczą w mechanizmach regulacji genów, sprawia że przyczyniają się do zachodzenia tych zmian. Pierwsze badania, które sprawdzały regulacje i funkcje cząsteczek miRNA w różnych modelach patofizjologicznego bólu wsparły tą hipotezę. Zasugerowano, także że jeden z rodzajów cząsteczek miRNA odgrywa role w rozwoju antynocyceptywnej tolerancji powszechnie stosowanej morfiny. Dowiedziono, że morfina swoiście aktywuje cząsteczkę *let-7* (rodzaj cząsteczek miRNA u myszy), która tłumi receptory opioidowe dla morfiny. Wykazano również, że inhibicja *let-7* częściowo osłabiła tolerancję na antynocyceptywne efekty opioidowe [20].

Do chwili obecnej jedynie kilka badań dotyczyło roli miRNA w eksperymentalnym bólu zapalnym. Jedno z badań opierało się na wyłączeniu genu enzymu *Dicer* w neuronie $Na_V1.8$ (jest to neuron związany z procesem nocycepcji). Wynikiem czego była utrata lub inhibicja około 60 znanych lub nowych cząsteczek miRNA, które znajdowały się w tych neuronach. Wpłynęło to na zmianę ekspresji i regulację swoistych transkryptów nocyceptorów. Interesujący jest fakt, że usunięcie enzymu *Dicer* przyczyniło się do utraty wszystkich dojrzałych miRNA, a niektóre sensoryczne neurono-swoiste transkrypty były inhibitowane przez CamKII (kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny, która jest jedną z najważniejszych kinaz w komórkach nerwowych) i $Na_V1.8$.

W jednym z badań na szczurze laboratoryjnym u którego zaimplikowano kompletny adiuwant Freunda (ang. CFA – *complete Freund's adjuvant*) do mięśnia żwacza, kilka miRNA były istotnie choć różnie hamowane w neuronach zwoju trójdzielnego. Autorzy badania zasugerowali, że spadek miRNA pozwala na aktywowanie białek związanych z procesem bólowym, które przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego i allodynii, czyli bólu powstałego na skutek oddziaływania bodźca, który zwykle nie wywołuje bólu [20].

Jak wynika z przeprowadzonych badań na szczurze laboratoryjnym, który posiadał pourazowe uszkodzenie rdzenia kręgowego na skutek stłuczenia (ang. SCI – *spinal cord contusion*), ekspresja powyżej 250 cząsteczek miRNA została uregulowana po 4 godzinach, 1 dniu lub 7 dniach po operacji. Późniejsze bioinformatyczne analizy zidentyfikowały kilka docelowych genów regulowanych przez miRNA odgrywających ważną rolę w patogenezie SCI poprzez wpływanie na procesy zapalne lub apoptozę neuronów. Interesującym faktem, jest że niektóre miRNA regulujące przeciwzapalne i przeciwapoptotyczne białka były aktywowane,

podczas gdy kilka miRNA kontrolujące ekspresję prozapalnych i proapoptotycznych białek były zahamowane. Badanie te dostarczyły informacji, że miRNA przyczyniają się do patogenezy SCI. Jednak szczegółowe znaczenie miRNA *in vivo* w SCI pozostaje wciąż do ustalenia.

Kolejne badania przeprowadzone na szczurze laboratoryjnym z uszkodzonym obwodowym nerwem wskazują, że kilka rodzajów miRNA licznie ulegały ekspresji w tkankach i organach związanych z percepcją sensoryczną. Znaleziono je w znacznej ilości w dużych mielinowych i małych niemielinowych neuronach w zwojach korzeni bocznych (ang. DRG – *dorsal root ganglia*). Zaproponowano, że jeden z rodzaju cząsteczek miRNA (miRNA-183) w DRG odpowiedzialne jest za regulacje kilku ważnych genów dla specyficznej funkcji nocycepcji i podstawowych aferentnych neuronów mechanoreceptorów. Zanotowanie różnicy w ilości występowania miRNA-183 odnotowano także u szczura, któremu zaimplikowano CFA do mięśnia żwacza. Fakt ten może sugerować, że ten rodzaj cząsteczek miRNA może odgrywać główną rolę w kilku rodzajach bólu przewlekłego [20]. Przedstawione w tym rozdziale wyniki badań pozwalają przypuszczać, że cząsteczki miRNA mogą mieć duży potencjał terapeutyczny chorób cywilizacyjnych.

5. miRNA jako potencjalne cząsteczki terapeutyczne

W dobie poszukiwania coraz to nowych rozwiązań do walki z chorobami i wiążącemu się z nimi bólu, zaczęto przeprowadzać badania w których sprawdzano terapeutyczne możliwości mikroRNA. Odnotowano zmiany ekspresji miRNA u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, zapaleniem kości i stawów oraz układowym toczeniem rumieniowatym. Różnice w profilach ekspresji miRNA zostały również pokazane pomiędzy endometrium kobiet zarówno tych, które posiadają oraz nie posiadają bolesnej endometriozy we wczesnych fazach wydzielniczych. Podobnie, zmiana ekspresji miRNA została odnotowana u pacjentów z chronicznym zespołem bólowym pęcherza moczowego. Sugerowano, że zwiększona ekspresja odrębnych grup cząsteczek miRNA w tkance pęcherza moczowego u tych pacjentów może indukować hamowanie receptorów neurokininowych. Mechanizm ten może być także ważny dla innych bolesnych chorób powiązanych z modulacją receptorów neurokininowych, jak choroba nowotworowa lub zapalenie trzustki. Zgromadzone wyniki pokazują jednoznacznie, że cząsteczki miRNA odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji ekspresji genów w kilku chorobach ludzkich powiązanych z bólem. W związku z tym mogą one stanowić nowe biomarkery dla odpowiednich chorób lub posłużyć jako nowe cele dla poszczególnych antagonistów miRNA. Wydaje się, że stosunkowo niedawno odkryte cząsteczki miRNA zdobywają coraz to większe zainteresowanie jako narzędzie badawcze. Jak pokazują przytoczone przeze mnie przykłady mogą być wykorzystywane z powodzeniem jako, biomarkery i potencjalnie nowej

generacji leki skierowane przeciwko wielu chorobom. Chociaż większość badań jest wciąż opisowych, pokazujących regulację tylko na poziomie miRNA, nie jest wykluczone, że ich znaczenie w walce zjawiskiem bólu będzie wzrastało w ciągu kilku kolejnych lat. Niemniej jednak kilka nowych ostatnio opublikowanych badań dostarcza nam w tym kierunku nadziei [8, 20]. Dla przykładu, podskórne podanie antysensownego inhibitora mir-122 zostało z sukcesem testowane w drugiej fazie badań klinicznych przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C (ang. HCV – *hepatitis C virus*) u człowieka [20]. W kolejnym badaniu udało się skutecznie podskórnie dostarczyć asRNA (ang. asRNA – *antisense* RNA) jako inhibitora rodziny cząsteczek miRNA-33 znajdujących się u naczel-nych. Dożylne wstrzyknięcie liposomów zawierających substancję imitującą miRNA34 w celu leczenia nowotworu wątroby jest w fazie I badań klinicznych [21]. Korzystając z wyników wykonanych badań, możliwe że uda się uzyskać sposoby dostarczania modulatorów miRNA do obwodowych i centralnych neuronów czuciowych wspomagając w ten sposób opracowywanie nowych technik leczenia bólu. miRNA są kluczowymi molekułami zmieniającymi progi aktywacji i pobudliwości czuciowych nocyceptorów Nav1.8. Może to dostarczyć nowego narzędzia do leczenia pacjentów z chronicznym bólem zapalenia. Oczywistym faktem jest, że ze względu na dużą liczbę funkcji jakie spełnia miRNA w regulacji translacji, całkowita utrata miRNA przez delecję enzymu *Dicer* mogło by utrudniać w innych funkcjach fizjologicznych i wywoływać skutki uboczne. Jednak, wyciszanie genów pojedynczymi specyficznymi cząsteczkami miRNA może zredukować ból zapalny poprzez modelowanie pobudliwości układu nocyceptywnego. Przyszłe badania roli miRNA jako cząsteczki regulujące przetwarzanie i rozwój bólu mogą dostarczyć scharakteryzowanych cząsteczek miRNA jako potencjalnych i specyficznych leków łagodzących ból [20].

6. Perspektywy na przyszłość

Szczegółowe przeanalizowanie opublikowanej literatury pozwala na sformułowanie kilku wniosków i spostrzeżeń dotyczących potencjału cząsteczek miRNA w leczeniu bólu. Z przedstawionych w rozdziale pierwszym rozważań jasno wynika, że stosowane dotychczas farmaceutyki oprócz wielu korzyści które nam dają, niosą również istotne wady objawiające pojawieniem się groźnych powikłań lub uzależnień podczas dłuższego stosowania ich. Nie ulega wątpliwości, że niedoskonałości (a w wielu przypadkach poważne wady) stosowanych lekarstw przyczyniły się do poszukiwania alternatywnych dróg łagodzenia bólu. Warto podkreślić, że kolejnym bodźcem do szukania nowych oraz skuteczniejszych metod leczenia jest wzrost zapadalności na choroby XXI wieku w naszym społeczeństwie. Należy sądzić, że pojawienie się miRNA w kontekście leczenia bólu dało sporą nadzieję na rozwiązanie problemów z dotychczasowymi metodami leczenia. Związku z tym, miRNA odgrywają funkcjo-

nalną rolę w modulacji układu nocyceptywnego. Oddziaływają jednocześnie na kilka mediatorów w skomplikowanym szlaku bólu, co bardzo cenne jest w przypadku prób leczenia bólu przewlekłego, na którego powstawanie ma wpływ wiele mediatorów. Jednakże, pomimo istnienia niezawodnych narzędzi do badania ekspresji i regulacji miRNA w szlakach nocyceptywnych, wyjaśnienie ich udziału w funkcjonowaniu zjawisku bólu pozostaje nadal mało poznane. Należy jeszcze uwzględnić fakt, że ze względu na duża liczbę funkcji jakie spełnia miRNA w regulacji translacji, mogą one powodować oprócz pożądanych efektów, pewne skutki uboczne. Dlatego ważne jest doskonalenie ich jako molekuł terapeutycznych w odniesieniu do ich modyfikacji *in vitro*: dostarczanie, biodostępność, skuteczność i bezpieczeństwo. Jest to dział badań charakteryzujący się wieloma wyzwaniami i pułapkami ale także ogromną nadzieją na zrozumienie i leczenie patologicznego bólu. Wydaje się, że w najbliższych latach okaże się czy miRNA podołają wywiązaniu się z wielkich obietnic danym biologii molekularnej i leczeniu wielu chorób układu nerwowego [8].

Literatura

1. Mattick J.S. *Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms*, Bioessays, 2003, s. 930-939
2. Dubin A.E. *Nociceptors: the sensors of the pain pathway, Journal of Clinical Investigation*, 2010, s. 3760-3772
3. Ganong W.F. *Fizjologia*, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2007, s. 143-148
4. Sadowski B. *Biologiczne mechanizmy zachowania się ludzi i zwierząt*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001, s. 249-266
5. Górska T. *Mózg a zachowanie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000, s. 252-269
6. Tafil-Klawe M. *Wykłady z fizjologii człowieka*, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2009, s. 264-272
7. Wordliczek J. *Leczenie bólu*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011
8. Bali K.K. *Noncoding RNAs: key molecules in under standing and treating pain*, Trends in Molecular Medicine, 2014, s. 437-448
9. Szarzyńska B., Szweykowska-Kulińska Z., Jarmołowski A., *Mikrozarządzanie*, Biotechnologia, 2005, s. 144-164
10. Munker, R. *MicroRNA profiling in cancer*, Clinical Science, 2011, s. 141-158
11. He L. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*, Nature Reviews Genetics, 2004, s. 522-531
12. Shomron N. *MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, s. 6
13. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*, Science, 2007, s. 1931-1934
14. Bartel D.P. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanizm and function*, Cell, 2004, s. 281-297
15. Wang Z., *MicroRNA: A matter of life or death*, World Journal of Biological Chemistry, 2010, s. 41-54

16. Tomankova T. *Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in the lung*, Respiratory Research, 2010, s. 111-159
17. Zhao S. *Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation*, Science China Life Sciences, 2009, s. 1111-1116
18. Cannell I.G. *How do microRNAs regulate gene expression*, Biochemical Society Transactions, 2008, s. 1224-1231
19. Fiore R. *MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease*, Biochimica et BiophysicaActa, 2008, s. 471-478
20. Niederberger E. *MicroRNAs as New player in the pain game*, Pain, 2011, s. 1455-1458
21. Rottiers V. *Pharmacological inhibition of a microRNA family in nonhuman primates by a seed targeting 8-mer antimiR*, Science Translational Medicine, 2013, 20;5

MiRNA w leczeniu bólu

Streszczenie
Niekodujące RNA u organizmów wyższych odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek poprzez regulacje ekspresji białek, transkrypcji i alternatywnego *splicing*. Najdokładniej przebadane i uznawane za ważne składowe różnych aspektów układu nerwowego są cząsteczki zwane miRNA. Wzrost zapadalności społeczeństwa na choroby cywilizacyjne, którym towarzyszy zjawisko bólu chronicznego sprawiło zainteresowanie naukowców połączeniami między miRNA a zjawiskiem bólu. Cząsteczki miRNA wydają się być przydatnym narzędziem w zrozumieniu transkrypcyjnych i translacyjnych mechanizmów chronicznego bólu. MiRNA poprzez regulację ekspresji genów neuronów wpływają na ich przewodzenie sygnału nerwowego. Manipulacja ekspresją odpowiedniego rodzaju cząsteczek miRNA *in vivo*, może stworzyć nam możliwość oddziaływania jednocześnie na kilka mediatorów w skomplikowanym szlaku bólu. Ze względu na dużą liczbę funkcji jakie spełnia miRNA w utrzymaniu homeostazy w organizmie ludzkim, nieprawidłowe ich zastosowanie może powodować pewne nieporządane efekty. Ważne jest doskonalenie ich jako molekuł terapeutycznych w odniesieniu do ich modyfikacji *in vitro*: dostarczanie, biodostępeność, skuteczność oraz bezpieczeństwo. W niedalekiej przyszłości okaże się czy leczenie bólu przy użyciu cząsteczek miRNA stanię się skuteczną i powszechnie stosowaną terapią.
Słowa kluczowe: ból, miRNA, cząsteczki terapeutyczne

MiRNA in treating pain

Abstract
Non-coding RNA in higher organisms play an important role in normal cell function by regulation of protein expression, transcription and alternative splicing. The most thoroughly tested and recognized as an important component of various aspects of the nervous system are molecules called miRNAs. Increased incidence of lifestyle diseases society, accompanied by the occurrence of chronic pain caused interest of scientists connections between miRNAs and the occurrence of pain. MiRNAs seem to be a useful tool in understanding the transcription and translation mechanisms of chronic pain. MiRNA regulate gene expression in neurons caused changes in conduction of nerve signal. Manipulation of expression of the corresponding molecular species miRNAs in vivo, we can create the possibility of influencing simultaneously on several mediators in the complex pathway of pain. Due to the large number of functions that correspond to miRNAs in maintaining homeostasis in the human body, improper use thereof can cause certain undesirable effects. It is important to improve them as therapeutic molecules in relation to the *in vitro* modification of: providing, bioavailability, effectiveness and safety. The near future will prove if the treatment of pain using miRNA molecules will become effective and widely used treatment.
Key words: pain, miRNA, therapeutic molecules

Adrian Krajewski[1], Maciej Gawroński[2], Arkadiusz Goede[2]

miRNAs – znane cząsteczki w nieznanej roli

1. Wprowadzenie

Postęp technologiczny i coraz dokładniejsze techniki pozwalają na izolację i identyfikację nawet najmniejszych molekuł biorących udział w sterowaniu skomplikowaną siecią szlaków biochemicznych, których niezakłócony przebieg jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania komórek, tkanek i całych organizmów. Odkryte stosunkowo niedawno – bo na początku lat 90 cząsteczki mikro RNA(miRNAs) spowodowały rewolucję w naszym postrzeganiu dotyczącym regulacji ekspresji genów. Szacuje się, że miRNAsbiorą udział w kontroli aktywności ponad połowy wszystkich genów kodujących białka. Cząsteczki te zaangażowane są w niemal każdy aspekt biologii komórki – od jej powstania, poprzez kierowanie cyklem komórkowym i metabolizmem, aż po programową śmierć. Zaburzenia w syntezie miRNAs mogą prowadzić do stanów patologicznych. Zmiany w profilu ekspresji miRNA obserwuje się m. in. w chorobach układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy, nowotworach czy nawet chorobach psychicznych [1-6]. Udział w tych zdarzeniach powoduje, że miRNAs stanowią potencjalne biomarkerypozwalajce na diagnostykę, monitorowanie pocesu leczenia, a także ocenę rokowań w wielu stanach chorobowych.Początkowo uważano, że dominującym mechanizmem stojącym za działaniem miRNA jest post-transkrypcyjne łączenie z docelowym mRNA w regionie 3'UTR (3' untranslated region). Intensywnie prowadzone badania wskazały, że kanoniczna ścieżka miRNA, nie jest jedyną dzięki której te niekodujące, jednoniciowe RNA mogą wywierać wpływ na aktywność poszczególnych genów. Coraz liczniejsze doniesienia wskazują, że miRNAs mogą także łączyć się do komplementarnych regionów 5'UTR, regionów kodujących mRNA oraz promotorów genów [7-9]. Wszystko to powoduje, że traktowanie cząsteczek miRNA jako elementów przede wszystkim post-transkrypcyjnej kontroli ekspresji nie jest w pełni uprawnione, a mnogość mechanizmów przez które te

[1] Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, adres e-mail: krajewski.adrian@wp.pl
[2] Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

niewielkie cząteczkimogą na niąwpływać, pozwala sądzić, że liczba procesów w które zaangażowane są miRNAs wielokrotnie przewyższa nasze początkowe przypuszczenia. Niniejsza praca ma na celu podsu-mowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej mechanizmów działania microRNA ze szczególnym uwzględnieniem roli jądrowych miRNA w kontroli ekspresji genów na poziomie ich transkrypcji.

2. miRNA w ujęciu tradycyjnym

2.1. BiogenezacząsteczekmiRNA

Każda cząsteczkami RNA powstaje w wyniku serii przemian, których efektem jest przekształcenie pierwotnego pri-miRNA, w dojrzałemi RNA regulujące ekspresję genów. Biosynteza miRNAs zachodzi dwuetapowo – pierwszy etap ma miejsce w jądrze komórkowym, natomiast drugi w cyto-plazmie. Po transkrypcji przez polimerazę II powstałe pri-miRNA w wyniku endonukleazowej aktywności enzymu Drosha, przycinane jest do pre-miRNA o strukturze spinki do włosów o długości 60-100 nukleotydów [10]. Następnie, przy udziale eksportyny 5 i Ran-GTP, pre-miRNA transportowane jest z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie podlega kolejnej obróbce enzymatycznej przeprowadzanej przez kompleks DICER. Dojrzałe miRNA ma długość 20-30 nukleotydów i składa się z dwóch nici – nici wiodącej, która bierze udział w wyciszaniu genów oraz nici towarzyszącej (passengerstrand) oznaczanej czasami jako miRNA*. Dalej, mikroRNA włączane jest do kompleksu enzymatycznego RISC (RNA InducedSilencingComplex) w którym nić towarzysząca najczęściej jest degradowana, jednakże istnieją doniesienia o tym, że może ona być nicią aktywną. Najważniejszymi składnikami kompleksu RISC są białka Argonaute (Ago1-4), które odpowiadają za wiązanie miRNA i rozpozna-wanie docelowego mRNA [11].

2.2. Mechanizm post-transkrypcyjnego wyciszania ekspresji genów

Kanoniczny mechanizm działania microRNAodnosi się do post-trans-kprypcyjnego wyciszania genów poprzez wiązanie się do komplemen-tarnych cząsteczek mRNA.MicroRNAw kompleksie z białkiem Argonaute wyszukuje komplementarną sekwencję w docelowym mRNA. Dla stwo-rzenia dupleksu kluczowy jest 6-7 nukleotydowy region na końcu 5'UTR w miRNA zwany seed. Od stopnia komplementarności pomiędzy nim, a cząsteczką matrycowego RNA zależy mechanizm poprzez który dojdzie do wyciszenia ekspresji. W przypadku stuprocentowej komplementarności dochodzi do degradacji mRNA, jednakże taki mechanizm obserwowany jest przede wszystkim wśród roślin. W organizmach zwierzęcych dominuje

mechanizm indukowany niepełną komplementarnością pomiędzy dwiema niciami. W takim przypadku następuje inhibicja translacji, destabilizacja mRNA i transfer do ciałek P, gdzie ostatecznie następuje jego degradacja. MicroRNA stanowi bardzo wydajny system regulacyjny, ze względu na to, że jedna taka cząsteczka może wpływać na ekspresję wielu genów, ponieważ na różnych mRNA może występować taka sama lub bardzo podobna sekwencja w regionie 3'UTR. Jak już wspomniano, najczęstszym miejscem wiązania się miRNA do docelowego matrycowego RNA jest region 3'UTR. Możliwe jest także wiązanie się do regionu 5'UTR czy też sekwencji kodujących białko. To wszystko powoduje, że liczba celów molekularnych z którymi mogą łączyć się microRNA jest ogromna i jak się okazuje, post-transkrypcyjne wyciszanie nie jest jedynym mechanizmem przez który te niewielkie cząsteczki mogą kierować skomplikowanym szlakiem biogenezy białek [12, 13].

3. Promotorowe microRNA

Jak już wspomniano, miRNAs kojarzone są przede wszystkim jako elementy wyciszające ekspresję genówpoprzezinhibicjętranslacji mRNA. Jednak coraz większa liczba publikacji wskazuje, że microRNAs mogą także występować w innej, jeszcze stosunkowo mało poznanej roli – regulatorów, które mogą zarówno aktywować jaki i wyciszać ekspresję genów już na etapie transkrypcji poprzez bezpośrednie oddziaływanie z DNA.

3.1. Jądrowa lokalizacja microRNAs i odkrycie promotorowych miRNA

Początkowo uważano, że działanie miRNAs ograniczone jest do przestrzeni cytoplazmatycznej komórki. Jednakże, gdy funkcjonalne elementy maszynerii enzymatycznej odpowidzialnej za działanie RNA i zostały odnalezione m.in. w jądrze komórkowym i mitochondriach, pozwaliło to wysunąć hipotezę, że microRNA mogą wywierać wpływ na regulację ekspresji także w innych kompartmentach komórkowych. Ponadto, coraz dokładniejsze techniki sekwencjonowania pozwoliły ustalić, że część miRNAs wykazuje jądrową lokalizację. Ponadto udało się ustalić, że w transport pomiędzy cytoplazmą, gdzie miRNA powstają, a jądrem komórkowym zaangażowany jest kompleks CRM1/Ekportyna 1 oraz Importyna 8 [14, 15]. To wzmocniło podejrzenie, że miRNA regulują ekspresję także poza cytoplazmą. Kolejnym krokiem do zidentyfikowania nowego mechanizmu działania miRNA, było odkrycie, że syntetyczne dwuniciowe RNA (dsRNA) zwane także małymi aktywującymi RNA (saRNA), mogą intensyfikować ekspresję genów poprzez odziaływanie z promotorami w procesie nazwanym aktywacją RNA (RNAa). Dodatkowo, analiza mutacji wykazała, że podobnie

jak w przypadku cząsteczek micro RNA, do zainicjowania procesu nie jest niezbędna pełna komplementarność pomiędzy dsRNA i docelowąsekwencją [16, 17]. To pozwoliło na wysunięcie hipotezy o tym, że wytwarzane w komórce miRNAs również mogą uczestniczyć w mechanizmie RNAa. Rzeczywiście założenie to okazało się słuszne. Huang i wsp. jako pierwsi zidentyfikowali miR-373, jako endogenne promotorowe miRNA, wytwarzane przez komórki ludzkie. Cząsteczka ta jest zdolna do aktywowania ekspresji E-kadheryny oraz białka CSDC2 (cold-shock domain containing protein C2), poprzez łączenie się z promotorami. Stopień komplementarności pomiędzy miR-373 i sekwencjami w regionie promotorowym wynosi około 80%. Aktywacja ekspresji zależna była od enzymu Dicer i powodowała zwiększoną rekrutację RNAP II do regionu promotora [18]. Od momentu odkrycia nowego mechanizmu regulacyjnego, udało się zidentyfikować kilkadziesiąt nowych miRNAs promotorowych, których celem działania jest wiele różnych, ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki genów. W kolejnym podrozdziale opisane zostaną przykłady zidentyfikowanych w ostatnich latach promotorowych miRNAs.

3.2. PromotorowemiRNAs – stan wiedzy na dziś

Promotorowe miRNA mogą brać udział zarówno w procesie transkrypcyjnego wyciszania genów (TGS – Transcriptonal Gene Silencing), jak i w procesie aktywacji ekspresji (RNAa). Mechanizm działania tych cząsteczek również okazał się być bardzo różnorodny i złożony. Takie microRNA mogą stanowić zarówno regulatory *cis* jak i regulatory *trans.* Przykład miRNA będącego czynnikiem *cis* stanowi miRNA-320, wyciszające ekspresję genu POLR3D kodującego jedną z podjednostek dla polimerazy III. Sekwencja dla miR-320 ulokowana jest na nici antysensownej, dokładnie powyżej promotora POLR3D. Wysoka ekspresja miR-320 koreluje ze zmniejszeniem ilości mRNA dla POLR3D. Podejrzewa się, że miR-320 działa jako czynnik rekrutujący białko Ago1 i pośredniczacy w modyfikacjach epigenetycznych promomotora, gdyż komórki transfekowane tym miRNA charakteryzowała zwiększona ilość Ago1, metylotransferazy EZH2 oraz histonu H3K27me3 [19]. MicroRNAs działające jako czynniki trans wydają się być bardziej powszechne. MiR-589 może w ten sposób zwiększać ekspresję genów COX-2 i PLA2G4A. Inne badania wykazały, że syntetyczny miR-423-5p indukuje TGS łącząc się z konserwatywnym regionem promotora receptora progesteronowego. Co ciekawe, w przypadku wyciszenia ekspresji przez to microRNA nie zaobserwowano charakterystycznych dla TGS zdarzeń, takich jak modyfikacja histonów, czy metylacja DNA. MicroRNA są uznanymi czynnikami mogącymi inicjować i modulować przebieg procesu onkogenezy. Dlatego

też cząsteczki te budzą wielkie zainteresowanie, ze względu na potencjalną możliwość wykorzystania ich jako celów molekularnych w terapii przeciwnowotworowej lub jako markerów pozwalających na wykrycie, bądź też przewidzenie rokowania, a w późniejszym etapie także monitorowanie przebiegu leczenia. Dlatego też po odkryciu promotorowych miRNA, szybko podjęto się weryfikacji hipotezy, czy te cząsteczki również mogą wpływać na procesy,którekojarzone są z nowotworzeniem. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech komórki nowotworowej jest jej nieprawidłowa proliferacja, spowodowana zaburzeniem ekspresji białek cyklu komórkowego. W wyniku badań przeprowadzonych *in silico* udało się zidentyfikować miejsce wiązania dla kilku microRNA, na promotorze genu Ccnb1, który koduje cyklinę B1. Cykliny stanowią grupę białek, które wraz z kinazami cyklinozależnymkontrolują przejście komórek z jednej fazy cyklu komórek do drugiej. Kompleks cyklina B1 fosoforylując kinazę CDK1 umożliwia progresję do fazy M cyklu komórkowego. Huang i wsp. w swojej pracy wykazali, że ekspresja cykliny B1 jest zależna od elementów uczestniczących w biogenezie miRNA (enzymy Drosha i Dicer) oraz od białek odpowiadających za funkcjonowanie tych cząsteczek (Ago1 i Ago2). MiR-744 zwiększał aktywność polimerazy RNAP II oraz zwiększał ilość histonu H3K4me w regionie miejsca startu transkrypcji (TSS – transcription starting site). Nadekspresja Ccnb1 sprzyja procesowi nowotworzenia, a gen ten uznawany jest za onkogen. W opisywanym badaniu, wykazano, że mysie komórki TRAMP C1, transfekowane miR-744 i miR-1186, w przypadku krótkiej nadekspresji Ccnb1 wykazywały zwiększoną proliferację w stosunku do komórek w których nadekspresja tego genu trwała dłużej. Zależność tę potwierdziły badania *in vivo,* gdzie u myszy z wszczepionymi komórkami nowotworowymi pasażowanymi do dziesięciu razy, obserwowano większą objętość guza, niż u tych zwierząt, którym wszczepiono komórki pasażowane 30 razy. Można to wytłumaczyć tym, że nadekspresja cykliny B1 sprzyja gromadzeniu się aberracji chromosomowych, co powoduje zmniejszenie tempa proliferacji komórek nowotworowych [20]. Oprócz opisanych zidentyfikowano także miRNAs wiążące się z promotorami różnych, innych genów m.in. interleukiny 24 i 32 czy czynnika NFI-A [21, 22].O ile istnienie zjawiska transkrypcyjnego wyciszania i aktywacji genów przez miRNa jest już dosyć dobrze udokumentowane, trudności nastręcza opis mechanizmu, który leży u podstaw tego zjawiska. Najbardziej prawdopodobne jest tworzenie się trójniciowycch struktur DNA-miRNA. Paugh i wsp. w swojej pracy potwierdzili istnienie takich struktur, za pomocą spektroskopii NMR, analizy FTIR i SPR. Tripleksy takie były tworzone zarówno przez miRNA bogate zarówno w puryny jaki i pirymidyny, a które łączyły się z specyficznymi miejscami na dupleksie DNA. Autorzy przypuszczają, że

mechanizm aktywacji związany jest z niewielkim rozwinięciem się helisy DNA, co może być potencjalnym czynnikiem wzmagającym ekspresję. Druga wspomniana przez badaczy hipoteza mówi, że stworzenie dupleksu w mejscu zbliżonym do promotora może indukować taką zmianę jego topologii, która będzie umożliwiała łatwiejsze wiązanie się czynników transkrypcyjnych [23]. Liczba poznanych miRNAs cały czas rośnie. Rośnie też nasza świadomość, że mechanizm działania tych cząsteczek jest o wiele bardziej złożony niż by mogło się wcześniej wydawać. Cały czas odkrywamy nowe szlaki, w których miRNAs odgrywają znaczącą rolę. Nasza wiedza jednak cały czas pozostaje niepełna. O tym, że miRNAs mają przed nami wiele do ukrycia, świadczyć mogą badania, w których wskazuje się na nowy model działania miRNAs – jako cząsteczek uruchamiających działanie sekwencji wzmacniających – enhancerów. MikroRNA (m.in. miR-26a-1, miR-3339) nazywane przez autorów eRNA, łączyły się z komplementarnymi sekwencjami enhancerów, powodując zmiany epigenetycznne i zwiększoną ekspresję sąsiadujących genów [24]. Przedstawione powyżej dane wskazują na konieczność kontynuowania badań nad miRNAs jako regulatorami transkrypcji.

3.3. PromotorowemiRNAs a wirus HIV

Transkrypcja kompletnego wirusa HIV, wymaga współdziałania wielu różnych mechanizmów kontrolnych. Badania wykonane w ostatnim czasie wskazują na ważną rolę niekodujących RNA, które zaangażowane są w proces jego rozwoju. Po zintegrowaniu się z organizmem gospodarza wirus rozpoczyna namnażanie swojego mRNA w niemal wszystkich komórkach $CD4^+$. W tych komórkach, wirusowe białko Tat, odziałowywuje ze strukturą spinki do włosów wirusowego RNA, zwanego TAR (transactivation response element), który zwiększa intensywność rekrutacj polimerazy, co powoduje zwiększenie transkrypcji elementów wirusa. W części limfocytów $CD4^+$, wirus integruje się z genomem, lecz pozostaje w uśpieniu i nie dochodzi do procesu transkrypcji. Przejście do fazy latencji wiąże się z utworzeniem zamkniętej heterochromatyny, metylacją histonów oraz ich deacetylacją. Procesy te są przeprowadzane przez specyficzne metylotransferazy i deacetylazy. Z kolei aktywacja wirusa przebiega z utworzeniem euchromatyny i acetylacją ogonów histonowych. Mechanizm odpowiedzialny za przejście wirusa w stan utajenia nie został w pełni poznany. Wiadomo, że wirusowy materiał genetyczny integruje się z chromatyną gospodarza, na której tworzą się 3 nukleosomy w regionie 5'LTR wirusa. Lokalizacja tych nukleosomów jest stała i przewidywalna. Ostatnie badania pokazują, że niekodujące RNA, w tym promotorowemi RNA mają duży udział w procesie tworzenia heterochromatyny. Niedawno odkryte wirusowe miR-H3 okazuje się wzmagać namnażanie się HIV-1 poprzez łączenie się z sekwencją TATA w regionie 5'LTR wirusa. Jest to pierwsza praca w której wykazano, że

miRNA kodowane przez wirus wykorzystuje aparat enzymatyczny nosiciela w celu intensyfikacji namnażania. Ponadto wcześniej opisywane promotorowe miRNA łączyły się w odległości do 1000 par zasad od miejsca startu transkrypcji, natomiast w tym przypadku obserwujemy pokrycie przez miR-H3 kluczowego miejsca dla inicjacji transkrypcji, gdzie dochodzi do złożenia kompleksu preinicjacyjnego polimerazy II (PICs – polymerase II pre-initiationcomplex). MiR-H3 jest kolejnym poza białkiem Tet elementem wirusowym kontrolującym proces jego namnażania. Nadekspresja mir-H3 wywoływała wzmożoną produkcję mRNA wirusa oraz jego białek. Co niezwykle ważne, tę właściwość miR-H3 wykazywał zarówno w limfocytach $CD4^+$ aktywowanych jak i w limfocytach $CD4^+$ spoczynkowych. Trudność w usunięciu latentnych wirusów jest głównym powodem niepowodzenia terapii przeciwwirusowych. Stosowane dzisiaj metody, farmakologiczne charakte ryzują się dużą toksycznością dla pacjenta, dlatego teżodkrycie miR-H3 daje nadzieję na wypracowanie precyzyjnej, selektywnej i pozbawionej efektów ubocznych strategii pozwalającej na aktywację wirusa i pełną jego eradykację [25]. U osób zakażonych wirusem HIV, obserwuje się zmieniony poziom wielu cytokin. Może on być spowodowany zaburzoną ekspresją miRNAs nosiciela. W zainfekowanych aktywowanych komórkach $CD4^+$, obserwuje się obniżony poziom let-7 oraz podwyższony poziom interleukiny 10. Z kolei let-7i komplementarne do regionu promotora IL-2 powoduje obniżenie ekspresji interleukiny 2. Dane te wskazują na udział promoto-rowych mikroRNA w procesie aktywacji wirusa HIV. Ponadto w tej samej pracy autorzy wykazali, że promotorowe mikroRNA mogą wpływać na ekspresję m.in. insuliny, kalcytoniny czy c-myc [26]. Wszystko to powoduje, że należy zintensyfikować badania nad promotorowymi miRNAs, w kon-tekście zakażenia HIV, gdyż tylko pełne poznanie biologii wirusa umożliwi w przyszłości opracowanie skutecznych terapii.

4. Podsumowanie

Ostatnie badania zidentyfikowały nowy, dosyć niespodziewany mechanizm regulacji ekspresji genów. Znane od lat cząsteczki wiązanie przede wszystkim z działaniem na poziomie post-transkrypcyjnym, okazują się być działającymi niezwykle kompleksowo regulatorami. Zdolność miRNA do zrówno aktywacji jak i wyciszania ekspresji, powoduje, że musimy spojrzeć szerzej na funkcjonowanie tych cząsteczek w komórce. Pomocna w zrozumieniu nowej roli miRNAs, będzie wiedza jakiej dostarczyły nam badania nad innnymi rodzajami małych niekodujących RNA, gdyż promotorowe miRNA wykazują analogię do cząsteczek siRNA, czy saRNA. Nowe, coraz bardziej czułe metody detekcji i sekwencjonowania kwasów nukleinowych, w niedługim czasie z pewnością pozwolą na uzyskanie nowychh informacji, dzięki którym nasza wiedza na temat ncRNAs będzie bardziej kompletna.

Literatura

1. SantangeloC. , Zicari A., Mandosi E., Scazzocchio B., Mari E., Morano S. *Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives*, British Journal of Nutrition, 115 (2016), s. 1-16
2. Kato M., Castro N.E., Natarajan R. *MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications*, Free Radical Biology and Medicine, 64 (2013), s. 85-94
3. Issler O., Chen A. *Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders*, Nature Review Neuroscience, 16 (2015), s. 201-212
4. Clauss S., Wakili R., Hildebrand B., Kääb S., Hoster E., Klier I.*MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study - A Sub-Study of the Munich Marathon Study)*, PLoS ONE, 11(2) (2016), e0148599. doi:10.1371/journal.pone.0148599
5. Vegter E.L., van der Meer P., de Windt L.J., Pinto Y.M., Voors A.A. *MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy*, European Journal of Heart Failure, 18(5) (2016), s. 457-468
6. Di Leva G., Briskin D., Croce C.M.*MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy*, Upsala Journal of Medical Sciences, 117 (2012), s. 202-216
7. Zhou H., Rigoutsos I.*MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells*, RNA, 20 (2014), s. 1431-1439
8. Younger S.T., Corey D.R.*Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters*, Nucleic Acids Research, 39 (2011), s. 5682-5691
9. Brümmer A., Hausser J.*MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation*, Bioessays, 36 (2014), s. 617-626
10. Krol J., Loedige I., Filipowicz W. *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*, Nature Reviews Genetics, 11(9) (2010), s. 597-610
11. Davis B., Hata A.*Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms*, Cell Communication and Signaling, 18 (2009), doi:10.1186/1478-811X-7-18
12. Carthew R.W., Sontheimer E.J. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*, Cell, 136 (2009), s. 642-655
13. Hammond S.M.*An overview of microRNAs*, Advvanced Drug Delivery Reviews, 87 (2015), s. 3-14
14. Castanotto D., Lingeman R., Riggs A., Rossi J.*CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 106 (2009), s. 21655-21659
15. Weinmann L., Höck J., Ivacevic T., Ohrt T., Mütze J., Schwille P. *Importin 8 Is a Gene Silencing Factor that Targets Argonaute Proteins to Distinct mRNAs*, Cell, 136 (2009), s. 496-507

16. Li L.-C., Okino S., Zhao H., Pookot D., Place R., Urakami S. *Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (2006), s. 17337-17342
17. Matsui M., Sakurai F., Elbashir S., Foster D., Manoharan M., Corey D.*Activation of LDL receptor expression by small RNAs complementary to a noncoding transcript that overlaps the LDLR promoter*, Chemistry & Biology, 17 (2010), s. 1344-1355
18. Place F., Li L.-C., Pookot D., Noonan E.J., Dahiya R. *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*, Proceedings of the National Academy of Sciences. 105 (2008), s. 1608-1613
19. Kim D.H., Saetrom P., Snøve O., Rossi J.J.*MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (2008), s. 16230-16235
20. Huang V., Place R.F., Portnoy V., Wang J., Qi Z., Jia Z. *Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer*, Nucleic Acids Research, 40 (2012), s. 1695-1707
21. Majid S., Dar A.A., Saini S., Yamamura S., Hirata H., Tanaka Y. *MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer*, Cancer, 116 (2010), s. 5637-5649
22. Zardo G., Ciolfi A., Vian L., Starnes L.M., Billi M., Racanicchi S. *Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression*, Blood. 119 (2012), s. 4034-4046
23. Paugh S.W., Coss D.R., Bao J., Laudermilk L.T., Grace C.R., Ferreira A.M. *MicroRNAs Form Triplexes with Double Stranded DNA at Sequence-Specific Binding Sites; a Eukaryotic Mechanism via which microRNAs Could Directly Alter Gene Expression*, PLoS Computational Biology, 12 (2016), e1004744. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004744
24. Xiao M., Li J., Li W., Wang Y., Wu F., Xi Y. *MicroRNAs Activate Gene Transcription Epigenetically as an Enhancer Trigger*, RNA Biology, 2016
25. Zhang Y., Fan M., Geng G., Liu B., Huang Z., Luo H. *A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region*, Retrovirology, 11 (2014), s. 23
26. Zhang Y., Fan M., Zhang X., Huang F., Wu K., Zhang J. *Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs*, RNA, 20 (2014), s. 1878-1889

miRNAs – znane cząsteczki w nieznanej roli

Streszczenie
Cząsteczki miRNA dobrze znane są jako post-transkrypcyjne regulatory ekspresji genów. Badania ostatnich lat wskazują, że mechanizm ten nie jest jedynym, przez który te niewielkie cząsteczki wywierają wpływ na poziom ekspresji. Okazuje się bowiem, że poza wyciszaniem, możliwe jest także aktywowanie genów przez miRNAs. Ponadto miRNAs mogą regulować ekspresję już na poziomie transkrypcji łącząc się z regionami promotorowymi. Taki mechanizm powoduje, że aktywacja bądź wyciszenie jest bardzo efektywne. Szczegóły tego procesu nie sią do końca poznane, podejrzewa się jednak, że promotorowe miRNAs wywołują zmiany epigenetyczne oraz zmiany konformacyjne helisy DNA, ułatwiające przyłączanie się czynników transkrypcyjnych. Dotychczas poznana liczba promotorowychmiRNAs nie jest duża, jednakże to co już wiemy, pozwala stwierdzić, że biorą one udział w wielu ważnych procesach biologicznych. Celem pracy było podsumowanie aktualnej wiedzy o miRNAs jako czynnikach transkrypcyjnych.
Słowa kluczowe: miRNA, transkrypcja, cykl komórkowy, epigenetyka, HIV

miRNAs – known molecules in unknown role

Abstract
Micro RNAs are well known from its post-transcriptional regulation of gene expression. Recent studies show that it is not only mechanism by which these small molecules affect the expression level. It appears that beyond silencing miRNAs are capable to activate gene expression. Moreover, miRNAs can fine-tune gene expression on transcriptional level, targeting gene promoters. Such a mechanism makes activation or silencing is very effective. But the details of the process still unclear, but it is possible that promoter targeting miRNAs trigger epigenetic modifications or change conformation of double helix DNA and supports binding of the other transcription factors. To date several promoter miRNAs were discovered. The aim of these review was to summarize current knowledge about miRNAs as a transcriptional factors.
Keywords: miRNA, transcription, cell cycle, epigenetics, HIV

Karol Nowosad[1], Piotr Stępień[2], Paula Musiał[3]

CRISPR-Cas9 nowe narzędzie inżynierii genetycznej

1. Wstęp

Opracowanie metod sekwencjonowania w latach 70 XX wieku umożliwiających analizę składu nukleotydowego DNA pozwoliły na dokładniejsze poznanie struktury, funkcji i właściwości kwasów deoksyrybonukleinowych, prowadząc do rozwoju genomiki strukturalnej oraz genomiki funkcjonalnej [1]. W ciągu ostatnich czterdziestu lat powstało wiele technik umożliwiających badanie funkcji genów poprzez indukowanie mutacji losowych i selekcję pozytywnych mutantów. Metody oparte na mutagenezie fizycznej i chemicznej opracowane jako jedne z pierwszych charakteryzowały się niską specyficznością, były praco- i czasochłonne oraz wymagały stosowania czynników kancerogennych, szkodliwych dla człowieka. Wykorzystanie transpozonów oraz zmodyfikowanych plazmidów Ti w mutagenezie genetycznej pozwoliło na skrócenie czasu trwania doświadczeń. Dzięki zastosowaniu mechanizmu transpozycji oraz właściwości plazmidów Ti możliwe było badanie wpływu inaktywacji genów na funkcjonowanie poszczególnych procesów metabolicznych [2]. Niska specyficzność cechująca się brakiem zdolności do wprowadzania zmian w obrębie poszczególnych nukleotydów wśród wyżej wymienionych technik znacznie ograniczała możliwość badania złożonych procesów metabolicznych o podłożu wielogenowym. Wieloletnie badania prowadzone na systemie CRISPR-Cas (ang. *CRISPR-Cas-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated sequences*) powszechnie występującym u bakterii i archeonów umożliwiły opracowanie nowej technologii pozwalającej na wprowadzanie miejscowo-specyficznych modyfikacji w genomowym DNA komórki. CRISPR-Cas9 oparty na systemie CRISPR-Cas typu II wyizolowanym z *Streptococcus pyogenes* to doskonałe narzędzie inżynierii genetycznej, które znalazło

[1] karol-nowosad@wp.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii
[2] piotr.stepien@interia.pl, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
[3] musial_paula@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe działające przy Zakładzie Kinezjologii Katedry Fizjoterapii Wydziału Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

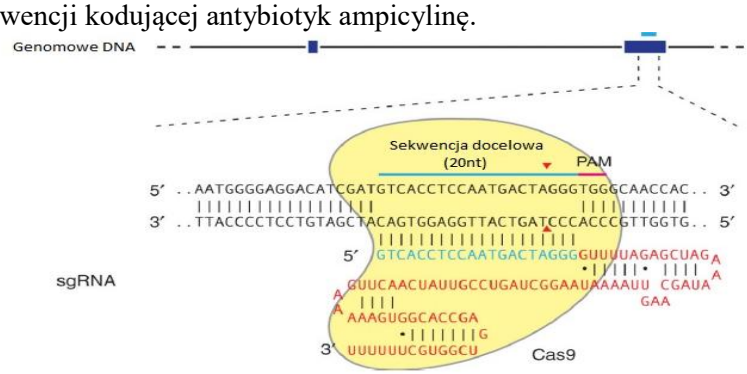
szerokie zastosowanie w medycynie i biotechnologii m. in. w projektowaniu modeli chorób nowotworowych, terapii genowej i przeciwwirusowej [3]. W niniejszym artykule przedstawiono charakterystykę oraz zastosowania aplikacyjne systemu CRISPR-Cas9.

2. Zarys historyczny

Po raz pierwszy szereg czternastu sekwencji palindromowych o długości 29 nt przeplatany 32-33 nt regionami łącznikowymi, charakterrystyczny dla systemu CRISPR-Cas został odkryty w 1987 roku podczas sekwencjonowania genu iap u *Escherichia coli* [4]. Wraz z opisem następnych genomów organizmów prokariotycznych identyfikowano kolejne klastry kodujące podjednostki CRISPR-Cas, jednak ich rola nie była znana [5]. Powstało wiele hipotez na temat funkcji pełnionych przez wyżej wymienione fragmenty DNA. W 2005 roku Mojica, F. i wsp. udowodnili, że system CRISPR-Cas zaangażowany jest w ochronę komórki przed bakteriofagami i wpływem obcego DNA na jej metabolizm, co następnie zostało potwierdzone przez inne zespoły badawcze. W ostatnich latach system CRISPR-Cas został opisany u około 40% bakterii i 90% archeonów, poznano również jego budowę i mechanizm działania [6].

3. Budowa i mechanizm działania CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 wykorzystywany w inżynierii genetycznej składa się z wektora zawierającego podstawowe elementy składowe systemu CRISPR-Cas typu II [7]. Umożliwia on na wprowadzenie 20nt sekwencji komplementarnej względem docelowego DNA do fragmentu crRNA (ang *CRISPR RNA*), która wraz z tracRNA (ang. *trans-activating crRNA*) tworzy cząsteczkę zwaną sgRNA (ang. *single guide RNA*). Wektor dodatkowo zawiera geny CAS kodujące białka Cas9 oraz system selekcji w postaci sekwencji kodującej antybiotyk ampicylinę.



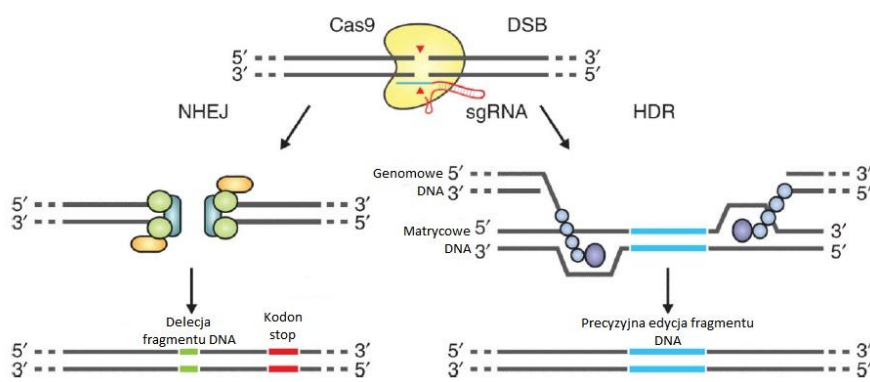
Rysunek 1. Schemat przedstawiający kompleks rybonukleoproteinowy przyłączony do sekwencji docelowej DNA [8- zmodyfikowano]

Po wprowadzeniu wektora do komórki następuje biosynteza części składowych systemu CRISPR-Cas9, które tworzą aktywne kompleksy rybonukleoproteinowe, rozpoznające sekwencje docelowe w obrębie DNA komórki (Rys. 1). Przyłączenie sgRNA do Cas9 powoduje aktywację białka w wyniku zmian konformacyjnych w obrębie domen HNH i RuvC, odpowiedzialnych za cięcie podwójnej nici DNA. Interakcja pomiędzy homologicznym fragmentem sgRNA, a DNA prowadzi utworzenia DSBs (ang. *double-strand break*). Miejsce trawienia znajduje się w obrębie trzeciego nukleotydu powyżej sekwencji PAM (ang. *protospacer adjacent motif*) nici sensownej oraz pomiędzy trzecim, a ósmym nukleotydem powyżej sekwencji PAM nici nonsensownej. Dwuniciowe pęknięcia DNA są następnie łączone w wyniku działania dwóch odrębnych mechanizmów naprawy DNA: NHEJ (ang. *non-homologous end joining*) i HDR (ang. *homologous directed recombination*) [7, 9, 10].

Opracowanie zmodyfikowanego białka Cas9 umożliwiło stworzenie nowego wariantu systemu CRIPR-Cas9, który odpowiedzialny jest za cięcie pojedynczej nici DNA. W zależności od wprowadzonej mutacji (D10A / H840A) w domenie RuvC1 lub HNH nukleaza zdolna jest do generowania przerw w nici nonsensownej, czy też nici sensownej, co wykazano w badaniach *in vitro* [3].

4. Mechanizm działania NHEJ oraz HDR

W zależności od wykorzystywanego organizmu oraz fazy cyklu komórkowego, w którym znajduje się badana komórka preferowany jest jeden z dwóch systemów naprawy DNA.



Rysunek 2. Mechanizmy naprawy DNA [8-zmodyfikowano].

System niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) jest powszechnie stosowany w komórkach ssaczych. Około 90% uszkodzeń, w których doszło do przerwania obu nici DNA usuwanych jest na drodze NHEJ. W pierwszym etapie DSBs rozpoznawane są przez białkowy kompleks Ku70/Ku80, który łączy się z kinazą DNA – PK. Następnie w proces naprawy angażowany jest szereg enzymów takich jak: nukleazy, polimerazy oraz ligazy IV, które łączą przeciwległe końce nici DNA. W wyniku działania NHEJ dochodzi do utraty części sekwencji, co może powodować mutacje w danym genie (Rys. 2) [11].

Rekombinacja homologiczna (HDR) jest to system, który wykorzystuje matrycę DNA do naprawy DSBs. Zachodzi w późnej fazie S oraz w fazie G2 cyklu komórkowego. W przeciwieństwie do NHEJ w trakcie trwania HDR odbudowany jest utracony fragment DNA (Rys. 2). W celu zwiększenia wydajności rekombinacji homologicznej stosuje się plazmidy kodujące fragment DNA wykorzystywany przez komórki jako matryca. Dodatkowo aplikuje się inhibitory NHEJ oraz związki chemiczne hamujące cykl komórkowy w danej fazie [12]. W naprawę podwójnych pęknięć nici DNA zaangażowany jest kompleks MRN, który rozpoznaje miejsce uszkodzenia, aktywuje kinazę ATM i wraz z białkiem CtIP uczestniczy w powstawaniu odcinków ssDNA (ang. single strand DNA). W następnym etapie dochodzi do interakcji ssDNA z matrycą przy udziale BRCA1, BRCA2 oraz RAD51 oraz naprawy miejsca uszkodzenia w wyniku aktywności polimeraz, nukleaz oraz helikaz [11].

5. Sposoby wprowadzania CRISPR-Cas9 do komórek.

Proces transformacji oraz transfekcji w przypadku komórek ssaczych jest to jeden z kluczowych etapów doświadczenia. Wysoka specyficzność oraz wydajność gwarantuje uzyskanie pozytywnych wyników. W zależności od stosowanego wektora wyróżnia się różne metody wprowadzania DNA do komórek.

5.1. Wektory wirusowe

Wektory wirusowe ze względu na swoje właściwości stały się najczęściej wykorzystywanym nośnikiem DNA w doświadczeniach z użyciem komórek ssaczych. Wyróżnia się wektory na bazie parwowirusów (adenoassociated virus, AAV) oraz lentiwirusów. Wektory AAV posiadają 4% genomu wirusa, w obrębie którego można wyróżnić sekwencje odpowiedzialne za pakowanie DNA do kapsydu oraz jego integrację z DNA komórki. Nie są groźne dla gospodarza i stymulują układ immunologiczny na niskim poziomie. Nośniki na bazie parwowirusów zdolne są do transdukcji zarówno komórek mitotycznych jak i w pełni

zróżnicowanych, odpowiednio zaprojektowane transportują materiał genetyczny do komórek w obrębie jednej tkanki [13]. Senís E. i wsp. jako pierwsi zastosowali wektor AAV do wprowadzenia sekwencji kodującej system CRISPR-Cas9 do hepatocytów mysich, potwierdzając jego skuteczność w doświadczeniach *in vivo* [14]. Bezpieczeństwo wektorów wirusowych AAV potwierdza fakt, iż w 2012 zostały zatwierdzone przez Europejską Agencje Leków w leczeniu niedoboru lipazy lipoproteinowej [15].

Wektory lentiwirusowe na bazie wirusa HIV-1 powszechnie stosowane w biotechnologii i medycynie pozwalają na skuteczne wprowadzenie sekwencji docelowych zarówno do zróżnicowanych komórek jak i komórek zdolnych do podziałów [13]. Wymagają one integracji z genomem gospodarza, co może powodować zaburzenia niektórych procesów metabolicznych. Nowa generacja wektorów lentiwirusowych zwana IDLVs (ang. *Integrase-deficient lentivirus vectors*) efektywne dostarcza materiał genetyczny do wnętrza komórki bez konieczności integracji z DNA. Dzięki dużej pojemności genomu wirusa (ok. 10 kb) wektor umożliwia wprowadzenie systemu CRISPR-Cas9 do docelowych komórek bez wywoływania skutków ubocznych [15].

5.2. Wektory niewirusowe

Wektory niewirusowe cieszą się dużym zainteresowaniem wśród naukowców m.in. ze względu na wysokie bezpieczeństwo oraz dużą wydajność. Aktualnie opracowanych zostało jedynie kilka wektorów Niewirusowych zdolnych do transportu CRISPR-Cas9, jednak trwają intensywne badania nad wykorzystaniem nowych systemów transportu [16]. Duża popularność tego typu nośników zaowocowała powstaniem wielu technik transformacji/transfekcji wektorów niewirusowych, w tym: elektroporacji, iniekcji hydrodynamicznej, czy wykorzystania nanocząsteczek na bazie lipidów.

5.3. Sposoby wprowadzania wektorów niewirusowych

5.3.1. Elektroporacja

Jest to powszechna metoda stosowana w celu wprowadzania makrocząsteczek do wnętrza komórek. Wykorzystuje pole elektromagnetyczne o wysokim napięciu generujące elektropowy w błonie komórkowej, które umożliwiają wnikanie do cytozolu molekuł o średnicy nieprzekraczającej 10 nm. Pory powstałe w wyniku dezintegracji błony komórkowej są niestabilne i zanikają w ciągu kilku-kilkunastu minut od momentu powstania. Ekstremalne warunki panujące podczas elektroporacji odpowiedzialne są za wysoką śmiertelność komórek, dlatego należy odpowiednio

dobrać parametry procesu w celu ich optymalizacji [17]. Wykorzystanie pola elektromagnetycznego w transporcie wektorów CIRSPR-Cas9 znalazło zastosowanie w doświadczeniach *in vitro* [18].

5.3.2. Iniekcja hydrodynamiczna

Technika stosowana w doświadczeniach *in vivo*. Polega na wprowadzeniu dużych ilości DNA pod wysokim ciśnieniem do wnętrza naczyń krwionośnych. Iniekcja hydrodynamiczna znalazła zastosowanie w badaniach z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. W celu dostarczenia wektora CRISPR-Cas9 do miejsca docelowego wykonuje się nastrzyk jednej z żył, w przypadku myszy najczęściej są to żyły ogonowe [19].

5.3.3. Nanonośniki lipidowe

Nanonośniki lipidowe zbudowane z lipidów kationowych o charakterze amfipatycznym tworzą struktury zwane lipopleksami. Dodatnio naładowane „główki" lipidów reagują z ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwasu dezoksyrybonukleinowego ospłaszczając DNA. Ze względu na swoje właściwości umożliwiające im fuzję z błoną komórkową skutecznie transportują DNA do wnętrza komórki [20]. Liczne modyfikacje polegające na integracji przeciwciał na powierzchni dwuwarstwy lipidowej wykorzystywane w nanocząsteczkach lipidowych do transportu leków dają szansę na opracowanie nowych, tkankowo specyficznych nośników DNA [21]. Nanonośniki lipidowe wprowadzane do krwi poprzez mechaniczne uszkodzenie ściany naczyń krwionośnych zdolne są do pokonywania bariery krew-mózg, co umożliwia ich zastosowanie w terapii związanej z leczeniem centralnego układu nerwowego. Transport CRISPR-Cas9 za pomocą nanocząsteczek o charakterze lipidowym stosowany jest w zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo* [16].

6. Zastosowanie systemu CRISPR-Cas9

6.1. Terapia genowa z wykorzystaniem CRISPR-Cas9

Terapia genowa jest to nowa metoda wykorzystywana w medycynie spersonalizowanej, której głównym założeniem jest wprowadzenie kwasów nukleinowych kodujących dany produkt białkowy do komórek posiadających zamiany w obrębie genomowego DNA. Zastąpienie uszkodzonej sekwencji DNA nowymi kopiami prawidłowego genu ma na celu regulację i optymalizację procesów metabolicznych. Wykorzystanie narzędzi pozwalających na precyzyjną manipulację materiałem genetycznym umożliwiło opracowanie metod nowej generacji opartych na systemie CRISPR-Cas9, których zadaniem jest naprawa uszkodzonych fragmentów DNA w komórce [15, 22].

Pierwsze prace z wykorzystaniem CRISPR-Cas9 w celach terapeutycznych prowadzono na prostych modelach chorobowych, posiadających mutacje w obrębie jednego genu. CRISPR-Cas9 znalazł zastosowanie w leczeniu m.in. beta-talasemii, mukowiscydozy oraz dystrofii mięśniowej Duchenne'a.

Beta-talasemia jest to jedna z najczęściej występujących chorób o podłożu genetycznym, będąca przyczyną nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu krwionośnego. Szacuje się że około 4,5% populacji posiada zmiany powstałe w wyniku delecji lub punktowych mutacji w genie HBB odpowiedzialnym za produkcję beta-globiny. Zaburzenia procesu syntezy podjednostek β tworzących czwartorzędową strukturę hemoglobiny (Hb) wpływają na obniżenie stężenia Hb we krwi. Powstało kilka sposobów leczenia B-talasemii m. in. transplantacja zdrowych komórek macierzystych szpiku oraz wprowadzanie prawidłowych kopii genów HBB do uszkodzonych komórek, jednak posiadają one pewne ograniczenia. W przypadku pierwszej terapii czynnikiem limitującym jest mała liczba dawców szpiku, natomiast w przypadku drugiej metody wektory wirusowe zawierające geny kodujące β-globinę wbudowują swój materiał genetyczny w sposób losowy, co może wywoływać efekty uboczne. Zastosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) pochodzących od pacjentów chorych na β-talasemię w badaniu właściwości terapeutycznych systemu CRISPR-Cas9 daje szansę na opracowanie skutecznej terapii genowej. Wykazano, że spośród 57 wyselekcjonowanych komórek poddanych działaniu CRISPR-Cas9 siedem komórek wprowadziło pozytywną rekombinację homologiczną i były zdolne do produkcji β-globiny na poziomie porównywalnym ze zdrowymi komórkami [23].

Zmiany w obrębie sekwencji genów odpowiedzialnych za biosyntezę hemoglobiny są przyczyną wielu innych chorób układu krwionośnego, w tym niedokrwistości sierpowatej. Mutacja punktowa w genie HBB prowadzi do zmiany sekwencji w łańcuchu aminokwasowym białka. Wymiana kwasu glutaminowego na walinę przyczynia się do zaburzenia pierwotnych właściwości fizykochemicznych hemoglobiny, znacznie obniżając jej powinowactwo do tlenu. Wśród heterozygot posiadających allel z uszkodzonym genem hemoglobina nieprawidłowa (HbS) występuje w liczbie około 40 %. Erytrocyty posiadające (HbS) cechują się swoistym sierpowatym kształtem. Do tej pory nie udało się opracować efektywnego leczenia przyczynowego niedokrwistości sierpowatej. Trwają intensywne badania z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9 w celu stworzenia skutecznej metody naprawy mutacji genetycznej w komórkach szpiku kostnego [9].

Mukowiscydoza jest chorobą genetyczną dziedziczoną autosomalnie recesywnie. Powstaje w wyniku mutacji w obrębie genu CFTR kodującego

błonowe białko regulatorowe odpowiedzialne za utrzymywanie optymalnego poziomu jonów chlorkowych w komórce. Nieprawidłowości w transporcie Cl^- generują poważne zaburzenia w funkcjonowaniu organizmu, nieleczone powodują około 70% zgonów przed pierwszym rokiem życia [24]. Skutki uboczne farmakoterapii oraz brak skutecznego leczenia przyczynowego skłania naukowców do poszukiwania nowych metod walki z chorobą. Gerald Schwank i wsp. wykazali skuteczność działania systemu CRISPR-Cas9 w naprawie genu CFTR, co daje szansę na opracowanie alternatywnego sposobu leczenia mukowiscydozy [25].

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest to choroba o podłożu genetycznym powodująca postępujący, permanentny zanik mięśni. Dziedziczona w sposób autosomalny recesywny sprzężony z płcią występuje z częstotliwością 1 na 5 600 do 7 700 mężczyzn w wieku 5-24 lat [30]. Powstaje w wyniku duplikacji, delecji oraz punktowych mutacji w obrębie genu DMD powodując zanik ekspresji dystrofiny lub syntezę nieprawidłowo sfałdowanego produktu białkowego. Spadek masy mięśniowej w obrębie całego ciała wywołuje zaburzenia w funkcjonowaniu układu motorycznego, oddechowego oraz krwionośnego prowadząc w najcięższych przypadkach do śmierci pacjenta. Do tej pory udało się opracować jedynie metody obniżające tempo zaniku mięśni oparte głównie na zabiegach rehabilitacyjnych. Doświadczenia prowadzone w celu stworzenia terapii genowej ukierunkowanej na leczenie przyczynowe dają szansę na skuteczną walkę z chorobą. Pozytywne wyniki uzyskane w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem CRISPR-Cas9 potwierdzają efektywność tego systemu w naprawie genu DMD i leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a [31].

6.2. Projektowanie modeli chorobowych z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych

Zmiany poziomu ekspresji genów supresorowych, białek sygnałowych oraz czynników transkrypcyjnych powstałe w wyniku mutacji DNA komórek macierzystych hemopoezy i komórek progenitorowych prowadzą do zaburzeń w produkcji prawidłowych elementów morfotycznych krwi, wywołując ostrą białaczkę szpikową (AML). Osoby chore na AML posiadają niskie stężenie leukocytów, krwinek czerwonych oraz trombocytów we krwi, co objawia się m.in. dusznością, anemią, ogólnym osłabieniem, a także wysoką podatnością na infekcje i częstymi krwotokami [26]. Transformacja komórek szpiku wywołana mutacjami w obrębie ośmiu genów: Tet2, Runx1, Dnmt3a, Ezh2, Nf1, Smc3, p53 i Asxl1 prowadzi do powstania i rozwoju nowotworu. Odpowiednia charakterystyka zmian genetycznych występujących w komórkach nowotworowych oraz analiza ich wpływu na procesy metaboliczne i skuteczność stosowanych terapii przeciwnowotworowych daje szansę na opracowanie alternatywnych metod leczenia. Dirk Heckl

i wps. wykorzystując system CRISPR-Cas9 wyhodowali mysz posiadającą knock-down w pięciu genach: Tet2, Runx1, Dnmt3a, Ezh2, Nf1 będącą wiernym modelem chorobowym białaczki szpikowej [27]. Wprowadzenie mutacji wielogenowych w genomie myszy pozwala na skuteczną analizę wyników stosowanych leków przeciwnowotworowych w czasie rzeczywistym w modelu *in vivo*.

6.3. Regulacja ekspresji genów oraz wizualizacja DNA w żywych komórkach

Odpowiednio zmodyfikowany system CRISPR-Cas9, posiadający obie mutacje (D10A / H840A) w obrębie sekwencji kodującej nukleazę Cas9 może być wykorzystywany w wyciszaniu oraz regulacji poziomu ekspresji genów jak i w oznaczaniu docelowych fragmentów DNA w doświadczeniach *in vivo*. Wykazano, że przyłączenie kompleksu rybonukleinowego do promotora skutecznie hamuje ekspresję genów w organizmach prokariotycznych i komórkach ludzkich, natomiast inaktywacja genów kodujących czynniki transkrypcyjne wpływa na poziom ekspresji wybranych genów. Wykorzystanie białka GFP do wizualizacji kompleksu rybonukleinowego przyłączonego do docelowej sekwencji DNA umożliwia badanie dynamiki i struktury chromosomów w żywej komórce [3].

6.4. Terapia przeciwwirusowa

Wirus HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) odpowiedzialny za pandemię w regionie Afryki oraz milionowe zgony na całym świecie prowadzi do rozwoju zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Zdolny jest do infekcji: limfocytów T $CD4^+$, monocytów/makrofagów oraz komórek dendrytycznych, posiadających specyficzny zestaw receptorów na powierzchni błony komórkowej. Wykazuje naturalny tropizm względem komórek T $CD4^+$, których liczba spada poniżej 200 komórek na mililitr krwi w zaawansowanym stadium choroby. Powoduje to zaburzenia w funkcjonowaniu zarówno humoralnej jak i komórkowej odpowiedzi układu immunologicznego. Osoby chore na AIDS podatne są na infekcje bakteryjno-wirusowe, będące głównym powodem zgonów wśród pacjentów. Intensywne badania prowadzone w celu charakterystyki czynnika etiologicznego AIDS odkryły grupę osób odpornych na infekcję HIV. Posiadają one mutację w genie CCR5 kodującym koreceptor niezbędny do zapoczątkowania pierwszego etapu cyklu replikacyjnego wirusa [28]. Poznanie patomechanizmu umożliwia stworzenie efektywnej terapii genowej w oparciu o działanie systemu CRISPR-Cas9. Przeprowadzone zostały pierwsze badania, w których udowodniono skuteczność CRISP-Cas9 w generowaniu mutacji w genie CCR5. Lin Ye i wsp. opracowali sposób produkcji indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) posiadających uszkodzony gen CCR5. Uzyskane iPSC wykazują oporność względem wirusa HIV [29].

7. Podsumowanie

Odkrycie systemu CRISPR-Cas u organizmów prokariotycznych, a następnie jego wykorzystanie w inżynierii genetycznej należą do jednych z największych osiągnięć drugiej dekady XXI wieku. Szerokie spektrum aplikacyjne zaowocowało powstaniem kilku tysięcy publikacji od momentu wdrożenia CRISPR-Cas9, co dowodzi jego skuteczności oraz popularności wśród naukowców. Badania przedstawione w artykule wykazują, że wyżej wymieniony system może stać głównym narzędziem terapii genowej, zdolnym do leczenia wielu chorób o podłożu genetycznym przyczyniając się do rozwoju medycyny spersonalizowanej.

Literatura

1. Nowosad K., Stępień P., Musiał P. *Sekwencjonowanie DNA – przegląd metod*, Rozwój nauk medycznych i przyrodniczych., (2015), s. 141-153
2. Sobkowiak Ł., Szweykowska-Kulińska Z. *Fizyczne, chemiczne i genetyczne metody mutagenezy roślin*, Biotechnologia., 4 (2007), s. 157-169
3. Jeffry D., Sander J., Keith Joung. *CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting*, Nature Biotechnology., 32(4) (2014), s. 347-355
4. Ishino Y., Shinagawa H., Makin, K., Amemura M. i Nakata A. *Nucleotide sequence of the iap gene responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*, Journal of Bacteriology., 169(12) (1987), s. 5429-5433
5. Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., Fitz-Gerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F, Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S., Venter J. C. *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*, Science., 273(5278) (1996), s. 1058-1073
6. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. *CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea*, Nature Reviews Microbiology., 6(3) (2008), s. 181-186
7. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J., Charpentier E. *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*, Science., 337(6096 (2012) s. 816-821
8. Ran F., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D., Zhang F. *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*, Nature Protocols., 8 (2013), s. 2281–2308
9. Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F., *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*, Cell., 157(6) (2014), s. 1262-1278
10. Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E, Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A. T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J. A. *Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation*, Science., 343(6176) (2014), s. 1247997

11. Korwek Z., Alster O. *Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym*, Postepy Biochemii., 60(2) (2014), s. 248-262
12. Daneshvar K. *CRISPR-Cas9 in gene therapy: much control on breaking, little control on repairing*, PeerJ PrePrints., 818 (2) (2015)
13. Duniec K. *Wirusowe nośniki genów w neurobiologii*, Materiały Konferencji 'Nowe metody w neurobiologii'., (2004), s. 13-17
14. Senis E., Fatouros C., Grosse S. *CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox*, Biotechnology Journal., 9 (2014), s. 1402–1412
15. Gori J. L., Hsu P. D., Maeder M. L., Shen S., Welstead G. G., Bumcrot D. *Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy, Human Gene Therapy*., 26(7) (2015), s. 443-451
16. Zuris J. A., Thompson D. B., Shu Y., Guilinger J. P., Bessen J. L., Hu J. H., Maeder M. L., Joung J. K., Chen Z. Y., Liu D. R. *Cationiclipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo*, Nature Biotechnology., 33 (2015), s. 73-80
17. Skołucka N., Saczko J., Kotulska M., Kulbacka J., Choromańska A. *Elektroporacja i jej zastosowanie*, Polski Merkuriusz Lekarski., 28(168) (2010), s. 501-504
18. Ding Q., Regan S. N., Xia Y., Oostrom L. A., Cowan C. A., Musunuru K. *Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs*, Cell Stem Cell., 12 (2013), s. 393-394
19. Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R. L., Benedetti E., Grompe M., Koteliansky V., Sharp P. A., Jacks T., Anderson D. G. *Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype*, Nature Biotechnology., 32 (2014) s. 952
20. Wasungu L., Hoekstra D. *Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes*, Jouranl of Control Release., 116 (2) (2006), s. 255-264
21. Mishra H., Mishra D., Mishra P. K., Nahar M., Dubey V., Jain N. K. *Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccifnation using subcutaneous route*, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences., 13 (4) (2010) s. 495-509
22. Podolska K., Stachurska A., Hajdukiewicz K., Małecki M. *Gene Therapy Prospects – Intranasal Deliveryof Therapeutic Genes*, Advances in Clinical and Experimental Medicine., 21 (4) (2012), s. 525-534
23. Xu P., Tong Y., Liu X. Z., Wang T. T., Cheng L., Wang B. Y., Lv X., Huang Y., Liu D. P. *Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2-654 (C>T) mutation in ß-thalassemia-derived iPSCs*, Scientific Reports., 5 (2015), s. 12065
24. Olejniczak M., Emerich K., Wierchoła B, Adamowicz-Klepalska B. *Cystic fibrosis–anointer disciplinary medical and dental problem on the basis of the literature*, Czasopismo Stomatologiczne., 9 (2005)
25. Schwank G., Koo B. K., Sasselli V., Dekkers J. F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., Ent C. K., Nieuwenhuis E. E., Beekman J. M., Clevers H. *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*, Cell Stem Cell., 13(6) (2013), s. 653-658

26. Murati A., Brecqueville M., Devillier R., Mozziconacci M. J., Gelsi-Boyer V., Birnbaum D. *Myeloid malignancies: mutations, models and management*, BMC Cancer., 12 (2012), s. 304
27. Heckl D., Kowalczyk M. S., Yudovich D., Belizaire R., Puram R. V., McConkey M. E., Thielke A., Aster J. C., Regev A., Ebert B. L. *Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing*, Nature Biotechnology., 32(9) (2014), s. 941-946
28. Knysz B., Szetela B., Gąsiorowski J., Czarnecki M., Rymer W., Szymczak A. *Etiopatogeneza zakażenia HIV i AIDS. Zakażenia HIV/AIDS, Poradnik dla lekarzy praktyków*., Wrocław, Conlinuo, 2007 s. 21-35
29. Ye L., Wang J., Beyer A. I., Teque F., Cradick T. J., Qi Z., Chang J. C., Bao G., Muench M. O., Yu J., Levy J. A., Kan Y. W. *Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5?32 mutation confers resistance to HIV infection*, Proceedings of the National Academy of Science., 111(26) (2014), s. 9591-9596
30. http://www.cdc.gov/ncbddd/musculardystrophy/data.html
31. Tabebordbar M., Zhu K., Cheng J. K., Chew W. L., Widrick J. J., Yan W. X., Maesner C, Wu E. Y., Xiao R., Ran F. A., Cong L., Zhang F., Vandenberghe L. H., Church G.M.,Wagers A. J. *In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells*, Science., 351(6271) (2016), s. 407-411

CRISPR-Cas9 nowe narzędzie inżynierii genetycznej

Streszczenie:
CRISPR-Cas9 to innowacyjne narzędzie inżynierii genetycznej, opracowane w oparciu o system odporności immunologicznej bakterii i archeonów, które znalazło powszechne zastosowanie w medycynie oraz biotechnologii. Składa się z krótkiego fragmentu sgRNA oraz białka Cas9 zdolnych do tworzenia aktywnych kompleksów rybonukleoproteinowych. Generowanie pęknięć w obrębie obu nici DNA za pomocą nukleazy Cas9 umożliwia precyzyjną manipulację genomu komórki, co w połączeniu z mechanizmami naprawy kwasów dezoksyrybonukleinowych pozwala na stworzenie skutecznej terapii leczenia wielu chorób o podłożu genetycznym, przyczyniając się do rozwoju medycyny spersonalizowanej. Możliwość zastosowania systemu CRISPR-Cas9 zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo* pozwoliło między innymi na opracowanie wiernych modeli chorobowych z użyciem zwierząt laboratoryjnych oraz badanie jego właściwości terapeutycznych względem wirusa HIV.
Słowa kluczowe: CRISPR-Cas9, NHEJ, HDR, terapia genowa.

CRISPR-Cas9 a new genetic engineering tool

Abstract:
CRISPR-Cas9 is an innovative genetic engineering tool based on a immunity system of bacteria and archaea, which found widespread use in medicine and biotechnology. It consists of a sgRNA and Cas9 protein, which can forming active ribonucleoprotein complexes. Generated a double strand breaks by Cas9 nucleases enables precise manipulation of the genome, which in combination with DNA repair mechanisms allows to create an effective therapy for the treatment of many genetic diseases, contribute to development of personalised medicine. The applicability of the CRISPR-Cas9 system both in vitro and in vivo experiments enabled to create animal disease models and study of its therapeutic properties of HIV treatments.
Keywords: CRISPR-Cas9, NHEJ, HDR, gene therapy.

Martyna Bednarczyk[1], Katarzyna Walkiewicz[1], Paweł Kozieł[1], Urszula Mazurek[2], Małgorzata Muc-Wierzgoń[1]

Podstawy molekularne autofagii

1. Makroautofagia

Autofagia jest katabolicznym mechanizmem występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych. Polega na samodzielnym trawieniu odpowiedzialnym za usuwanie długotrwale uszkodzonych białek, uszkodzonym organelli oraz białek zniekształconych podczas biosyntezy. Autofagia obejmuje również różne funkcje komórkowe, takie jak wzrost, różnicowanie, odpowiedź na niedobór składników odżywczych i stres oksydacyjny oraz śmierć komórki [1-3]. Odpowiada również za utrzymanie homeostazy komórkowej [4]. Proces autofagii obejmuje tworzenie pęcherzyka o podwójnej błonie, który obejmuje w cytoplazmie zniekształcone białka i organelle, a następnie łączy się z lizosomem powodując degradację [2]. Aktywna jest podczas niedoboru składników odżywczych oraz w czasie stresu komórkowego, czy niedotlenienia [5]. Ponadto cytokiny, hormony czy uszkodzenie DNA również aktywują autofagię [6].

1.1. Mechanizm autofagii

W proces ten zaangażowane są białka związane z autofagią Atg (ang. *Autophagy-related gene*), z których większość po raz pierwszy zidentyfikowano u drożdży [1; 6]. Są to białka niezbędne do tworzenia autofagosomu, biorą udział w poszczególnych etapach autofagii [6, 7]. 14 z 32 poznanych dotąd białek Atg u drożdży wykazuje homologię z białkami ssaków [2].

Przebieg procesu autofagii dzieli się na cztery etapy: inicjację, elongację fagoforu, dojrzewanie autofagosomu oraz jego fuzję z lizosomem oraz trawienie zawartości [8].

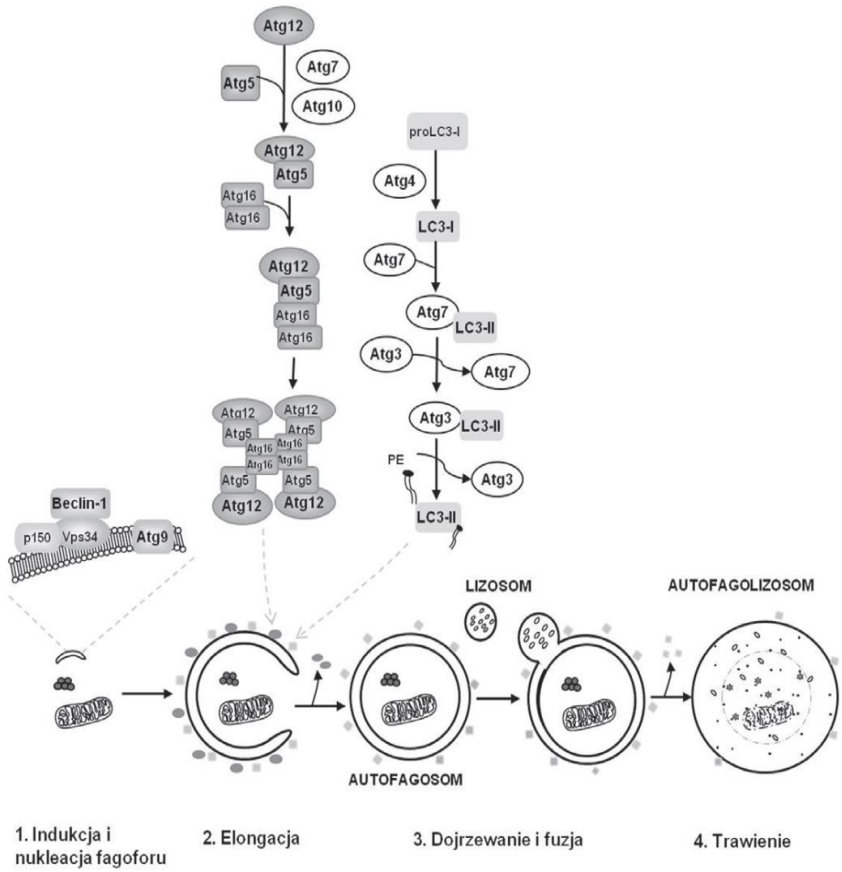
W pierwszym etapie, jakim jest inicjacja autofagii, następuje tworzenie fagoforu oraz jego stopniowe wydłużanie. Zaangażowany jest tutaj kompleks, w którego skład wchodzą kinaza 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K-III), Beklina 1 i kinaza serynowa p150. W tym etapie również

[1] martyna.bednarczyk@outlook.com, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny
[2] umazurek@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny

bierze udział białko Atg9 oraz Atg2, zaangażowane w formowanie błony izolującej [6]. Aktywność Bekliny 1 jest hamowana przez białka Bcl-2 i Bcl-X_L [8]. Po zakończeniu inicjacji autofagii, Beklina1 wraz z Bcl-2 zostaje uwolniona do retikulum endoplazmatycznego [4].

Podczas powstawania autofagosomu z fagoforu aktywne są dwa ubikwitynopodobne kompleksy: Atg12-Atg5 oraz LC3-II-fosfatydyloetanoloamina (LC3-II-PE). Do działania pierwszego kompleksu niezbędne są cztery białka: Atg5, 7, 10 i 12. Białko Atg12 wiąże się kowalencyjnie z Atg5, tworząc kompleks Atg12-Atg5, który wspamaga tworzenie autofagosomu ale nie jest w nim obecny. W procesie również uczestniczy Atg8, zwiększając fuzję błon [6, 9]. W następnym etapie powstały kompleks Atg12-Atg5 wiąże się z białkiem Atg16L, zachodzi multimeryzacja i utworzony zostaje tetramer Atg12-Atg5-Atg16L uczestniczący w elongacji fagoforu. Naukowcy twierdzą, że ten kompleks wywołuje jego krzywiznę. W momencie powstania dojrzałego autofagosomu, białko Atg16L oddysocjowuje, co świadczy o tym, że nie może stanowić markera procesu autofagii. Następie dochodzi do aktywacji drugiego ubikwitynopodobnego kompleksu LC3-II-PE. LC3 jest białkiem związanym z mikrotubulami, znajduje się w cytozolu i syntetyzowane jest jako prekursor pro-LC3. Forma pro-LC3 w wyniku cięcia przez Atg4 ulega przemianie do LC3-I, do którego przyłącza się białko Atg7, Atg3 oraz powstały niedawno kompleks Atg12-Atg5-Atg16L. W kolejnym etapie LC3-I przyłącza lipofilną fosfatydyloetanoloaminę (PE) i przekształca się w formę LC3-II, co prowadzi do formowania i rozbudowy autofagosomu [2, 6, 10-12]. LC3-II pozostaje przyłączony do błony autofagosomu, aż do momentu fuzji z lizosomem. Uznaje się go za wiarygodny marker autofagii, ponieważ jego stężenie jest proporcjonalne do liczby powstałych autofagosomów [11].

W ostatnim etapie błona autofagosomu ulega fuzji z lizosomem, powstaje autofagolizosom, w którym dochodzi do trawienia białek przeznaczonych do degradacji, dzięki obecności kwaśnych proteaz lizosomalnych. W fuzji uczestniczą białek SNARE oraz Rab, przede wszystkim Rab7, niezbędny podczas dojrzewania autolizosomu [6, 12, 13]. Rysunek 1 przedstawia etapy procesu autofagii.



Rysunek. 1. Przebieg procesu autofagii [12]

1.2. Regulacja procesu autofagii

Jednym ze szlaków regulujących autofagię, jest szlak mTOR wrażliwy na obecność lub brak składników odżywczych [1, 2]. mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) jest kinazą serynowo-treoninową, której zadaniem jest regulacja wzrostu i proliferacji komórek oraz wielu procesów metabolicznych [9]. mTOR tworzy w komórkach ssaków dwa białkowe kompleksy: mTORC1 i mTORC2. Pierwszy z nich w swoim składzie zawiera kinazę mTOR oraz białka Raptor i mLST8/GbL, jest negatywnym regulatorem autofagii. Natomiast w skład drugiego wchodzi kinaza mTOR oraz białka Rictor i mLST8/GbL, jest odpowiedzialny za funkcję cytoszkieletu komórki. mTORC1 charakteryzuje się wrażliwością na rapamycynę, co powoduje w warunkach głodu defosforylację ULK1

i aktywację szlaku autofagii [1, 6]. Na aktywność mTOR wpływają między innymi aminokwasy, insulina i kinaza aktywowana AMP (AMPK) [3]. Kinaza AMPK hamuje szlak mTORC1, natomiast aktywuje kompleks ULK. ULK z kolei aktywuje kompleks PI3K, zawierający Beklinę1, PI3K oraz Atg14L [5]. Białko PI3K jest zaangażowane w proces autofagii i jest substratem do powstania PI3P, niezbędnego do wydłużania fagoforu. Interakcja Bekliny1 z PI3K i kinazą serynową p150 wykazuje aktywność katalityczną i powoduje zwiększenie poziomu PI3P, który jest aktywatorem autofagii i powoduje proliferację komórek [6, 11, 13].

W normalnych warunkach wzrostu, gdy środowisko jest obfite w składniki odżywcze, szlak mTOR ulega aktywacji, poprzez blokowanie kompleksu ULK, co prowadzi do zahamowania autofagii, powodując proliferację komórek [2]. Natomiast wiele czynników, takich jak niedotlenienie czy niedobór składników odżywczych wpływa na zahamowanie szlaku mTOR, w wyniku czego kompleks Ryc. 1. Przebieg procesu autofagii [12] kinazy ULK staje się aktywny, co inicjuje powstawanie fagoforu [3].

Kinaza AMPK jest jednym z głównych aktywatorów autofagii. W warunkach deficytu składników odżywczych i energii, następuje zmniejszenie stosunku ATP/AMP w komórce. W odpowiedzi, serynowo-treoninowa kinaza LKB1 aktywuje AMPK poprzez fosforylację thr172, co prowadzi do fosforylacji TSC1/2 oraz inhibicji mTORC1. Ostatnie doniesienia sugerują, że AMPK reguluje sygnalizację mTORC1 za pomocą alternatywnego mechanizmu, zgodnie z którym AMPK bezpośrednio fosforyluje podjednostkę mTORC1, białko Raptor, co ma znaczenie w rozpoczynaniu procesu autofagii, inaktywując kompleks mTORC1. Z tego wniosek, iż AMPK jest pozytywnym regulatorem autofagii [11, 14].

Kolejnym istotnym regulatorem autofagii jest białko p53, uznawane za „strażnika genomu", które pełni podwójną rolę w regulacji procesu, w zależności od tego czy zlokalizowane jest w jądrze komórkowym czy cytoplazmie: pozytywną bądź negatywną [11, 14]. W przypadku genotoksycznego stresu oraz progresji nowotworu indukuje autofagię. p53 aktywuje AMPK, która z kolei aktywuje kompleks TSC1/2, prowadząc do hamowania szlaku mTORC1. p53 również indukuje autofagię poprzez aktywację białka występującego w błonie lizosomalnej DRAM1 (ang. *Damage-regulated autophagy Modulator*). DRAM1 odpowiada za indukcję makroautofagii oraz kumulację autofagosomów [1]. Hamowanie autofagii za pośrednictwem p53 polega na inhibicji mTORC1. Tasdemir i wsp. Wykazali, że zahamowanie aktywności białka p53 obecnego w cytozolu powoduje indukcję autofagii. Ponadto wspomniani naukowcy wykazali, że niedobór składników pokarmowych, stres ER, hamowanie kompleksu mTOR przez rapamycynę, powoduje proteasomalną degradację białka p53, co promuje autofagię [11].

Kolejnymi białkami regulującymi proces autofagii jest rodzina białek Bcl-2, które również odgrywają podwójną rolę w tym procesie. Białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w czy Mcl-1, hamują autofagię, podczas gdy białka proapoptotyczne, takie jak BNIP3, Bad, Bik, Noxa, Puma lub BimEL – indukują. Interakcja Bcl-2 z Bekliną1, przerywa wiązanie Bekliny1 z hVps34, co powoduje inhibicję autofagii [14].

1.3. Podwójny charakter autofagii

Autofagia odgrywa kluczową rolę w patogenezie wielu chorób człowieka, w tym chorób neurodegeneracyjnych, infekcji, chorób układu krążenia, chorób metabolicznych oraz nowotworów [3].

Podczas zmniejszenia aktywności autofagii, komórki tracą zdolność do usuwania uszkodzonych białek i rozpoczyna się akumulacja składników cytotoksycznych. Może to doprowadzić do zapoczątkowania procesu ontogenezy. Natomiast autofagia na wyższym poziomie niż podstawowy odpowiada za przetrwanie komórki w niekorzystnych warunkach, na przykład podczas niedoboru składników odżywczych, niedotlenienia, infekcji bakteryjnych czy stresu komórkowego [2].

Dokładna rola autofagii w procesie nowotworzenia, nadal nie jest poznana [15]. Według obecnego stanu wiedzy, w powstawaniu raka, autofagia pełni dwojaką funkcję, nie jest więc jedynie synonimem śmierci komórki, jak apoptoza. Z jednej strony, chroni komórki przed transformacją nowotworową poprzez usuwanie uszkodzonych organelli, zagregowanych białek, redukuje uszkodzenia DNA, czy zaburzenia mitochondrialne. Z drugiej strony wpływa na tworzenie guza poprzez ułatwienie dostępu do składników odżywczych, które mają kluczowe znaczenie dla metabolizmu i wzrostu komórek nowotworowych. Zahamowanie śmierci komórek zwiększa również oporność na leczenie [2, 3]. Ponadto, autofagia ma różne działanie w zależności od wielu czynników, w tym etapu kancerogenezy, pochodzenia tkanki czy mutacji genów ulegających ekspresji w określonym typie raka. Autofagia może zapobiec inicjacji nowotworu, dzięki usunięciu nieprawidłowych białek i organelli. Natomiast w późniejszym etapie rozwoju guza, przyczynia się do adaptacji komórek do niekorzystnych warunków, jak niedotlenienie czy głód, umożliwiając progresję nowotworu. Niektóre typy nowotworów, jak na przykład ludzki rak trzustki, charakteryzują się aktywnym genem Ras, co świadczy o podwyższonym poziomie autofagii, która przyczynia się do proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych. W ludzkim raku piersi, jajników czy prostaty, obserwuje się delecję alleli Bekliny1, zasadniczego regulatora autofagii, co wskazuje na zmniejszony poziom autofagii przyczyniając się do progresji nowotworu [2, 15].

Białka z rodziny Bcl-2 i Bcl-X_L zaangażowane w proces apoptozy, również uczestniczą w autofagii, działając jako jej inhibitory. W niektórych typach komórek, białka te łączą się z Beklin̨ą1, obniżając jej powinowactwo do PI3K III. Rola tych białek w autofagii, związana jest z tym, że kompleks Bcl-2/Bcl-X_L-Beklina1-PI3K, ma mniejszą aktywność kinazową niż kompleks bez przyłączonych białek Bcl-2 czy Bcl-X_L. Interakcje między Beklin̨ą1 a wyżej wspomnianymi białkami regulowane są przez stan ich ufosforylowania. Kinaza DAPK-1 fosforyluje Beklinę1, natomiast kinaza JNK1 fosforyluje białko Bcl-2. Następnie dochodzi do rozłączenia tych białek, co prowadzi do indukcji autofagii. ponadto ufosforylowane białko Bcl-2 łączy się z proapoptotycznym białkiem Bax, hamując apoptozę [11].

2. Autofagia zależna od chaperonów

Autofagia zależna od białek opiekuńczych – chaperonów (CMA), mechanizm degradacji białek cytozolowych w lizosomie, jest jednym z najbardziej selektywnych typów autofagii u ssaków [16]. Różni się od innych rodzajów autofagii dwoma właściwościami, jest selektywna tylko wobec określonego typu białek oraz charakteryzuje się odmiennym sposobem dostarczania substratów do lizosomu [1]. Zadaniem chaperonów jest wychwytywanie białek niepofałdowanych lub nieprawidłowo fałdowanych, które następnie przenoszone są do lizosomów [2]. Białko szoku cieplnego hsc70 oraz LAMP2A są kluczowymi czynnikami zaangażowanymi w ten proces [17].

CMA aktywowana jest w prawie wszystkich rodzajach komórek w odpowiedzi na wiele czynników, ale najważniejszym z nich jest stres oksydacyjny, dlatego uważa się ten proces za pierwszą linię obrony przed stresem [16, 17]. Ten typ autofagii jest również indukowany w przypadku długotrwałego pozbawienia składników odżywczych (powyżej 10 godzin) [16, 18]. Aktywacja podczas niedoboru składników odżywczych, związana jest z wyższym poziomem lys-hsc7 w świetle lizosomu oraz LAMP2A w błonie lizosomalnej. Ponieważ oddziaływanie białek substratowych jest ograniczone etapem szlaku autofagii, zmiany w poziomie LAMP2A w błonie lizosomalnej modulują aktywność CMA [19].

Przeciwutleniacze, substancje utleniające oraz denaturujące toksyny również przyczyniają się do wzrostu aktywności CMA, która selektywnie usuwa uszkodzone białka z cytozolu [18, 20]. Niepożądane modyfikacje potranslacyjne (łagodne utlenienie, częściowe pofałdowanie, nieprawidłowe skrócenie białka, sprzęganie z toksynami oraz tworzenie adduktów białka z małymi cząsteczkami) również powodują wzrost autofagii zależnej od chaperonów w celu usunięcia uszkodzonych białek [16]. Aktywacja

tego typu autofagii zachodzi również w wątrobie i nerkach po ekspozycji na pochodne benzyny oraz w komórkach z nadekspresją LAMP2A [19].

Upośledzona autofagia prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji utlenionych i zagregowanych białek oraz hamuje przeżywalność komórek podczas stresu. Zaobserwowano spadek aktywności CMA wraz z wiekiem, co sugeruje większą wrażliwość starych organizmów na stres. Zmniejszona aktywność CMA w procesie starzenia może nasilać postęp pewnych zaburzeń związanych z wiekiem, takich jak choroby neurogedeneracyjne, cukrzyca czy nowotwory, w niektórych chorobach, białka chorobotwórcze gromadzą się w uszkodzonych komórkach wywierając bezpośredni efekt toksyczny na CMA [18, 20].

Podstawowa aktywność CMA wykrywana jest niemal we wszystkich typach komórek i odpowiada za niektóre funkcje poszczególnych rodzajów komórek. Autofagia zależna od chaperonów bierze udział między innymi w prezentacji antygenu komórkom, wpływa na żywotność neuronów przez modulowanie poziomu czynnika transkrypcyjnego MEF2D lub kontroluje wzrost komórek kanalików nerkowych przez degradację czynnika transkrypcyjnego Pax2 [16].

2.1. Mechanizm autofagii zależnej od chaperonów

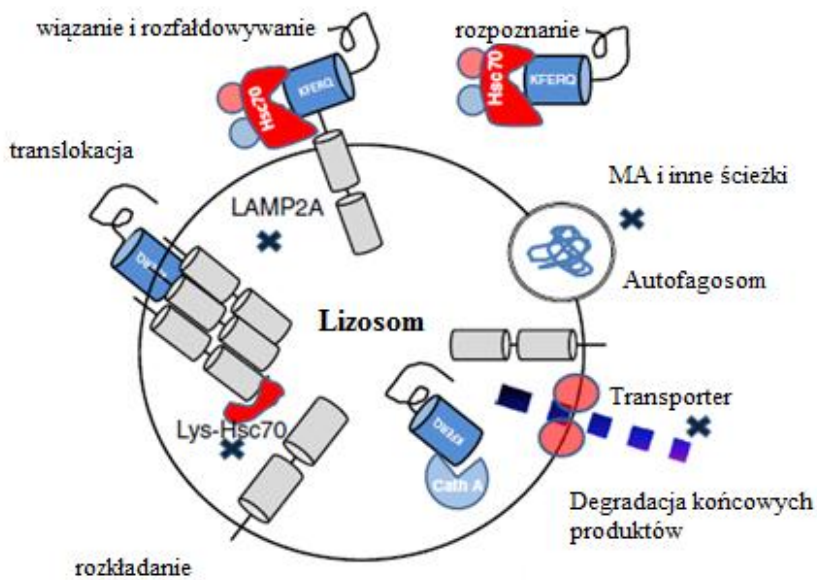
Odkrycie autofagii zależnej od chaperonów wiązało się z odkryciem, że podczas niedoboru składników odżywczych w lizosomach były znacznie większe ilości białek szoku cieplnego 70 (hsc 70) [21].

CMA jest procesem wieloetapowym, który obejmuje: rozpoznanie substratu i kierowanie do lizosomu; wiązanie; translokację substratu i jego degradację w świetle lizosomu [22]. Chaperony rozpoznają tylko substraty, które zawierają w swojej strukturze specyficzną sekwencję pentapeptydu, Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ). KFERQ jest motywem występującym w ok. 30% białek cytozolowych, jest rozpoznawany przez białko szoku cieplnego hsc73. Odpowiada za traslokację substratu do lizosomu [2, 18, 23]. Kompleks substrat-chaperon skierowany zostaje do powierzchni lizosomu, gdzie wiąże się z receptorem LAMP2A (ang. Lysosome-associated membrane protein type 2A), który zawiera region N-glikozylowany, pojedynczy region transbłonowy oraz krótki ogon cytozolowy, wiążący substraty [16, 24]. LAMP2A znajduje się w błonie lizosomalnej, występuje w formie monomeru, a w połączeniu z innymi białkami tworzy kompleks niezbędny do translokacji substratu. Translokacja substratu wymaga obecności białka szoku cieplnego hsc70, obecnego w lizosomach. Pomimo, że specyficzny sposób translokacji nie został jeszcze poznany, wiadomo że hsc70 zapobiega powrotowi substratu do cytozolu [22]. W końcu białko przeznaczone do degradacji dostaje się

do wnętrza lizosomu, gdzie ulega hydrolizie za pomocą proteolitycznych enzymów lizosomalnych. Transport wymaga źródła energii w postaci ATP oraz zależny jest od temperatury (wiązanie może zachodzić nawet w temperaturze 10°C, ale transport jest wykrywalny dopiero powyżej 25°C) [1, 23].

Po tym, jak substrat dostanie się do światła lizosomu, LAMP2A odłącza się od kompleksu, powraca do formy monomerycznej i znów wiąże kolejne białka substratowe. Wiązanie i translokacja substratu są etapami skoordynowanymi, ale mogą również występować osobno [23].

Rysunek 2 przedstawia dokładne etapy procesu autofagii zależnej od białek opiekuńczych, X oznacza miejsce regulacji.



Rysunek. 2. Etapy procesu autofagii zależnej od chaperonów [24]

2.2. Charakterystyka molekularna autofagii zależnej od chaperonów

Dokładna regulacja CMA nie jest jeszcze do końca poznana. Uważa się, że poziom białka LAMP2A bezpośrednio koreluje z aktywnością autofagii, a zmiany w jego poziomie są wykorzystywane przez komórki do modulowania szlaku autofagii [16, 18]. Nie wiadomo jednak czy cząsteczki LAMP2A są losowo degradowane, w celu zmniejszenia aktywności CMA, czy pewna pula LAMP2A jest wrażliwsza na działanie proteaz [23]. W specyficznych warunkach (np. stres oksydacyjny) poziom LAMP2A zwiększa się poprzez indukcję transkrypcji i syntezę *de novo* tego białka.

Jednak w większości przypadków zmiany w poziomie LAMP2A są regulowane bezpośrednio przy błonie lizosomalnej, co nie wymaga syntezy *de novo* tego białka. LAMP2A również poddawany jest ściśle regulowanej degradacji poprzez sekwencyjne cięcie przez katepsyny A oraz metaloproteinaz związanych z błoną, których charakter nadal pozostaje nieznany. Odcięta forma LAMP2A uwalniania zostaje do światła lizosomu, gdzie szybko jest degradowana. W warunkach, które wymagają maksymalnej aktywacji CMA, degradacja LAMP2A zmniejsza się, w konsekwencji następuje wzrost poziomu tego białka bez konieczności jego syntezy [18].

Wiele czynników uczestniczy w regulacji procesu składania/rozdzielania kompleksu translokacyjnego, na przykład jednym z takich czynników może być zmiana w płynności błony lizosomalnej, co wpływa na zmianę gęstości białek w błonie. Do tej pory pierwszymi opisanymi białkami regulującymi składanie/rozdzielania kompleksu LAMP2A w sposób zależny od GTPazy są GFAP i EF1α. Białko GFAP przyczynia się między innymi do stabilizacji kompleksu translokacyjnego [16, 22]. GFAP dzieli się na dwie formy: nieufosforylowaną formę GFAP, wiążącą multimry LAMP2A oraz ufosforylowaną (GFAP-P), który z kolei wiąże EF1α. Nieufosforylowane białko GFAP ma zwykle wyższe powinowactwo do GFAP-P niż do LAMP2A, ale tworzenie dimerów GFAP-GFAP-P jest zwykle uniemożliwione, dzięki obecności EF1α związanego z GFAP-P [18]. W obecności GTP, z błony lizosomalnej uwalniany zostaje czynnik EF1α, co prowadzi do samoistnego łączenia z GTAP, który oddzysocjowuje z kompleksu translokacji CMA i w ten sposób neutralizowana jest jego funkcja stabilizacyjna. Mimo wszystko mechanizm ten wciąż nie jest do końca poznany [16, 22]. Natomiast na podstawie zebranych do tej pory danych ustalono, że zmiany w poziomie GFAP–GFAP-P, EF1α w błonie lizosomalnej, jak również zmiany w poziomie wewnątrzkomórkowego GTP oraz Ca^{2+} wewnątrz lizosomów, mogą przyczyniać się do wpływu na aktywność CMA [18].

Liczne badania wykazują, że różne szlaki autofagii współdziałają ze sobą. Zahamowanie makroautofagii powoduje aktywację autofagii zależnej od chaperonów. Ponadto, jeśli zablokowana jest autofagia zależna od białek opiekuńczych, makroautofagia jest aktywna. W ten sposób utrzymywana jest homeostaza komórki [16].

2.3. Autofagia zależna od chaperonów a rak

Zaburzenia w procesie autofagii zależnej od cha peronów zostały opisane w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, chorobach nerek, cukrzycy czy raku. Stopniowy spadek aktywności CMA występuje już w starszym wieku, ze względu na zmniejszenie stężenia LAMP2A wraz z wiekiem [25].

Aktywacja CMA związana jest z przeżyciem i proliferacją komórek nowotworowych. Badanie aktywności autofagii na ludzkich komórkach nowotworowych pobranych podczas biopsji, wykazały wzrost podstawowej aktywności CMA [22]. Autofagia zależna od chaperonów bierze udział w proliferacji komórek nowotworowych, progresji guza oraz generowaniu przerzutów [26]. W komórkach rakowych obserwujemy zwiększony poziom LAMP2A, co wskazuje na większą aktywność CMA [22].

Warto zwrócić uwagę na zależność pomiędzy CMA a metabolizmem glukozy. Komórki nowotworowe są silnie zaangażowane w glikolizę, w celu produkcji ATP oraz pośrednich metabolitów, co jest niezbędne do szybszego wzrostu komórek nowotworowych oraz ich proliferacji. Ponadto zahamowanie CMA w komórkach nowotworowych powoduje tłumienie transkrypcji enzymów glikolotycznych, powodując zmniejszenie glikolizy oraz produkcji ATP. W innych typach nowotworów zaobserwowano, że zmniejszenie glikolizy powoduje blokowanie CMA, które nie wynika ze zmian w poziomie transkrypcji ale w poziomie białka. CMA reguluje również równowagę pomiędzy aktywną i nieaktywną formą enzymu glikolitycznego PKM2, ulegającego nadekspresji w komórkach rakowych. PKM2 niedawno został zdefiniowany jako substrat CMA. Mechanizm autofagii zmniejsza poziom nieaktywnej formy PKM2 w wyniku acetylacji. Zahamowanie CMA w komórkach nowotworowych prowadzi do gromadzenia się w nich nieaktywnych form PKM2 oraz obniżenia glikolizy. Z kolei, w wielu typach nowotworów, dłuższe zahamowanie CMA, pozytywną regulację układu ubikwityna-proteasom (UPS), uniemożliwiając gromadzenie uszkodzonych substratów przeznaczonych do degradacji [22, 26].

Indukcja autofagii w wielu typach nowotworów, prowadzi do łagodzenia stresu wewnątrzkomórkowego oraz sprzyja aktywacji onkogennych szlaków przeżycia [22, 26].

Podsumowując, istnieje złożona zależność pomiędzy CMA a biologią nowotworów. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w komórkach nowotworowych autofagia zależna od chaperonów ma działanie proonkogenne, natomiast w zdrowych komórkach jej działanie jest przeciwne – chroni komórki przed uszkodzeniami wewnątrz – i zewnątrzkomórkowymi. Ponadto, wykazano, że CMA powoduje zmniejszenie poziomu zmutowanego białka p53, poprzez jego degradację w komórkach rakowych nieproliferujących, co świadczy o antyonkogennym działaniu CMA. Poza tym CMA kontroluje również proteolizę innych pro onkogennych białek, na przykład Eps8 (ang. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 8*) zaangażowany w rozwój guzów litych. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, w celu lepszego zrozumienia zróżnicowanej roli CMA w procesie nowotworzeni [22].

3. Mitofagia

Mitochondria są endosymbiotycznymi organellami pochodzącymi od bakterii tlenowych. Są bardzo dynamiczne, ciągle się przemieszczają i zmieniają kształt Zdrowe mitochondria są istotne dla funkcjonowania i żywotności komórek eukariotycznych. Mają zasadnicze znaczenie w wielu procesach, takich jak generowane energii, metabolizm, buforowanie jonów wapnia. Natomiast uszkodzone lub starzejące się mitochondria są źródłem reaktywnych form tlenu i azotu. Następuje w nich również spadek produkcji energii. W celu spowolnienia uszkodzeń mitochondrialnych, komórka opracowała szereg procesów kontroli jakości. W przypadku, gdy mitochondria zgromadziły większą liczbę uszkodzeń i nie są w stanie utrzymywać potencjału błonowego, są kierowane do lizosomów i ulegają degradacji w procesie zwanym mitofagią [Narendra 2011; Chen 2013; Cavallucci 2014].

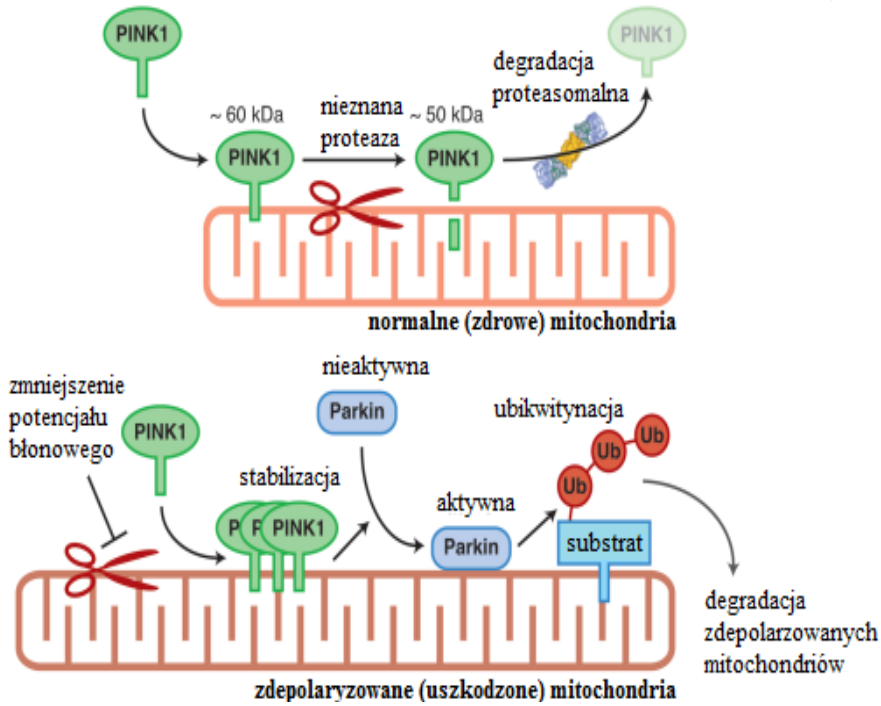
Mitofagia jest procesem selektywnej, mitochondrialnej autofagii. Polega na pochłanianiu przez autofagosom i dostarczaniu do lizosomów nieprawidłowych i uszkodzonych mitochondriów, gdzie następnie ulegają degradacji. Proces degradacji mitochondriów polega na sekwestracji ładunków cytoplazmatycznych do błonowych wakuoli autofagosomalnych (AVS) w celu dostarczenia ich do lizosomów [27, 28]. Głównymi białkami regulującymi proces mitofagii są białka PINK1 oraz Parkina [29].

Proces mitofagii zachodzi w dwóch etapach: indukcji oraz rozpoznanie substratów. W pierwszym etapie następuje hamowanie mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) indukowanego przez ROS (produkowane przez uszkodzone mitochondria) oraz aktywacja AMPK, spowodowana obniżeniem poziomu ATP. Ponadto następuje aktywacja szlaków zależnego PI3K/Akt-I i niezależnego PI3K/Akt-I. Białka PTK i GPCR zlokalizowane na powierzchni komórki i połączone z ligandami obecnymi na zewnątrz komórki, powodują przemianę PIP2 do PI3P w wyniku fosforylacji. PI3P jest ważną cząsteczką sygnałowa. Łączy się z białkiem PDK1 w błonie komórkowej i fosforyluje Akt. Aktywowane białko Akt następnie fosforyluje wiele białek docelowych w uszkodzonych mitochondriach i hamuje mTORC1, prowadząc do indukcji mitofagii. Niezależny szlak PI3K/Akt-I jest aktywowany w wyniku obniżenia poziomu mitochondrialnego ATP, co może indukować kinazę wątrobową B1 (LKB1) lub AMPK i wpływać na aktywność mTORC1. Aktywowana AMPK może fosforyzować TSC2, zwiększać aktywność GAP i przekształcać homolog Rheb-GTP do homologu Rheb-GDP, który jest zaangażowany w mitofagię. W drugim etapie mitofagii biorą udział białka PINK1 i Parkina [30].

3.1. Rola białka PINK1 w mitofagii

Najlepiej poznanym mechanizmem regulującym proces mitofagii jest szlak PINK1/Parkin [28]. PINK1 (ang. *PTEN-induced putative kinase 1*) jest kinazą serynową-treoninową, składającą się z 581 aminokwasów o masie 63 kDa. W swojej budowie zawiera N-końcową mitochondrialną sekwencję kierującą oraz C-końcową domenę autoregulacyjną, która znajduje się głównie w mitochondriach, ale może również występować w cytozolu. Występuje w całym organizmie, a najwyższą ekspresję wykazuje w sercu, mięśniach i jądrach. Ulega również wysokiej ekspresji w mózgu ssaków, gdzie najwyższy poziom mRNA PINK1 obserwuje się w obrębie ciała komórkowego neuronów oraz w komórkach glejowych. PNK1 działa jako główne białko neuroprotekcyjne, mające na celu zapobieganie uszkodzeniom mitochondriów oraz apoptotycznej śmierci komórek w odpowiedzi na warunku stresowe. Aktywność PINK1 regulowana jest przez kilka mechanizmów, w tym fosforylację białek mitochondrialnych TRAP1 i Omi/HtrA2. Badania wykazały, że rekombinowany PINK1 może ulegać autofosforylacji, jak również może fosforyzować substraty *in vitro* [31-33]. Natomiast Parkina koduje ligazę ubikwityny E3. Ze względu na funkcję molekularną tych białek, oczywiste jest, że PINK1 pośredniczy w fos-forylacji a Parkina w ubikwitynacji, tym samym są kluczowymi elementami w patogenezie wielu chorób [34].

Najnowsze badania dotyczące Parkiny i PINK1 wykazały, że te białka mają zasadnicze znaczenie w utrzymaniu integralności oraz funkcjonowania mitochondriów [30]. PINK1 uznawany jest za czujnik stanu polaryzacji mitochondriów, co zostało pokazane na rys. 2. W spolaryzowanych mitochondriach, PINK1 zostaje importowany do przestrzeni międzybłonowej, gdzie ulega szybkiej degradacji za pomocą proteaz PARL i proteasomu, tym samym zostaje utrzymany niski podstawowy poziom PINK1. W zdrowych mitochondriach, które zachowują swój potencjał błonowy, poziom PINK1 pozostaje bardzo niski. Depolaryzacja uszkodzonych mitochondriów powoduje inaktywację importu PINK1 i proteasomalnej degradacji, co prowadzi do akumulacji PINK1 w zewnętrznej błonie. Parkina zostaje rekrutowana do uszkodzonego mitochondriom o niskim potencjale błonowym, czego skutkiem jest aktywacja enzymu E3 w celu ubikwitynacji substratów mitochondrialnych. Następstwem tych zdarzeń jest inicjacja autofagii zależnej od LC3, nazwanej mitofagią, prowadzącej do usuwania uszkodzonych mitochondriów [28, 32, 36-38].



Rysunek. 3. Model mitochondrialnej kontroli jakości z udziałem białka PINK1 oraz Parkiny [35]

Za pomocą szlaku ubikwityna-proteasom, Parkina ubikwitynuje i degraduje niektóre białka zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, w tym Mfn, Drp1,VDAC1 oraz Bcl-2. Degradacja mitochondrialnego czynnika fuzji (Mfn) przyczynia się do fragmentacji mitochondriów i może ułatwiać proces mitofagii [36].

3.2. Mitofagia w chorobach neurodegeneracyjnych

Choroba Parkinsona jest jedną z typowych chorób neurodegeneracyjnych, spowodowaną zaburzeniami mitochondriów. Defekty często są obserwowane w istocie czarnej oraz ciele migdałowatym. W komórkach nerwowych pacjentów spotykane są obrzękowe mitochondria. Na tej podstawie wykazano, że zachorowalność na chorobę Parkinsona, może być z powodzeniem ograniczona przez usuwanie uszkodzonych mitochondriów. W przypadku nieusunięcia dysfunkcyjnych mitochondriów na drodze mitofagii, następuje wzrost produktów toksycznych w komórce, co prowadzi do śmierci dopaminergicznych neuronów, a w konsekwencji do

choroby Parkinsona [30]. Charakteryzująca się drżeniem, sztywnością mięśni, upośledzeniem ruchów dowolnych (akineza), spowolnieniem ruchowym (bradykinezja) oraz niestabilnością postawy [39].

Choroba Parkinsona charakteryzuje się degeneracją dopaminergicznych i innych monoaminowych neuronów, prowadząc do niedoboru dopaminy w czynnościowym, autonomicznym i w końcu poznawczym układzie nerwowym. Mutacje w genach specyficznych zidentyfikowano w rodzinnej formie choroby Parkinsona. Mutacje w fosfatazie oraz PINK1 kodowanym przez gen PARK6 zidentyfikowano u pacjentów we wczesnym stadium choroby. Ponadto, mutacje w Parkinie, kodowanej przez gen PARK2 również zidentyfikowano we wczesnym stadium rozwoju choroby. Na tej podstawie uznano, że PNK1 oraz Parkina są podstawowymi białkami zaangażowanymi w patogenezę choroby Parkinsona. W ostatnich badaniach zaobserwowano, że niektóre zmutowane formy PINK1 charakteryzują się zmniejszoną aktywnością kinazy, natomiast inne wykazują zmniejszoną stabilność białka, dlatego wysnuto wniosek, ze normalnie funkcjonujące białko PINK1 pełni funkcję ochronną neuronów. Podobnie Parkina wykazuje działanie ochronne w kilku modelach uszkodzenia neuronów, w tym podczas niedoboru PINK1 [39, 40]. Wykazano, że PINK1 ulega ekspresji w korze, ciele prążkowanym oraz pniu mózgu. Obecny jest w mitochondriach tkanek mózgowych, ale występuje również w cytoplazmie [41].

Zachodząca interakcja pomiędzy PINK1 a Bekliną1 indukuje mitofagię, natomiast jeśli zmutowane białko PINK1 wchodzi w interakcję z Bekliną1, następuje hamowanie mitofagii. Badania wykazały, że zmutowane białko PINK1 może spowodować spadek aktywności Bekliny1, tylko wtedy jeśli miejsce mutacji znajduje się w pozycji W437X. inne miejsca mutacji, prawie nie mają wpływu na aktywność Bekliny1. Kolejnym białkiem odpowiedzialnym za chorobę Parkinsona jest Parkina. Zaangażowana jest w degradację uszkodzonych mitochondriów oraz działa jako ligaza ubikwityny E3 [30].

Badania wykazały, że niedobór PINK1 związany z wiekiem powoduje zmniejszenie żywotności neuronów i zwiększenie wrażliwości na mitochondrialną apoptozę indukowaną stresem. Na podstawie wcześniejszych badań stwierdzono, że mitochondrialne zaburzenia są związane z obniżeniem potencjału błonowego, wzrostem stresu oksydacyjnego oraz zmianami morfologicznymi w tych organellach spowodowane niedoborem PINK1, a te wszystkie czynnik mogą prowadzić do choroby Parkinsona [34].

4. Mikrofagia

Mikrofagia jest najmniej, jak dotąd poznanym rodzajem autofagii. procesowi mikrofagii podlegają przede wszystkim małe cząsteczki. Jest to

proces nieselektywny, w którym białka przeznaczone do degradacji wprowadzane są do wnętrza lizosomu przez wpuklenie w jego błonie, bez udziału autofagosomu. W lizosomie dochodzi do enzymatycznego trawienia białek. Dokładny mechanizm procesu nie został jeszcze zbadany [2, 42].

5. Podsumowanie

W literaturze pojawia się coraz więcej doniesień na temat udziału autofagii w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworów. W związku z czym, konieczne jest określenie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tego procesu. Ponadto uważa się, że dokładne poznanie i przeanalizowanie genów zaangażowanych w autofagię, umożliwi rozwój badań nad opracowaniem nowych metod diagnostyki oraz terapii mających na celu zwalczanie różnych chorób.

Kolejne wyniki pokazują, iż zarówno indukcja, jak i inhibicja procesu autofagii może mieć duże znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Dlatego wciąż poszukuje się modulatorów, jak i inhibitorów tego procesu. Naukowcy pracują nad otrzymaniem leków stymulujących autofagię, które mogą przyczynić się do zwalczania chorób infekcyjnych oraz nowotworowych.

Literatura

1. Badadani M. *Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders,* Cell Biology. (2012), s. 1-11
2. Dereń - Wagemann I., Kiełbiński M., Kuliczkowski K. *Autofagia - proces o dwóch obliczach,* Acta Haematologica Polonica., 44 (2013), s. 383-391
3. Burada F., Nicoli ER., Ciurea ME., Constantin D., Ioana M., Gheonea DI. *Autophagy in colorectal cancer An important switch from physiology to pathology,* World Journal of Gastrointestinal Oncology., 7 (11) (2015), s. 271-284
4. Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande SR. Jangamreddy JR., Mehrpour M., Christofferson J., Chaabane W., Moghadam AR., Kashani HH., Hashemi M., Owji AA., Łos M., *Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders,* Progress in Neurobiology., 112 (2014), s. 24-49
5. Kiriyama Y., Hochi H. *The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases,* International Journal of Molecular Sciences., 16 (2015), s. 26797-26812
6. Lisak N., Totoń E., Rybczyńska M. *Autofagia, nowe perspektywy w terapii przeciwnowotworowej,* Postępy Medycyny i Higieny Doświadczalnej., 68 (2014), s. 925-935
7. Fujita Y., Araya J., Ito S., Kosaka N., Yoshioka Y., Kadota T., Hara H., Kuwano K., Ochiya T. *Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis,* Journal of Extracellular Vesicles., 4 (2015), s. 1-12
8. Świderek E., Strządał L. *Autofagia i białko BNIP3 w nowotworach,* Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej., 67 (2013), s. 363-370

9. Eskelinen E. Saftig P. *Autophagy A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease*, Biochemica et Biophysica Acta., 1793 (2009), s. 664-673
10. Groulx JF., Khalfaoui T., Benoit YD. *Autophagy is active in normal colon mucosa,* Autophagy., 8 (6) (2012), 893-902
11. Polewska J. *Autofagia – mechanism molekularny, apoptoza i nowotwory*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 66 (2012), s. 921-936
12. Kost A., Kasprowska D., Łabuzek K., Wiaderkiewicz R., Gabryel B. *Autofagia w niedokrwieniu mózgu*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej., 65 (2011), s. 524-533
13. Glick D., Barth S., Macleid K. *Autophagy cellular and molecular mechanisms,* Journal of Pathology., 221(1) (2012), s. 3-12
14. Yang Z., Klionsky D. *Mammalian autophagy core molecular machinery and signaling regulation,* Current Opinion in Cell Biology., 22 (2) (2010), s. 1-14
15. Kania E., Pająk B., Orzechowski A. *Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells*, BioMed Research International. (2015), s. 1-12
16. Arias E., Cuervo A. *Chaperone-mediated autophagy in protein quality control*, Current Opinion n Cell Biology., 23(2) (2011), s. 184-189
17. Su M., Guan H. Zhang F., Gao Y., Teng X., Yang W. *HDAC6 Regulates the Chaperone-Mediated autophagy to Prevent Oxidative Damage in Injured Neurons after Experimental Spinal Cord Injury*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. (2015), s. 1-13
18. Kaushic S., Bandyopadhyay U., Sunandini S. *Chaperone-mediated autophagy at a glance* , Journal of Cell Science.,124 (2011), s. 495-499
19. Kiffin R., Christian Ch, Knecht E., Cuervo AM. *Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress,* Molecular Biology of Cell., 15 (2004), s. 4829-4840
20. Koga H., Martinez-Vincente M., Macian F., Verkhusha VV., Cuervo AM. *A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy*, Naature Communications., 2(386) (2011), s. 1-21
21. Franch HA. *Chaperone-mediated autophagy in the kidney the road more traveled*, Seminars in Nephrology., 34(1) (2014), s. 72-83
22. Curveo AM., Wong E. *Chaperone-mediated autophagy roles in disease and aging,* Cell Research., 24 (2014), s. 92-104
23. Kaushik S., Massey A, Cuervo A. *Lysosome membrane lipid microdomains novel regulators of chaperone-mediated autophagy*, The EMBO Journal., 25 (2006), s. 3921-3933
24. Wang F., Muller S. *Manipulating autophagic processes in autoimmune diseases a special focus on modulating chaperone-mediated autophagy, an emerging therapeutic target*, Frontiers in Immunology., 6(252) (2015), s. 1-14
25. Rodrigues-Navarro JA., Cuervo A. *Dietary lipids and aging compromise chaperone-mediated autophagy by similar mechanisms,* Autophagy., 8(7) (2012), s. 1152-1154
26. Kaushic S., Cuervo A. *Chaperone-mediated autophagy a unique way to enter the lysosome world*, Trends in Cell Biollogy., 22(8) (2012), s. 407-417

27. Dagda RK, Cherra S., Kulich S. *Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission*, The Journal of Biological Chemistry., 284(20) (2009), s. 13843-13855
28. East DA., Fagiani F., Crosby J., Georgakopoulos ND., Bertrand H., Schaap M., Fowkes A., Wells G., Campanella M. *PMI: $\Delta\Psi_m$ Independent pharmacological regulator of mitophagy*, Cell Press., 21 (2014), s. 1586-1596
29. Narendra D., Youle J. *Targeting mitochondrial dysfunction role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control*, Antioxidants and Redox Signaling., 14(10) 2011, s. 1929-1938
30. Narendra D., Jin S., Tanaka A. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin, PLOS Biology, 8 (1) (2010), e1000298
31. Song Y., Ding W., Xiao Y. Lu K.. *The Progress of Mitophagy and Related Pathogenic Mechanisms of the Neurodegenerative Diseases and Tumor*, Neuroscience Journal, (2016), s. 1-10
32. Arena G., Gelmetti V., Torosantucci L., Vignone D., Lamorte G., Rosa PD., Cilia E., Jonas EA., Valente EM. *PINK1 protects against cell death induced by mitochondrial depolarization, by phosphorylating Bcl-xL and impairing its pro-apoptotic cleavage*, Cell Death and Differentiation, 20 (2013), s. 920-930
33. Gomez-Sanchez R., Gegg M., Bravo-San Pedro J. i in. *Mitochondrial impairment increases FL-PINK1 levels by calcium-dependent gene expression*, Neurobiology and Disease, 62 (2014), s. 426-440
34. Li L., Hu G. *Pink1 protects cortical neurons from thapsigargin-induced oxidative stress and neuronal apoptosis*, Bioscense Reports, 35 (2015), s. 1-10
35. Matsuda N. , Tanaka K. *Uncovering the roles of PINK1 and parkin in mitophagy*, Autophagy, 6(7) (2010), s. 952-954
36. Imai Y., Lu B. *Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder*, Current Opinion in Neurobiology, 21 (6) (2011), s. 935-941
37. Jim SM., Youle R. *The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2 Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria*, Autophagy, 9 (11) (2013), s. 1750-1757
38. Hamacher-Brady A., Brady M. *Mitophagy programs mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy*, Cellular and Molecular Life Science, 73 (2016), s. 775-795
39. Kiriyama Y., Nochi H. *The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases*, International Journal of Molecular Science, 16 (2015), s. 26776-26812
40. Cherra S., Dagda R., Tandon A. Chu T. *Mitochondrial autophagy as a compensatory response to PINK1 deficiency*, Autophagy, 5 (8) (2009), s. 1213-1214
41. Chu CT. *Tickled PINK1 mitochondrial homeostasis and autophagy in recessive Parkinsonism*, Biocchemica et Biophysica Acta, 1802(1) (2010), s. 20-28
42. Zielniok K., Gajewska M. Znaczenie autofagii w procesie nowotworzenia, Życie weterynaryjne, 90(9) (2015), s. 565-569

Podstawy molekularne autofagii

Streszczenie

W pracy opisano molekularne podłoże głównych typów autofagii zachodzących w komórce, a także znaczenie tego procesu w patogenezie wielu chorób. Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem degradacji uszkodzonych białek i organelli komórkowych, odgrywającym ważną rolę w utrzymaniu homeostazy w komórce. W degradacji tych struktur główną rolę odgrywa lizosom. Wyróżniamy cztery podstawowe typy autofagii: makroautofagię, autofagię zależną od białek opiekuńczych, mikroautofagię oraz autofagię specyficzną (mitofagię- degradacja uszkodzonych mitochondriów).

W procesie makroautofagii formowana jest struktura zwana autofagosomem, który następnie ulega fuzji z lizosomem, tworząc autofagolizosom. Proces kontrolują produkty genów z rodziny ATG. W przypadku autofagii zależnej od białek opiekuńczych (chaperonów), białka te wychwytują nieprawidłowo pofałdowane białka i przenoszą je do lizosomów. Mikroautofagia jest najmniej, jak dotąd poznanym procesem. Mitofagia ma na celu usuwanie uszkodzonych mitochondriów. Odgrywa istotną rolę w patogenezie choroby Parkinsona.

Słowa kluczowe: autofagia, nowotwór, białka opiekuńcze, lizosom, mitochondria

Molecular basis of autophagy

Abstract

This paper aims to summarize the main molecular mechanisms of autophagy, as well as the importance of this process in pathogenesis of many diseases. Autophagy is an intracellular process of damaged proteins and organelle degradation. The lysosome plays a major role in the degradation of these structures. Known are four main types of autophagy: macroautophagy, chaperone-mediated autophagy (CMA), microphagy and selective autophagy (mitophagy- degradation of damaged mitochondria).

In the case of the macroautophagy is formed structure called autophagosome which is then fused with lysosomes to form autophagolysosome. The process is controlled by the genes ATG. In the case of chaperone-mediated autophagy, chaperones bind to substrate proteins and transfer them to the lysosomes. Microphagy is the least so far - known process. Mitophagy aims is to remove the damaged mitochondria. It plays an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease.

Keywords: autophagy, cancer, chaperon, lysosome, mitochondria

Łukasz Kręcidło[1, 3], Teresa Krzyśko-Łupicka[2]

Geny warunkujące produkcję mykotoksyn u grzybów strzępkowych obecnych w magazynach zbożowych

1. Wstęp

Płody rolne, a w szczególności zboża, stanowią podstawowe źródło żywności dla człowieka. Szacuje się, iż uprawy zbóż zaspokajają ponad 50% zapotrzebowania ludzkości na węglowodany [1]. Ziarna zbóż wykorzystywane są również do skarmiania zwierząt hodowlanych zarówno w postaci pierwotnej, jak i przetworzonej na paszę [1, 2].

Przechowalnictwo płodów rolnych jest istotnym etapem na drodze produkcji rolno-spożywczej. Błędy popełnione podczas tego procesu mogą mieć nieodwracalny skutek. Źle dobrane parametry przechowywania zwiększają ryzyko rozwoju mikrobioty magazynowej. Skutkiem tego może być ubytek masy składowanego ziarna oraz spadek jego jakości, co w konsekwencji powoduje straty ekonomiczne [3-5]. Zgodnie z zaleceniami i normami wilgotność magazynowanego ziarna nie powinna przekraczać 14,5%, a temperatura ziarna po schłodzeniu powinna być niższa niż 20^0C [6]. Okazuje się jednak, że powyższe parametry są trudne do uzyskania w przypadku magazynów płaskich. Poza tym grzyby strzępkowe, potrafią rozwijać się w zalecanych warunkach środowiskowych. Dlatego oprócz strat ekonomicznych ponoszonych podczas magazynowania szczególnie istotne zagrożenia stanowią mikroorganizmy przechowalniane, które mogą wydzielać szkodliwe dla zdrowia człowieka i zwierząt metabolity. Przykładem takich substancji są mykotoksyny [7, 8]. Związki te mogą oddziaływać na organizm człowieka w wieloraki sposób. Niektóre oprócz działania toksycznego wykazują właściwości kancerogenne, mutagenne, teratogenne oraz estrogenne [9, 10]. Substancje te nie ulegają degradacji, co powoduje iż z zanieczyszczonych nimi płodów rolnych otrzymane są produkty zawierające mykotoksyny [11]. W związku z tym monitorowanie

[1] mag18-89@o2.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl
[2] teresak@uni.opole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl
[3] Stypendysta w programie: Stypendium Prezydenta Miasta Opola 2015/2016

zawartości mykotoksyn oraz obecności grzybów strzępkowych potencjalnie zdolnych do ich biosyntezy wydaje się być niezbędnym elementem, zmniejszającym ryzyko niekorzystnego oddziaływania na człowieka [12].

Analizę potencjalnej toksynotwórczości danego gatunku wyizolowanego ze środowiska można przeprowadzić z wykorzystaniem technik molekularnych. Mykotoksyny kodowane są przez zespoły genów warunkujących ich produkcję i wydzielanie. Dzięki poznaniu roli poszczególnych genów biorących udział w biosyntezie mykotoksyn można odtworzyć ich szlaki metaboliczne. Pozwala to na ustalenie zależności między poszczególnymi intermediatami oraz określenie istotnych genów, których uszkodzenie lub brak uniemożliwia biosyntezę mykotoksyn. Obecnie analiza molekularna jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod do stwierdzenia potencjalnej toksynotwórczości danego szczepu [13-15].

2. Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie dotychczasowej wiedzy na temat genów warunkujących produkcję i wydzielanie mykotoksyn u grzybów magazynowych, a także przedstawienie sposobów identyfikacji grzybów potencjalnie toksynotwórczych.

3. Grzyby strzępkowe izolowane z magazynów zbożowych

Przeprowadzone analizy środowiskowe pozwalają stwierdzić iż grzyby strzępkowe występujące w magazynach zbożowych w większości należą do rodzajów *Aspergillus* oraz *Penicillium*. W mniejszej ilości izolowane są szczepy z rodzajów *Cladosporium*, *Fusarium* oraz *Alternaria*. Pozostałe grzyby strzępkowe stanowią niewielki odsetek izolatów. Zależność ta jest dosyć ciekawa ponieważ mogło by się wydawać iż skoro największy procent zanieczyszczeń mykologicznych podczas uprawy i zbiorów płodów rolnych oprócz rodzajów *Aspeirillus* oraz *Penicillium* stanowią grzyby z rodzaju *Fusariam*, to wraz z ziarnem powinny one trafić do magazynów zbożowych [16].

Podobne obserwacje dotyczące dominacji grzybów strzępkowych z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, podczas przechowywania produktów rolnych odnotowano również w przypadku roślin okopowych, jabłek i innych owoców. Poczynione obserwacje wskazują, iż przedstawiciel tych dwóch rodzajów grzybów strzępkowych wykazują wysokie cechy przystosowawcze do specyficznych warunków magazynowania, niezależnie od przechowywanego surowca [17, 18].

4. Zagrożenia mykologiczne podczas magazynowania

Niekorzystne oddziaływania związane z rozwojem grzybów strzępkowych podczas procesu magazynowania należy podzielić na dwa typy zagrożeń. Pierwszy można określić mianem negatywnego wpływu na składowany surowiec, co objawia się spadkiem jakości magazynowanego ziarna, osłabieniem zdolności kiełkowania materiału siewnego, ubytkiem masy, porażeniem ziarniaków oraz zmianą parametrów organoleptycznych i chemicznych [19]. Drugim typem zagrożeń jest negatywny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt, zarówno na etapie magazynowania jak i podczas przerobu zanieczyszczonego surowca oraz konsumpcji produktów jego pochodzenia [9].

Zagrożenia mykologiczne wykryte w produkcie spożywczym, które powstały na etapie magazynowania, przeważnie związane są z metabolitami wtórnymi w tym mykotoksynami wydzielanymi przez grzyby strzępkowe rozwijające się na masie zanieczyszczonego ziarna. Zagrożenie dla zdrowia przeciętnego człowieka stanowi głównie możliwość spożycia mykotoksyn wraz z żywnością [7]. Czego przykładem jest choroba zwana „Toksyczną Aleukią Żywnościową" – ATA. Jest to forma zatrucia pokarmowego spowodowanego spożyciem zbóż zanieczyszczonych trichotencenami. ATA charakteryzuje się następującymi objawami: nudności, wymioty, biegunka, leukopenia, krwotoki, zapalenia skóry. W ciężkich przypadkach może prowadzić do śmierci. W historii największą ilość zgonów spowodowana przez ATA odnotowano podczas II Wojny Światowej na terenie obecnego Kazachstanu [20].

Przechowywanie płodów rolnych stwarza również bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia i życia pracowników magazynów zbożowych. Oprócz negatywnego wpływ wydzielanych przez grzyby strzępkowe wtórnych metabolitów, pracownicy są również narażeni na niekorzystne oddziaływanie pyłu organicznego, które prowadzić może do „Alergicznego Zapalenia Pęcherzyków Płucnych" – AZPP oraz „Zespołu Toksycznego Wywołanego Pyłem Organicznym" – ODST. Największe stężenie pyłu organicznego, które stwarza wysokie zagrożenie dla zdrowia pracowników odnotowywane jest w momencie otwierania włazów silosów zbożowych. Dlatego w celu profilaktyki pracownicy magazynów zbożowych powinni podczas tej czynności używać maseczki ochronne [21-23].

AZPP jest chorobą zawodową w przypadku przemysłu zbożowego określaną potocznie płucem farmera. Zapalenie pęcherzyków płucnych spowodowane jest wdychaniem dużej ilości antygenów grzybów z rodzaju *Aspergillus* zawartych w pyle pochodzenia organicznego. Objawy kontaktu z alergenami są różne, mogą występować gorączka, dreszcze, duszności i kaszel. Niezdiagnozowane AZPP może prowadzi do zwłóknienia płuc,

a w skrajnych wypadkach do śmierci [21-23]. Zespół ODST niegdyś określane mianem mykotoksykozy, wywoływany jest przez fragmenty plechy grzybów strzępkowych, ich zarodniki oraz mykotoksyny. Objawami ODST podobnie jak w przypadku AZPP są: gorączka, dreszcze, duszności i kaszel. jak w przypadku alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych nie leczony ODST może prowadzić do śmierci [22].

5. Mykotoksyny

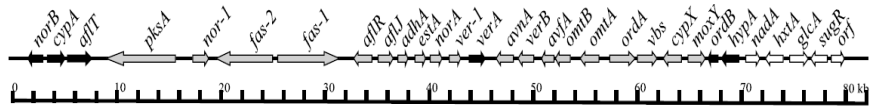
Wytwarzane przez grzyby strzępkowe wtórne metabolity zwane mykotoksyny stanowią istotne ryzyko dla zdrowia człowieka i zwierząt hodowlanych [7]. Dotychczas zidentyfikowano około 400 różnego rodzaju mykotoksyn, wśród których najlepiej poznanymi są: aflatoksyny, ochratoksyny, trichoteceny oraz patulina [24, 25]. Związki te oprócz działania toksycznego wykazują również właściwości kancerogenne, mutagenne, teratogenne i estrogenne [26]. Szczególne istotne zagrożenie stanowią tzw. zamaskowane mykotoksyny oraz pochodne mykotoksyn. Przeważnie ich obecność w produkcie jest nie możliwa do wykrycia przy wykorzystaniu konwencjonalnych metod do oznaczania mykotoksyn [27]. Zamaskowane mykotoksyny powstają w wyniku reakcji obronnych roślin na metabolity wydzielane przez fitopatogenne grzyby strzępkowe. Rośliny przekształcają mykotoksyny w formę nieaktywną poprzez wbudowanie w nie różnego rodzajów związków np.: cukrów, aminokwasów czy siarczanów [28]. Taka forma toksyny po spożyciu, dla człowieka i zwierząt jest równie toksyczna co niemodyfikowana toksyna [29].

5.1. Aflatoksyny

Obecność aflatoksyn najczęściej jest wynikiem złego przechowywania płodów rolnych, a głównymi ich producentami są szczepy *Aspergillus flavus* oraz *Aspergillus parasiticus* [15]. Spożywanie produktów zawierających aflatoksyny może powodować uszkodzenia wątroby i stymulować procesy nowotworowe w tym organie. Oddziaływania kancerogenne w przypadku tej mykotoksyny mogą być ogólnoustrojowe. Aflatoksyny posiadają również właściwości mutagenne i teratogenne, które odnotowano zarówno w przypadku zwierząt hodowlanych, jak i ludzi [12].

Wyróżniamy cztery główne aflatoksyny B1, B2, G1, G2 nieznacznie różniące się miedzy sobą budową chemiczną. Oznaczono również dwa metabolity M1 oraz M2, powstałe w wyniku przekształceń głównych aflatoksyn w organizmach zwierząt. Co powoduje iż metabolity M1 i M2 są głównymi aflatoksynami zanieczyszczającymi produkty żywnościowe pochodzenia zwierzęcego [12].

Aflatoksyny kodowane są przez zespół 30 genów (Rys. 1.). W tym cztery będące transkryptem enzymów degradujących cukry podczas biosyntezy tej mykotoksyny [30]. Szczególnie istotnym jest gen regulujący szlak metaboliczny *aflR*. W przypadku, gdy dany szczep jest pozbawiony genu *aflR* lub w genomie występuje on w postaci uszkodzonej, dany izolat nie jest zdolny do syntezowanie aflatoksyny [15, 31, 32]. Początkowy substrat szlaku biosyntezy aflatoksyny musi zawierać w swojej budowie grupę octanową. Pierwszym stabilnym prekursor aflatoksyny jest kwas norsolonikowy (NOR) [31].

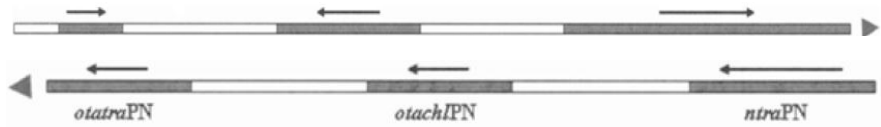


Rysunek 1 Mapa genów kodujących aflatoksyny w szlaku jej biosyntezy przez szczep *Aspergillus flavus*. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów [32]

5.2. Ochratoksyny

Magazynowanie zboża w nieodpowiednich warunkach wilgotności i temperatury zwiększa możliwość rozwoju grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* zdolnych do wytwarzać ochratoksyn. Wyróżniamy trzy ochratoksyny mianowicie A, B oraz C. Najbardziej szkodliwą jest ochratoksyna A. Mykotoksynę tą najczęściej wydzielają szczepy z gatunków *Aspergillus ochraceus* oraz *Penicillium verrucosum* [25, 33]. Ochratoksyna wykazuje działanie mutagenne wobec komórek ssaczych, indukuje endogenne wytwarzanie wolnych rodników tlenowych oraz wykazuje właściwości hepatotoksyczne i nefrotoksyczne. Niektórzy naukowcy wskazują iż ochratoksyna A może wpływać na rozwój chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroby Parkinsona oraz choroby Alzheimera [34].

Ochratoksyna A kodowana jest przez klaster 6 genów podzielony na dwa kompleksy genetyczne (Rys.2.). Ekspresja genów *otapksPN*, *otanpsPN*, *otachlPN* oraz *otatraPN* przebiega kaskadowo tzn. w momencie gdy ekspresja jednego ulega wyciszeniu następuje stymulacja ekspresji następnego [33, 35]. Sekwencje kodującą genów odpowiedzialnych za biosyntezę ochratoksyny A znacząco różnią się między rodzajami *Aspergillus* i *Penicillium*, natomiast sam mechanizm szlaku metabolicznego mykotoksyny jest podobny [36]. Początkowym substratem szlaku biosyntezy ochratoksyny A jest kompleks acetylo-CoA z malonianem [35].



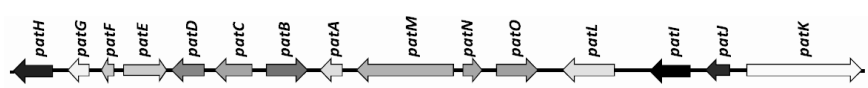
Rysunek 2 Mapa genów kodujących ochratoksynę A w szlaku jej biosyntezy przez szczep *Penicillium verrucosum*. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów [33]

5.3. Patulina

Patulina podobnie jak ochratoksyny oraz aflatoksyny syntetyzowana jest głownie przez szczepy grzybów strzępkowych z rodzajów: *Aspergillus* i *Penicillium* [37]. Powoduje reakcje immunologiczne, zaburzenia neurologiczne, choroby oraz uszkodzenia przewodu pokarmowego. Jej wniknięcie do organizmu w skrajnych wypadkach może prowadzić do śmierci [38].

Patulina najczęściej wykrywana jest w jabłkach i produktach przetwórstwa sadowniczego. W mniejszym stopniu stanowi zagrożenie dla magazynowanych zbóż. Najczęściej obecność tej mykotoksyny powiązana jest z brunatną zgnilizną. W zawiązku z potencjalnie szkodliwym działanie na organizm ludzki, w Europie ustalono maksymalny poziom jej zawartości w produktach spożywczych, który wynosi 50 $mg \cdot kg^{-1}$ [39].

Patulina kodowana jest przez zespół 15 genów, z czego 11 jest bezpośrednio zaangażowane w reakcjach enzymatycznych prowadzących do produkcji patuliny. Pozostałe 4 geny kodują białka regulatorowe i transportowe (Rys.3.) [40]. Obecnie poznaliśmy funkcje zaledwie pięciu z nich, a mianowicie: *atK*, *patG*, *patH*, *patI*, oraz *patN*. Jak do tej pory tylko w przypadku gatunków *Aspergillus clavatus* oraz *Penicillium expansum* udało się zsekwencjonować cały klaster genów kodujący patulinę [41]. Początkowym substratem szlaku metabolicznego patuliny jest kompleks acetylo-CoA z 3 manylo-CoA [42].



Rysunek 3 Mapa genów kodujących paulinę w szlaku jej biosyntezy przez szczep *Aspergillus clavatus*. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów [41]

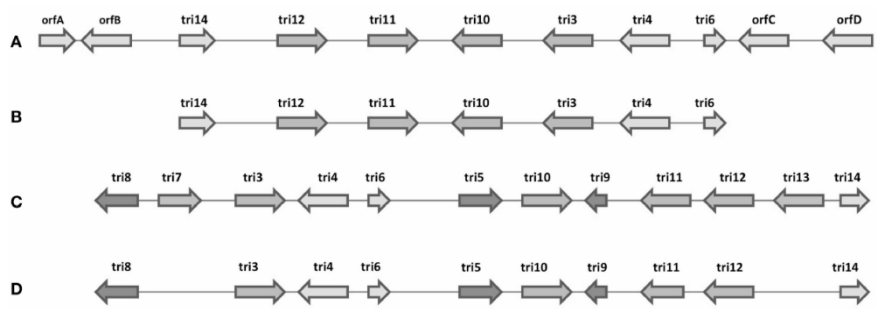
5.4. Trichoteceny

Trichoteceny to grupa ponad 60 różnego rodzaju mykotoksyn posiadających podobne właściwości chemiczne. Mogą być biosyntezowane przez grzyby strzępkowe należące do rodzajów *Fusarium, Cephalosporium, Myrothecium, Trichoderma* i *Stachybotrys*. Związki te podzielono na cztery grupy: A, B, C oraz D [43]. Największy wpływ na człowieka

i zwierzęta hodowlane wykazują tricheteceny należące do grupy B. W szczególności niwalenol, deoksyniwalenol oraz jego pochodne, związki te stanowią najczęstsze zanieczyszczenia żywności oraz pasz [44].

Trichoteceny typu B, w przypadku komórek ssaczych, wykazują działanie hamujące syntezę białek. Mogą również powodować zaburzenia układu rozrodczego, pokarmowego oraz immunologicznego [44, 45]. W przypadku trichotecen typu A najczęściej występującymi związkami są T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol. Mykotoksyny te mogą powodować działanie cytotoksyczne oraz immunosupresyjne [46].

Wszystkie cztery typy trichotecenów mogą być kodowane przez zespół 16 genów, z czego 12 tworzy tak zwany region *Tri* (Rys.4.). Pozostałe to geny regulatorowe wpływające na syntezę trichotecen. Szczególnie istotnymi genami kompleksu *Tri* są *Tri3*, *Tri5*, *Tri7*, oraz *Tri13* [14, 47]. Gen *Tri3* odpowiada za powstawanie pochodnych deoksyniwalenolu, powodując jego acetylację [48]. *Tri5* to pierwszy gen biorący udział w biosyntezie trichotecen, odpowiada za syntezę pierwszego stabilnego związku szlaku metabolicznego [46]. Gen *Tri7* odpowiada za acetylacje niwalenolu. *Tri7* oraz *Tri13* warunkują powstanie danego typu trichocenów [48–50]. Uszkodzenie lub brak jednego z genów *Tri3*, *Tri5*, *Tri7* uniemożliwia biosyntezę mykotoksyn [46, 51]. Aktywny gen *Tri13* powoduje konwersję deoksyniwalenonu do niwalenolu [52]. W przypadku uszkodzenia lub braku genu *Tri13* syntetyzowany jest deoksyniwalenon [50]. Początkowy substrat szlaku metabolicznego mykotoksyn z grypy trichotecen jest związek zwany trichodienem [47].



Rysunek 4. Mapa genów kodujących trichoteceny typów A, B C i D w szlaku ich biosyntezy przez szczep (A) *Trichoderma arundinaceum*, (B) *T. brevicompactum*, (C) *Fusarium sporotrichioides*, oraz (D) *F. graminearum*. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów [47]

6. Metody molekularne oznaczania mykotoksyn

Wszystkie z stosowanych metod do analizy molekularnej, potencjalnie mykotoksynotwórczych szczepów grzybów strzępkowych oparte są na procedurze reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) DNA. Technika ta

została wynaleziona w 1985 roku przez Kary'ego Mullisa z kalifornijskiej firmy Cetus. Mullis, który za wynalezienie techniki PCR w roku 1993 otrzymał Nagrodę Nobla. Obecnie najczęściej do oznaczania możliwości biosyntezy mykotoksyn przez izolaty środowiskowe wykorzystywane są trzy następujące techniki: SCAR, RT-PCR oraz real-time PCR. W przypadku oznaczania szczepów grzybów potencjalnie zdolnych do produkcji mykotoksyn poszukuje się w genomie danego izolatu klastrów genów odpowiedzialnych za ich biosyntezę [14, 54].

6.1. SCAR

System markerowy SCAR – polimorfizm sekwencyjne charakteryzowanych regionów DNA pozwala na wiarygodną identyfikację genotypów. Startery wykorzystywane do analizy najczęściej uzyskiwane są z badań przeprowadzonych metodą RAPD [55].

System RAPD czyli losowo amplifikowanego polimorficznego DNA bazuje na reakcji PCR z zastosowaniem startera o przypadkowej sekwencji i długości 9-11 pz. Produkty amplifikacji DNA systemem RAPD rozdziela się na żelu agarozowym, a ich detekcja odbywa się z użyciem bromku etydyny [56, 57]. Zaletą przeprowadzenia wstępnej analizy tą metoda jest szybkość jej wykonania oraz większa wydajność w porównaniu do metody RFLP. System RAPD nie pozwala na dokładne określenie składu produktu amplifikacji, często okazuje się, iż w rzeczywistości dany fragment genomu może składać się z wspólnie migrujących w żelu poliakrylamidowym fragmentów DNA. Dlatego analizę najczęściej kontynuuje się poprzez zastosowanie systemu markerowego SCAR.

Przekształcenie markera RAPD w marker SCAR jest dosyć złożoną procedurą, która składa się z pięciu etapów: wycięcie prążka RAPD z żelu poliakrylamidowego, izolacji DNA, klonowaniu fragmentu DNA, ustalenie sekwencji oraz zaprojektowanie specyficznych starterów o długości 17-24 pz, dających tylko jeden produkt amplifikacji o długości równej wyjściowemu fragmentowi [14, 55].

Zastosowanie systemu markerowego SCAR w przypadku oznaczania grzybów strzępkowych potencjalnie toksynotówrczych pozwala na wykrycie określonych genów odpowiedzialnych za biosyntezę danej mykotoksyny [58, 59].

6.2. Real-time PCR

Reakcja real-time PCR stosowana jest do pomiaru ilościowego kopi genu i poziomu ekspresji RNA. Technika ta jest dużo bardziej dokładna od konwencjonalnej techniki PCR. Liczba kopi cząsteczek DNA w metodzie real-time PCR jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji.

W technice tej wynik analizy obrazuje się przy użyciu fluorescencji. Metodę real-time PCR można podzielić ze względu na sposób monitorowania na wykorzystujące – fluorescencyjny interkalujący barwnik np.: SYBR Green lub sekwencję specyficznej sondy nukleotydowej np.: HybProbes, Molecular Beacons i *Taq*Man [60-62].

6.2.1. SYBR Green

SYBR Green jest fluorochromem czyli barwnikiem emitującym światło tylko w przypadku związania do dwuniciowego DNA. Produktem reakcji PCR jest dominująca cząsteczka dsDNA obecna w mieszaninie reakcyjnej – sygnał z matrycowego DNA zostaje odjęty jako tło. Technika ta nie wymaga zastosowania skomplikowanej sondy, co znacznie obniża koszty, lecz jest bardziej podatna na błędy [61, 63].

6.2.2. HybProbes

Technika ta oparta jest na dwóch krótkich sondach komplementarnych do amplifikowanej sekwencji. Jedna z sond zawiera cząsteczkę fluorochromu związaną z jej końcem 3', a druga inną cząsteczkę fluorochromu związaną z jej końcem 5'. W cyklu reakcji PCR, na etapie hybrydyzacji znakowane sondy hybrydyzują do sekwencji komplementarnej. W obecności światła o odpowiedniej długości fali fluorochrom 3' zostaje wzbudzony i jego energię przechwytuje fluorochrom 5', który emituje światło o długości fali odpowiadającej jego parametrom. Pomiarowi poddaje się natężenie światła emitowanego przez fluorochrom 5'. Sytuacja taka zachodzi tylko gdy oba fluorochromy znajdują się bardzo blisko siebie na dupleksie DNA. Na etapie elongacji obie sondy są usuwane [60, 64]

6.2.3. Molecular Beacons

Z końcami pojedynczej sondy, która posiada sekwencje do siebie komplementarne i tworzy strukturę spinki do włosów związane są dwie cząsteczki. Jedna z nich jest fluorochromem, a druga wygaszaczem. W obecności światła o odpowiedniej długości fali fluorochrom na jednym końcu zostaje wzbudzony lecz nie emituje światła, gdyż wygaszacz przechwytuje jego energię. Na etapie hybrydyzacji sonda hybrydyzuje do sekwencji komplementarnej i fluorochrom zostaje oddalony od wygaszacza oraz emituje światło, którego natężenie jest monitorowane. Na etapie elongacji sonda jest usuwana z kompleksu i fluorescencja zanika [62].

6.2.4. *Taq*Man

Pojedyncza sonda posiada na obu końcach cząsteczki fluorochromów. Wielkość sondy umożliwia przekazywanie energii z jednego fluorochromu na drugi. Sonda taka jest degradowana przez polimerazę *Taq* posiadającą aktywność 5'-eksonukleazową na etapie elongacji. Rozdział obu cząsteczek umożliwia emisję światła fluorescencyjnego przez fluorochrom wzbudzany światłem o danej długości fali. Sonda *Taq*Man jest obecnie najczęściej stosowana w technice real-time PCR [61, 65].

6.3. RT-PCR

Reverse-transcription PCR technika oparta na wykorzystaniu odwrotnej transkryptazy pozwalającej na przemianę RNA w dsDNA. Metoda pozwala określić aktywności oraz funkcji poszczególnych genów [66]. Analiza jest możliwa poprzez detekcję mRNA danego transkrytpu genu. Stosowane jest również połączenie metod real-time PCR z RT-PCR. Real-time quantitative RT-PCR pozwala w czasie rzeczywistym określić aktywność i funkcje poszczególnych genów. Sposób monitorowana real-time quantitative RT-PCR jest identyczny jak w przypadku zwykłego real-time PCR, jednak najczęściej stosowane są: sonda *Taq*Man oraz SYBR Green [67].

Technika oparta na zastosowaniu enzymu odwrotnej transkryptazy pozwala lepiej zrozumieć szlak biosyntezy danych mykotoksyn oraz wyznaczyć geny newralgiczne – w momencie ich uszkodzenia lub braku synteza metabolitu jest niemożliwa. Metoda RT-PCR jest często wykorzystywana w celu określenie zdolności mykotoksycznych wybranych szczepów grzybów strzępkowych [14, 66].

Zastosowanie metod molekularnych w przypadku grzybów strzępkowych ma wiele zalet w tym wysoką wrażliwość wykonywanych analiz. Pozwala na szybką ocenę możliwości biosyntezy poszczególnych metabolitów. Zmniejsza pracochłonność analiz w porównaniu do innych metod. Umożliwia poznanie funkcji poszczególnych genów oraz pozwala na odtwarzania szlaków biosyntezy mykotoksyn. Podobnie jak wszystko metody molekularne posiadają również wady. Największą z nich bez wątpienia jest koszt ich wykonania, czy brak sekwencji części znanych oraz jeszcze nie poznanych mykotoksyn i gatunków grzybów strzępkowych powoduje spadek efektywności wykrywania potencjalnie szkodliwych metabolitów [68, 69]. Wykonując analizę molekularną często wykorzystuje się informacje zawarte w genetycznych bazach danych, niestety istniej możliwość iż ktoś popełnił błąd przy oznaczaniu danego gatunku. Problemy z właściwym przyporządkowaniem związane są przeważnie z oznaczanie danego gatunku na podstawie fragmentu sekwencji genetycznej, a nie pełnego genomu. Jednak wykorzystanie metod moleku-

larnych, mimo tych wada, wydaje się być jedną z obecnie najlepszych możliwości identyfikacji i oznaczania organizmów. [69]

7. Podsumowanie

Magazynowanie zbóż jest istotnym etapem produkcji w wielu branżach przemysłu spożywcego. W związku z tym zagrożenia występujące podczas przechowywania mogą pośrednio lub bezpośrednio wpływać na jakość produktów końcowych.

Jednym z najistotniejszych zagrożeń towarzyszących procesowi składowania zbóż są grzyby strzępkowe. Ich rozwój na powierzchni magazynowanego ziarna powoduje stary ekonomiczne związane ze zmniejszeniem masy składowanego surowca. Poza tym mogą one wytwarzać szkodliwe dla zdrowia i życia wtórne metabolity, w tym mykotoksyny, które nie ulegają degradacji podczas procesów produkcyjnych. Substancje te odkładają się w organizmach zarówno roślinnych jak i zwierzęcych, co powoduje iż konsumenci ostateczni są najbardziej narażeni na ich toksyczne działanie. Szczególne istotny problem stanowią tzw. zamaskowane mykotoksyny, które mogą występować w produktach roślinnych.

W celu zmniejszenia ilości mykotoksyn w produktach spożywczych należy ograniczyć możliwość rozwoju szczepów potencjalnie toksynotwórczych na początkowych etapach łańcucha produkcyjnego.

Oznaczenie grzybów strzępkowych potencjalnie zdolnych do wytwarzania mykotoksyn najczęściej wykonuje się poprzez zastosowanie metod molekularnych. W takich analizach oznacza się zarówno poszczególne geny jaki i kompleksy kodujące powstawanie mykotoksyn.

Techniki analizy molekularnej wykorzystane są również do poznania roli poszczególnych genów w produkcji mykotoksyn oraz odtwarzania ich szlaków metabolicznych. Okazuje się iż w przypadku uszkodzenia niektórych genów należących do kompleksów toksynotwórczych szczepy grzybów strzępkowych nie biosyntetyzują mykotoksyn.

Literatura

1. Kowieska A., Jaskowska I., Lipiński P. *Zawartość frakcji węglowodanowych i aminokwasów w ziarnie pszenicy wyprodukowanym w dwóch następujących po sobie latach,* Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica., 9 (4), (2010), s. 135-146
2. Wu F., Johnston L.J., Urriola P.E., Hilbrands A.M., Shurson G.C. *Evaluation of NE predictions and the impact of feeding maize distillers dried grains with solubles (DDGS) with variable NE content on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs*, Animal Feed Science and Technology., 215, (2016), s. 105-116
3. Kręcidło Ł., Krzyśko-Łupicka T. *Sensitivity of molds isolated from warehouses of food production*, Inż. Ekolog., 43, (2015), s. 100-108

4. Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra P.K., Dubey N.K. *Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene*, Food and Chemical Toxicology., 48 (6), (2010), s. 1734-1740
5. Robens J., Cardwell K. *The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States*, Journal of Toxicology: Toxin Reviews., 22 (2-3), (2003), s. 139-152
6. Rudziński R. *Zasady przechowywania i magazynowania towarów pochodzenia rolniczego*, Zeszyty Naukowe UNIWERSYTETU PRZYRODNICZO- Seria: Administracja i Zarządzanie, (88) (2011), s. 113-126
7. Zhu Y., Hassan Y.I., Watts C., Zhou T. *Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents*, Animal Feed Science and Technology, 2016
8. Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C. *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis*, Trends in Food Science & Technology., 36 (2), (2014), s. 96-136
9. Bryden W.L. *Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security*, Animal Feed Science and Technology., 173 (1-2), (2012), s. 134-158
10. Beszterda M., Waśkiewicz A. *Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu układu płciowego wywołane obecnością zearalenonu - mikotoksyny o działaniu estrogennym*, Medical Mycology., 18 (3), (2011), s. 140
11. Hymery N., Vasseur V., Coton M., Mounier J., Jany J.-L., Barbier G., Coton E. *Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety., 13 (4), (2014), s. 437-456
12. Wu F., Groopman J.D., Pestka J.J. *Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins*, Annu. Rev. Food Sci. Technol., 5 (1), (2014), s. 351-372
13. Cardoza R.E., Malmierca M.G., Hermosa M.R., Alexander N.J., McCormick S.P., Proctor R.H., Tijerino A.M., Rumbero A., Monte E., Gutierrez S. *Identification of Loci and Functional Characterization of Trichothecene Biosynthesis Genes in Filamentous Fungi of the Genus Trichoderma*, Applied and Environmental Microbiology., 77 (14), (2011), s. 4867-4877
14. Suchorzyñska M., Misiewicz A. *Mikotoksynotwórcze grzyby fito patogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie technikami PCR*, Postępy Mikrobiologii., 48 (3), (2009), s. 221-230
15. Prieto R., Yousibova G.L., Woloshuk C.P. *Identification of aflatoxin biosynthesis genes by genetic complementation in an Aspergillus flavus mutant lacking the aflatoxin gene cluster*, American Society for Microbiology., 62 (10), (1996), s. 3567-3571
16. Piegza M., Stempiniewicz R., Witkowska D. *Wpływ metabolitów* Geotrichum candidum *na wzrost* Fusarium, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość,., 3 (40), (2004), s. 175-183
17. Arroyo-Manzanares N., Huertas-Pérez J.F., Gámiz-Gracia L., García-Campaña A.M. *Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups*, Food Chemistry., 177, (2015), s. 274-279

18. St. Leger, R. J., Screen S.E., Shams-Pirzadeh B. *Lack of Host Specialization in Aspergillus flavus,* Applied and Environmental Microbiology., 66 (1), (2000), s. 320-324
19. Broda M., Grajek W. *Mikroflora ziaren zbóż i metody redukcji skażenia mikrobiologicznego*, Post. Nauk Rol. (2), (2009), s. 19-30
20. Pitt J.I. *Toxigenic fungi and mycotoxins,* British Medical Bulletin., 56 (1), (2000), s. 184-192
21. Grudny J., Wiatr E., Langfort R., Rudziński P., Orłowski T., Wesołowski S., Bestry I., Roszkowski-Śliż K. *Alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych rozpoznane przy pomocy otwartej biopsji płuca w materiale Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc,* Pneumologia i Alergologia (72), (2004), s. 78-84
22. Wiszniewska M., Walusiak J., Gutarowska B., Żakowska Z., Pułczyński C. *Grzyby pleśniowe w środowisku komunalnym i miejscu pracy – istotne zagrożenie zdrowotne,* Medycyna Pracy., 55 (3), (2004), s. 257-266
23. Mackiewicz B. *Study on exposure of pig farm Wolkers to bioarerosols immunologic reactivity and heal effects,* Annals of Agricultural and Environmental Medicine (5), (1998), s. 169-175
24. Stanisławczyk R., Rudy M., Świątek B. *Występowanie mikotoksyn w zbożach i przetworach zbożowych znajdujących się w placówkach handlowych województwa Podkarpackiego*, Żywność Nauka Technologia Jakość., 6 (73), (2010), s. 58-66
25. Pokrzywa P., Cieślik E., Topolska T. *Ocena zwartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość,., 3 (52), (2007), s. 139-146
26. Bonerba E., Ceci E., Conte R., Tantillo G. *Survey of the presence of patulin in fruit juices,* Food Additives and Contaminants: Part B., 3 (2), (2010), s. 114-119
27. Stoev S.D. *Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction,* Environmental Toxicology and Pharmacology., 39 (2), (2015), s. 794-809
28. Engelhardt G., Ruhland M., Wallnöfer P.R. *Metabolism of mycotoxins in plants,* Advances in food sciences., 21 (3-4), (1999), s. 71-78
29. Dellafiora L., Perotti A., Galaverna G., Buschini A., Dall'Asta C. *On the masked mycotoxin zearalenone-14-glucoside. Does the mask truly hide?,* Toxicon., 111, (2016), s. 139-142
30. Yu J., Chang P.-K., Ehrlich K.C., Cary J.W., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Payne G.A., Linz J.E., Woloshuk C.P., Bennett J.W. *Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis,* Applied and Environmental Microbiology., 70 (3), (2004), s. 1253-1262
31. Yu J. *Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination,* Toxins., 4 (12), (2012), s. 1024-1057
32. Yu J., Bhatnagar D., Cleveland T.E. *Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in Aspergillus parasiticus1,* FEBS Letters., 564 (1-2), (2004), s. 126-130
33. Geisen R., Schmidt-Heydt M., Karolewiez A. *A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes inPenicillium,* Mycotox Res., 22 (2), (2006), s. 134-141

34. Zhang X., Boesch-Saadatmandi C., Lou Y., Wolffram S., Huebbe P., Rimbach G. *Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells*, Genes Nutr., 4 (1), (2009), s. 41-48
35. Gil-Serna J., Vázquez C., González-Jaén M.T., Patiño B. *Clustered array of ochratoxin A biosynthetic genes in Aspergillus steynii and their expression patterns in permissive conditions*, International Journal of Food Microbiology., 214, (2015), s. 102-108
36. Bogs C., Battilani P.B., Geisen R. *Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing Penicillium species and its application to analyse the occurrence of Penicillium nordicum in cured meats*, International Journal of Food Microbiology., 107 (1), (2006), s. 39-47
37. Varga J., Due M., Frisvad J.C., Samson R.A. *Taxonomic revision of Aspergillus section Clavati based on molecular, morphological and physiological data*, Studies in Mycology., 59, (2007), s. 89-106
38. Puel O., Galtier P., Oswald I.P. *Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin*, Toxins., 2 (4), (2010), s. 613-631
39. Artigot M.P., Loiseau N., Laffitte J., Mas-Reguieg L., Tadrist S., Oswald I.P., Puel O. *Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in Aspergillus clavatus*, Microbiology., 155 (5), (2009), s. 1738-1747
40. Snini S.P., Tadrist S., Laffitte J., Jamin E.L., Oswald I.P., Puel O. *The gene PatG involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase*, International Journal of Food Microbiology., 171, (2014), s. 77-83
41. Tannous J., El Khoury R., Snini S.P., Lippi Y., El Khoury A., Atoui A., Lteif R., Oswald I.P., Puel O. *Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from Penicillium expansum*, International Journal of Food Microbiology., 189, (2014), s. 51-60
42. White S., O'Callaghan J., Dobson A.D. *Cloning and molecular characterization of Penicillium expansum genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis*, FEMS Microbiology Letters., 255 (1), (2006), s. 17-26
43. McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. *Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins*, Toxins., 3 (12), (2011), s. 802–814.
44. Bennett J.W., Klich M. *Mycotoxins*, Clinical Microbiology Reviews., 16 (3), (2003), s. 497-516
45. Mayer Z., Farber P., Geisen R. *Monitoring the Production of Aflatoxin B1 in Wheat by Measuring the Concentration of nor-1 mRNA*, Applied and Environmental Microbiology., 69 (2), (2003), s. 1154-1158
46. Edwards S.G., O'Callaghan J., Dobson A.D. *PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi*, Mycological Research., 106 (9), (2002), s. 1005-1025
47. Mousa W.K., Raizada M.N. *Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes*, Front. Plant Sci., 6 (68), (2015), s. 847

48. Quarta A., Mita G., Haidukowski M., Santino A., Mulè G., Visconti A. *Assessment of trichothecene chemotypes of Fusarium culmorum occurring in Europe*, Food Additives and Contaminants., 22 (4), (2005), s. 309-315
49. Ji L., Cao K., Hu T., Wang S. *Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol Chemotypes of Fusarium graminearum Isolates from China by PCR Assay*, J Phytopathol., 155 (7-8), (2007), s. 505-512
50. Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E. *A Genetic and Biochemical Approach to Study Trichothecene Diversity in Fusarium sporotrichioides and Fusarium graminearum*, Fungal Genetics and Biology., 32 (2), (2001), s. 121-133
51. Jennings P., Coates M.E., Turner J.A., Chandler E.A., Nicholson P. *Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of Fusarium culmorum isolates from England and Wales by PCR assay*, Plant Pathology., 53 (2), (2004), s. 182-190
52. Amarasinghe C., Wang J.-H., Liao Y.-C., Fernando W.D. *Difference in TRI13 Gene Sequences between the 3-Acetyldeoxynivalenol Producing Fusarium graminearum Chemotypes from Canada and China*, IJMS., 12 (12), (2011), s. 6164-6175
53. Quecine M.C., Araujo W.L., Marcon J., Gai C.S., Azevedo J.L., Pizzirani-Kleiner A.A. *Chitinolytic activity of endophytic Streptomyces and potential for biocontrol*, Letters in Applied Microbiology., 47 (6), (2008), s. 486-491
54. Savazzini F., Longa, Claudia Maria Oliveira, Pertot I., Gessler C. *Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent Trichoderma atroviride strain SC1 in soil*, Journal of Microbiological Methods., 73 (2), (2008), s. 185-194
55. Hermosa M.R., Grondona I., Díaz-Mínguez J.M., Iturriaga E.A., Monte E. *Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of Trichoderma atroviride 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens*, Current Genetics., 38 (6), (2001), s. 343-350
56. Govarthanan M. *Genetic variability among Coleus sp. studied by RAPD banding pattern analysis*, Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res., 2 (12), (2011).
57. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J., Tingey S.V. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, Nucl Acids Res., 18 (22), (1990), s. 6531-6535
58. Baturo-Ciesniewska A., Suchorzynska M. *Verification of the effectiveness of SCAR (sequence characterized amplified region) primers for the identification of Polish strains of Fusarium culmorum and their potential ability to produce B-trichothecenes and zearalenone*, International Journal of Food Microbiology, 148 (3), (2011), s. 168-176
59. Zhang J.-B., Li H.-P., Dang F.-J., Qu B., Xu Y.-B., Zhao C.-S., Liao Y.-C. *Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the Fusarium graminearum clade from China*, Mycological Research., 111 (8), (2007), s. 967-975
60. Chui L., Couturier M.R., Chiu T., Wang G., Olson A.B., McDonald R.R., Antonishyn N.A., Horsman G., Gilmour M.W. *Comparison of Shiga Toxin-*

Producing Escherichia coli Detection Methods Using Clinical Stool Samples, The Journal of Molecular Diagnostics., 12 (4), (2010), s. 469-475
61. Suarez M.B., Walsh K., Boonham N., O'Neill T., Pearson S., Barker I. *Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of Botrytis cinerea in planta*, Plant Physiology and Biochemistry., 43 (9), (2005), s. 890-899
62. Wong M.L., Medrano J.F. *Real-time PCR for mRNA quantitation*, Biotechniques., 39 (1), (2005), s. 75-85
63. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. *Export Download More… BioTechniques Volume 22, Issue 1, January 1997, Pages 130-138 Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*, Biotechniques., 22 (1), (1997), s. 130-138
64. Lim S.Y., Kim B.-J., Lee M.-K., Kim K. *Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of Mycobacterium species*, Lett Appl Microbiol., 46 (1), (2007), s. 101-106
65. Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*, Genome Research., 4 (6), (1995), s. 357-362
66. Bleve G., Rizzotti L., Dellaglio F., Torriani S. *Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products*, Applied and Environmental Microbiology., 69 (7), (2003), s. 4116-4122
67. Dobbie Z., Janovjak H., Miserez A., Muller P. *Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR*, Biotechniques., 32 (6), (2002), s. 2-7
68. Sulik-Tyszka B., Wróblewska M. *Przegląd metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych*, Journal of Laboratory Diagnostics., 51 (2), (2015), s. 147-152
69. Adamiak A., Otlewska O., Gutarowska B. *Współczesne metody stosowane w analizie biodeterioracji obiektów zabytkowych*, Kosmos., 64 (1), (2015), s. 57-69

Geny warunkujące produkcję mykotoksyn u grzybów strzępkowych obecnych w magazynach zbożowych

Streszczenie
Mykotoksyny stanowią jeden z największych problemów przemysłu rolno-spożywczego. Związki te oprócz działania toksycznego, wykazują właściwości kancerogenne, mutagenne, teratogenne oraz estrogenne. Zidentyfikowano już około 400 różnych mykotoksyn. Najczęściej produkowane są przez grzyby strzępkowe należące do rodzajów *Aspergillus, Penicillium, Fusarium*. Największym, wyzwaniem przy wykrywaniu tych związków stanowią tzw. zamaskowane mykotoksyny posiadające wiązanie glikozydowe, które powoduje, iż nie można wykryć ich obecności w paszach oraz produktach roślinnych.
Analiza molekularna jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod do stwierdzenia toksynotwórczości danego szczepu. Dzięki poznaniu roli poszczególnych genów w produkcji mykotoksyn można spróbować odtworzyć szlaki metaboliczne, w których substancje te są wytwarzane. Produkcja aflatoksyny B1, jednej z najniebezpieczniejszych dla człowieka mykotoksyn, zachodzi w szlaku enzymatycznym liczącym około 23 reakcje biochemiczne. Cząsteczki biorące udział w produkcji tej mykotoksyny kodowane są przez ok. 25 genów.
Obecnie najczęściej taki sposób oznaczenia potencjalnie groźnych szczepów prowadzi się dla grzybów z rodzaju *Fusarium*, u których poszukuje się np. genów z grupy *Tri* kodujących trichoteceny.
Celem pracy jest przedstawienie dotychczasowej wiedzy na temat genów warunkujących produkcję i wydzielanie mykotoksyn u grzybów magazynowych, a także przedstawienie sposobów identyfikacji grzybów potencjalnie toksynotwórczych.
Słowa kluczowe: grzyby strzępkowe, metody molekularne, mykotoksyny

Genes responsible for the production of mycotoxins in molds that are present in grain warehouses

Mycotoxins are one of the crucial issues in the agricultural -food industry. These compounds in addition to toxicity, exhibit carcinogenic, mutagenic, teratogenic, and estrogenic activity. Currently, there are approximately 400 different identified mycotoxins. Most mycotoxins are produced by molds belonging to the genera: Aspergillus, Penicillium, Fusarium.
Molecular analysis is one of the methods most frequently used to determine toxin-producing strains. By understanding the role of individual genes in the production of mycotoxins it should be possible to identify metabolic pathways in which these substances are produced. As an example: production of aflatoxin B1, one of the mycotoxins that are most dangerous to humans, is formed as a result of 23 biochemical reactions. Molecules involved in the production of these mycotoxins are encoded by 25 genes. Currently, molecular methods are also commonly used to indicate potentially dangerous strains of molds of the genus Fusarium. They can be identified by searching the genome of these molds for genes of the '*Tri*' group, which are encoding the trichothecenes.
The most pressing challenge for providing mycotoxin-free products, at this moment, is the detection of masked mycotoxins. The characteristic trait of the group is the presence of a glycosidic bond in its structure, which prevents the detection of those compounds in seeds and plant products with normal assays used for mycotoxin detection.
The aim of this paper was to present current knowledge on the genes responsible for the production and secretion of mycotoxins by storage molds and to show ways of identifying potential toxin-producing molds.
Keywords: filamentous fungi, molecular methods, mycotoxins

Robert Karpiński[1], Beata Górniak[2], Jakub Szabelski[3], Mirosław Szala[4]

Charakterystyka i podział materiałów szewnych

1. Wstęp

Nici znajdują obecnie zastosowanie w większości specjalistycznych dziedzin medycyny. Szwy wykorzystywane są do zbliżania brzegów ran powstałych w wyniku zamierzonych działań chirurga lub też na skutek wypadku.

Historia materiałów do zespalania tkanek jest więc nieodłącznie związana z historią chirurgii. Nici wykorzystywane są nie tylko do zespoleń skóry ale również tkanek i narządów wewnętrznych oraz naczyń krwionośnych. Obecnie nici zarówno resorbowalne jak i nie ulegające resorpcji w ustroju dostępne są w postaci monofilamentów, multifilamentów oraz pseudomonofilamentów. W niektórych przypadkach w celu zmniejszenia współczynnika tarcia i zwiększenia łatwości przenikania przez tkanki nici poddaje się procesowi powlekania. Nici resorbowalne tracą swoje wyjściowe właściwości mechaniczne aż do momentu całkowitego ich wchłonięcia, natomiast nieresorbowalne zachowują właściwości mechaniczne przez cały okres implantacji aż do ich usunięcia. W procesach biodegradacji i wchłaniania resorbowalnych szwów najważniejsze parametry to utrata masy szwu oraz początkowej siły podtrzymywania. Syntetyczne szwy wchłanialne ulegają resorpcji na drodze procesu hydrolizy. Dobór materiałów szewnych o niewłaściwych właściwościach mechanicznych może przekreślić cały wysiłek lekarza a przedwczesne rozejście się brzegów rany narazić zdrowie, niekiedy nawet życie pacjenta. Nić przez cały okres implantacji musi utrzymać odpowiedni poziom podtrzymywania tkankowego. W przypadku nici niewchłanianych spadek wytrzymałości na rozciąganie mogą doprowadzić do zerwania szwów podczas narastania obrzęku występującego po zabiegu lub dynamicznych ruchów pacjenta. Zbyt wczesna utrata wytrzymałości

[1] robert.karpinski1@onet.eu, Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Koło Naukowe Technologii Materiałów
[2] b_gorniak@onet.eu, Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Koło Naukowe „Informatyk”
[3] j.szabelski@pollub.pl , Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Instytut Technologicznych Systemów Informacyjnych
[4] m.szala@pollub.pl, Katedra Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

związana z procesami resorpcji materiału występująca przez zabliźnieniem rany doprowadzi do jej otwarcia. Zbyt niskie zdolności materiału do wydłużenia mogą sprawić, że zaaplikowana nić będzie zachowywała się jak nóż chirurgiczny i przecinała otaczające tkanki. Ważna jest również poręczność obejmująca, przenikania przez tkanki, łatwość wiązania i dociągania węzłów oraz ich stabilność.

2. Charakterystyka nici chirurgicznych

Tkanki uszkodzone podczas zabiegu chirurgicznego goją się tak samo jak każde inne. Pozostawienie rozległej rany chirurgicznej samej sobie tak jak często robione jest to w przypadku prostych skaleczeń, byłoby jednak niedopuszczalne. Znacząco wydłużyłoby czas gojenia, a w większości przypadków organizm mógłby nie poradzić sobie sam z tym procesem. Najważniejsze w zaopatrzeniu chirurgicznym jest hemostaza, aseptyka i delikatne preparowanie tkanek. Podstawowym zadaniem nici chirurgicznych jest zbliżenie oraz utrzymanie blisko siebie brzegów rany powstałej w wyniku urazu lub cięcia chirurgicznego bez miażdżenia tkanek. Szwy mają zapewnić wytrzymałość rany aż do czasu uzyskania niezależnego zrostu. Zbliżenie za pomocą nici ma też zminimalizować wielkość blizny [11, 16]. Rozejście brzegów rany pojawia się w sytuacji, gdy szwy nie są w stanie utrzymywać brzegów rany w odpowiedniej bliskości, zanim w tkance blizny wytworzyła się odpowiednia wytrzymałość. Nici wykorzystywane są także do podwiązywania naczyń krwionośnych oraz innych tkanek miękkich. Bardzo ważnym elementem w takich przypadkach jest nie tylko wytrzymałość zastosowanej nici ale też jej rozciągliwość. Niewłaściwy dobór grubości czy też rodzaju nici może skutkować zerwaniem lub rozwiązaniem szwów podczas np. dynamicznego ruchu, narastającego obrzęku czy też napięć mięśniowych. Sytuacje takie mogą prowadzić do ponownego samoczynnego otwarcia rany. Może to być związane z przedwczesnym spadkiem wytrzymałości założonego szwu, zbyt słaba wytrzymałością wyjściową szwów i węzłów lub przecięciem tkanki przez nici [16]. Jest to bardzo niebezpieczne dla zdrowia a niekiedy nawet życia pacjenta. Praktycznie każdy taki przypadek znacząco wydłuża czas hospitalizacji, a to prowadzi do wzrostu kosztów pobytu pacjenta w placówce służby zdrowia. Oprócz rozciągliwości oraz wytrzymałości na zrywanie ważne są cechy wpływające na łatwość użytkowania szwu: giętkość i łamliwość, poręczność, a także łatwość wiązania, zaciskania węzłów, gładkość lub szorstkość, strzępienie końców po obcięciu oraz właściwości elektrostatyczne materiału wpływające np. na to czy nić przykleja się do lateksowych rękawiczek. Wszystkie informacje na temat szwu muszą znajdować się na opakowaniu. Przykładowy schemat tabliczki

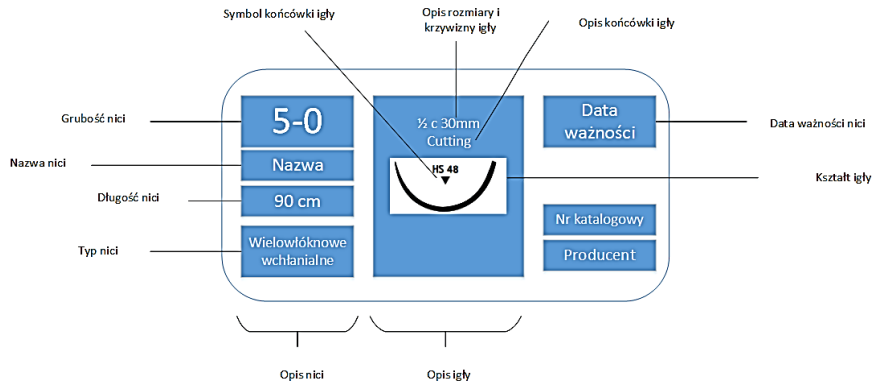
informacyjnej wraz z objaśnieniem pokazano na rys. 1. Odpowiedni dobór materiału ułatwi pracę lekarza odpowiedzialnego za zamknięcie rany [11].

Numeracja nici chirurgicznych oparta jest na systemie systemie klasyfikacji podanym po raz pierwszy w Farmakopei USA w 1937 roku z uwzględnieniem późniejszych modyfikacji [3]. Amerykański system został dostosowany do europejskich wymagań i ukazał się w Farmakopei Europejskiej (EP). Przykład takiej numeracji znajduje się w tab. 1.

Tab. 1 Porównanie rozmiarów szwów chirurgicznych wg standardów USP i EP

Rozmiar USP	Rozmiar EP	Średnica minimalna [mm]	Średnica maksymalna [mm]
12-0	0,01	0,001	0,009
11-0	0,1	0,01	0,019
10-0	0,2	0,02	0,029
9-0	0,3	0,03	0,039
8-0	0,4	0,04	0,049
7-0	0,5	0,05	0,069
6-0	0,7	0,07	0,099
5-0	1	0,1	0,149
4-0	1,5	0,15	0,199
3-0	2	0,2	0,249
2-0	3	0,3	0,339
0	3,5	0,35	0,399
1	4	0,4	0,499
2	5	0,5	0,599
3 i 4	6	0,6	0,699
5	7	0,7	0,799
6	8	0,8	0,899
7	9	0,9	0,999
8	10	1	1,099
9	11	1,1	1,199
10	12	1,2	1,299

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [16]



Rys. 1 Opis podstawowych informacji znajdujących się na opakowaniu nici chirurgicznej

Pomimo ogromnej ilości i różnorodności materiałów do zaopatrywania ran nie jest jeszcze dostępny szew idealny o następujących właściwościach [16]:

- może być użyty w każdej operacji;
- jest wygodny w wiązaniu;
- daje pewny węzeł;
- ma odpowiedną wytrzymałość na zrywanie (liniową i w węźle);
- łatwo penetruje tkanki;
- powoduje minimalną reakcję tkanek;
- jest dobrze widoczny w polu operacyjnym;
- nie przyczynia się do rozwoju zakażenia;
- nie strzępi się;
- nie kurczy się i nie ulega nadmiernemu rozciąganiu;
- jest niewłoskowaty, niealergiczny, nierakotwórczy i nieelektrolitowy;
- sterylizacja i przechowywanie nie zmieniają jego właściwości;
- ulega wchłonięciu po spełnieniu swojego zadania;
- jest niedrogi.

Przyjmuje się, że nici chirurgiczne powinny mieć charakter uniwersalny. Oznacza to, że muszą być wykonane z materiałów pozwalających na zastosowanie ich w zabiegach chirurgicznych. Nici powinny posiadać wysoką wytrzymałość na rozciąganie, stałe wymiary oraz strukturę ułatwiającą przenikanie przez tkanki oraz minimalizującą ich uszkodzenia podczas aplikacji. Nie powinny one przy tym wywoływać reakcji tkankowej. Powinny być elastyczne, gładkie w celu poprawienia jakości ich użytkowania. Ważną cechą jest łatwość dociągania węzła, który nie powinien powodować znacznego obniżenia właściwości mechanicznych nici. Węzeł powinien być mocny i trwały. Nici winny być odporne na infekcje i warunki środowiska, w którym zostały zaimplantowane, wykazywać optymalną absorpcję płynów ustrojowych oraz utrzymywać

oryginalne wymiary i kształt w kontakcie z tkankami [3-5, 9, 14, 15]. Porównanie wybranych cech wybranych nici chirurgicznych zostało przedstawione w tabeli 2.

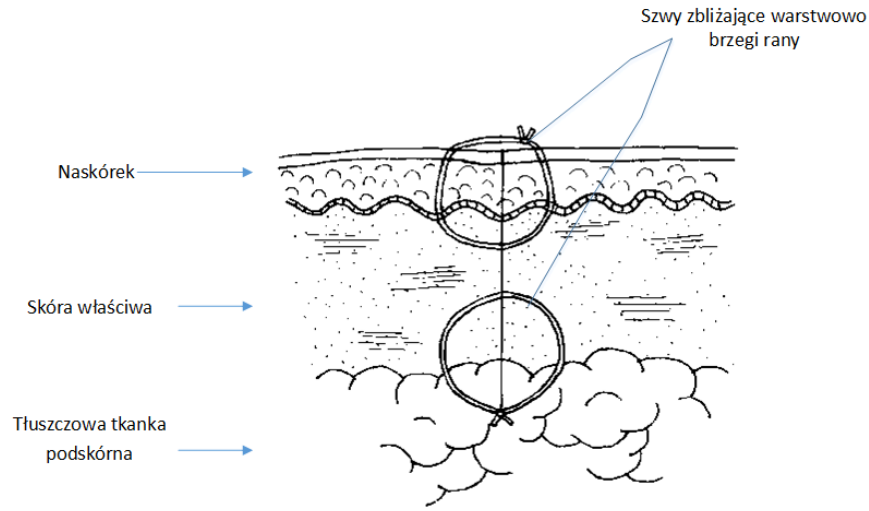
Tab.2 Charakterystyka wybranych nici chirurgicznych [13]

Cechy nici	Nici poliestrowe Mersilene	Nici lniane	Nici poliolefinowe Prolene, Dermalene oraz polietylenowe i polipropylenowe	Nici polibutestrowe		Nici teflonowe
				Novafil	Monolene	
Poręczność chirurgiczna	dobra	dobra	dobra	bardzo dobra	dobra	bardzo dobra
Pewność węzła	dobra	dobra	dobra	bardzo dobra	bardzo dobra	słaba
Toksyczność	brak	mała	brak	brak	brak	brak
Kapilarność	mała	duża	brak	brak	brak	brak
Odczyn tkanek	lekki	nasilony	lekki	minimalny	minimalny	lekki
Wytrzymałość mechaniczna w węźle	bardzo dobra	bardzo dobra	bardzo dobra	bardzo dobra	bardzo dobra	-

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [13]

Głębokie rany zamyka się warstwowo, zakładając na warstwy przenoszące największe obciążenia (powięź) i skórę właściwą szwy wchłanialne. Przekrój przez skórę z widocznymi szwami utrzymującymi brzegi rany w zbliżeniu został pokazany na rysunku 4.2. Skóra właściwa zbliżona celem nadania wytrzymałości, natomiast naskórek zbliżony w celu uszczelnienia rany i wyrównania powierzchni. Powierzchniowe rany (naskórek) zespalane są natomiast za pomocą szwów nieresorbowalnych najczęściej w postaci monofilamentu. Powierzchniowe szwy usuwane są w zależności od stanu rany. Jeśli skóra została zespolona prawidłowo to szwy naskórkowe mogą zostać usunięte już po kilku dniach od aplikacji. Jeżeli natomiast skóra została zespolona jednowarstwowo, odradza się usunięcie szwu przed 7-10 dniem od aplikacji. Szwy założone na tkanki

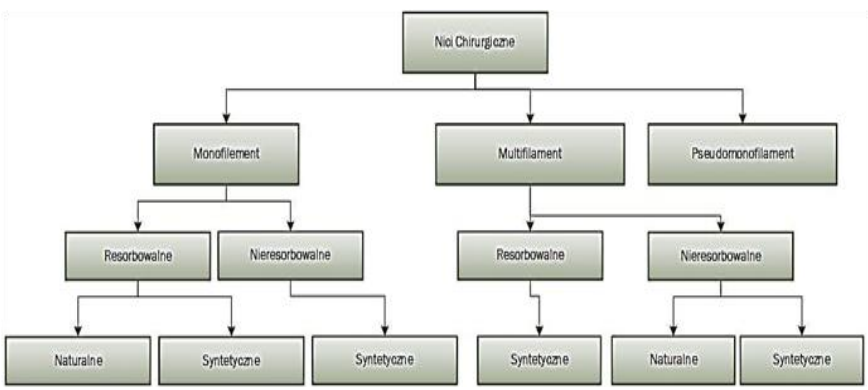
podskórne przyczyniają się jedynie do obumierania komórek tłuszczowych oraz wpływają na rozwój zakażenia [10].



Rys. 2 Przekrój przez skórę z widocznymi szwami zbliżającymi brzegi rany [17].

3. Podział nici chirurgicznych

Podział szwów chirurgicznych powinien uwzględniać pochodzenie materiału z jakiego zostały wykonane, wchłanialność lub niewchłanialność, biodegradację, budowę nici (pleciona, skręcona), strukturę nici mono-filamentowa, multifilamentowa lub w postaci pseudomonofilamentu. Podział nici chirurgicznych został pokazany na rysunku 3.



Rys.3 Podział nici chirurgicznych

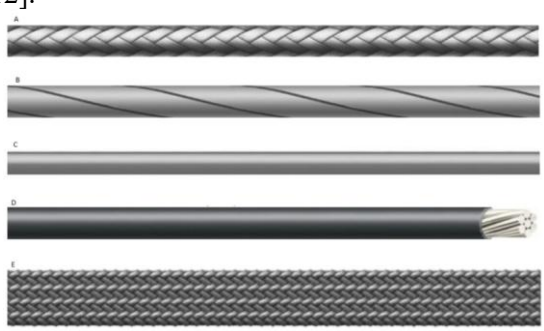
Nici chirurgiczne można sklasyfikować pod względem pochodzenia biomateriału. Wyróżnia się nici [1, 5, 16]:

- roślinne (np. lniane lub bawełniane);
- zwierzęce (np. jedwabne, kolagenowe lub katgutowe);
- z tkanek ludzkich (np. autogenne lub homogenne);
- z tworzyw metalicznych (np. stalowe lub srebrne);
- polimerowe (np. poliamidowe, polipropylenowe lub teflonowe).

Nici chirurgiczne mogą być sklasyfikowane pod względem postaci na [5]:

- skręcane (np. lniane lub bawełniane);
- splatane (np. jedwabne lub poliestrowe);
- powlekane (np. poliamidowe);
- impregnowane (np. teflonowane).

Pod względem struktury nici mogą być sklasyfikowane w 3 grupach monofilamentów, multifilamentów oraz grupie będącej połączeniem dwóch poprzednich czyli pseudomonofilamentów (nici plecione pokrywane monofilamentową powłoką). Nici mogą być produkowane z przędzy wielowłoknistej, którą skręca się lub splata, a także w postaci włókien pojedynczych. Struktury nici chirurgicznych zostały pokazane na rysunku 4. Nici w postaci plecionek, są mniej sztywne w porównaniu do monofilamentów, posiadają także wyższą wytrzymałość na rozciąganie i łatwiej wiązać na nich węzły. Posiadają jednak wyższy współczynnik tarcia co wpływa na utrudnienie przenikania przez tkanki oraz większe uszkodzenia ich podczas aplikacji, wykazują także większą zdolność absorpcji cieczy i ulegają inwazji bakteryjnej co wpływa na częstość występowania infekcji i zakażeń. Nie powinny być stosowane tam gdzie przewidywany jest duży wysięk z rany ponieważ mogą one wpływać na rozprzestrzenianie się zakażenia [3, 12].



Rys. 4 Struktury nici chirurgicznych: A – multifilament, B – nici skręcane, C – monofilament, D – pseudomonofilament, E – taśma pleciona [18]

Nici w postaci monofilamentów zdecydowanie łatwiej przenikają przez tkanki podczas szycia, jednak są o wiele bardziej podatne na rozciąganie, szczególnie podczas procesu dociągania węzłów, a same węzły ze względu na niższy współczynnik tarcia w porównaniu z plecionkami są bardziej

podatne na rozwiązanie. Są również bardziej wrażliwe na zmiażdżenie i uszkodzenia mechaniczne [3, 6]. Wraz ze wzrostem średnicy monofilamentu wzrasta też sztywność i trudność wiązania a także trudność utrzymania węzła.

W celu uzyskania nici o jak najlepszych właściwościach mechanicznych zastosowano połączenie monofilamentu oraz multifilamentu. W efekcie powstał pseudomonofilament. Nić łącząca właściwości dwóch wcześniej wymienionych grup, jest atraumatyczna, łatwo przenika przez tkanki, jest bardziej wytrzymała, mniej podatna na rozciąganie w porównaniu do klasycznych monofilamentów dzięki wewnętrznej plecionej strukturze. Gładka jednolita powierzchnia i brak właściwości absorbcji płynów ustrojowych ogranicza liczbę drobnoustrojów zmniejszając tym samym reakcję tkankową i ilość powikłań po aplikacji.

Wymienione wyżej przykłady klasyfikacji nici chirurgicznych odgrywają znaczącą rolę w wyborze odpowiedniego materiału do konkretnego zabiegu jednak z praktycznego punku widzenia to podział szwów ze względu na trwałość w środowisku tkanek obejmujący szwy wchłanialne i niewchłanialne jest najistotniejszy.

4. Szwy wchłaniane

Materiały resorbowalne to takie, które w określonym czasie od wprowadzenia do organizmu tracą odporność na rozciąganie. Po aplikacji szwu rozpoczyna się proces jego rozpadu, za który odpowiadają różne reakcje enzymatyczne. Potocznie używa się pojęcia rozpadu enzymatycznego dla grupy szwów białkowych na przykład katgutu, natomiast szwy syntetyczne ulegają rozpadowi w reakcji hydrolizy. Katgut zatem jest traktowany przez organizm jak każde inne obcogatunkowe białko. Proces rozkładu rozpoczyna się już w kilka dni po wszczepieniu, a kończy po 15-20 tygodniach. Warto dodać, że proces hydrolizy także odbywa się przy pomocy enzymów z grupy estraz [16]. Resorbowalne szwy chirurgiczne możemy podzielić jeszcze ze względu na czas, w którym nić zachowuje zdolność podtrzymywania tkankowego na te o krótkim, średnim, długim lub ekstremalnie długim okresie podtrzymywania (tab.3).

Tab. 3 podział szwów ze względu na okres podtrzymywania tkankowego

Okres wchłaniania	50% początkowej siły podtrzymywania	Całkowita absorpcja
Krótki	5-7 dni	6-8 tygodni
Średni	2-3 tygodnie	9-13 tygodni
Długi	4-5 tygodni	26-30 tygodni
Ekstremalnie długi	13 tygodni	ok. 56 tygodni

Przykładem resorbowalnych nici o krótkim okresie resorpcji w ustroju są nici Safil Quick+ rozkładane na drodze hydrolizy. Wytrzymałość na rozciąganie po 5 dniach od aplikacji w ustroju wynosi około 50% wartości początkowej siły podtrzymywania. Całkowita resorpcja następuje między 42 a 56 dniem od implantacji. Do grupy nici o średnim czasie resorpcji należy Dexon. Jest to syntetyczna plecionka której czas wchłaniania wynosi od 60-90 dni. Wartość siły podtrzymywania po 2 tygodniach wynosi około 65% wartości początkowej natomiast po 3 tygodniach jest tylko około 35%. Przykładem nici ulegającej hydrolizie o długim okresie resorpcji jest nić Maxon, rozpada się ona do dwutlenku węgla, kwasu β-hydroksy-masłowego oraz kwasu glikolowego. W tym przypadku proces ten rozpoczyna się ok. 60 dnia po operacji natomiast całkowita resorpcja następuje po około 180 dniach od aplikacji w ustroju. Przez pierwsze 28 dni szew nie zmienia swoich własności mechanicznych później następuję stopniowa utrata wytrzymałości aż do całkowitego rozpadu. Do nici o ekstremalnie długim okresie wchłaniania należy MonoMax. Jest to monofilamentowy szew wykonany z kwasu poli-4-hydrksybutyratowego. Jego zalecane zastosowane to zespolenia jamy brzusznej. Zapewnia on bezpieczeństwo podczas krytycznej fazy gojenia się jamy brzusznej, utrzymując aż 50% początkowej siły podtrzymywania po 90 dniach. Całkowita absorpcja masy szwu wynosi około 13 miesięcy [7, 8].

Ważne jest różnicowanie między czasem, który jest potrzebny aby nić uległa wchłonięciu, a czasem po którym nic zaczyna tracić swoje właściwości mechaniczne. Najważniejszą cechą przy doborze nici rozpuszczalnych jest właśnie czas po którym nici tracą swoją wytrzymałość [16].

4.1. Resorbowalne szwy pochodzenia organicznego

Katgut – materiał wchłanialny produkowany z warstwy podśluzowej jelit zwierzęcych, zazwyczaj z odcinka pierwszych 5-7 metrów licząc od strony żołądka. Zbudowany jest od 95 do nawet 99% z czystego kolagenu. Na jakość pozyskanego materiału wpływają takie czynniki jak wiek i sposób hodowli zwierzęcia, ale głównie pasze i odpowiednie zawartości składników mineralnych. Resorpcja następuje na drodze rozpadu enzymatycznego. Szybkość wchłaniania nici z katgutu zależy od siły i stopnia skręcenia, im mocniej skręcona tym wchłanianie jest wolniejsze. Jej szybkość jest uzależniona również od grubości aplikowanej nici oraz od tego czy katgut był chromowany. Dużą zaletą stosowania tego materiału jest możliwość jego użycia nawet w zainfekowanych ranach. Do wad zaliczamy trudny do kontrolowania i zmienny czas wchłaniania, prawdopodobieństwo działania antygenowego oraz podtrzymywanie zakażenia w ranie. Obecnie katgut nie jest już stosowany. Przykładem produktu handlowego jest Softcat wytwarzany przez firmę B. Braun [2, 16].

Nici kolagenowe – powstały w wyniku ewolucji szwów wykonanych z tradycyjnego katgutu posiadającego wiele wad. Otrzymywane z kolagenu

zwierzęcego, rozpraszanego, a następnie wytłaczanego i formowanego we włókna. Proces resorpcji był bardzo zbliżony do procesu wchłaniania katgutu [2, 16].

4.2. Resorbowalne szwy pochodzenia syntetycznego

Kwas poliglikolowy – jest to materiał o przełomowym znaczeniu dla grupy wchłanialnych nici chirurgicznych ze względu na to, że z niego wykonany został pierwszy syntetyczny szew. Ulega on wchłonięciu na drodze hydrolizy całkowita absorbcja następuje między 100 a 120 dniem od implantacji. Traci około 33% wartości wyjściowej w ciągu pierwszych 7 dni, a około 80 % w ciągu 14 dni od implantacji. Podczas resorpcji nici występuje minimalny odczyn tkankowy. Czas wchłonięcia w małym stopniu zależy od różnego rodzaju czynników tkankowych dlatego jest powszechnie stosowany zarówno w ranach czystych jak też zanieczyszczonych. W porównaniu do szwów wykonanych z katgutu, szwy z kwasu poliglikolowego posiadają większą wytrzymałość na rozciąganie i są łatwiejsze w obsłudze. Do wad zaliczamy zdecydowane osłabienie struktury w węźle i słabą stabilność w środowisku zasadowym [2, 16].

Polidwuoksan – wartość siły podtrzymywania tkankowego po 14 dniach od implantacji wynosi około 70%, po miesiącu jest to 50% natomiast po 56 dniach około 15 % siły początkowej. Ulega rozpadowi na drodze hydrolizy do dwutlenku węgla oraz wody. Czas całkowitego wchłonięcia szwu wynosi 6-7 miesięcy. Szwy wykonane z tego materiału mają niestrzępiące się końcówki, łatwo przenikają przez tkanki i łatwo wiąże się na nich węzły. Wadą szwów z polidwuoksanu jest wysoka sztywność utrudniająca obsługę [2, 16].

5. Szwy niewchłaniane

Nieresorbowalne nici chirurgiczne stosowane są do zespoleń ran powierzchownych, zazwyczaj stosowane są do szycia naskórka. Najważniejszą ich cechą jest utrzymywanie własności mechanicznych przez okres ponad 60 dni od implantacji. Szwy zdejmuje się po różnym czasie od implantacji. Długość utrzymania szwów zależy od czynników takich jak: wiek pacjenta, lokalizacja rany, napięcie otaczających tkanek, występowanie obrzęku i stanu zapalnego oraz jakość procesu gojenia. Zbyt długie pozostawienie szwów w tkankach może powodować wzmocnienie efektu drabinkowania zwiększa też ryzyko wystąpienia bliznowca, czyli nadmiernie rozrośniętej blizny. Przy usuwaniu szwu chwyta się pęsetą za jeden z jego końców, a następnie przecina nożyczkami węzeł i wyciąga nitkę.

Podobnie jak w przypadku nici resorbowalnych nici nieresorbowalne pod względem pochodzenia możemy podzielić na dwie grupy: pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego.

5.1. Niewchłanialne nici chirurgiczne pochodzenia syntetycznego

Poliester – szwy z poliestru występują w postaci multifilamentów zarówno zwykłych jak i powlekanych. Powłoki wykonywane są na przykład z silikonów lub teflonu i mają zmniejszyć współczynnik tarcia i ułatwić przenikanie szwu przez tkanki oraz zmniejszyć jego kapilarność. Szew wykonany z tego materiału jest jednym z najwytrzymalszych dostępnych niemetalicznych szwów i praktycznie nie traci właściwości po aplikacji w ustroju. Nici poliestrowe doskonale nadają się do użycia w przypadkach gdy proces gojenia przebiega powoli i niezbędne jest długotrwałe wsparcie ze strony nici. Głównymi wadami jest niska stabilność węzła, wysoki współczynnik tarcia nici niepoleczonej i wywoływanie reakcji tkankowej szczególnie w zanieczyszczonym środowisku [2, 16].

Poliamid – szwy z poliamidu występują zarówno w postaci mono jaki i multifilamentów. Po wszczepieniu monofilamenty wykonane z poliamidu po około 2 latach tracą 30% swojej początkowej wytrzymałości ze względu na procesy chemicznego rozpadu. Multifilamenty tracą praktycznie całą swoją wytrzymałość na rozciąganie po około 6 miesiącach w ustroju. Główne wady do słabe właściwości prowadzenia nici oraz niska stabilność węzła [2].

Polipropylen – szwy z tego materiału dostępne są przeważnie w postaci monofilamentu. Sam materiał jest syntetyzowany z poliolefinowych tworzyw sztucznych. Nić nie traci wytrzymałości na rozciąganie po implantacji i cechuje się wysokim poziomem bezpieczeństwa węzła. Nici wykonane z polipropylenu najczęściej wykorzystywane są do zespoleń skóry. Wartość wytrzymałości na rozciąganie jest niższa w porównaniu do reszty niemetalicznych materiałów wykorzystywanych do produkcji nici chirurgicznych [2, 16].

Literatura

1. Casey D.J., Lewis O.G. *Absorbable and nonabsorbable sutures*, [in:] A.F. von Recum (ed.) Handbook of biomaterials. Scientific and clinical testing of implat materials, Macmillan, New York 1986
2. Chellamani K.P., Veerasubramanian D. and Vignesh Balaji R.S. *Surgical Sutures: An overview* The South India Textile Research Association
3. Gogolewski S. *Biomateriały polimerowe*, [w:] M. Nałęcz (red.): Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, t. 4. Biomateriały. Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003
4. Kuś H., Kędra H. *Biomateriały do zespalania tkanek,* [w:] M. Nałęcz (red.): Problemy Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, t. 4. Biomateriały. Wyd. Komunikacji i Łączności, Warszawa 1990, s. 230-246
5. Marciniak J. *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2013, s. 405-408
6. Marturello, D.M., McFadden, M.S., Bennett, R.A., Ragetly, G.R., Horn, G., 2014. *Knot security and tensile strength of suture materials.* Vet. Surg. 43 (1), s. 73-79

7. Murawski M., Staniszewska-Kuś J., Rutowski R. *Ocena nici chirurgicznych o długim okresie resorpcji w zespoleniach jajowodowych z zastosowaniem technik mikrochirurgicznych. Badania eksperymentalne*
8. Murawski M., Staniszewska-Kuś J., Rutowski R, *Ocena nici chirurgicznych o krótkim okresie resorpcji w zespoleniach jajowodowych z zastosowaniem technik mikrochirurgicznych. Badania eksperymentalne*
9. Rodetheaver G.T., Borzelleca, D.C., Tacker J.G., Edlich R.F. *Unique performance characteristics of Novafil®.* Surg. Gynecol. Obstet. 164, 1987, s. 230-236
10. Rowiński W. (red.) *Chirurgia ogólna*. Wyd. Urban & Partner, Wrocław 1998
11. Snyder C.C. *On the history of suture*. Bull Hist Dent, 25 (1977), s. 79-84
12. Solski L. *Szyć! Ale czym?* Wiedza i życie, 5 (2000)
13. Szlezyngier W., Brzozowski Z.K. *Tworzywa sztuczne. T. 3. Środki pomocnicze i specjalne zastosowania polimerów*, Wyd. Oświatowe Fosze, Rzeszów 2012
14. Thacker J.F., Rodetheaver G.T., Moore J.W., Kauzlarich J.J., Kurtz L., Edgerton M.T., Edlich R.F. *Mechanical performance of surgical sutures,* Am. J. Surg. 130, 1975, s. 347-380
15. Thacker J.G. Rodetheaver G., Kurtz L., Edgerton M.T., Edlich R.F. *Mechanical performance of sutures in surgery*. Am. J. Surg. 133, 1977
16. Zapalski S., Chęciński P. *Szwy chirurgiczne: wybrane problemy*. Front Cover., Alfa-Medica Press, 1999
17. http://img.mp.pl/articles/www/inne_publikacje/plastyka03_rys01a.gif
18. http://www.struna.edu.pl/pub/user/4979/projects/656/kurs_szycia.pdf

Charakterystyka i podział materiałów szewnych

Streszczenie
Praca stanowi przegląd literatury poruszającej tematykę współcześnie stosowane materiały służące do zespalania tkanek uszkodzonych na skutek wypadku bądź w wyniku celowego działania chirurga. Opisano szczegółową klasyfikację nici chirurgicznych ze względu na pochodzenie biomateriału, strukture nici, a także ze względu na czas resorpcji w ustroju.
Słowa kluczowe: nici chirurgiczne, biomateriały

Characteristics and division of surgical suture

Abstract
This work is a review of the literature covering the subjects of the materials used nowadays for the fusion of tissues damaged by accident or as a result of deliberate action by the surgeon. The review describes detailed classification of surgical sutures based on the origin of the biomaterial, the structure of the suture, and the time needed for resorption in the body.
Keywords: surgical sutures, biomaterials

Robert Karpiński[1], Beata Górniak[2], Jakub Szabelski[3], Mirosław Szala[4]

Historia chirurgii i materiałów szewnych

1. Wstęp

Nici stosowane są w praktycznie każdej dziedzinie medycyny. Zespalanie ran jest powszechną procedurą kończącą większość zabiegów chirurgicznych. Najczęściej wykorzystywane są do łączenia brzegów uszkodzonych przez chirurga lub na skutek wypadku tkanek. Znajdują zastosowanie podczas zespoleń skóry, tkanki mięśniowej, jelit naczyń krwionośnych, a nawet soczewki oka. Ze względu na szeroki zakres zastosowań wymagania stawiane obecnie materiałom szewnym są niezwykle rozbudowane. Idealna nić powinna być nietoksyczna, niedrażniąca oraz poręczna. Dla chirurga musi także cechować się odpowiednimi właściwościami wytrzymałościowymi. Obecnie proces wytwarzania materiałów do zespalania tkanek jest doskonale opanowany. Wytworzenie materiału o pożądanych właściwościach nie stanowi najmniejszego problemu. Jest to efektem doświadczeń zdobytych przez ludzkość na przestrzeni tysiącleci, a w szczególności ostatnich 60 lat, w których to nastąpił gwałtowny rozwój inżynierii materiałowej [18].

2. Historia materiałów szewnych

Opisanie historii samych materiałów szewnych jest praktycznie niemożliwe, bez poruszenia genezy zabiegów chirurgicznych. Ponieważ tematy te stanowią jedną nierozłączną całość, pominiecie któregokolwiek z nich stanowiłoby poważne wypaczenie. Pod pojęciem materiałów szewnych znajdują się zarówno same nici chirurgiczne jak również specjalistyczne podwiązki wykorzystywane do podwiązywania żył i tętnic.

Nie znana jest dokładna data ani miejsce pierwszego zabiegu chirurgicznego, w którym świadomie wykorzystano dostępne materiały do

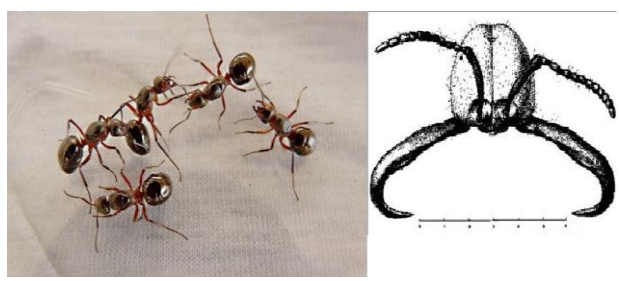
[1] robert.karpinski1@onet.eu, Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Koło Naukowe Technologii Materiałów
[2] b_gorniak@onet.eu, Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Koło Naukowe „Informatyk”
[3] j.szabelski@pollub.pl , Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, Instytut Technologicznych Systemów Informacyjnych
[4] m.szala@pollub.pl, Katedra Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

zbliżenia brzegów rany. Bez wątpienia musiało mieć to miejsce w czasach kiedy nasi praprzodkowie zamieszkiwali jaskinie. Dowodem na rozwój chirurgii już w okresie neolitu są pochodzące z tego okresu czaszki noszące ślady zabiegów z powodzeniem przeprowadzonej trepanacji. Widoczne zrosty kostne świadczą o tym, że pacjent żył przez dłuższy okres od przeprowadzonego zabiegu. Analiza znalezionych szczątków daje pewne wskazówki dotyczące początków chirurgii. Indianie zamieszkujący tereny Ameryki Południowej przeprowadzali zabiegi kauteryzacji polegające na termicznym lub chemicznym koagulowaniu żywej patologicznie zmienionej tkanki. Zabieg ten miał na celu przyspieszenie gojenia ran ziarninujących, zamknięcia naczyń krwionośnych w obrębie rany i usunięcia nadmiaru obumarłych tkanek. Starożytni Egipcjanie natomiast zszywali rany za pomocą materiałów takich jak włókna roślinne (konopie, len, bawełna), ścięgna, włosy oraz nici wykonane z wełny. Wszystkie te materiały zostały znalezione w zmumifikowanych szczątkach. Plemiona zamieszkujące wschodnią Afrykę do podwiązywania uszkodzonych naczyń używały zaś ścięgien zwierzęcych, a do zbliżania brzegów rany kolców akacji i prymitywnych materiałów zrobionych z dostępnej roślinności. Umiejętności praktyczne doskonalone były na tykwach i melonach oraz skórach zwierzęcych [12, 17, 21].

Rys. 1 Igły z uchem wykonane z kości pochodzące z okresu paleolitu [22]

Pierwsze wzmianki dotyczące prymitywnych narzędzi chirurgicznych w postaci igieł z uchem zaprezentowanych na rys. 1 pochodzą z okresu pomiędzy 50 000 and 30 000 lat p.n.e. natomiast powstanie igieł wykonanych z kości datowane jest na około 20 000 lat p.n.e. Warto podkreślić, że igły te były niezrównanym standardem aż do epoki renesansu. Cywilizacje Mezopotamii oraz Indii regularnie kontaktowały się i wymieniały osiągnięciami z różnych dziedzin życia – między innymi medycyny. Pierwszym znanym dokumentem opisującym szwy i techniki szycia jest *Samhita,* autorstwa indyjskiego chirurga Susruta powstała około

500 r. p.n.e. [13, 15]. W swoim dziele zalecał on przepłukiwanie ran a następnie zbliżanie ich brzegów z wykorzystaniem dużych czarnych mrówek pokazanych na rys. 2. Ich szczęki pozostawiano w ranie po zbliżeniu jej krawędzi a resztę ciała ukręcano. Szczęki owadów skutecznie zamykały ranę działając podobnie do stosowanych obecnie klipsów. Technika ta stosowana była również przez ludy zamieszkujące Amerykę Południową [13, 16]. Susruta opisał także wykorzystanie cięciwy łuku wykonanej z górnej części owczego jelita cienkiego do zszywania ran po zabiegach korekcji nosa oraz usunięcia migdałków. Katgut produkowany jest z jelit zwierząt roślinożernych a jego najważniejszą cechą jest resorbowalność (chociaż fakt ten odkryty został dopiero w XVIII wieku). W tamtych czasach materiał ten był łatwo dostępny dzięki muzykom, którzy wykorzystywali go jako struny do instrumentów [12, 15]. Powszechnie przeprowadzane były zabiegi usuwania niedrożności jelit. Polegały one na otwarciu jelita, usunięciu niedrożności, a następnie przepłukaniu go mlekiem oraz smarowaniu masłem przed zamknięciem z wykorzystaniem mrówek. Do wykonania wyżej opisanych zabiegów wykorzystywano około 125 różnorodnych narzędzi takich jak trójkątne, zakrzywione, okrągłe i proste igły chirurgiczne. Najszybszy rozwój chirurgii nastąpił w Indiach. Prace tamtejszych lekarzy ustanowiły fundamenty dla późniejszego rozwoju tej dziedziny w kulturach Egiptu, Babilonu, Grecji oraz państw Bliskiego Wschodu [12].



Rys.2 Mrówki bengalskie wykorzystywane do zamykania ran [23]

Amerykański egiptolog Edwin Smith odkrył w 1852 roku egipski papirus zawierający informacje dotyczące wiedzy medycznej, datowany na około 1600 r. p.n.e. Papirus nazwany później na cześć jego odkrywcy miał ponad 4,5 m długości i zawierał ponad 500 linijek tekstu oraz 48 obrazów dotyczących sposobów leczenia urazów. Jest to najstarszy tekst chirurgiczny w historii naszej cywilizacji i prawdopodobnie pierwsza próba kodyfikacji wiedzy i doświadczeń zdobytych przez poprzednie pokolenia. Informacje dotyczące szwów i metod zespalania ran zostały opisane na wielu spośród 48 opisanych przypadków [2, 9, 12, 13].

Egipcjanie nigdy nie osiągnęli poziomu chirurgii występującego w Indiach. Jednak to właśnie oni zainicjowali gwałtowny rozwój tej dziedziny zwłaszcza w Starożytnej Grecji. Wzrost zainteresowania chirurgią w tym kraju przyszedł w okresie złotego wieku kiedy to nastąpił rozdział religii i medycyny. Około 460 roku na świat przyszedł Hipokrates. Wraz ze swymi uczniami przywrócił medyczne zainteresowania i nauczanie. Przyczynił się oni do rozwoju chirurgii, a także medycznych aspektów tej dziedziny. Jego prace nie zawierały zbyt wielu informacji o przeprowadzanych zabiegach jednak wiadomo, że nauczanie opierał na pełnym wykorzystaniu sił natury. Zalecał i podkreślał ważność zamykania ran otwartych, podwiązywanie krwawiących naczyń oraz stosowanie opatrunków uciskowych. Jego główny wkład to opisy kilku zabiegów, które oparte były w większym stopniu o tradycję niż racjonalne podejście. W okresie tym królowała zasada:

„Czego nie uleczą leki, to uleczy nóż;
czego nie uleczy nóż to uleczy ogień;
ale czego nie uleczy ogień,
to należy uznać nieuleczalnym”.

Punkt kulminacyjny rozwoju medycyny greckiej przypadł na pierwszy wiek naszej ery [13, 21].

Nieco później zasłynął wybitny rzymski znawca sztuki medycznej, encyklopedysta i nauczyciel Aurelius Cornelius Celsus. W jednym ze swoich dzieł *De Re Medicina* stworzonym ok. 30 r. n.e. opisał zastosowanie plecionych szwów chirurgicznych. W jego pracach znajdują się informacje o tym, że szwy powinny być możliwie miękkie i nie powinny być zbyt mocno skręcone. Opisał również małe metalowe klipsy do zespoleń podobne do tych stosowanych współcześnie. Celus opisał cztery podstawowe objawy infekcji występujące po zespoleniu rany. Przypisuje się mu także udokumentowanie podwiązywania uszkodzonych naczyń krwionośnych [6, 12].

Późniejsze wzmianki o zastosowaniu materiałów do zespoleń tkanek pojawiły się w pracach Galena z Pergamonu (129-200), który jako pierwszy opisał wykorzystanie materiału z jelit do łączenia przerwanych ścięgien gladiatorów dając im szanse na przynajmniej częściowy powrót do sprawności. W swoich pracach zwraca uwagę na problemy gnicia materiału, z którego zrobione są nici i zaleca stosowanie materiałów w jak najmniejszym stopniu podlegającym procesom gnicia np. jedwabiu. Jeśli natomiast materiałów takich nie można było dostać na danym terenie, zalecał stosowanie do szycia katgutu. Galen podobnie jak Celsus i Hipokrates rekomendował dokładne oczyszczenie rany i przepłukanie jej winem, a następnie jej zamknięcie przy pomocy szwów [1, 12, 13].

W VIII wieku standardowym zabiegiem było wypalanie rany. Miało ono na celu zmniejszenie krwawienia poprzez zamknięcie mniejszych naczyń krwionośnych. Zabieg wykonywany był przy użyciu gorącego oleju. Proces ten często jednak powodował poważne uszkodzenia tkanek otaczających ranę.

O zastosowaniach nici z tego okresu dowiadujemy się jeszcze z opracowań kilku lekarzy. Jednym z nich był Rhazes, który przyszedł na świat w roku 852 w pobliżu Teheranu. Początkowe lata swojego życia pracował jako muzyk i dość późno rozpoczął działania związane z medycyną. Kontynuował on zespalanie ran za pomocą katgutu. Stosował on również szwy wykonane z włosia końskiego, a prezentowane przez niego metody wykorzystywane były przez następne stulecia [8].

Kolejnym lekarzem odgrywającym znaczącą role w historii chirurgii oraz materiałów szewnych był Ali Ibn Sina znany także jako Avicenna działający na terenie dzisiejszego Iranu około 60 lat po śmierci Rhazesa. Zaobserwował on zdecydowanie szybsze rozpuszczanie szwów w obecności zakażenia występującego po naprawie przetoki odbytu. Podczas poszukiwania bardziej odpowiedniego materiału opisał on w swoim dziele *The Canon of Medicine* naturalne szwy w postaci monofilamentu zrobione ze świńskiego włosia. Avicenna opisał także zastosowanie pętli szwu na zamknięciu jamy brzusznej. Pozwoliło to na wyeliminowanie najsłabszej części szwu czyli węzła. Warto podkreślić, że Kanon Medycyny był używany jako podręcznik w uczelniach medycznych do schyłku XVIII wieku. W tym samym czasie tworzył Abulcasis, który urodził się w pobliżu Kordoby w 936 r. (teren dzisiejszej Hiszpanii). W swoich pracach uporządkował on dotychczasowy stan wiedzy dotyczącej zaopatrywania rany i technik szycia chirurgicznego. W pierwszej książce zalecał on powszechne stosowanie kauteryzacji. Jego późniejsze dzieła zalecają natomiast odejście od tego zabiegu i wykorzystanie innych narzędzi chirurgicznych oraz stosowania szwów. Opisał on również szwy podwójne stosowane do chwili obecnej [7, 13].

W średniowieczu większość dzieł była przechowywana w klasztorach. Mnisi zajmowali się tłumaczeniem i przepisywaniem ksiąg. Nie był to okres sprzyjający szybkiemu postępowi medycyny, która tylko nieznacznie rozwinęła się między V a XV wiekiem. W okresie tym nie odnotowano postępu chirurgii, a co za tym idzie samego zszywania ran czy tamowania krwawień. Wykonywane w tym okresie zabiegi chirurgiczne ograniczały się do upustów krwi, amputacji oraz wyrywania zębów. Chirurgia średniowiecza opierała się na tradycjach antycznych, interpretowanych jednak często w sposób wygodny danemu mistrzowi. Opisy przeprowadzanych zabiegów należały do rzadkości. Preferowano kauteryzację zamiast

podwiązywania uszkodzonych naczyń krwionośnych a sporadyczne rany pooperacyjne zamykano z wykorzystaniem ludzkich włosów [21].

Okres pomiędzy XVI a XVIII wiekiem przyniósł niewielkie zmiany w zakresie stosowanych materiałów, jednakże dyskusja na temat metod zszywania ran oraz technik aseptyki przyczyniła się do zmian w tej dyscyplinie. Francuski lekarz wojskowy Ambroise Paré (ur. 1510 r.) zalecał unikanie kauteryzacji z wykorzystaniem gorącego oleju i przywrócił techniki stosowane przez Galena, Celsusa i Avicenne przy zaopatrywaniu ran powstałych na skutek amputacji kończyn. Ograniczone dostawy oleju i melasy zmusiły go do poszukiwania nowych rozwiązań zaopatrywania ran. Początkowo do zastąpienia braków wykorzystywał mieszaninę jaj oraz wody różanej co okazało się przynosić znacznie więcej korzyści niż wypalanie ran olejem. Paré w swojej praktyce wykorzystywał paski wykonane z lnu i jedwabiu. Uważał, że szwy powinny być stosowane w przypadkach rozległych ran lub poprzecznego przecięcia mięśnia. Ostrzegał on również przed powstawaniem martwej przestrzeni w przypadkach zbyt płytkiego zespolenia ran głębokich. W swoich dziełach opisał metody zszywania ran twarzy polegające na przymocowaniu listew z gipsu poniżej i powyżej rany, a następnie zszycie samych listew. Wpływało to na znaczne zmniejszenie blizny [12-14].

Odsetek niepowodzeń chirurgicznych, spowodowanych ropieniem ran z powodu braku sterylności materiałów używanych do ich zamykania był ogromny. W XVII wieku szukano więc metod „oczyszczania" nici chirurgicznych. Niemiecki chirurg Purmann (1648-1721) moczył cienki katgut w winie przez noc poprzedzającą jego aplikację. Zauważył zmniejszenie ilości powikłań [21].

Początek wieku XIX przyniósł wzrost zainteresowania właściwościami resorbowalnych materiałów szewnych, o których w tamtym okresie niewiele jeszcze było wiadomo. Wszystko zmieniło się kiedy amerykański lekarz Philip Syng Physick podjął tematykę szwów resorbowalnych podczas swoich zajęć prowadzonych na Uniwersytecie Medycznym w Filadelfii. Physick jako pierwszy zauważył, że płyny wydobywające się z rany znacząco wpływają na rozpuszczanie się skóry. Doszedł on do wniosku, że rozpuszczalne szwy mogłyby być bardzo pomocne [5]. Prowadził on następnie badania na zwierzętach, a zastosowanie wyprawionej skóry zwierzęcej okazało się bardzo skuteczne. Spopularyzował on szwy chromowe i został nazwany „ojcem amerykańskiej chirurgii". Jego badania były przełomowe ponieważ nikt wcześniej nie zakładał wykorzystania materiału spełniającego początkowo swoją funkcję, a po określonym czasie ulegającego całkowitej resorpcji. Katalogi chirurgiczne z późniejszego okresu XIX wieku zawierały resorbowalne nici wykonane ze ścięgien zwierząt takich jak wół, łoś, renifer, królik czy nawet kangur [20].

Wykorzystanie srebrnych cienkich drutów podczas zabiegów chirurgicznych spopularyzował James Marion Sims. Zauważył on, że rekonstrukcje przetoki z wykorzystaniem materiałów jedwabnych i chromowanych często kończyły się niepowodzeniem, bardzo szybko pojawiał się stan zapalny. W roku 1858 po raz pierwszy opisał wykorzystanie drutów wykonanych ze srebra, twierdząc, że za ich sprawą ilość powikłań pooperacyjnych znacząco spadnie przyczyniając się jednocześnie do zmniejszenia poziomu umieralności pacjentów [10]. Nie wynalazł on samych szwów, ale sprawił, że materiał ten znalazł szerokie grono odbiorców. Srebrne szwy były wykorzystywane do zamykania tkanek pod napięciem i znalazły powszechne zastosowanie w dziedzinach chirurgii szczególnie narażonych na zakażenie. Firmy zajmujące się zaopatrzeniem medycznym podkreślały przewagę materiałów ze srebra nad jedwabiem czy katgutem [20].

Zainteresowanie srebrnymi szwami zdecydowanie zmalało gdy na rynku pojawiły się nowe syntetyczne materiały niewchłanialne. Obecnie stalowe nici stosowane są w chirurgii brzusznej, zabiegach ortopedycznych, chirurgii przepuklin i zamknięciach mostka oraz niektórych zabiegach chirurgii rekonstrukcyjnej. Niektóre nici wykonane ze stali nierdzewnej występują w postaci skręconych monofilamentów powleczonych w celu zmniejszenie współczynnika tarcia oraz ułatwienia użytkowania nici chirurgowi [13].

Mimo, że nici były powszechnie stosowane w XIX wieku, nie spełniały jeszcze w pełni oczekiwań lekarzy. Często w zaopatrzone nimi rany wdawały się infekcje, wynikające z braku odpowiedniej sterylizacji tego typu materiałów. Duża część wówczas pracujących lekarzy dalej wolała wykonać zabieg kauteryzacji rany niż zaryzykować zdrowie oraz życie pacjenta z powodu możliwych powikłań powstałych w wyniku założenia szwów. Przełomem w tej dziedzinie chirurgii był cykl publikacji stworzony przez Josepha Listera brytyjskiego chirurga, inicjatora antyseptyki. Opisał on proces gnicia i fermentacji oraz własne uwagi na temat ropienia ran. Był on świadomy obecności bakterii na stosowanych materiałach. Opierając się na badaniach Louisa Pasteura mówiących, że to mikroby są odpowiedzialne za proces zakażenia rany, postanowił utrudnić im dostęp poprzez pokrywanie ran materiałem nasyconym roztworem kwasu karbolowego. Wprowadził zasadnicze zmiany w procesie przygotowania materiałów do zszywania. Rany zszywane były nićmi wykonanymi z katgutu nasączonymi przed zabiegiem karbolem czyli wodnym roztworem fenolu [10, 11, 19]. Pierwszy eksperyment na ludziach został przeprowadzony 12 grudnia 1867 r. Lister zauważył wtedy, że wyleczenie nastąpiło bez ropienia i obrzęku rany [11]. Niezadowolony z właściwości katgutu opracował w 1881 roku katgut chromowany. Katgut chromowany powstał w wyniku pokrycia klasycznego materiału roztworem kwasu chromowego. Jednak

otrzymany materiał również nie do końca spełniał stawiane mu wymogi w kwestiach sterylności [19].

Katgut był powszechnie wykorzystywany jako wchłanialny materiał szewny do 1930 r. W sytuacjach kiedy do zespoleń tkanek lekarze potrzebowali materiałów nieulegających resorpcji, używali nici wykonanych z jedwabiu oraz bawełny. W celu zachowania zasad aseptyki nici były początkowo pakowane do szklanych opakowań z cieczą, proces ten jednak został zniesiony w roku 1950, gdy do sterylizacji zaczęto wykorzystywać promieniowanie gamma. Obecnie szwy wykonane z katgutu produkowane są metodami zbliżonymi do tych sprzed 100 lat jednak coraz rzadziej znajdują zastosowanie we współczesnej medycynie. W celu wydłużenia czasu gdy szew utrzymuje podstawowe właściwości mechaniczne katgut poddawany jest działaniu soli chromu co wpływa na sieciowanie cząsteczek kolagenu [13, 19].

Standaryzacja rozmiarów szwów chirurgicznych w Stanach Zjednoczonych nastąpiła w roku 1937. Od roku 1967 produkty wprowadzane na rynek muszą zostać sprawdzone i zatwierdzone przez właściwe instytucje takie jak Food and Drug Administration (FDA). Producenci muszą spełnić określone wymagania w procesie wytwarzania oraz zagwarantować całkowite bezpieczeństwo korzystania z produkowanych przez nich materiałów. Lister do sterylizacji szwów używał fenolu, obecnie szwy poddawane są sterylizacji w tlenku etylenu lub z wykorzystaniem promieniowania gamma. Średnica nici wykonanej z katgutu została ustanowiona zgodnie z systemem klasyfikacji podanym w Farmakopei USA (USP) będącej zbiorem norm dla leków dopuszczonych do sprzedaży na terenie USA na 0,05 mm, dzięki temu zdecydowanie łatwiej było określić właściwości mechaniczne powstałej nici [22], [13].

Na początku XX wieku szwy zostały ukazane w serii zdjęć pokazujących skomplikowaną dramatyczną sztukę chirurgii. Zdjęcia zostały wykonane przez amerykańskiego fotografa Lejarena. Do wykonania zdjęć zatrudnił grupę aktorów, przebranych za pacjentów. Seria obrazowała osiągnięcia chirurgii i przedstawiała dokonania ludzi takich jak Philip Syng Physick, Celsus, Ambroise Paré oraz wielu innych. Hiller otrzymał prestiżową nagrodę American Peace Award w 1937 roku [13]. Dzięki tej reklamie sprzedaż szwów wzrosła. Zwiększona liczba kontraktów wynikała też z wybuchu II Wojny Światowej. Wzrost popytu spowodował zwiększenie liczby producentów oraz wprowadzenie nowych rodzajów szwów resorbowalnych [13].

Chemia tworzyw sztucznych umożliwiła w II połowie XX wieku produkcję niewchłanialnych nici chirurgicznych. Ich powszechne stosowanie znacząco obniżyło ilość powikłań pooperacyjnych takich jak zakażenie czy ropienie. Lata sześćdziesiąte XX wieku i wzmożone badania

nad polimerami w tym okresie przyniosły wytworzenie około 40 nowych syntetycznych resorbowalnych polimerów takich jak np. polimer kwasu glikolowego uzyskany przez Frazza i Schmitta czy też kwas polimlekowy [3, 4, 13, 21]. Odkrycia te umożliwiły masową produkcję syntetycznych resorbowalnych nici, które ulegają stopniowemu rozpadowi i całkowitemu wchłanianiu na drodze powolnej hydrolizy [21].

Obecnie możemy znaleźć wiele innowacyjnych zastosowań dla szwów chociażby wykorzystanie nici z zadziorami do zamykania ran bez konieczności wiązania tradycyjnego węzła lub nasączanie powłoki szwu antybiotykiem mającym zminimalizować szanse wystąpienia zakażenia operowanego miejsca. Gama produktów do zespalania tkanek ciągle się rozrasta rozszerzając tym samym ilość materiałów spełniających wymagania wielu specjalistycznych zabiegów chirurgicznych [13].

Nici syntetyczne posiadają nazwy handlowe nadawane przez producenta lub osobę, która wynalazła dany materiał. Doskonałym przykładem jest nić Mersilene, którego nazwa stworzona została poprzez połączenie części nazwiska Georgea Mersona oraz Terylene czyli współczesnej nazwy handlowej poliestru. Wczesne plecione nici poliestrowe zostały szybko wyparte przez nici nylonowe charakteryzujące się lepszą obsługą [13].

3. Podsumowanie

Poznanie historii materiałów wykorzystywanych przez chirurgów na przestrzeni dziesiątek tysięcy lat do zespalania uszkodzonych tkanek jest pierwszym krokiem do docenienia współcześnie stosowanych materiałów oraz procesów ich wytwarzania. Wiele z zasad współczesnej chirurgii opiera się na doświadczeniach zdobywanych przez Celsusa, który wynalazł i powszechnie stosował podwiązania w celu utrzymania homeostazy (zdolności utrzymania parametrów wewnętrznych w systemie). Bez wątpienia przełomem było uznanie wyższości szwów nad zabiegiem kauteryzacji przez Ambroisea Paré, a później wprowadzenie przez Listera sterylizacji materiału przed jego aplikacją. Ostatnie 80 lat przyniosło gwałtowny rozwój materiałów syntetycznych i nowych zastosowań szwów produkowanych na bazie materiałów naturalnych. Obecne szwy spełniają większość stawianych im wymagań i nadają się do zastosowań w określonych strukturach anatomicznych.

Literatura

1. Bollom T, Meister K. *Surgical principles: biodegradable materials in sports Medicine*. In: DeLee JC, Drez DJ, Miller MD, editors. eds. DeLee & Drez's Orthopaedic Sports Medicine: Principles and Practice. 2nd edn Philadelphia, PA: Saunders; 2003
2. Breasted J.H. The Edwin Smith Papyrus: *Hieroglyphic Transliteration, Translation and Commentary*. Chicago, IL: University of Chicago Press; 1930
3. Claes LE. *Mechanical characterization of biodegradable implants*. Clin Mater, 10 (1992), s. 41-46

4. Davis & Geck Company Records Archives & Special Collections at the Thomas J Dodd Research Center. University of Connecticut; 2005
5. Edwards G. Philip Syng Physick, 1768–1837. Proc R Soc Med., 33 (1940) s. 145-148
6. Greive J. *Medicine in Eight Books, Translated with critical notes and explanatory*. London: D Wilson and T Durham; 1756
7. Gruner O.C. A *Treatise on the Canon of Medicine of Avicenna*, Incorporating a Translation of the First Book. London; Luzac & Co.; 1930
8. Kravetz R.E. *Horse hair sutures*. Am J Gastroenterol, 98 (2003), s. 691
9. Lawrence Ch., *Surgery, „Scientific Thought: In Context",* K Lee Lerner; Brenda Wilmoth Lerner, t. 1, Detroit: Gale, 2009
10. Levert HS. *Experiments on the use of metallic ligatures, as applied to arteries*. Am J Med Sci, 7 (1829), s. 17-22
11. Lister J. *On a new method of treating compound fracture, abscess, etc., with observations*
12. Mackenzie D., *The history of sutures*. Med. Hist., 17 (1973), s. 158-160
13. Muffly T.M., Tizzano A.P., Walters M.D., *The history and evolution of sutures in pelvic surgery*. J. R. Soc. Med., 104 (2011), s.107-112
14. Paré A. O., *Euvres complètes d'Ambroise Paré*. Paris: J-B Baillière; 1840
15. Ricci JV. The Development of Gynaecological Surgery and Instruments. San Francisco, CA: Norman Publishing; 1990
16. Scott M. 32,000 years of suture. NATNews, 20 (1983), s. 15-17
17. Snyder CC. *On the history of suture.* Bull Hist Dent, 25 (1977), s. 79-84
18. Solski L. *Szyć! Ale czym?* Wiedza i życie nr 05/2000
19. Thorwald J. *„Stulecie chirurgów"* Wydawnictwo Literackie 1996
20. Truax C. The *Mechanics of Surgery.* Chicago, IL: Hammond Press; 1899
21. Zapalski S., Chęciński P.: *Szwy chirurgiczne: wybrane problemy*. Front Cover., Alfa-Medica Press, 1999
22. https://roberthorvat30.wordpress.com/2013/10/22/bone-sewing-needles-a-brief-history-of/
23. http://sknchirurgiamiedzylesie.wum.edu.pl/abstract/OSKA/rany.html

Historia chirurgii i materiałów szewnych

Streszczenie

Praca stanowi przegląd literatury poruszającej historie materiałów służących do zespalania tkanek uszkodzonych na skutek wypadku bądź w wyniku celowego działania chirurga oraz ewolucję tych materiałów ściśle powiazaną z rozwojem chirurgii.Przedstawiono najważniejsze osiągniecia, które znacząco wpłynęły na nici chirurgiczne stosowane obecnie.

Słowa kluczowe: nici chirurgiczne, chirurgia, biomateriały

History of surgery and surgical suture

Abstract

This work is a review of the literature regarding the history of the materials used for the fusion of tissues damaged by accident or as a result of deliberate action by the surgeon and the evolution of these materials closely linked to the development of the surgical practice. The review presents the most important achievements that have significantly influenced the sutures used today.

Keywords: surgical sutures, surgery, biomaterials

Marta Kozak[1], Paweł Sobczak[2], Kazimierz Zawiślak[3]

Ocena wybranych właściwości fizycznych aglomeratów z mieszanek roślinnych na bazie nasion soi

1. Wstęp

Uzyskanie dobrych efektów produkcji zwierzęcej przede wszystkim zależy od optymalnego i racjonalnego żywienie zwierząt. Odpowiednio skomponowane pasze zaspokajają potrzeby zwierząt, dostarczając im składników niezbędnych do budowy organizmu, energii warunkującej przebieg procesów fizjologicznych oraz związków biologicznie czynnych, koniecznych w przemianach metabolicznych. Świadomie kierując żywieniem, można osiągnąć określoną użytkowość zwierząt i wysoką jakość produktów [1].

Tłuszcz odgrywa bardzo ważną rolę w żywieniu zwierząt, gdyż stanowi istotny składnik wszystkich komórek organizmu zwierzęcego, a jego wartość energetyczna jest 2,25 razy wyższa niż wartość węglowodanów. W związku z tym jego zawartość decyduje o wartości energetycznej paszy, co jest szczególnie ważne w przypadku młodych, szybko rosnących zwierząt, które mają wysokie zapotrzebowanie na energię i składniki odżywcze, a równocześnie posiadają mało pojemny żołądek. Wartość energetyczna tłuszczu zależy nie tylko od jego ilości ale także od długości łańcucha i stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych uczestniczących w jego budowie. Im dłuższy łańcuch tym wyższa wartość energetyczna, a im więcej podwójnych wiązań tym jest ona niższa [2, 3].

Niektóre kwasy tłuszczowe obecne w tłuszczach, nie są wytwarzane w organizmach zwierząt i muszą być dostarczane w pożywieniu. Wśród nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w tłuszczach roślinnych i zwierzęcych w największej ilości występują: stearynowy,

[1] kozak-marta@wp.pl, Katedra Inżynierii i Maszyn Spożywczych, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
[2] pawel.sobczak@up.lublin.pl, Katedra Inżynierii i Maszyn Spożywczych, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
[3] kazimierz.zawislak@up.lublin.pl, Katedra Inżynierii i Maszyn Spożywczych, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

palmitynowy, oleinowy, linolowy i linolenowy. Ponadto tłuszcz obecny w paszy ułatwia wchłanianie witamin w nim rozpuszczalnych [4].

Pasze o wysokiej zawartości tłuszczu mają zazwyczaj wysoka wartość odżywczą, dzięki wysokiej wartości energetycznej tłuszczu i jego dużej strawności. Wykorzystanie wysokotłuszczowych pasz w żywieniu rosnących zwierząt gospodarskich wpływa na poprawę ich zdrowotności i przyrost masy. Jednak wysoka zawartość tłuszczu w paszy nie zawsze jest korzystna, szczególnie w końcowej fazie tuczu gdyż może pogarszać jakość tuszy, czy zmiękczać słoninę [5].

Podstawowe zadanie producentów pasz polega na optymalizacji zawartości podstawowych składników pokarmowych, co ma duże znaczenie w żywieniu trzody chlewnej i drobiu, którym należy zapewnić odpowiednie proporcje energii i aminokwasów oraz właściwą zawartość aminokwasów egzogennych. Obok tłuszczu podstawą bilansowania receptur mieszanek paszowych są aminokwasy. Zawartość aminokwasów egzogennych i ich koncentracja w mieszance paszowej zależy od zapotrzebowania zwierząt na te składniki i jest niezależne od składu surowcowego mieszanek paszowych. Przyswajalność aminokwasów przez zwierzęta zależy od stopnia rozdrobnienia surowców, jakości ich wymieszania, rodzaju i warunków obróbki ciśnieniowo-termicznej oraz stopnia aglomeracji [1, 6].

Soja należy do roślin strączkowych z rodzaju bobowatych, a ze względu na wysoką zawartość tłuszczu, wynoszącą powyżej 15%, jest zaliczana do surowców oleistych. Tłuszcz zawarty w nasionach soi jest bogaty w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) przede wszystkim w kwas linolowy i linolenowy. Nasiona soi zawierają dużą ilość łatwo przyswajalnego białka (około 35-40%) o znaczącym udziale aminokwasów egzogennych, a w szczególności lizyny i tryptofanu. Dostarczają również dużo składników mineralnych głównie magnezu, fosforu, wapnia i żelaza oraz witamin takich jak: B1, B2, PP, A, C, E, K [7, 8].

Ze względu na swój skład produkty sojowe stanowią dobre źródło cennych składników odżywczych i mogą być stosowane jako dodatek wzbogacający pasze dla zwierząt. Nasiona soi wykorzystywane są przede wszystkim w żywieniu trzody chlewnej, drobiu, królików, zwierząt towarzyszących oraz przeżuwaczy [7, 9, 10].

Kukurydza również należy do podstawowych roślin stosowanych w żywieniu zwierząt gospodarskich. Ziarno kukurydzy zawiera dużo łatwo strawnych węglowodanów, co sprawia, że posiada najwyższą wartość energetyczną spośród zbóż uprawianych w Polsce. Cechuje je również niska zawartość włókna, która wpływa na wysoką strawność składników pokarmowych zawartych w paszach z jej dodatkiem. Ziarno kukurydzy jest bogate w tłuszcz zawierający witaminę E, ksantofile oraz nienasycone

kwasy tłuszczowe. Występuje w nim niewielka ilość białka (około 8%) o niskiej wartości biologicznej, dlatego pasze z dodatkiem kukurydzy powinny być bilansowane pod względem zawartości aminokwasów. Ziarno kukurydzy nie zawiera substancji antyodżywczych i jest chętnie spożywane przez zwierzęta [11, 12].

Pszenica stanowi cenne zboże paszowe, jest łatwostrawną paszą, przeznaczoną do stosowania u wszystkich gatunków zwierząt. Zboże to wykorzystywane w tuczu pozwala osiągnąć bardzo dobre przyrosty, a także korzystnie wpływa na jakość i smak mięsa [12, 13].

Obróbka termiczna stosowana podczas przetwarzania omówionych surowców na pasze dla zwierząt może powodować utratę cennych witamin i składników mineralnych oraz powodować niekorzystne przemiany chemiczne białka, np. głęboką denaturację i powstawanie dużej liczby produktów reakcji Maillarda, co z kolei powoduje utratę podstawowych aminokwasów i obniżenie wartości odżywczej produktu. Aglomeracja może stanowić alternatywną metodę ich przetwarzania. Jest to proces łączenia drobnych cząstek materiałów sypkich w większe skupiska przy zachowaniu ich pierwotnych właściwości fizyko-chemicznych. Aglomeracja surowców roślinnych może być realizowane w różny sposób, przy czym można wyróżnić metodę ciśnieniową i bezciśnieniową. Aglomeracja bezciśnieniowa polega na przesypywaniu drobnoziarnistego materiału zmieszanego z dodatkiem spoiwa lub cieczy granulacyjnej, w wyniku czego cząstki materiału łączą się, stopniowo zagęszczają i zwiększają swoją objętość. Powstałe granulki charakteryzują się nieregularnym, zbliżonym do kuli kształtem. Proces granulacji bezciśnieniowej charakteryzuje się niską energochłonnością, a otrzymany produkt wymaga suszenia ze względu na podwyższoną wilgotność [12, 14].

Natomiast aglomeracja ciśnieniowa jest procesem, w którym rozdrobniony materiał pod wpływem działania sił zewnętrznych i wewnętrznych ulega zagęszczeniu, a otrzymany produkt posiada określoną, stałą formę geometryczną. Proces ten jest prowadzony w różnego typu tabletkarkach, prasach tłokowych, ślimakowych, walcowych, czy ślimakowo-walcowych [15-17].

Najczęściej spotykaną w przemyśle formą aglomeracji surowców roślinnych jest granulowanie i tabletkowanie. Proces tabletkowania polega na jednoczesnym zagęszczaniu i ściskaniu odpowiednio odmierzonej porcji materiału pod wpływem sił zewnętrznych. Może być stosowany nacisk tłoka, walców, ślimaków i innych elementów o dowolnych kształtach. Gotowy produkt charakteryzuje się ściśle określonym kształtem i wymiarem wynikającym z geometrii komory roboczej. Tabletkowanie można prowadzić metodą na sucho bądź też na mokro, czyli z dodatkiem cieczy nawilżającej np. wody, lub alkoholu. Niekiedy proces tabletkowania

poprzedza etap zagęszczania proszku polegający na granulowaniu, najczęściej na granulatorze talerzowym lub fluidalnym. Tabletki wytworzone za pomocą metody na mokro muszą zostać poddane procesowi suszenia w celu obniżenia wilgotności do poziomu gwarantującemu bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktu [14, 18, 19].

Uzyskanie aglomeratów o wysokiej wytrzymałości stanowi podstawę projektowania i wykonywania procesu zagęszczania materiałów roślinnych. Jakość otrzymanych aglomeratów zależy od doboru metody, dodatków wiążących, wilgotności surowców, odpowiednich urządzeń do aglomeracji i ich parametrów pracy. Odporność mechaniczna materiałów określana jest przy pomocy maszyn wytrzymałościowych i najczęściej obejmuje ocenę wytrzymałości na ściskanie, zgniatanie, rozciąganie oraz na ścinanie [20].

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena wybranych właściwości fizycznych i wytrzymałościowych tabletek z mieszanek roślinnych na bazie soi.

Zakres pracy obejmował wytworzenie tabletek, pomiar ich wysokości oraz cech wytrzymałościowych.

3. Materiały i metody

Surowiec do badań stanowiły nasiona soi, ziarna kukurydzy i pszenicy, które rozdrobniono na rozdrabniaczu bijakowym z sitem o średnicy otworu 3 mm, co pozwoliło na uzyskanie śrut o jednakowym stopniu rozdrobnienia.

Z rozdrobnionych surowców przygotowano dwa rodzaje mieszanek o 50% udziale poszczególnych zbóż:

- soja – pszenica (50 / 50),
- soja – kukurydza (50 / 50).

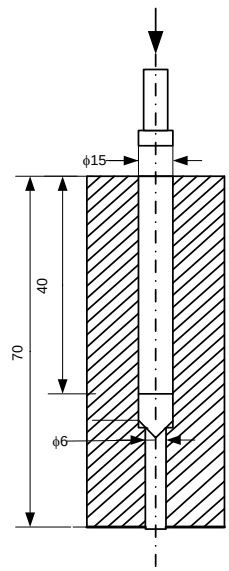
Następnie oznaczono wilgotność sporządzonych mieszanek według obowiązującej normy [21] i dowilżono je wodą do około 15% wilgotności. Odpowiednia ilość dodatku wody została wyznaczona według wzoru (1).

$$M_w = \frac{x_2 - x_1}{100 - x_2} \cdot N_w \tag{1}$$

gdzie: M_w – masa dodawanej cieczy [g], x_1 – wilgotność początkowa [%], x_2 – wilgotność żądana [%], N_w – masa surowca [g].

Tak przygotowane mieszaki roślinne kondycjonowano przez 24 godziny w temperaturze około 2°C w celu wyrównania ich wilgotności, a następnie poddano je procesowi tabletkowania na urządzeniu wytrzymałościowym

typu Instron 4302. Wykonano po 50 tabletek z każdego rodzaju mieszanki (rys. 1), za każdym razem nasypując do przystawki zagęszczającej taką samą masę surowca wynoszącą 4 g.



Rysunek 1. Schemat przystawki do tabletkowania [14]

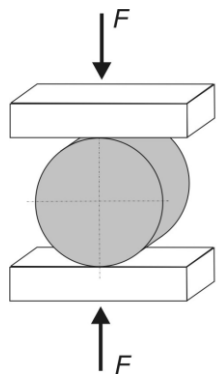
W trakcie wytwarzania tabletek rejestrowano siłę prasującą materiał roślinny i energię. Po sprasowaniu mieszanki roślinnej wypychano metalowy stożek z cylindra wraz z wytworzoną tabletką. Na rysunku 2 przedstawiono schemat przystawki wraz z tłokiem zagęszczającym. Wysokość tabletek z poszczególnych mieszanek została zmierzona suwmiarką elektroniczną. Ponadto oznaczono wilgotność końcową wytworzonych aglomeratów zgodnie z obowiązującą normą [21].

Przy użyciu tekstuometru TA.XT.plus zbadano parametry wytrzymałościowe tabletek roślinnych na bazie soi. Wyznaczono maksymalną siłę cięcia F_{max} przecinając aglomerat wzdłuż jego średnicy nożem o grubości 1 mm.

Następnie określono wytrzymałość tabletek na ściskanie w tzw. „brazylijskim" teście ściskania. Metoda ta jest bardzo często stosowana do oceny właściwości mechanicznych kruchych aglomeratów w kształcie walca i polega na umieszczeniu próbki pomiędzy powierzchniami głowicy ściskającej poprzecznie do ich osi (rys. 3). Aglomeraty roślinne ściskano do połowy ich średnicy określając siłę potrzebną do zniszczenia próbki (maksymalna siła niszcząca). Badanie wytrzymałości na ściskanie tą metodą umożliwia wyznaczenie twardości produktu i zbadanie procesu powstawania uszkodzeń w centralnej części brykietu [20].

A) B)

Rysunek 2. Aglomeraty z mieszanek roślinnych na bazie soi A)soja – pszenica, B) soja – kukurydza [opracowanie własne]



Rysunek 3. Metoda brazylijska - próbka w głowicy ściskającej [20]

Odporność tabletek roślinnych na naprężenia podczas ściskania obliczono korzystając z poniższego wzoru (2):

$$\sigma_m = \frac{2F_n}{\pi dh} \tag{2}$$

gdzie: F_n – maksymalna siła niszcząca [N], d - średnica tabletki (d=15 mm),
h – wysokość tabletki [mm] [18].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu STATISTICA 9.0., a rezultaty przedstawiono jako średnią i odchylenie standardowe. Wyznaczono istotność różnic między średnimi (p) i wartości testu F (ANOVA) przy 95% przedziale ufności.

4. Analiza wyników

Badania przeprowadzono zgodnie z opracowaną metodyką. W tabeli 1 zaprezentowano analizę statystyczną parametrów zagęszczania surowców roślinnych oraz podstawowych właściwości fizycznych wytworzonych aglomeratów.

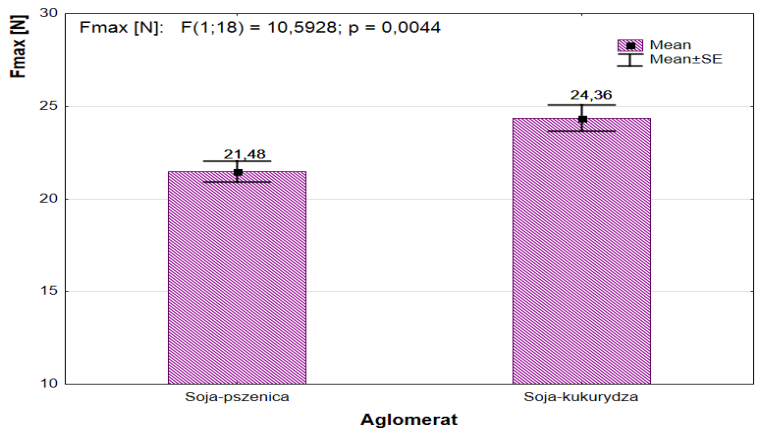
Tabela 1.Analiza statystyczna parametrów aglomeracji i właściwości fizycznych wytworzonych tabletek roślinnych na bazie soi [opracowanie własne]

DS.	$x_{śr}$±SE Soja-pszenica	$x_{śr}$±SE Soja-kukurydza	SS	df	F Value	p
Siła prasująca [KN]	9,472 ± 0,159	9,437 ± 0,123	0,0311	1	1,53892	0,217740
Energia [J]	0,244 ± 0,064	0,189 ± 0,046	0,0734	1	23,88825	0,000004
Wysokość [mm]	18,479± 0,0743	18,430± 0,0404	0,0600	1	16,79500	0,000086
Wilgotność końcowa [%]	7,684 ± 0,029	7,852 ± 0,043	0,0706	1	52,26667	0,000090

gdzie: DS – źródło zmienności, $x_{śr}$±SE – średnia ± odchylenie standardowe, SS – suma kwadratów, df – stopnie swobody, F Value – wartość testu F (ANNOVA), p – prawdopodobieństwo.

Przeciętne wartości siły prasującej potrzebnej do zagęszczenia materiału mieszanek roślinnych na bazie soi były bardzo zbliżone i wynosiły około 9,5 KN. Pomiar energii zużytej w procesie aglomeracji wykazał istotne różnice w energochłonności w zależności od rodzaju zagęszczanego materiału roślinnego (p=0,000004). Aglomeraty z dodatkiem pszenicy wymagały wyższego nakładu energii do ich wytworzenia wynoszącego 0,244 J, co w przeliczeniu na jednostkową energochłonność wynosi 0,061 J/g. Okazały się one również nieco wyższe niż tabletki z mieszanki soi i kukurydzy, a różnice te były istotne statystycznie (p=0,000086).

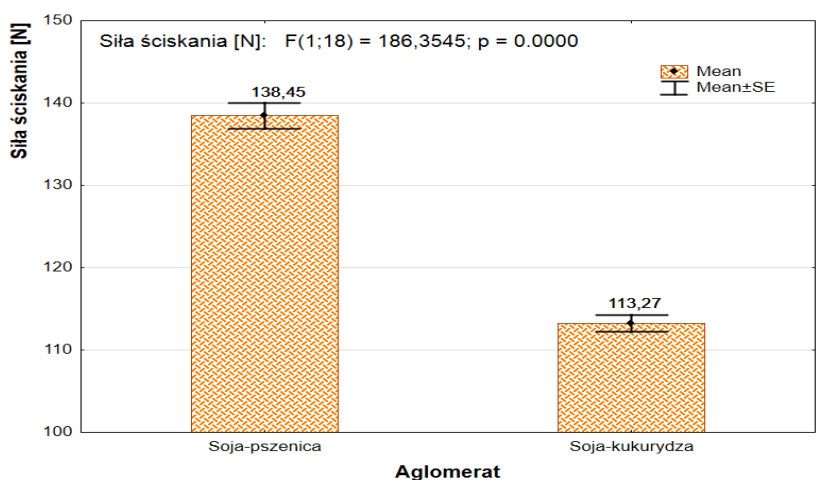
Na rysunku 4 przedstawiono wyniki pomiarów maksymalnej siły cięcia (F_{max}). Tabletki z mieszanki soi i kukurydzy wymagały wyższej siły do przecięcia pojedynczej próbki, która przeciętnie wynosiła 24,36 N, czyli 1,32 N/mm. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne różnice wyników badań (p=0,0044).



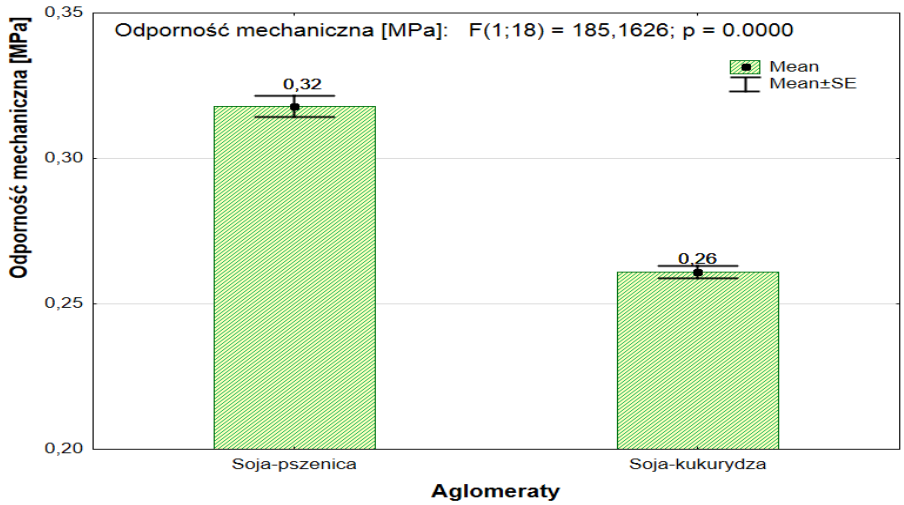
Rysunek 4. Wyniki pomiarów maksymalnej siły cięcia roślinnych aglomeratów na bazie soi [opracowanie własne]

Wyniki przeprowadzonych testów ściskania zamieszczono na rysunku 5 Zaobserwowano istotny statystycznie wpływ rodzaju użytej mieszanki roślinnej na wartość siły niszczącej wytworzone tabletki ($p<0,05$). Znacznie wyższą siłą potrzebną do zniszczenia pojedynczej próby charakteryzowały się aglomeraty z mieszanki soi i pszenicy.

Podobną zależność zaobserwowano podczas analizy odporności tabletek roślinnych na naprężenia podczas ściskania, której wyniki zaprezentowano na rysunku 6. Wytrzymałość mechaniczna aglomeratów roślinnych na bazie soi zależy w istotny sposób od ich twardości ($p< 0,05$).



Rysunek 5. Wyniki pomiarów siły ściskania aglomeratów na bazie soi w zależności od rodzaju użytej mieszanki roślinnej [opracowanie własne]



Rysunek 6. Porównanie odporności mechanicznej aglomeratów roślinnych na bazie soi [opracowanie własne]

5. Wnioski

Przeprowadzone analizy pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

- Właściwości aglomeratów roślinnych zależą od rodzaju surowca użytego do ich produkcji;
- Wartości siły ściskającej były bardzo zbliżone, jednak poziom energii zużytej w procesie ich aglomeracji istotnie się różnił i był wyższy w przypadku mieszanek sojowo-pszennych;
- Sojowo-pszenne tabletki były wyższe niż aglomeraty z mieszanki soi i kukurydzy, a otrzymane wartości różniły się statystycznie ($p<0,05$);
- Zastosowana technologia produkcji pozwoliła otrzymać aglomeraty roślinne o wilgotności gwarantującej bezpieczeństwo mikrobiologiczne (<8%);
- Aglomeraty sojowe z dodatkiem kukurydzy charakteryzują się niższą wytrzymałością mechaniczną;
- Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że aglomeracja ciśnieniowa stanowi idealny sposób produkcji aglomeratów sojowych przeznaczonych na cele paszowe.

Literatura

1. Sobczak P. *Zastosowanie obróbki ciśnieniowo-termicznej w wytwarzaniu zbożowo-tłuszczowych koncentratów paszowych*, Acta Agrophysica Monographiae, 1 (2013)
2. Lipiec A., Pisarski R. K. *Paszoznawstwo*, UP w Lublinie, 2010
3. Zhang B., Haitaob L., Zhaoa D., Guoa Y., Barr A. *Effect of fat type and lysophatidylcholine addition to broiler diets on performance, apparent digestibility of fatty acids, and apparent metabolizable energy content*, Animal Feed Science and Technology, 163 (2011), s. 177-184
4. Seong-Koon Lo, Chin-Ping Tan, Kamariah Long, Mohd Suria Affandi Yusoff, Oi-Ming Lai. *Diacylglycerol oil properties, processes and products: A Review*, Food and Bioprocess Technology, 1 (2008), s. 223-233
5. Jamroz D., Podkówka W., Chachułowa J. *Żywienie zwierząt i paszoznawstwo*. Paszoznawstwo. Tom III, PWN, Warszawa 2006
6. Kasprowicz-Potocka M. *Aminokwasy z „drugiego" planu*. Ogólnopolskie czasopismo Specjalistyczne. Trzoda Chlewna, 5 (2011), s.58-61
7. Budzyński W., Zając T. *Rośliny oleiste – uprawa i zastosowanie*, PWRiL, Warszawa 2010
8. Kapusta F. *Rośliny strączkowe źródłem białka dla ludzi i zwierząt*, Nauki Inżynierskie i Technologie, 1 (2012), s.16-32
9. Sikorski E. Z. *Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007
10. Sobczak P. Zawiślak K., Kozak M., Mazur J., Panasiewicz M., Kobus Z., Żukiewicz-Sobczak W. *Extrusion of Cereals with Admixture of Soya Bean Grains from Traditional Crops*, Agriculture and Agricultural Science Procedia, 7 (2015), s. 236-240
11. Gąsiorowski H. *Kukurydza*, Część I. Wiadomości ogólne, Przegląd Zbożowo-Młynarski, 10 (2005), s. 31-33
12. Mościcki L., Mitrus M., Wójtowicz A., *Technika ekstruzji w przemyśle rolno-spożywczym*, PWRiL, Warszawa 2007
13. Jerocha H., Lipiec A. (pod red.), *Pasze i dodatki paszowe*, PWRiL, Warszawa 2012
14. Sobczak P., Zawiślak K., Panasiewicz M., Mazur J., Starek A., Kozak M., Zarajczyk J., Kowalczuk J. *Wykorzystanie procesu tabletkowania w zagospodarowaniu odpadów zielarskich*, W: Fizyczne właściwości surowców i ich wykorzystanie, SPOMASZ, Lublin 2014
15. Hejft R., Obidziński S., *Ciśnieniowa aglomeracja materiałów roślinnych – innowacje technologiczno-techniczne*. Część I, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 57 (2012), s. 63-65
16. Laskowski J., Skonecki S. *Wpływ masy materiału i średnicy komory na parametry zagęszczania ziarna pszenicy*, Inżynieria Rolnicza, 5 (2004), s. 195-204
17. Obidziński S., Hejft R. *Wpływ parametrów aparaturowo-procesowych na wartości nacisków zagęszczających w procesie granulowania pasz*, Inżynieria Rolnicza, 5 (2007), s. 213-319

18. Skonecki S., Kulig R., *Potręć M. Ciśnieniowe zagęszczanie trocin sosnowych i topolowych – parametry procesu i jakość aglomeratu*, Acta Agrophysica, 18 (2011), s. 149-1160
19. Sobczak P. *Wpływ składu mieszanek warzywno-ziołowych i czasu nawilżania na ich właściwości fizyczne oraz wytrzymałość na ściskanie*, Inżynieria Rolnicza, 6 (2006), s. 285-293
20. Borowski G. *Porównanie dwóch sposobów określania wytrzymałości brykietów z materiałów drobnoziarnistych*, Postępy Nauki i Techniki, 12 (2012), s. 115-121
21. PN-EN ISO 712, 2012. *Ziarno zbóż i przetwory zbożowe. Oznaczanie wilgotności*. Metoda odwoławcza, Polski Komitet Normalizacji, Warszawa 2012

Ocena wybranych właściwości fizycznych aglomeratów z mieszanek roślinnych na bazie nasion soi

Streszczenie
Soja należy do roślin zawierających dużą ilość tłuszczu, białka i aminokwasów, dlatego produkty z jej dodatkiem mogą być stosowane jako dodatek wzbogacający pasze dla zwierząt gospodarskich. Aglomeracja ciśnieniowa może stanowić dobrą metodę jej przetwarzania, gdyż zapobiega utracie cennych witamin i składników mineralnych, mającej miejsce w przypadku obróbki termicznej. Materiał badawczy stanowiły tabletki wytworzone poprzez aglomerację ciśnieniową dwóch mieszanek roślinnych na bazie polskiej odmiany soi oraz kukurydzy i pszenicy. Celem pracy była ocena wybranych właściwości fizycznych i wytrzymałościowych tabletek z mieszanek roślinnych. Zakres pracy obejmował wytworzenie aglomeratów, pomiar ich podstawowych parametrów oraz testy wytrzymałościowe przy użyciu teksturometru TA.XT.plus. Właściwości fizyczne jak i wytrzymałościowe tabletek sojowych zależały od rodzaju mieszanki surowcowej użytej do ich sporządzenia.
Słowa kluczowe: soja, aglomeracja, wytrzymałość

Evaluation of selected physical properties of tablets from plants mixtures based on soybean

Abstract
Soybean is one of the plants containing a large amount of fat, protein and amino acids, which is why products with the additive can be used as an enrichment feed supplement for farm animals. Pressure agglomeration can be a good method of processing of them, as it prevents the loss of valuable vitamins and minerals, which took place in the case of thermal treatment. Research material was constitute tablets prepared by agglomeration pressure of two mixtures of plant based on Polish variety of soybeans, corn and wheat. The aim of the study was to evaluate selected physical and strength properties of tablets with plants mixtures. The scope of work was embraced the production of agglomerates, measuring their basic parameters and strength tests using texturometer TA. XT. plus. Physical properties and strength properties of soybean tablets depend on the type of mixture of raw materials used in their preparation.
Keywords: soybean, agglomeration, strength

Izabela Wrona[1], Artur Wójcik[2]

Praktyczne zastosowania materiałów w stanie nadprzewodzącym

1. Wprowadzenie

Celem pracy jest zaprezentowanie przeglądu współczesnych zastosowań materiałów, w których obserwuje się występowanie nadprzewodnictwa.

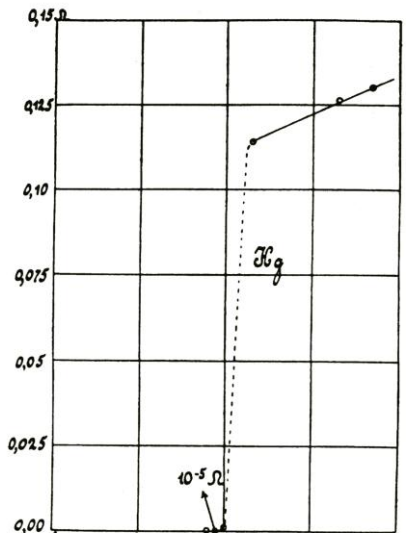
Nadprzewodniki są substancjami, które poniżej pewnej temperatury, nazywanej temperaturą krytyczną, uzyskują szczególne właściwości, dzięki którym są wykorzystywane w wielu urządzeniach usprawniając ich pracę oraz pozwalając na oszczędności związane z zapotrzebowaniem na energię elektryczną. W ramach pracy zostanie również zaprezentowany aktualny kierunek badań oraz przyszłe możliwości wykorzystania nadprzewodników.

2. Historia nadprzewodnictwa

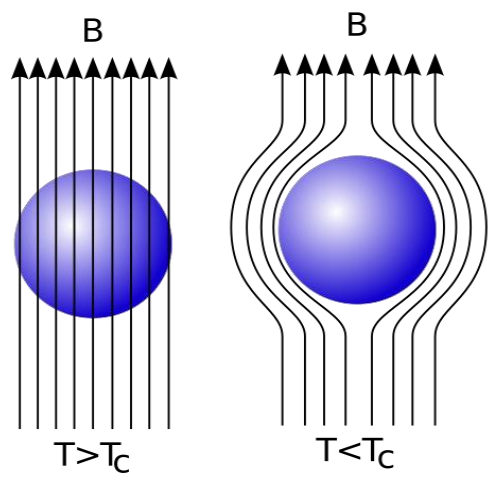
Nadprzewodnictwo odkrył Heike Kamerlingh Onnes w 1911 roku podczas badań właściwości materiałów w niskich temperaturach. Badania rtęci, która była wówczas najczystszym możliwym do uzyskania pierwiastkiem, wykazały spadek jej oporu elektrycznego w temperaturze 4 K do niemierzalnie niskiej wartości. Jest to jedna z charakterystycznych cech nadprzewodników – zerowa rezystancja poniżej pewnej temperatury nazywanej temperaturą krytyczną. Wartość tej temperatury jest indywidualna dla każdej substancji i zależy zarówno od składu chemicznego jak i struktury danego związku. Przyjmuje również różne wartości w zależności od czynników zewnętrznych takich jak ciśnienie czy pole magnetyczne [1]. Na rysunku 1 został zaprezentowany oryginalny wykres H. Kamerlingha Onnesa przedstawiający spadek oporu rtęci wraz z temperaturą [2].

Drugą charakterystyczną cechą nadprzewodników jest zerowa wewnętrzna indukcja magnetyczna. Jej skutkiem jest fakt, że materiał będący w stanie nadprzewodzącym wypycha ze swojego wnętrza linie pola magnetycznego [1]. Zjawisko to nazwane efektem Meissnera-Ochsenfelda, zostało zobrazowane na rysunku 2 [3].

[1] izabelawrona2107@op.pl, Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Produkcji i Technologii Materiałów, Politechnika Częstochowska, www.pcz.pl
[2] awojcik14@wp.pl, Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Produkcji i Technologii Materiałów, Politechnika Częstochowska, www.pcz.pl



Rys. 1. Zależność oporu elektrycznego rtęci od temperatury [2]



Rys. 2. A - pole magnetyczne przenika substancję w stanie normalnym; B - efekt Meissnera-Ochsenfelda - substancja w stanie nadprzewodzącym wypycha pole magnetyczne [3]

Kolejną ważną datą w historii nadprzewodnictwa jest rok 1956 kiedy to powstała pierwsza teoria opisująca zjawisko, od nazwisk twórców – Johna Bardeena, Leona Coopera i Roberta Schrieffera – nazwana teorią BCS. Teoria ta wprowadza pojęcie pary Coopera, czyli elektronów związanych ze sobą poprzez oddziaływanie z siecią fononów. Dwa elektrony, jako

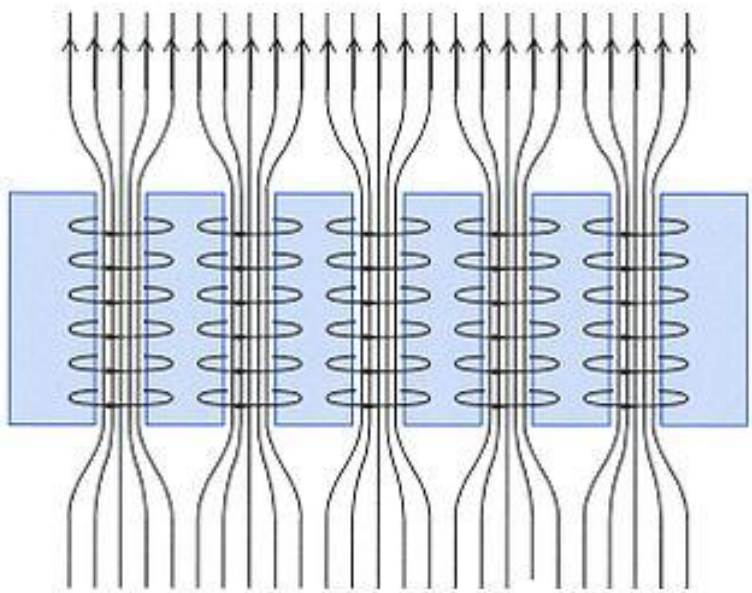
cząsteczki o tym samym ładunku, odpychają się, jednak w przypadku kiedy badana próbka znajduje się w stanie nadprzewodzącym, w dużym uproszczeniu można przyjąć, że poruszający się elektron przyciągając jony sieci krystalicznej wywołuje zagęszczenie ładunku dodatniego w swoim otoczeniu. Zagęszczenie to przyciąga natomiast kolejny elektron, w wyniku czego efektywne oddziaływanie między dwoma elektronami jest przyciągające [1].

W 1986 roku Bednorz i Müller odkryli nadprzewodnictwo wysokotemperaturowe. Teoria BCS nie sprawdza się jednak w przypadku nadprzewodników wysokotemperaturowych i jak dotąd nie powstała ogólnie akceptowalna teoria opisująca ten rodzaj nadprzewodnictwa [4].

3. Rodzaje i właściwości nadprzewodników

Istnieją dwa rodzaje nadprzewodników. Nadprzewodniki typu pierwszego całkowicie wypychają pole magnetyczne ze swojego wnętrza. Głębokość wnikania pola magnetycznego jest wartością charakterystyczną dla stanu nadprzewodzącego. W związku z wypychaniem pola magnetycenego poza nadprzewodnik oraz brakiem wnikania zmian pola obserwuje się tzw. londonowską głębokość wnikania pola magnetycznego, która zanika ekspotencjalnie. Materiały o grubości mniejszej niż głębokość wnikania dla danego nadprzewodnika posiadają większe wartości pola krytycznego oraz, co za tym idzie, większe wartości natężenia strumienia prądu [5].

Nadprzewodniki drugiego typu charakteryzują się występowaniem dwóch wartości pola krytycznego. Stan nadprzewodzący, poniżej pierwszej wartości pola krytycznego, nie różni się od stanu nadprzewodzącego w nadprzewodnikach pierwszego rodzaju, natomiast przekroczenie drugiej wartości pola krytycznego skutkuje powrotem materiału do stanu normalnego. Pomiędzy wspomnianymi wartościami występuje stan nazywany mieszanym, w którym do wnętrza nadprzewodnika wnika częściowo skwantowane pole magnetyczne w postaci fluksonów. Flukson tworzy nić strumienia magnetycznego, przechodzącego przez nadprzewodnik, wokół którego płynie prąd nadprzewodzący tworzący wir, co zostało zobrazowane na rysunku 3. Wewnątrz fluksonu natężenie pola magnetycznego jest duże i w jego obrębie, materiał znajduje się w stanie normalnym. Natomiast w obszarach, których nie przenika pole magnetyczne, próbka znajduje się wciąż w stanie nadprzewodzącym [1].



Rys. 3. Fluksony w stanie mieszanym nadprzewodnika II rodzaju [6]

Kolejnym parametrem charakterystycznym dla nadprzewodników jest długość koherencji określająca maksymalną odległość między elektronami tworzącymi parę Coopera. Jej wartość maleje wraz ze wzrostem ilości domieszek w materiale. Każdy doskonale czysty nadprzewodnik posiada indywidualną wartość stałej materiałowej Ginzburga-Landaua, która jest stosunkiem głębokości wnikania do długości koherencji [5].

Ponadto w stanie nadprzewodzącym zmieniają się właściwości cieplne materiałów. Obserwuje się skok ciepła właściwego oraz spadek przewodności cieplnej. Ulegają zmianie również właściwości absorpcyjne i odbiciowe fal elektromagnetycznych [1].

4. Zastosowania nadprzewodników

Ze względu na swoje unikatowe cechy nadprzewodniki znajdują liczne zastosowania od detekcji pól magnetycznych, magazynowania energii, układów przełączających czy obwodów mikrofalowych po urządzenia do przeprowadzania reakcji termojądrowych. Technologie pozwalające na wykorzystanie nadprzewodników są wciąż doskonalone, dlatego badania dotyczące nadprzewodnictwa mogą mieć istotny wpływ na rozwój nauki i techniki.

W ramach pracy zostaną scharakteryzowane najważniejsze rozwiązania technologiczne, w których praktycznie wykorzystuje się występowanie stanu nadprzewodzącego.

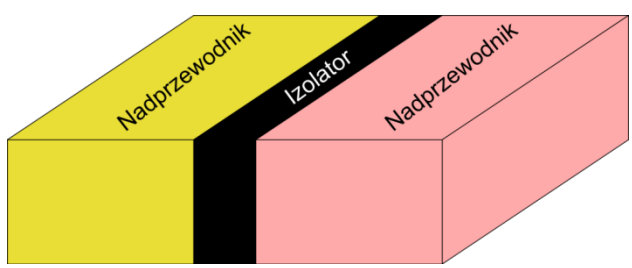
W dziedzinie wytwarzania materiałów nadprzewodnikowych światowym liderem jest firma American Superconductor założona w 1987 roku. Obecnie prowadzi ona badania nad opracowaniem technologii pozwalającej na produkcję na skalę przemysłową nadprzewodników wysokotemperaturowych, których koszt byłby porównywalny z cenami tradycyjnych materiałów.

W Europie natomiast utworzono konsorcjum zrzeszające firmy działające w kierunku rozwoju zastosowań nadprzewodników pod nazwą CONECTUS [7].

4.1. Złącze Josephsona

Złącze Josephsona jest elementem elektronicznym składających się z dwóch różnych nadprzewodników oddzielonych cienką warstwą izolatora (rys. 4). Prąd nadprzewodzący w postaci par Coopera może tunelować przez warstwę izolatora, a jego natężenie zależy od pola magnetycznego w jakim znajduje się złącze.

Na początku 1960 odkryto, że złącze Josephsona można wykorzystać do konstrukcji przełączników w układach cyfrowych, ponieważ cechuje się niskim poborem mocy i bardzo krótkim czasem przełączania. Badania w tym kierunku prowadzone przez firmę IBM zostały jednak porzucone mimo obiecujących wyników. Komputer wykorzystujący nadprzewodzące elementy nie jest konkurentem dla dzisiejszej technologii, przynajmniej w takiej postaci w jakiej dotychczas poznano nadprzewodnictwo. Przyczyną porzucenia badań była głównie potrzeba ciągłego schładzania urządzeń oraz ich wyjątkowo niska wytrzymałość mechaniczna. Należy jednak podkreślić, że powinniśmy się spodziewać wielu rewolucyjnych rozwiązań z chwilą odkrycia materiału wykazującego właściwości nadprzewodzące w temperaturze pokojowej [8].



Rys. 4. Złącze Josephsona [9]

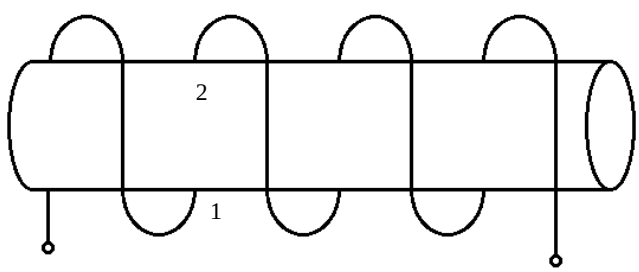
4.1.1. SQUID

SQUID (ang. ***s**uperconducting **qu**antum **i**nterference **d**evice*), czyli nadprzewodnikowy interferometr kwantowy, jest niezwykle czułym detektorem pól magnetycznych. W zależności od konstrukcji SQUID zbudowany jest z dwóch lub jednego złącza Josephsona oraz nadprzewodzącego pierścienia. Główną funkcją złącz Josephsona w tym urządzeniu jest umożliwienie strumieniowi magnetycznemu wnikania do wnętrza pierścienia nadprzewodzącego. Ponadto złącza pozwalają śledzić periodyczne zmiany prądu indukowanego w pierścieniu pod wpływem zmieniającej się indukcji zewnętrznego pola magnetycznego.

Czułość nadprzewodnikowego interferometru kwantowego pozwala na pomiar natężenia pola magnetycznego rzędu 10^{-13} T, czyli jest on zdolny do wykrycia pola magnetycznego generowanego przez serce i mózg człowieka. Dla porównania pole magnetyczne ziemi osiąga wartość rzędu 10^{-4} T. Wykorzystanie tego urządzenia w praktyce pozwala na bezinwazyjną diagnostykę mózgu [10].

4.2. Kriotron

Kriotron składa się z solenoidu z nadprzewodzącego drutu o dużym polu krytycznym, wewnątrz którego umieszczony jest krótki drut nadprzewodzący o niewielkim polu krytycznym nazywany zaworem (rys. 5). Zawór znajduje się w polu magnetycznym generowanym przez solenoid pod wpływem przepływającego prądu. Po przekroczeniu przez to pole wartości krytycznej zawór przechodzi ze stanu nadprzewodzącego w normalny. Kriotron został skonstruowany podczas badań nad wykorzystaniem nadprzewodników w maszynach liczących w 1954 roku w Massachusetts [5].



Rys. 5. Kriotron z uzwojeniem drucianym. 1 – cewka sterująca; 2 – drut zaworu [11]

4.3. Transformatory

Konstrukcja nadprzewodnikowego transformatora opiera się na rdzeniu magnetycznym odseparowanym od pozostałych uzwojeń. Ze względu na dziesięciokrotnie większe gęstości prądu niż w konwencjonalnych transformatorach, transformatory nadprzewodnikowe charakteryzują się dużo mniejszą masą i objętością, przy zwiększonej sprawności. Redukcja wymiarów może sięgać nawet 40%.

Czołowe firmy na świecie prowadzą prace nad transformatorami nadprzewodnikowymi. W 1997 r. rozpoczęto eksploatację transformatora w Genewie zaprojektowanego przez firmę ABB, która jednocześnie podjęła projekt budowy transformatora z zastosowaniem przewodów wykonanych z nadprzewodników wysokotemperaturowych. Badania nad transformatorami są również prowadzone przez takie firmy jak Siemens, Fuji-Electric czy Sumitomo [7].

4.4. Magazynowanie energii

Magazynowanie energii i przechowywanie jej bez strat przez nieokreślony czas jest możliwe przy użyciu obwodu składającego się z cewki nadprzewodzącej oraz nadprzewodzącego łącznika. Stosowanie nadprzewodników pozwala na gromadzenie bardzo dużych energii w porównaniu z metodami konwencjonalnymi co rozszerza zakres ich zastosowań. Ponadto nadprzewodniki pozwalają na uzyskiwanie bardzo szybkich wyładowań i co za tym idzie bardzo dużych mocy. Istnieje możliwość zasilania odbiorników za pomocą klasycznego uzwojenia wtórnego w transformatorze oraz zasilanie kilku obwodów jednocześnie. Nadprzewodniki umożliwiają także wytwarzanie prądów lub napięć o bardzo dużych wartościach oraz uzyskiwanie sprawności urządzeń na wysokim poziomie poprzez impedancję użyteczną [5, 11].

4.5. Kriokable

Kriokable wypadają niezwykle korzystnie w porównaniu z kablami tradycyjnymi, gdyż są w stanie przewodzić prąd o tysiąckrotnie większym natężeniu. Ich skomplikowana konstrukcja, przedstawiona na rysunku 6, ma na celu zapewnienie utrzymania rdzenia poniżej temperatury krytycznej co skutkuje uzyskaniem stanu nadprzewodzącego. W niskich temperaturach właściwości fizyczne metali, takie jak elastyczność, mogą znacząco się zmieniać, dlatego istotna jest ochrona nadprzewodzącego rdzenia przed uszkodzeniami mechanicznymi. Często kriokable umieszcza się w sztywnej stalowej rurze, półsztywnym aluminium lub w ołowianej powłoce wypełnionej wysokociśnieniowym olejem, który ma na celu zapewnienie spójności izolacji kabla [12].

Rys. 6. Przykładowa konstrukcja kriokabla [13]

Wyjątkowo dobre parametry posiadają kable wykonane z wykorzystaniem związku Nb_3Sn. Związek ten, będący nadprzewodnikiem II rodzaju, wykazuje właściwości nadprzewodzące w temperaturze 17,5 K, czyli wyższej niż czysty niob. Ponadto charakteryzuje się wysoką wartością pola krytycznego co jest wyjątkowo korzystne z punktu widzenia przydatności do konstrukcji silnych magnesów nadprzewodzących wymagających dużych gęstości prądu [14].

Rdzeń kabla zawiera zatopione w miedzi włókna wykonane z niobu o średnicy 5 μm otoczone 1 mikrometrową warstwą Nb_3Sn. Ze względu na kruchość Nb_3Sn kable wykonane z wykorzystaniem tego związku muszą być traktowane ze szczególną ostrożnością. Każdy przewód ma określoną krytyczną średnicę gięcia, poniżej której następuje znaczna redukcja przewodzonego prądu [12, 13].

4.6. Silne pole magnetyczne

4.6.1. Nadprzewodzące elektromagnesy

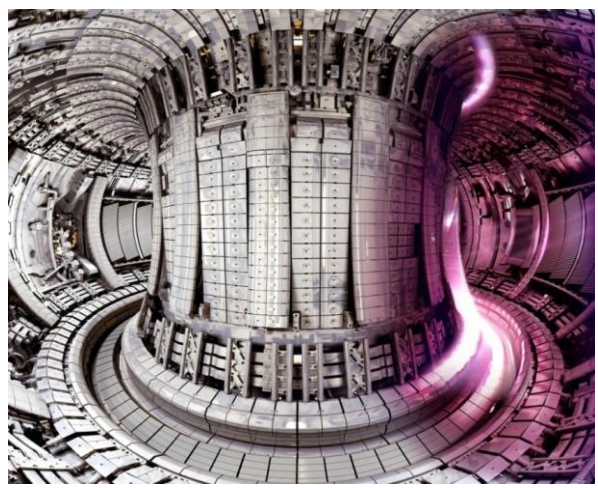
Konstrukcja elektromagnesu nadprzewodzącego opiera się na cewce wykonanej z nadprzewodzącego drutu. Jest ona zanurzona w cieczy kriogenicznej zapewniającej utrzymanie temperatury poniżej temperatury krytycznej nadprzewodnika. Prąd wpuszczony w zapętloną cewkę może krążyć w niej bez końca, również po wyłączeniu zasilania, pod warunkiem utrzymania materiału poniżej temperatury krytycznej.

Wykorzystanie elektromagnesów nadprzewodzących do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego było pierwszym komercyjnym zastosowaniem materiałów w stanie nadprzewodzącym. Ta bezinwazyjna technika pozwala na tworzenie dwuwymiarowych obrazów umożliwiających lokali-

zowanie i identyfikację zaburzeń w obrębie ludzkiego ciała. Badanie polega na umieszczeniu pacjenta w jednolitym silnym polu magnetycznym elektromagnesu. Powodem zastosowania nadprzewodników jest czynnik ekonomiczny, ponieważ koszty utrzymania właściwej temperatury są mniejsze od kosztów pracy elektromagnesów generujących straty w postaci ciepła i wymagających zasilania w wysokie moce [10].

4.6.2. Kierowanie strumieniem cząstek

Nadprzewodzące cewki są wykorzystywane do kontroli strumienia naładowanych cząstek. W zależności od rodzaju urządzenia wytworzone pole magnetyczne może być toroidalne jak w tokamaku lub w postaci wielokrotnie zwiniętej wstęgi Möbiusa w urządzeniu o nazwie stellarator. Wspomniane urządzenia, zaprezentowane na rysunkach 7 i 8, służą do wytwarzania plazmy i przeprowadzania kontrolowanej reakcji termojądrowej.



Rys. 7. Wnętrze tokamaku [15]

Rys. 8. Plazma utrzymywana w polu magnetycznym stellaratora [16]

4.6.3. ITER

ITER (ang. *International Thermonuclear Experimental Reactor*) jest programem badawczym mającym na celu zbadanie możliwości wykorzystania na wielką skalę energii uzyskiwanej podczas przeprowadzania kontrolowanej fuzji jądrowej. Na realizację projektu, polegającego na budowie reaktora termonuklearnego w oparciu o tokamak oraz wykonanie planowanych badań, przeznaczono 30 lat, termin rozpoczęcia pracy reaktora wyznaczono na 2019 rok [17].

Pożądana energia powstaje podczas fuzji jądra deuteru z jądrem trytu. W wyniku reakcji uzyskuje się jedną cząstkę alfa, wysokoenergetyczny neutron oraz 17,5 MeV energii. Do przeprowadzenia fuzji konieczne jest zapewnienie odpowiednich warunków, do których należy ekstremalnie wysoka temperatura porównywalna z temperaturą panującą we wnętrzu gwiazd. Tak gorąca plazma nie może mieć kontaktu ze ścianami reaktora. Dodatkowo konieczne jest utrzymanie odpowiednio wysokiej gęstości plazmy. Realizuje się to poprzez zamknięcie plazmy w pułapce magnetycznej w odpowiednio ukształtowanym polu wytworzonym przez magnesy nadprzewodzące [18].

Tokamak jako konstrukcja umożliwiająca przeprowadzenie fuzji jądrowej powstaje w centrum badawczym Cadarache, w pobliżu Marsylii, na południu Francji. Sercem urządzenia jest toroidalny układ magnesów nadprzewodzących składających się z 18 cewek. Cewki nawinięte są z kabli zawierających nici miedziane wraz z nadprzewodzącymi nićmi niobowo-cynowymi o łącznej długości ponad 80 km. Przewody będą chłodzone ciekłym helem wewnątrz stalowej otuliny. Konstrukcja umożliwia przepływ prądu o wartości 68 kA oraz generowanie pola magnetycznego o wartości 11,8 T.

Zgodnie z założeniami reaktor ma być uruchamiany na 1000 sekund generując w tym czasie moc 500-1100 MW. Energia fuzji jądrowej ma ogromny potencjał ze względu na produkcję dużo mniejszej ilości zanieczyszczeń w porównaniu z energią pozyskiwaną w reaktorach jądrowych. Ponadto promieniowanie, które jest efektem ubocznym reakcji zachodzącej w tokamaku można przeznaczyć do wytworzenia paliwa wykorzystywanego w nim samym [17].

4.7. Maglev – kolej magnetyczna

Maglev (ang. ***mag****netic* ***lev****itation*) jest przykładem praktycznego wykorzystania efektu Meissnera. Dzięki wypychaniu pola magnetycznego poza nadprzewodniki umieszczone w podwoziu pociąg jest w stanie lewitować nad torowiskiem zbudowanym z układu elektromagnesów. Oznacza to całkowite wyeliminowanie kontaktu z podłożem, a więc minimalizację strat

związanych z tarciem. W porównaniu z konwencjonalnymi liniami dużych prędkości kolej magnetyczna pozwala na 30% redukcję zużycia energii. Ponadto zapewnia wysoki komfort jazdy dzięki minimalizacji drgań, wibracji oraz hałasu.

Obecnie kolej opierająca się na wykorzystaniu nadprzewodników funkcjonuje na trasie łączącej lotnisko w Szanghaju z centrum miasta. Maksymalna prędkość jaką osiąga ten najszybszy komercyjnie wykorzystywany pociąg wynosi 430 km/h. Maglev, przedstawiony na rysunku 9, pokonuje 30,5 kilometrową trasę w 8 minut ze średnią prędkością wynoszącą 228 km/h [19].

Rys. 9. Maglev – Shanghajski pociąg utrzymywany nad torami dzięki wykorzystaniu nadprzewodników [19]

5. Podsumowanie

Mimo, iż nadprzewodniki nie spełniły oczekiwań jakie im stawiano w przeszłości, ponieważ ówczesne rewolucyjne zastosowania okazały się nieopłacalne ekonomicznie, badania dotyczące nadprzewodnictwa wciąż stanowią istotną gałąź fizyki dającą nadzieję na znaczący rozwój techniki.

Aktualnie nadprzewodniki są wykorzystywane w wielu urządzeniach usprawniając ich pracę oraz pozwalając na oszczędności związane z zapotrzebowaniem na energię elektryczną. Pozwalają przede wszystkim na rozwój urządzeń wykorzystujących silne pola magnetyczne, a w przyszłości będą stosowane w coraz większej liczbie przyrządów w celu ograniczenia strat energetycznych.

Znaczący postęp w dziedzinie wytwarzania materiałów nadprzewodzących oraz ich wykorzystania nastąpił wraz z odkryciem nadprzewodników wysokotemperaturowych. Wartość ich temperatury krytycznej pozwala na zastąpienie używanego do chłodzenia ciekłego helu azotem, co jest równoznaczne z obniżeniem kosztów. Naukowcy

prześcigają się w odkrywaniu związków o coraz wyższej temperaturze krytycznej oraz w dopracowywaniu technologii związanych z już poznanymi nadprzewodnikami. Rewolucji należy się jednak spodziewać z chwilą odkrycia związku wykazującego właściwości nadprzewodzące w temperaturze pokojowej.

Literatura

1. Stankowski J., Czyżak B. *Nadprzewodnictwo,* Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa (1999)
2. Kamerlingh Onnes H. *Commun. Phys. Lab. Univ. Leiden. Suppl*. 29, 120 (1911)
3. https://en.wikipedia.org/wiki/Meissner_effect - marzec 2016
4. Bednorz J.G., Müller K.A., *Phys*. B 64, 189 (1986)
5. Smoliński S. *Nadprzewodnictwo, zastosowania*, Wydawnictwa Naukowo - Techniczne, Warszawa 1983
6. http://www.npl.co.uk/science-technology/strategic-research/projects/anomalous-critical-fields-in-quantum-critical-superconductors – marzec 2016
7. Miksiewicz R. *Zastosowanie wysokotemperaturowych materiałów nadprzewodnikowych w maszynach elektrycznych i transformatorach,* Zeszyty Problemowe – Maszyny Elektryczne Nr 71/2005
8. Blundel S. *Superconductivity A Very Short Introduction*, Oxford University Press Inc., New York 2009
9. https://pl.wikipedia.org/wiki/Tunelowanie_Josephsona- marzec 2016
10. Simon R., Smith A. *Superconductors*: *conquering technology's new frontier,* Springer Science+Business Media, LLC
11. Bremer J. W. *Urządzenia nadprzewodnikowe,* Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1965
12. http://www.oxford-instruments.com/products/superconducting-magnets-and-wire/superconducting-wire/nb3sn-iter-lowloss - marzec 2016
13. https://gigaom.com/2010/10/06/superconducting-wire-powering-up-korean-smart-grid/- marzec 2016
14. Ferracin P., Caspi S., Felice H., Leitner D., Lyneis C., M., Prestemon S., Sabbi G. L., Todd D. S., *Nb_3Sn superconducting magnets for electron cyclotron resonance ion sources*, Review of Scientific, (2009).
15. https://pl.wikipedia.org/wiki/Tokamak – marzec 2016
16. https://pl.wikipedia.org/wiki/Stellarator – marzec 2016
17. https://www.iter.org/mach – marzec 2016
18. http://www.kierunekenergetyka.pl/magazyn,energetyka-termojadrowa-mit-czy-bliska-rzeczywistosc.html – marzec 2016
19. http://www.stuff.co.nz/travel/news/63558825/Whats-the-worlds-fastest-passenger-train – marzec 2016

Praktyczne zastosowania materiałów w stanie nadprzewodzącym

Celem pracy jest zaprezentowanie przeglądu współczesnych zastosowań materiałów w stanie nadprzewodzącym.
Nadprzewodniki są substancjami, które poniżej pewnej temperatury, nazywanej temperaturą krytyczną, uzyskują szczególne właściwości, do których zaliczyć należy między innymi zerowy opór elektryczny. Ta wyjątkowa cecha pozwala konstruować przewody o doskonałych parametrach. Pierwszy raz nadprzewodniki zostały wykorzystane w rezonansie magnetycznym, jako magnesy nadprzewodzące, co pozwoliło zminimalizować straty wynikające z nagrzewania się urządzeń podczas przepływu prądu o dużej mocy. Inną cechą charakterystyczną materiałów w stanie nadprzewodzącym jest wypychanie z ich wnętrza pola magnetycznego. Zjawisko to zostało wykorzystane np. do stworzenia lewitujących pociągów poruszających się bez tarcia z ogromnymi prędkościami.
Ze względu na swoje unikatowe cechy nadprzewodniki znajdują liczne zastosowania od detekcji pól magnetycznych, magazynowania energii, układów przełączających czy obwodów mikrofalowych po urządzenia do przeprowadzania reakcji termojądrowych.
Technologie pozwalające na wykorzystanie nadprzewodników są wciąż doskonalone, dlatego badania dotyczące nadprzewodnictwa mogą mieć istotny wpływ na rozwój nauki i techniki.
W ramach pracy zostaną scharakteryzowane najważniejsze rozwiązania technologiczne, w których praktycznie wykorzystuje się występowanie stanu nadprzewodzącego.
Słowa kluczowe: nadprzewodnik, temperatura krytyczna, nowoczesne technologie

Practical applications of materials in the superconducting state

The aim of the publication is to present a review of modern applications of materials in the superconducting state.
Superconductors are materials that below a certain temperature, called the critical temperature, obtain special properties, which include electrical resistance equal to zero. This special feature allows to create wires with perfect properties. For the first time superconductors are used in magnetic resonance imaging, as the superconducting magnets, which could minimize losses of energy resulting from the heating of the equipment during of the high power current flow. Another characteristic property of materials in the superconducting state is pushing out the magnetic field from the interior. This phenomenon has been used for example to create levitating trains moving without friction with enormous velocities.
Due to its unique characteristics the superconductors have many applications like the detection of magnetic fields, energy storage, switching arrangements, microwave circuits or facilities for carrying out the reaction of thermonuclear fusion.
Technologies capable of the use of superconductors is still developing, which is why research on superconductivity may have a significant impact on the development of science and technology.
As part of this work we have characterized most important technologies in which the superconductors there are practically used.
Keywords: superconductor, critical temperature, modern technologies

Adrian Dubicki[1]

Technologie i metody wytwarzania indywidualnych implantów kostnych

1. Wstęp

Nieustannie rosnące tempo życia sprawia, że każdy z nas ma coraz mniej czasu na zatroszczenie się o swoje zdrowie. Przyczynia się to również do coraz liczniejszych i bardziej zaawansowanych problemów z układem mięśniowo-szkieletowym. Medycyna wypracowała szereg standardowych rozwiązań, lecz często rozległość uszkodzeń nie pozwala na ich zastosowanie. W takich przypadkach często jedynym rozwiązaniem stają się implanty indywidualne.

Rozwój techniki w znaczący sposób przyczynia się do rozwoju indywidualnego podejścia do pacjenta, jego schorzenia. Staje się to widoczne obserwując drogę pacjenta od diagnozy, przez podjęcie decyzji o leczeniu, aż do jego zakończenia. Na każdym kroku pacjentowi towarzyszy nowoczesna technika, przy pomocy której nawet najbardziej zaawansowane schorzenia czy uszkodzenia nie wydają się być beznadziejnymi.

Szczególnie widoczne jest to w ortopedii. Do niedawna wykonanie opracowanego dla danego implantu było procesem żmudnym, często niemożliwym. Obecna technika pozwala na wykorzystanie danych diagnostycznych, opracowanie na ich podstawie modelu cyfrowego implantu przeznaczonego dla konkretnego pacjenta i jego wytworzenie na urządzeniach ubytkowych lub przyrostowych.

2. Cel pracy

Zamysłem niniejszej pracy jest przedstawienie metod i technologii wytwarzania, coraz częściej stosowanych implantów indywidualnych, będących często jedynym ratunkiem dla pacjentów z zaawansowanymi schorzeniami czy uszkodzeniami. W pracy został uwzględniony podział na metody ubytkowe i przyrostowe.

Szczególną uwagę poświęcono metodom przyrostowym, które dają bardzo dobre efekty, dokładne odwzorowanie modelu komputerowego implantu przy wytwarzaniu wszczepu. Spośród metod przyrostowych opisane zostały technologie mogące służyć do wytworzenia gotowych

[1] a.dubicki@doktoranci.pb.edu.pl, Katedra Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Białostocka, www.pb.edu.pl

implantów – selektywne spiekanie laserowe (SLS) i selektywne topienie laserowe (SLM).

3. Schorzenia wymagające wykorzystania indywidualnych wszczepów

Najczęstszymi schorzeniami, które wymagają zastosowania implantów indywidualnych są złamania (głównie z powikłaniami), choroby nowotworowe, wysokoenergetyczne zdarzenia, (wypadki komunikacyjne, upadki z wysokości) oraz zwyrodnienia, deformacje i martwice kości [1].

Złamania, zwyrodnienia stawów czy deformacje często wymagają zastosowania endoprotez. Medycyna wypracowała sobie dziesiątki rozmaitych rozwiązań, różniących się budową, materiałem i sposobem mocowania. Stosowanie endoprotez wiąże się również z problemami. Najpoważniejszymi z nich jest ryzyko zwichnięcia stawu, poluzowania elementów endoprotezy, jak i również zużycie materiału powierzchni sztucznego stawu. Wprowadza to konieczność ograniczenia aktywności osób po alloplastyce, a w przypadku zużycia – jej wymiany. Protezy wtórne nazywane są rewizyjnymi. Niestety zużycie takiej protezy może wiązać się z koniecznością unieruchomienia stawu. Jedynym ratunkiem pozostawiającym ruchomość stawu jest opracowanie indywidualnej konstrukcji, dokładnie dopasowanej do pozostałego kośćca [2].

Prawdziwą plagą naszych czasów stały się choroby nowotworowe. Zmiany takie mogą pojawić się w niemal każdej okolicy ciała, mogą zająć każdy układ i narząd, również narządu ruchu. Wyniki leczenia zmian nowotworowych zależą w głównej mierze od ich wczesnego rozpoznania, co jest często trudne, gdyż początkowe objawy nie są charakterystyczne. Leczenie dobierane jest w zależności od rodzaju nowotworu. Zmiany łagodne w obrębie kośćca wymagają jedynie zabiegu chirurgicznego i wycięcia, wyłyżeczkowania lub wyfrezowania zmiany oraz uzupełnienia przeszczepem kostnym lub stabilizowany płytkami. Zmiany złośliwe wymagają tzw. leczenia skojarzonego, z dodatkowym zastosowaniem chemio- i/lub radioterapii. Zaawansowane zmiany mogą wymagać zastosowania implantów spersonalizowanych [1].

Kolejnym przykładem wymagającym wykorzystanie indywidualnych środków są tzw. zdarzenia wysokoenergetyczne – wypadki komunikacyjne, upadki. Powstałe w ich skutek wieloodłamowe złamania uniemożliwiają wykorzystanie standardowych płytek, śrub czy gwoździ zespalających. W takim przypadku odłamy kostne muszą być zastąpione przygotowanym implantem. Częstymi przypadkami w których obecnie stosowane są takie rozwiązania to ubytki kostne czaszki. Implanty takie nie wymagają znacznej wytrzymałości, co konieczne jest dla wszczepów zastępujących

kości przenoszące znaczne obciążenia (głównie uzupełniające, zastępujące tkankę kości czy stawów biorących udział w lokomocji), a stanowi pewien problem przy ich wytwarzaniu metodami przyrostowymi [1, 3, 4]

Przy obecnym stanie techniki i nauki, lekarze we współpracy z inżynierami mogą tworzyć implanty niemal każdej części ciała. Oprócz wytwarzanych z różnych materiałów wszczepów, mogących zastąpić kości, coraz częściej można spotkać się z uzupełnieniem innych tkanek [5].

4. Wytwarzanie implantów indywidualnych

Wytwarzanie standardowych implantów oparte jest na procesach odlewania, kucia, cięcia, wiercenia oraz toczenia i frezowania. Opracowane przez firmy z branży ortopedycznej procesy technologiczne pozwalają na seryjną produkcję standardowych wyrobów, które będą spełniać wszystkie stawiane im wymagania, a koszty ich produkcji pozwolą na konkurencyjność z innymi korporacjami.

Implanty indywidualne wymagają innego podejścia. Jednostkowa produkcja takiego wyrobu sprawia, że wykorzystanie metod stosowanych do produkcji masowej staje się nieopłacalne, a wręcz niemożliwe ze względu na konieczność dokładnego odwzorowania kształtu implantu indywidualnego. Proces projektowania indywidualnych implantów z obrazów pochodzących z urządzeń diagnostycznych zachęca, ale i wymusza zastosowanie technik wytwarzania ze wspomaganiem komputerowym (ang. *Computer Aided Manufacturing* – CAM).

Najczęściej spotykaną formą wytwarzania implantów spersonalizowanych są techniki przyrostowe. Pozwalają one na dokładne odwzorowanie komputerowego modelu implantu i jego niemal natychmiastowe wszczepienie. Nie są one jednak jedynym możliwym rozwiązaniem. Rozwój współczesnych urządzeń do wytwarzania metodą ubytkową, które opierają się na sterowaniu przez system komputerowy sprawił, że mogą być one z powodzeniem wykorzystane w produkcji nawet dosyć skomplikowanych implantów.

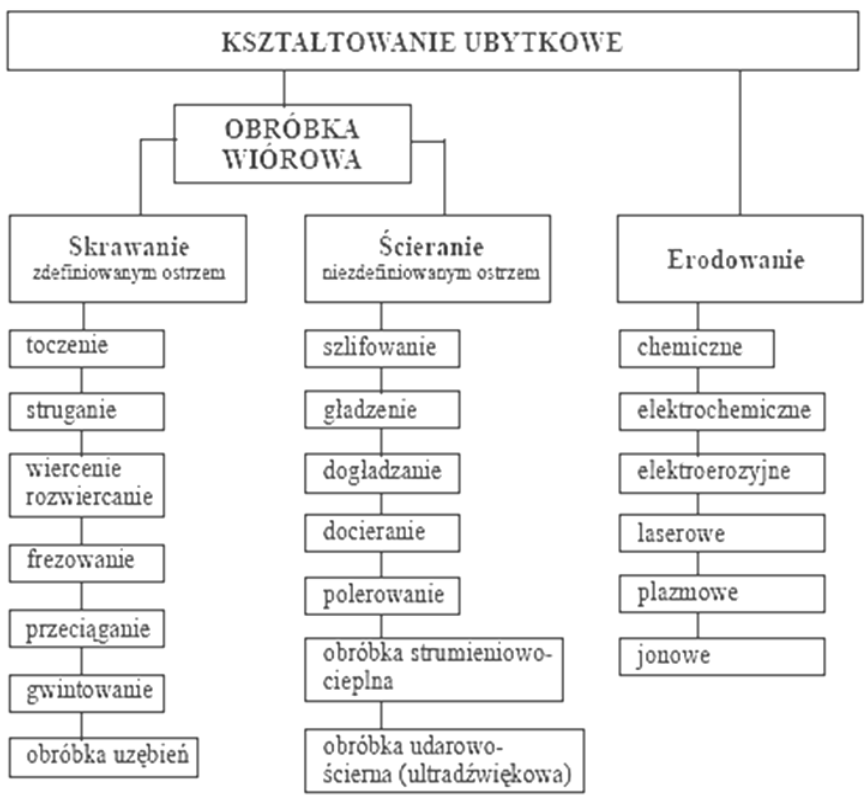
4.1. Metody ubytkowe

Nadanie kształtu wyrobowi poprzez stopniowe usuwanie nadmiaru z przyjętego wstępnie w większej ilości materiału, poprzez jego skrawanie, ścieranie lub erodowanie, nazywane jest kształtowaniem ubytkowym wyrobów [6].

Pierwsze urządzenia służące do ubytkowego kształtowania przedmiotów pochodzą z czasów prehistorycznych, a dokładniej epoki żelaza. Przykładałem może być tokarka z około 1200 roku p.n.e. używana w Mykenach. Napędzane poprzez naciskanie pedału, obrabiające drewno tokarki były

stosowane również przez Etrusków (700 r. p.n.e.) oraz Egipcjan (200 r. p.n.e.). W średniowieczu urządzenia zostały udoskonalone, poprzez dodanie napędu siłą wody. Masowy rozwój obrabiarek, spowodowany rewolucją przemysłową, można zaobserwować pod koniec XVIII wieku. To wtedy wprowadzone zostały nowe rozwiązania wiertarek, tokarek i frezarek, często funkcjonujące do czasów współczesnych. Wiek XX przyniósł rozwój automatyzacji i komputeryzacji produkcji, co widoczne jest również w konstrukcjach obrabiarek, w których starano się zminimalizować udział człowieka w obsłudze urządzeń [7].

Kształtowanie poprzez ubytek materiału może odbywać się metodami skrawania, ścierania lub erodowania. Podział przedstawiony został na rysunku 1.



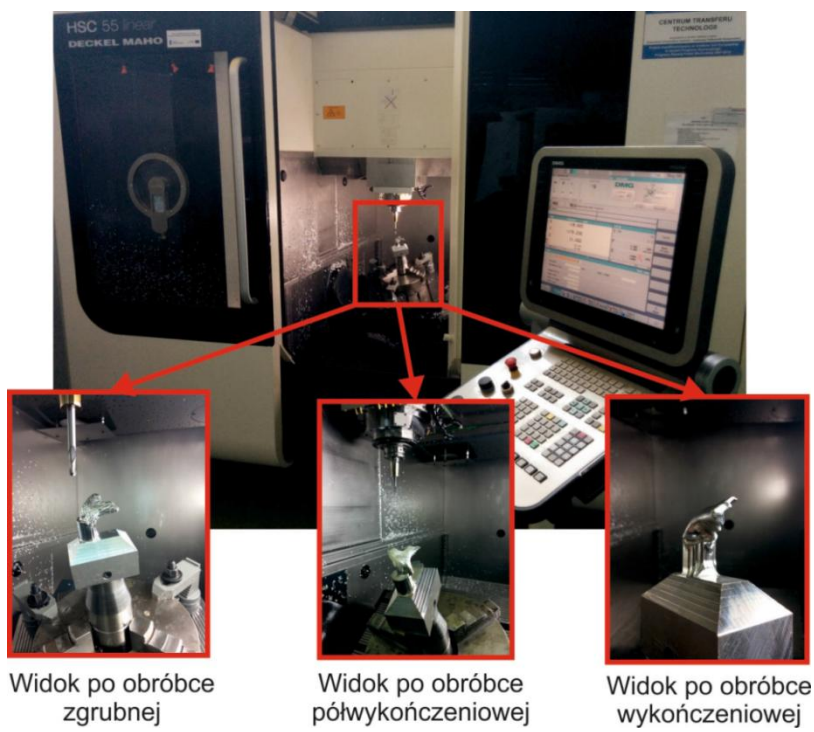
Rysunek 1. Schemat podziału metod kształtowania ubytkowego [6]

Obróbka wiórowa polega na usuwaniu, z wykorzystaniem energii mechanicznej, materiału w postaci wiórów. Mogą one być oddzielane przy użyciu pojedynczego lub wielu ostrzy o znanym kształcie, geometrii

(skrawanie) lub wręcz niezliczoną liczbą ostrzy, o nieznanej geometrii (ścieranie). Obróbka erozyjna wykorzystuje do usuwania materiału różnego rodzaju zjawiska erozyjne. Stosowana jest głównie przy materiałach trudnoskrawalnych [6].

Do wytwarzania przedmiotów stosowanych do celów medycznych, wymienione metody mogą i są z powodzeniem wykorzystywane przy produkcji seryjnej. Produkcja indywidualnych implantów, dokładne odwzorowanie ich geometrii z modeli numerycznych wymaga zastosowania zaawansowanych obrabiarek CNC (ang. *Computerized Numerical Control*) [8].

Sterowanymi numerycznie obrabiarkami, które umożliwiają wykonanie indywidualnego implantu o zaawansowanej geometrii są pięcioosiowe centra obróbkowe. Umożliwiają one wytworzenie nawet najbardziej skomplikowanych przedmiotów dla przemysłu lotniczego (np. turbin), medycznego, kosmicznego i elektronicznego. Obrabiarki te umożliwiają obróbkę detali o bardzo złożonych kształtach (odwzorowanie biomodeli) oraz osiąganie dużych gładkości obrabianych powierzchni dzięki działaniu w pięciu osiach [8].



Rysunek 2. Wytwarzanie implantu kości jarzmowej w 5-cio osiowym centrum obróbkowym [8]

Obróbka materiału rozpoczyna się od wgrania wcześniej przygotowanego pliku z modelem powierzchniowym wytwarzanej części. Następnie użytkownik ma za zadanie zamodelować część chwytową urządzenia oraz półfabrykat. Ważnym etapem jest również dobór narzędzi. Program obrabiarki przygotowuje plan obróbki i generuje ścieżki ruchu frezów [8]. Po przeprowadzeniu komputerowej symulacji obróbki, umieszczeniu półfabrykatu i narzędzi, centrum obróbkowe rozpoczyna pracę (rysunek 2).

Program obrabiarki dzieli przeważnie proces obróbki na trzy etapy: obróbkę zgrubną, kształtującą i wykończeniową. Taki podział na etapy pozwala na stopniowe usuwanie materiału i dokładne wykonanie przedmiotu.

Wykorzystanie pięcioosiowych centr obróbkowych pozwala na produkcję implantów o skomplikowanych kształtach. Uzyskany wyrób jest wykonany z dużą dokładnością. W tej metodzie występują jednak pewne mankamenty. Ze względu na konieczność zastosowania uchwytu, nie otrzymujemy gotowego produktu. Musi on być poddany dodatkowej obróbce mającej na celu jego usunięcie. Oprócz tego problemu, zaawansowane centra obróbkowe w zupełności mogą być wykorzystywane do wykonania modeli średnio skomplikowanych struktur anatomicznych [8].

4.2. Metody przyrostowe

Wytwarzanie fizycznych, przestrzennych obiektów z modeli komputerowych, poprzez dodawanie kolejnych warstw materiału, nazywa się kształtowaniem przyrostowym. W przeciwieństwie do metod ubytkowych, w których otrzymany przedmiot jest mniejszy od materiału wejściowego oraz występuje odpad, metody przyrostowe prawie nie generują odpadów [9].

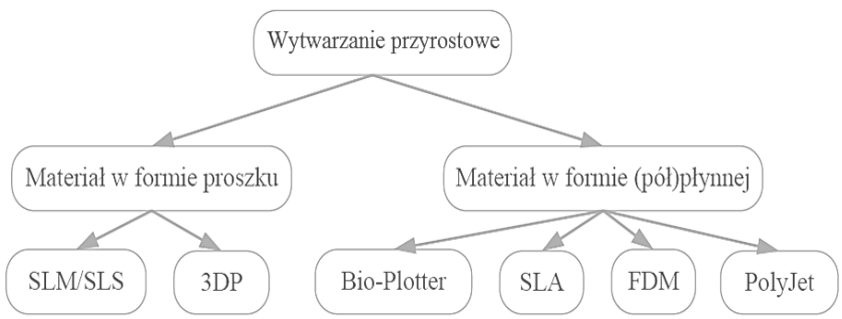
Wiele osób uważa, że metody przyrostowe są współczesnymi technikami kształtowania wyrobów, lecz ich historia sięga lat osiemdziesiątych XX wieku. Ten mylny pogląd wynika z obecnie obserwowanego wzrostu popularności technik przyrostowych, nagłaśniania przez media coraz to nowszych zastosowań oraz znaczący spadek cen niektórych urządzeń addytywnych, przez co technika ta jest bardziej dostępna [9].

Pierwszą metodą wykorzystującą technikę przyrostową była stereolitografia (ang. *Stereolithography* – SLA). Ta opracowana przez Charlesa Hull'a metoda, została przedstawiona w 1984 roku, a pierwszym wykonanym przedmiotem była filiżanka. W 1986 roku Hull otrzymał ochronę patentową na swój wynalazek i założył firmę 3D Systems. Metoda opiera się na lokalnym oddziaływaniu, emitowanych przez laser promieni UV na jednorodny ośrodek i zmianie jego stanu fazowego. Proces ten nosi nazwę fotopolimeryzacji. Pod wpływem wiązki promieni UV, w płynnej żywicy rozpoczynają się procesy budowy łańcuchów polimerowych. Wraz z techniką stereolitografii, powstał również format plików STL, który jest

obecnie powszechnie wykorzystywany do wymiany danych między komputerem, a drukarką 3D [9, 10].

Obecnie najpopularniejszą metodą wytwarzania przyrostowego jest opracowana w 1988 roku przez Scotta Crumpa, technika osadzania topionego materiału (ang. *Fused Deposition Modeling* – FDM). Polega ona na nanoszeniu kolejnych warstw budowanego modelu, przy użyciu podgrzewanych dysz, do których dostarczany jest i topiony, a następnie przez nienanoszony, warstwa po warstwie materiał budulcowy. Popularność metody wynika m.in. z wygaśnięcia ochrony patentowej na ten wynalazek oraz możliwości skonstruowania prostych urządzeń z ogólnie dostępnych komponentów [9, 10].

Innowacyjność technik przyrostowych sprawiła, że powstawały coraz to nowsze metody tworzenia addytywnego przedmiotów. Na rysunku 3 zaprezentowane zostały obecnie stosowane metody przyrostowe z podziałem według rodzaju stosowanego materiału.



Rysunek 3. Metody wytwarzania przyrostowego z podziałem ze względu na postać stosowanego w produkcji materiału [11]

Opisane metody znajdują zastosowanie również w medycynie. Obecnie służą głównie do tworzenia fizycznych modeli, pomagających lekarzom w zaplanowaniu przebiegu operacji. Stereolitografia może być również stosowana do produkcji implantów, które nie będą poddawane znacznym obciążeniom. Osadzanie topionego materiału, z pewnymi modyfikacjami może być wykorzystywane do wytwarzania resorbowalnych rusztowań dla komórek macierzystych [11, 12].

Największe zastosowanie w medycynie, jeżeli chodzi o produkcję indywidualnych implantów, znajdują techniki przyrostowe, które umożliwiają wykorzystanie proszków metali. Do takich metod należą selektywne spiekanie laserowe oraz selektywne topienie laserowe.

4.2.1. Selektywne spiekanie laserowe (SLS)

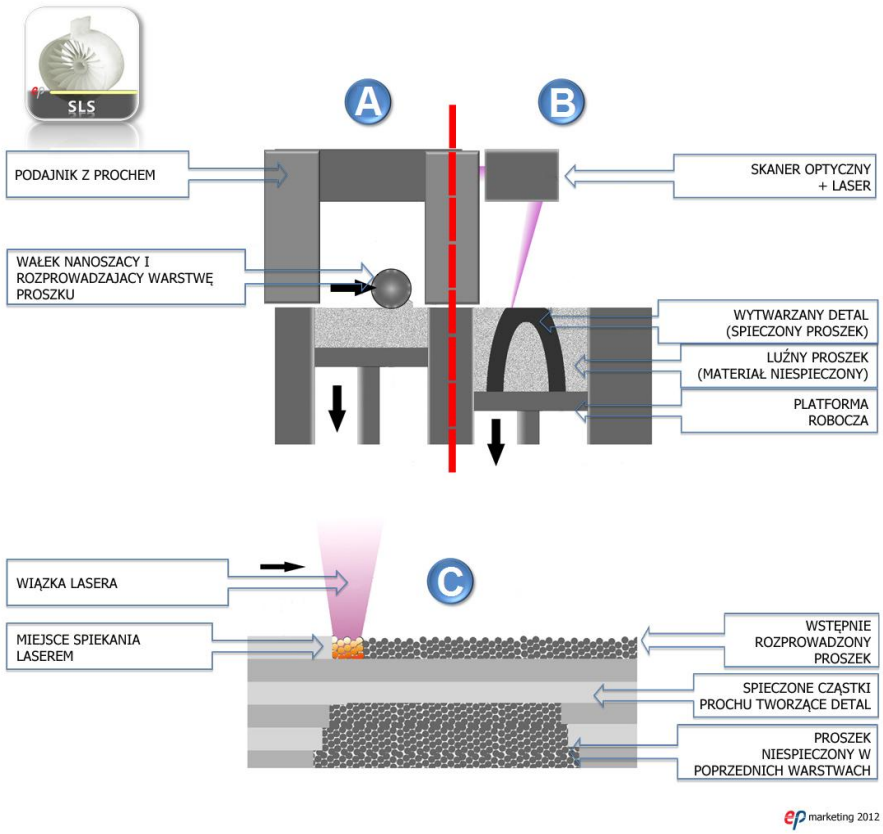
Selektywne spiekanie laserowe (ang. *Selective Laser Sintering* – SLS) jest metodą bardzo podobną do stereolitografii. Główną różnicą jest stosowany materiał, który w tej metodzie występuje w postaci proszków [13].

Historia tej metody sięga roku 1979, kiedy to Ross Hausholder opatentował system warstwowego formowania obiektów przy użyciu spiekającego materiał lasera. Idea spiekania została zaczerpnięta z obserwacji przyrody. Hausholder jadąc do pracy zaobserwował fale, które nanosiły kolejne warstwy piasku. Jednak z przyczyn finansowych, spiekanie laserowe nie zostało skomercjalizowane przez jego pomysłodawcę. Niezależne prace prowadził również Carl Decard, który postanowił wykorzystać układ sterujący maszyn CNC i połączyć go z pracą lasera. Po blisko trzyletnim przygotowaniu, w 1984 roku przedstawił on koncepcję selektywnego spiekania laserowego. Metoda ulegała stopniowemu rozwojowi, co doprowadziło do jej skomercjalizowania, m.in. dzięki pomocy Uniwersytetu Teksańskiego [9, 10, 13].

Metoda opiera się na działaniu, poruszającej się po wyznaczonej ścieżce i powodującej spieczenie proszków, skupionej wiązki światła laserowego. Spieczenie proszków odbywa się samorzutnie, wraz ze wzrostem temperatury. Drobne, stykające się ze sobą ziarna materiału, wiążą się ze sobą po podgrzaniu do 60-85% temperatury topnienia [9, 10]. Schemat działania metody SLS przedstawia rysunek 4.

Urządzenia do selektywnego spiekania laserowego są zbudowane z umieszczonej w podgrzewanej komorze platformy, wyposażonej w stół roboczy (ruch w osi Z), lasera z systemem soczewek (ruch w osiach X i Y) oraz dystrybutora proszku wraz z systemem rozprowadzania proszku i wyrównywania jego powierzchni [13].

Wytwarzanie detali rozpoczyna się od przygotowania i zaimportowania modelu komputerowego. Oprogramowanie urządzenia dzieli model na prostopadłe do osi Z warstwy o grubości zależne od możliwości urządzenia oraz potrzeby dokładności odwzorowania. Wiązka lasera, powoduje lokalne podwyższenie temperatury i w rezultacie spieczenie proszku. Po zakończeniu budowy warstwy, stolik roboczy obniża się w osi Z o zaprogramowaną wartość, równą grubości pojedynczej warstwy. Dystrybutor podaje określoną, odpowiednią ilość proszku, która rozprowadzana jest przez rolkę rozprowadzającą. Podporę dla kolejnych warstw stanowi spieczony oraz rozprowadzony proszek. Te kroki powtarzane są wielokrotnie, aż do wykonania ostatniej zaplanowanej warstwy i zakończenia budowy przedmiotu. [9, 13].



Rysunek 4. Schemat działania metody SLS (A – rozprowadzenie proszku z komory podajnika, B – rozpoizęcie procesu spiekania, C – proces spiekania) [14]

Metoda SLS znalazła zastosowanie w produkcji przedmiotów o skomplikowanych kształtach. Możliwość wykorzystania szerokiej gamy materiałów, m.in. proszków metali (stopy tytanu, stali, kobaltu), ceramiki (hydroksyapatyt, fosforany wapnia) i tworzyw sztucznych, sprawia że staje się coraz częściej wykorzystywana. Metoda ta daje również dobre rezultaty w dokładności odwzorowania i jakości powierzchni (tolerancja – 0,2 mm) [9]. Dużą zaletą jest również brak podpór, który umożliwia wykonanie przedmiotów o bardzo skomplikowanych kształtach [13]. Dodatkową zaletą jest wysoka wytrzymałość na rozciąganie otrzymanych przedmiotów (50 MPa) [9].

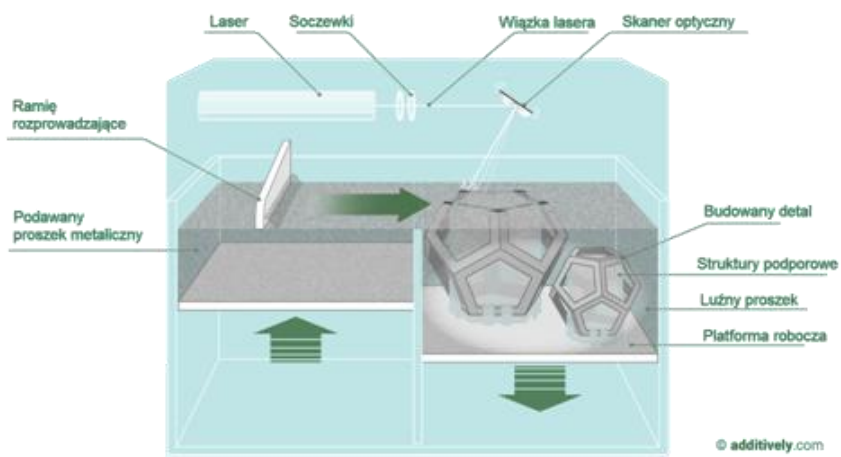
Dobre rozwiązania są jednak nierozerwalnie związane z dużym kosztem. Dotyczy on głównie zakupu urządzeń oraz przygotowania zaplecza do pracy z proszkami (wyciągi, wentylacja). Urządzeniom SLS

trudności sprawia również formowanie płaskich powierzchni, głównie ze względu na powstające w trakcie procesu różnice temperatury. Wady metody nie są dużym utrudnieniem i znalazła ona zastosowanie m.in. w przemyśle samochodowym, lotniczym, odlewnictwie oraz oczywiście medycynie [9, 13].

4.2.2. Selektywne topienie laserowe (SLM)

Selektywne topienie laserowe (ang. *Selective Laser Melting* – SLM) jest metodą formowania przyrostowego, bardzo podobną do selektywnego spiekania laserowego. Główną różnicą jest energia generowana przez laser, która powoduje lokalne podwyższenie temperatury proszku i jego stopienie. Nie dochodzi do spiekania proszku, a do przejścia z materiału o stanie stałym (proszek), poprzez stan ciekły, ponownie do stanu stałego [15].

Metoda topienia laserowego rozwijana była równolegle ze spiekaniem laserowym. Jest intensywnie rozwijaną przez konkurencyjne firmy techniką, co powoduje stosowanie różnego nazewnictwa (np. DMLS – ang. *Direct Metal Laser Sintering*). Konstrukcja takich urządzeń niemal nie różni się od budowy omawianych maszyn SLS. W urządzeniu SLM można spotkać nóż (zamiast rolki rozprowadzającej), który dodatkowo służy do ścinania nierówności przetopowych [9, 16]. Schemat urządzenia przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat urządzenia i działania metody SLM [17]

Proces przetapiania metali wiąże się z szybkim skurczem materiału, pod wpływem dużych różnic temperatur. Aby uniknąć deformacji wykonywanego detalu, konieczne jest zastosowanie podpór. Jest to dużą wadą tej metody, gdyż wykonany element musi być po zakończonym procesie

odcięty od stołu roboczego i poddany dodatkowej obróbce, w celu usunięcia podpór [15, 16].

SLM znalazł zastosowanie m.in. w jubilerstwie. Tą metodą otrzymywane są również części do silników oraz różnego rodzaju prototypy. Stomatologia wykorzystuje ją do produkcji koron i mostów oraz indywidualnych implantów stomatologicznych [15].

Selektywne topienie laserowe pozwala otrzymać efekty podobne do tych, uzyskiwanych w procesie odlewania. Głównymi stosowanymi materiałami są tu proszki brązu, stopu kobaltu z chromem, stali nierdzewnej, czystego tytanu oraz stopu tytanu z aluminium. Wady jak i zalety SLM są podobne do metody SLS. Przy porównaniu tych metod można zauważyć, że topienie laserowe pozwala otrzymać detale o lepszych własnościach mechanicznych, ale dużą wadą jest konieczność stosowania podpór [15, 16].

5. Podsumowanie

Coraz szybszy tryb życia, nie przejmowanie się o swoje zdrowie, nieprawidłowe żywienie, używki – wszystko to przyczynia się do powstawania licznych schorzeń. Pomimo że organizm sam próbuje zwalczyć swoje nieprawidłowe funkcjonowanie i dając wyraźne sygnały swego wadliwego działania, są one przez nas bagatelizowane. Gdy dojdzie do poważnych zmian często jest za późno na wprowadzenie standardowych rozwiązań.

Współczesna technika i nauka dają jednak nadzieje na odzyskanie sprawności, w postaci indywidualnych implantów. Stają się one coraz powszechniej stosowanym sposobem zastąpienia uszkodzonych tkanek i przywrócenia pełnionych przez nie funkcji. Oprócz zwiększonego zapotrzebowania, przyczynia się do tego również rozwój techniki, który umożliwia przygotowanie i wytworzenie idealnie dopasowanych wszczepów.

Indywidualne implanty mogą być wytwarzane metodami ubytkowymi lub przyrostowymi. Metody ubytkowe polegają na stopniowym usuwaniu nadmiaru z przyjętego wstępnie w większej ilości materiału. Otrzymany implant, przy wykorzystaniu odpowiedniego materiału, charakteryzuje się odpowiednią wytrzymałością i innymi właściwościami wymaganymi od wszczepów. Nieznaczną wadą tej metody jest konieczność zastosowania uchwytu, przez co nie otrzymujemy gotowego produktu, a wyjęty z urządzenia implant wymaga jeszcze dodatkowej obróbki (m.in. usunięcie wspomnianego uchwytu). Oprócz tego, wykonanie elementów o bardzo zaawansowanej przestrzennej budowie może być niewykonalne, ze względu na brak możliwości dojścia narzędzia w niektóre miejsca i ich prawidłową obróbkę.

Metody przyrostowe polegają na wytwarzaniu fizycznych, przestrzennych obiektów z modeli komputerowych, poprzez dodawanie

kolejnych warstw materiału. Do produkcji implantów, ze względu na konieczność zastosowania biozgodnego metalu, nadają się dwie metody – selektywne spiekanie laserowe (SLS) i selektywne topienie laserowe (SLM). Obydwie metody różnią się od siebie małymi, lecz znaczącymi szczegółami.

SLM pozwala na otrzymanie produktu zbliżonego właściwościami do odlewu. Podczas procesu formowania dochodzi do przetopienia proszku i jego połączenia, czemu towarzyszy jednak szybki skurcz materiału związany z dużą różnicą temperatur. Stanowi to znaczny mankament metody, gdyż konieczne jest zastosowanie podpór, które później muszą być usunięte podczas obróbki wykańczającej. Produkcja elementów przy wykorzystaniu technologii SLS wymaga mniejszych temperatur, gdyż podczas przejścia wiązki lasera dochodzi tylko do nagrzania materiału do temperatury potrzebnej do połączenia cząstek proszku. Dochodzi do spiekania materiału i jego połączenia. Niższa różnica temperatur niweluje efekt skurczu materiału i nie wymaga zastosowania podpór, a otrzymany element prawie nie wymaga dodatkowej obróbki wykańczającej. Minusem tej technologii jest niestety mniejsza wytrzymałość w porównaniu do SLM, co może okazać się niewystarczającym przy produkcji implantów przenoszących znaczne obciążenia.

Zarówno metody ubytkowe jak i przyrostowe mają zalety i wady. Metody ubytkowe pozwalają na przygotowanie wytrzymałych implantów, lecz o nie bardzo skomplikowanych kształtach. Metody przyrostowe dają niemal nieograniczone możliwości w odniesieniu do kształtu implantu, lecz konieczność zastosowania podpór lub niewystarczająca wytrzymałość stanowi dużą przeszkodę.

Medycyna jak i technika nie stoją w miejscu. Pojawiające się potrzeby napędzają rozwój. Z całą pewnością można stwierdzić że za kilka czy kilkanaście lat zaprezentowane w niniejszym opracowaniu metody zostaną znacząco dopracowane, a niewykluczone że pojawia się nowe i jeszcze lepsze rozwiązania produkcji indywidualnych implantów.

Literatura

1. *Ortopedia i traumatologia*. Praca zbiorowa pod redakcją naukową T. S. Gaździka. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2010, ISBN 978-83-200-4165-1
2. Madej T. *Modelowanie strefy ruchowej endoprotezy stawu biodrowego w aspekcie biomateriałów.* Kraków: 2008, Praca doktorska, Wydział inżynierii mechanicznej i robotyki, Akademia Górniczo-Hutnicza
3. Otrębska M., Wyleżoł M.: *Modelowanie implantów w kranioplastyce – od tomografii komputerowej do modelu wirtualnego*. Warszawa: Międzynarodowy Kongres CAx Innovation, 2013

4. Trusscott M., Beer D., Vicatos G., Hosking K., Barnard L., Booysen G., Campbrll R. I. *Using RP to promote collaborative design of customised medical implants*. Bloemfontein-Cape Town: Rapid Prototyping Journal, 2007, tom 13, numer 2, s. 107-114
5. KuberaG.:*Druk3Dprzyszłością biomedycyny[online]* http://www.pcworld.pl/artykuly/394433_1/Druk.3D.przyszloscia.biomedycyny.html [dostęp: 6 II 2016 r.]
6. Storch B. *Podstawy obróbki skrawaniem*. Koszalin: Wydawnictwo Politechniki Koszalińskiej, 2001
7. Zielińska A., Herma S. *Historia i tendencje rozwoju obrabiarek*. Koszalin: Wydawnictwo Politechniki Koszalińskiej, Modele inżynierii teleinformatyki pod redakcją K. Bzdyry, 2009, tom 4, s. 255-260
8. Budzik G., Burek J., Dziubek T., Gdula M., Płodzień M., Turek P. *Analiza dokładności modelu kości jarzmowej, wykonanego na 5-osiowym centrum obróbkowym.* Warszawa: Międzynarodowy Kongres CAx Innovation, 2015
9. Miecielica M. *Techniki szybkiego prototypowania - Rapid Prototyping.* Warszawa: Przegląd Mechaniczny, 2010, numer 2, s. 39-45
10. *Historia druku 3D [online]:* http://3dtech.cba.pl/historia-druku-3d [dostęp: 18 II 2016 r.]
11. Gonera K., Kurzac J., Rusińska M., Dybała B. *Metody CAx w aplikacjach medycznych przy wytwarzaniu technologiami generatywnymi*. Wrocław: Miesięcznik Naukowo-Techniczny Mechanik, 2010, tom 83, numer 2, s. 132-142
12. Markowska O., Budzik G. *Innowacyjne metody wytwarzania implantów kostnych za pomocą inżynierii odwrotnej (RE) oraz technik szybkiego prototypowania (RP).* Sosnowiec: X Forum Inżynierskie ProCAx, 2011
13. *SLS - Selective Laser Sintering [online]:* http://www.przyrostowo.pl/technologie/sls#.VKvNT010zcs [dostęp: 10 III 2016 r.]
14. *Drukowanie 3D - SLS/DMSL [online]:* http://www.e-drukowanie3d.pl [dostęp: 10 III 2016 r.]
15. Kiełpińska M. *SLS doskonałą technologią wytwarzania przedmiotów*. Design News Polska, 2008
16. *DMLS - Direct Metal Laser Sintering, SLM - Selective Laser Melting [online]:* http://www.przyrostowo.pl/technologie/dmls-slm#.VKvlO010zcs [dostęp: 18 III 2016 r.]
17. *Laser Meltinh [online]:* https://www.additively.com/en/learn-about/laser-melting [dostęp: 18 III 2016 r.]

Technologie i metody wytwarzania indywidualnych implantów kostnych

Streszczenie
Indywidualne implanty są coraz chętniej stosowaną alternatywą dla standardowych rozwiązań jak i podstawowym wyborem przy zaawansowanych zmianach nowotworowych, zwyrodnieniach czy skomplikowanych złamaniach. Do niedawna duży problem stanowiło ich wytwarzanie. Rozwój techniki i nauki daje coraz nowsze możliwości szybkiej produkcji spersonalizowanych wszczepów.
W pracy przedstawiono obecnie stosowane w produkcji indywidualnych implantów metody – ubytkowe i przyrostowe. Zaprezentowano ich główne odmiany oraz ich zalety i wady.
Słowa kluczowe: implanty, implanty indywidualne, SLS, SLM, obrabiarki CNC

The technologies and methods of individual bone implants manufacture

Abstract
Individual implants are becoming more readily used alternative for standard solutions as well as the primary choice for advanced neoplastic lesions, degenerations or complicated fractures.
Until recently, the major problem constituted the production. The development of technology and science gives more possibilities of rapid production of customized implants.
The paper presents currently used in the production of individual implants methods – cavities and incremental. The work presents the main technologies and the relative advantages and disadvantages.
Keywords: implants, individual implants, SLS, SLM, CNC machines

Anna Kamińska[1], Zdzisław Pakowski[2], Robert Adamski[3]

Analiza deformacji powierzchni żelu krzemionkowego suszonego konwekcyjnie

1. Wprowadzenie

Żele krzemionkowe są materiałem często wykorzystywanym w wielu gałęziach przemysłu. Najczęściej w formie wysuszonej, można je spotkać w formie silikażeli służących do pochłaniania wilgoci. Obecnie wiele ośrodków naukowych z całego świata skupia się nad wytworzeniem na bazie żeli krzemionkowych tzw. aerożeli – porowatych materiałów, o niskiej gęstości, wysokiej przepuszczalności światła widzialnego i niskim współczynniku przewodzenia ciepła. Od tego typu materiałów oczekuje się, że zastąpią dotychczas stosowane w budownictwie materiały izolacyjne i m.in. będzie je można stosować do wypełniania przestrzeni w oknach. Jednak niskie właściwości mechaniczne, konieczność zastosowania syntezy kilkuetapowej oraz uzyskiwanie najlepszych właściwości przy suszeniu nadkrytycznym pod wysokim ciśnieniem – znacząco ogranicza produkcję w skali przemysłowej a co za tym idzie praktyczne zastosowanie aerożeli krzemionkowych. Suszenie w warunkach nadkrytycznych ma niewątpliwie jedną zaletę, w znaczący sposób ogranicza lub w niektórych przypadkach eliminuje skurcz suszarniczy, pomimo tego jest to proces energochłonny, czasochłonny i wymaga stosowania rozpuszczalników w stanie nakrytycznym. Jednak nadal istnieje tylko kilkanaście prac, raportów z badań nad procesem odparowania rozpuszczalnika z żeli o niskiej gęstości, prowadzonego pod ciśnieniem atmosferycznym, co jest rozwiązaniem tańszym i niekiedy szybszym. Największy problem pojawia się jednak przy próbie wyeliminowania znaczącego skurczu suszarniczego i braku transparentności żeli uzyskanych tą metodą [1].

Dla suszenia klasycznego istnieje obszerna literatura, w której prezentowane są modele suszenia porównujące dane eksperymentalne z wynikami obliczeń. Większość z nich zaniedbuje skurcz suszarniczy, który jest

[1] anna.kaminska@dokt.p.lodz.pl, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, www.wipos.p.lodz.pl
[2] zdzislaw.pakowski@p.lodz.pl, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, www.wipos.p.lodz.pl
[3] robert.adamski@p.lodz.pl, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, www.wipos.p.lodz.pl

znaczący w przypadku suszenia konwekcyjnego, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z produktami rolnymi, spożywczymi czy materiałami budowlanymi takimi jak drewno, ceramika, gdzie skurcz jest kluczowym aspektem przy odparowaniu [2-3]. Również badania nad zjawiskami transportu masy i ciepła, które występują podczas suszenia różnych materiałów w postaci cząstek stałych, są istotne nie tylko z powodów technologicznych ale przede wszystkim pozwalają zrozumieć mechanizmy transportu w złożonych materiałach. Suszenie materiałów żelowych także stanowi wyzwanie. Wiele prac badawczych na drodze rozważań teoretycznych czy przy wykorzystaniu przeróżnych technik eksperymentalnych i pomiarów dynamicznie zmiennych właściwości materiału podczas suszenia, próbuje analizować i definiować mechanizmy odpowiedzialne za przenoszenia ciepła i masy w materiale, który ulega silnym odkształceniom [4-5].

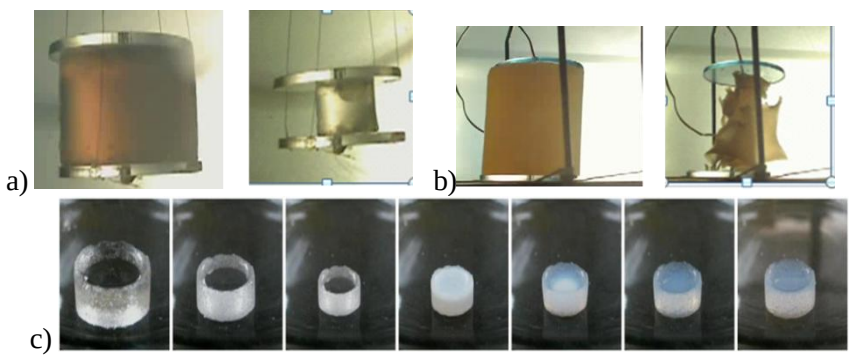
Zmiana objętości materiału podczas suszenia jest podstawowym zagadnieniem służącym do charakteryzowania zarówno dynamicznych zmian właściwości badanego materiału jak i charakteryzowania samego procesu suszenia. Podczas usuwania rozpuszczalnika, w wyniku suszenia, struktura materiału ulega znaczącym modyfikacjom. Niektóre z nich mają ogromny wpływ na właściwości fizyczne produktów końcowych a także oczekiwania klientów. Analizując literaturę przedmiotu możemy znaleźć, zależnie od warunków prowadzenia procesu czy rodzaju żelu różne typy skurczu suszarniczego przedstawione na rys. 1, gdzie widać wygląd próbek przed i po suszeniu pod ciśnieniem atmosferycznym. Najczęściej występuje skurcz jednorodny, niejednorodny oraz zjawisko sping-backu polegające na tym, że początkowo materiał kurczy się równomiernie a przy pewnej wilgotności zaczyna zwiększać swoją objętość i w końcowym etapie osiąga wymiary sprzed suszenia [6-8]. Oprócz kurczenia podczas suszenia, wyróżnia się także w obliczeniach takie mechanizmy jak zapadanie czy pęcznienie. Niektóre raporty naukowe pokazują żele krzemionkowe modyfikowane organicznymi związkami, poddane suszeniu nadkrytycznemu, wykazujące właściwości elastyczne [1].

Znajomość postępu skurczu suszarniczego jest kluczowym parametrem niezbędnym do modelowania, projektowania i optymalizacji warunków suszenia tak aby sam proces był efektywny a uzyskany produkt zadawalał klienta. Oprócz prawidłowo wykonanych obliczeń, niezbędne jest opracowanie metodyki zbierania danych eksperymentalnych, w tym aktualnej objętości próbki [6].

Najczęściej stosowanym do syntezy żeli krzemionkowych źródłem krzemionki jest tetraetoksysilan (TEOS) organiczny związek o wzorze $Si(OC_2H5)_4$. Przygotowanie próbek z użyciem tego związku wymaga obecności alkoholu etylowego i/lub silnego kwasu, a w konsekwencji

w końcowym etapie otrzymywania produktu konieczne jest czasochłonne ich wymywanie w wodzie destylowanej [9-13].

W przedstawionej pracy wykorzystano inny prekursor – zol kwasu metakrzemowego, który nie zawiera związków organicznych. Natomiast jako czynnik żelujący użyto uwodnionego β-glicerofosforanu wapnia a proces żelowania zachodził w temperaturze otoczenia [13]. Uzyskany materiał stanowi ciekawy obiekt badawczy z uwagi na niespotykane do tej pory w literaturze przedmiotu deformacje powierzchni podczas suszenia, które są pewnego rodzaju wyzwaniem dla modelowania. Również właściwości produktu końcowego sprawiają, że może on mieć walory aplikacyjne np. jako substancja wspomagająca rozpadanie tabletek w środowisku wodnym [14].



Rysunek 1. Przykład skurczu suszarniczego podczas procesu suszenia prowadzonego pod ciśnieniem atmosferycznym, w temperaturze otoczenia: a) jednorodnego, b) niejednorodnego [opracowanie własne], c) spring-backu [1]

2. Cel pracy

Celem pracy była analiza deformacji suszarniczych powierzchni chemicznego żelu krzemionkowego, podczas suszenia konwekcyjnego, których do tej pory nie opisano w literaturze przedmiotu oraz opracowanie dynamicznej metody obserwacji aktualnego skurczu suszarniczego bez konieczności wyjmowania próbek z tunelu suszarniczego.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

Do przygotowania przebadanego w pracy żelu, jako prekursora krzemionki użyto zolu kwasu metakrzemowego (nazwa handlowa Sizol 030®), który nie posiada w swoim składzie żadnych komponentów organicznych. Producentem tego odczynnika na skalę przemysłową są

Zakłady Chemiczne „Rudniki". Zgodnie z kartą charakterystyki zol kwasu metakrzemowego o pH=9, zawiera 30% masowych SiO_2 i śladowe ilości sodu w postaci 0,36% masowych Na_2O. Drugi reagent to uwodniony β-glicerofosforan wapnia (GF) stanowiący czynnika żelujący, pozyskany z firmy Sigma-Aldrich (nr 50043). Dla wzmocnienia struktury i spowolnienia procesu żelowania użyto niewielkiej ilości chitozanu pozyskiwanego z pancerza krabów o stopniu deacetylacji 80,4% i średniej masie cząsteczkowej 680 kDa. Do rozpuszczenia chitozanu wykorzystano stężony kwas octowy 98%, oba odczynniki pozyskano również z firmy Sigma-Aldrich.

3.2. Synteza

W pierwszym etapie syntezy sporządzano roztwór 4% chitozanu w kwasie octowym. W 96 g 4% roztworu kwasu octowego rozprowadzano 4 g chitozanu i tak przygotowaną mieszaninę umieszczano na godzinę w łaźni wodnej w temperaturze 55°C do uzyskania homogenicznego roztworu.

Następnie przy użyciu homogenizatora o mocy 200W, mieszano przez 1,5 min składniki w proporcji wagowej 1,3:1:93 (roztwór chitozanu: GF:Sizol). Czas żelowania dla uzyskanych próbek wynosił 7 minut (bez dodatku chitozanu czas ten wynosił 0,5 minuty). Tak przygotowany zol odlewano do sylikonowych form, przykrywano i odstawiano na kilka godzin do pełnego usieciowania struktury żelu. W końcowym etapie badań żel suszono w tunelu suszarniczym w temperaturze 30, 40 i 50°C.

Do określenia wiązań w suchym materiale wykorzystano spektroskopię w podczerwieni FTIR aparatem ATI Mattson Infinity Series. Widma dla czystych składników i kompozytów otrzymano w zakresie liczby falowej 4000–650cm^{-1}. Próbki analizowano w formie proszków bez wcześniejszego sprasowania (tabletkowania) i bez użycia KBr. Przebieg poszczególnych widm analizowano przy wykorzystaniu programu KnowItAll(R) Informatics System 2014 i danych literaturowych. Uzyskane rezultaty potwierdziły wytworzenie mostków tlenowych między krzemem zawartym w Sizolu i β-glicerofosforanem wapnia. Potwierdza to zasadność użycia terminu żelu chemicznego wobec otrzymanych żeli, dodatkowo mokre próbki po zżelowaniu nie rozpuszczają się pod wpływem temperatury oraz w wodzie czy w rozpuszczalnikach organicznych np.: etanolu.

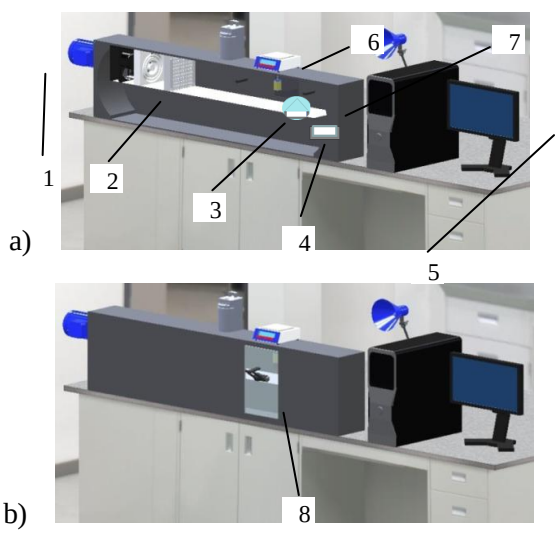
3.3. Aparatura doświadczalna

Eksperymenty suszarnicze prowadzono w specjalnie przygotowanym do tego celu tunelu suszarniczym schematycznie przedstawionym na rys. 2. Tunel o długości 150 cm i przekroju 25 x 25 cm, wykonany jest ze stali nierdzewnej i zaizolowany od zewnątrz wełna mineralną w celu zredukowania strat cieplnych do otoczenia. Sterowanie i monitorowanie

temperatury, wilgotności i prędkości czynnika suszącego oraz masy próbki odbywa się przy użyciu oprogramowania komputerowego. Dodatkowo, tunel wyposażony jest w szklane okno rewizyjne, przy którym montowana jest kamera (rys. 2b), dzięki której można obserwować postęp skurczu suszarniczego. Zamontowana lampa oświetla pole, w którym zawieszona jest próbka, w związku z tym obserwacje można prowadzić w sposób ciągły zarówno w dzień jak i w nocy.

W pojedynczym eksperymencie w tunelu umieszczano dwie próbki odlane w identyczne silikonowe formy. Jedną z próbek zawieszano na szalce podpiętej do wagi, natomiast drugą umieszczano obok z zamontowanymi czujnikami temperatury firmy MadgeTech, rejestrującymi temperaturę powierzchni materiału oraz temperaturę otoczenia. Czujniki wyposażone były w cieniutkie termopary typu J, aby nie zniszczyć struktury materiału przed suszeniem, dwie termopary zanurzano w każdej próbce od razu po odlaniu do silikonowej formy, przed zżelowaniem.

Na rys. 3 przedstawiono geometrię suszonego materiału, założono że odparowanie rozpuszczalnika podczas suszenia zachodzi tylko z jednej powierzchni. Forma silikonowa stanowiła izolację cieplną, a silikon wykorzystany do jej przygotowania jest odporny na działanie wysokich temperatur i nie ulega odkształceniom ani upłynnieniu. Średnica uzyskanych próbek wynosiła 9 cm a wysokość 1,56 cm.



Rysunek 2. Tunel suszarniczy a) wewnątrz b) zewnątrz: 1 – wentylator, 2 – wyrównywacz strumienia, 3 – próbka zawieszona pod wagą; 4 – próbka do rejestracji temperatury powierzchni materiału, 5 – komputer do zbierania danych, 6 – waga, 7 – czujnik Pt100 temperatury w tunelu, 8 – kamera [opracowanie własne]

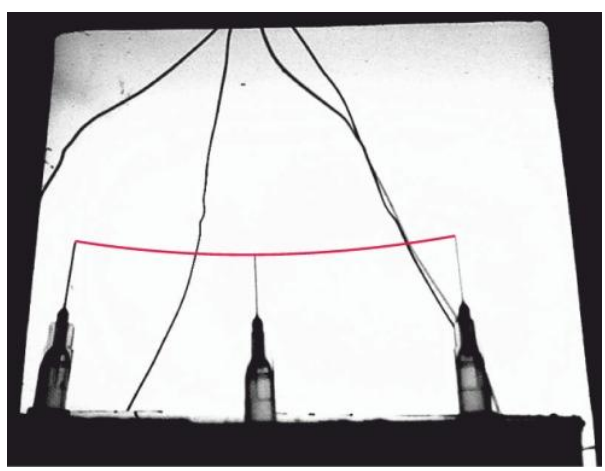
W związku z tym, że forma silikonowa jest nieprzezroczysta, do obserwacji skurczu, na powierzchni żelu, przed umieszczeniem w tunelu, ustawiono w linii prostej trzy jednakowe pionowe znaczniki, o znanej masie i wymiarach (rys. 3b). Na podstawie uzyskanych zdjęć, w wybranych odstępach czasu przy użyciu programu CorelDRAW X5 odczytano aktualne wymiary próbki oraz odwzorowano kształt powierzchni. Rzeczywiste odległości i zmiany wysokości oraz średnicy próbki uzyskano poprzez skalowanie zdjęć z kamery i rzeczywistych odległości pomiędzy znacznikami, zmierzonych suwmiarką przed suszeniem. Uzyskane kształty w kolejnych etapach prac posłużą do obliczenia skurczu suszarniczego i zamodelowania procesu suszenia konwekcyjnego dla uzyskanego żelu krzemionkowego.

Eksperymenty prowadzono w trzech temperaturach 30, 40 i 50°C i prędkości czynnika suszącego 1 m/s. Przed każdym eksperymentem tunel wygrzewano przez kilka godzin do zadanej temperatury, aby ustabilizować warunki prowadzenia procesu suszenia.

Po zakończeniu suszenia, próbki, które podwieszono w tunelu pod wagą, dosuszano przez 24 godziny w temperaturze 100°C do uzyskania suchej masy i wyznaczenia krzywej kinetyki suszenia.

a)

b)

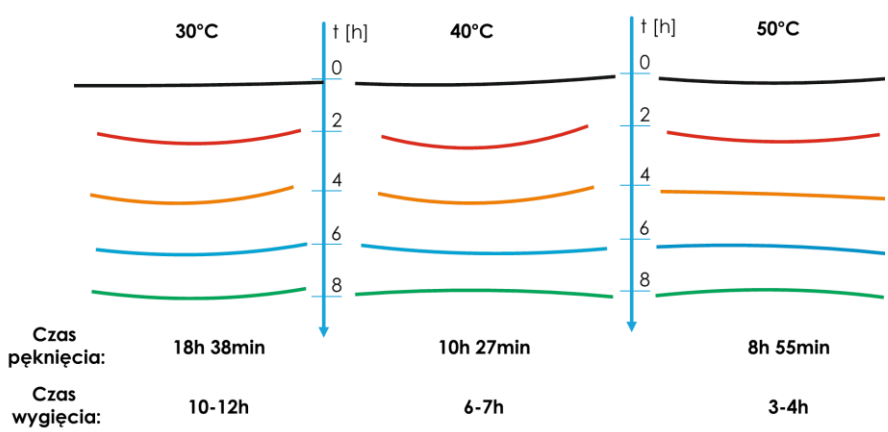


Rysunek 3. Geometria suszonego materiału a) zdjęcie przed wstawieniem do tunelu b) zdjęcie próbki ze znacznikami do obserwacji kształtu powierzchni [opracowanie własne]

4. Wyniki

Zestawiając kształty powierzchni żelu na rys. 4, w trzech temperaturach, można zauważyć wyraźnie przejście z etapu deformacji w kształt soczewki wklęsłej na etap soczewki wypukłej. Zestawienie wykonano w odstępach co dwie godziny, dla 8 godzin suszenia z uwagi na fakt, że w 50°C po tym czasie próbka ulega popękaniu i dalsze obserwacje skurczu suszarniczego są niemiarodajne. Czas po którym następuje wygięcie w drugą stronę, bez pękania próbki, wydłuża się wraz z obniżeniem temperatury suszenia. Podobne rezultaty otrzymano dla zależności czasu pękania próbki od temperatury suszenia.

Do tej pory w literaturze przedmiotu nie opisano tego typu deformacji suszarniczych. Jest to zjawisko, które nie można w sposób jednoznaczny zaklasyfikować do któregoś z typów skurczu suszarniczego zaprezentowanych we wstępie. Jedna z założonych przez autorów tej publikacji, hipotez tłumaczy to zjawisko szybszym utwardzaniem obrzeży próbki w porównaniu z rdzeniem. W związku z tym odparowanie rozpuszczalnika ze struktury żelu zachodzi szybciej w obrębie środkowej część powierzchni kontaktującej się z czynnikiem suszącym. Wraz z postępem skurczu zagęszcza się struktura żelu, cała powierzchnia utwardza się a odparowanie zaczyna zachodzi z powierzchni bocznej a wytworzone naprężenia w materiale powodują wyginanie żelu w drugą stronę, aż do momentu osiągniecia naprężeń niszczących powodujących pękanie.

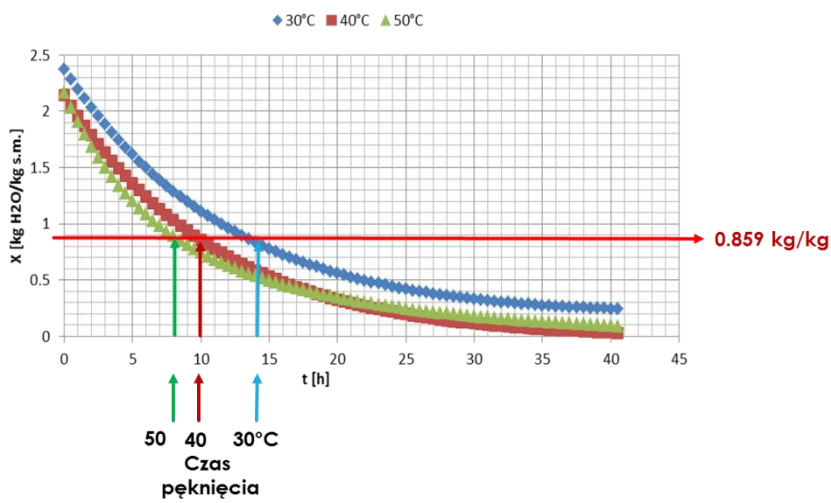


Rysunek 4. kształty powierzchni żelu suszonego w różnych temperaturach, w odstępach co 2 h [opracowanie własne]

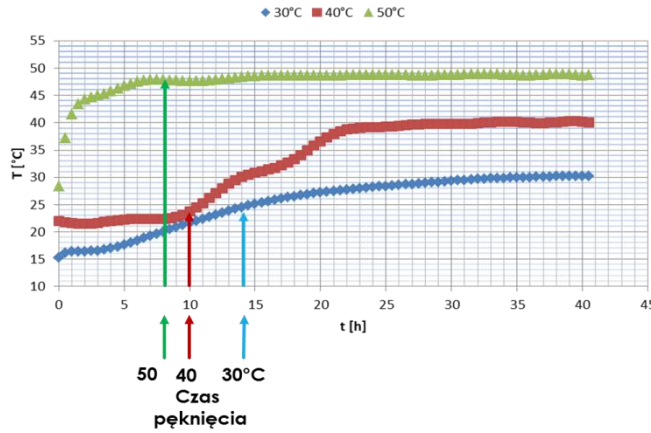
Po zestawieniu krzywych kinetyki suszenia dla trzech temperatur na rys. 5 i zestawieniu czasów pękania, widać że dla każdej temperatury zachodzi ono przy wilgotności materiału takiej samej i równej 0,859 kg H_2O/ kg s.m. Natomiast wygięcie następuje, niezależnie od temperatury, przy wilgotności materiału ok. 1,5 kg H_2O/kg s.m.. Z kolei nanosząc czasy pęknięć na przebieg zmian temperatury powierzchni materiału (rys. 6) widać, że materiał w większości przypadków, nie uzyskał jeszcze temperatury czynnika suszącego a już nastąpiło pęknięcie.

Dodatkowe eksperymenty wykazały, że po wysuszeniu próbek w tunelu rozpadają się po zanurzeniu w wodzie (rys. 7 b). Mokre próbki mogą leżeć tygodniami w wodzie bez widocznego rozpadu czy rozpuszczania (rys. 7 a). Poszukiwania granicznej wartości wilgotności żelu przy której dochodzi do takiego rozpadu pozwoliły wywnioskować, że przy średniej wilgotności materiału poniżej 0,859 kg H_2O/ kg s.m próbka zachowuje się jak tabletka musująca, woda wnika do suchego żelu rozrywając jego strukturę. W efekcie końcowym w zlewce z wodą pozostają drobne kryształki suchego żelu.

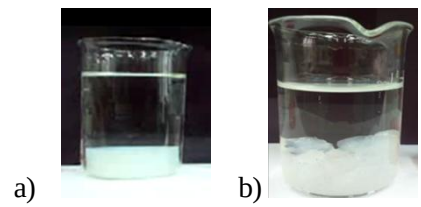
Najprawdopodobniej powierzchnia żelu podczas suszenia w tunelu utwardza się i osiąga szybciej wilgotność 0,859 kg H_2O/ kg s.m a dyfundująca z głębi materiału woda powoduje powstawanie pęknięć na powierzchni i niszczy spójną strukturę materiału.



Rysunek 5. Kinetyka suszenia w trzech temperaturach suszenia z zaznaczonym czasem pękania próbki [opracowanie własne]



Rysunek 6. Przebieg temperatury na powierzchni materiału podczas suszenia różnych warunkach z zaznaczonym czasem pękania próbki [opracowanie własne]



Rysunek 7. a) mokry żel b) suchy żel, po zanurzeniu w wodzie [opracowanie własne]

5. Wnioski

Podczas suszenia konwekcyjnego uzyskany żel ulega popękaniu, niezależnie od temperatury suszenia, przy wilgotności poniżej 0,859 kg H_2O/kg s.m.

Żel zarówno mokry jak i suchy nie rozpada się w organicznych rozpuszczalnikach takich jak np. etanol, z kolei przy wilgotności poniżej 0,859 kg H_2O/kg s.m. po zanurzeniu w wodzie zachowuje się jak tabletka musująca i pęka na drobne kryształki.

Analizując przebieg deformacji powierzchni żelu suszonego konwekcyjnie można wyróżnić dwa etapy: I etap kiedy powierzchnia przyjmuje kształt soczewki wklęsłej i II etap soczewki wypukłej.

Uzyskany materiał dzięki swoim właściwościom, może posłużyć jako matryca do szybkiego uwalniania leków, nawozów itp. substancji w ośrodkach wodnych lub w glebie. Natomiast zaobserwowany nowy typ deformacji wzbogaca literaturę z dziedziny suszarnictwa a przedstawiona metodyka obserwacji skurczu suszarniczego pozwala zbierać dane o aktualnych wymiarach próbki podczas suszenia i weryfikować z obliczeniami modelowymi.

Literatura

1. Khalloufi S., Almeida-Rivera C., Janssen J., Van-Der-Vaart M., Bongers P. *Mathematical Model for Simulating the Springback Effect of Gel Matrixes During Drying Processes and Its Experimental Validation*, Drying Technology, 29 (2011), s. 1972-1980
2. Gen Hayase G., Kanamori K., Maeno A., Kaji H., Nakanishi K. *Dynamic spring-back behavior in evaporative drying of polymethylsilsesquioxane monolithic gels for low-density transparent thermal superinsulators*, Journal of Non-Crystalline Solids, 434 (2016), s. 115-119
3. Kuenzel C., Vandeperre L.J., Donatello S., Boccaccini A.R., Cheeseman C. *Ambient Temperature Drying Shrinkage and Cracking in Metakaolin-Based Geopolymers*, Journal of the American Ceramic Society, 95 [10] (2012), s. 3270-3277
4. Prado M. M., Ferreira M. M. P., Sartori D. J. M. *Drying of Seeds and Gels*, Drying Technology, 24 (2006), s. 281-292
5. Adamski R., Pakowski Z., Kamińska A. *The Mechanism of Moisture Transport in a Gel Cylinder*, Drying Technology, 32 (11) (2014), s. 1266-1268
6. Katekawa M. E., Silva M. A. *A Review of Drying Models Including Shrinkage Effects*, Drying Technology, 24 (2006), s. 5–20
7. Katelaars, A.A.J. *Drying deformable media kinetics, shrinkage and stresses*, *Drying Technology*, 12 (1992), s. 1029-1038
8. Kowalski, S.J. *Problemy deformacji i destrukcji materiałów suszonych*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, 2000
9. Sridhar R., Sundarrajana S., Venugopal J. R., Ravichandran R., Ramakrishna S., *Electrospun inorganic and polymer composite nanofibers for biomedical applications*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 24 (4) (2013), s. 365-385
10. Jongwattanapisan P., Thongbunchoo J., Smith S.M., Charoenphandhu N., Tang I-M., Pon-On W., Hoonsawat R., *In vitro study of the SBF and osteoblast-like cells on hydroxyapatite/chitosan–silica nanocomposite*, Materials Science and Engineering C 31 (2011), s. 290-299
11. Budnyak T.M., Pylypchuk I.V., Tertykh V.A., Yanovska E.S., Kolodynska D. *Synthesis and adsorption properties of chitosan-silica nanocomposite prepared by sol-gel method* , Nanoscale Research Letters (2015), s. 1-10
12. Al-Sagheer F. Muslim S. *Thermal andMechanical Properties of Chitosan/SiO2 Hybrid Composites*, Journal of Nanomaterials, (2010), s. 1-7
13. A. Kamińska, R. Adamski, Z. Pakowski, Z. Modrzejewska, *T.E.L., Douglas*, Polskie zgłoszenie patentowe, P. 411938, (2015)
14. El-Barghouthi M., Eftaiha A., Rashid I., Al-Remawi M., Badwan A. A *Novel Superdisintegrating Agent Made from Physically Modified Chitosan with Silicon Dioxide*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 34 (2008), s. 373-383

Analiza deformacji powierzchni żelu krzemionkowego suszonego konwekcyjnie

Streszczenie

Zjawiskiem występującym podczas suszenia konwekcyjnego materiałów koloidalno-kapilarno-porowatych jest skurcz oraz pękanie, będące wynikiem powstawania naprężeń. Kurczący się materiał, którego szkielet zagęszcza się, zmienia swoje właściwości mechaniczne, zależne od zawartości rozpuszczalnika w porach suszonego materiału. W literaturze przedmiotu, podejmowany jest temat opisu mechanizmów zjawisk transportu masy i ciepła w połączeniu ze skurczem suszarniczym. Z wyników prezentowanych w publikacjach wynika, że w zależności od warunków suszenia konwekcyjnego oraz od struktury usieciowania żelu i typu sił odziaływania międzycząsteczkowego, może występować skurcz jednorodny, niejednorodny oraz zjawisko spring-backu. W niniejszej pracy zamieszczono wyniki suszenia konwekcyjnego chemicznego żelu krzemionkowego, w którym jako czynnik żelujący użyto uwodnionego β-glicerofosforanu wapnia. Szczegółowe badania kinetyki suszenia płaskiej płyty wykonano w temperaturach 30, 40 i 50°C, przy wilgotności początkowej materiału 2,1 kg H_2O/kg s.m. Otrzymane rezultaty pozwalają przeanalizować dynamiczne zmiany kształtu powierzchni suszonego materiału, dotychczas nigdzie niepublikowane. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do przewidywania maksymalnych, dopuszczalnych naprężeń powstających podczas nietypowych odkształćceń w czasie suszenia konwekcyjnego.

Słowa kluczowe: skurcz suszarniczy, żel krzemionkowy, deformacje, suszenie konwekcyjne

Analysis of surface deformation of silica gel during convective drying

Abstract

Shrinkage and cracking are phenomena occurring during convective drying of colloidal-capillary-porous materials, as a result of the formation of stress. The shrinking material whose skeleton is concentrated, changes its mechanical properties, depending on the solvent content in the pores of the material. In the literature, the problem description of the mechanisms of transport phenomena of mass and heat in combination with the drying shrinkage is analysed. The results presented in the publications indicate that depending on the conditions of convective drying, crosslinking structure of the gel and the type of the intermolecular forces, the shrinkage can be homogeneous, heterogeneous or undergo the spring-back phenomenon. This paper presents the results of convective drying of silica gel where, as the gelling agent a hydrated calcium β-glycerophosphate salt was used.

A detailed study of the kinetics of drying of the flat gel plate was performed at temperatures of 30, 40 and 50 ° C, the initial moisture content of the material was 2.1 kgH_2O / kgs.m.

The obtained results, not published before, allow us to analyse the dynamic changes of shape of the surface of dried material. The results may provide a basis for predicting the maximum, allowable stresses occurring during abnormal deformation during convection drying.

Keywords: drying shrinkage, silica gel, deformation, convective drying

Paulina Karpeta[1], Adam Mokshaha-Zarzycki[2], Roksana Tomanek[3], Justyna Wilińska[4]

Zastosowanie terpolimeru w otrzymywaniu implantów z estradiolem metodą ekstruzji

1. Wprowadzenie

17-β-estradiol (E2) jest hormonem steroidowym, plejotropowym, posiada-jącym wielokierunkowe działanie zarówno w organizmie kobiet, jak i mężczyzn. Należy zaznaczyć, że oprócz warunkowania rozwoju cech płciowych, wykazuje on korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, a także obniża poziom glukozy we krwi. Obniżenie poziomu E2 w okresie menopauzy skutkuje rozwojem osteoporozy i pogorszeniem funkcjono-wania mięśni [1].

W ostatnim czasie wykazano również korzystny wpływ E2 w leczeniu chorób układu nerwowego. Właściwości neuroprotekcyjne manifestują się szybszą rekonwalescencją i mniejszymi powikłaniami po wystąpieniu okluzji tętnicy mózgowej środkowej oraz lżejszym przebiegiem takich chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Parkinsona i Alzheimera [2].

Uzyskanie korzystnych efektów neuroprotekcyjnych w terapii za pomocą E2 wiąże się ze stałym podawaniem substancji leczniczej, należy także podkreślić, iż klasyczne metody podania leku wykorzystywane w hormo-nalnej terapii zastępczej wykazują szereg wad. Postaci doustne wymagają podania większych dawek E2, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych, takich jak wystąpienie zakrzepów krwi prowadzących często do udaru mózgu [3]. Również sama postać leku może powodować trudności w przyjmowaniu, w szczególności

[1] paulina.karpeta@gmail.com Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Biofarmacji, ul. Jedności 8, Sosnowiec, www.sum.edu.pl
[2] adam.zarzycki91@gmail.com, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Biofarmacji, ul. Jedności 8, Sosnowiec, www.sum.edu.pl
[3] roxy.tmk@gmail.com, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Biofarmacji, ul. Jedności 8, Sosnowiec, www.sum.edu.pl
[4]justynawilinska90@gmail.com, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katedra i Zakład Biofarmacji, ul. Jedności 8, Sosnowiec, www.sum.edu.pl

w przypadkach dysfagii u osób w podeszłym wieku, z chorobą Parkinsona oraz po przebytym udarze a także z innymi chorobami neurologicznymi [4]. Powyżej wymienionych komplikacji pozwalają uniknąć systemy transdermalne, w których stosowana jest niższa dawka utrzymująca się na stałym poziomie. Jednakże stosowanie ich zwiększa ryzyko wystąpienia alergii skórnych [5]. Ponadto w systemach transdermalnych problem stanowi również ryzyko zmiany formy polimorficznej E2. Wynika to z faktu, iż E2 występuje w różnych odmianach krystalograficznych, co może prowadzić do istotnych trudności, zarówno podczas wytwarzania postaci leku, jak i jej stosowania [6, 7].

Ze względu na powyższe, uzasadnione jest opracowanie nowej postaci leku, która pozwalałaby na stosowanie E2 w niskiej dawce podawanej permanentnie. Dla zapobiegania i leczenia chorób neurodegeneracyjnych optymalnym rozwiązaniem może być zastosowanie implantów polimerowych, co wiąże się jednak z zastosowaniem inwazyjnej metody aplikacji.

Zmniejszenie inwazyjności można osiągnąć przez wykorzystanie polimerów z pamięcią kształtu (SMP). Jest to grupa materiałów aktywnie zmieniająca swój kształt z formy odkształconej do kształtu wyjściowego. Powrót do pierwotnej postaci następuje poprzez stymulowanie polimeru odpowiednim bodźcem, którego następstwem jest zmiana molekularnej architektury z zachowaniem niezmienionej struktury chemicznej [8]. Czynnik stymulujący może mieć charakter fizyczny, taki jak zmiana temperatury, siła jonowa czy pole magnetyczne lub chemiczny – pH, wpływ rozpuszczalników. Najczęściej wykorzystywane są jednak indukowane termicznie SMP ze względu na dobrą powtarzalność, niski koszt oraz łatwość odzyskiwania kształtu w niskich temperaturach [9].

Kolejnym ważnym czynnikiem, który również wpływa na zmniejszenie inwazyjności jest biodegradowalność, ze względu na brak konieczność eksplantacji oraz biozgodność polegająca na otrzymywaniu w procesie degradacji polimeru *in vivo* produktów będących naturalnymi metabolitami organizmu [8].

Istotnym aspektem jest także zastosowanie katalizatora polimeryzacji, którego pozostałość może wykazywać działanie toksyczne. Katalizatorem obecnie często wykorzystywanym w syntezie polimerów, poliestrów alifatycznych i poliwęglanów, jest oktanian cyny. Jednakże istnieją badania wskazujące na niekorzystne jego działanie na organizm ludzki, m.in. uszkadzanie DNA. Dlatego uzasadnione wydaje się być zastosowanie jako inicjatora polimeryzacji octanu cyrkonu $Zr(Acac)_4$ o dziesięciokrotnie mniejszej toksyczności. Pozwala to na optymalizację biozgodności polimeru [9].

Zastosowany w prowadzonych badaniach poli-(L-laktydo-ko-gligolido-ko-trimetylenowęglan) (P(L-LA:GA:TMC)) jest niezwykle obiecującym materiałem polimerowym, który może być wykorzystywany jako nośnik

leku w otrzymywaniu produktów leczniczych w formie *depot*. Należy podkreślić, że nieodpowiednio dobrany sposób formulacji może niekorzystnie wpłynąć na właściwości, zarówno substancji leczniczej, jak i materiału polimerowego. Istnieje wiele możliwości otrzymania omawianej postaci leku, należą do nich m.in. metoda wtrysku, walcowania, formowania pod ciśnieniem oraz ekstruzji. Ostatnia z metod należy do jednego z częściej wykorzystywanych sposobów w produkcji prętów polimerowych. Ekstruzja jest procesem mechaniczno-termicznym wymagającym wykorzystania podwyższonej temperatury w celu uplastycznienia masy polimerowej [10]. Zatem przy otrzymywaniu postaci leku tą metodą należy zoptymalizować warunki termiczne przetwarzania biorąc pod uwagę labilność substancji leczniczej i polimerowego nośnika leków.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu warunków przetwarzania E2 i P(L-LA:GA:TMC) podczas otrzymywania prętów za pomocą ekstruzji, jak również właściwości strukturalnych i morfologicznych prototypu postaci leku.

3. Materiały i metody

3.1. Synteza materiału polimerowego

P (L-LA:GA:TMC) (57:19:24) z pamięcią kształtu, o masie 59000Da, zsyntetyzowano w masie z użyciem inicjatora $Zr(Acac)_4$ (Sigma-Aldrich) w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu [11].

3.2. Ekstruzja

Do przygotowania prętów polimerowych z P(L-LA:GA:TMC) zastosowano metodę ekstruzji. Przed przetwarzaniem terpolimer był rozdrobniony w młynku kriogenicznym (6870 SPEX) w temperaturze -196°C, a następnie suszony. W przypadku otrzymywania prętów z E2, do sproszkowanego materiału polimerowego dodano substancję leczniczą (10% w/w) i wymieszano. Mieszaninę umieszczono w cylindrze współbieżnej wytłaczarki dwuślimakowej (Minilab, Thermo-Haake, GE), wykorzystującej ślimaki plastyfikujące obracające się z szybkościa 20obr./min i ogrzane do temperatury 105°C. Stopioną mieszaninę wytłoczono przez dyszę o średnicy 0,7 mm. Finalny produkt posiadał średnicę 1mm i długość 10 mm.

3.3. Sterylizacja

Sterylizację otrzymanych prętów przeprowadzono z użyciem akceleratora wiązki elektronów (10MeV, 360mA, 25kGy). Proces sterylizacji został przeprowadzony w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Centrum ds. Badań i Technologii Radiacyjnych (Certyfikat nr 457/2014 / E).

3.4. Metody badawcze

3.4.1. Badania DSC

Badanie właściwości termicznych E2, granulatu terpolimerowego i prętów z oraz bez E2 przeprowadzono metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Pomiary wykonano aparatem TA DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE), który skalibrowano za pomocą wzorców indu i galu o wysokiej czystości.

Pomiary właściwości termicznych dla E2 zostały przeprowadzone w czterech etapach, tj. w pierwszym biegu próbki ogrzewano z szybkością 20°C/min, a następnie z tą samą szybkością poddano je chłodzeniu. Po schłodzeniu w czasie drugiego biegu próbki ponownie ogrzewano z szybkością 20°C/min i schłodzono stosując dwa sposoby chłodzenia, tj. stopniowe (20°C/min) i w ciekłym azocie.

Pręty terpolimerowe ogrzewano z szybkością 20°C/min. Podczas pierwszego biegu temperaturę podniesiono do 190°C, a następnie stopiony materiał polimerowy gwałtownie schłodzono do temperatury -30°C. W drugim biegu pręty ogrzewano w zakresie temperaturowym -30°C-190°C. Temperaturę zeszklenia (T_g) wyznaczono jako środkowy punkt zmiany właściwości termicznych próbki amorficznej występujących podczas drugiego biegu.

3.4.2. Badania widm NMR

Analizę mikrostruktury łańcucha i składu badanego terpolimeru, przeprowadzono za pomocą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR).

Widma otrzymano używając spektrofotometru Bruker Avance-II Ultrashield Plus przy 600Mhz (^{1}H) oraz 125Mhz (^{13}C) stosując 5 mm probówki i DMSO-d6 jako rozpuszczalnik.

3.4.3. Badania GPC

Średnią liczbowo masę cząsteczkową (M_n) oraz współczynnik polidyspersji (I) próbek oznaczono metodą chromatografii żelowej (GPC)

z wykorzystaniem chromatografu Viscotek Rimax (dwie kolumny chromatograficzne Viscotek 3580, detektor Shodex SE 61).

Proces przeprowadzono z szybkością przepływu 1ml/min i zastosowano chloroform jako rozpuszczalnik. M_n zostały skalibrowane z wykorzystaniem wzorców polistyrenowych.

3.4.4. Badania SEM

Morfologię powierzchni i przełomu prętów analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Quanta 250 FEG, FEI Company, USA) pracującego w warunkach niskiej próżni (80Pa), z napięciem przyspieszającym 5kV z elektronów wtórnych, wyłapanych przez detektor LFD (*ang. Large Field Detector*).

4. Wyniki

4.1. Analiza termogramów DSC

4.1.1. Analiza właściwości termicznych E2

Analiza krzywych DSC przeprowadzona dla E2 wykazała różne efekty termiczne, które zostały przedstawione w *Tabeli 1*.

Tabela 1. Efekty termiczne E2 zbadane za pomocą DSC

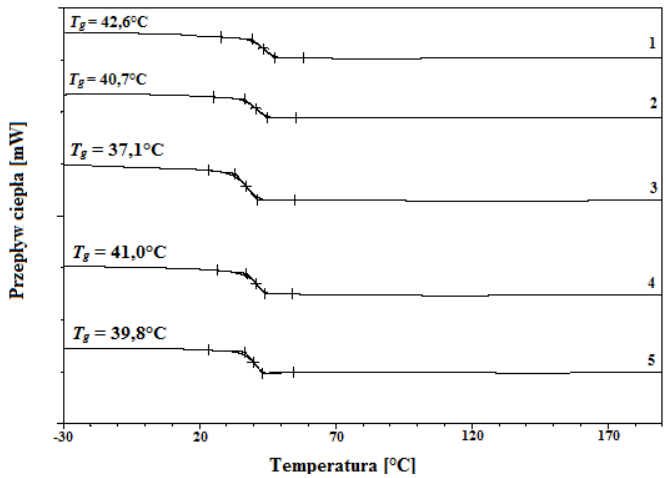
Termogram	Temperatura [°C]	Efekt cieplny
Pierwszy bieg	122,4	Endotermiczny
	173,8	Endotermiczny
	179,7	Endotermiczny
Stopniowe schładzanie	139,5	Egzotermiczny
Drugi bieg po stopniowym schłodzeniu	132,6	Egzotermiczny
	167,9	Endotermiczny
	179,4	Endotermiczny
Drugi bieg po gwałtownym schłodzeniu	130,9	Egzotermiczny
	157,8	Egzotermiczny
	179,5	Endotermiczny

Źródło: Opracowanie własne

4.1.2. Analiza właściwości termicznych granulatu i prętów P(L-LA:GA:TMC)

Analiza krzywych DSC dla drugiego biegu granulatu polimerowego, pręta, pręta po sterylizacji, pręta z E2 oraz pręta z E2 po sterylizacji

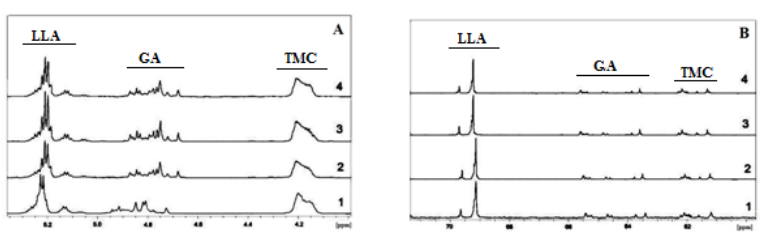
wskazała na różnice wynikające z przetwarzania materiału polimerowego. Ekstruzja wpłynęła na zmniejszenie wartości T_g. Natomiast wprowadzenie E2 nie spowodowało istotnych zmian T_g. Proces sterylizacji wykazano istotny spadek wartości T_g tylko dla pręta bez E2. W przypadku pręta zawierającego E2 nie obserwowano żadnych istotnych zmian w wartości T_g jako rezultat sterylizacji (*Rys.1*).



Rys.1. Parametry termiczne uzyskane w drugim biegu dla granulatu P(L-LA:GA:TMC) (1), pręta P(L-LA:GA:TMC) (2), pręta P(L-LA:GA:TMC) po sterylizacji (3), pręta P(L-LA:GA:TMC) z E2 (4), pręta P(L-LA:GA:TMC) z E2 po sterylizacji (5) [opracowanie własne]

4.2. Analiza widm NMR

Ocenę składu badanych próbek określono na podstawie widm ^{1}H NMR (*Rys.2A*). Analiza wykazała nieistotne różnice wartości ułamka molowego jednostek glikolidylowych (F_{GA}), jednostek laktydylowych (F_{LL}), jak i jednostek węglanowych (F_{TMC}) między nieprzetworzonym granulatem a prętami we wszystkich wariantach.



Rys.2. Widma ^{1}H NMR (A) oraz ^{13}C NMR (B) obrazujące P(L-LA:GA:TMC) analizę granulatu (1), pręta (2), pręta z E2 (3) i pręta z E2 po sterylizacji (4) [opracowanie własne]

Analizę mikrostruktury opracowano na podstawie widm ^{13}C NMR (*Rys.2B*). Nie wykazano żadnych różnic w długości bloków laktydylowych (l_{LL}), glikolidylowych (l_{GA}) oraz węglanowych (l_{TMC}) między nieprzetworzonym granulatem i wszystkimi rodzajami prętów (*Tabela 3*).

Tabela 3. Parametry NMR charakteryzujące badane próbki, F_{LL} – ułamek molowy jednostek laktydylowych; F_{GA} – ułamek molowy jednostek glikolidylowych; F_{TMC} – ułamek molowy jednostek węglanowych; l_{LL} – średnia długość bloków laktydylowych; l_{GG} – średnia długość bloków glikolidylowych; l_{TMC} – średnia długość bloków węglanowych

Próbka	F_{LL}	F_{GA}	F_{TMC}	l_{LL}	l_{GA}	l_{TMC}
Nieprzetworzony granulat P(L-LA:GA:TMC)	57.0	19.0	24.0	4.4	1.1	1.5
Pręt P(L-LA:GA:TMC)	57.7	17.5	24.8	4.4	1.1	1.5
Pręt P(L-LA:GA:TMC) z E2	58.0	17.7	24.3	4.5	1.1	1.5
Pręt P(L-LA:GA:TMC) z E2 po sterylizacji	57.5	17.6	24.9	4.4	1.1	1.5

Źródło: Opracowanie własne

4.3. Analiza widm GPC

Badania M_n i I wskazały na spadek wartości tych parametrów dla prętów w stosunku do czystego granulatu w procesie ekstruzji. Natomiast sterylizacja oraz wprowadzenie E2 nie miały istotnego wpływu na zmianę analizowanych wartości (*Tabela 4*).

4.4. Analiza obrazów SEM

Analiza morfologii zewnętrznej wskazała na zmianę właściwości powierzchniowych spowodowanych wprowadzeniem E2 do materiału polimerowego (*Tabela 5*). Obserwowano wzrost heterogenności powierzchni postaci leku. Natomiast proces sterylizacji nie wpłynął na zmianę cech w morfologii zewnętrznej. Natomiast analiza morfologii wewnętrznej nie ujawniła istotnych zmian spowodowanych zarówno wprowadzeniem E2, jak i procesem sterylizacji.

Tabela 4. Wynik badania GPC, M_n - liczbowo średnia masa cząsteczkowa; I –współczynnik polidyspersji

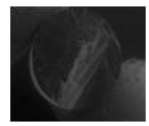
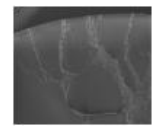
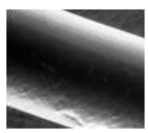
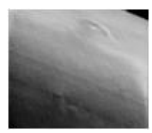
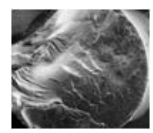
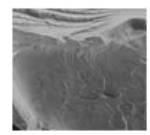
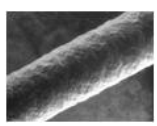
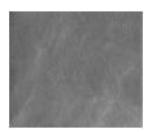
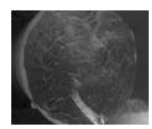
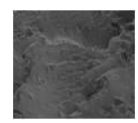
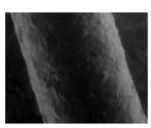
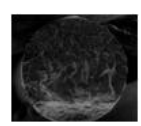
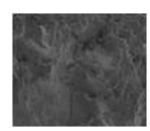
Próbka	M_n [kDa]	I
Nieprzetworzony granulat P(L-LA:GA:TMC)	58,5	3,7
Pręt P(L-LA:GA:TMC)	45,5	2,2
Pręt P(L-LA:GA:TMC) po sterylizacji	45,1	2,0
Pręt P(L-LA:GA:TMC) z E2	45,8	1,9
Pręt P(L-LA:GA:TMC) z E2 po sterylizacji	45,5	2,0

Źródło: Opracowanie własne

5. Dyskusja

Obecnie stosowane są różne postaci leku zawierające E2. W leczeniu chorób neurodegeneracyjnych istotne jest permanentne dostarczanie substancji leczniczych. Klasyczne postaci leku często nie spełniają oczekiwań terapeutycznych. W przypadku tabletek główny problem stanowi dysfagia oraz zwiększone ryzyko wystąpienia choroby zakrzepowej naczyń i udaru. Z kolei systemy transdermalne mogą wywoływać alergię, a niestabilna postać amorficzna E2 stwarza ryzyko wykrystalizowania substancji leczniczej wewnątrz plastra i spadek dostępności biologicznej. Wskazane trudności skutkowały podjęciem badań nad opracowaniem nowej postaci leku, jaką jest implant polimerowy zawierający E2.

Tabela 5. Wyniki obrazowania SEM dla pręta P(L-LA:GA:TMC) (1), pręta P(L-LA:GA:TMC) po sterylizacji (2), pręta P(L-LA:GA:TMC) z E2 (3), pręta P(L-LA:GA:TMC) z E2 po sterylizacji (4)

	Powierzchnia		**Przełom**	
1	2,20x2,20mm	264x264µm	 1,63x1,63mm	 217x217µm
2	 1,37x1,37mm	 242x242µm	 1,06x1,06mm	 242x242µm
3	 2,59x2,59mm	 249x249µm	 1,25x1,25mm	 288x288µm
4	 1,49x1,49mm	242x242µm	 1,15x1,15mm	 242x242mm

Źródło: Opracowanie własne

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania właściwości termicznych wskazują, iż proces ekstruzji nie będzie wpływać na zmianę właściwości krystalograficznych E2 w zaproponowanych warunkach. Wykazały one wprawdzie obecność zjawisk endotermicznych w pierwszym biegu ogrzewania, związanych z odparowaniem wody związanej wiązaniami wodorowymi oraz utratą wody wbudowanej w sieć krystaliczną E2. Jednakże zjawiska te zachodzą znacznie powyżej temperatury przetwarzania, która wynosiła w przypadku ekstruzji 105°C. Z kolei zjawiska egzotermiczne obserwowane w drugim biegu, wskazujące na krystalizację E2, zachodziły również poniżej 105°C. Uzyskane dane są analogiczne do otrzymanych poprzednio [6, 12]. Wskazane warunki przetwarzania E2 są adekwatne dla możliwości uzyskania produktu leczniczego metodą ekstruzji.

Z kolei analiza wpływu warunków temperaturowych podczas ekstruzji na terpolimer wykazała nieznaczny spadek T_g otrzymanego implantu względem nieprzetworzonego polimeru. Różnica ta może wynikać ze spadku wartości M_n w czasie przetwarzania P(L-LA:GA:TMC) w podwyższonej temperaturze. Niemniej jednak T_g końcowego produktu leczniczego pozostaje powyżej 36,6°C (temperatura ciała ludzkiego). Fakt ten istotne znaczenie, gdyż przejście w stan ciała szklistego w organizmie ludzkim powodowałoby niekorzystne zwiększenie elastyczności polimeru pod wpływem plastyfikującego działania cząsteczek wody i w konsekwencji jego przyspieszoną degradację [13]. Co ważne, przeprowadzone w tej pracy badania nie wykazały również istotnych zmian w składzie terpolimeru oraz żadnych zmian w jego mikrostrukturze. Wskazuje to na zastosowanie polimeru o optymalnych właściwościach dla wykorzystanego sposobu wytwarzania implantów polimerowych z E2. Wprowadzenie substancji leczniczej skutkowało jedynie zwiększeniem heterogenności powierzchni obserwowanej w obrazach SEM.

Jednym z ostatnich procesów stosowanych w otrzymywaniu postaci leku jest sterylizacja. Jałowość jest warunkiem bezwzględnym dla wszystkich leków podawanych parenteralnie i często stanowi kompromis między uzyskaniem jałowego produktu a utratą jego właściwości w wyniku tego procesu. Zastosowana warunki sterylizacji nie wpłynęły w istotny sposób na zmianę wartości T_g, M_n, składu oraz właściwości strukturalnych i morfologicznych pręta z E2.

6. Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość otrzymywania implantów z E2 i P(L-LA:GA:TMC) za pomocą metody ekstruzji. Właściwości strukturalne i morfologiczne prototypu postaci leku zapewniają możliwość aplikacji. Pozawalają także na kontynuacje prac nad uwalnianiem i degradacją w metodach *in vitro* i *in vivo*.

Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania Panu dr Arturowi Turkowi oraz Pani mgr inż. Aleksandrze Boreckiej za nieocenioną pomoc merytoryczną, wsparcie oraz życzliwość, które niezaprzeczalnie umożliwiły powstanie tej pracy.

Literatura

1. Skibińska I. *Molekularne mechanizmy działania 17β-estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na plemniki ludzkie*, (2011); Praca doktorska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
2. Brann D.W., Dhandapani K., Wakade C., Mahesh V.B., Khan M.M. *Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications*, Steroids., 72 (2007), s. 381-405
3. Klaiber E., Vogel W., Rako S. *A critique of the Women's Health Initiative hormone therapy study*, Fertility and Sterility., 84 (2005), s. 1589-1601
4. Kokoszka A, Brus S. *Tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej: zalety i ograniczenia użyteczności,* Wiadomości Psychiatryczne., 13 (2010), s. 70-77
5. Goodman M.D. M. *Are all estrogens created equal? A review of oral vs. transdermal therapy*, Journal of Women's Health., 21 (2012), s. 161-169
6. Variankaval N.E, Jacob K.I, Dinh S.M. *Characterization of crystal forms of b-estradiol thermal analysis, Raman microscopy, X-ray analysis and solid-state NMR.*, Journal of crystal growth., 217 (2000), s. 320-331
7. Ma X, Taw J, Chiang C-M. *Control of drug crystallization in transdermal matrix system*, International journal of pharmaceutics., 142 (1996), s. 115-119
8. Behl M, Lendlein A. *Shape-memory polymers*. Materials today., 10 (2007), s. 20-28
9. Gębarowska K, Kasperczyk J, Dobrzyński P, Scandola M, Zini E, Li S. *NMR analysis of the chain microstructure of biodegradable terpolymers with shape memory properties*, European Polymer Journal., 47 (2011), s.1315-1327
10. Pęksa, A. *Ekstruzja jako metoda produkcji wyrobów ekspandowanych*. Seminaria Naukowe Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego, 6 (2007), ISSN 1642-848X
11. Dobrzyński P, Kasperczyk J, Smola A, Pastusiak M, Sobota M. *Bioresorbable and biocompatible thermoplastic elastomer having a shape memory,particularly for biomedical applications and a process for their preparation*, EP 2647656 A2. (2013)
12. Wiranidchapong C, Tucker IG, Rades T, Kulvanich P. *Miscibility and interactions between 17beta-estradiol and Eudragit® RS in solid dispersion*, Journal of pharmaceutical sciences., 97 (2008), s.4879-88
13. Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. *The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review*, International journal of pharmaceutics., 415 (2011), s. 34-52

Zastosowanie terpolimeru w otrzymywaniu implantów z estradiolem metodą ekstruzji

Streszczenie

17-β-estradiol (E2) jest hormonem pełniący istotne funkcje w organizmie. Ostatnio zwrócono także uwagę na możliwości wykorzystania jego właściwości neuroprotekcyjnych. Terapia chorób neurodegradacyjnych wymaga stałego przyjmowania substancji leczniczej, a optymalnym sposobem terapii może być zastosowanie implantów otrzymanych za pomocą ekstruzji.

Celem badań była ocena właściwości strukturalnych i powierzchniowych implantów zawierających E2 otrzymanych z terpolimeru z pamięcią kształtu. Przydatność procesu ekstruzji jako metody otrzymania implantów polimerowych była również przedmiotem badań.

Implanty (1mm x 10 mm) zawierające E2 (10% w/w) uzyskano z terpolimeru poli-L-laktydo-ko-glikolido-ko-trimetylenowęglanu (57:19:24; 59000 Da) z pamięcią kształtu. Terpolimer zsyntetyzowano w masie, a jako inicjatora polimeryzacji użyto octanu cyrkonu o niskiej toksyczności. Implanty otrzymano metodą ekstruzji. Implanty sterylizowano za pomocą promieniowania gamma z użyciem akceleratora wiązki elektronów (10 MeV, 360 mA, 25kGy). Badaniom poddano E2, terpolimer, implanty przed i po sterylizacji. Właściwości strukturalne i powierzchniowe zbadano za pomocą DSC, NMR, GPC i SEM.

Otrzymane wyniki wykazały na możliwość zastosowania ekstruzji do wytwarzania implantów polimerowych z E2 na bazie P(L-LA:GA:TMC).

W toku badań uzyskano optymalne właściwości strukturalne i powierzchniowe dla prototypu produktu leczniczego.

Słowa kluczowe: 17- β -estradiol, poli-(L-laktydo-ko-gligolido-ko-trimetylenowęglan, ekstruzja, pręty, pamięć kształtu

Application of terpolymer in the preparation of estradiol implants by extrusion

Abstract

17-β-estradiol (E2) is a hormone performing essential functions in the body. Recently attention has been paid to the possibility of using its neuroprotective properties. Neurodegenerative diseases therapy requires permanent drug administration. An optimal method of treatment may be the use of implants prepared by means of extrusion.

The aim of the study was to evaluate the structural properties and surface implants with E2 obtained from the terpolymer with shape memory. The usefulness of the extrusion process as a method of the obtaining of polymer implants was also studied.

Implants (1mm x 10mm) with E2 (10%w/w) were formulated from lactide: glycolide: trimethylenecarbonate (57:19:24; 59000 Da) with shape memory. This terpolymer was synthesized in mass using and zirconium (IV) acetylacetonate was used as the polymerization initiator with a low toxicity. The implants were obtained by extrusion. The implants were sterilized by gamma radiation using an electron beam accelerator (10 MeV, 360 mA, 25kGy). E2, terpolymer, implants before and after sterilization were analysed. The structural and surface properties were studied by DSC, NMR, GPC and SEM.

The results demonstrated the applicability of extrusion in the preparation of polymeric implants with E2 based on the P (L-LA: GA: TMC).

In this study were obtained optimal structural properties and surface for the prototype of the medicinal product.

Keywords: 17- β -estradiol, poly(L-lactide- co-glycolide- trimethylenecarbonate), extrusion, rods, shape-memory

Indeks autorów

Adamski R. 183
Bednarczyk M. 88
Cwynar A. 21
Dubicki A. 169
Dudko P. 41
Gawroński M. 66
Goede A. 31, 66
Górniak B. 123, 135
Janicka A. 21
Junkuszew A. 41
Kamińska A. 183
Karpeta P. 194
Karpiński R. 123, 135
Kozak M. 145
Kozieł P. 88
Krajewski A. 31, 66
Kręcidło Ł. 106
Krzyśko-Łupicka T. 106
Mazurek U. 88
Mokshaha-Zarzycki A. 194
Muc-Wierzgoń M. 88
Musiał P. 53, 76
Nowosad K. 76
Pakowski Z. 183
Simińska E. 31
Sobczak P. 145
Stępień P. 53, 76
Szabelski J. 123, 135
Szala M. 123, 135
Tomanek R. 194
Walkiewicz K. 88
Wandtke T. 7
Wilińska J. 194
Wójcik A. 156
Wrona I. 156
Wybranowski T. 21
Zawiślak K. 145