

# **Nowoczesne trendy w medycynie**



# **Nowoczesne trendy w medycynie**

Redakcja:  
**Monika Olszówka**  
**Kamil Maciąg**

Lublin 2015

## **Recenzenci:**

dr n. farm. Anna Berecka  
prof. dr hab. n. biol. Alicja Buczek  
prof. dr hab. inż. Andrzej Chwojnowski  
dr n. med. Marzanna Ciesielka  
dr n. med. Katarzyna Kocka  
dr Agnieszka Kuźniar  
dr Anna Matuszewska  
dr Barbara Michalec-Wawiórka  
dr Agnieszka Nawrocka  
dr Aneta Ptaszyńska  
dr Ewa Sajnaga  
dr n. rolniczych Ewa Skrzypczak  
dr inż. Jarosław Zubrzycki

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:  
Ilona Żuchowska

Projekt okładki:  
Agnieszka Ciurysek

© Copyright by Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL

ISBN 978-83-65272-10-2

Wydawca:  
Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL  
ul. Głowackiego 35/348, 20-060 Lublin  
[www.fundacja-tygiel.pl](http://www.fundacja-tygiel.pl)

## Spis treści

<i>Andrzej Michniowski, Agnieszka Szyszkowska, Dagmara Galas</i> Aplikacje materiałów polimerowych w medycynie .....	7
<i>Robert Karpiński, Beata Górniak, Jacek Maksymiuk</i> Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe .....	18
<i>Paulina Musiał, Mateusz Stojko, Aleksandra Moździerz, Dorota Olczyk, Wioleta Kobiela, Małgorzata Juszek-Piekut, Jerzy Stojko</i> Badania doświadczalne biogodności tkankowej polimerów.....	33
<i>Żaneta Anna Mierzejewska</i> Biokompatybilności i osteointegracja implantów metalicznych.....	45
<i>Zofia Kula, Anna Laska, Hieronim Szymanowski</i> Zastosowanie polimerów w stomatologii .....	55
<i>Joanna Dziedzic, Monika Smyl-Golianek, Wojciech Smagowski, Rafał Rusinek</i> Stopy metali używane w ortodoncji.....	67
<i>Aleksandra Stefanowicz, Izabela Bielińska, Tomasz Wandtke</i> Skutki uboczne materiałów stosowanych we współczesnej protetyce stomatologicznej na przykładzie materiałów odbudowujących i środków do wybielania zębów .....	80
<i>Aleksandra Kruk, Agnieszka Gadomska-Gajadbur, Paweł Ruśkowski</i> Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej .....	91
<i>Ilona Dudek, Marta Skoda, Anna Jarosz</i> Medycyna w skali nano – grafen .....	103
<i>Mateusz Niścior, Monika Adameczyk, Katarzyna Tarnawska</i> Matryce hydrożelowe – zastosowania superabsorbentów polimerowych w medycynie.....	115
<i>Arkadiusz Goede, Maciej Gawroński, Joanna Woźniak</i> Mini-koliste cząsteczki DNA jako potencjalnie bezpieczne i wysoce efektywne nośniki w niewirusowym transferze genów .....	130
<i>Sylvia Nisztuk-Pacek, Magdalena Surdyka</i> Chromosom Y w molekularnych badaniach kryminalistycznych .....	144
<i>Kamil Myszczyński, Łukasz Paukšto, Tomasz Molcan, Jan Paweł Jastrzębski</i> Badanie ekspresji genów kluczem do poznania funkcjonowania organizmów – porównanie wiodących metod wysokoprzepustowych .....	158

<i>Anna Wawruszak, Katarzyna Król-Turmińska, Agnieszka Borzęcka</i> Terapeutyczne zastosowanie wybranych inhibitorów deacetylaz histonów (HDIs)...	173
<i>Marek Kowalczyk</i> Zmienność sekwencji genu GPX1 u człowieka i zwierząt modelowych .....	183
<i>Karolina Kasprzak, Kinga Kropiwiiec, Malwina Merska</i> Wykorzystanie genetyki molekularnej w ochronie zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich .....	200
<i>Marta Karaźniewicz-Łada, Agnieszka Anczykowska, Karolina Wiśniewska</i> Metoda HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu krwi z przeznaczeniem do badań farmakokinetyki u ludzi .....	208
<i>Alicja Janicka, Anna Cwynar, Blanka Ziomkowska</i> Przegląd spopularyzowanych i najczęściej stosowanych metod spektroskopowych w dziedzinach nauk medycznych i farmaceutycznych .....	219
<i>Ewa Kurzak, Piotr Kucharzewski, Ewa Mrukwa-Kominek</i> Metoda sieciowania włókien kolagenowych w terapii schorzeń rogówki – zastosowanie i skuteczność kliniczna .....	229
<i>Marta Iskierka, Olga Loska</i> Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej.....	240
<i>Iwona Kamińska, Joanna Ortyl, Roman Popielarz</i> Systemy monitorowania on-line reakcji polimeryzacji .....	255
<i>Łukasz Jaworski, Robert Karpiński, Daniel Gąska</i> Telemanipulator RobIn Heart i jego zastosowanie w medycynie.....	270
<i>Wioleta Kobiela, Mateusz Stojko, Paulina Musiał, Aleksandra Moździerz, Dorota Olczyk, Małgorzata Juszek-Piekut, Jerzy Stojko</i> Ocena kliniczna skuteczności terapeutycznej maści propolisowo-pyłkowej.....	285
<i>Magdalena Osiak, Natalia Pajk</i> Wpływ fazy przedanalizacyjnej na wynik badania laboratoryjnego .....	297
Indeks autorów .....	309

# **Aplikacje materiałów polimerowych w medycynie**

## **1. Wprowadzenie**

Materiały polimerowe wykorzystywane są niemal we wszystkich gałęziach przemysłu. Mamy z nimi również styczność w codziennym życiu. Opakowania na różnego rodzaju produkty, jednorazowe reklamówki, przedmioty codziennego użytku czy też elementy budowlane wykonane są w dużej mierze z tworzyw sztucznych zbudowanych właśnie z polimerów. W Polsce rocznie produkowanych jest około 2,1 mln ton polimerów [1], przy czym światowa roczna produkcja sięga 300 mln ton [2]. Produkowane obecnie materiały polimerowe posiadają ściśle określone zastosowania i są przeznaczone do indywidualnych celów. Współczesna nauka nie mogłaby istnieć bez rozwoju wiedzy na temat polimerów. Materiały polimerowe wykorzystywane są bardzo powszechnie w medycynie. Takie polimery nazywane są polimerami biomedycznymi [3]. Są one wykorzystywane w różnych gałęziach medycyny, takich jak medycyna estetyczna, stomatologia, chirurgia, ortopedia, kardiologia, okulistyka i wiele innych.

## **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy jest przegląd literaturowy najnowszych doniesień z zakresu wykorzystania polimerów w medycynie. Omówione zostały przykładowe materiały polimerowe wykorzystywane w różnych gałęziach medycyny. Zwrócono szczególną uwagę na możliwości ich zastosowania w inżynierii tkankowej, chirurgii kostnej oraz do produkcji sprzętu medycznego.

---

<sup>1</sup> michniowski.a@wp.pl, Kliniczny Oddział Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu, ul. Lwowska 60, 35-301 Rzeszów

<sup>2</sup> szyszkowska.a@wp.pl, Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

<sup>3</sup> dgalas@poczta.onet.eu, Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

### 3. Materiały polimerowe w medycynie

#### 3.1. Znaczenie materiałów polimerowych

Polimery są materiałami występującymi bardzo powszechnie w przyrodzie. Niektóre z nich, tj. polisacharydy, polipeptydy czy polinukleotydy, produkowane są przez organizmy żywe. Nazywane są one biopolimerami i pełnią istotne funkcje biologiczne [4]. Przełomowym wydarzeniem, które zrewolucjonizowało przemysł biomedyczny, stało się pojawienie na rynku polimerów syntetycznych w roku 1920. Początkowo wykorzystywane były do zamykania ran lub leczenia zębów [5]. W ostatnich latach odnotowano ogromny postęp w zakresie materiałów mających styczność z organizmem pacjenta. Obecnie materiały polimerowe mogą być wykorzystywane do budowy elementów mających bezpośredni kontakt z wewnętrznymi lub zewnętrznymi częściami organizmu pacjenta, jak i do budowy aparatury oraz narzędzi medycznych. Znalazły one także zastosowanie w farmacji jako środki krwiozastępcze czy substancje wprowadzające leki do organizmu (nośniki leków). W tabeli 1 zostały zestawione przykładowe zastosowania trzech wybranych polimerów: polietylenu, polichloroku winylu oraz poliamidów [3].

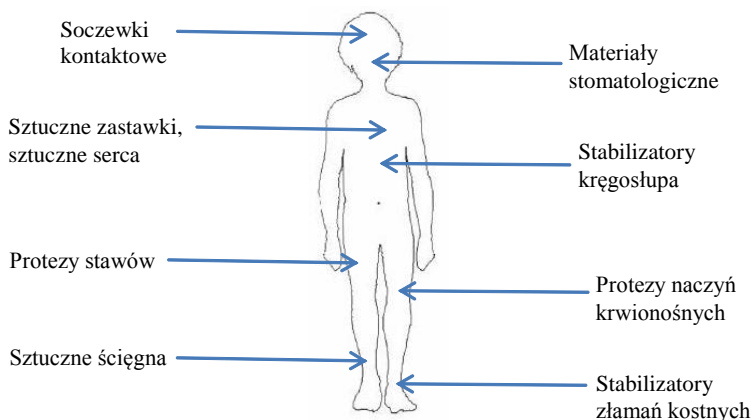
Tabela 1. Zastosowania wybranych polimerów w medycynie

Nazwa polimeru lub grupy polimerów	Zastosowanie
polietylen	jednorazowe rękawiczki, strzykawki, pojemniki
polichlorek winylu	cewki, ustniki, wzierniki
poliamidy	wyroby dentystyczne, pojemniki do sterylizacji

Źródło: Opracowanie własne

Ze względu na styczność materiałów polimerowych z ciałem pacjenta muszą one spełniać kilka wymogów: powinny zachować swoje właściwości fizykochemiczne pomimo działania na nie wysokiej temperatury, detergentów, promieniowania rentgenowskiego czy aseptyków. Polimery, jak większość materiałów, po pewnym czasie eksploatacji mogą ulegać degradacji, dlatego też istotne jest również, aby produkty ich rozkładu nie wywoływały u pacjentów, stanów zapalnych, reakcji alergicznych, immunologicznych, czy jakichkolwiek innych interakcji z organizmem [3]. Na rysunku 1 zostały przedstawione wybrane obszary zastosowań materiałów polimerowych w odniesieniu do ciała pacjenta.

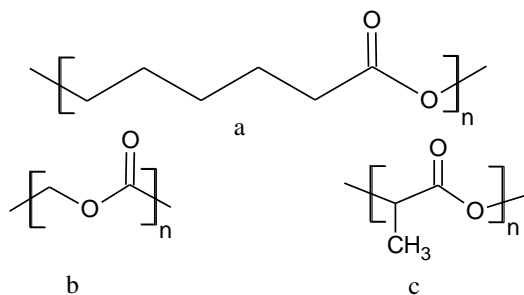




Rysunek 1. Zastosowanie materiałów polimerowych w odniesieniu do ciała człowieka [opracowanie własne]

### 3.2. Wykorzystanie polimerów w inżynierii tkankowej

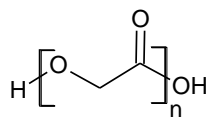
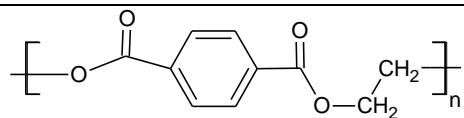
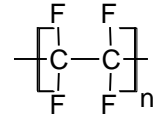
Materiały polimerowe ze względu na dużą biotolerancję znalazły zastosowanie w produkcji implantów. Pod tym pojęciem kryje się cała gama różnych elementów, które po umieszczeniu w ciele pacjenta imitują w lepszym lub gorszym stopniu naturalne ludzkie tkanki. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie implantami biowchłanialnymi. Istotną zaletą wspomnianych materiałów jest łatwość ich użycia, duża wytrzymałość mechaniczna, a także nie bez znaczenia jest też fakt, że implantów takich nie trzeba w przyszłości usuwać. Implanty takie są rozkładane w procesie hydrolizy a następnie metabolizowane w komórkach organizmu do dwutlenku węgla oraz wody, które są następnie usuwane z organizmu [6]. Do popularnych prekursorów służących do produkcji implantów polimerowych należą w ostatnim czasie  $\epsilon$ -kapolaktony (Rys. 2), są one związkami łatwo degradującymi oraz ulegającymi reakcji polimeryzacji, w wyniku której tworzą poli( $\epsilon$ -kapolaktony) (PCL). Substancje te cechują się dużą odpornością mechaniczną, odpornością na korozję oraz nie wchodzi w interakcje z organizmem. Materiały te rozkładają się po zakończeniu procesu leczenia [7÷9]. W inżynierii tkankowej wykorzystuje się również poli(kwas glikolowy) (PGA) oraz poli(kwas mlekowy) (PLA) przedstawione na rysunku 1, ze względu na możliwość ich łatwej degradacji [10÷13]. Przykładowo, PGA posiada szybkie tempo degradacji i po 6 miesiącach zostaje usunięte z organizmu, natomiast PCL wymaga około 2-3 lat na całkowitą degradację [10, 14].



Rysunek 2. Wzory półstrukturalne a) poli(ε-kaprolaktonu) (PCL), b) poli(kwas glikolowy) (PGA), c) poli(kwas mlekowy) (PLA) [opracowanie własne]

Materiały polimerowe zrewolucjonizowały takie dziedziny medycyny jak kardiologia inwazyjna oraz chirurgia naczyń, są one szeroko wykorzystywane jako sztuczne zastawki serca oraz w udrażnianiu światła zwężonych naczyń wieńcowych pod postacią tak zwanych stentów. Obecnie w medycynie znalazło zastosowanie kilka rodzajów polimerów, do najpopularniejszych należą polietylen, politetrafluoroetylen, polipropylen, poliuretany oraz poli(tereftalan etylenu) [15,16]. Pierwsze badania z zastosowaniem przeszczepu naczyniowego u człowieka odnotowano już w 1954r. przez Blakemore i Voorhees[17]. Wraz z rozwojem nauki zaczęto wykorzystywać coraz to lepsze materiały do produkcji implantów naczyniowych. W tabeli 2 przedstawiono wybrane materiały polimerowe wykorzystywane w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Popyt rynku stał się kołem napędowym do produkcji biogodnych polimerów. Wiele grup naukowców prowadzi badania nad syntezą i modyfikacjami już istniejących polimerów, dążąc do otrzymania materiału, który znajdzie zastosowanie w medycynie.

Tabela 2. Wybrane polimery wykorzystywane w leczeniu schorzeń sercowo-naczyniowych

Nazwa	Skrót	Wzór
poli(kwasglikolowy)	PGA	
poli(teraftalanetyleny)	PET	
poli(tetrafluoroetylen)	PTFE	

Źródło: Opracowanie własne

Do najnowszych materiałów biomedycznych służących do produkcji stentów należy poli(sebacynian glicerolu) (PGS). O ile wspomniane wcześniej PLA, PGA oraz PCA miały docelowo znaleźć zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, tak PGS został zaprojektowany typowo do zastosowań medycznych, jako rusztowanie do wytwarzania struktur w inżynierii tkankowej, a dokładniej do produkcji tkanek sercowo-naczyniowych [18]. PGS jest materiałem tanim, biokompatybilnym, biodegradowalnym, zaprojektowanym tak, aby zapewnić optymalne środowisko do proliferacji macierzy pozakomórkowej. Co więcej, badania rusztowań PGS pozwoliły stwierdzić, iż wykazują one podobieństwo do rodzimej tkanki naczyniowej, co sprzyja braku odrzucenia przez organizm [19, 20].

Materiały polimerowe znalazły również zastosowanie do wytwarzania sztucznych zastawek serca. Wady zastawek serca są źródłem zarówno zachorowalności jak i umieralności. Pierwszy przeszczep zastawki miał miejsce w 1952 roku. Od tego czasu medycyna zrobiła duży krok naprzód wykorzystując coraz to nowsze materiały jako implanty zastawek, co zmniejszyło ilość powikłań i poziom śmiertelności po zabiegach [10]. Obecnie największe znaczenie mają zastawki mechaniczne i biologiczne. Pierwsze charakteryzują się mniej skomplikowaną budową, natomiast drugie są bardziej podobne do naturalnych zastawek serca [21]. Zarówno implanty biologiczne jak i mechaniczne zastawek nie są bez wad. Jako alternatywa od wspomnianych implantów została opracowana tzw. zastawka inżynierii tkankowej [ang. *tissue-engineered heart valve* (TEHV)] [10]. Do produkcji tego typu zastawek wykorzystuje się takie polimery jak poliglikolid PGA, polilaktyd PLA, poli-4-hydroksymaślan P4HB. Na wspomniane materiały nanosi się odpowiednie linie komórkowe, które po

wprowadzeniu do organizmu mają na celu rekonstrukcję zastawki [22]. Badania wykazały, iż najlepsze rezultaty daje materiał wykonany z połączenia PLA-P3HB (kompozyt PLA-P3HB) ze względu na duże podobieństwo do zastawek naturalnych [23].

Ostatecznym celem inżynierii tkankowej w dziedzinie układu krążenia jest stworzenie sztucznego serca, które może być wykorzystane do leczenia niewydolności serca. Ma ono być pomocne, gdy niewystarczające stają się przeszczepy allogeniczne komórek (w obrębie jednego organizmu). Obecnie na rynku dostępnych jest kilka prototypów sztucznego serca, tj. Abiomed, SynCardia, Carpentier czy POLVAD (polskiej produkcji). Podjęto już próby wszczepienia sztucznego serca do organizmu pacjenta, jednak technika ta wymaga jeszcze udoskonaleń.

### 3.3. Materiały polimerowe w chirurgii kostnej

Materiały polimerowe wykorzystywane w chirurgii kostnej muszą charakteryzować się dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz dużą wytrzymałością w układach biologicznych. Wykorzystywane są one do produkcji protez ścięgien, stawów biodrowych, stawów ręki czy kości [3]. Mogą być one wykonane z różnego rodzaju polimerów, przykładowe zostały zestawione w tabeli 3.

Tabela 3. Przykładowe materiały do otrzymywania wybranych protez

Rodzaj protezy	Materiał
ścięgna	tkanina poliestrowa
staw ręki	kauczuk silikonowy
staw biodrowy	poli(metakrylan metylu)
kości	płytki poliestrowe

Źródło: Opracowanie własne


Do niedawna najczęściej używanym materiałem do produkcji różnego rodzaju protez były stopy tytanu, kobaltu oraz ceramika [24, 25]. Typowa proteza stawu biodrowego zbudowana jest z trzpienia, wkładki, głowy oraz panewki. Bardzo ważnym elementem procesu leczenia jest prawidłowe dopasowanie protezy do indywidualnych potrzeb chorego. Ma to wpływ nie tylko na komfort ruchu pacjenta ale także na przeżywalność implantu. Dąży się do tego aby sztywność protezy była jak najbardziej zbliżona do sztywności kości, ponieważ zbyt duża jej sztywność może powodować odciążenie tkanki kostnej a w rezultacie jej zanik. Materiały metaliczne mimo, iż wykazują dużą wytrzymałość na zużycie mogą powodować destrukcję kostną, dlatego też obecnie są prowadzone badania nad nowymi materiałami o lepszych właściwościach. Do tej pory nie udało się stworzyć

idealnych materiałów do produkcji protez, ponieważ zarówno implanty metalowe jak i ceramiczne nie są pozbawione wad. Obiecującą grupą materiałów są kompozyty polimerowe, których znaczenie na rynku rośnie z roku na rok [26]. Materiały te cechuje łatwość oraz wszechstronność wykorzystania ze względu na ich dużą wytrzymałość mechaniczną, mały ciężar właściwy, przenikalność dla promieniowania rentgenowskiego, a także właściwości antykorozyjne [27]. Istotną wadą tego typu protez jest jednak czas ich eksploatacji, który waha się w granicach od 7 do 10 lat. Oznacza to, iż pacjent w przeciągu życia może potrzebować wymiany zużytej protezy. Jednak badania nad materiałami biomedycznymi, mogą przyczynić się do otrzymania materiału o zadawalających właściwościach.

### 3.4. Materiały polimerowe do produkcji sprzętu medycznego

Polimery są powszechnie wykorzystywane do produkcji sprzętu medycznego. Najczęściej wykorzystywanymi polimerami są: polietylen (PE), polipropylen (PP), polistyren, poliestry, polichlorek winylu (PVC) czy poliwęglany (PC). Znalazły one wszechstronne zastosowania, używa się ich m. in. do produkcji rękawiczek, nici chirurgicznych, różnego rodzaju pojemników, wzierników, kaniuli, glukomerów, kroplówek i innych. Są materiałami stosunkowo tanimi co pozwala na wykorzystanie ich do wytwarzania produktów jednorazowego użytku. W tabeli 4 zostały zestawione wybrane polimery oraz ich zastosowanie w medycynie.

Tabela 4. Wybrane polimery oraz ich zastosowanie w medycynie [28]

Polimer	Wzór	Zastosowanie
polietylen (PE)	$\left[ \text{CH}_2\text{CH}_2 \right]_n$	folie, opakowania, worki, plastry, łożyska do protez bioder oraz alloplastyki kolan
polipropylen (PP)	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	nici chirurgiczne, zasłony, fartuchy, pojemniki, strzykawki, tacki medyczne
polistyren	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n$ 	instrumenty diagnostyczne i laboratoryjne, jednorazowe naczynia, szalki Petriego, pojemniki do hodowli

		tkankowych, pipety, kolby
poliestry	$\left[ \text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \text{R}^1 \text{---} \text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \text{O} \text{---} \text{R}^2 \text{---} \text{O} \right]_n$	sterylne tacki, narzędzia stomatologiczne oraz chirurgiczne, kaniule, elementy strzykawek, uchwyt do ostrza skalpela
biodegradowalne poliestry (np. P3HB)	$\left[ \text{O} \text{---} \text{CH} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \end{array} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \right]_n$	biodegradowalne nici chirurgiczne, zszywki do tkanek, stenty, ortopedyczne urządzenia stabilizujące, materiał dla inżynierii tkankowej
poliwęglany (PC)	$\left[ \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \right]_n$	aparatura medyczna, pojemniki, strzykawki, kaniule, separatory, osłony dializatorów, glukometry, pompy, uchwyty chirurgiczne, długopisy insulinowe
polichlorek winyłu (PVC)	$\left[ \text{CH} \begin{array}{c}   \\ \text{Cl} \end{array} \text{---} \text{CH}_2 \right]_n$	opakowania, blistry, rurki do transportu płynów, kroplówki, membrany, maski tlenowe, rękawiczki

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [28]

#### 4. Podsumowanie

Rozwój wiedzy na temat polimerów stał się krokiem milowym w rozwoju wielu dziedzin, w tym medycyny. Obecnie materiały polimerowe są powszechnie wykorzystywane w procesie leczenia. Badania nad syntezą oraz modyfikacjami już istniejących materiałów skutkują tym, że z roku na rok wypuszczane są na rynek coraz to nowsze produkty o lepszych właściwościach. Zastosowanie materiałów polimerowych pomogło przyspieszyć oraz ułatwić proces leczenia, a także poprawić komfort pacjentów. Nie udało nam się jeszcze poznać wszystkich możliwych zastosowań polimerów, jednak naukowcy pokładają duże nadzieje w tym, iż w najbliższych latach materiały polimerowe zrewolucjonizują przemysł medyczny.

#### Literatura

1. Endo K., Kubo N., Ishida T. *Polymerization of Cyclic-Disulphides and Formation of Gel Structure Containing Polycatenane*, *Kautschuk Gummi, Kunststoffe.*, 61 (2008), s. 176-179
2. Cordier P., Tournilhac F., Soulie-Ziakowic C., Leibler L., *Self – healing and thermoreversible rubber from supramolecular assembly*, *Nature.*, 451 (2008), s. 977-980
3. Rabek J. F., *Współczesna wiedza o polimerach*, Wydawnictwo Naukowe PWN., (2013), s.480-497
4. Wiśniewska M., *Encyklopedia dla wszystkich Chemia*, Wydawnictwo Naukowe i Techniczne., (2001), s. 53
5. Denis C., Menidjel R. A., *Patentability searching for biomaterial and related polymers*, *World Patent Information.*, 34 (2012), 284-291
6. Chantsoulis M., Świątkowska-Wróblewska K., Skrzek A., Urbanowska J., Chamela-Bilińska D., Zwoliński J., Sakowski J., *The use of bioresorbable implants for the operative treatment of cervical spondylosis*, *Physical medicine.*, (2009), s. 66
7. Russo L., Russo T., Battocchio C., Taraballi F., Gloria A., D'Amora U., De Santis R., Polzonetti G., Nicotra F., Ambrosio L., Cipolla L. *Galactose grafting on poly( $\epsilon$ -caprolactone) substrates for tissue engineering: a preliminary study*, *Carbohydrate Research.*, 405 (2015), 39-46
8. Pigulski B., Gulia N., Szafert S. *New  $\epsilon$ -caprolactone diene monomers aiming for biodegradable polymers*, *Tetrahedron Letters.*, 54 (2013), 6032-6034
9. Shi W., Gu C., Jiang H., Zhang M., Lang M. *Effects of amphiphilic chitosan-g-poly( $\epsilon$ -caprolactone) polymer additives on paclitaxel release from drug eluting implants*, *Materials Science and Engineering.*, 45 (2014), 502-509
10. Lee A. Y., Mahler N., Best C., Lee Y., Breuer C. K. *Regenerative implants for cardiovascular tissue engineering*, *Translational Research.*, 163, Number 4, (2014), 321-341

11. Cleary M. A., Geiger E., Grady C., Best C., Naito Y., Breuer C. *Vascular tissue engineering: the next generation*, Trends in Molecular Medicine., 18(2012), s. 394-404
12. Patterson J. T., Gilliland T., Maxfield M. W. *Tissue-engineered vascular grafts for use in the treatment of congenital heart disease: from the bench to the clinic and back again*, Regenerative Medicine., 7(2012) s. 409-19
13. Hibino N., Yi T., Duncan D. R. *A critical role for macrophages in neovessel formation and the development of stenosis in tissue-engineered vascular grafts*, The FASEB Journal., 25(2011) s. 4253-63
14. Gunatillake P. A., Adhikari R. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*, European Cells & Materials., 5(2003), s. 1-16
15. Liu W., Wang J., Chen C., Zhou F., Zhou Y., Zhang F. *The effects of Batroxobin on the intimal hyperplasia of graft veins*, The American Journal of Surgery., 206 (2013), s. 594-598
16. Baino F., Perero S., Ferraris S., Miola M., Balagna C., Verné E., Vitale-Brovarone C., Coggiola A., Dolcino D., Ferraris M. *Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: Overview and future prospects*, ActaBiomaterialia., 10 (2014),s. 1064-1087
17. Blakemore A. H., Voorhees A. B. *The use of tubes constructed from Vinyon N cloth in bridging arterial defects: experimental and clinical*, Annals of Surgery., 140 (1954), s. 324-34
18. Wang Y., Ameer G. A., Sheppard B. J., Langer R. *A tough biodegradable elastomer*, Nature Biotechnology., 20(2002), s. 602-6
19. Gao J., Crapo P. M., Wang Y. *Macroporous elastomeric scaffolds with extensive micropores for soft tissue engineering*, Tissue Engineering., 12(2006), s. 917-25
20. Chen Q. Z., Bismarck A., Hansen U. *Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue*, Biomaterials., 29 (2008), s. 47-57
21. Rachwalik M., Biały D., Wawrzyńska M. *Mechaniczne protezy zastawek serca – historia i rozwój technologii*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica., 16 (3)(2010), s. 265-267
22. Kostrzewa B., Rybak Z. *Rys historyczny, terażniejszość i przyszłość biomateriałów wykorzystywanych w sztucznych zastawkach serca*, Polimery w Medycynie., 43 (3)(2013),s. 183-189
23. Sewell-Loftin M. K., Chun Y. W., Khademhosseini A., Merryman W. D. *EMT-inducing biomaterials for heart valve engineering: taking cues from developmental biology*, Journal of Cardiovascular Translational Research., 4 (5)(2011), s. 658-671
24. Cohen J. *Metal implants: historical background and biological response to implantation*, Biomaterials in reconstructive surgery., L. R. Rubin, St. Luis, Bobsy (1983)
25. Marciniak J. *Biomateriały w chirurgii kostnej*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej., Gliwice (1992)
26. Matthews F. L., Rawlings R. D. *Composite materials: Engineering and science*, Chapman&Hall, (1995)



27. Mano J. F., Sousa R. A., Boesel L. F., Neves N. M., Reis R. L. *Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments*, Composites Science and Technology., 64 (2004), s. 789-817
28. Czuba L. *Application of Plastics in Medical Devices and Equipment*, *Plastics Design Library.*, (2014), s. 9-19

## **Aplikacje materiałów polimerowych w medycynie**

### Streszczenie

W artykule zwrócono uwagę na powszechność wykorzystania polimerów w różnych gałęziach medycyny, takich jak medycyna estetyczna, stomatologia, chirurgia, okulistyka i wiele innych. Niniejsza praca przedstawia przegląd literaturowy najnowszych doniesień z zakresu wykorzystania polimerów w medycynie. Omówione zostały przykładowe materiały polimerowe oraz możliwości ich wykorzystania w przemyśle medycznym. Zwrócono szczególną uwagę na możliwości ich zastosowania w inżynierii tkankowej, chirurgii kostnej oraz do produkcji sprzętu medycznego. Zwrócono uwagę na potrzebę rozwoju wiedzy na temat polimerów, syntezę nowych oraz modyfikacje już istniejących polimerów.

Słowa kluczowe: polimery, zastosowania medyczne, polimery biodegradowalne

## **Applications of polymeric materials in medicine**

### Abstract

The article focuses on the universality of the use of polymers in various branches of medicine, such as cosmetic medicine, dentistry, surgery, ophthalmology, and many others. This paper presents a literature review of recent reports on the use of polymers in medicine. Discussed examples of polymeric materials and their use in the medical industry. Special attention is paid to the possibility of their use in tissue engineering, bone surgery and for the production of medical equipment. Drew attention to the need to develop knowledge of polymers, synthesis of new and modification of existing polymers.

Keywords: polymers, medical applications, biodegradable polymers

## **Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe**

### **1. Wstęp**

Leczenie ran od początku istnienia ludzkości stanowi bardzo istotny problem. Pierwszymi środkami leczniczymi były substancje pochodzenia naturalnego takie jak miód, masło, żywica, preparaty roślinne. Z biegiem lat i rozwojem nauki powstawały coraz to nowe metody wspomagające odbudowę uszkodzonych tkanek. Przełomem w tej dziedzinie były badania prowadzone przez Prof. Wintera w 1962 roku. Dowiódł on, że wilgotne środowisko dwukrotnie przyspiesza proces odnawiania się naskórka. W 1964 roku Prof. Hinman i Prof. Maibach potwierdzili jego badania w warunkach szpitalnych. Od tamtej pory zainteresowanie polimerowymi opatrunkami systematycznie wzrasta [1]. Celem pracy jest przegląd literatury dotyczącej procesu gojenia się rany oraz opatrunków nowej generacji stosowanych obecnie w medycynie.

### **2. Proces gojenia się rany**

Rana jest to przerwanie ciągłości skóry, uszkodzenie błon śluzowych i tkanek głębiej położonych powstałe na skutek urazu (mechanicznego, termicznego, chemicznego) lub zamierzonych działań w wyniku zabiegów chirurgicznych często połączone z krwotokiem. Uszkodzenie ciała inicjuje wiele złożonych zjawisk fizycznych i chemicznych składających się na proces gojenia rany, wykształcony w milionach lat rozwoju filogenetycznego człowieka [2].

Przebieg procesu gojenia jest skomplikowany i indywidualny u każdego człowieka. Ma na niego wpływ wiele czynników ogólnych, takich jak: wiek, odżywianie, odporność, zaburzenia hormonalne, przebyte lub obecne choroby, stosowana farmakologia a także temperatura i stężenie tlenu. Szybkość gojenia rany zależy także od jej wielkości, umiejscowienia, ukrwienia, obecności ciał obcych, tkanki martwiczej lub infekcji oraz sposobu leczenia. Każdy z tych czynników może odpowiednio skracać lub

---

<sup>1</sup> Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, robert.karpinski@pollub.edu.pl, Koło Naukowe Inżynierii Biomedycznej

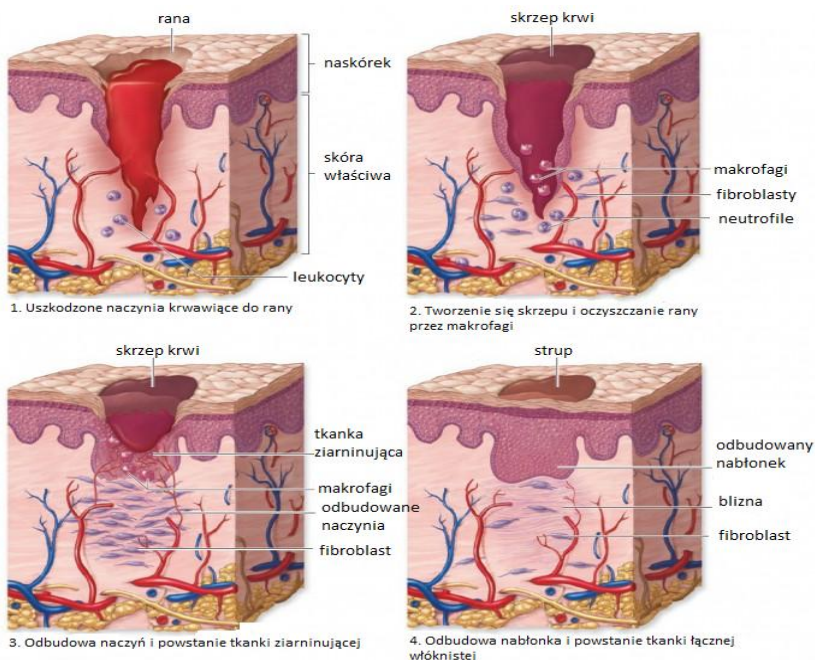
<sup>2</sup> Politechnika Lubelska, Wydział Mechaniczny, beata.gornica@pollub.edu.pl

<sup>3</sup> Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Łęcznej, jacek.maksymiuk84@gmail.com

wydłużać proces gojenia na poszczególnych jego etapach. To, czego nie można uniknąć, co jest jednakowe i niezmiennie u każdego z nas to stadia gojenia się ran [3].

Wyróżniamy trzy następujące po sobie fazy: oczyszczania (faza zapalna, wysiękowa), proliferacyjna oraz remodelingu (odrost nabłonka, naczyń i nerwów, migracja komórek, uporządkowanie się kolagenu) (Ryc.1). Z rany początkowo wydobywa się krew, a następnie (po zahamowaniu krwawienia) wydzielina surowiczo-włóknikowa, która ulega skrzepnięciu. Faza oczyszczania (24-48h) polega na usunięciu martwiczych tkanek, zanieczyszczeń oraz na zapewnieniu ranie odpowiednich warunków środowiskowych. W fazie tej główną rolę odgrywają płytki krwi uwalniające substancje powodujące krzepnięcie. Do skrzepniętej wydzieliny przedostają się leukocyty, które rozpuszczają się i pochłaniają martwe tkanki. Ważną rolę odgrywa także płytkowy czynnik wzrostu (PDGF). Przyciąga on do rany neutrofile i monocyty z krwi oraz fibroblasty z otoczenia rany, które inicjują krótki proces zapalny [2÷6].

Faza proliferacyjna (4-42 dni) rozpoczyna się kilka dni po utworzeniu rany. Polega na wytworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Jednocześnie od brzegów rany zaczyna rozrastać się tkanka ziarninowa, która stopniowo wypełnia ubytek. Przez cały czas rozrostu ziarnina jest pokryta warstewką płynu surowiczo-włóknikowego i leukocytów, co chroni ranę przed wtórnym zakażeniem. Przebieg tej fazy zależny jest także od zaopatrzenia rany w tlen i substancje odżywcze [2÷6].



Rys. 1. Fazy gojenia rany [7]

W trzeciej, ostatniej fazie (6 tyg.-9 miesięcy) dzięki uporządkowaniu włókien kolagenowych dochodzi do obkurczenia i zmniejszenia powierzchni rany, która w efekcie pokryta zostaje cienką warstwą nabłonka. W końcu na bliznę narasta z sąsiedztwa naskórek i na tym kończy się proces gojenia. Tkanka bliznowata jest twardsza i bledsza od zwykłej tkanki łącznej, gdyż zawiera więcej włókien, które często ulegają zmianom szklistym, a mniej naczyń krwionośnych [2÷6].

### 3. Model idealnego opatrunku aktywnego

Wieloletnie badania dotyczące wpływu wilgoci w złożonych procesach gojenia i rozwój technologii materiałów polimerowych pozwoliły na określenie cech i stworzenie opatrunku idealnie przyjaznego ranie. Zaawansowane wyroby, często nazywane opatrunkami nowej generacji wyróżniają się spośród tradycyjnych materiałów opatrunkowych następującymi cechami:

- utrzymują odpowiednie warunki środowiskowe dla gojenia się ran (wilgotność, temperatura, pH, odpowiednia wymiana gazowa między raną a otoczeniem);

- mają bezpośredni wpływ na gojenie się ran (pochłanianie wysięku, oczyszczanie rany z tkanek martwiczych, stymulacja namnażania komórek znacznie przyspieszających proces leczenia, usuwanie toksycznych komponentów);
- chronią ranę i nowo powstające tkanki przed zanieczyszczeniem, ponownym uszkodzeniem;
- tworzą skuteczną barierę dla bakterii i drobnoustrojów;
- wymagają znacznie mniejszej częstotliwości zmian;
- nie zawierają substancji toksycznych dla organizmu;
- są hipoalergiczne;
- przezroczystość opatrunku pozwala na kontrolę stanu rany w dowolnym momencie;

Idealne opatrunki aktywne oprócz zapewniania wilgotnego środowiska zawierają dodatkowo czynnik aktywny. Czynniki aktywnymi są przede wszystkim związki antydnobnoustrojowe, czynniki wzrostu komórek oraz żywe komórki. Istnieją również przypadki, wykorzystywania, jako czynniki aktywne antybiotyków oraz substancji tamujących krwawienie [8, 9].

Jednak ze względu na różnorodność ran i zróżnicowane warunki gojenia odmienne u każdego pacjenta, stworzenie jednego opatrunku spełniającego wszystkie cechy i obejmującego spektrum swojego działania cały okres gojenia rany wydaje się trudny do osiągnięcia.

#### **4. Rodzaje opatrunków aktywnych**

Rozpoznanie zjawisk zachodzących podczas procesu gojenia zaowocowało szybkim rozwojem grupy specjalistycznych opatrunków. Wywołało to pojawienie się na rynku dużej ilości produktów o zróżnicowanych cechach [10].

Aktywne wyroby opatrunkowe stanowią obecnie główny kierunek rozwoju w gałęzi rynku wyrobów medycznych. Z roku na rok obserwuje się coraz większą liczbę takich opatrunków, wprowadzanych do standardowych metod leczenia, a badania nad nowymi materiałami opatrunkowymi intensyfikuje dodatkowo brak pojedynczego produktu, idealnego dla każdego rodzaju rany, na wszystkich etapach jej leczenia [8].

W tabeli 1 przedstawiono poszczególne rodzaje opatrunków aktywnych, przykłady produktów handlowych, główne składniki oraz krótką charakterystykę.

Tabela 1. Rodzaje opatrunków aktywnych, przykłady produktów handlowych, skład i charakterystyka[11]

Opatrunki aktywne	Produkt	Skład	Charakterystyka
Opatrunki absorpcyjne	Actisorb Plus Kaltocarb Lyofoam C	Węgiel aktywowany, srebro lub alginian	Występują w postaci miękkiej, elastycznej pianki, pochłaniają przykry zapach i wydzielinę, dają termiczną izolację, są przepuszczalne dla powietrza
Hydrożele	Aqua-gel, Curiosin, Granugel, Hydrosorb, Intrasite gel,	Polimery	Wchodzące w skład tych opatrunków nierozpuszczalne polimery oczyszczają ranę z tkanek martwiczych oraz utrzymują odpowiednią wilgotność
Hydrowłókna	Aquacel, Versiva	Karboksymetylo-celuloza	Karboksymetyloceluloza która po wchłonięciu wysięku tworzy żel wypełniający dno rany, dzięki temu hamuje dalszy wysięk. Ponadto zapewnia korzystne, wilgotne środowisko oraz kwaśne pH, co z kolei hamuje rozwój drobnoustrojów.
Granulaty	Acudex, Debrisan, Jodosorb	Ziarna polisacharydów	Są pierwszymi opatrunkami aktywnymi wprowadzonymi do leczenia Ziarna polisacharydów pochłaniają wysięk i wspomagają oczyszczanie się ran.
Opatrunki poliuretanowo-piankowe	Allewyn, Combiderm, Lyofoam, Mepilex, Tielle	Składniki hydrofilowe	Hydrofilowe składniki absorbują wysięk jednocześnie zapewniając wilgotne środowisko rany, działają termoregulacyjnie.

			Zapewniają większy komfort pacjentowi poprzez rzadsze zmiany opatrunku.
Alginiany	Kaltogel, Kaltostat, Sorbalgon, Sorbsan	Sole sodowe i wapniowe kwasu alginowego	W kontakcie z raną powstaje substancja żelowa, która dzięki swoim właściwościom hydrofilowym zapobiega wysuszeniu rany oraz przyspiesza powstawanie ziarniny i epitelizację.
Hydrokoloidy	Comfeel, Granuflex, Hydrocoll, Tegasorb	Elastomery, karboksymetyloceluloza, polisacharydy, proteiny	W reakcji z wysiękiem wewnętrzna warstwa opatrunku złożonego z elastomerów, karboksymetylocelulozy, polisacharydów i protein zwiększa swoją objętość, tworząc miękki żel. W takim środowisku zachodzą procesy oczyszczania, ziarninowania i naskórkowania.
Perforowane okłady okluzyjne	Comprigel, Melolin, Release	Polisacharydy	Dzięki swej przestrzennej budowie skutecznie ochraniają ranę nie przywierając do niej, działanie kohezyjne, efekt chłodzenia, do ogólnego zaopatrywania ran różnego pochodzenia
Opatrunki półprzepuszczalne	Bioclusive, Cutifilm, Hydrofilm, Opsite	Błona poliuretanowa	Stanowią ochronę przed wtórnym zakażeniem i mechanicznymi podrażnieniami gojących się ran. Są przepuszczalne dla gazów i wody, a ich odpowiednia plastyczność zapewnia dobre dopasowanie takiego opatrunku do ciała

Opatrunki złożone	Combider, Fibracol, Tender Wet, Tielle, Versiva	Alginian sodowo-wapniowy i kolagen wołowy	Zostały opracowane w celu połączenia korzystnych działań różnych rodzajów opatrunków aktywnych. Zatem ich działanie jest wielostronne na proces gojenia się ran
Opatrunki oparte na inżynierii genetycznej	Unikatowe opatrunki lniane	Macierz pozakomórkowa, czynniki wzrostu, cytokiny, keratynocyty	Do tej grupy opatrunków należą bezkomórkowe substytuty skóry oraz substytuty skóry jedno- i dwuwarstwowe

Źródło: Opracowanie własne przy wykorzystaniu [11]

## 5. Hydrożele

Hydrożelem nazywamy substancję, którą tworzy trójwymiarowa sieć polimerowa, a fazą rozproszoną wypełniającą wolne przestrzenie jest woda. W stanie suchym łańcuchy polimerowe występują w postaci ściśle zwiniętych kłębków. Pod wpływem wody grupy funkcyjne ulegają dysocjacji przez co następuje rozluźnienie kłębka i możliwości dalszej absorpcji wody aż do utworzenia żelu [12].



Rys. 2. Przykładowy hydrożel [13].

Do produkcji hydrożeli wykorzystywane są polimery naturalne, sztuczne a także ich mieszaniny. Ich przykłady pokazane są w tabeli 2.



Tabela 2. Polimery wykorzystywane w procesach wytwarzania hydrożeli [12]

Polimery wykorzystywane do tworzenia hydrożeli	Naturalne	Kwas alginowy, pektyna, kwas hialuronowy, siarczan dekstranu, siarczan chondroityny, chitozan, polilizyna, chityna, fibryna, kolagen, żelatyna, dekstran, agaroz, pullulan
	Sztuczne	PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA PHB, polialkohol winylowy, polifosfazen, N-winylopirolidon
	Kombinacje naturalnych i sztucznych	P(PEG-co-peptyd), alginian-g-(PEO-PPO-PEO), P(PLGA-co-seryna), kolagen akrylan, alginian-akrylan

Źródło: Opracowanie własne na podstawie.[12]

Właściwości fizyczne polimerowych absorbentów zależą od wielu czynników takich jak: rodzaj matrycy polimerowej, charakter grup funkcyjnych, temperatury, w jakiej przebiega reakcja sieciowania, stosunku reagentów oraz stopnia rozdrobnienia produktu. Ważnymi czynnikami wpływającymi na właściwości końcowe substancji są skład chemiczny i temperatura roztworu wypełniającego przestrzeń w szkieletie polimerowym.

Wykonanie hydrożelu o odpowiedniej konsystencji wymaga użycia polimerów o odpowiedniej lepkości i stężeniu zbyt twarda konsystencja utrudnia rozprowadzenie natomiast zbyt miękka może przyczynić się do zbyt słabej adhezji substancji do skóry [14].

Obecnie wyróżniane są trzy metody otrzymywania hydrożeli a mianowicie metoda chemiczna, metoda wykorzystująca promieniowanie mikrofalowe oraz metoda radiacyjna.

Zastosowanie chemicznych metod otrzymywania pozwala uzyskać pożądane substancje w warunkach laboratoryjnych przy niewielkich kosztach. Zdecydowaną wadą jest brak sterylności i długi czas przebiegu reakcji dochodzący nawet do 24 godzin [15].

Substancje powstałe w procesach wykorzystujących promieniowanie mikrofalowe nie zawsze charakteryzują się właściwościami oczekiwanymi przed rozpoczęciem procesu. Ze względu na kierunek przebiegu ciepła (od wewnątrz substancji do zewnątrz) często dochodzi do miejscowych przegrzań a w wyniku tego wzrostu porowatości i spadku ogólnych właściwości substancji wyjściowej [16÷19].

W metodzie radiacyjnej proces sieciowania zachodzi pod wpływem promieniowania gamma lub strumienia elektronów z akceleratora. Jest on bezodpadowy i przyczynia się do eliminacji substancji szkodliwych dla zdrowia i środowiska. Superabsorbenty wytwarzane za pomocą metody radiacyjnej charakteryzują się najlepszymi właściwościami fizycznymi. Tylko substancje otrzymane za pomocą tej metody są sterylne i znajdują zastosowanie w medycynie [1].

## **6. Opatrunki hydrożelowe**

Opatrunki hydrożelowe należą do najnowszej trzeciej generacji materiałów opatrunkowych. Posiadają lepsze właściwości mechaniczne, są bardziej elastyczne. Cechuje je bardzo dobra biokompatybilność. Zazwyczaj stosowane są w leczeniu ran trudno gojących, słabo lub średnio sączących w zależności od posiadanych zdolności absorpcyjnych. Zdecydowanie rzadziej stosowane są do ran mocno sączących. Zbudowane są z trójwymiarowej sieci polimerów polisacharydowych poprzerplątanych cząsteczkami poliakryloamidu lub poliuretanu. Zawartości wody w hydrożelowym opatrunku waha się w granicach 60-90%. Dzięki tak dużej zawartości wody zapewniają suchej ranie odpowiednie nawilżenie i nawodnienie. Przenikanie wody z opatrunku powoduje rozpuszczenie strupa oraz tkanek martwiczych jednocześnie wspomagając procesy gojenia [9].

Woda obecna w opatrunkach przyczynia się do pojawienia efektu chłodzenia, który jest bardzo korzystny w przypadku bolesnych ran oparzeniowych. Opatrunki zmniejszają bolesność i zapobiegają powstawaniu blizn przerostowych.

Materiały tego typu charakteryzują się doskonałą zdolnością absorpcji wody. Umożliwia to wiązanie wydzieliny wraz z zanieczyszczeniami we wnętrzu makrocząsteczek zapewniając stałe oczyszczanie rany. Woda, która nieustannie paruje z powierzchni opatrunku zastępowana jest przez pochłonięty wysięk pozwala to na zachowanie żelowej konsystencji. Trójwymiarowa struktura hydrożelu wspomaga tworzenie bariery

ochronnej zabezpieczając tym samym ranę przed wtórnym zakażeniem. Struktura opatrunku stanowi warstwę przepuszczalną dla tlenu, zapewniając odpowiednią wymianę gazową przez cały proces leczenia. Tym samym przyspieszając regenerację uszkodzonych tkanek. Opatrunki hydrożelowe są nietoksyczne, niealergizujące, ich produkcja jest stosunkowo łatwa i nie wymaga dużych kosztów. Stosowanie hydrożelowych opatrunków zapewnia leczenie rany w środowisku wilgotnym. Opatrunek nie przywiera bezpośrednio do rany dzięki temu jego zmiana jest bardzo łatwa. Zapobiega to pozostawianiu w ranie trudno usuwalnych fragmentów często występujących w przypadku tradycyjnych opatrunków [1, 20].

Proces zmiany opatrunku pokazany jest na rysunku 3. Wewnętrzna część opatrunku pokryta jest wysiękiem wydobywającym się z rany oraz rozmiękczoną tkanką martwiczą.



Rys 3. Zmiana opatrunku hydrożelowego [21]

Opatrunki hydrożelowe występują obecnie w dwóch postaciach a mianowicie miękkiego żelu w tubce lub jednorazowych aplikatorach a także płytek żelowych.

Produkty w postaci żelu aplikuje się do wnętrza rany lub na jej powierzchnię w zależności od głębokości. Na ranę wypełnioną hydrożelem w takim przypadku należy nałożyć opatrunek wtórny, który zabezpieczy hydrożel przed wysychaniem. Żel poprzez pochłanianie wysięku z rany zwiększa swoją lepkość. Opatrunek należy zmieniać co kilka dni zazwyczaj od trzech do nawet tygodnia. Częstsze zmiany zalecane są w przypadku ran mocno sączących lub pojawienia się nieprzyjemnego zapachu. Zmiana

opatrunku jest bardzo prosta, można to zrobić poprzez przepłukanie rany roztworem Ringera (roztwór zawierający chlorki sodu, potasu i wapnia) lub solą fizjologiczną (0, 9% roztwór chlorku sodu) [22].

Opatrunki w postaci żelowych płytek są zdecydowanie łatwiejsze w stosowaniu a dzięki przezroczystości umożliwiają obserwację procesu gojenia bez zdejmowania opatrunku z rany. Ważne jest, aby opatrunek pokrywał dokładnie całą ranę oraz skórę otaczającą w promieniu 3-4 cm. Niektóre płytki są samoprzylepne jednak część wymaga umocowania za pomocą opatrunku wtórnego. Opatrunków w postaci płytek okluzyjnych nie należy stosować na rany zakażone [22].



Rys. 4. Zakładanie opatrunku w postaci żelowej płytki na ranę [23]

## **7. Przykłady produktów handlowych**

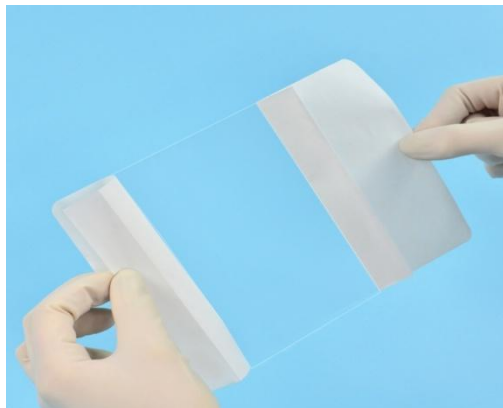
**Granuflex®** to opatrunek opatrunek absorpcyjny z karboksymetylocelulozy, żelatyny i pektyny, spełniający wymogi nowoczesnej koncepcji leczenia ran w środowisku wilgotnym. Karboksymetyloceluloza sodowa odpowiedzialna jest za pochłanianie wilgoci, żelatyna wspomaga utrzymanie wilgotnego środowiska, a pektyna obniża pH. Granuflex jest przeznaczony do leczenia różnych rodzajów ran z małym lub średnim wysiękiem. Można go stosować na różnych etapach gojenia rany [24].



Rys. 5. Opatrunek hydrokoloidowy Granuflex [25]

**Actisorb Plus®** jest to opatrunek antybakteryjny, włóknisty, na bazie czystego węgla aktywnego impregnowanego srebrem. Opatrunek tworzy środowisko sprzyjające gojeniu rany przez wiązanie i inaktywowanie mikroorganizmów, które kontaminują i zakażają ranę. Srebro eliminuje mikroorganizmy podchodzące z rany, które zostaną wchłonięte do opatrunku, zmniejszając w ten sposób kolonizację bakterii i hamując rozwój zakażenia. Może być wykorzystany, jako pierwszy etap leczenia wszystkich ran przewlekłych. Jest wskazany do stosowania na rany: nowotworowe powikłane grzybicą, wrzodziejące, urazowe, pooperacyjne, w których doszło do kontaminacji lub zakażenia. Niewątpliwą zaletą jest zdolność pochłaniania nieprzyjemnego zapachu pochodzącego z rany [26].

**BIOCLUSIVE®** to samoprzylepny, jałowy opatrunek z błony poliuretanowej stanowiący barierę ochronną dla rany. Dzięki przezroczystości pozwala na łatwą obserwację rany bez potrzeby usuwania opatrunku, przez co ulega zmniejszeniu ryzyko ewentualnej infekcji. Półprzepuszczalność umożliwia swobodne oddychanie rany oraz skóry wokół niej. Nadmiar płynnej wydzieliny jest usuwany w formie pary wodnej. Niewątpliwą zaletą jest wodoodporność. Opatrunek chroni ranę przed cieciami mogącymi powodować zanieczyszczenie i uszkodzenie rany, umożliwia pacjentowi swobodne mycie. Stanowi skuteczną ochronę przed bakteriami i drobnoustrojami mogącymi wywołać wtórne zakażenie rany. Dzięki swoim właściwościom plastycznym można go łatwo aplikować nawet w trudno dostępnym miejscach [27].



Rys. 6. Opatrunek z błony poliuretanowej [28]

**Medisorb G** jest to amorficzny opatrunek hydrożelowy. Ma postać żelu, który tworzy i utrzymuje wilgotne środowisko w ranie. Opatrunek nie przylega do powierzchni rany minimalizuje to ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek i czyni jego zmianę bezbolesną. Przed nałożeniem opatrunku należy ranę przepłukać roztworem soli fizjologicznej a następnie osuszyć otaczającą ją skórę. Ranę pokrywa się warstwą żelu o grubości około 5 mm. Żel jest obojętny dla tkanek zdrowych. Po nałożeniu ranę należy zakryć opatrunkiem wtórnym. Producent zaleca zmianę opatrunku w przypadku ran martwiczych, co 24 h natomiast w przypadku ran czystych opatrunek powinien pozostawać na ranie maksymalnie 72 h [29].

**TenderWet** to jałowy opatrunek do stosowania na rany kliniczne, rany trudno gojące się (odleżyny, owrzodzenia podudzia, zgorzel cukrzycowa), a w szczególności na rany głębokie wymagające szczególnego oczyszczenia. Przed użyciem należy aktywować produkt roztworem Ringera lub roztworem TenderWet. Opatrunek nadaje się do oddzielania od powierzchni rany tkanki martwiczej, usuwana jest ona wraz z opatrunkiem podczas jego zmiany. Jest to szczególnie ważne w przypadkach, gdy niemożliwe jest chirurgiczne opracowanie rany. Dzięki doskonałej plastyczności zapewnia bezpośredni kontakt z dnem rany. Zalecany przez producenta czas przebywania produktu na ranie wynosi 12 h po jego upływie opatrunek należy wymienić [30].

## 8. Podsumowanie

W dzisiejszej medycynie często pojawia się problem w leczeniu różnego rodzaju ran, dlatego zapotrzebowanie na polimerowe opatrunki aktywne będące alternatywą dla opatrunków tradycyjnych systematycznie wzrasta. Umożliwia to lekarzowi bardziej indywidualne podejście do procesu

leczenia u konkretnego pacjenta. Głównymi grupami tego typu opatrunków są opatrunki hydrożelowe, produkty opatrunkowe w postaci granulatów, hydrokoloidy oraz hydrowłókna. Zastosowanie produktów zapewniających przebieg procesu gojenia rany w środowisku wilgotnym przyczynia się do krótszego czasu hospitalizacji, a przez to zmniejszenia jej kosztów. Zmiana opatrunku jest bezbolesna dla pacjenta, a wysięk wydobywający się z rany jest pochłaniany, co pozwala na częściową neutralizację nieprzyjemnego zapachu i wpływa bezpośrednio na podniesienie komfortu procesu leczenia. Odpowiednie przygotowanie opatrunku daje pacjentowi możliwość samodzielnej jego zmiany bez potrzeby częstych wizyt ambulatoryjnych. Wszystkie te cechy przemawiają za jak najszerzym i jak najczęstszym stosowaniem tego typu opatrunków. Przeszkodą jednak mogą być wysokie ceny, ale biorąc pod uwagę dynamikę rozwoju i dużą różnorodność produktów powinny one ulec zmianie.

### Literatura:

1. Bialik-Wąs K., Pielichowski K.; *Polimerowe opatrunki hydrożelowe dla zastosowań biomedycznych*; Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej; 2011
2. Dąbrowiecki S: *Fizjologia i patofizjologia procesu gojenia ran*. Polska Medycyna Paliatywna 2003; 2(4): 283
3. Gomułka w., Rewerski W., *Encyklopedia zdrowia*, PWN, 1996, 351
4. Petkow L., Górkiewicz-Petkow A.: *Przegląd Flebologiczny*, (2002), 10(4), 101-105
5. Skórkowska-Telichowska K., Bugajska-Prusak A., Pluciński P., Rybak Z., Szopa J.: *Dermatologia Praktyczna*. 2009, 5, 15-29
6. Szewczyk M. T.: *Klinika zakażeń*, 2005, 1, 80-88
7. <http://biologyforums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=15063>
8. Gorczyca G., Tylingo R.; *Biopolimery w konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności antydebrusującej*, *Polimery*, 10/2011, 710-712
9. Mrozowski T.: *Opatrunki nowej generacji*, *Ogólnopolski przegląd medyczny*, 8/2008, 51-59
10. <http://matopat.pl/nasze-rozwiazania-widok/leczenie-ran-przewleklych-w-srodowisku-wilgotnym/>
11. <http://www.nazdrowie.pl/artukul/nowoczesne-opatrunki-aktywne>
12. Pluta J., Karolewicz B., *Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. I. Charakterystyka hydrożeli*, Zakład Farmacji Aptecznej Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2004, 201, 1-31
13. [https://lh5.googleusercontent.com/Nfh76T6fVOW/UTNJSzINII/AAAAAAAGs/ogk9yvMAITQ/s223/hydrogel\\_heal\\_thyself\\_bioengineering-bioengineering-hero+rozmiar.jpg](https://lh5.googleusercontent.com/Nfh76T6fVOW/UTNJSzINII/AAAAAAAGs/ogk9yvMAITQ/s223/hydrogel_heal_thyself_bioengineering-bioengineering-hero+rozmiar.jpg)
14. Sosnowska K., *Hydrożele jako nowoczesna postać leku*, *Gazeta farmaceutyczna* 2/2009, 34-36
15. Uygun M. Kahveci M. U., Odax D., Timur S., Yagci Y., *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2009, 210, 1867-1875
16. Amin S., Rajabnezhad S., Kohli K., *Scientific research and essay*, 2009, 3, 1175-1183
17. Sosnik A., Gotelli G., Abraham G.A., *Progress in Polymer Science*, 2010

18. Tyliczszak B., Lorenc I., Pielichowski J., Pielichowski K., *Engineering of biomaterials*, 2008, 51, 77-80
19. Tyliczszak B., Polaczek J., Pielichowski J., Pielichowski K., *Macromoll. Symp.*, 2009, 279, 236-242
20. Pluta J., Karolewicz B., *Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. II. Możliwości zastosowania hydrożeli, jako nośników substancji leczniczych*, Zakład Farmacji Aptecznej Akademii Medycznej we Wrocławiu, 2004, 304,1-41
21. <http://kikgel.webprom.pl/wpcontent/uploads/2009/06/przyschniety-aquagel.jpg>
22. <http://www.biomedical.pl/zdrowie/opatrunki-hydrozelowe-1804.html>
23. <http://www.sklepreehabilitacyjny.com.pl/userdata/gfx/e8d32b4fbd9b8a1f10dc6272555017be.jpg>
24. [http://dlapacjenta.pl/sklep/product\\_info.php/products\\_id/342](http://dlapacjenta.pl/sklep/product_info.php/products_id/342)
25. [http://dlapacjenta.pl/sklep/popup\\_image.php/pID/342](http://dlapacjenta.pl/sklep/popup_image.php/pID/342)
26. [http://diabetyk24.pl/systagenix-actisorb-plus-25-opatrunek-10,5x10,5cm-1szt.-o\\_1\\_913.html](http://diabetyk24.pl/systagenix-actisorb-plus-25-opatrunek-10,5x10,5cm-1szt.-o_1_913.html)
27. <http://media-med.pl/bioclusive-1>
28. <http://zarys.pl/zdjecia/301/bioclusive-301-d.jpg>
29. [http://www.irmed.com.pl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=130&Itemid=143&9e5436011ad1db867f045fa9e61a6ccc=01a4359a9d084301907f86ff58576e79](http://www.irmed.com.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=130&Itemid=143&9e5436011ad1db867f045fa9e61a6ccc=01a4359a9d084301907f86ff58576e79)
30. <https://www.hartmann24.pl/products.php?id=729>

## **Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe**

### Streszczenie

Artykuł stanowi przegląd literatury dotyczącej możliwości wykorzystania biopolimerów do otrzymywania materiałów opatrunkowych. Opisano przebieg procesu gojenia się rany na poszczególnych etapach począwszy od momentu jej powstania do fazy remodelingu. Wymieniono i omówiono rodzaje występujących na rynku medycznym opatrunków aktywnych i scharakteryzowano model idealnego opatrunku wyróżniającego się zapewnianiem odpowiednich warunków środowiskowych, a także bezpośrednim działaniem na ranę. Omówiono właściwości oraz metody otrzymywania hydrożeli, a także możliwości zastosowania ich, jako materiałów opatrunkowych należących do nowej generacji. Scharakteryzowano wybrane produkty handlowe.

Słowa kluczowe: polimery, gojenie rany, materiały opatrunkowe, hydrożele

## **Biomedical application of polymers – materials for dressings**

### Abstract

The article is a review of the literature concerning the possible use of biopolymers for the preparation of dressings. It describes the process of wound healing at different stages from its inception to the remodeling phase. The types of active dressings occurring on the medical market are listed and discussed, and an ideal model of dressing, which stands out from others by providing appropriate environmental conditions, as well as direct effects on the wound, has been characterized. Furthermore, the article discusses the properties and methods for preparing the hydrogels, the same as the possibility of their use as wound dressing materials belonging to the new generation. Selected commercial products have been characterized.

Keywords : polymers, wound healing dressings, hydrogels



Paulina Musiał<sup>1</sup>, Mateusz Stojko<sup>2</sup>, Aleksandra Moździerz<sup>3</sup>, Dorota Olczyk<sup>4</sup>,  
Wioleta Kobiela<sup>5</sup>, Małgorzata Juszko-Piekut<sup>6</sup>, Jerzy Stojko<sup>7</sup>

## **Badania doświadczalne biogodności tkankowej polimerów**

### **1. Wprowadzenie**

W pracy przedstawiono wyniki wstępnych badań mających na celu ocenę biogodności kopolimeru laktydu, glikolidu i trimetylowęgłanu, który w przyszłości miał znaleźć zastosowanie jako resorbowalny, samorozprężający się stent tchawiczo-oskrzelowy z pamięcią kształtu.

Zwężenia tchawicy i oskrzeli mogą mieć charakter wrodzony lub nabyty. Zmiany wrodzone występują u dzieci najczęściej pod postacią tracheomalacji i bronchomalacji czyli wiotkości tchawicy i oskrzeli, dysplazji oskrzelowo płucnej i nieprawidłowej budowy rusztowania chrzęstnego dróg oddechowych. Zwężenia nabyte najczęściej są stanami pourazowymi, po przebytej intubacji lub powstają wskutek zmian nowotworowych.

Bioresorbowalne, samorozprężające się stenty z pamięcią kształtu są to stenty, które w formie tymczasowej charakteryzują się małymi rozmiarami.

---

<sup>1</sup> paulinna.musial@gmail.com, SKN przy Zakładzie Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>2</sup> mateusz.stojko@gmail.com, SKN przy Zakładzie Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>3</sup> amozdzierz@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>4</sup> dolczyk@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>5</sup> bioanaliza@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>6</sup> mpiekut@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>7</sup> jstojko@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

Po ich wprowadzeniu w miejsce implantacji w wyniku zadziałania impulsu temperaturowego powracają do wcześniej zaprojektowanego kształtu pierwotnego [1,2]. Stent ulega w ten sposób samorozprężeniu poszerzając tchawicę lub oskrzele, poprawiając znacznie warunki wentylacji. Po utworzeniu nowych warunków anatomicznych (likwidacji zwężenia), stent ulega bioresorpcji.

## **2. Cel pracy**

Celem prowadzonego badania była ocena biozgodności czyli prawidłowego zachowania terpolimeru w kontakcie z tkanką, o składzie: 76% laktyd, 12% glikolid oraz 12% trimetylenowęglan otrzymanego z udziałem inicjatorów reakcji polimeryzacji bazujących na związkach cyrkonu opracowanych i opatentowanych (Pat. RP 191 846 z 2001 r.) przez zespół Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych w Zabrze. Eksperyment został przeprowadzony w warunkach testów doświadczalnych *in vivo*. Uzyskanie informacji dotyczących mechanizmu i czasu biodegradacji polimeru oraz ocena jego biozgodności pozwolą na ewentualne wdrożenie badanego materiału do praktyki medycznej.

## **3. Materiały i metody**

Do eksperymentu użyto 12 królików rasy New Zealand w 10 tygodniu życia, płci obojga o masie ciała 1,5-2,0 kg. Materiał badany w kształcie krążka o średnicy 0,5 cm implantowano pod powięź mięśnia prostego grzbietu i zamocowano przy użyciu szwów Vicryl 5-0, na okres 7-14-28 dni [Rycina 1 i 2]. Utworzono trzy grupy badanych zwierząt po cztery sztuki. W każdej z grup, u trzech zwierząt wykonano implantację badanego materiału polimerowego, a czwarte zwierzę stanowiło grupę kontrolną.

Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, u których wykonano nacięcie mięśnia prostego grzbietu bez implantacji materiału. Czas obserwacji zwierząt w tej grupie wynosił również 7-14-28 dni.

Zwierzęta były poddane premedykacji – wykonano iniekcję podskórną siarczanu atropiny; po upływie 10 minut wykonano iniekcję domięśniową chlorowodorku ksylazyny, w dawce 0,2 mg/kg wagi ciała, następnie podawano Tiopental w dawce 25 mg/kg m.c. iniekcją dożylną poprzez kaniulę umieszczoną w żyłę brzeżnej ucha. Zabiegi implantacji matrycy polimerowej wykonano w znieczuleniu ogólnym.

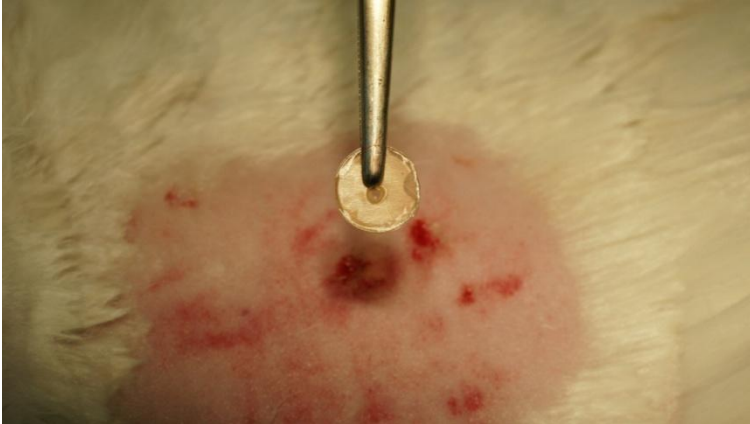
### **3.1. Obserwacja zwierząt po wszczepieniu implantu**

W tym czasie była prowadzona kliniczna ocena stanu zwierząt (pomiar temperatury ciała, pomiar masy ciała, ilość przyjmowanego pokarmu i wody) oraz makroskopowa ocena miejsca implantacji. Również

prowadzono dokumentację fotograficzną służącą dalszej ocenie morfometrycznej [Rycina 3 i 4]

### **3.2. Pobranie materiału tkankowego do badań histopatologicznych i wydobycie wszczepionych implantów**

Grupę badaną podzielono na trzy podgrupy, w których czas kontaktu biomateriału z tkanką wynosił odpowiednio 7, 14 i 28 dni. W każdej grupie badanej i kontrolnej dokonano makroskopowej oceny miejsca implantacji oraz wykonano dokumentację fotograficzną. Następnie zostały przeprowadzone procedury związane z poborem materiału do kolejnych badań. Pobrano biomateriał wraz z otaczającą tkanką mięśniową. W grupie kontrolnej była pobrana tkanka mięśniowa z okolicy, w której wykonano nacięcie. Ponadto, w grupie badanej i kontrolnej pobrano do dalszych etapów badań następujące narządy: wątrobę i nerki. Po zakończeniu badań eksperymentalnych zwierzęta zostały poddane zabiegowi eutanazji poprzez dożylnie podanie preparatu Morbital 200 mg/kg m.c do żyły brzeżnej ucha.



Rycina 1. Okrągła matryca polimerowa [opracowanie własne]



Rycina 2. Implantacja matrycy polimerowej [opracowanie własne]



Rycina 3. Pobrany wycinek mięśnia [opracowanie własne]



Rycina 4. Lokalny odczyn zapalny [opracowanie własne]

#### 4. Wyniki badań

Tabela 1. Wyniki badań po 7 dniach

Nr. królika	Ocena stanu skóry	Ocena stanu materiału	Stany zapalne w mięśniu
34	b/z	Materiał silnie przylegający do mięśnia, lekko wygięty, dostosowany do kształtu mięśnia, lekkie złogi włókniaka	b/z
23	b/z	Materiał nieprzylegający, brak zmiany kształtu, zmiana koloru – zmętnienie	b/z
3	b/z	Silna zmiana koloru z żółtego na mleczny, obecność włókniaka	b/z
10 kontrola	Szew-minimalna ilość włókniaka	-	Obecność włókniaka

Źródło: opracowanie własne

Tabela 2. Wyniki badań po 14 dniach

Nr. królika	Ocena stanu skóry	Ocena stanu materiału	Stany zapalne w mięśniu
1	b/z	Materiał makroskopowo mleczno-biały, odkształcony, silnie przylegający ze wszystkich stron, nieznaczna resorpcja	Brak odczynu zapalnego w okolicy mięśnia przykręgosłupowego. Obecność włókniaka
2	b/z	Zrost pełny. Materiał całkowicie otoczony włóknikiem	Obrzęk mięśnia i zrośnięcie powięzią. Brak odczynu w okolicy mięśnia przykręgosłupowego. Skrzep – brak krwi
11	Rana dobrze zrośnięta. Duża ilość włókniaka w okolicy podpowięziowej	Materiał otoczony włóknikiem, matowy, nieprzezroczysty	Obrzęk mięśnia, przekrwienie, wynaczynienia i skrzepy. Odczyn zapalny od strony jamy otrzewnowej
21 kontrola	Mały miejscowy odczyn przy szwie, niewielkie wynaczynienie	-	Mięsień błydy. Odczyn zapalny od jamy otrzewnowej. Przekrwienie mięśnia przykręgosłupowego

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 3. Wyniki badań po 28 dniach

Nr. królika	Ocena stanu skóry	Ocena stanu materiału	Stany zapalne w mięśniu
12	b/z	Złogi włókniaka pod implamntem. Całkowite zmętnienie materiału, częściowa resorpcja i brak rozpadu	Przekrwienie, miejscowy i ograniczony odczyn zapalny mięśnia
13	Wygojenie rany	Duża resorpcja materiału. Krążek cały ale cienki	Silnie zrośnięta powięź, obrzęk mięśnia pod materiałem. Nad materiałem pęcherz z płynem surowicznym otoczony powięzią. Miejscowy i ograniczony odczyn zapalny mięśnia
24	Wygojenie rany	Duża resorpcja materiału, kruszenie się krążka	Obecność włókniaka. Obrzęk miejsca wszczepu. Pod materiałem strefa przekrwienia. Lekki odczyn zapalny mięśnia przykręgosłupowego. Odczyn miejscowy, ograniczony.
41kontrola	Rana wygojona prawidłowo	-	b/z

Źródło: Opracowanie własne

Wyniki otrzymane w doświadczeniu zostały przedstawione w tabelach nr 1, 2 i 3. Pod uwagę wzięte zostały stan skóry oraz rany, obecność lub brak stanu zapalnego w mięśniu oraz obrazy makroskopowe nerek i wątroby.

Tabela nr 1 przedstawia wyniki uzyskane po eutanazji zwierząt po 1 tygodniu (7 dniach) od daty implantacji. Obserwacja powyższych elementów wykazała, że po pierwszym tygodniu od wszczepienia (7 dni od

daty implantacji materiału polimerowego) nie zaobserwowano istotnych zmian świadczących o braku biozgodności badanego materiału z organizmem biorcy. W ocenie stanu skóry oraz rany nie wykazano żadnych zmian. Ocena stanu wszczepionego materiału również nie wykazała, iż uległ on istotnym zmianom fizycznym. Materiał z reguły silnie przylegał do mięśnia i nie zmieniał swojego kształtu. Wykazano jedynie zmianę barwy matrycy polimerowej. Ulegała ona zmętnieniu, a kolor zmieniał się z żółtego na mleczny. W makroskopowej ocenie obecności stanu zapalnego w mięśniu nie stwierdzono takiego stanu. Również nie wykazano żadnych zmian makroskopowych występujących w nerkach i wątrobie.

Tabela nr 2 przedstawia obserwacje uzyskane po likwidacji grupy zwierząt, u których badana matryca polimerowa przebywała 2 tygodnie (14 dni). Zaobserwowano, że kondycja skóry pozostała bez zmian, a rana dobrze się zrosła i wygoiła (królik nr 11). Dopiero makroskopowa ocena stanu badanego materiału wykazała zachodzące w nim zmiany. Materiał matowiał (królik nr 11) i odkształcał się oraz ulegał nieznacznej resorpcji (królik nr 1). Makroskopowa ocena występowania stanów zapalnych w mięśniu wykazała zróżnicowane obserwacje. U królika nr 1 nie wykazano obecności stanu zapalnego, natomiast u zwierząt nr 2 i 11 zaobserwowano obrzęk mięśnia. Natomiast makroskopowa ocena zmian w nerkach oraz wątrobie wykazała, iż w tych narządach nie stwierdzono żadnych widocznych zmian makroskopowych.

Tabela nr 3 prezentuje wyniki uzyskane po likwidacji grupy zwierząt, u których zabieg wszczepienia matrycy wykonano 28 dni przed ich eutanazją. Z tabeli wynika, iż skóra jak i rana wygoiły się bardzo dobrze. Natomiast makroskopowa ocena stanu materiału wykazała iż zaszło w nim wiele zmian. Materiał badany pobrany od każdego ze zwierząt wykazywał pewien stopień resorpcji. U królika nr 24 resorbcja materiału polimerowego była tak duża, iż zaczął się on kruszyć i rozpadać. U innych zwierząt był on cieńszy w porównaniu ze stanem początkowym (królik nr 13) oraz całkowicie mętniał (królik nr 12). Makroskopowa ocena obecności stanu zapalnego wykazała, iż stan ten występował u każdego z biorców badanego materiału (króliki nr 12,13 i 24). Ponadto, u królików nr 13 i 24 zaobserwowano obrzęk mięśnia, a u królika nr 13 pęcherz z płynem surowicznym. Makroskopowa ocena nerek i wątroby nie wykazała żadnych widocznych zmian.

## **5. Dyskusja**

Wyniki otrzymane w doświadczeniu zostały przedstawione w tabelach oraz na zdjęciach. Pod uwagę wzięte zostały: stan skóry oraz rany, obecność lub brak stanu zapalnego w mięśniu oraz obrazy makroskopowe nerek i wątroby. Po ocenie makroskopowej materiału polimerowego oraz



okolicy wszczepienia polimeru, stanu (wyglądu) mięśnia od strony jamy otrzewnej wykazano, że badany biopolimer nie posiada cech w pełni zadawalającej biogodności. Niekorzystne oddziaływania pomiędzy materiałem a biorcą mogą wynikać z samych właściwości badanego materiału jak i z metod jego syntezy oraz produkcji lub innych nieanalizowanych w tym badaniu zmiennych. Wyniki jednoznacznie wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Materiał przeznaczony do implantacji w tkanki żywego organizmu powinien spełniać podstawowe wymogi biogodności. Jednym z etapów wykonania oceny biogodności materiału polimerowego jest określenie występowania miejscowej reakcji tkanek wywołanej przez wszczepiony implant. Najlepszą metodą do takiej oceny jest wykonanie implantu, a następnie jego obserwacja po wszczepieniu do żywego organizmu.

Obserwacja makroskopowa pozwala na ocenę stanu tkanek oraz występujących w nich zmian jak np.: występowanie obrzęku oraz wysięku zapalnego w bezpośrednim sąsiedztwie implantu. Ponadto, umożliwiają zapoznanie się ewentualnymi zmianami, które mogą zachodzić w badanym materiale [3].

Dzięki innowacyjnemu wykorzystaniu związków cyrkonu jako inicjatorów reakcji polimeryzacji, zdaniem autorów patentu udało się znacznie zmniejszyć toksyczność materiału polimerowego. Stosowane wcześniej inicjatory (głównie związki cyny, cynku oraz glinu) przenikały do krwioobiegu i wykazywały właściwości toksyczne o działaniu ogólnoustrojowym. Użyty w eksperymencie biomateriał został dokładnie scharakteryzowany przez określenie masy cząsteczkowej, jego właściwości termicznych i mikrostruktury łańcuchów kopolimerowych. Określono wpływ budowy łańcucha i jego skład na właściwości termomechaniczne i zapamiętywania kształtu [8,9].

Analizując rycinę nr 4 oraz zapoznając się z danymi umieszczonymi w tabelach można stwierdzić, iż badany materiał polimerowy zmienił nie tylko swój kształt, ale również barwę i właściwości fizyczne. Materiał wyjściowo był biały i w niewielkim stopniu przezroczysty, po zakończeniu doświadczenia stawał się matowy i mlecznobiały.

Zaobserwowano również zbyt szybką resorpcję badanego implantu oraz jego rozpad, materiał kruszał. Takie zachowanie badanego materiału można tłumaczyć m.in. tym, iż pojawienie się w żywym organizmie ciała obcego pobudza wiele mechanizmów mających na celu jego usunięcie, rozpad.

Gdy obca substancja, w tym przypadku implant, zostaje wykryta przez układ immunologiczny, organizm rozpoczyna wytwarzanie przeciwciał. Przeciwciała gromadzą się w pobliżu polimerowego wszczepu i przenikają do biomateriału. Reakcja obronna organizmu staje się jedną z przyczyn wystąpienia degradacji materiału polimerowego [5,6]. Na rycinie nr 4

wyraźnie widać toczący się proces zapalny. Widać powstawanie sieci nowych naczyń krwionośnych w pobliżu implantu, obrzęk, zaczerwienienie oraz włókniak.

Warunki panujące w żywym organizmie są warunkami dość specyficznymi. W płynach ustrojowych występują m.in. jony chloru, sodu, potasu, wapnia i magnezu oraz fosforany. Agresywność środowiska płynów ustrojowych potęguje również występowanie w nich organicznych składników, takich jak np. białka. Na zmiany kształtu i wyglądu implantu wpływ może mieć również zmiana pH środowiska otaczającego implant. W normalnych warunkach pH organizmu wynosi ok. 7.4, jednak w przypadku wprowadzenia ciała obcego wartość pH w miejscu wszczepu może wykazywać odczyn kwaśny. Wszystkie te cechy tworzą z żywego organizmu środowisko bardzo wymagające, któremu nie każdy materiał jest w stanie sprostać [6]. W przypadku materiału polimerowego procesowi degradacji zainicjowanym pobyt w żywym organizmie, towarzyszy nie tylko spadek masy cząsteczkowej materiału, ale również spadek jego właściwości mechanicznych, co w konsekwencji doprowadza do utraty jego funkcjonalności.

Na podstawie danych zamieszczonych w tabelach, można stwierdzić, że badany polimer nie spełnia w całości wszystkich kryteriów biogodności. Obserwowana jest znaczna reakcja zapalna. Prawdopodobną przyczyną ich powstania może być zbyt szybka degradacja materiału polimerowego i powstanie zbyt dużej ilości produktów rozpadu w krótkim czasie. Efektem degradacji badanego polimeru jest wydzielenie kwasu mlekowego, którego ilość może przewyższać aktualną zdolność biorcy do jego metabolizowania [4].

Pojawienie się licznych odczynów zapalnych świadczy o tym, iż organizm biorcy zwalcza zaimplantowany materiał polimerowy. Im dłuższy czas kontaktu badanego materiału polimerowego z organizmem biorcy, tym liczba i stopień nasilenia odczynu zapalnego ulega zwiększeniu.

Powstawanie obrzęku, miejscowego przekrwienia w miejscu wszczepienia matrycy polimerowej oraz powstanie odczynu zapalnego w mięśniu mogą wynikać z samych właściwości badanego materiału jak i z metod jego syntezy oraz produkcji.

Interpretacja uzyskanych wyników jest utrudniona w związku z tym, iż zwierzęta użyte w eksperymencie żyją krócej niż człowiek. Ponadto, zwierzęta doświadczalne są biologicznie młode i nie obciążone żadnymi chorobami. Należy zwrócić również uwagę, że zwierzęta te nie podlegały żadnym czynnikom środowiskowym, z którymi styczność ma człowiek.

U człowieka może wystąpić wrodzona skłonność do większej wrażliwości na toksyczne działanie związków chemicznych, niż może to mieć miejsce u królika, czy innego gatunku zwierzęcia użytego jako model doświadczalny w podobnych badaniach [7].

Badany materiał polimerowy wykazał w trakcie przeprowadzonej obserwacji niedostateczną biogodność już na etapie oceny makroskopowej.

Uzyskane wyniki dyskwalifikują biopolimer do zastosowania w produkcji stentów bioresorbowalnych z pamięcią kształtu. Konieczne są dalsze modyfikacje metody wytwarzania i właściwości fizykochemicznych polimeru celem wyeliminowania odczynów zapalnych wywoływanych przez implant w organizmie biorcy oraz spowolnienie procesu jego degradacji.

## 6. Wnioski

W wyniku przeprowadzonego badania eksperymentalnego oraz obserwacji klinicznych wyciągnięto następujące wnioski:

- Badany materiał wywołał miejscowe i ogólnoustrojowe zmiany świadczące o jego bioagresywnym oddziaływaniu.
- Zaburzenia struktury implantowanego polimeru nie potwierdziły jego długoterminowej biodegradowalności.

Uzyskane na tym etapie wstępne wyniki są przyczynkiem do dalszych badań nad pozyskiwaniem nowego polimeru, który w przyszłości może być wykorzystany jako materiał do wykonania stentów o różnorodnym wykorzystaniu.

## Literatura

1. Lendkein A., Kelch S. *Shape memory polymers*, Angew. Chem. Int. Ed., 41 (2002) s. 2034-2057
2. Zini E., Scandola M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M. *Shape memory behavior of novel (L-lactide-glycolide-trimethylene carbonate) terpolymers.*, Biomacromolecules, 8 (2007), s. 3661-3667
3. Nałęcz M. *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000 pod red. M. Nałęcza.*, tom 4 Biomateriały; red. tomu: Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT., Warszawa 2003, s. 257-596
4. Rabek J.F. *Współczesna wiedza o polimerach.*, Wybrane zagadnienia., (2008)
5. Świerczko-Żurek B., Krzemiński M. *The degradation of metal implants* Advances in Materials Science., vol.8, 1 (15), 2008, s. 179-183
6. Świerczko-Żurek B. *Ocena struktury i własności mechanicznych oraz odporności korozyjnej tworzyw metalowych na implanty dla chirurgii kostnej.*, Instrukcja do ćwiczeń z Biomateriałów., Katedra Inżynierii Materiałowej, Politechnika Gdańska., (2009)
7. Jodynis-Liebert J., Seńczuk W. *Toksykologia. Podręcznik dla studentów, lekarzy i farmaceutów.* Wyd. 3 unow. i rozsz. (1999) s. 222-263
8. Jaros A., Gębarowska K., Stojko J., Kasperczyk J., Smoła A. *Badania mechanizmu degradacji in vivo terpolimerów z pamięcią kształtu*, Engineering of biomaterials Inżynieria Biomateriałów, numer 106-108, (grudzień 2011)., s. 79-84
9. Smoła A., Dobrzyński P., Pastusiak M., Sobota M., Kasperczyk J. *Nowe semikrystalicznebioresorbowalne materiały z pamięcią kształtu*; Engineering of Biomaterials, Numer 89-91, (grudzień 2009), s. 82-87

## **Badania doświadczalne biogodności tkankowej polimerów**

### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki wstępnych badań mających na celu ocenę biogodności kopolimeru laktydu, glikolidu i trimetylowęgłanu, który w przyszłości miał znaleźć zastosowanie jako resorbowalny, samorozprężający się stent tchawiczo-oskrzelowy.

Do eksperymentu użyto 12 królików rasy New Zealand w 10 tygodniu życia. Materiał badanyw kształcie krążka implantowano pod powięź mięśnia prostego grzbietu i zamocowano przy użyciu szwów, na okres 7-14-28 dni. Utworzono trzy grupy badanych zwierząt po cztery sztuki. W każdej z grup, u trzech zwierząt wykonano implantację badanego materiału polimerowego, a czwarte zwierzę stanowiło grupę kontrolną, u którego wykonano nacięcie mięśnia prostego grzbietu bez implantacji badanego materiału. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta zostały poddane zabiegowi eutanazji.

Do oceny wzięte zostały: stan skóry oraz rany, obecność lub brak stanu zapalnego w mięśniu oraz obrazy makroskopowe nerek i wątroby. Początkowo nie zaobserwowano żadnych zmian. W dalszych obserwacjach wykazano obecność stanu zapalnego, obrzęk mięśnia, zmętnienie matrycy polimerowej

i zmiana jej koloru z żółtego na mleczny oraz jej pogłębiającą się resorpcję. Makroskopowa ocena nerek i wątroby nie wykazała żadnych widocznych zmian.

Po ocenie makroskopowej materiału polimerowego oraz okolicy wszczepienia polimeru, stanu mięśnia od strony jamy otrzewnej wykazano, że badany biopolimer nie posiada cech w pełni zadawalającej biogodności i badania zakończono.

Słowa kluczowe: biogodność, terpolimery

## **Experimental studies of the tissue biocompatibility of polymers**

### Abstract

This case shows the results of preliminary studies aimed to evaluate the biocompatibility of a copolymer of lactide, glycolide and lactones which may be used as resorbable, expansion by itself tracheal – bronchial stent.

12 New Zealand rabbits 10 weeks of age were used for the experiment. The disk-shaped tested material was implanted under the rectus fascia dorsal and attached using sutures, for a period of 7-14-28 days. Three groups were created of tested animals of four per item. In each group, in three of them were made the implantation polymeric tested material and the fourth animal was a control group which was made an incision dorsal rectus muscle without implantation of the tested material. After the end of experiment, the animals have been killed by euthanasia.

To assess were taken: state of the skin and wound, the presence or absence of muscle inflammation and macroscopic images of the kidneys and liver. Initially, there were no changes. In further observations revealed the presence of inflammation, muscle swelling muscle swelling, clouding of the polymer matrix and changing its color from yellow to milky and its deepening resorption. Macroscopic evaluation of the kidneys and liver showed no visible changes.

After macroscopic assessment of the polymeric material and the implantation site of the polymer, the state of the muscle from the peritoneal cavity have evidenced that the tested biopolymer does not have points of similarity fully successful of biocompatibility and consequently whole process was ended.

Key words: biocompatibility, terpolymers

## **Biokompatybilności i osteointegracja implantów metalicznych**

### **1. Wstęp**

Materiały implantacyjne stanowią specyficzną grupę materiałów. Ich cechą charakterystyczną jest kompatybilność i możliwość współpracy z żywą tkanką. Definicją, która najtrafniej opisuje pojęcie biomateriału, jest ta, podana na Konferencji Biomateriałów przez National Institute of Health. Przedstawia ona biomateriał jako *„każdą inną niż lek substancję albo kombinację substancji syntetycznych lub naturalnych, która może być użyta w dowolnym okresie, w całości lub części, a której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek narządu albo jego części lub spełnianie ich funkcji”* [1].

Biomateriały różnią się składem, budową i właściwościami. Ze względu na ich zachowanie w kontakcie z tkankami, biomateriały dzieli się na trzy grupy [2]. Pierwszą grupę stanowią materiały obojętne lub prawie obojętne – neutralne. Są to substancje, które nie wywołują żadnej znaczącej reakcji w otaczających je tkankach. Kolejną grupą są materiały aktywne, które integrują się z tkanką okołowszczepową, stymulują do rozwoju oraz pobudzają jej regenerację. Trzecią grupę stanowią materiały biodegradowalne, które po ściśle określonym czasie działania zostają rozłożone oraz wchłonięte przez otaczające je tkanki, nie powodując przy tym żadnych uszkodzeń i zmian patologicznych.

Biomateriał pracuje w zmiennym stanie naprężeń i przemieszczeń oraz w środowisku reaktywnym. Stosowany jako wszczep, bez względu na przewidziane dla niego funkcje, musi spełniać szereg wymagań. Biomateriały o optymalnej biotolerancji nie powodują ostrych lub chronicznych reakcji organizmu. Oznacza to harmonijną interakcję pomiędzy implantem i tkanką. Ich zastosowanie poprzedzane jest wieloletnimi testami biogodności tkankowej i jeśli wyniki badań są zadowalające, wtedy materiały takie mogą zostać dopuszczone do zastosowania na implanty [3]. Biomateriały, które zostały dopuszczone jako elementy konstrukcyjne endoprotez skatalogowano i opisano

---

<sup>1</sup> a.mierzejewska@poczta.pb.edu.pl, Katedra Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Białostocka, www.pb.edu.pl

w normach amerykańskich i europejskich, a ich właściwości mechaniczne, technologiczne oraz biotolerancję wymieniono *tabeli 1*.

Powszechnie stosowane do wytwarzania implantów materiały metaliczne, pomimo wielu zalet, posiadają szereg niekorzystnych cech. Metale o bardzo dobrych właściwościach mechanicznych są zbyt sztywne w stosunku do kości, jak również ulegają korozji w agresywnym środowisku biologicznym. Działanie na implanty naprężeń mechanicznych i obecność płynów ustrojowych, może przyspieszać ich degradację, zmniejszyć stabilność i trwałość. Pomimo wielu wad charakteryzujących biomateriały metaliczne, dzięki korzystnym właściwościom mechanicznym, takim jak: odporności na korozję zmęczeniową i kruche pękanie, wytrzymałość na rozciąganie i zginanie, mają one bardzo szerokie spektrum zastosowań [2]. Żaden ze znanych materiałów metalicznych nie spełnia wszystkich stawianych przed nim wymagań. Na obecną chwilę można wyróżnić cztery podstawowe grupy biomateriałów metalicznych: stale austenityczne, stopy na osnowie kobaltu, tytan i jego stopy oraz stopy z pamięcią kształtu. Do wykonania trzpieni endoprotez stawu biodrowego stosuje się pierwsze trzy materiały. Kierując się kryterium, jakim jest czas bezpiecznego użytkowania implantu dla organizmu pacjenta, dzielimy je na [1]:

- krótkotrwałe – czas przebywania w środowisku tkankowym nie powinien być dłuższy niż dwa lata (stale austenityczne, stopy z pamięcią kształtu),
- długotrwałe – czas przebywania w środowisku tkankowym może przekroczyć nawet dwadzieścia lat (stopy na osnowie kobaltu, stopy tytanu).

**Tabela 1** Właściwości materiałów implantacyjnych [1]

Własności mechaniczne	Biotolerancja	Technologiczność
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wytrzymałość na rozciąganie i ściskanie</li> <li>• Wytrzymałość na zginanie i skręcanie</li> <li>• Wytrzymałość zmęczeniowa</li> <li>• Twardość</li> <li>• Odporność na ścieranie</li> <li>• Sztywność</li> <li>• Ciągliwość</li> <li>• Plastyczność</li> <li>• Granica plastyczności</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nietoksyczność</li> <li>• Obojętność immunologiczna</li> <li>• Obojętność korozyjna w środowisku tkanek i płynów ustrojowych</li> <li>• Degradacja związana z uszkodzeniami lokalnymi implantu</li> <li>• Brak tendencji do tworzenia zakrzepów</li> <li>• Zachowanie pierwotnych własności mechanicznych /fizycznych/ chemicznych podczas eksploatacji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zapewnienie wymaganej jakości</li> <li>• Sterylność, czas procesu wytwarzania oraz przechowywania</li> <li>• Zapewnienie żądanej jakości powierzchni</li> <li>• Koszt wytworzenia</li> </ul>

## 2. Osteointegracja

Reakcje zachodzące na granicy implant-biosystem, jakim jest organizm ludzki, mają ogromne znaczenie dla właściwego działania implantu w środowisku tkankowym oraz właściwego doboru technologii przygotowania jego powierzchni. Wprowadzając implant do organizmu ludzkiego, należy pamiętać, że jest to ciało obce i należy liczyć się z różnego rodzaju reakcjami organizmu. Zachodzące procesy należy rozpatrywać w skali molekularnej. Powierzchnia styku implant-biosystem jest bowiem powierzchnią, na której spotykają się i wzajemnie na siebie oddziałują żywe komórki oraz warstwa wierzchnia obcego materiału. Zgodnie z definicją Brånemarka proces osteointegracji to „*bezpośrednie strukturalne i funkcjonalne połączenie organicznej, żywej kości z powierzchnią obciążonego implantu*” [4]. Połączenie tkanki kostnej z powierzchnią implantu może mieć charakter zarówno biochemiczny jak i biomechaniczny. Osteointegracja biomechaniczna (*ang. interlocking*) jest procesem długotrwałym, podczas którego następuje przerastanie nieregularnej powierzchni implantu tkanką kostną. Stabilizacja pierwotna implantu, tuż po wprowadzeniu do wypreparowanego łoża kostnego, realizowana jest poprzez jego geometrię. Reakcją odciążonej tkanki kostnej na ciało obce, które w znacznej mierze przenosi obciążenia i naprężenia,

jest jej resorpcja i związane z tym pogorszenie stabilizacji implantu [5,6]. Wraz z upływem czasu tkanka kostna przerasta powierzchnię implantu, uzyskując w ten sposób stabilizację wtórną. W przeciwieństwie do osteointegracji biomechanicznej, proces chemicznego wiązania tkanki kostnej z powierzchnią implantu jest natychmiastowy. Materiałem, o którym najczęściej mówi się w kontekście możliwej osteointegracji jest tytan i jego stopy. Przyjmuje się, że tytan nie posiada właściwości pozwalających na biochemiczne wiązanie się z tkanką kostną, dlatego też implanty wykonane z tego materiału wymagają modyfikacji chemicznej. Utworzenie wiązań biochemicznych pomiędzy tytanem a tkanką kostną umożliwia przyłączenie do powierzchni jonów magnezu, wapnia lub fluoru, obróbka termiczna oraz umieszczenie detalu w ogniwie galwanicznym. Do materiałów o zdolności osteointegracji zalicza się również materiały ceramiczne, w szczególności zaś hydroksyapatyt. Zjawisko osteointegracji biochemicznej jest mocno dyskusyjne. Wielu badaczy wskazuje, że istnienie wiązań biomechanicznych pomiędzy powierzchnią implantu a tkanką kostną jest niemożliwe ze względu na istnienie ruchów międzyfazowych pomiędzy implantem a kością, które nie pozwalają na utrzymanie tego typu wiązania [7].

Interakcja pomiędzy implantem a tkanką kostną otaczającą wszczep jest dynamiczna, wieloetapowa i uzależniona od wielu czynników. Szczególnie istotna jest odpowiedź komórkowa, determinowana przez osteoblasty. Reakcje tkanek okołowszczepowych można podzielić na kilka następujących po sobie faz.

Pierwszą jest faza niekomórkowa, w której dochodzi do adsorpcji protein na wszczepionym materiale. Faza ta ma miejsce bezpośrednio po zetknięciu się implantu z płynami ustrojowymi. Na jej przebieg wpływają właściwości fizykochemiczne materiału, takie jak: chropowatość, topografia, biegunowość, hydrofilność, ładunek elektryczny. Przebieg tej fazy zależny jest również od pH środowiska tkankowego, składu chemicznego roztworu, temperatury, grup funkcyjnych białek i substratów otaczających implant oraz tkanki okołowszczepowe [8, 9].

Druga faza związana jest z przyłączaniem się do powierzchni implantu biologicznych molekuł, do których zalicza się: zewnątrzkomórkowe białka macierzy, białka błony komórkowej, białka cytoszkieletu. Komórki te różnicują się, migrują i wpływają na późniejszą odpowiedź komórkową. Na fazę przyłączania wpływ mają siły jonowe oraz siły Van der Waalsa [10]. To zewnątrzkomórkowe rusztowanie, zbudowane z połączonych glikoprotein, kolagenu, proteoglikanów i czynników wzrostu pozwala na przyłączanie i organizowanie się nie tylko komórek, ale również mediatorów i receptorów, rozpoznających molekuly zewnątrzkomórkowego matriksu [11].



Koleją fazą jest faza komórkowa, którą możemy podzielić na fazę przyłączania, adhezji, migracji, proliferacji i różnicowania komórek. Faza przyłączania (ang. *attachment chase*) jest krótkotrwałym, fizykochemicznym procesem, na który wpływ mają siły jonowe i siły Van der Waalsa. Adhezja komórek do powierzchni materiału ma miejsce w ciągu pierwszych godzin kontaktu wszczepionego materiału z kością. Jest to pierwsza faza interakcji komórek z materiałem i ma ona istotny wpływ na późniejszy wzrost, proliferację, różnicowanie i migrację komórek. Jest to najbardziej krytyczny moment interakcji komórka – materiał. Faza adhezji jest dłuższa niż faza przyłączania. Biorą w niej udział zewnątrzkomórkowe białka matriksu fibronektyna, kolagen, laminina, vitronektyna), białka błony komórkowej oraz białka cytoszkieletu (aktyna, talina i vinkulina) oraz receptory błony komórkowej (integryny). Na późniejszy wzrost i różnicowanie komórek wpływ ma sygnał powstały w wyniku interakcji między wymienionymi białkami a ich specyficznymi receptorami [9÷11].

Kolejną fazą jest migracja komórek po powierzchni materiału, możliwa dzięki stworzeniu dynamicznej interakcji pomiędzy komórką, materiałem i cytoszkieletem. W pierwszym stadium komórka tworzy wypustkę – lamellopodium. Po utworzeniu i umocowaniu lamellopodium komórka generuje siłę trakcyjną oraz energię niezbędną do przemieszczenia się. Ostatnim etapem jest uwolnienie tyłu komórki i jego retrakcja. W proces migracji zaangażowane są integryny. Komórki mało ruchliwe tworzą silną warstwę adhezyjną, komórki bardziej ruchliwe tworzą mniej struktur adhezyjnych. Pośrednia wartość siły przyłączania przekłada się natomiast na najwyższą zdolność do migracji. Następnie dochodzi do kolonizacji komórek na powierzchni materiału poprzez proliferację. Komórki zaczynają się dzielić, a ich podział zależny jest od połączenia z podłożem. Pokrycie podłoża przez komórki warunkuje ich proliferację i jest z kolei związane z zaadsorbowanymi na powierzchni molekułami mediującymi adhezję komórek [9÷12]. Następnie dochodzi do ich różnicowania. Ostatnią fazą osteointegracyjnego różnicowania komórek na powierzchni materiału jest produkcja osteoidu - niezmineralizowanej macierzy kostnej. Ostatecznym etapem interakcji kość – materiał jest faza mineralizacji [9÷12].

Warunkiem uzyskania osteointegracji tkanki kostnej z implantem jest utworzenie się krwiaka i przekształcenie się go w tkankę włóknistą. Aby nastąpiła osteointegracja powinny być zachowane określone warunki m.in. odpowiednie względne relacje odkształcalności w tym unikanie stressshieldingu w otaczającej implant tkance kostnej, a także bioakceptowalność. Właściwe relacje odkształcalności otrzymuje się przez odpowiedni dobór wzajemnej sztywności (moduł sprężystości, ukształtowanie geometrii przekroju). W związku z występowaniem zjawiska remodelingu kości – dostosowywaniem się struktury trabekularnej tkanki kostnej do aktualnego

stanu naprężenia (prawo Wolffa) istotne jest by wielkość naprężeń po implantacji nie różniła się znacznie od stanu przed implantacją[14]. W przypadku silnego połączenia implantu oraz kości można założyć, iż oba materiały ulegają takiemu samemu odkształceniu. Idealny implant powinien cechować się modułem Younga zbliżonym do modułu kości oraz zajmować nie większą powierzchnię niż zastępowana tkanka[10÷12]. Obecnie poszukuje się materiału, który zminimalizowałby bądź zlikwidowałby problem stress-shieldingu. Z drugiej strony zbyt duża podatność implantu wprowadzanego powoduje występowanie znacznych naprężeń stycznych w warstwie przejściowej, które niszczą świeżą strukturę tkankową. W wyniku dużej różnicy odkształcalności implantu i kości dochodzi między nimi do mikroruchów. Jeżeli ruchy te przekraczają 100µm mogą być przyczyną rozrostu tkanki łącznej zamiast pożądanej tkanki kostnej doprowadzając do upośledzenia stabilności mechanicznej. Ponadto stają się przyczyną niszczenia sieci włókien oraz nowych naczyń krwionośnych [12, 13]. Wytrzymałość połączenia pomiędzy kością i biomateriałem powinna być zbliżona do wytrzymałości natywnej tkanki kostnej. Współcześnie jest to jedno z najsłabszych ogniw w implantacji.

### **3. Modyfikacje własności warstwy wierzchniej pod kątem zastosowań biomedycznych**

W celu prawidłowego scharakteryzowania sposobów modyfikacji powierzchni implantów konieczne jest poznanie pojęć definiujących warstwę powierzchniową. Uzyskane warstwy powierzchniowe mogą być [14]:

- powłokami, czyli warstwami naniesionymi trwale na powierzchnię podłoża, w celu uzyskania wymaganych własności fizycznych, antykorozyjnych lub dekoracyjnych,
- warstwami wierzchnimi ograniczonymi powierzchnią elementu, obejmującymi obszar materiałów o własnościach różniących się od własności materiałów rdzenia, uzyskanymi w wyniku łącznego działania sił mechanicznych, elektrycznych, ciepła, czynników chemicznych [14].

Różnice właściwości warstwy wierzchniej oraz rdzenia materiału wynikają głównie z ich odmiennego stanu energetycznego. Atomy, cząsteczki i jony warstwy wierzchniej (z kilku pierwszych warstw atomowych) są rozmieszczone inaczej niż wewnątrz materiału. Atomy warstwy wierzchniej ciała stałego posiadają wyższą energię potencjalną i podczas kontaktu z inną fazą (gazem lub cieczą) dążą do jej obniżenia. Atomy warstwy wierzchniej są jednocześnie przyciągane przez atomy sieci wewnętrznej oraz oddziałują z atomami fazy będącej w kontakcie z powierzchnią.

Warstwa wierzchnia materiału oraz jej modyfikacja jest bardzo ważna, gdyż styka się ona bezpośrednio z ośrodkiem zewnętrznym przez co jest narażona na działanie zewnętrznych obciążeń oraz odpowiada za reakcje z otaczającym środowiskiem [15].

Jako jeden z największych problemów związanych z osteointegracją jest przygotowanie warstwy wierzchniej implantu. Badacze wskazują na istotę warstwy wierzchniej i wrażliwość komórek kostnych na podłoże, na którym mają wzrastać i różnicować się. Udowodniono, iż przyleganie i adhezja komórek do biomateriałów odpowiadają za właściwy wzrost, proliferację oraz różnicowanie się osteoblastów[16]. Należy zatem optymalnie zmodyfikować powierzchnię biomateriałów aby polepszyć adhezję komórek osteogennych. Warstwy pośrednie stanowią także barierę dyfuzyjną i powodują podwyższenie odporności na korozję.

Ze względu na zróżnicowanie budowy powierzchni materiałów implantacyjnych wynikające z mnogości stosowanych biomateriałów istnieje bardzo wiele sposobów modyfikacji ich powierzchni. Można wyróżnić cztery typy warstw pośrednich [17]:

- warstwy dyfuzyjne;
- warstwy diamentowe (NCD, DLC);
- powłoki hydroksyapatytowe;
- warstwy kompozytowe (nowość).

Do najczęściej stosowanych sposobów nanoszenia warstw należą metody wykorzystujące plazmę, fotony i jony (procesy PDT – Plasma Diffusion Treatment):

- RFCVD – Radio Frequency Chemical Vapour Deposition;
- MWCVD – Microwave CVD;
- PLD – Pulsed Laser Deposition;
- metoda zol-żel.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi najczęściej stosowanymi materiałami są sztuczny hydroksyapatyt (HA) oraz tlenki metali, z których wykonywane są implanty. Hydroksyapatyt jest osteofilny i staje się „rusztowaniem” dla proliferacji i rozrostu kości. Dzięki warstwie hydroksyapatytu implant formuje szybsze i mocniejsze połączenie z kością oraz nie powstaje niepożądana tkanka łączna [15]. Niestety występuje nadal wiele problemów: odspajanie się warstwy, jej pękanie (zwłaszcza w przypadku HA), bioelektryczne niedopasowanie, występowanie efektu piezoelektrycznego czy optymalny dobór struktury i kształtu porów.

Wymuszenie przerastania powierzchni implantu tkanką kostną możliwe jest poprzez zastosowanie porowatych powierzchni. Doniesienia literaturowe mówią, że to właśnie pory mają znaczący wpływ na stopień przerastania implantu tkanką kostną. Wysoka porowatość i nasiąkliwość

materiałów podłożowych są niezbędne w celu uzyskania: odpowiedniej adhezji, wzrostu komórek, łatwej dyfuzji składników odżywczych i produktów przemiany materii oraz procesów unaczynienia implantu [15÷17]. Jako optymalny rozmiar porów dla regeneracji tkanki kostnej uznaje się zakres 200-400  $\mu\text{m}$  [18], przy czym maksymalną wytrzymałość na styku kość-implant otrzymuje się przy wielkości porów 100-400  $\mu\text{m}$ , natomiast dopiero przy porach większych niż 100  $\mu\text{m}$  mineralizacja przekracza głębokość 1000  $\mu\text{m}$  włąb, a tkankę kostną uznaje się za prawidłową zarówno pod względem biologicznym, jak i funkcjonalnym [18].

#### **4. Wnioski**

Implant uzyskuje swoje podstawowe cechy oraz biokompatybilność dzięki składowi materiału, z którego został zbudowany. Największe jednak znaczenie dla akceptacji implantu przez tkankę i dla procesu osseointegracji ma skład jego warstwy powierzchniowej [19].

W tkankach otaczających świeżo wszczepiony implant zachodzą komórkowe i tkankowe procesy gojenia. Oparte są one na przebudowie i reorganizacji tkanki kostnej oraz na dynamice tych przemian, które muszą zachodzić szybciej, niż procesy resorpcji, wywołane obecnością ciała obcego. Na równowagę między tymi procesami mają wpływ m.in. siły biomechaniczne wyzwalane przez konstrukcję protetyczną – zarówno prowizoryczną jak i stałą oraz zdolności organizmu indywidualnego pacjenta. Reakcje te mogą, ale nie w każdym przypadku muszą, być jednakowe [20].

Przy obecnym rozwoju nauki i techniki współczesne techniki diagnostyczne nie pozwalają na określenie stopnia i dynamiki osteointegracji implantu. Proces osteointegracji jest widoczny jedynie w obrazie mikroskopu elektronowego, jako obecność młodej tkanki na tlenkowej powierzchni implantu. Stwierdzenie więc, czy implant zrósł się z tkanką kostną możliwe jest dopiero po wypreparowaniu, pocięciu i poddaniu analizie mikroskopowej zarówno implantu jak i tkanek okołowszczepowych, co z oczywistych względów praktycznych jest niemożliwe [19].

Współczesne piśmiennictwo podaje, że osteointegracja może w ogóle nie wystąpić, mimo, że wszczep nie wykazuje ruchomości. Osteointegracja może też wystąpić jedynie przez pewien czas i zaniknąć. Nie zawsze znane są przyczyny takich niepowodzeń. Często mogą one zależeć od czynników natury biologicznej, np. kość może być zbyt słabo unaczyniona, lub jej jakość czy zwartość mogą się okazać nieodpowiednie. Proces osteointegracji może też zaniknąć na skutek przeciążenia implantu czy parafunkcyjnych nawyków pacjenta.

## Podziękowania

Acknowledgements: This scientific work was supported by the Faculty of Mechanical Engineering, Białystok University of Technology, project No MB/WM/14/2014.

## Literatura

1. Żurek-Świczko B., *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2009
2. Nowacki, L., Gustavo F., *Biomateriały w konstrukcji implantów*, Open Access Library Volume 11, 2012
3. Gierzyńska-Dolna M., *Biotribologia*, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2002
4. Brånemark P. I, Adell R., Breine U., Hansson B.O., Lindstrom J., Ohlsson A., *Intra-osseus anchorage of dental prostheses. Experimental studies*, Scand. J. Plastic. Reconstruct Surg 196, 3, 81-100
5. Dąbrowski J. R., Sterna J., Sidun J., Oksiuta Z., *Osteointegracja porowatych implantów na bazie stopu Co-Cr-Mo*, Acta of Bioengineering and Biomechanics. Materiały III Symposium Inżynieria Ortopedyczna i Protetyczna IO' 2001; 3(1), Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2001, 47-54
6. Sidun J., Popko J., Dąbrowski J. R., *Reakcje okołowszczepowe materiałów implantacyjnych*, Mechanika w medycynie 7. Zbiór prac seminarium naukowego. (red.) Korzyński M., Cwanek J., Rzeszów 2004
7. Łomżyński Ł., Mierzwińska-Nastalska E., Kłodkowska-Dobrucka M., *Implanty śródkostne w leczeniu protetycznym – ewolucja implantologii.*, Protet. Stomatol. 2012, LXII, 4, 244-251
8. Majewski P., Gronkiewicz K., Majewski S., *Praktyczne aspekty tkankowej integracji tytanowych wszczepów dentystycznych*, Implantoprotetyka 2011, XII, 3-4, 44-45, 44-47
9. Stupka M., Majewski P., *Poimplantacyjna stabilizacja włórnna wszczepów filarowych jako jeden z elementów oceny warunków do rozpoczęcia etapu zaopatrzenia protetycznego – możliwe powikłania*, Implantoprotetyka 2009, X, 4, 37, 14-16
10. Larsson C., Thomsen P., Lausmaa J., Rodahl M., Kasemo B., Eriksson L.E., *Bone response to surface-modified titanium implants: Studies on electropolished implants with different oxide thickness and morphology*, Biomaterials 1994, 15, 1062-1074
11. Brånemark P.I., Zarb G.A., Albrektsson T., *Tissue – Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry*, Quintessence Publishing Co., Chicago, IL, 1985
12. Maciejewska I., Nowakowska J., Bereznowski Z., *Osteointegracja wszczepów zębowych – etapy gojenia kości Praca pogładowa*, Protet. Stomatol. 2006, LVI, 3, 214-219
13. Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Dufresne E., Judas D., Iost A., Hardouin P., *Qualitative and quantitative study of human osteoblasts adhesion*

- on materials with various surface roughnesses*, Biomed. Mater. Res. 2000, 49, 155-166
14. Hanks C., Watahaz J.C., Suni Z.: *In vitro models of biocompatibility: A review*, Dent. Mater. 1996, 12, 186-193
  15. Będziński R., *Biomechanika inżynierska. Zagadnienia wybrane*, Wrocław, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 1997, 13-70
  16. Będziński R. *Relacje tkanka-implant*, *Inżynieria Biomateriałów*, 2002, 131-136
  17. Hutmacher D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, *Biomaterials* 21, 2000, 2529-2543
  18. Jaegermann Z., Karaś J., Michałowski S., *Struktury porowate materiałów ceramicznych na nośniki żywych komórek do stosowania w inżynierii tkankowej*, *Inżynieria Biomateriałów*, 2002, 12-14
  19. Kutz M., *Standard handbook of biomedical engineering and design*, USA, The McGraw-Hill Companies, 2003, 15.1-15.22
  20. Salvi G.E., Lang N.P., *Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions*, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2004, 19, 116-127

### **Biokompatybilność i osteointegracja implantów metalicznych**

#### Streszczenie

Implanty medyczne powinny spełniać wiele istotnych warunków, aby mogły być bezpiecznie stosowane u osób chorych. Od wszczepów wymaga się braku toksyczności i cech alergicznych oraz braku działań mutagennych i kancerogennych. W zależności od zastosowań wymagania poszerzają się o hemo- i trombozgodność oraz biofunkcjonalność. Poprawa biozgodności i tolerancji materiału może być osiągnięta drogą modyfikacji jego powierzchni. Rodzaje zmian powierzchni wszczepów metalicznych można najogólniej podzielić na dwie grupy: fizyko-chemiczną i biochemiczną. Metody fizyko-chemiczne powodują zmiany składu chemicznego istniejącej powierzchni. Metody biochemiczne oparte są na przyłączaniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie białek do powierzchni "uatrakcyjniając" warstwę wierzchnią wszczepu.

Słowa kluczowe: biokompatybilność, osteointegracja, implanty metaliczne, modyfikacja powierzchni

### **Biocompatibility and osteointegration metallic implants**

#### Abstract

Medical implants should meet several relevant conditions for safely use. Grafts have to be free from toxicity and allergenic features, and also free from mutagenic and carcinogenic effects. In dependence on the use requirements can be extended on hemo- and thrombo-compatibility, and also on bio-functionality. Every implant undergo to gradual degradation due to contact with body fluids. Corrosion is a significant phenomenon in the case of metallic implants, and it can results in metallosis and also in lose of mechanical property of an implant. An improvement in biocompatibility and tolerance of metallic materials can be reached by a surface modification. Types of surface modification methods can be divided onto two groups: physico-chemical and biochemical methods. Physico-chemical methods of modification cause changes in chemical composition of the existing surface, whereas biochemical methods rely on attachment of small organic molecules, which allow to bind to the surface of specific proteins, making the implant surface more attractive.

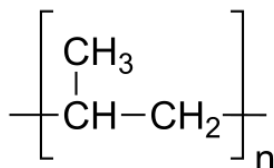
Keywords: biocompatibility, osseointegration, metallic implants, surface modification

## Zastosowanie polimerów w stomatologii

### 1. Wstęp

Polimerami nazywamy związki chemiczne składające się z wielu powtarzających się elementów struktury, zwanymi merami. Proste związki, z których tworzy się polimery, to monomery. Częsteczką polimeru może być zbudowana z różnego typu monomerów. Jest to wtedy tzw. kopolimer lub trimer (połączenie trzech cząsteczek zdolnych do polireakcji) [1].

Na poniższym rysunku (rys.1) została przedstawiona budowa meru syntetycznego polimeru – polipropylenu.



Rys. 1. Polipropylen z zaznaczoną jednostką podstawową [opracowanie własne]

#### Struktura polimerów

Ze względu na strukturę atomową łańcucha polimery mogą być liniowe lub usieciowane. Liniowe polimery są zbudowane z długich łańcuchów zawierających tysiące merów. Łańcuchy te mogą powstawać w wyniku polimeryzacji zarówno addycyjnej, jak i kondensacji. Polimery usieciowane mają łańcuchy połączone kowalencyjnymi wiązaniami poprzecznymi, które tworzą sieć. Powstają w wyniku polikondensacji, rzadko – polimeryzacji addycyjnej.

#### Podział polimerów

Materiały polimerowe można klasyfikować według różnych kryteriów. Najczęściej stosowane podziały tej grupy materiałów dokonuje się ze względu na ich pochodzenie, budowę chemiczną, sposób przenoszenia naprężeń w temperaturze pokojowej, kinetykę i mechanizm reakcji otrzymania,

<sup>1</sup> kula.zofia@wp.pl, Instytut Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Łódzka

<sup>2</sup> anna.barbara.laska@gmail.com, Instytut Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Łódzka

<sup>3</sup> hieronim.szymanowski@p.lodz.pl, Instytut Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Łódzka

właściwości przetwórcze lub zastosowanie. W tabeli (Tab. 1) przedstawiono kilka powszechnych podziałów polimerów wraz z przykładami.

Tabela.1 Przykładowe kryteria podziału polimerów wraz z przykładami

<b>Kryterium podziału</b>	<b>Podział</b>	<b>Przykłady</b>
Pochodzenie polimeru	polimery naturalne	kolagen, elastyna, skrobia, soja, kwas hialuronowy, chityna, chitozan, kwas alginowy
	polimery syntetyczne	polimetakrylan metylu, metyloceluloza, poliwęglany, silikon, polilaktyd, poliglikolid, polikaprolakton
Sposób przenoszenia naprężeń w temperaturze pokojowej	elastomery	kauczuk naturalny, kauczuk syntetyczny, poliuretany, plastyfikowany PCV
	plastomery termoplasty duroplasty	
Właściwości przetwórcze	termoplasty bezipostaciowe (amorficzne) krystaliczne (częściowo-krystaliczne)	polistyren, poliamidy alifatyczne (np. nylon), PCV, polimetakrylan metylu, polietylen, polipropylen, azotan celulozy
	duroplasty termoutwardzalne chemoutwardzalne	żywice epoksydowe, żywice poliestrowe, poliuretany, tworzywa silikonowe, fenoplasty

Źródło: Opracowanie własne

### Mechanizm polimeryzacji

Tworzywa sztuczne otrzymuje się na drodze reakcji polimeryzacji. Łańcuchy polimerowe powstają w wyniku łączenia się małych cząsteczek. Warunkiem otrzymania polimeru ze związków małowcząsteczkowych jest użycie substratów zawierających w cząsteczce co najmniej dwie zdolne do reakcji grupy funkcyjne np. -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, bądź wiązania wielokrotne C=C. Reakcje polimeryzacji mogą przebiegać według różnych mechanizmów.



Dzielimy je na polireakcje łańcuchowe i polireakcje stopniowe. Polireakcje łańcuchowe obejmują procesy polimeryzacji i kopolimeryzacji, a polireakcje stopniowe procesy polikondensacji i poliaddycji [1].

## **2. Właściwości polimerów stosowanych w stomatologii**

Celem niniejszej pracy jest pogładowe przedstawienie istniejących i potencjalnych zastosowań polimerów w stomatologii.

Polimery do zastosowań stomatologicznych muszą wykazywać określone właściwości fizyczne, chemiczne, biologiczne i mechaniczne. Zastosowanie polimerów jest ściśle związane z ich właściwościami. Ze względu na biomedyczne zastosowanie, materiały polimerowe winny spełniać szereg wymogów.

Polimery biomedyczne używane w stomatologii powinny być biogodne i nie wywoływać negatywnych reakcji w kontakcie z tkankami pacjenta. Wymaganiem kryterium jest brak reakcji alergicznych i toksycznych, brak stanów zapalnych oraz zmian nowotworowych, mutagennych i teratogennych [2]. W przypadku zastosowań stomatologicznych takie właściwości jak współczynnik rozszerzalności cieplnej, przewodnictwo cieplne, odporność na ścieranie i wysoka wytrzymałość na zginanie i ścinanie odgrywają kluczową rolę, aby materiał polimerowy właściwie funkcjonował w organizmie pacjenta.

Właściwości fizyczne, chemiczne i mechaniczne materiałów polimerowych stosowanych w stomatologii nie powinny zmieniać się pod wpływem środowiska biologicznie czynnego. Dodatkowo, już podczas wytwarzania, przetwarzania oraz sterylizacji właściwości materiału muszą podlegać ścisłej kontroli, ponieważ w przypadku polimerów każdy proces może znacząco wpłynąć jego strukturę, a w konsekwencji zmienić jego właściwości.

## **3. Zastosowanie polimerów w stomatologii**

Tworzywa polimerowe znalazły zastosowanie w takich dziedzinach stomatologii jak: protetyka, ortodoncja, profilaktyka, stomatologia zachowawcza czy chirurgia. W protetyce i ortodoncji wykonuje się z polimerów protezy, zęby sztuczne, łyżki indywidualne oraz aparaty ortodontyczne. Lakiery zabezpieczające nasze zęby przed próchnicą są na bazie polimeru. Stomatolodzy również stosują polimery, kiedy trzeba wypełnić ubytek podczas leczenia zachowawczego bądź endodontycznego.

### **3.1. Materiały do wykonywania wycisków stomatologicznych**

Masy wyciskowe służą do odwzorowania warunków pola protetycznego w jamie ustnej na modele gipsowe umożliwiające precyzyjne

wykonawstwo protez na etapie laboratoryjnym. Masy wyciskowe powinny spełniać określone wymagania: nieszkodliwość dla tkanek jamy ustnej, łatwość zarabiania, przyjemny smak, zapach, odpowiedni czas wiązania, dokładne odwzorowanie pola protetycznego, trwałość nadanego w jamie ustnej kształtu, odpowiednią wytrzymałość mechaniczną oraz łatwość oddzielania od modelu.

Masy wyciskowe dzielimy na:

- masy wyciskowe sztywne (gips, gutaperka);
- masy wyciskowe elastyczne (masy silikonowe, polisulfidowe oraz polieterowe).

W technice dentystycznej gutaperka zaliczana jest do mas termoplastycznych, które są pochodzenia naturalnego. Jej plastyczność zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury osiągając optimum w zakresie temperatur 40-60° C. W 100° C zamienia się w lepką, ciągliwą maź, która rozkłada się przy temperaturze 120° C. Obecnie gutaperka jest zastępowana przez elastyczne materiały wyciskowe, ale nadal znajduje zastosowanie wszędzie tam gdzie wymagana jest zdolność materiału do długiego zachowania plastyczności. Wykorzystuje się ją również do uszczelniania kanału zęba. Ta naturalna żywica nie drażni tkanek okołowierzchołkowych, stanowi więc materiał biogodny, dobrze tolerowany przez nasz organizm.

Z mas wyciskowych elastycznych najbardziej popularna są masy polisulfidowe. Masy te występują w dwóch tubkach. W jednej z nich znajdują się cząstki polimeru polisulfidowego. Druga tubka zawiera  $PbO_2$ . Polisulfidowy polimer ma masę cząsteczkową 2000 do 4000 i końcowe oraz boczne grupy merkaptanowi (-SH). Końcowe i boczne grypy przylegających cząsteczek są utleniane pod wpływem akceleratora, by odpowiednio wydłużyć i sieciować łańcuch [1]. Zaletą tych mas jest duża wytrzymałość mechaniczna, łatwość mieszania mas oraz dobra elastyczność.

Silikony zawierają bazę, która jest polimerem silikonowy. Katalizatorem reakcji jest kwas chloro-platynowy. Podstawą twardnienia tych mas jest reakcja addycji (przyłączenie). Jest to rodzaj reakcji chemicznej, polegającej na przyłączeniu jednej cząsteczki do drugiej w wyniku czego powstaje tylko jeden produkt bez żadnych produktów ubocznych. Nie dochodzi do powstania nowych produktów. Jedynie w minimalnych ilościach wydzielany jest wodór. Proces polimeryzacji ulega zakończeniu już w jamie ustnej pacjenta. Masy te charakteryzują się bardzo dużą dokładnością odwzorowania detali [3].

Masy polieterowe posiadają bazę, która zawiera polieter o niskiej masie cząsteczkowej, plastyfikatory oraz wypełniacze. Katalizator zawiera ester kwasu sulfonowego. Podstawą twardnienia jest polimeryzacja kationowa.

Zaletą tych mas jest bardzo duża dokładność odwzorowania, długi okres stabilności wymiarów i najmniejsza kurczliwość liniowa 0,1% [3].

### 3.2. Materiały do produkcji protez stomatologicznych

Każda proteza protetyczna musi spełniać zasadnicze funkcje medyczne czyli odtworzenie funkcji układu stomatognatycznego oraz jego rehabilitacja przy minimalnej inwazyjności działania [4].

W protetyce najbardziej popularne są protezy stomatologicznych wykonane z akrylu. Z tworzywa akrylowego wytwarza się protezy całkowite i częściowe. *Proteza częściowa akrylowa* jest to rodzaj uzupełnienia protetycznego odbudowującego pojedyncze braki zębowe. Natomiast proteza akrylowa całkowita to taka, która uzupełnia całkowite braki zębowe (bezzębnie). Akryl stomatologiczny występuje w postaci proszku oraz płynu. Skład proszku oraz płynu, wykorzystywany do produkcji protez został przedstawiony w tabeli poniżej (Tab.2).

Tabela 2. Podstawowe składniki akrylowych płyt protez

Składnik w formie proszku	Składnik w formie płyn
Polimer (lub kopolimer) akrylowy w postaci perełek	Monomer
Inicjator	Inhibitor
Pigmenty	Przyspieszacz
Barwniki	Plastyfikator
Środek zmętniający	Środek sieciujący
Plastyfikator	
Włókno organiczne barwione	
Cząstki nieorganiczne	

Źródło: [1]

Po zmieszaniu proszku z płynem możemy wyróżnić poszczególne fazy procesu częściowego rozpuszczania ziaren polimeru przez monomer.

### Faza mokrego piasku

Pod wpływem zwilżania proszku przez płyn zbijają się ciasno ze sobą, a na powierzchni można zauważyć monomer. Pęcznienie ziarenek polimeru w wyniku absorpcji monomeru powoduje, że masa akrylowa zaczyna przechodzić w następną fazę. Ten proces trwa około 3-5 minut [5].

### Faza nitek

Ta faza charakteryzuje się obecnością tzw. „nitek”, które przy dotknięciu narzędzia do nakładania akrylu rwą się. W tej fazie dochodzi do płynięcia i ciągnięcia się masy akrylowej. W tym czasie nadmiar monomeru zostaje wchłonięty przez polimer. Faza ta trwa około 5-15 minut [5].

### Faza ciasta

Masa akrylowa ma konsystencję ciasta, łatwo się formuje. Materiał na tym etapie powinien być wyjęty z naczynia i wyrobiony w rękach przez 30-45 sekund. Następnie akryl jest umieszczany z nadmiarem w specjalnej puszcze polimeryzacyjnej, która trafia pod prasę.

### Faza wstępnej polimeryzacji

Na tym etapie dochodzi do utwardzania akrylu [5].

Do produkcji płyt protezy wykorzystuje się również modyfikowane materiały na bazie polimetakrylanu metylu. Obejmują one akrylany wykorzystywane w metodzie wtryskowej i wlewowej, hydrofilowe poliakrylany, żywice akrylowe o dużej udarności, akrylany szybko polimeryzujące na gorąco oraz materiały aktywowane światłem [1].

Już od wielu lat coraz bardziej powszechne w leczeniu protetycznym stają się protezy elastyczne. Technologia protez elastycznych jest obecnie najbardziej dynamicznie rozwijającą się dziedziną protetyki. Wyróżniamy kilka rodzajów protez elastycznych. Protezy oparte na poliamidach, które są bardzo wytrzymałe, lekkie, o bardzo dobrej estetyce. Protezy acetalowe, które są alternatywą dla klasycznych protez szkieletowych wykonanych z elementów metalowych. Różnica polega na tym, że sztywne elementy metalowe i akrylowe zostały zastąpione przez tworzywo elastyczne – acetal. Do produkcji protez wykorzystywany jest również nylon. Tworzywo to zapewnia protezie odporność na złamanie i podnosi w znaczącym stopniu komfort użytkowania. Po niżej został przedstawiony rysunek całkowitej protezy akrylowej. Proteza ta jest przeznaczona dla pacjentów bezzębnych.



Rys. 1. Gotowa proteza akrylowa [opracowanie własne]

### 3.3. Materiały do wykonywania koron i mostów protetycznych

Korony i mosty protetyczne są wykonywane w laboratoriach protetycznych, dzięki czemu konieczne jest dodatkowo zrobienie tymczasowych koron bądź mostów z polimerów akrylu. Materiał ten składa się z proszku i płynu. Miesza się je aż do uzyskania klarownej konsystencji, a następnie umieszcza się w uprzednio wykonanej formie korony czy mostu. Tak przygotowane uzupełnienie wykańcza się przy użyciu frezów i osadza na zębach za pomocą cementu tymczasowego [5]. Po niżej została zaprezentowana fotografia (Rys. 2) gotowego mostu protetycznego.



Rys. 2. Gotowy most protetyczny [6]

### 3.4. Materiały do wykonywania aparatów ortodontycznych

Materiały pod względem składu chemicznego przeznaczone do wykonywania płyt ruchomych aparatów ortodontycznych są samo polimerami. Do wykonania takiej płyty wykorzystuje się płyn i proszek. W celu

zabarwienie aparatu używa się stężone koncentraty kolorów o większym stężeniu barwników, które następnie miesza się z bezbarwnym monomerem w ilości 2-4 kropli koncentratu na 1ml bezbarwnego monomeru. Płyn składa się z metakrylanu metylu oraz aminy trzeciorzędowej. Natomiast proszek jest kopolimerem metakrylanu metylu i metakrylanem etylu.

Ruchome płytki aparatów ortodontycznych wykonywana jest metodą nasypywania akrylu na model. Metoda ta pozwala na bardzo szybkie wykonywanie całej pracy bez konieczności czekania na fazę przydatności do użycia oraz utwardzania w gorącej wodzie. Na przygotowany model nasypuje się warstwę cienką warstwę polimeru ortodontycznego i delikatnie nasącza monomerem, po czym nasypujemy kolejną warstwę proszku i ponownie nasącza monomerem do momentu, kiedy zostaną przykryte wszystkie metalowe elementy aparatu ortodontycznego. Na koniec model pokryty akrylową masą umieszczany jest w polimeryzatorze ciśnieniowym w wodzie o temperaturze 50-60° C, pod ciśnieniem 2,5-6 barów na czas 20 minut [5].

Po niżej na rysunku (Rys. 3) został przedstawiony gotowy aparat ortodontyczny, który jest umieszczony na modelu gipsowym.



Rys. 3. Gotowy ruchomy aparat ortodontyczny [opracowanie własne]

### 3.5. Tworzywa polimeryzowane światłem UV

Materiały te składają się z matrycy mieszaniny uretanodimetakrylanu imonomerów akrylowych, napełniaczy krzemionkowych o mikronowym stopniu rozdrobnienia systemu fotoinicjatorów. Polimeryzacja zachodzi pod wpływem naświetlania. Zakres długości fali przy którym dochodzi do sieciowania to 400 do 500nm. Czas ekspozycji na polimeryzację jest różny i zależy od typu urządzenia polimeryzującego, głębokości ubytku i odcienia

materiału. Na ogół proces ten przebiega od 20 do 60 sekund dla 2-milimetrowej warstwy materiału. Kompozyty z mikrowypełniaczem potrzebują dłuższego czasu naświetlania niż kompozyty mikrohybrydowe, ponieważ małe cząsteczki wypełniacza rozpraszają światło w większym stopniu. W przypadku głębokich ubytków kompozyt powinien być nakładany warstwami o grubości 2mm. Zawartość czynnika absorbującego promieniowanie UV wpływa na stabilizację koloru i fluorescencję zapieniającą estetykę. Z kolei nadmierna koncentracja inicjatora ma niekorzystny wpływ na zasięg naświetlania [1].

W stomatologii. Materiały kompozytowe światłoutwardzalne oparte na osnowie żywicy mają coraz szersze zastosowanie na stałe wypełnienia stomatologiczne. Głównie zastosowanie znalazły w stomatologii zachowawczej jako wypełnienia ubytków, ale i nie tylko. Stosuje się je również w protetyce do wykonywania łyżek indywidualnych.

Właściwości mechaniczne kompozytów stomatologicznych zależą w dużym stopniu od typu, wielkości cząstek oraz ilości wprowadzonego wypełniacza. Wiele właściwości mechanicznych, takich jak wytrzymałość na ściskanie, mikrotwardość, wytrzymałość na zginanie czy moduł sprężystości rośnie wraz ze wzrostem udziału wypełniacza w kompozycie [7].

### **3.6. Tworzywa utwardzalne chemicznie**

Kompozyty chemoutwardzalne są najczęściej umieszczane w strzykawkach lub słóczkach zawierających pastę bazową i katalizator, które należy ze sobą zmieszać. Jednakowe ilości pasty i katalizatora miesza się energicznie ze sobą przez 20-30s. Z powodu właściwości ściernych nieorganicznych cząsteczek wypełniacza wskazane jest użycie plastikowej szpatułki. Czas plastyczności kompozytów chemoutwardzalnych wynosi od 1 do 1,5 minuty od momentu zamieszania. Po tym czasie rozpoczyna się proces twardnienia pod czas którego materiał należy pozostawić –przez 4-5 minut [1]. Czas utwardzania materiałów chemoutwardzalnych jest dłuższy niż w przypadku kompozytów sieciowanych światłem UV. Kompozyty chemoutwardzalne nie wymagają nakładania warstwowego jak jest w przypadku materiałów światło utwardzalnych [8].

### **3.7. Materiały do ochrony indywidualnej**

W stomatologii do ochrony indywidualnej używa się głównie rękawiczek jednorazowych, maseczek, papierowych serwet, okularów oraz fartucha ochronnego. Większość wymienionych rzeczy jest jednorazowego użytku.

Rękawiczki jednorazowe są wykonane z polimeru winylowego. Otrzymuje się je w wyniku polimeryzacji winylowej z monomerów

zawierających podwójne wiązania  $C=C$ . Łańcuchy główne składają się z atomów węgla powiązanych pojedynczymi wiązaniami  $-C-C-C-C-$ .

Ważnym elementem o którym warto wspomnieć to koferdam. Jest to materiał izolujący wykonany z lateksu. Stosuje się go zamiast wałeczków ligniny. Zadaniem koferdamu jest izolowanie leczonego zęba od dostępu śliny. Gwarantuje nam suchość pola zabiegowego.

#### 4. Łączenia akrylu z innymi materiałami

Zjawisko adhezji jest odpowiedzialne za połączenie ze sobą dwóch różnych materiałów. Adhezja jest zjawiskiem, które tworzy połączenie pomiędzy dwoma przylegającymi substratami, w wyniku którego powstaje nowy układ zwany połączeniem adhezyjnym. Wynika ona z oddziaływań międzycząsteczkowych stykających się substancji [5].

W celu polepszenia połączenia adhezyjnego zwiększa się powierzchnię styku dwóch płaszczyzn. Sposobem rozwijającym powierzchnię jest piaskowanie przy pomocy tlenku glinu oraz stosowanie elementów retencyjnych np. kulek.

Podczas wykonywania różnych prac protetycznych często zachodzi potrzeba łączenia różnych materiałów z tworzywem akrylowym. Tworzywa akrylowe w protetyce łączy się je głównie z metalem, kompozytem, włóknem szklanym czy też drutami ortodontycznymi. Poniżej została przedstawiona proteza szkieletowa, która jest wykonana z połączenia dwóch materiałów akrylu oraz metalu.



Rys. 4. Proteza szkieletowa [opracowanie własne]



## **5. Starzenie się tworzyw akrylowych stosowanych w stomatologii**

Tworzywa akrylowe są odporne na działanie nawet stężonych kwasów, natomiast pod wpływem środków alkalicznych ulegają destrukcji. W momencie ogrzewania do temperatury 300°C bez kontaktu z powietrzem ulegają depolimeryzacji z wydzieleniem wolnego monomeru.

Podczas użytkowania akryl może ulec przebarwieniu pod wpływem działania różnych barwników zawartych w żywności. Działanie takich czynników jak: kawa, herbata czy wino w krótkim czasie przebarwia tworzywa akrylowe [5].

W jamie ustnej do niewypolerowanych powierzchni mogą kolonizować się bakterie, dlatego ważne jest zachowanie higieny jamy ustnej oraz protez czy też aparatów ortodontycznych. Powinny być myte co najmniej raz lub dwa razy dziennie przy pomocy specjalnej szczotki oraz pasty o niskim współczynniku RDA. Środki dezynfekcyjne na bazie chlorheksydyny podczas długotrwałego stosowania powoduje wzrost powierzchniowej twardości tworzyw akrylowych polimeryzowanych termicznie oraz w niższych temperaturach [5, 8].

## **6. Wnioski**

Rozwój współczesnej medycyny jest niemożliwy bez wielokierunkowego wykorzystania naturalnych i syntetycznych związków wielkocząsteczkowych. Badania z zakresu syntezy i modyfikacji polimerów oraz rozwój technologii materiałów wielkocząsteczkowych o szczególnych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych przyczyniły się do opracowania nowoczesnych technik leczenia. Polimery dzięki swoim bardzo dobrym właściwościom pozwoliły na wyeliminowanie większości problemów z jakimi borykali się lekarze stomatolodzy oraz technicy dentyści.

Czas pokaże czy tworzywa polimerowe zostaną zastąpione nowymi, lepszymi materiałami. Po mimo wielu prób zastąpienia ich innymi tworzywami, pozostają one głównymi materiałami stosowanymi w stomatologii.

## Literatura

1. Craig R.G. *Materiały stomatologiczne*, Urban & Partner, 2006
2. Gogolewski S., Stoch L. *Biomateriały polimerowe*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT 2003
3. [www.dtpractice.eu/materialoznawstwo/masy-wyciskowe](http://www.dtpractice.eu/materialoznawstwo/masy-wyciskowe)
4. Polanowski K. *Protezy elastyczne i wykorzystanie technologii tworzyw termoplastycznych w praktyce stomatologicznej*, Magazyn stomatologiczny., (2013), s. 70-76
5. Raszewski Z. *Nowe spojrzenie na tworzywa akrylowe*, Elamed, 2009
6. [www.flicker.pl](http://www.flicker.pl)
7. Andrzejczuk M. *Właściwości mechaniczne światłoutwardzalnych kompozytów zbrojonych mikro- i nanocząsteczkami*, Kompozyty, 5 (2005), s. 75-79
8. Olędzka E. *Polimery w medycynie*, Polimery, 11-12 (2007) s. 795-803

## Zastosowanie polimerów w stomatologii

### Streszczenie

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat polimery naturalne jak i syntetyczne wpłynęły w znaczący sposób na rozwój cywilizacji oraz polepszenie jakości życia ludzi. Polimery znalazły szerokie zastosowanie w medycynie, dzięki swoim bardzo dobrym właściwościom, tj. odporności na działanie kwasów, dużej wytrzymałości mechanicznej, odporności na ścieranie i pękanie oraz możliwości barwienia. Tworzywa polimerowe zastosowano w takich dziedzinach stomatologii jak: protetyka, ortodoncja, profilaktyka, stomatologia zachowawcza czy chirurgia.

## Application of polymers in stomatology

### Abstract

Over the last decades natural and synthetic polymers have significantly influenced the development of civilization and improvement of people' life quality. Polymeric materials are widely used in dentistry because of their very good properties such as resistance to acids, high mechanical strength, resistance to abrasion and cracking and staining. Polymer materials are used in areas such as dental prosthetics, orthodontics, preventive, restorative dentistry and surgery dental.

## Stopy metali używane w ortodoncji

### 1. Wstęp

Metale stosowane w ortodoncji gwałtownie zmieniły się w ostatnich latach i będą się zmieniały w przyszłości. Jedną z podstawowych właściwości metali jest ich zdolność do tworzenia stopów. Stopem metali nazywa się mieszaninę dwóch lub większej ilości metali, bądź metalu z innymi pierwiastkami niemetalicznymi. Aby uzyskać stop należy podgrzać składniki do temperatury powyżej temperatury topnienia, a następnie schłodzić je. Nie jest to jednak jedyna metoda. Stopy można otrzymać również przez sproszkowanie poszczególnych metali, ich zmieszanie, a następnie sprasowanie ich mieszaniny. Jeszcze jedną znaną metodą otrzymywania stopów jest elektroliza roztworów soli metali. Jednak najczęściej stosowana jest metoda stapiania poszczególnych czystych substratów. Zazwyczaj powstały stop posiada odmienne charakterystyki od jego elementów składowych [1].

Czyste metale mają niewielkie zastosowanie w ortodoncji, gdyż posiadają niskie właściwości wytrzymałościowe, które są wymagane szczególnie dla drutów ortodontycznych. Niewielki dodatek określonego metalu do stopu może polepszyć jego właściwości mechaniczne np. gdy do stopu ołowiu doda się niewielką ilość rtęci, stop będzie twardszy, natomiast dodatek platyny do złota zwiększa znacznie jego sprężystość. W pracowniach ortodontycznych nie ma możliwości badania stopów należy więc pamiętać, aby do wykonywania prac, używać stopów o znanych właściwościach. Wykonanie aparatu z nieznanymi materiałami, może spowodować zniszczenie pracy w trakcie realizacji poszczególnych etapów jej wykonania. W najgorszym wypadku może dojść do uszkodzenia aparatu w jamie ustnej pacjenta [1].

Stopy wykorzystywane w ortodoncji poddawane są często obróbce plastycznej. Przybierają one formę włóknistą poprzez oddziaływanie

---

<sup>1</sup>j-dziedzic13@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Ortopedii Szczękowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Politechnika Lubelska

<sup>2</sup>monikagolianek@wp.pl, Katedra i Zakład Ortopedii Szczękowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>3</sup>w.smagowski@pollub.pl, Katedra Mechaniki Stosowanej, Politechnika Lubelska

<sup>4</sup>r.rusinek@pollub.pl, Katedra Mechaniki Stosowanej, Politechnika Lubelska

mechaniczne. Struktura krystaliczna metali może się jednak zmieniać pod wpływem ogrzewania stopu i przyjąć formę podstawową siatki krystalicznej. Informacja ta jest bardzo ważna podczas lutowania tego typu stopów, gdyż wysoka temperatura może doprowadzić do zmiany właściwości metalu. Elementy ortodontyczne wykonane ze stopów poddawanych obróbce mechanicznej są giętkie oraz mają dużą odporność na pęknięcie, co ma ogromny wpływ na sposób leczenia wad zgryzu. Druty ortodontyczne sporządza się głównie ze stopów metali nieszlachetnych, jednak są one również wykorzystywane do wytwarzania narzędzi stomatologicznych oraz odlewów uzupełnień protetycznych [2].

Aparaty zdejmowane powinny być przez większość doby noszone w jamie ustnej pacjenta, dlatego tak ważna jest biokompatybilność drutów ortodontycznych. Jest to termin, który jest najczęściej wykorzystywany, aby zdefiniować biologiczne wymagania stawiane stopom [3].

Biokompatybilność można zdefiniować jako zgodność tkankową oraz brak negatywnego wpływu na tkanki. Definicję tę rozszerzono dodając, iż możliwe jest wytworzenie materiałów bioaktywnych, które są zdolne do wywołania reakcji tkankowych, które będą korzystnie wpływały na organizm [3].

Na biokompatybilność stopów ma wpływ ich podatność na korozję, czyli stopniowe niszczenie materiałów, zachodzące między ich powierzchnią a otaczającym je środowiskiem, w tym wypadku jest to jama ustna pacjenta. Każdy stop niezależnie od tego jaki ma skład w pewnym stopniu ulega korozji. Stopy wysoko szlachetne uwalniają mniej elementów w wyniku tego procesu niż stopy o mniejszej szlachetności. Druty ortodontyczne dostępne w sprzedaży są bezpieczne, jednak należy zwracać uwagę, czy dana firma przeprowadziła ocenę podatności na korozję swoich wyrobów, gdyż proces ten może wywołać negatywne skutki w jamie ustnej pacjenta np. uczulenie bądź, nieprzyjemny metaliczny smak [2].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie oraz charakterystyka najpopularniejszych stopów wykorzystywanych w ortodoncji do wykonawstwa aparatów stałych i ruchomych. Dodatkowo zostały przedstawione i omówione wyniki badań rzeczywistej wytrzymałości drutów ortodontycznych na rozciąganie.

## **2. Właściwości mechaniczne stopów**

Ze stopów metalowych nie produkuje się wyłącznie drutów, ale również inne elementy wykorzystywane w aparatach takie jak zamki czy pierścienie. Stopy wykorzystywane w ortodoncji mogą mieć różny skład, a co za tym idzie również właściwości fizyczne mogą się nieco różnić od siebie. Ważne jest poznanie własności mechanicznych nowoczesnych

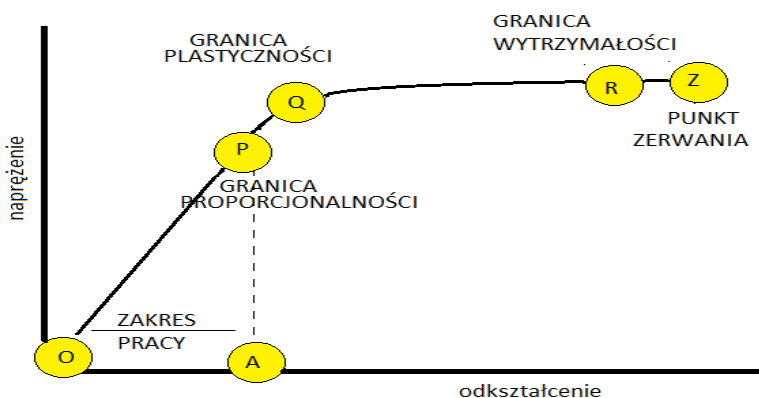
stopów, aby później dokonać dobrego wyboru produktów oferowanych przez producenta [4].

Materiały wykorzystywane do produkcji drutów mają określone właściwości mechaniczne takie jak: odkształcenie, elastyczność, sprężystość, plastyczność, wytrzymałość, zakres pracy oraz sztywność. Warto wiedzieć, czym charakteryzują się poszczególne pojęcia, aby dokonać odpowiedniej charakterystyki i poznać możliwości poszczególnych stopów [4].

- Odkształcenie – zdolność ciała do zmiany swoich kształtów i wymiarów pod wpływem działania sił obciążających lub innych czynników np. ciepło wilgotnościowych [5];
- Elastyczność – wielkość charakterystyczna dla polimerów, jest to zdolność materiału do odkształcania się pod wpływem działającej siły oraz powrotu do stanu pierwotnego po odjęciu działającej siły (tzw. Odkształcenie elastyczne) [4];
- Sprężystość – zdolność ciała do gromadzenia energii uzyskanej pod wpływem przyłożonej do tego ciała siły [4];
- Plastyczność – łatwość, z jaką materiał może być na trwale odkształcony (tzw. odkształcenie plastyczne) [6] Nieodwracalne odkształcenia są wynikiem działania na ciała stałe naprężeń mechanicznych, które przekraczają zakres, w którym ciało jest jeszcze zdolne do odkształceń sprężystych. Naprężenia te nie powodują zniszczenia ciągłości struktury ciała, na które działają;
- Wytrzymałość- nazywa się zdolność ciała do przenoszenia obciążeń. Wytrzymałością graniczną drutu ortodontycznego, nazywa się tą wartość wytrzymałości, po której osiągnięciu następuje zerwanie drutu. Jednostką wytrzymałości jest g/cm<sup>2</sup> [4];
- Zakres pracy- wielkość zależąca od maksymalnego odkształcenia elastycznego. Jednostką zakresu pracy jest mm [4];
- Sztywność – opór stawiany siłom, które powodują odkształcenie [6]. Z teoretycznego punktu widzenia, jest to stosunek siły do wywołanego przez nią odkształcenia.

Powyżej wymienione właściwości mechaniczne można przedstawić posługując się wykresem zależności odkształcenia od siły, które je wywołują (Rys.1). Należy pamiętać, że przebieg krzywej jest cechą charakterystyczną dla danego rodzaju stopu i obrazuje zachowanie się materiału po przyłożeniu siły. Zgodnie z Prawem Hooke'a, które mówi, że odkształcenie ciała pod wpływem działającej siły jest proporcjonalne do tej siły. Na wykresie rozciągania (Rys.1) pole zawarte pod odcinkiem pomiędzy punktami O i P przedstawia elastyczność drutu, odcinek OP to linia prosta, która unosi się ku górze. Granica proporcjonalności zaznaczona na wykresie literą P, oznacza wartość, od której materiał

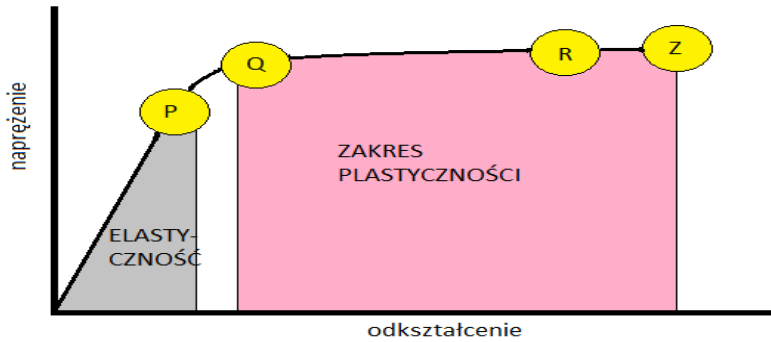
odkształca się na trwałe, czyli po odjęciu przyłożonej siły drut nie powraca do pierwotnego kształtu. Punkt Q nazwany granicą plastyczności, informuje o początku zakresu plastycznego materiału. Plastyczność jest jedną z najważniejszych cech drutu ortodontycznego, gdyż dzięki niej możliwe jest formowanie dowolnych kształtów z tego materiału. Należy jednak pamiętać, że obciążanie ma pewne granice wytrzymałości, a po ich przekroczeniu drut ulega zniszczeniu [4].



Rysunek 1. Wykres zależności naprężenia od odkształcenia; Źródło: opracowanie własne na podstawie [4]

Na wykresie zaznaczone są jeszcze dwa punkty R i Z. Punkt R oznacza granicę wytrzymałości drutu ortodontycznego na rozciąganie, natomiast Punkt Z oznacza wartość, przy której drut ulega zerwaniu.

Sztywność drutu jest odwrotnie proporcjonalna do podatności, to oznacza, że im sztywniejszy będzie drut, tym mniejsza będzie zdolność do jego uformowania, ale z drugiej strony będzie on lepiej spełniał swoje zadanie w jamie ustnej pacjenta. Dlatego do wykonywania sprężyn wybiera się druty o dużej sprężystości, aby sprężyny miały zdolność gromadzenia energii pod wpływem przyłożonej siły.



Rysunek 2. Wykres zależności naprężenia od odkształcenia, pole elastyczności i zakres plastyczności; Źródło: opracowanie własne na podstawie [4]

Sprężystość (czasami zwana elastycznością) materiału ma wpływ na łatwość formowania elementów ortodontycznych, co jest pomocną cechą dla technika wykonującego aparat. Im drut jest sztywniejszy to pole jego elastyczności jest mniejsze, a przebieg krzywej bardziej stromy, co przedstawia wykres przedstawiony na Rys. 2. To oznacza, że drut cechujący się dużą elastycznością ma szeroki zakres pracy, a co za tym idzie konieczna jest mniejsza siła do wywołania odkształcenia trwałego takiego drutu. Zakres plastyczności przedstawiony na wykresie (Rys.2) charakteryzuje parametry, przy których drut ortodontyczny ulega trwałemu odkształceniu, a jednocześnie nie ulega złamaniu.

„Odnosząc opisane właściwości drutów do celów ortodontycznych wydaje się, że najkorzystniejsze cechy to: duży zakres pracy i dobra plastyczność, wysoka wytrzymałość i, poza wyjątkowymi sytuacjami, niewielka sztywność „[4].

### 3. Stal nierdzewna

Najczęściej stosowanym stopem do produkcji drutów ortodontycznych jest stal nierdzewna. Równie znaną, ale rozpowszechnioną głównie w implantologii protetycznej jest stal Vitallium. W skład stali nierdzewnej wchodzi głównie chrom i kobalt, a dla potrzeb ortodoncji stal została wzbogacona również w nikiel. Zawartość chromu to około 12% natomiast zawartość niklu może sięgać nawet do 35%. Oprócz tych dwóch pierwiastków stal może zawierać również niewielkie ilości molibdenu, manganu, magnezu, miedzi i kobaltu [7].

Duży dodatek niklu do stali zwiększa jej trwałość i ciągliwość. W stomatologii stosowana jest niehartowana i austenityczna stal chromowo-

niklowa. Zawiera ona od 18% Cr i 8% Ni, określana jest jako stal nierdzewna i oznaczona jest symbolem 18:8.

Do głównych właściwości tej stali można zaliczyć:

- wysoką odporność na korozję;
- wzrost granicy plastyczności poprzez obróbkę za zimno;
- wysoką zdolność do wydłużenia.

Właściwości elementów stalowych mogą być zmieniane przez producenta w procesie wyżarzania lub poprzez obróbkę na zimno. Stal całkowicie wyżarzona charakteryzuje się wysoką plastycznością i małą twardością. W wyniku obróbki na zimno stal staje się dużo twardsza, co wykorzystuje się do produkcji łuków ortodontycznych o różnej twardości [4].

Przy zakupie elementów ortodontycznych należy pamiętać, że stal, z której zostały wykonane elementy została wcześniej wyżarzona, dlatego też nie powinno się poddawać tych elementów dodatkowej obróbce cieplnej, szczególnie po uformowaniu z nich odpowiednich części aparatu. Poprawianie właściwości stali poprzez podgrzanie metalu może spowodować znaczny ubytek chromu ze stopu, który jest odpowiedzialny za tworzenie ochronnej pasywnej warstwy antykorozyjnej. Dlatego nie należy ulepszać stali „na własną rękę”, bo może to przynieść negatywne skutki podczas użytkowania aparatu. [4]

Związki chemiczne, które wchodzi w skład stali zwykle są dobrze tolerowane przez organizm, ale czasami mogą działać toksycznie lub wywołać reakcje alergiczne. Stan fizykochemiczny powierzchni materiału stalowego może ulec zmianie przez przewodzenie przez elementy metalowe prądów elektrycznych, procesy korozyjne oraz tarcie, które może wpływać drażniąco na tkanki organizmu[7].

#### **4. Stopy kobaltu**

Stopy kobaltu są najczęściej wykorzystywane w protetyce stomatologicznej jak również w ortodoncji. Uznanie zyskały również w chirurgii narządów ruchu jako materiał stosowany przy wykonywaniu endoprotez m.in. stawu biodrowego.

Cechują się niskim przewodnictwem cieplnym, dzięki któremu pacjent może spożywać ciepłe posiłki bez obaw, że poparzy się rozgrzanym drutem aparatu. Dobra biogodność stopów zapewnia brak negatywnego wpływu na tkanki organizmu. Dodatkowymi właściwościami stopów kobaltu są: wysoki moduł sprężystości, wysoka wytrzymałość przy każdej możliwej rozpiętości elementu, niski współczynnik rozszerzalności cieplnej oraz wysoka odporność na korozję, która może być przyczyną metalozy [8]. Do najczęściej stosowanych stopów kobaltu można zaliczyć Vitalium oraz Elgiloy.



#### 4.1. 4.1. Vitalium

Vitalium jest nazwą firmową stopu składającego się z 65% kobaltu, 30% chromu i 5% molibdenu. W skład Vitalium wchodzi też inne metale takie jak mangan, nikiel, czy kobalt. Materiał ten jest używany w protetyce i ortodoncji stomatologicznej oraz w chirurgii, ze względu na jego odporność na korozję. Jest on również stosowany do produkcji składników turbosprężarki ze względu na odporność cieplną. Vitalium został opracowany przez Alberta W. Merrick dla Austenal Laboratories w 1932 roku [9]. Dokładny skład stopu został przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Skład chemiczny Co-Cr-Mo (w %), Źródło: opracowanie własne na podstawie [10]

C	P	S	Mn	Si	Cr	Ni	Mo	Fe	Co
0.10	0.01	0.01	0.88	0.50	28.2	0.02	4.40	0.55	65.0

Ilość chromu i molibdenu w stopach dobierany jest tak, aby roztwór  $\beta$ -Co był osnową tych stopów. Obecność chromu w stopie wpływa na wzrost odporności na korozję, zaś molibden odpowiedzialny jest za wzmocnienie osnowy oraz rozdrobnienie ziarna. Vitalium należy do stopów niskowęglowych, dzięki temu nadaje się do spawania laserowego [8]. Stop ten ma też istotne wady m. in. niską plastyczność, która może być przyczyną uszkodzeń elementów druczianych podczas użytkowania aparatu [11]. Stopy Co-Cr-Mo używane są w większości do odlewania szkieletu protez szkieletowych oraz elementów metalowych protez klamrowych i mocowanych na zatrzaski, zasuwy oraz rygle [8].

#### 4.2. 4.2 Elgiloy

Elgiloy jest stalowym stopem o własnościach, które są przydatne i cenione w ortodoncji. Po raz pierwszy został wyprodukowany w fabryce Elgina i był używany do produkcji sprężyn w zegarkach. Firma RockyMountain wprowadziła go do ortodoncji pod nazwą Elgiloy. Podstawowymi składnikami stopu są chrom (około 20%) oraz kobalt (40%). Elgiloy w swoim składzie zawiera również żelazo, nikiel, magnez, molibden, beryl i węgiel. Materiał okazał się wysoce odporny na korozję dzięki dużej zawartości chromu. Największą zaletą tego stopu jest jego podatność na obróbkę termiczną. Stal przed podgrzaniem można łatwo kształtować i jest bardzo miękka natomiast po ogrzaniu zyskuje na twardości i elastyczności [4].

Elgiloy produkowany jest w czterech wersjach o różnych stopniach twardości i elastyczności. Ze względu na stopień twardości każda odmiana stopu jest oznaczona inną barwą. Tak więc, kolorem niebieskim oznaczono drut miękki, a żółtym, drut nieco twardszy i giętki. Zielony to drut twardy i półsprężysty, natomiast największą twardość i sprężystość wykazuje drut oznaczony kolorem czerwonym. Producent zapewnia, że wszystkie cztery rodzaje drutów mają ten sam skład stopów. Różnice w sprężystości i twardości wynikają z różnego sposobu ich wytwarzania. Druty oznaczone kolorem niebieskim i żółtym po obróbce cieplnej stają się twardsze, podobnie jak stal nierdzewna. Natomiast druty Elgiloy zaliczane do twardych i bardzo twardych właściwościami zbliżone są do tzw. super stali. Druty Elgiloy wykazują odporność na korozję dzięki obecności cienkiej warstwy pasywnej tlenku chromu na powierzchni drutu [4, 12].

#### **4.2.1. Elgiloy Blue**

Największe powodzenie wśród ortodontów zdobył drut Elgiloy Blue, z uwagi na łatwość nadawania mu odpowiednich kształtów. Po podgrzaniu zwiększa się jego twardość i elastyczność, tak że przyjmuje właściwości stali nierdzewnej. Co więcej, drut łatwo poddać obróbce cieplnej, gdyż lekarz może to zrobić za pomocą aparatu do spawania. Urządzenie to działa na zasadzie oporu elektrycznego. Producent do danego sprzętu zawsze dołącza instrukcje użycia i specjalną pastę, która wskazuje kiedy zostanie osiągnięta odpowiednia temperatura i czas nagrzewania. Łuki Elgiloy Blue różnią się składem stopu od stali nierdzewnych, jednakże mają zbliżone właściwości mechaniczne. Do porównywalnych cech można zaliczyć m.in. wartości wyzwalanej siły, elastyczność i twardość. Stopy są podobne również pod względem zawartości niklu i właściwości łączenia się [12].

### **5. Stopy niklu**

Stopy niklu stosuje się zamiennie ze stopami kobaltu. Nikiel jest metalem wysoce odpornym na korozję i posiada dużą odporność na ścieranie, przez co znalazł zastosowanie w stopach ortodontycznych. Pomimo swoich korzystnych właściwości, druty z dodatkiem niklu mogą być czynnikiem alergizującym [8]. Uczulenie na ten materiał zanotowano u 13% dorosłych, 10% nastolatków i 8% dzieci. Klinicznie alergia na nikiel bardzo często objawia się jako alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (Ni-ACD allergic contact dermatitis to nickel), nieżyt nosa, ale także w postaci zapalenia spojówek, astmy oskrzelowej, wyprysku rozproszonego, oraz pokrzywki współistniejącej [13]. Dlatego przed rozpoczęciem leczenia, lekarz musi się upewnić, czy pacjent nie ma uczulenia na ten pierwiastek.

## **5.1. Stopy niklowo-tytanowe**

Stopy niklowo-tytanowe powstały w latach sześćdziesiątych XX wieku dzięki współpracy NASA, U.S. Navy i Uniwersytetu Iowa. Wykorzystywano go wtedy do komunikacji satelitarnej marynarki wojennej. Stop ten w swoim składzie posiadał 55% niklu, i 45% tytanu. Miał dużo cech dotąd nieznanych, posiadał pamięć kształtu, czyli w niskich temperaturach był dowolnie formowany, a podgrzany wracał do pierwotnego kształtu, przy tym był bardzo elastyczny i nie korodował [4].

Stop niklowo-tytanowy może występować w dwóch rodzajach struktury krystalicznej tj. austenitu- w temperaturach wysokich i martenzytu – w temperaturach niskich. Temperatura przemiany martenzytycznej wynosi od 15 do 60°C. Do przemiany faz, a w konsekwencji zmiany kształtu drutu, wykorzystano ciepło jamy ustnej. Po dowiązaniu do zamków, schłodzony drut ulegał deformacji zgodnie z przebiegiem krzywizny łuku zębowego, następnie pod wpływem ciepła dochodziło do przemiany faz i drut powracał do pierwotnego kształtu korygując przy tym wadę zgryzu. W ortodoncji stop niklowo- tytanowy został wprowadzony 1972r., ulepszenie jego składu doprowadziło do tego że drut posiadał właściwości takie jak: duża sprężystość, wysoka wytrzymałość, ale niestety niska plastyczność i duża kruchość. Łuków nie można dowolnie kształtować i nie nadają się do lutowania.

Nowopowstałe łuki niklowo- tytanowe posiadają dodatkowe cechy tj. superelastyczność i pseudoplastyczność [4]. Pseudoelastyczność definiuje się jako zdolność do przemiany austenitu w martenzyt pod wpływem działającej na łuk siły oraz reakcji odwrotnej, czyli zamiany martenzytu w austenit, po odjęciu działającej siły [4]. Superelastyczność to zdolność materiału do dużych odkształceń przy najmniejszym z możliwych spadków generowanej siły. Cecha ta pozwala do efektywnego dążenia do swojego pierwotnego kształtu [4]. Dzięki tym nowym właściwościom drut można zamocować w jamie ustnej pacjenta bez konieczności wcześniejszej aktywacji, aż do momentu, gdy pozostanie on w pełni pasywny.

## **6. Materiały lutownicze**

Materiały lutownicze są to specjalne stopy służące do trwałego łączenia metali. W ortodoncji lutowie stosuje się do połączenia elementów druczianych (najczęściej są to łuki) z pierścieniami metalowymi. Natomiast w protetyce za pomocą lutowania łączy się klamry z protezą częściową, poszczególne części mostów, czasami lutowie służy jako odbudowa defektów odlewu lub jako odtworzenie punktów styecznych w koronach [2].

Można wyróżnić dwa procesy lutowania. Pierwszy z nich to lutowanie w niskiej temperaturze. Proces ten zachodzi w temperaturze poniżej 425°C.

Drugi natomiast nazywa się lutowaniem twardym i odbywa się on w temperaturze powyżej 425°C. W ortodoncji wykorzystuje się lutowanie twarde. Aby połączyć ze sobą elementy, metal musi być dokładnie oczyszczony. Elementy poddane lutowaniu mocuje się za pomocą papki gipsowej lub mokrego pumeksu do suchego modelu gipsowego. Powierzchnię, która ma być poddana lutowaniu należy wytrawić za pomocą topnika. Zadaniem jego jest oczyszczenie powierzchni i rozpuszczenie warstwy tlenków. Dla stopów ze stali nierdzewnych stosuje się topniki ze związkami fluoru, natomiast dla stopów na bazie złota topnikiem jest zazwyczaj boraks. Topniki stosowane w trakcie lutowania ułatwiają zwilżenie i płynięcie po powierzchni stopów poddanych lutowaniu, występują one zwykle w postaci past, płynów lub proszków i są kompatybilne z łączonym stopem. Po przygotowaniu lutowanej powierzchni całość nagrzewa się do temperatury topnienia lutowia. W praktyce jest to moment, w którym ogrzewany element zaczyna nabierać czerwonej barwy, a przyłożone do niego lutowie nabiera płynnej formy. Ogrzewanie można wykonać za pomocą palnika lub lasera. Stopy lutowia wykorzystywane w ortodoncji powstają na bazie srebra. Dodaje się do nich specjalne składniki, np. cynę, która obniża temperaturę topnienia lutowia polepszając dzięki temu jego płynięcie [2]. Stopy lutownicze muszą mieć odpowiednie właściwości, bez których niemożliwe byłoby połączenie ze sobą poszczególnych części metalowych. Do zalet stopów tych należą:

- duża odporność na korozję;
- dobra płynność i zwilżalność;
- temperatura likwidus musi być niższa od temperatury solidus stopu lutowanego [8].

Lutowanie należy do trudnych zabiegów, dlatego wymaga doświadczenia i wiedzy na temat materiałów lutujących i lutowanych. Jest to zabieg z wykorzystaniem wysokiej temperatury, więc konieczne jest zachowanie szczególnej ostrożności przy wykonywaniu związanych z tym czynności oraz przestrzeganie zasad BHP.

## **7. Badanie wytrzymałości na rozciąganie drutu ortodontycznego**

Druty ortodontyczne wykorzystywane są do wykonywania precyzyjnych części drucianych aparatów ortodontycznych. Druty te można podzielić ze względu na ich grubość, materiał z jakiego są wykonywane, bądź ze względu na ich zastosowanie. W zależności od rodzaju drutu wykonuje się z niego odpowiednie elementy aparatów zdejmowanych. Każdy element druciany pełni określoną funkcję w jamie ustnej pacjenta np. klamry służą do utrzymania aparatu, a sprężyny do wywierania sił przesuujących zęby. Ważny jest odpowiedni wybór drutów do wykonania elementów aparatu, gdyż źle podjęta decyzja może mieć wpływ na niekorzystny wynik leczenia, bądź błędy w wykonawstwie aparatu np. pęknięcie elementów drucianych.

### 7.1. Cel eksperymentu

Celem eksperymentu było wyznaczenie rzeczywistej wytrzymałości na rozciąganie drutów ortodontycznych. Druty ze stali nierdzewnej zostały poddane statycznej próbie rozciągania, co pozwoliło określić wytrzymałość materiału na tego typu obciążenia.

### 7.2. Materiały i metody

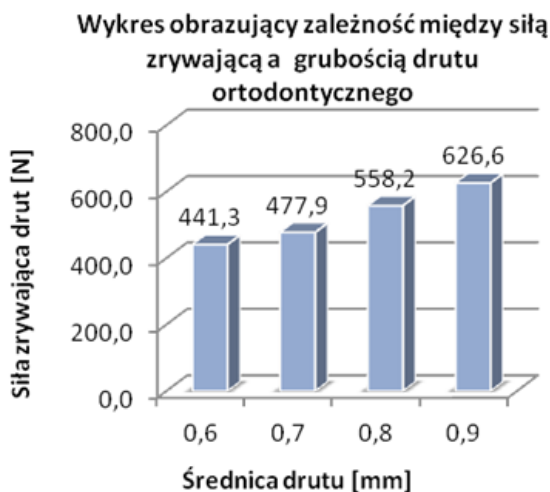
Przedmiotem niniejszych badań były druty ortodontyczne wykonane ze stali nierdzewnej o średnicach: 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 mm. Wyznaczoną liczbę drutów o podanych wyżej grubościach poddano statycznej próbie rozciągania. Druty zamocowano w szczękach maszyny wytrzymałościowej Shimatzu i rozciągano aż do zerwania przy stałej prędkości, bez gwałtownych zmian, które mogły mieć wpływ na wartości wielkości mierzonych (Rys.3).



Rysunek 3. Drut umieszczony w maszynie wytrzymałościowej przed i po zerwaniu.  
Źródło: opracowanie własne

### 7.3. Wyniki badań

W wyniku badań uzyskano graficzną zależność pomiędzy siłą zrywającą a średnicą drutu. Rezultaty badań zostały przedstawione na Rys. 4. Jednoznacznie z nich wynika, że istnieje liniowa zależność pomiędzy wytrzymałością drutu a jego grubością.



Rysunek 4. Wykres przedstawiający wyniki końcowe. Źródło: opracowanie własne

#### 7.4. Wnioski

Z przedstawionych badań wynika, że grubość drutu ortodontycznego ma znaczący wpływ na jego wytrzymałość na rozciąganie. Wraz ze wzrostem grubości drutu zwiększa się jego siła zrywająca. Można więc wywnioskować, że dobór grubości drutu ma decydujący wpływ na jakość wykonanego aparatu ortodontycznego. Elementy, na które będzie wywierane największe obciążenie, to jest klamry i łuki wargowe powinny być wykonywane z drutu 0.8 i 0.9 mm. Pozostałe elementy, które nie są poddawane dużym obciążeniom np. sprężyny, mogą być wykonywane się z drutu 0,6-0,7 mm.

#### Literatura

1. Kordasz P., Wolanek Z. *Materialoznastwo protetyczno-stomatologiczne*, wyd. II poprawione i uzupełnione, Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, (1976),s.135-145
2. Craig R.G., Powers J. M., Wataha J. C. *Dental Materials, Materiały stomatologiczne*, wyd.I polskie pod redakcją Honoraty Limanowskiej-Shaw, Wrocław, Wyd. Medyczne Urban & Partner, s.227-246
3. Freitag M.; *Struktura i właściwości modyfikowanych powierzchni stopów NiTi*; Uniwersytet Śląski Wydział Informatyki i Nauki o Materiałach Instytut Nauki o Materiałach.,Katowice, praca doktorska, 2012, s. 15-52
4. Komorowska A. *Materiały i techniki ortodontyczne*, wyd. I, Lublin, wyd. Polskie Towarzystwo Ortodontyczne., (2009), s.61-74
5. Bodnar A. *Wytrzymałość materiałów*, wyd. I, Politechnika Krakowska., Kraków 2004, s. 15-40

6. Kusy R.P. *A review of contemporary archwires : Their properties and characteristics*; The Angle Orthodontist., (1997), s. 197-208
7. Świerczyńska-Machura D., Kieć-Świerczyńska M., Kręcisz B., Pałczyński C. *Alergia na składowe implantów, Allegy to components of implants*, Klinika i przychodnia chorób zawodowych Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi., 9 (2004), s.128-132
8. Surowska B. *Biomateriały metalowe oraz połączenia metal- ceramika w zastosowaniach stomatologicznych*, Lublin, Politechnika Lubelska, Wydawnictwo Uczelniane., 2009, s. 15-47
9. Kaminski M., Baszkiewicz J., Kozubowski J., Bednarska A., Barcz A., Gawlik G., Jagielski J. *Effect of silicon ion implantation on the properties of a cast Co-Cr-Mo alloy*, Journal of Materials Science., 32(1997), s. 3727
10. Wojnar L. *Porosity structure and mechanical properties of vitalium-type alloy for implants*, Materials Characterization., 46(2001), s. 221
11. Bojar Z. *Morfologia dendrytów i segregacja dendrytyczna w odlewniczym stopie Co-Cr-Mo-C* ; Solidification of Metals and Alloys Krzepnięcie Metali i Stopów PL ISSN 0208 -9386, s.22-30
12. Brantley A. W., Eliades T. *Materiały ortodontyczne w ujęciu naukowym i klinicznym*, , wyd. I, Lublin, wydawnictwo Czelej, 2003, s.95
13. Czarnobilska E., Obtulowicz K., Wsołek K., Piętowska J., Śpiewak R. *Mechanizmy alergii na nikiel*, Przegląd Lekarski., 64(2007), s.7-8

## Stopy metali używane w ortodoncji

### Streszczenie

Przedstawiona praca dotyczy zastosowania różnych rodzajów stopów ortodontycznych, które zwykle wykorzystuje się do produkcji drutów, zamków lub łuków ortodontycznych. Druty ortodontyczne produkowane są z różnych materiałów, zazwyczaj jest to stal nierdzewna, ale równie popularne są stopy kobaltu i niklu. Materiały wykorzystywane do produkcji drutów mają określone właściwości mechaniczne takie jak: odkształcenie, sprężystość, wytrzymałość, elastyczność bądź sztywność. Cechy te są ze sobą ściśle powiązane, dlatego ważne jest odpowiednie dobranie drutu dla danego elementu. W powyższej pracy zostały opisane poszczególne rodzaje stopów oraz przedstawiono możliwości ich wykorzystania w ortodoncji. Następnie przedstawiono wyniki badań własnych dotyczących wpływu grubości drutu na jego wytrzymałość w statycznej próbie rozciągania.

Słowa kluczowe: stopy ortodontyczne, aparaty ortodontyczne, wytrzymałość

## Metal alloys used in orthodontics.

### Abstract

The paper concerns the usage of different kinds of orthodontic alloys. Usually they are used to make wires, brackets or orthodontic arches. Orthodontic wires are made from different materials, usually it is stainless steel but cobalt and nickel alloys are also popular. Materials used to produce wires have specific mechanical features such as: distortion, resilience, flexibility or rigidity. These features are closely connected with each other, so it is very important to adjust the wire properly to the specified element. The paper provides the description of different kinds of alloys used in orthodontics. Next, the results of static tension test are presented where an influence of wire diameter on their strength is discussed.

Keywords: orthodontic alloys, braces, wires; wire strength

# **Skutki uboczne materiałów stosowanych we współczesnej protetyce stomatologicznej na przykładzie materiałów odbudowujących i środków do wybielania zębów**

## **1. Wprowadzenie**

Pomimo, iż protetyka stomatologiczna jest prężnie rozwijającą się dziedziną, bardzo wiele stosowanych obecnie rozwiązań i materiałów wykazuje liczne skutki uboczne. Jest to szczególnie widoczne w procedurach refundowanych przez Narodowy Fundusz Zdrowia, gdzie czynnikiem decydującym o zastosowaniu danego materiału jest czynnik ekonomiczny. Problem działań niepożądanych wywołanych obecnością obcych materiałów w środowisku jamy ustnej jest zagadnieniem często pomijanym. Biokompatybilność materiałów stosowanych w stomatologii powinna być celem nadrzędnym w myśl zasady „Primum non nocere”.

### **1.1. Zadania protetyki stomatologicznej**

Precyzyjne określenie terminu protetyki stomatologicznej oraz zakresu jej działalności nie jest zadaniem łatwym. Protetyka stomatologiczna jest gałęzią stomatologii zajmującą się czynnościową i estetyczną odbudową narządu żucia przez zastąpienie utraconych narządów i tkanek materiałami odtwórczymi. Swoim obszarem obejmuje zarówno wykonawstwo kliniczne, jak i laboratoryjne łącząc pracę lekarzy stomatologów i techników dentystycznych w jeden zespół leczenia protetycznego.

Wigdorowicz- Makowerowa określa cele współczesnej protetyki jako "przywrócenie uszkodzonych lub utraconych funkcji narządu żucia, eliminowanie parafunkcji przy jednoczesnym zapobieganiu schorzeniom

---

<sup>1</sup> aleksandra\_stefanowicz@o2.pl, Koło Naukowe Ekonomia w Medycynie, Katedra i Zakład Ekonomii Zdrowia, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>2</sup> belaiza92@o2.pl, Koło Naukowe Ekonomia w Medycynie, Katedra i Zakład Ekonomii Zdrowia, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>3</sup> tomasz\_wandtke@wp.pl, Koło Naukowe Ekonomia w Medycynie, Katedra i Zakład Ekonomii Zdrowia, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy



podłoża protetycznego". Majewski natomiast precyzuje główne zadania protetyki następująco: "rehabilitacja przez morfologiczną rekonstrukcję tkanek utraconych z równoczesnym przywróceniem uszkodzonych funkcji żucia i artykulacji dźwięków, poprawa estetyki twarzy, profilaktyka w odniesieniu do tkanek układu stomatologicznego". Działania te obejmują sporą część populacji, nie tylko ludzi dorosłych, a protetyka dziecięca staje przed coraz to nowszymi wyzwaniami. Ujmując temat nieco krócej: w zasięgu działań protetyki stomatologicznej jest profilaktyka, leczenie oraz rehabilitacja [1].

Aby harmonijnie wkomponować uzupełnienie protetyczne do układu stomatognatycznego, należy je precyzyjnie zaprojektować uwzględniając wiele czynników podłoża: jakość pola śluzówkowego i kostnego, liczbę oraz rozmieszczenie zębów własnych pacjenta, jeśli takowe występują, stopień ich osadzenia w zębodole lub rozchwiania. Należy unikać zaburzeń zgryzowo- zwarciovych, aby nie obciążać stawu skroniowo-żuchwowego. Po ocenie warunków anatomicznych danego pacjenta można przystąpić do projektowania poszczególnych elementów danego uzupełnienia i doboru materiału, z którego zostanie ono wykonane.

## **1.2. Rodzaje materiałów stomatologicznych**

Istnieje wiele podziałów materiałów stomatologicznych używanych w protetyce. Najbardziej podstawowym kryterium podziału jest pogrupowanie materiałów na podstawowe oraz pomocnicze.

Materiały podstawowe, czyli takie, z których wykonane jest ostateczne uzupełnienie. Po odpowiednim przygotowaniu pozostają w stałym kontakcie z tkankami jamy ustnej. To one najczęściej niosą ze sobą niepożądane skutki uboczne. Materiałami pomocniczymi natomiast nazywamy te, które są używane podczas procedur laboratoryjnych tylko na pewnych etapach wykonawstwa, a nie są efektem finalnym. Ich kontakt z jamą ustną pacjenta jest krótkotrwały, albo nie występuje wcale, ponieważ używa się ich tylko w laboratorium dentystycznym. Zarówno materiały podstawowe, jak i pomocnicze możemy pogrupować według specjalności stomatologicznej, w której znajdują zastosowanie:

- I. Materiały stosowane w stomatologii zachowawczej i dziecięcej
- II. Materiały stosowane w protetyce stomatologicznej i ortodoncji
- III. Materiały stosowane w chirurgii stomatologicznej i periodontologii

Ze względu na temat pracy omówione zostaną głównie materiały stosowane w protetyce stomatologicznej. Umieszczono je w jednej grupie z materiałami używanymi w ortodoncji z racji na podobne procedury laboratoryjne wykonawstwa protez i aparatów ortodontycznych [2].

A. Materiały podstawowe:

- Masy akrylowe (akrylanowe);
- Metale i stopy metali;
- Tworzywa ceramiczne (porcelanowe);
- Klamry i druty ortodontyczne.

B. Materiały pomocnicze:

- Masy wyciskowe:
  - ✓ Alginatowe,
  - ✓ Agarowe,
  - ✓ Silikonowe,
  - ✓ Polisiłoksanowe,
  - ✓ Polisulfidowe,
  - ✓ Polieterowe,
  - ✓ cynkowo-eugenolowe,
- Gipsy;
- Materiały izolacyjne;
- Woski laboratoryjne;
- Masy ogniotrwałe.

Dokonując podziału materiałów stosowanych w stomatologii odtwórczej, czyli takiej która stawia sobie za zadanie odtwarzanie budowy i funkcji utraconych tkanek zębowych, oprócz wyżej wymienionych należy także uwzględnić amalgamaty używane do wypełnień trwałych.

### 1.3. Kryteria doboru materiału stomatologicznego

Każdy z zastosowanych materiałów musi spełniać określone kryteria. Najważniejszym z nich jest brak działania toksycznego na tkanki, z którymi pozostaje w trwałym kontakcie. Nie może drażnić zmysłu smaku i powonienia, powodować zmian w ustroju pacjenta. Ważnym czynnikiem jest również odporność na działanie środowiska jamy ustnej. Spełnienie wyżej wymienionych warunków można nazwać biokompatybilnością.

Niestety nie zawsze przy doborze materiału celem nadrzędnym jest brak toksyczności. Często decydującym okazuje się czynnik ekonomiczny. Jest to szczególnie widoczne w procedurach refundowanych przez Narodowy Fundusz Zdrowia, gdzie finansowane są tylko rozwiązania najtańsze. Za nowsze technologie i bardziej biogodne materiały pacjent musi płacić sam.

W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się również ogromny rozwój stomatologii estetycznej. Estetyka jest często najważniejszym aspektem dla pacjentów, celem całkowicie nadrzędnym. Rolą lekarza protetyka powinno być wyważenie wszystkich trzech czynników: biokompatybilności, efektu estetycznego i czynnika ekonomicznego, a na szczycie powinno się znajdować zdrowie i dobro pacjenta. Jest to niezmiernie ważne przy

dobrze materiału, z którego zostanie wykonana proteza zębowa, aby zminimalizować skutki uboczne użytkowania uzupełnień protetycznych.

## **2. Cel pracy**

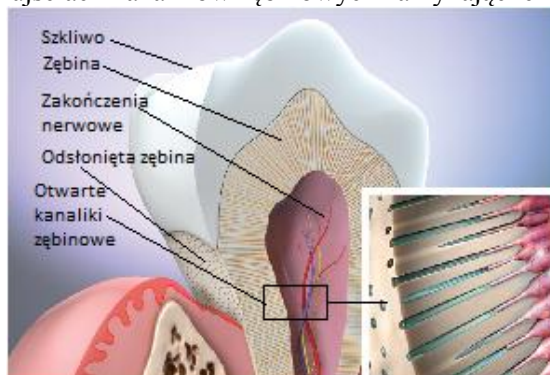
Zwrócenie uwagi na problematykę negatywnego wpływu materiałów stosowanych w stomatologii na zdrowie człowieka w oparciu o przegląd literatury naukowej.

## **3. Przykłady działań niepożądanych**

Nie każde rozwiązanie protetyczne niesie dla pacjenta same korzyści. Za licznymi zaletami stosowanych materiałów kryje się również szereg wad. Przykładami efektów niekorzystnych po zastosowaniu różnego rodzaju materiałów stomatologicznych mogą być: zapalenia miazgi wywołane mikroprzeciekami lub działaniem kwasów wytrawiających szkliwo/zębinę; tworzenie się mikroogniw galwanicznych w środowisku jamy ustnej przy uzupełnieniach metalowych i amalgamatowych, alergie na stopy dentystyczne np. nikiel, podrażnienia wywołane przewodnictwem termicznym stopów metali, uwalnianie resztkowego monomeru z płyt protez akrylowych oraz nadwrażliwość zębów po zastosowaniu środków wybielających.

### **3.1. Zapalenia miazgi**

Miazga jest najbardziej wewnętrzną częścią zęba. W jej skład wchodzi naczynia krwionośne, nerwy oraz tkanka łączna. Podczas opracowywania ubytku przez dentystę przy pomocy instrumentów takich jak wiertła zostaje naruszona uwapniona macierz zębin. Na powierzchni tworzy się tzw. warstwa mazista, czyli fragmenty organicznych i nieorganicznych pozostałości po procedurze usuwania naruszonych tkanek zęba. Gromadzi się ona również w ujściach kanalików zębinowych zamykając ich światło [3].



Rys. 1. Budowa zęba – przekrój; źródło: <http://www.dentine.pl>

Pogarsza to połączenie między powierzchnią ubytku, a materiałem odbudowującym. Warstwę mazistą, której grubość wynosi ok 1-2 mikrometra można usunąć przez wytrawianie kwasem. Używa się do tego celu różnych kwasów: fosforowego, cytrynowego, solnego oraz mlekowego w stosownych stężeniach. Przynosi to korzystne rezultaty z punktu widzenia połączenia tkanek naturalnych z materiałem odtwórczym, zwiększa siłę wiązania. Mając jednak na uwadze problem biokompatybilności kwasy wytrawiające mają działanie cytotoksyczne. Mogą one dyfundować przez kanaliki zębinowe do poziomu miazgi wywołując zapalenia. Wpływ kwasów na miazgę zależy w znacznym stopniu od grubości zębiny pozostawionej przez lekarza po opracowaniu. Minimalna dopuszczalna grubość warstwy zębinowej pomiędzy wypełnieniem, a miazgą wynosi 0,5mm. Taka warstwa jest wskazywana w piśmiennictwie jako wystarczająca [3]. Jeśli natomiast toksyczne substancje przedostaną się przez warstwę zębiny, w pierwszym stadium powodują ogniskową martwicę odontoblastów i miazgowej tkanki łącznej. Następnie, przy dłuższej ekspozycji na szkodliwy czynnik może rozwinąć się bardziej rozległe zapalenie miazgi. Odpowiedź taka może ustąpić samorzutnie w wypadku gdy zostanie przerwane narażenie na czynnik drażniący lub gdy zostaną zamknięte kanaliki zębinowe. Zębina koronowa wykazuje większą przepuszczalność, niż zębina korzeniowa.

Oprócz czynników chemicznych, jakimi są kwasy wytrawiające, również toksyczne produkty bakteryjne są niezwykle groźne dla miazgi zęba. Ich transfer do tkanek wewnętrznych może być spowodowany mikroprzeciekami brzeżnym, czyli niewystarczająco dokładnym przyleganiem materiału odbudowującego. Pomiędzy wypełnienie, a ząb mogą dostawać się resztki pokarmowe oraz ślina, co sprzyja rozwojowi bakterii. Szczególnie toksyczne są produkty ich metabolizmu, które mogą wywoływać podobne reakcje miazgi, jak opisane powyżej.

### **3.2. Tworzenie mikroogniw galwanicznych**

Metale odgrywają istotną rolę we współczesnym materiałoznawstwie dentystycznym. Nie są jednak używane w formie czystej, lecz w postaci stopów, gdyż w takiej formie posiadają dużo lepsze właściwości [4].

Amalgamaty stanowią materiał podstawowy stosowany w stomatologii zachowawczej do wypełnień ubytków zębów przedtrzonowych i trzonowych. Nie stosuje się ich w odcinku przednim łuku zębowego ze względu na ich brak podobieństwa do naturalnych tkanek, a co za tym idzie niewystarczające walory estetyczne. Ich polska nazwa to ortecia, są fizykochemicznym połączeniem rtęci z metalami lub ze stopami metali. Amalgamat klasyczny, zwany też tradycyjnym lub niskomiedziowym składa się z 68,5% srebra, 25,5% cyny, 5% miedzi i 1% cynku. Za

niekorzystne cechy amalgamatów odpowiedzialna jest faza gamma. Aby ją zredukować wprowadzono stopy o podwyższonej zawartości miedzi (do 30%). Zawartość srebra natomiast zredukowano nawet do 40%. Amalgamaty wysokomiedziowe charakteryzują się dużo korzystniejszymi właściwościami, niż konwencjonalne: lepszym przyleganiem brzeżnym, większą odpornością na korozję [5]. Przy uzupełnieniach amalgamatowych również możemy zaobserwować zjawisko mikroprzecieku. Aby temu zapobiec rekomendowane jest stosowanie dużego rozdrobnienia proszku stopowego. Zawartość cynku natomiast ma wpływ na rozszerzalność wypełnienia. Takie zjawisko może powodować wywieranie ciśnienia na ściany ubytku, a co za tym idzie dolegliwości bólowe i działanie destrukcyjne na powierzchnię zęba.

W przypadku wszystkich uzupełnień metalowych, w tym również amalgamatów ich biogodność jest determinowana przez produkty korozji uwalniane w trakcie użytkowania.

Korozja jest to chemiczny lub elektrochemiczny proces niszczenia metali rozpoczynający się na ich powierzchni. Może wystąpić w jamie ustnej przy równoczesnym zastosowaniu dwóch metali o różnych potencjałach elektrochemicznych. Dochodzi wówczas do powstania ogniwa galwanicznego, którego obwód zamyka ślina będąca elektrolitem. Wysokość napięcia tego źródła prądu zależy od różnicy potencjałów występującej między dwoma metalami, stanowią one wówczas elektrody. Metal o niższym potencjale (bardziej aktywny) stanowi anodę, natomiast metal o wyższym potencjale katodę. Stop mniej szlachetny ulega korozji uwalniając swoje jony do roztworu śliny. Możliwe jest również występowanie ogniwa galwanicznego w obrębie jednego stopu, jeśli charakteryzuje się on niejednorodną strukturą [6].

Skutkiem korozji i tworzenia ogniw galwanicznych może być metaliczny posmak oraz dolegliwości bólowe związane z przepływem prądu. Mimo iż wartości napięcia są niewielkie, to zdarzają się pacjenci odczuwający dyskomfort – zależy to od indywidualnych predyspozycji i wrażliwości osobniczej.

### **3.3. Alergie na stopy dentystyczne**

Skutkiem opisanej wyżej korozji mogą być również alergie. Metale będące materiałami podstawowymi mogą powodować reakcje nadwrażliwości opóźnionej, inaczej alergii kontaktowej, czyli stanu zapalnego skóry lub błony śluzowej. Dzieje się tak na skutek aktywacji przez alergen swoistej komórkowej odpowiedzi immunologicznej organizmu [7]. Alergia kontaktowa jest efektem przewlekłego narażenia śluzówki jamy ustnej (języka, policzków, warg) na bezpośredni kontakt z materiałem obcym. W zależności od nasilenia stanu zapalnego można obserwować zwykle asymetryczne, białe

przebarwienia w miejscu styczności materiału dentystycznego ze śluzówką. Bardziej nasilone zmiany mają charakter zmian nadżerkowych (zaczerwieniona śluzówka) lub głębszych zmian wrzodziejących (ubytki śluzówki, odsłaniające kolejne warstwy tkanek) i powodują dyskomfort w jamie ustnej, pieczenie, ból oraz miejscowy stan zapalny [8]. Najbardziej alergizującymi metalami są nikiel, kobalt, pallad i rtęć. Kontaktową reakcję alergiczną na metale dentystyczne potwierdzono dodatnim wynikiem testów płatkowych u ok. 7–70% pacjentów, u których podejrzewano taką alergię [9]. U bardzo niewielkiej liczby pacjentów zanotowano także bardziej poważne powikłania zdrowotne, w tym reakcje ogólne organizmu, a nawet zagrożający życiu wstrząs anafilaktyczny [10, 11].

### **3.4. Uwalnianie resztkowego monomeru**

U pacjentów z całkowitymi lub cząstkowymi brakami uzębienia często stosowane są całkowite lub częściowe protezy akrylowe.

Masy akrylowe są to wielkocząsteczkowe, organiczne tworzywa sztuczne składające się z estru metylowego kwasu metakrylowego, czyli metakrylanu metylu o wzorze  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ . Już w temperaturze  $65^\circ\text{C}$  oraz pod wpływem światła pojedyncze mery metakrylanu ulegają samorzutnej polimeryzacji tworząc strukturę łańcuchową. W wyniku tego procesu powstaje przejrzyste ciało stałe, czyli polimetakrylan metylu.

Tworzywo polimerowe stosowane w stomatologii składa się z proszku i płynu. Po zmieszaniu tych dwóch komponentów otrzymujemy ciasto akrylowe dające się łatwo formować. Płyn zwany monomerem oprócz metakrylanu metylu zawiera różnego rodzaju dodatki, które mają na celu uzyskanie wymaganych cech fizycznych spolimeryzowanego tworzywa np. octan winylu, styren, ftalan dibutyli, aceton i inne. Powinien być on przechowywany w ciemnych butelkach z racji na samoistny przebieg reakcji polimeryzacji w sytuacji dostępu światła. Aby zminimalizować to zjawisko do płynu dodawane są odpowiednie inhibitory hamujące ten proces np. parahydrochinon. Proszek natomiast jest kopolimerem składającym się z krótkich łańcuchów cząsteczek monomeru. W swoim składzie też zawiera liczne dodatki tj. barwniki, substancje wypełniające i plastyfikatory, ponieważ czyste tworzywo akrylowe jest przezroczyste i bezbarwne. Aby zbliżyć się wizualnie to tkanek jamy ustnej dodawany jest m.in. tlenek cynku, który czyni masę nieprzezroczystą. Najważniejszym jednak dodatkiem do proszku są substancje zapoczątkowujące reakcję polimeryzacji, które swoim działaniem mają zneutralizować inhibitory zawarte w płynie. Są to substancje utleniające nazwane katalizatorami np. nadtlenek benzoilu [12].

Przygotowanie masy akrylowej polega na zmieszaniu proszku z płynem w ilościach ściśle określonych przez producenta. W przybliżeniu stosunek wagowy proszku do płynu wynosi 1:1 lub 1:2. Po spolimeryzowaniu tworzywo akrylowe jest ciałem stałym o twardości 2-3 w skali Mohsa [13].

Płyn monomerowy jest substancją silnie cytotoksyczną, może powodować odczyny uczuleniowe o charakterze miejscowym. Zmiany tkankowe występują w wyniku kontaktu bezpośredniego. Dlatego niezwykle ważne jest, aby właściwie przeprowadzać proces polimeryzacji doprowadzając do całkowitego przereagowania monomeru. Wówczas w powierzchni tworzywa nie pozostaje monomer resztkowy, który może mieć działanie drażniące błony śluzowe. Monomerem resztkowym nazywamy wolny monomer znajdujący się w tworzywie, który nie uległ spolimeryzowaniu. Ma on równie silne działanie cytotoksyczne, jak monomer w czystej postaci przed procesem polimeryzacji. Aby temu zapobiec niezwykle ważne jest dopełnienie warunków właściwej temperatury i czasu przeprowadzania procesu. Puzkę polimeryzacyjną umieszcza się w wodzie, którą ogrzewa się wolno do temp. 65°C, którą należy utrzymać przez 30-60 minut. Następnie podnosi się temp. do 100°C i utrzymuje na tym poziomie przynajmniej przez 30 minut. Stopniowe podnoszenie temperatury ma na celu niedopuszczenie do przekroczenia punktu wrzenia płynu monomerowego. (100,3°C) Dotrzymanie takiej procedury pozwala zminimalizować ryzyko uwalniania się resztkowego monomeru z gotowej płyty protezy [2].

### **3.5. Nadwrażliwość zębów po zastosowaniu środków wybielających**

Środki do wybielania zębów są stosowane zarówno do zębów żywych, jak i martwych. Ze względu na dużą wagę, jaką przywiązuje się obecnie do estetyki, w ostatnim czasie procedury wybielające są wykonywane coraz częściej. Głównie do tego celu używa się różnego rodzaju nadtlenków – m.in. nadtlenku wodoru oraz nadtlenku mocznika w postaci żelu. Może być on aplikowany przez pacjenta samodzielnie w domu lub przez lekarza dentystę w gabinecie stomatologicznym. Preparaty te różnią się między sobą stężeniem nadtlenków oraz czasem, w którym powinny pozostawać w kontakcie z zębami. Istnieją preparaty, które aplikuje się na kilka minut lub takie, które nakłada się na kilka godzin. Badania *in vitro* wykazały, że nadtlenki mogą w ciągu kilku minut dyfundować przez zębinę w wystarczającym stopniu, aby były cytotoksyczne. Zależy to głównie od stężenia nadtlenku w środku wybielającym oraz od czasu ekspozycji [3].

Większość doniesień jest zgodna, że długoterminowe stosowanie tych produktów na żywe zęby powoduje występowanie nadwrażliwości zębów.

Preparaty te mogą też chemicznie oparzyć dziąsła, szczególnie jeśli mamy do czynienia z nierównomiernym rozproszaniem środka na łyżce [14].

#### 4. Wnioski

Wiele używanych materiałów stomatologicznych ma niekorzystny wpływ na jamę ustną pacjenta. Często niewłaściwym celem nadrzędnym podczas doboru materiału, z którego wykonujemy uzupełnienie jest estetyka lub czynnik ekonomiczny. Biokompatybilność zależy od składu materiału, jego lokalizacji oraz interakcji z tkankami jamy ustnej. Elementy z metalu, ceramiki, czy polimeru wywołują odmienne odpowiedzi biologiczne ze względu na różny skład i zróżnicowaną zdolność do uwalniania swoich cytotoksycznych komponentów. Bardzo ważną rolę odgrywa również właściwie wykonana procedura laboratoryjna. Należy badać biokompatybilność materiałów, ich wpływ na zdrowie pacjenta oraz dobierać je właściwie do miejsca i rodzaju uzupełnienia, aby zminimalizować dolegliwości związane z uzupełnieniami stomatologicznymi i zwiększyć komfort ich użytkowania.

#### Literatura

1. Spiechowicz E. *Protetyka Stomatologiczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wydanie VI, Warszawa 2006, s. 15-16
2. Pietrzyk M., Groszewska J., Grygiel R., Skomro P. *Materiałoznawstwo w propedeutyce stomatologii*, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 1998, s. 9, 61
3. Craig R.G., Powers J.M. *Materiały stomatologiczne* [tł. z jęz. ang. E. Andrzejewska], Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2008, s. 97, 118-119
4. Kordasz P., Wolanek Z. *Materiałoznawstwo protetyczno- stomatologiczne* Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1980, s.102-113
5. *Materiały lecznictwa stomatologicznego* pod redakcją K. Stawińskiego Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1985, s.40-54
6. Wójciak L. *Zagadnienie wpływu ogniów galwanicznych powstałych w jamie ustnej na tkanki otaczające i odległe w badaniach doświadczalnych in vivo na psach* Wydawnictwo Uczelniane Akademii Medycznej, 1967
7. Boushell L.W., Padilla R.J.: *Featured topic: contact allergy to dental fillings*. Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 21 (2009) s. 355-6
8. Thornhill M.H., Pemberton M.N., Simmons R.K., Theaker E.D.: *Amalgam-contact hypersensitivity lesions and oral lichen planus*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics, 95 (2003) s. 291-9
9. Raap U., Stiesch M., Reh H.i wsp.: *Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients*. Contact Dermatitis, 60 (2009) s. 339-43



10. Vamnes J.S., Lygre G.B., Gronningsaeter A.G., Gjerdet N.R.: *Four years of clinical experience with an adverse reaction unit for dental biomaterials*. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 32 (2004) s. 150-7
11. Mallo Perez L., Diaz Donado C.: *Intraoral contact allergy to materials used in dental practice. A critical review*. Med. Oral, 8 (2003) s. 334-47
12. *Materiałoznawstwo protetyczne* pod redakcją dr hab. n. med. M. Gołębiewskiej, Akademia Medyczna w Białymstoku, 2003, s. 57-9
13. Pasenkiewicz W. *Przewodnik do ćwiczeń z materiałoznawstwa stomatologicznego*, Akademia Medyczna im. M. Kopernika, 1989
14. Wagner L., Małkiewicz K. *Wybielanie zębów żywych*, Med Tour Press International, 2006

### **Skutki uboczne materiałów stosowanych we współczesnej protetyce stomatologicznej na przykładzie materiałów odbudowujących i środków do wybielania zębów**

#### **Streszczenie**

Pomimo, iż protetyka stomatologiczna jest prężnie rozwijającą się dziedziną, bardzo wiele stosowanych obecnie rozwiązań i materiałów wykazuje liczne skutki uboczne. Biokompatybilność materiałów stosowanych w stomatologii powinna być celem nadrzędnym w myśl zasady „Primum non nocere”.

**Cel:** Zwrócenie uwagi na problematykę negatywnego wpływu materiałów stosowanych w stomatologii na zdrowie człowieka w oparciu o przegląd literatury naukowej.

**Wyniki:** Przykładami efektów niekorzystnych po zastosowaniu różnego rodzaju materiałów stomatologicznych mogą być: zapalenia miazgi wywołane mikroprzeciekami lub działaniem kwasów wytrawiających szkliwo/zębinę; alergie na stopy dentystyczne np. nikiel, podrażnienia wywołane przewodnictwem termicznym stopów metali, uwalnianie resztkowego monomeru z płyt protez akrylowych, nadwrażliwość zębów po zastosowaniu środków wybielających oraz tworzenie się mikroogniw galwanicznych w środowisku jamy ustnej przy uzupełnieniach amalgamatowych. **Wnioski:** Wiele używanych materiałów stomatologicznych ma niekorzystny wpływ na jamę ustną pacjenta. Biokompatybilność zależy od składu materiału, jego lokalizacji oraz interakcji z tkankami jamy ustnej. Elementy z metalu, ceramiki, czy polimeru wywołują odmienne odpowiedzi biologiczne ze względu na różny skład i zróżnicowaną zdolność do uwalniania swoich cytotoksycznych komponentów. Należy badać biokompatybilność materiałów, ich wpływ na zdrowie pacjenta oraz dobierać je właściwie do miejsca i rodzaju uzupełnienia, aby zminimalizować dolegliwości związane z uzupełnieniami stomatologicznymi i zwiększyć komfort ich użytkowania.

Słowa kluczowe: materiały stomatologiczne, biokompatybilność, protetyka stomatologiczna

## **Side effects of dental materials used in modern prosthodontics on the example of recovering materials and teeth bleaching agents**

### **Abstract**

Although, prosthodontics is very fast growing field, many up-to-date solutions and materials customarily used in dentistry exhibit many side effects. Biocompatibility of materials used in prosthodontics should be the most important goal according to the rule "Primum non nocere". **Aim:** To draw attention to the problem of harmful health effects of using dental materials based on the scientific literature review. **Results:** Examples of side effects after application of different types of materials could be: pulpitis caused by microleakages or the acids pickling of enamel or dentine, allergies to dental alloys e.g. nickel, irritation caused by thermal conductivity of metal alloys, release of residual monomer from surfaces of acrylic dentures, oversensitivity of teeth after applying bleaching agents, formation of galvanic microcells in the oral cavity because of amalgam restorations. **Conclusions:** Many dental materials have a negative impact on patient's oral cavity. Biocompatibility depends on the material composition, location and interaction with oral cavity tissues. The elements of metal, ceramic or polymer elicit different biological responses due to the different composition and different release of their cytotoxic components. There is a clear need to investigate the biocompatibility of dental materials, their impact on the health of the patient to fit them properly to the location in oral cavity and type of restoration in order to minimize the side effects associated with dental restorations and increase its comfortable use.

**Keywords:** dental materials, biocompatibility, prosthodontics

## **Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej**

### **1. Wstęp**

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój inżynierii tkankowej jako nowoczesnej dziedziny nauki. Stanowi ona nową, interdyscyplinarną gałąź medycyny regeneracyjnej, która łączy wiedzę z zakresu nauk przyrodniczych oraz nowoczesnych technologii biomateriałów. Jednym z głównych, a zarazem najnowszych zagadnień tej dziedziny są skafoldy (ang. *Scaffolds* – rusztowania). Są to mikroporowate struktury charakteryzujące się wysoce rozwiniętą, trójwymiarową budową przestrzenną. W tej unikatowej, przestrzennej strukturze mogą być prowadzone hodowle tkankowe, przez umieszczanie komórek w porowatej sieci. Ten sposób prowadzenia hodowli znacznie lepiej odzwierciedla warunki panujące w organizmie, w porównaniu do tradycyjnych kultur dwuwymiarowych, prowadzonych w zwykłych podłożach mikrobiologicznych. Z tego względu skafoldy mogą być z powodzeniem stosowane jako implanty zawierające komórki startowe, służące do regeneracji uszkodzonych tkanek [1].

### **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu literaturowego dotyczącego trójwymiarowych rusztowań do hodowli komórkowych, ich zastosowania w inżynierii tkankowej oraz stosowanych do ich wytwarzania materiałów.

### **3. Inżynieria tkankowa**

Uszkodzenia tkanek są poważnym problemem dotyczącym wielu ludzi w różnym wieku. Mogą być spowodowane wieloma czynnikami tj. urazy, zmiany zwyrodnieniowe czy choroby zapaalne. Niektóre tkanki tj. np. tkanka chrzęstna ze względu na to, że jest słabo unaczyniona, wykazuje bardzo

---

<sup>1</sup>akruk@ch.pw.edu.pl, Laboratorium Procesów Technologicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

<sup>2</sup>agadomska@ch.pw.edu.pl, Laboratorium Procesów Technologicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

<sup>3</sup>pawel.ruskowski@ch.pw.edu.pl, Laboratorium Procesów Technologicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

słabe zdolności autoregeneracyjne [2]. Z tej przyczyny uszkodzenia takich tkanek wymagają interwencji medycznej. Leczenie uszkodzonej tkanki może być prowadzone farmakologicznie, poprzez zastąpienie uszkodzonego fragmentu protezą lub transplantologicznie. Terapia farmakologiczna nie prowadzi do regeneracji uszkodzonej tkanki. Jedynie może być prowadzona w bardzo wczesnych stadiach uszkodzenia, w przypadku gdy jest ono spowodowane stanem zapalnym. Z kolei protezy nigdy nie zastąpią naturalnej tkanki, ponieważ nie integrują się z organizmem. Transplantacje są bardzo skomplikowane do przeprowadzenia, a także niosą ryzyko odrzucenia przeszczepu oraz powikłań (infekcje). Z tych względów poszukiwano nowych, alternatywnych metod, pozwalających na regenerację uszkodzonych tkanek, które pozwolą wyeliminować powyższe problemy [3,4].

Inżynieria tkankowa zakłada, że do prawidłowego przebiegu regeneracji tkanki konieczne są trzy, ściśle związane ze sobą elementy. Pierwszym z nich jest rusztowanie, stanowiące miejsce przyczepu komórek, które zapewni im określone warunki przestrzenne, niezbędne do prawidłowego ich wzrostu. Drugim elementem są komórki, które po zaszczepieniu na rusztowaniu namnożą się, a następnie zintegrują się z komórkami uszkodzonej tkanki. Trzecim elementem są czynniki wzrostu tj. witaminy, aminokwasy, cukry czy hormony, które jako substancje odżywcze umożliwią komórkom prawidłowe funkcjonowanie i wzrost [4, 5].

#### **4. Hodowle tkankowe**

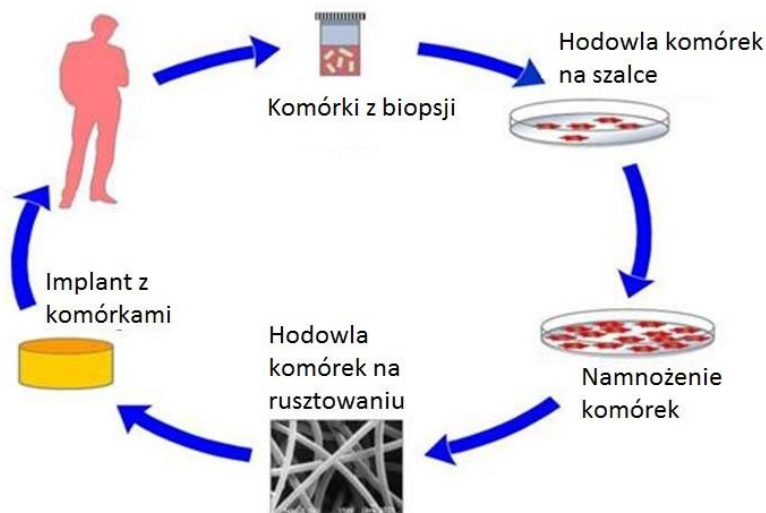
Przez wiele lat tradycyjne badania *in vitro*, dotyczące komórek prowadzono wykorzystując modele dwuwymiarowe. Kultury komórkowe były hodowane w podłożach mikrobiologicznych umieszczonych na płytkach, szlakach Petriego czy też w podłożu płynnym. Jednak w ostatnich latach zakwestionowano słuszność tych badań, ze względu na to, że warunki te znacznie odbiegają od tych, które naturalnie występują w organizmie (brak podobieństwa do natywnej macierzy międzykomórkowej). Przede wszystkim w modelach tych nie ma trójwymiarowej sieci połączeń, w której to komórki wzajemnie między sobą komunikują się. Interakcje te dotyczą zarówno komórek w obrębie jednej tkanki, ale także innych znajdujących się w ich otoczeniu. Ponadto wykazano, że kultury wyhodowane w modelach 2D mają zmieniony wzrost, metabolizm i ekspresję genów, w porównaniu do komórek wyhodowanych naturalnie. Na tej podstawie stwierdzono, że tkankę należy traktować jako skomplikowaną, trójwymiarową sieć połączeń, w której to kluczowym elementem jest struktura przestrzenna. Z tych przyczyn rozpoczęto poszukiwania rozwiązań, które pozwoliły by jak najlepiej odtworzyć naturalne środowisko panujące w tkance, co znacznie podniosło by rzetelność badań *in vitro i ex vivo* [6,7].

Prowadzenie hodowli 3D można wykonać na dwa sposoby. Pierwszy z nich do wytworzenia trójwymiarowej kultury wykorzystuje rusztowania wykonane z biomateriałów. W drugim podejściu, pozbawionym rusztowań korzysta się z innych właściwości komórek tj. adhezja czy skłonność do tworzenia agregatów. Przykładami hodowli 3D prowadzonych ostatnimi metodami są agregaty, sferoidy, hodowle narządowe oraz kokultury organotypowe [7]. Poniżej omówiono jedynie skafoldy, gdyż one mają praktyczne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako implanty. Hodowle pozbawione rusztowań są na ogół modelami do badań laboratoryjnych.

## **5. Skafoldy**

Skafoldy są trójwymiarowym, fizycznym podłożem do hodowli komórek. Charakteryzują się unikalną przestrzenną budową utworzoną przez sieć porów. Ich głównym zadaniem oprócz utrzymania komórek w przestrzeni jest zapewnienie warunków, możliwie jak najbardziej podobnych do tych które naturalnie występują w organizmie. Oczekuje się, że komórki wyhodowane na skafoldzie będą miały odpowiedni kształt, a ich metabolizm i funkcje życiowe będą prawidłowe [6, 7].

Skafoldy z racji, że są zbudowane w większości przypadków z polimerów bioresorbowalnych mogą być z powodzeniem stosowane jako implanty do regeneracji uszkodzonych tkanek. W tym celu najpierw pobiera się z organizmu dawcy komórki regenerowanej tkanki, które następnie namnaża się w zwykłej hodowli 2D. Potem namnożone komórki wysiewa się na skafold, który wszczepia się do organizmu pacjenta. Po wprowadzeniu skafoldu wraz zaszczipionymi komórkami docelowej tkanki do organizmu człowieka, następuje ich proliferacja oraz zintegrowanie z obecnymi już w ciele komórkami (Rysunek 1). Wraz z upływem czasu podłoże polimerowe ulega bioresorpcji w wyniku przemian metabolicznych do nietoksycznych produktów, które następnie są wydalane z organizmu [8].



Rysunek 1. Etapy inżynierii tkankowej [9]

## 6. Skafoldy jako nośniki czynników wzrostu

Skafoldy dzięki swojej silnie porowatej strukturze mogą być stosowane jako nośniki substancji aktywnych. Komórki do prawidłowego funkcjonowania potrzebują odpowiednich czynników wzrostu. Są nimi na ogół aminokwasy, cukry, białka oraz inne związki czynne biologicznie. Substancje te mogą być zamykane w strukturze rusztowania, znajdować się na ich powierzchni na drodze pokrywania nimi polimeru lub mogą być same w sobie materiałem budującym skafold (białka, polisacharydy).

Skafoldy dzięki temu, że odznaczają się wysokim stopniem porowatości otwartej wykazują kilka dodatkowych cech związanych z migracją składników. Ważnym jest, aby do komórek zamkniętych w porach docierały również substancje odżywcze z medium hodowlanego. Istotne jest też, aby metabolity powstałe w wyniku procesów życiowych komórek były wyprowadzane na zewnątrz rusztowania. Ich nagromadzenie było by toksyczne i w konsekwencji powodowało by śmierć komórek [5, 10, 11].

## 7. Skafoldy w systemach podawania leków

Skafoldy mogą być też nośnikami substancji aktywnych farmaceutycznie (API) w systemach podawania leków o kontrolowanym czasie uwalniania. Zamykane są w nich leki przeciwzapalne oraz antybiotyki. Skafold z lekiem umieszcza się w odpowiednim miejscu

w organizmie, skąd dalej następuje stopniowe uwalnianie substancji leczniczej. Takie rozwiązania stosuje się przede wszystkim po zabiegach operacyjnych, w celu obniżenia ryzyka stanu zapalnego (leki przeciwzapalne) oraz w innych przypadkach wymagających długotrwałego efektu terapeutycznego [11].

## **8. Materiały stosowane do wytwarzania skafoldów**

W zależności od docelowej tkanki stosuje się różne materiały budujące rusztowanie. W przypadku tkanek twardych np. tkanki kostnej, materiałami tymi mogą być metale, szkło oraz ceramika (Rysunek 2). Są one tu stosowane ze względu na dobrą wytrzymałość mechaniczną. W przypadku tkanek miękkich np. chrzęstnej czy mięśniowej, do wytwarzania rusztowań stosuje się przede wszystkim biomateriały. Jest to nowe pojęcie, łączące trzy ważne cechy. Biomateriał charakteryzuje się biogodnością. Oznacza to, że jest nietoksyczny wobec komórek oraz samego organizmu, a także nie wywołuje odpowiedzi układu immunologicznego. Dotyczy to również produktów jego rozpadu. Kolejną cechą jest biodegradowalność, czyli zdolność do ulegania rozkładowi w warunkach panujących w ustroju. Dodatkowo, jeśli rozpad ten następuje do związków, które są wydalane z organizmu lub też są wykorzystywane w innych procesach metabolicznych, materiały te nazywa się bioresorbowalnymi.

Bardzo ważne jest aby degradacja biomateriału zachodziła w sposób kontrolowany. Jej czas nie powinien być zbyt długi i krótki. Najlepiej jest dobrać czas rozkładu tak, aby postępował on proporcjonalnie wraz z regeneracją tkanki.

Oprócz wyżej wymienionych biologicznych cech, rusztowanie powinno charakteryzować się odpowiednią wytrzymałością mechaniczną, aby nie uległo zniszczeniu w trakcie regeneracji tkanki.

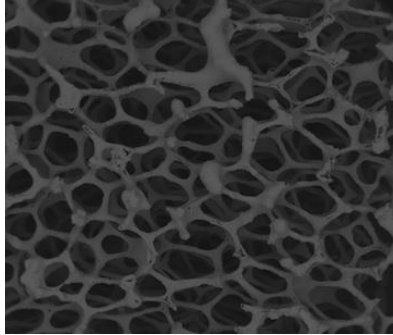
Dodatkowo, materiał budujący skafold powinien odznaczać się wysokim stopniem porowatości otwartej. Jak już zostało wspomniane, jest to niezbędne ze względu na migrację składników odżywczych niezbędnych dla komórek oraz wyprowadzanie na zewnątrz rusztowania ich metabolitów.

Rusztowanie powinno mieć także odpowiednie właściwości powierzchniowe oraz strukturę chemiczną, umożliwiające adhezję komórek do podłoża.

Większość opisanych cech spełniają polimery, dlatego są często stosowane jako materiały do wytwarzania skafoldów. Odpowiednio dobierając polimer do określonego celu, można łatwo sterować czasem degradacji całego rusztowania, a także jego właściwościami mechanicznymi i chemicznymi. Właściwości polimerów wynikają z ich

struktury. Są one zbudowane z powtarzających się kolejno po sobie jednostek (merów). W zależności liczby powtórzeń, otrzymuje się polimer o określonej długości łańcucha (ciężarze cząsteczkowym). Wraz ze wzrostem tej długości, rośnie także czas degradacji. Z tego względu, rusztowanie o określonych właściwościach można otrzymać, zpolimeru sterując jego ciężarem cząsteczkowym [7, 12].

W inżynierii tkankowej stosuje się przede wszystkim polimery biodegradowalne, zarówno naturalne jak i syntetyczne. Rzadziej używa się związków nie ulegające degradacji w ustroju np. polisulfon i polieterosulfon. Związki te są chętnie stosowane ze względu na stabilność w szerokim zakresie temperatur oraz wysoką odporność chemiczną i biologiczną.

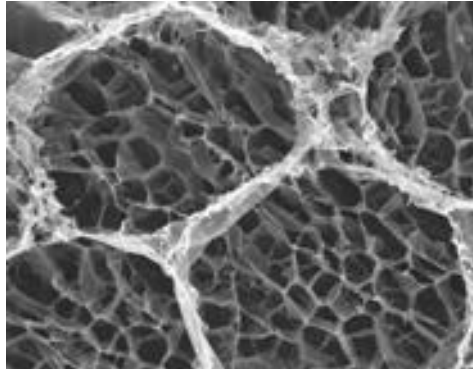


Rysunek 2. Struktura skafoldu wykonanego z bioszklą [13]

## **8.1. Polimery naturalne**

Naturalnymi polimerami stosowanymi w inżynierii tkankowej są przede wszystkim związki cukrowe oraz białkowe (Rysunek 3). Są one nie tylko materiałem budującym rusztowanie, ale też składnikami odżywczymi dla komórek. Mimo, że wykazują wiele zalet nie są najlepszymi materiałami do otrzymywania rusztowań. Zwykle są niestabilne w różnych warunkach temperatury i odczynu środowiska, co znacznie utrudnia znalezienie odpowiedniej metody wytwarzania rusztowań. Ponadto skafoldy wykonane z tych polimerów mają na ogół słabą wytrzymałość mechaniczną. Z tych przyczyn stosuje się często materiały kompozytowe, będące mieszaninami polimerów naturalnych i syntetycznych [14].





Rysunek 3. Struktura skafoldu wykonanego z kolagenu [15]

### **8.1.1. Kolagen**

Kolagen jest naturalnie występującym w organizmie, białkowym biopolimerem, zbudowanym głównie z aminokwasów: argininy, glicyny i kwasu asparaginowego. Jest on głównym białkiem tkanki łącznej, odpowiedzialnym za nadawanie tkance odpowiedniej wytrzymałości i odporności mechanicznej. Występuje też w dużej ilości w skórze, nadając jej elastyczność. Jego ubytek postępujący wraz z wiekiem powoduje powstawianie zmarszczek. Oprócz biodegradowalności i biogodności jego zaletą jest dobra adhezja do komórek. Mimo, wielu korzystnych cech, nie jest często stosowany jako samodzielny materiał budujący skafold ze względu na niedostateczne właściwości mechaniczne oraz krótki czas degradacji. Używa się go w połączeniu z innymi polimerami syntetycznymi [16, 17]

### **8.1.2. Elastyna**

Elastyna podobnie jak kolagen jest białkiem naturalnie występującym w organizmach jako element tkanki łącznej. Jest głównym składnikiem ścięgien, więzadeł, tkanki płucnej oraz ścian większych naczyń krwionośnych. Jej zadaniem jest nadawanie tkance elastyczności, dzięki temu tkanki nie ulegają odkształceniom. Podobnie jak kolagen wykazuje cechy biomateriałów (biogodność, biodegradowalność, bioresorbowalność). Jednak jej właściwości mechaniczne oraz szybkość degradacji są niedostateczne, więc stosuje się ją jako kompozyt z polimerami syntetycznymi [18].

### **8.1.3. Chitozan**

Chitozan jest polisacharydem pozyskiwanym z chityny, stanowiącej główny składnik pancerzyków skorupiaków. Występuje także w ścianach komórkowych grzybów strzępkowych. Jest biodegradowalny, biogodny, bioresorbowalny, ale mniej odporny mechanicznie niż chityna. Wykazuje

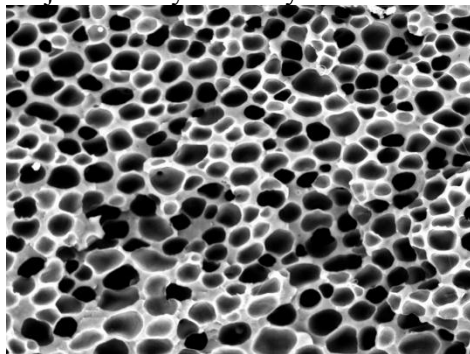
dobrą adhezję do komórek, a także ma właściwości sorpcyjne oraz antybakteryjne. Z tej przyczyny jest często wykorzystywany jako składnik opatrunków przyspieszających gojenie się ran. W przypadku rusztowań jest stosowany przede wszystkim wraz z innymi polimerami naturalnymi tj. kwas hialuronowy czy elastyna [17].

#### **8.1.4. Kwas hialuronowy**

Kwas hialuronowy jest polisacharydem występującym w organizmach. Jest obecny w skórze właściwej, gdzie wiąże wodę regulując tym samym jej zawartość. W młodej skórze występuje w dużej ilości, co zapewnia jej sprężystość. Wraz z wiekiem zaczyna go ubywać, co powoduje powstawanie zmarszczek. Kwas hialuronowy jest obecny także w mazi stawowej. Zapewnia jej lepkość, odpowiednie smarowanie stawów, a także jej nośnikiem substancji odżywczych dla komórek. W inżynierii tkankowej jest stosowany do wytwarzania rusztowań do hodowli chondrocytów wraz z polimerami syntetycznymi [16].

### **8.2. Polimery syntetyczne**

Polimery syntetyczne w porównaniu do naturalnych odznaczają się lepszą odpornością mechaniczną oraz trwałością w różnych warunkach. Z tych przyczyn są powszechnie wykorzystywane do wytwarzania rusztowań (Rysunek 4). Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę polimerów najczęściej stosowanych w inżynierii tkankowej.



Rysunek 4. Struktura skafoldu wykonanego z polilaktydu [opracowanie własne]

#### **8.2.1. Polikaprolakton (PCL)**

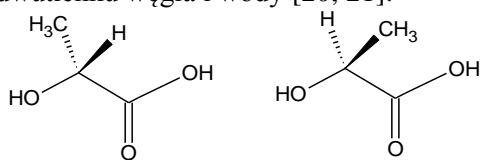
Polikaprolakton (PCL) jest biodegradowalnym, niepolarnym poliestrem alifatycznym pozyskiwanym z surowców petrochemicznych. Otrzymywany jest w wyniku polimeryzacji kaprolaktonu. Charakteryzuje się dość dobrą plastycznością i wytrzymałością mechaniczną. W organizmie ulega

biodegradacji. Jest hydrolizowany do kwasu 6-hydroksykapronowego który jest przekształcany w cykl kwasu cytrynowego, a następnie jest wydalany z organizmu. Polikaprolakton ma dłuższy czas degradacji niż np. polilaktyd (powyżej 2 lat). Z tej przyczyny jest stosowany jako długoterminowy implant lub jako kompozyt z innymi polimerami, zarówno naturalnymi jak i syntetycznymi. PCL jest też powszechnie używany do wytwarzania nici i śrub chirurgicznych, a także przedmiotów jednorazowego użytku [19].

### 8.2.2. Polilaktyd (PLA)

Polilaktyd (PLA) jest alifatycznym poliestrem pozyskiwanym ze źródeł odnawialnych (kukurydza, trzcina cukrowa). Zbudowany jest z połączonych ze sobą liniowo cząsteczek kwasu mlekowego występującego w postaci dwóch enancjomerów, dlatego mogą powstawać polilaktydy różniące się konfiguracją centrów chiralnych, o odmiennych właściwościach fizycznych (Rysunek 5). PLA homochiralny, zbudowany jedynie z cząsteczek kwasu L- lub D-mlekowego (PLLA, PDLA) charakteryzuje się wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz długim czasem biodegradacji, wzrastającym wraz z masą molową polimeru. Inne właściwości ma polilaktyd heterochiralny, zawierający w strukturze oba enancjomery kwasu mlekowego. Jest on bardziej elastyczny oraz ulega szybszej degradacji. Przez organizm przyswajalny jest jedynie izomer kwasu L-mlekowego. Enancjomer o konfiguracji D może odkładać się w ustroju, powodując w konsekwencji jego zakwaszenie. Z tych względów największe znaczenie w zastosowaniu farmaceutycznym ma PLLA o małej masie molowej oraz PLA z kilkuprocentowym dodatkiem centrów o konfiguracji D

PLA jest biodegradowalny. W organizmach jest degradowany przez enzymy w dwuetapowym procesie. Najpierw następuje hydrolityczny rozpad PLA do oligomerów kwasu mlekowego, które następnie są przekształcane w wyniku przemian enzymatycznych cyklu kwasu cytrynowego do dwutlenku węgla i wody [20, 21].



kwas D-mlekowy

kwas L-mlekowy

Rysunek 5. Enancjomery kwasu mlekowego

### 8.2.3. Poliglikolid (PGA)

Poliglikolid jest najprostszym poliestrem alifatycznym, zbudowanym z merów kwasu glikolowego. Jest polimerem pochodzącym ze źródeł odnawialnych, substrat do otrzymywania PGA (kwas glikolowy) może być pozyskiwany ze roślin tj. trzcina cukrowa czyburak cukrowy. Poliglikolid jest polimerem wysokokrystalicznym, nierozpuszczalnym w większości rozpuszczalników. Wyjątkiem są niektóre fluorowane rozpuszczalniki organiczne. Charakteryzuje się bardzo krótkim czasem degradacji hydrolytycznej (kilka tygodni). Szybka degradacja jest wynikiem dużej higroskopijności polimeru – wnika między łańcuchy woda, powoduje ich pękanie, co ułatwia transport enzymów hydrolytycznych. PGA jest podobnie jak inne polimery syntetyczne jest stosowany m.in. w medycynie do wytwarzania szybko rozkładających się nici chirurgicznych i igieł [19].

### 8.2.4. Kopolimer poli(laktyd-co-glikolid) (PLGA)

Poli(laktyd-co-glikolid) jest kopolimerem kwasu mlekowego oraz glikolowego. W zależności od stosunku tych dwóch związków użytych do polimeryzacji otrzymuje się polimer o odpowiednich właściwościach. Jak już zostało wspomniane wcześniej, polimer zbudowany jedynie z jednostek kwasu glikolowego rozpuszcza się wyłącznie we fluorowanych rozpuszczalnikach, dodatek kwasu mlekowego umożliwia stosowanie rozpuszczalników chlorowcowanych. Zwiększenie rozpuszczalności znosi ograniczenia metod późniejszego wykorzystania polimeru. Kolejną zaletą PLGA jest łatwość sterowania czasem degradacji w zależności od jego składu. Dzięki dodatkowi kwasu mlekowego degradacja polimeru zachodzi wolniej niż związku zbudowanego jedynie z kwasu glikolowego [22].

## 9. Podsumowanie

Inżynieria tkankowa jest skuteczną alternatywą wobec tradycyjnych sposobów leczenia uszkodzonych tkanek. Dotychczasowe metody tj. transplantacje czy protezy okazywały się często nieefektywne oraz problematyczne (ryzyko odrzucenia przeszczepu, brak integracji z naturalną tkanką). Ograniczenia te znosi zastosowanie skafoldów, jako bioresorbowlanych implantów wspomagających regenerację uszkodzonej tkanki.

Należy także wspomnieć, że skafoldy dzięki trójwymiarowej strukturze, dobrze oddają warunki naturalnie panujące w organizmie, więc mogą być z powodzeniem stosowane jako modele do badań *in vitro* i *ex vivo*.

Kolejnym ważnym aspektem jest zastosowanie do wytwarzania rusztowań polimerów biodegradowalnych. Związki te rozkładają się do nietoksycznych,

łatwo wydalanych z ustroju produktów. Dzięki temu nie ma konieczność usuwania implantu z organizmu, co zwiększa komfort terapii pacjenta.

Wszystkie te cechy sprawiają że skafoldy są obiecującym zagadnieniem nowoczesnej medycy regeneracyjnej, dlatego też są przedmiotem badań wielu grup badawczych zarówno w Polsce, jak i na świecie.

## Literatura

1. O'Brien F. J. *Biomaterials & scaffold for tissue engineering*, Materials Today, 14 (2011), s. 88-95
2. Ciszek B. *Morfologia I funkcja chrząstki stawowej*, Acta Clinica, 1 (2010), s. 10-14
3. <http://impomed.com.pl/index.php?action=page&parent2=158&parent=358&view=359>
4. Ma P. X. *Scaffolds for tissue fabrication*, Materials Today, 7 (2004), s. 30-40
5. Grolik M. *Inżynieria tkankowa-nowe narzędzie w rekonstrukcji tkanek*, Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe, 3 (2011), s. 33-40
6. Dhaliwa A. *Three Dimensional Cell Culture : A Review*, Materials and Methods, on-line (2012)
7. Król S., Choroszyńska D., Wawruszak A., Okła K. *Biotechnologia: wybrane zagadnienia*, Politechnika Lubelska, Tom I (2014), s. 77-93
8. Wójtowicz J., Leszczyńska J., Walenko K., Lewandowska-Szumieł M. *Produkty inżynierii tkankowej dla pacjentów pediatrycznych*, Borgis – Postępy Nauk Medycznych, 12 (2011), s. 1054-1060
9. <http://www.smita-iitd.com/research-highlights/tissue-engineering>
10. Whintaker M. J., Qurik R. A., Howdle S. M., Shakesheff K.M. *Growth factor release from tissue engineering scaffolds*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53 (2001), s. 1427-37
11. Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R. *Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery*, Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 29 (2012), s. 1-63
12. Tabata Y. *Biomaterial technology for tissue engineering applications*, Journal of Royal Society Interface, 6 (2009), s. S311-S324
13. De Guire E. *Researchers show axial vascularization of Bioglass matrix with animal tests*, American Ceramic Society Bulletin, 92 (2013), s. 17
14. Ko H. F., Sfeir C., Kumta P. N. *Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering*, Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences, 368 (2009), s. 1981-1997
15. Kawazoe N. *Creation of novel materials for tissue regeneration as next generation medical technology*, National Institute for Materials Science, on-line (2012)
16. Kim H. J., Kim K. K., Park I. K. *Hybrid Scaffolds Composed of Hyaluronic Acid and Collagen for Cartilage Regeneration*, Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 9 (2012), s: 57-62

17. Yang C. R., Di Chen J. *Preparation and biological evaluation of chitosan-collagen-icariin composite scaffolds for neuronal regeneration*, Neurological Sciences, 34 (2013), s. 941-947
18. Daamena W. F., Veerkampa J. H., van Hestb J. C. M., van Kuppevelt T. H. *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*, Biomaterials, 28 (2007), s. 4378-4398
19. Gołębiewski J., Gibas E., Malinowski R. *Wybrane polimery biodegradowalne – otrzymywanie, właściwości, zastosowanie*, Polimery, 53 (2008) s. 799-807
20. Gadomska A., Warych I., Ruśkowski P., Synoradzki L. *Otrzymywanie nanosfer polilaktydowych*, Przemysł Chemiczny, 93 (2014), s.1311-1314
21. Gadomska A., Mierzejewska J., Ruśkowski P., Synoradzki L., *Przemysł Chemiczny*, w druku (2015)
22. Pan Z., Ding J. *Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*, Interface Focus, 2 (2012), s. 366-377

## Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej

### Streszczenie

Inżynieria tkankowa jest nowoczesną, interdyscyplinarną dziedziną medycyny regeneracyjnej. Łączy wiedzę z zakresu nauk przyrodniczych oraz nowoczesnych technologii biomateriałów. Jednym z jej głównych, i najnowszych zagadnień są skafoldy (ang. *Scaffolds*-rusztowania). Są to mikroporowate struktury o wysoce rozwiniętej, trójwymiarowej budowie służące do hodowli komórek. Przestrzenna struktura doskonale oddaje naturalne warunki panujące w organizmie. Jest to ich przewagą wobec tradycyjnych hodowli dwuwymiarowych, dlatego też mogą być stosowane jako modele tkanek *in vitro* i *ex vivo*. Skafoldy są zbudowane z polimerów bioresorbowalnych, pochodzenia naturalnego oraz syntetycznych. Z tego względu mogą być z powodzeniem stosowane jako biodegradowalny implant do regeneracji uszkodzonych tkanek, co jest obiecującą alternatywą wobec tradycyjnych metod leczenia uszkodzeń.

Słowa kluczowe: hodowle komórkowe, inżynieria tkankowa, medycyna regeneracyjna, porowate trójwymiarowe rusztowania, polimery biodegradowalne

## Applications of bioresorbable scaffolds for tissue engineering

### Abstract

Tissue engineering is a new, interdisciplinary branch of regenerative medicine. It is join of biological sciences and modern technologies of biomaterials. The scaffolds are the main and the latest issue of this science. There are microporous structures characterized by a highly developed, three-dimensional spatial structure for cell culture. This spatial structure perfectly mimics natural conditions in the organism. It is of advantage to conventional two-dimensional cell culture. Therefore they may be used as models of tissue *in vitro* and *ex vivo*. Scaffolds are built from bioresorbable polymers, naturals and synthetics. Therefore they may be successfully used as a biodegradable implant for regeneration of damaged tissues. It is a promising alternative to conventional methods of treatment of damage.

Keywords: biodegradable polymers, cell culture, porous three-dimensional scaffolds, regenerative medicine, tissue engineering

## Medycyna w skali nano – grafen

### 1. Nanomedycyna

Nanomedycyna jest prężnie rozwijającą się gałęzią medycyny wykorzystującą nanocząsteczki w zastosowaniu biomedycznym, począwszy od inżynierii tkankowej a skończywszy na farmacji. Słowo „nano” w języku greckim oznacza „karzełek”, a medycyna operująca cząstkami w skali nano to nanomedycyna. Cząstki te osiągają wymiary od 1 do 100 nanometrów, i są one zaledwie 10x większe od średnicy atomu wodoru (~5x10<sup>-9</sup>m) i aż 80 000 razy mniejsze od średnicy ludzkiego włosa (0,1 mm) [1].

Termin nanomedycyna zaczął się pojawiać w fachowej literaturze już w początku lat 80, chociaż już w latach 50 XX wieku, amerykański fizyk i teoretyk, Richard Phillips Feynman, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki, zwrócił uwagę na potęgę i możliwości wynikające z operowania cząsteczkami w skali nano [1, 2]. Jego słynne stwierdzenie „*Tam na dole jest jeszcze dużo miejsca*”, uważane jest za hasło przewodnie nanoświata [2]. Następnie, w 1960 roku, inżynier Williama H. McLellana, za pomocą technik mikroelektroniki skonstruował silnik ważący zaledwie 250 mikrogramów, który miał moc 1 mW, a już w 1985 roku na Uniwersytecie Stanford, Thomas Newman przedstawił książkę, której strony zostały zmniejszone do w skali 1/25 000 [3]. W 1985 r. naukowcy: Harold Kroto, Sean O'Brien, Robert Curl i Richard Smalley, odkryli kulistą, sferyczną cząsteczkę złożoną z samych atomów węgla, fullerem C<sub>60</sub>, która uważana jest obecnie za ojca nanocząstek. Sześć lat później, Sumi i Iijima odkrył cylindryczne struktury, pojedynczych warstw atomów węgla o wyjątkowych właściwościach fizykochemicznych które z czasem zostały nazwane nanorurkami węglowymi CNT (*carbon nano tube*) [3].

Prace nad nanotechnologiami bardzo przyspieszyły w latach 80 i 90 ubiegłego wieku. To czas m.in. gwałtownego rozwoju technik litograficznych oraz produkcji ultracienkich warstw kryształów. Udoskonalenie technik

---

<sup>1</sup> ilodudek@gmail.com, Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, II wydział lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> skoda.marta@gmail.com Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, II wydział lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup> anna.jarosz@poczta.onet.pl, Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, II wydział lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

produkcji nanocząstek znacznie upowszechniło wykorzystywanie tych struktur w badaniach biomedycznych. Obecnie rozróżnia się 2 główne metody pozyskiwania nanostruktur: top down – („z góry do dołu”) i bottom-up – („z dołu do góry”). Pierwsza polega na zmniejszeniu wymiarów klasycznego makromateriału w wyniku mechanicznej obróbki ciał stałych (mielenie, cięcie, skrawanie, skręcanie pod wysokim ciśnieniem, wyciskanie hydrostatyczne). Druga metoda polega na łączeniu za pomocą metod chemicznych, molekuł prekursora w większe agregaty (osadzanie z fazy gazowej, metoda zol-żel, osadzanie elektrochemiczne, chemiczna redukcja, metoda mikroemulsyjna) [4].

Zmniejszenie w taki sposób rozmiarów cząstek, powoduje że wzrasta względna liczba atomów mieszcząca się na granicy dwóch faz. Atomy te charakteryzują się znacznie zwiększoną aktywnością w porównaniu do atomów klasycznych cząstek, dzięki czemu są w stanie wyeliminować wszelkie ograniczenia wynikające z zastosowania cząstek makroskopowych. Te właśnie cechy spowodowały rozwój nanomedycyny, która obecnie jest najprężniej rozwijającą się nauką biomedyczną. Naukowcy zapewniają, że XXI w. będzie wiekiem nanomedycyny. Wybitni uczeni zapowiadają, że nanocząstki i ich właściwości zrewolucjonizują niemal wszystkie dziedziny medycyny, począwszy od diagnostyki, po spersonalizowaną terapię. Obecnie światowe ośrodki badawcze skupiają się na zastosowaniu nanomateriałów w selektywnym dostarczaniu leków, bioobrazowaniu, biodetekcji, w medycynie regeneracyjnej i chirurgii implantacyjnej [5]. Naukowcy zapewniają, że nanomedycyna wykorzystująca nanomateriały, okaże się znakomitą metodą leczenia stanów zapalnych, nowotworów oraz innych dolegliwości, jak również spowoduje burzliwy postęp diagnostyki i wprowadzi do użytku implanty nowej generacji [5].

Aczkolwiek, ze względu na swoje bardzo małe wymiary oraz wysoce rozwiniętą powierzchnię, nanocząstką niezwykle aktywne chemicznie i mogą zachowywać się w sposób nieprzewidywalny po wprowadzeniu do organizmu ludzkiego. Skutkiem tego mogą być nieznane dotychczas działania uboczne nanomateriałów. Dlatego bardzo ważne jest prowadzenie licznych badań obrazujących ich interakcje z komórkami zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, zanim nanocząstki zostaną wprowadzone do zastosowania klinicznego. Równoległe z dynamicznym rozwojem nanomedycyny, naukowcy bardzo gorliwie zgłębiają patomechanizmy oddziaływania nanocząstek, tworząc nową subdyscyplinę zwaną nanotoksykologią.

Obecnie istnieją wiele nanocząstek, które są wykorzystywane w badaniach naukowych: nanocząstki metali (głównie srebra; 10-50 nm), dandrymery (1-100 nm), liposomy (około 20 nm), nanorurki węglowe (2-100 nm), fulereny (powyżej 20 nm) oraz najnowszy nanomateriał: grafen (10-100 nm) [6]. Naukowcy są zdania, że nanomateriały węglowe (głównie nanorurki



węglow i grafen), ze względu na swój skład i strukturę, są nanomateriałami charakteryzującymi się największą biokompatybilnością względem żywych organizmów. Dlatego też te dwa rodzaje nanomateriałów, wiodą prym w najświeższych doniesieniach naukowych z dziedziny nanomedycyny [7].

## 2. Grafen

Grafen jest alotropową, dwuwymiarową strukturą złożoną z atomów węgla o hybrydyzacji  $sp^2$  (struktura powłoki elektronowej atomu węgla w stanie podstawowym:  $1s^2 2s^2 2p^2$ ). Grafenowe atomy węgla łączą się w sześciokąty, swoją budową przypominając plaster miodu. Powierzchnia grafenu ma najmniejszą grubość z możliwych, zaledwie jednego atomu. Grafen pochłania jedynie 2,3% światła, jest ponad stukrotnie wytrzymalszy od stali i niesamowicie elastyczny, a przy tym twardszy, niż diament. Dodatkowo grafen jest bardzo wytrzymały termicznie i chemicznie odporny na działanie wody oraz rozpuszczalników organicznych. Jest w ogóle nieprzepuszczalny dla molekuł. Dodatkowo grafen wykazuje doskonałą przewodność elektryczną i termiczną. Jego unikalna powierzchnia posiada największą pojemność sorpcyjną związków chemicznych, leków i kwasów nukleinowych [8,9,11]. Grafen spośród innych nanomateriałów węglowych takich jak fulereny, czy CNTs (SWCNTs, DWCNTs, MECNTs), cechuje się najlepszymi właściwościami fizykochemicznymi i najlepszą biokompatybilnością [7].

Istnienie węgla w postaci pojedynczej warstwy atomów przewidywano już kilkadziesiąt lat temu. Pierwszy teoretyczny opis grafenu pochodzi z 1947 r. i został opublikowany przez Wallacea [9, 10]. Jednakże w ówczesnych czasach zetknął się on z powszechną krytyką, bowiem naukowcy byli przekonani, że dwuwymiarowa struktura atomów nie może w rzeczywistości istnieć. 1962 roku po raz pierwszy został użyty termin „grafen” przez Bohema, w celu opisanie jednowarstwowych folii węgla. Trzydzieści lat później, Van Bommel udokumentował obecność monoatomowej warstwy węgla o heksagonalnym ułożeniu atomów na powierzchni wygrzewanego w wysokiej temperaturze węgla krzemu [8,9,10]. Możliwość istnienia dwuwymiarowej postaci węgla została zaakceptowana przez większość naukowców.

W 2004 roku amerykańscy naukowcy opatentowali sublimację krzemu w warunkach próżni, przy okazji wytwarzając pierwsze warstwy grafenu. Jednak trudno było wyizolować wystarczająco duże kawałki grafenu, aby móc je zidentyfikować i opisać ich podstawowe własności fizyczne. W tym samym roku, rosyjscy badacze Andre Geim i Konstantin Novoselov z uniwersytetu w Manchesterze dokonali okrycia alotropowej postaci węgla – grafenu [7, 8]. Naukowcy do pierwszego wytworzenia tego cudownego

nanomateriału, wykorzystali bardzo prosty, wręcz banalny sposób: za pomocą zwykłej taśmy samoprzylepnej odrywali fragmenty z kawałka grafitu. Powtarzali tę czynność kilkadziesiąt razy, używając poprzednio oderwany fragment grafitu, do odrywania coraz cieńszych warstewek węgla, aż w końcu udało się otrzymać mikroskopijne kawałki grafenu. Sześć lat później, Andre Geim i Konstantin Novoselov za badania prowadzone nad grafenem oraz opis jego właściwości, otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki [7, 8, 10, 11].

Dokonania Geima i Novoselov zapoczątkowały gwałtowne przyspieszenie prac dotyczących grafenu, nie tylko pod kątem czysto badawczym ale przede wszystkim w celu opracowania metody pozwalającej na wytworzenie jak najdoskonalszej formy grafenu.

Początkowo, w celu produkcji grafenu, wykorzystywano opatentowaną przez Amerykanów w 2004 roku metodę sublimacji (odparowania) krzemu w warunkach próżni. Metoda ta została następnie zmodyfikowana przez wprowadzenie atmosfery argonu. Metodę sublimacji udoskonalamo tak ażeby zamiast sublimacji odkładać warstwy atomów węgla na podłożu SiC za pomocą metody CVD (Chemical Vapor Deposition) [12]. Zablockowanie procesu sublimacji poprzez przepływ argonu pozwoliło na uzyskiwanie lepszej jakości warstw grafenu, które w znacznie mniejszym stopniu były uzależnione od defektów podłoża SiC. Badania przy użyciu ARPES (Angle-Resolved Photoemission Spectroscopy) potwierdziły, że metoda ta może dostarczyć bardzo wysokiej jakości warstw grafenowych, a uzyskane nośniki zachowują się jak bezmasowe fermiony Diraca, dla których zależność energii od pędu jest liniowa [12]. Metoda CVD pozwala na wytworzenie węglowych warstw charakteryzujących się znacznie lepszą jednorodnością od warstw wytworzonych przy pomocy sublimacji.

Koreańscy naukowcy zapoczątkowali natomiast technikę produkcji grafenu metodą CVD na metalach, w szczególności na miedzi. Metoda ta obecnie jest powszechnie wykorzystana w wielu laboratoriach na świecie. Koreańska metoda produkcji grafenu, pozwoliła na znaczne ograniczenie kosztów. Niestety warstwy grafenu wytworzone na miedzi mają znacznie niższą jakość niż te otrzymane z grafitu, i nie mogą być stosowane w celu produkcji urządzeń elektrycznych [13]. Za to powszechnie metoda ta jest wykorzystywana w ośrodkach badawczych, które produkują grafen w celu jego stosowania w badaniach medycznych.

Niestety jakość stosowanego grafenu w badaniach biologicznych ma kluczowe znaczenie. Metoda produkcji i techniki obróbki nanomateriału mają duży wpływ na toksyczność grafenu względem komórek [14]. Nieregularna powierzchnia, ostre krawędzie, wgłębienia, wysepki oraz różne odległości pomiędzy atomami węgla sprawiają, że grafen może przerwać dwuwarstwą lipidową błonę komórki, zakłócić transport

elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i tym samym wymusić na komórce aktywację szlaku apoptozy [15]. Naukowcy z University of Maryland wykazali, że usunięcie z warstwy grafenu niektórych atomów, powoduje powstanie pustych miejsc które działają jak niewielkie magnesy, powodując tym samym zmianę właściwości fizykochemicznych nanomateriału i znacznie potęgując toksyczny wpływ na komórki poprzez silniejsze oddziaływanie z elektronami w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Naukowcy wykazali również, że zdolność makrofagów RAW-264, do internalizacji i efektywnego usuwania grafenu znacznie maleje w przypadku zanieczyszczenia nanomateriału cząsteczkami manganu [16]. Zanieczyszczenie i domieszka niemetali, półmetali a zwłaszcza metali powodują znaczny wzrost toksyczności nanomateriałów [16, 17]. Dlatego też w literaturze jest tak wiele niezgodności i sprzecznych wyników badań na temat toksycznego oddziaływania grafenu na komórki. Naukowcy bardzo często do badań biologicznych wykorzystują grafen uzyskany metodą elektrochemicznego złuszczenia anody, daje płatki grafenu o bardzo różnej wielkości, charakteryzujące się różnymi parametrami fizycznymi [16, 17, 18]. Użycie słabej jakości grafenu w badaniach biologicznych powoduje, że naukowcy wykazują toksyczne oddziaływanie grafenu względem organizmów żywych. W badaniach biogodności tak ważną jest więc metoda pozyskiwania nanomateriału, która zapewni uzyskanie grafenu o wysokiej jakości i odpowiednich właściwościach fizykochemicznych.

Jak dotąd główną przeszkodą w wykorzystaniu grafenu w biologii i chemii medycznej, oprócz wspomnianej wcześniej metody produkcji dającej niezadowalające arkusze grafenu, jest jego hydrofobowy charakter. Brak rozpuszczalności w większości rozpuszczalnikach przyjaznych dla środowiska znacznie ogranicza jego zastosowanie. Grafen w płynach ustrojowych takich jak surowica czy roztwór soli fizjologicznej, zmienia swoją konformację przestrzenną i ulega precypitacji. W związku z tym naukowcy coraz częściej doswycych badań stosują tlenek grafenu (GO), wytwarzany chemiczną metodą utlenienia grafitu (synteza Hummera) [28]. GO charakteryzuje się bardzo zbliżonymi właściwościami do dziewiczego grafenu i przy tym posiada bardziej hydrofilowy charakter, dzięki czemu jest znacznie bardziej biodostępny i mniej toksyczny niż grafen. GO daje szerokie możliwości projektowania nanohybryd o interesujących właściwościach. Koniugacja GO z grupami karboksylowymi, epoksydowymi i hydroksylowymi, jeszcze bardziej zwiększa jego biodostępność i organicznie niepożądaną wpływ na komórki [29].

Duży wpływ na oddziaływanie grafenu w sposób szkodliwy na komórki ma technika obróbki pozyskanego nanomateriału. Płatki grafenu poddane zbyt długo procesowi sonifikacji, charakteryzują się bardzo małym

rozmiarem (10 nm), nieregularnej jednolitości powierzchnią i bardzo ostrymi krawędziami. Tak pozyskany grafen wykazuje 100x większą zdolność do indukcji szlaku apoptozy w komórkach RAW 264 [16]. Akhavan i wsp. udowodnili również, że wytworzone poprzez sonifikację, bardzo małe arkusze (11nm) zredukowanego GO, wykazywały znacznie większą toksyczność wobec ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSCs) [16]. Płatki grafenu o bardzo małych rozmiarach i słabej jakości charakteryzują się dużą toksycznością wobec żywych komórek. Małe cząstki posiadają znacznie większą powierzchnię aktywną (mają większy stosunek powierzchni do objętości), która bardziej reaktywnie oddziałuje z komórkami, co potęguje potencjalne efekty uboczne. Małe i ostre płatki grafenu bez problemu przebijają błonę komórkową, zaburzają potencjał mitochondrialny oraz powodują wzmożoną produkcję wolnych rodników tlenowych w komórce [19]. Niezbędne zatem wydaje się ujednoczenie i wystandaryzowanie metody produkcji grafenu używanego w badaniach biomedycznych. Pozwoliłoby to na ujednoczenie sprzecznych wyników badań będących skutkiem stosowania niskiej jakości grafenu.

### 3. Grafen w aplikacjach biomedycznych

Fizykochemiczne właściwości grafenu spowodowały, że jest on coraz chętniej wykorzystywany w pracach badawczo-naukowych w celu poszukiwania nowych zastosowań w biotechnologii, farmacji i medycynie. Prowadzone od 2004 roku licznie badania *in vivo*, wykazały, że grafen charakteryzuje się wysoką biogodnością wobec hodowli komórek takich jak neurony, osteocyty, chondrocyty, fibroblasty, mezenchymalne komórki macierzyste, komórki układu immunologicznego i komórki endotelium [20, 21, 22, 23, 24, 25]. Naukowcy wykorzystują grafen w celu zastosowania go jako innowacyjny materiał biomedyczny w biodetekcji i bioobrazowaniu, dystrybucji leków w organizmie, w leczeniu nowotworów oraz jako rusztowanie dla komórek w inżynierii tkankowej [26, 27].

Naukowcy wykazali, że hodowla komórek nerwowych na grafenowym podłożu charakteryzuje się lepszymi parametrami życiowymi oraz że komórki znacznie chętniej ulegają rozmnażaniu aniżeli hodowla komórek nerwowych na zwykłym podłożu [30]. Inna grupa badaczy wykazała przyspieszone różnicowanie komórek macierzystych w neurony, na arkuszach tlenku grafenu [20]. Bardzo interesujące wyniki otrzymali Song i wsp., którzy wykazali, że wyjątkowa grafenowa pianka (3D) hamowała rozwój odpowiedzi zapalnej w mysiej linii komórek mikrogleju (komórki BV2). Wykazali oni, że grafen znacznie zmniejsza poziom IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  w hodowlach komórkowych, które były stymulowane przez LPS

[31]. Jednocześnie w swych badaniach wykazali, że grafen 3D wzmacnia proliferację komórek neuronowych oraz znacznie potęguje neuroprotektoryjną funkcję komórek mikrogleju [31]. Naukowcy są zdania, że grafenowe podłoże ze względu na bardzo dobre właściwości elektryczne, właściwości neuroprotektoryjne, bardzo wysoką wytrzymałość i wysoką biokompatybilność względem komórek nerwowych może w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych w szczególności w leczeniu choroby Alzheimera i choroby Parkinsona [32]. Jako że grafen stanowi również bardzo silne a zarazem najcieńsze z możliwych, rusztowanie dla komórek może on być wykorzystany w przyszłości w celu zaprojektowania nanopłytek- nanoimplantów pokrytych komórkami nerwowymi, które następnie będzie można wszczepić do mózgu pacjenta w celu uzupełnienia neuronów obumarłych z powodu choroby czy urazu mechanicznego [32].

Od 2004 r. trwają intensywne badania mające na celu wprowadzenie grafenu do konstrukcji bardzo wytrzymałych, ultra cienkich i zarazem bardzo biokompatybilnych rusztowań dla komórek [31, 32, 33]. Naukowcy w swych badaniach wykazali, że grafen idealnie się nadaje jako rusztowanie do hodowli ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC) [33, 34]. Komórki rosnące na grafenowym podłożu chętnie się dzieliły i ulegały proliferacji. W porównaniu do hodowli komórek macierzystych prowadzonych na podłożu SiO<sub>2</sub>,

hodowla komórek na grafenowym podłożu cechowała się znacznie większą liczebnością i zdolnością do różnicowania [34]. Z kolei inna grupa badaczy, wykazała, że grafen wzmacnia różnicowanie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC) w kierunku komórek kości (osteoblastów) w stopniu porównywalnym z czynnikami wzrostu indukującymi tworzenie kości takimi jak

czynnik morfogenetyczny kości (BMP-2) [35]. Hodowle prowadzone na grafenowym podłożu w porównaniu do hodowli na zwykłym podłożu z dodatkiem BMP-2, cechowały się taką samą a nawet większą ekspresją CD-44 (marker powierzchniowy dla ludzkich komórek macierzystych szpiku hMSC) oraz OCN (osteokalcyna – białko niekolagenowe syntetyzowane przez osteoblasty) [35]. Liu i wsp. potwierdzili również, że telenekgrafenu GO idealnie nadaje się do hodowli tkanki kostnej, promując wzrost, proliferację, a także mineralizację komórek kości, w znacznie lepszym stopniu niż chitosan [36].

Obecnie główny problem wynikający ze stosowania implantów i protez w ortopedii to ich stosunkowo niska wytrzymałość mechaniczna, a także niszczenie implantu i rozwój reakcji zapalnej w skutek metalozy [37]. Wytworzona warstwa pasywna między wprowadzonym implantem a organizmem nie może ulec niszczeniu. W innym przypadku, kiedy

materiał będzie miał bezpośredni kontakt z tkanką, z biomateriału mogą uwalniać się składniki stopów do organizmu. Powoduje to zmiany korozyjne na powierzchni implantu, nasilające reakcję zapalną w organizmie. Przenikanie cząsteczek stopu do środowiskapowoduje obumieranie tkanki, z którą styka się implant [37]. Powlekanie protez ortopedycznych warstwą super wytrzymałego, odpornego na działanie soli fizjologicznej i wysoce biokompatybilnegografenu, z pewnością ograniczyłoby ten problem do minimum. Grafenowa proteza mogłaby funkcjonować w organizmie człowieka przez wiele lat nie ulegając niszczeniu i nie tracą swojej funkcji.

Najwięcej badań prowadzonych nad zastosowaniem nanocząstek w medycynie, prowadzi się w celu zaprojektowania idealnego nośnika leku, a także w celu zwiększenia skuteczności obecnie stosowanych cytostatyków w terapii przeciwnowotworowej, oraz w celu opracowania nowych, niekonwencjonalnych metod eliminacji komórek nowotworowych z ciała pacjenta. Pod tym kątem, grafen jaki i GO są bardzo intensywnie badane, a pierwsze prace dają bardzo obiecujące wyniki.

Naukowcy zaprojektowali grafenową powłokę (tlenek grafenu pokryty grupami PGE, w celu lepszej koniugacji z lekiem) do transportu przeciwnowotworowego SN38, aktywnego metabolitu irynotekanu, hamującego topoizomerazy I DNA. Kompleks SN38-grafen wykazał się 1000x wyższą cytotoksycznością niż irynotekan wobec linii komórek HCT-116 [37]. Shen iwsp. w swoich badaniach wykorzystali grafen(a dokładniej tlenek grafenu wzbogacony grupami SO<sub>3</sub>H) jako nośnik, jednocześnie dla doksorubicyny i kamptotecyny. W swych badaniach wykazali, że zaprojektowany przez nich grafen znacznie zwiększa cytotoksyczność leków wobec komórek raka piersi [38, 39].

Obecnie prowadzone są również liczne badania dotyczące jednoczesnego ładowania i dostarczania leków i genu przez grafen na tej samej powierzchni [40, 41, 42]. Kojarzenie chemio- i genoterapii jest bardzo pożądane w celu zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Naukowcy za pomocą grafenowego wektora, z powodzeniem wprowadzili do komórek HeLa, genk Bcl-2 i gen kodujący lucyferazę. W swych badaniach wykazali również, że grafen idealnie nadaje się jako nośnik kwasów nukleinowych. Potwierdzili oni, że grafenowy nośnik chroni DNA przed nukleazami i zapewnia wydajniejszy i bardziej bezpieczny, niż dotąd stosowane wektory wirusowe, transfer kwasów nukleinowych do komórki [43, 44].

Zastosowaniegrafenu w farmacji daje możliwość bardziej precyzyjnej dystrybucji leków w organizmie oraz pozwala na znaczne ograniczenie dawki cytostatyków [45, 46]. Zastosowanie leków w postaci nanokryształów może spowodować, że staną się one o wiele mniejsze, będą lepiej wchłaniane i będą skuteczniej docierały do miejsca docelowego

w organizmie. Dodatkowo uwalnianie takich leków może być ściśle kontrolowane [45, 46].

#### 4. Podsumowanie

Dotychczasowe badania nad grafenem i możliwością jego zastosowania w aplikacjach biomedycznych są wielce obiecujące. Grafen doskonale nadaje się jako rusztowanie dla komórek, jako budulec innowacyjnych implantów oraz nośnik leków i genów. Jednakże należy przeprowadzić jeszcze wiele badań, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, zanim grafen znajdzie praktyczne zastosowanie klinicznie. Należy również dążyć do ujednoczenia i standaryzacji procedury badawczej wykorzystującej ten cudowny nanomateriał w aplikacjach biomedycznych, w celu eliminacji rozbieżności wyników uzyskanych przez różne jednostki naukowe.

#### Bibliografia

1. Subbiah R., Veerapandian M., Yun K. Nanoparticles: *Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences*, Current Medicinal Chemistry., 17 (2010), s. 4559-4577
2. <http://www.bbc.com/news/science-environment-11299244>
3. <http://www.nano.gov/timeline>
4. Aitken R. J. 1, Chaudhry M. Q. 2, Boxall A. B. A. 3 and Hull M. *4 Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends*, Occupational medicine., 57 (2006), s. 300-306
5. Jain KK. *Role of nanobiotechnology in the development of personalized medicine*, Nanomedicine., 4 (2009), s. 249-252
6. Nalwa HS. *Special Issue on Reviews in Nanomedicine, Drug Delivery and Vaccine Development*, Journal Biomedical Nanotechnology., 10 (2014), s. 1635-1640
7. Chou CC., Hsiao HY., QS. Hong QS et al *Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model*. Nano Letter., 8(2008), s.437-445
8. JW Bai, Zhong X., Jiang S., Huang Y., XF. Duan *Graphene nanomesh*. Nat Nanotechnol.,5 (2010), s. 190-194
9. Wallace P. R.. *The band theory of graphite*. „Physical Review”. 71, 1947. DOI: 10.1103/PhysRev.71.622
10. <http://www.hk.net.pl/grafen/historia-grafenu.html>
11. Geim AK., Novoselov KS. *The rise of graphene*, Nature Materials., 6 (2007), s. 183-191
12. <http://www.hk.net.pl/grafen/produkcja-grafenu.html>
13. Xuesong L., Weiwei C., Jinho A., Seyoung Large K. *-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils*. Science., 324 (2009), s. 1312-1314
14. Skoda M., Dudek I., Jarosz A., Szukiewicz D. *Graphene: One Material, Many Possibilities Application Difficulties in Biological Systems*. Journal of Nanomaterials(2014) DOI:10.1155/2014/890246

15. Chatterjee N., Eom HJ., Choi J. *A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interaction*, Biomaterials.,35 (2014), s. 1109-1127
16. Amedea B., Amauri S., de Lima R., Oswaldo L., Durán N. *Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide*. Chemical Research Toxicology., 27 (2014), s.159-168
17. Park S., Ruoff RS. *Chemical methods for the production of graphenes*. Nature Nanotechnology., 58(2009), s. 1-8
18. Chang Y., Yang ST., Liu HJ., Dong E., Wang Y., Cao A., Liu Y., Wang H., *In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells*, Toxicology Letters., 200 (2011), s. 201-210
19. Yue H., Wei W., Yue Z., Wang B., Luo N., Gao Y., Mac D., Maa G., Su Z.. *The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses* Biomaterials., 33 (2012), s. 4013-4021
20. Tu Q., Pang L., Chen Y., Zhang Y., Zhang R., Luc B. *Effects of surface charges of graphene oxide on neuronal outgrowth and branching*. Cite this: Analyst., 139 (2014), s. 105-115
21. Ruiz ON., Fernando S., Wang B., Brown NA., Luo PG., McNamara ND., Vangsness M., Sun Y., Bunker ChE. *Graphene Oxide: A Nonspecific Enhancer of Cellular Growth*, ASCNANO., 5 (2011), s. 8100-8107
22. Mao HY, Laurent S., Chen W., Akhavan O., Imani M., Ashkarran AA., MM. *Graphene: Promises, Facts, Opportunities, and Challenges in Nanomedicine*. Chemical. Reviews., 113 (2013), s. 3407-3424
23. Li N., Zhang Q., Gao S., Huang R., Wang L., Liu L., Tang DJ., Cheng G. *Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells*. Nature Scientific reports., 2(2013), s. 1604
24. Ding Z., Zhang Z., Ma H., Key Y.. *In Vitro Hemocompatibility and Toxic Mechanism of Graphene Oxide on Human Peripheral Blood T Lymphocytes and Serum Albumin* ACS Appl. Materials. Interfaces., 6 (2014), s. 19797-19807
25. Orecchioni M., Bedognetti D., Sgarrella F., Marincola FM., Bianco A., Gemma Delogu L. *Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells*. Journal of Translational Medicine., 12(2014), s.138
26. Zhang H., Grüner G., Zhao Y. *Recent advancements of graphene in biomedicine*. Journal of Material Chemical., 1 (2013), s. 2542
27. Feng LZ., Liu Z. *Graphene in biomedicine: opportunities and challenges*. Nanomedicine., 6 (2011), s. 317-324
28. Zhu BY., Murali S., Cai W., Li X., Suk JW., Potts JR., Ruoff RS. *Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications*. Advans in Materials.,22 (2010), s. 3906-3924
29. Wang K., Ruan J., Song H., Zhang J., Wo Y., Guo S. *Biocompatibility of graphene oxide*, Nanoscale Research Letters., 6 (2011), s. 8
30. N. Li, Zhang, Gao S., Huang R., Wang L., Liu L., Dai J., Tang M., Cheng G. *Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells*. Nature Scientific reports., 3 (2013), s. 1604



31. Song Q., Jiang Z., Li N., Liu P., Liu L., Tang M. *Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells*, Biomaterials., 35 (2014), s. 6930-6940
32. Arsiwala A., Desai P., Patravale V. *Recent advances in micro/nanoscale biomedical implant*, Journal of Controlled Release., 189 (2014), s. 25-45
33. Kalbacovaa M., Verdanova M., Broza A., Vetushkad A., Fejfar A., Kalbace M. *Modulated surface of single-layer graphene controls cell behavior*, Carbon., 72 (2014), s. 207-214
34. Lee WC., Lim CHYX., Shi H., Tang LAL., Wang Y. *Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide*, ACS Nano., 5 (2011), s. 7334-7341
35. Nayak TR., Andersen H., Makam VS., Khaw C., Bae S., *Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*, ASC Nano., 5 (2011), s. 4670-4678
36. Liu Y., Chen T., Du F., Zhao X., Xiong Ch., Zhou Y., *Is Graphene a Promising Nano-Material for Promoting Surface Modification of Implants or Scaffold Materials in Bone Tissue Engineering*, Tissue Engineering Part B., 20 (2014), s. 477-49
37. Liu Z., Robinson JT., Sun XM. *PEGylatednanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs*. Journal of the American Chemical Society., 130 (2008), s. 10876-10877
38. Zhang LM., Xia JG.. *Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs*, Small., 6 (2010), s. 537-544
39. Yang XY., Liu ZF. *High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide*, The Journal of Physical Chemistry., 112(2008), s. 17554-17558
40. Sun XM., Liu Z., Welsher K., Robinson JT., Goodwin A., Zaric S. *Nanographene oxide for cellular imaging and drug delivery*. Nano Research., 1(2008), s. 203-212
41. Chen B., Liu M., Zhang LM. *Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector*, Journal Material Chemical., 21(2011), s. 7736-7741
42. Liu Z., Robinson JT., Tabakman SM. *Carbon materials for drug delivery & cancer therapy*. Materials Today, 14(2011), s. 316-323
43. Bao HQ., Pan YZ., Ping Y. *Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery*, Small., 7(2011), s. 1569-1578
44. Zhang LM., Lu ZX., Zhao QH. *Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide*, Small., 7 (2011), s. 460-464
45. Zhao Y., Xing G., Chai Z. *Nanotoxicology: are carbon nanotubes safe?* Nature Nanotechnology., 3(2008), s. 191-192
46. Rana VK., Choi MC., Kong JY. *Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets*, Macromolecular Materials and Engineering., 296(2011); 131-140

## **Medycyna w skali nano – grafen**

### Streszczenie

Nanomedycyna jest prężnie rozwijającą się gałęzią medycyny wykorzystującą nanocząsteczki w biomedycynie, począwszy od inżynierii tkankowej a skończywszy na farmacji. Uczeni zapowiadają, że nanocząsteczki i ich właściwości zrewolucjonizuje niemal wszystkie dziedziny medycyny. Grafen jest dwuwymiarową strukturą złożoną z atomów węgla. Powierzchnia grafenu ma najmniejszą grubość z możliwych: zaledwie jednego atomu. Grafen pochłania jedynie 2,3% światła, jest ponad stukrotnie wytrzymalszy od stali i niesamowicie elastyczny, a przy tym twardszy, niż diament. Dodatkowo grafen jest bardzo wytrzymały termicznie i chemicznie. Fizykochemiczne właściwości grafenu spowodowały, że jest on coraz chętniej wykorzystywany w pracach badawczo-naukowych w celu poszukiwania nowych zastosowań w biotechnologii, farmacji i medycynie. Obecnie przeprowadzone badania wykazują, że grafen z powodzeniem może być wykorzystywany w nanomedycynie jako rusztowanie dla komórek, jako budulec innowacyjnych implantów oraz nośnik leków i genów.

Słowa kluczowe: nanomedycyna, grafen

## **Medicine at the nanoscale – graphene**

### Abstract

Nanomedicine is a rapidly developing branch of medicine which uses nanoparticles in biomedical application, ranging from tissue engineering and ending with the pharmacy. Researches predict that the nanoparticles and their properties will revolutionize almost every area of medicine. Graphene is a two-dimensional structure composed of carbon atoms. The surface of graphene has the smallest thickness possible: just one atom. Graphene absorbs only 2.3% of the light, is more durable than steel, extremely flexible and hundred times stronger than diamond. Additionally, graphene is very thermally and chemically durable. Physicochemical properties of graphene cause that it is becoming more likely used in scientific research and application of biotechnology, pharmacy and medicine in biotechnology, pharmacy and medicine. Currently, studies have shown that graphene can be successfully used in nanomedicine as a scaffold for the cells, as innovative material of implants and as drug and gene delivery.

Keywords: nanomedicine, graphene

## **Matryce hydrożelowe – zastosowania superabsorbentów polimerowych w medycynie**

### **1. Wstęp**

Obecnie polimery coraz częściej są stosowane jako nośniki w systemach uwalniania substancji aktywnej. Powstało wiele prac badawczych poświęconych temu zagadnieniu. Mikrokapsułki i mikrosfery polimerowe to znane nośniki leków, wewnątrz których znajduje się odpowiednia ilość leczniczej substancji [1÷3].

Aktualnie dużym zainteresowaniem cieszą się matryce hydrożelowe, za pomocą których możliwa jest regulacja szybkości uwalniania substancji czynnej. Takim zastosowaniem mogą być żelowe mikrosfery wprowadzane do oka. Ze względu na charakterystyczną strukturę spowalniają one uwalnianie leku a tym samym wydłużają czas jego działania. Superabsorbenty polimerowe służą także do produkcji aktywnych opatrunków, stosowanych w przypadku osób z rozległymi poparzeniami lub trudno gojącymi się ranami. Opatrunki hydrożelowe zawierają w sobie substancje czynne, m.in. zapobiegające powstawaniu obrzęków oraz przyspieszające proces gojenia się ran, uwalniane z odpowiednią szybkością, a co jest najważniejsze nie powodują podrażnienia rany [3].

Popularność matryc hydrożelowych wynika z licznych korzystnych ich właściwości, do których należą dwie najważniejsze:

- biodegradowalność, czyli rozkład w odpowiednich warunkach pod wpływem mikroorganizmów z wydzielaniem np. amoniaku, wody i dwutlenku węgla;
- biogodność, czyli otrzymane superabsorbenty polimerowe oraz produkty ich rozkładu są nietoksyczne [4].

Superabsorbenty to hydrofilowe, usieciowane, pęczniejące w wodzie polimery. Niekiedy nazywane są inteligentnymi żelami, ponieważ 1g hydrożelu może pochłonąć nawet 1000g wody [5].

---

<sup>1</sup> mateusz.niscior08@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biochemików UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

<sup>2</sup> monika.adamczyk.umcs@gmail.com Studenckie Koło Naukowe Biochemików UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

<sup>3</sup> katarzyna.tarnawska.umcs@gmail.com Studenckie Koło Naukowe Biochemików UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wyróżniamy dwie podstawowe grupy superabsorbentów. Pierwsze z nich to żele fizyczne określane mianem żeli odwracalnych. Mają one trójwymiarowe przestrzenne usieciowanie, w którym łańcuchy polimerowe są połączone przez wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne i oddziaływania hydrofobowe. Takie żele są nietrwałe i poddając je ogrzewaniu mogą zostać przekształcone w układ polimerowy np. agar i żelatyna. Drugą grupą stanowią żele chemiczne – również posiadają trójwymiarową strukturę przestrzenną, ale są bardziej trwałe niż żele fizyczne, ponieważ ich łańcuchy polimerowe są połączone wiązaniami kowalencyjnymi [6].

Celem niniejszej pracy było podsumowanie dotychczas uzyskanych informacji na temat polimerowych superabsorbentów oraz możliwości zastosowania hydrożeli w medycynie.

## **2. Metody otrzymywania hydrożeli**

Opracowano szereg metod otrzymywania hydrożeli. Wybór danej metody produktu uwarunkowany jest przeznaczeniem do konkretnych metody:

- Radiacji;
- sieciowania chemicznego;
- sieciowania fizycznego [4].

Hydrożele mogą być otrzymywane poprzez wytwarzanie wiązań kowalencyjnych w metodzie radiacji, czy też przez zastosowanie odpowiednich czynników sieciowania w metodzie sieciowania chemicznego [6]. W procesie sieciowania hydrożeli ważna jest nie tylko użyta metoda, ale także rodzaj polimeru oraz zastosowanie powstałego produktu. Końcowymi produktami są najczęściej makrocząsteczki posiadające właściwości umożliwiające ich zastosowanie w medycynie jako rusztowania w rekonstrukcji rdzenia kręgowego czy konstruowaniu sztucznej trzustki. Inną formą zastosowań hydrożeli są ich nanocząsteczkowe formy wykorzystywane jako nośniki leków.

## **2.1. Metody radiacji**

Metoda radiacyjna do sieciowania hydrożeli wykorzystuje promieniowanie gamma, którego źródłem są izotopy kobaltu  $^{60}\text{Co}$  lub cezu  $^{137}\text{Cs}$ . Źródłem promieniowania gamma może być także strumień elektronów z akceleratora. W wyniku sieciowania radiacyjnego powstają wiązania kowalencyjne, które ulegają rozpadowi jedynie podczas rozpadu całej makrostruktury cząsteczki [6]. Stosowanie metody radiacyjnej jest korzystne podczas produkcji hydrożeli przeznaczonych na sprzedaż ponieważ podlegają one jednocześnie sterylizacji [7]. Jest to metoda w wyniku, której nie powstają odpady przez co przyczynia się to do redukcji substancji niebezpiecznych zarówno dla ludzi jak i środowiska. Tą metodą otrzymuje się hydrożele w wyniku usieciowania polimerów: poli-alkoholu winylowego, poli- kwas akrylowy, poli-tlenek etylenu.

## **2.2. Metody sieciowania chemicznego**

Wśród metod chemicznych wyróżniamy następujące procesy sieciowania w:

- sieciowanie przez rodnikową polimeryzację- metoda w wyniku, której otrzymywane są hydrożele ze związków chemicznych o małej masie cząsteczkowej z wykorzystaniem czynników sieciowania. Hydrożelem otrzymanym tą metodą jest poli-hydroksymetakrylen. Substratem do otrzymywania tego polimeru jest hydroksymetakrylen oraz czynnik sieciujący- dimetakrylen glikolu etylenowego;
- sieciowanie przez chemiczną reakcję komplementarnych grup –reakcja ta jest możliwa dzięki obecności grup funkcyjnych: karboksylowej, aminowej, hydroksylowej. Sieciowanie zachodzi na skutek powstawania wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami aminową i karboksylową, izocyjanową i hydroksylową lub aminową [8];
- sieciowanie przez naświetlanie do którego używa się najczęściej promieniowania gamma oraz wiązki elektronów [9].

Wodne roztwory polimerów poddaje się działaniu promieniowania w wyniku czego powstają rodniki na skutek rozrywania wiązań C-H. Promieniowanie powoduje powstawanie rodników hydroksylowych pochodzących z cząsteczek wody. Rodniki hydroksylowe reagują łańcuchami polimerowymi dając w ten sposób makrorodniki. Makrorodniki prowadzą do utworzenia wiązań kowalencyjnych w łańcuchach oraz kształtowania końcowej usieciowanej struktury [10÷12].

### 2.3. Metody sieciowania fizycznego

Hydrożele można otrzymywać metodami fizycznymi, do których zaliczamy:

- sieciowanie przez jonową interakcje – w ten sposób otrzymuje się hydrożel z wykorzystaniem alginianu. W reakcji polimeru alginianowego z jonami dwuwartościowymi wapnia  $\text{Ca}^{2+}$  w temperaturze pokojowej oraz w fizjologicznym pH zachodzi proces sieciowania, którego produktem jest hydrożel;
- sieciowanie przez tworzenie wiązań wodorowych- hydrożele będące produktem z wykorzystaniem tej metody ulegają stopniowemu rozpuszczaniu na skutek dysocjacji powstałych kompleksów. Przykładem kompleksu tworzącego wiązania wodorowe jest kompleks polietyloglikolu z kwasem poliakrylowym i polimetakrylowym. Wiązanie wodorowe powstające w tym kompleksie powstaje pomiędzy tlenem polietylenoglikolu a grupą karboksylowa kwasu polimetakrylowego [8];
- sieciowanie przez interakcje z białkami - sieciowanie może zostać przeprowadzone z wykorzystaniem genetycznie zaprojektowanych białek oraz przy użyciu interakcji antygen- przeciwciało. W tej metodzie środkiem sieciującym jest poliakrylamid [13]. Hydrożel ulega pęcznieniu po wystawieniu na wolny antygen, który wiążąc się z przeciwciałem powoduje spadek gęstości usieciowania.

## 3. Układy chemiczne stosowane do produkcji hydrożeli

Najczęstszą metodą do otrzymywania hydrożeli jest kopolimeryzacja monomerów winylowych i diwinylowych zachodząca w obecności inicjatorów redoksowych. Do monomerów o podstawowym znaczeniu możemy zaliczyć akryloamid, kwas akrylowy, kwas metakrylowy oraz ich pochodne [1, 5]. Natomiast do najczęściej stosowanych monomerów diwinylowych należy N,N-metyleno-bisakryloamid (NMBA). Rzadziej stosowanymi są diakrylan glikolu etylenowego, tetrahydroksymetyloacetylnomocznik, diwinylobenzenosulfonian sodu czy akrylan alilu [1].

### 3.1. Poli-glikol etylenowy (PEG)

Jest to związek wykazujący dobra rozpuszczalność w wodzie, chlorku metylenu, toluenie, acetonie i etanolu. Biokompatybilność oraz nietoksyczność PEG sprawia, że związek ten może być bezpiecznie stosowany w farmacji, biomedycynie, inżynierii komórkowej czy do produkcji hydrożeli. Na bazie PEG w procesie wolnorodnikowego lub radiacyjnego sieciowania końcowych grup hydroksylowych możemy otrzymać superabsorbenty wykazujące bardzo dużą chłonność. Mogą one

być otrzymywane również w wyniku kopolimeryzacji z innymi związkami chemicznymi. Jako czynniki sieciujące możemy wykorzystać triizoaminy, triole, izocyjany wielofunkcyjne, a także mieszaniny diizocyjaninów [5, 14].

### **3.2. Poli-N-winylopirolidon (PVP)**

Związek ten wykazuje rozpuszczalność w wodzie alkoholach, węglowodorach aromatycznych, a także w kwasach organicznych i fluorowcopochodnych. Do zastosowań tego polimeru należą produkcja syntetycznego osocza krwi, a także produkcja hydrożeli, które otrzymuje się w procesie sieciowania PVP diwinyloeterami dietylenoglikolu. Hydrożele otrzymywane w ten sposób stosowane są np. jako materiały opatrunkowe czy systemy kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej [5, 14]

### **3.3. Poli-alkohol winylowy (PVAL)**

PVAL należy do polimerów rozpuszczalnych w wodzie natomiast nierozpuszczalnych w większości rozpuszczalników organicznych. Na bazie tego polimeru hydrożele otrzymywane są podczas wolnorodnikowego lub radiacyjnego sieciowania grup hydroksylowych. Czynnikiemami sieciującymi w tych reakcjach są aldehyd glutarowy lub 1,4-dizocyjanin heksylenu. Otrzymywane w ten sposób hydrożele stosowane są do produkcji membran, opatrunków aktywnych, systemów kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej a także implantów [5, 14, 15].

### **3.4. Kwas metakrylowy**

Związek ten jest dobrze rozpuszczalny w wodzie oraz w wodnych roztworach soli nieorganicznych. W wyniku kopolimeryzacji kwasu metakrylowego z akryloamidem powstają hydrożele, które stosowane są w medycynie oraz farmacji. Metakrylan-2-hydroksyetylu jako pochodna kwasu metakrylowego stosowany jest m.in. do produkcji soczewek kontaktowych [5, 15÷17].

### **3.5. Kwas akrylowy**

Jest to związek dobrze rozpuszczalny w wodzie oraz w wodnych roztworach soli nieorganicznych. Charakteryzuje się on dość dużą reaktywnością chemiczną podobnie jak inne monomery akrylowe. Hydrożele otrzymywane na bazie kwasu akrylowego otrzymuje się podczas homopolimeryzacji kwasu akrylowego lub jego kopolimeryzacji z akryloamidem. Związkami sieciującymi podczas tego procesu stosuje się połączenia akrylowe oraz diwinyłowe, do których należą np. diwinylo-benzenosulfonian sodu, diakrylan glikolu etylenowego, akrylan glikolu a także N,N'-metyleno-bis-akryloamid. Hydrożele akrylowe stosowane są

między innymi jako opatrunki medyczne, matryce w systemie kontrolowanego uwalniania substancji czynnej a także w inżynierii tkankowej [5, 14, 16].

### **3.6. Poli-kwas asparaginowy (PKA)**

Jest to związek higroskopijny, rozpuszczalny w wodzie a dzięki swojej nietoksyczności i biodegradowalności stosowany jest jako biomateriał używany np. w onkologii. Hydrożele otrzymywane na bazie poli-kwasu asparaginowego otrzymuje się w wyniku sieciowania radiacyjnego lub chemicznego, które przeprowadza się w rozpuszczalniku polarnym używając poliamin, politioli a także lizyny lub cysteiny. Sieciowanie chemiczne można przeprowadzić metodą standardową lub przy pomocy promieniowania mikrofalowego [18÷21].

### **3.7. Bezwodnik maleinowy**

Bezwodnik maleinowy jest to związek nierozpuszczalny w wodzie oraz nie ulegający homopolimeryzacji. Należy on do silnych akceptorów elektronów, łatwo ulegają kopolimeryzacji rodnikowej. Reakcje te najlepiej jest prowadzić w obecności benzenu, w którym powstający polimer się nie rozpuszcza i wytrąca się w postaci białego proszku. Dzięki możliwości łatwego otwierania pierścienia bezwodnika maleinowego można łatwo sieciować jego kopolimery z innymi związkami. Czynnikiem sieciującymi stosowanymi najczęściej są glikole, cukry oraz oksyetylenowa gliceryna także cukry [5].

### **3.8. Polisacharydy**

W wyniku modyfikacji polisacharydów można otrzymać hydrożele polimerowe. Taka modyfikacja chemiczna składa się z: żelatynowania, szepienia odpowiedniego monomeru, hydrolizy oraz suszenia. Monomerami szepiającymi najczęściej stosowanymi są akrylonitryl, akryloamid oraz kwas akrylowy. W tym przypadku sieciowanie następuje w trakcie hydrolizy, natomiast inną metodą sieciowania jest dodanie do roztworu skrobi N-hydroksymetylenoakryloamidu. Podczas modyfikacji celulozy otrzymuje się sól sodową karboksy-metylocelulozy, która po usieciowaniu za pomocą np. chlorometyloksiranu stosowana jest do otrzymywania żeli służący następnie do produkcji pampersów. Hydrożele polisacharydowe stosowane są również w inżynierii tkankowej lub jako opatrunki aktywne [5, 16].



#### **4. Właściwości hydrożeli**

Superabsorbenty posiadają szereg właściwości fizycznych, do których należą m.in.:

- Stopnia usieciowania polimeru;
- Stosunku reagentów;
- Temperatury reakcji;
- Charakteru grup funkcyjnych;
- Ilości inicjatora;
- Rodzaju matrycy polimerowej;
- Stopnia rozdrobnienia produktu;
- Składu chemicznego i temperatury pochłanianego roztworu [5, 14, 16].

Pożądanymi cechami superabsorbentów są:

- Duża pojemność absorpcji;
- Dobra wytrzymałość mechaniczna;
- Zdolność do wchłaniania wody;
- Duża szybkość chłonięcia płynu w sposób odwracalny;
- Nietoksyczność;
- Odporność termiczna i chemiczna;
- Elastyczność [5, 14, 16].

Hydrożele mają trójwymiarową usieciowaną strukturę zbudowaną z łańcuchów polimerowych połączonych ze sobą w pewnych punktach. Łańcuchy polimerowe w stanie suchym mają postać skręconych kłębków. Dopiero pod wpływem wody obecne w łańcuchach grupy funkcyjne ulegają dysocjacji i solwatacji. Odłączają się dodatnie kationy, a ujemne ładunki związane z łańcuchami polimeru odpychają się pod wpływem działania sił elektrostatycznych. W skutek tego następuje rozluźnienie kłęбка polimeru i umożliwia dalsze wchłanianie cieczy aż do utworzenia żelu. Całkowite zakończenie tego procesu zachodzi wówczas, gdy łańcuchy polimeru tworzące przestrzenną sieć ulegną maksymalnemu wydłużeniu [5].

Pęcznienie superabsorbentów, zwane również chłonnością, wyrażone jest najczęściej w gramach wody lub roztworu pochłoniętych przez 1 gram suchego żelu. Może wynosić od kilku do kilkuset  $\frac{g_{\text{roztworu}}}{g_{\text{superabsorbenta}}}$  i uzależniony jest od wielu czynników. Zjawisko to w dużym stopniu zależy od charakteru grup funkcyjnych i stopnia usieciowania polimeru. Kolejnym ważnym czynnikiem ograniczającym jest stopień rozdrobnienia produktu, a także skład pochłanianego roztworu. Występowanie związków chemicznych oraz elektrolitów zdolnych do reakcji z grupami funkcyjnymi żelu przeważnie pogarsza chłonność superabsorbentów [14].

Pęcznienie to zjawisko dyfuzyjne kierowane przez powinowactwo cząstek pęczniejących materiału do cząstek substancji. Równowaga pęcznienia jonowego żelu jest określana przez bilans trzech głównych sił:

- Ciśnienia osmotycznego wewnątrz sieci, wynikającego z ruchliwości przeciwjonów otoczonych grupami stałych ładunków;
- Wolnej energii mieszaniny ładunków sieci i rozpuszczalnika;
- Ciśnienia elastycznego pęcznienia [4].

Siły 1 i 2 faworyzują pęcznienie żelu, a siła 3 wprost przeciwnie.

## **5. Zastosowanie hydrożeli w medycynie**

Ze względu na duże podobieństwo hydrożeli do ludzkiej tkanki oraz ich biokompatybilność i biozgodność stają się one celem wielu prac badawczych. Badania te niosą nadzieję na pomoc wielu osobom chorującym na cukrzycę, mogą również pomóc odzyskać częściową sprawność fizyczną osobom z uszkodzonym rdzeniem kręgowym. Dzięki cechom jakie posiadają hydrożele znalazły one zastosowanie w optometrii do produkcji soczewek kontaktowych, w leczeniu ciężkich oparzeń oraz trudno gojących się ran stanowiąc grupę opatrunków trzeciej generacji. Hydrożele są również nośnikami wykorzystywanymi jako systemy dostarczania leków [2, 4].

### **5.1. Regeneracja uszkodzonego rdzenia kręgowego**

Uszkodzenia rdzenia kręgowego były uznawane za nieuleczalne. Prowadzono jednak badania, które wykazały, że aksony neuronów ośrodkowego układu nerwowego mają zdolność do samoregeneracji [22]. Jako materiał umożliwiający regenerację rdzenia kręgowego zaczęto brać pod uwagę polimerowe rusztowania, które pełniły by funkcję macierzy zewnątrzkomórkowych co pozwoliłoby na przerost aksonów w miejscu gdzie wystąpił ubytek rdzenia kręgowego oraz na odbudowę osłonki mielinowej. Hydrożele zastosowane w regeneracji rdzenia kręgowego dzięki sieciom polimerowym spełniają funkcję rusztowania umożliwiając w ten sposób regenerację aksonów [4, 22].

Hydrożele posiadają szereg korzystnych cech umożliwiających ich zastosowanie jako implanty w rdzeniu kręgowym. Są to m.in.

- porowatość, miękkość;
- łatwość migracji i adherencji;
- łatwość wymiany produktów przemiany materii;
- elastyczność, dzięki której mogą dopasować się do kształtu;
- biodegradowalność [4].

Do tworzenia polimerowych rusztowań macierzy komórkowej stosuje się: kolagen, kwas hialuronowy, agarozę, alginian, chitozan, metylocelulozę [22].

## **5.2. Wytwarzanie opatrunków hydrożelowych**

Proces gojenia się ran zachodzi dwukrotnie szybciej jeżeli zastosuje się opatrunek aktywny utrzymujący stale wilgoć. Jednym z rodzajów takich opatrunków są hydrożele. Hydrożelowe opatrunki dostępne komercyjnie to np.: Aguagel, Geliperm, Vigilion, Nu-Gel, Granugel, IntraSite Gel [1, 6]. Znalazły one zastosowanie w leczeniu ran, które nie sączą się intensywnie ze względu na małe możliwości chłonne. Ponadto wykorzystywane są w leczeniu trudno gojących się ran powstających na skutek odleżyn. Innym przykładem zastosowania tego typu opatrunków jest transplantologia, gdzie po przeszczepie skóry miejsce pobrania pokrywane jest opatrunkiem hydrożelowym. Takie rozwiązanie zapewnia optymalne środowisko dla gojenia ran, umożliwia wymianę gazową oraz przepuszczanie tlenu ograniczając w ten sposób rozwój groźnych beztlenowych patogenów [19].



Rys. 1. Opatrunek hydrożelowy stosowany w transplantologii [23]

Dzięki zastosowaniu opatrunków hydrożelowych rana znajduje się stale w środowisku wilgotnym dlatego też, dla pacjenta mniej bolesne jest stosowanie takich materiałów. Kolejnym atutem zastosowania hydrożelowych opatrunków jest absorpcja wydzielin i toksyn bakteryjnych, które nie zalegają w ranie [6]. Hydrożelowe opatrunki są przykładem kompozytów naturalnych i syntetycznych polimerów. Wykorzystuje się do tego celu np. polimery naturalne takie jak: agar żelatyna, alginiany,

celuloza, skrobia, guma sterculia i polimery syntetyczne takie jak: poliglikol etylenowy (PEG), poli(alkohol winylowy) (PVA), poli-kwas akrylowy (PAA) [4].



Rys. 2. Zastosowanie hydrożelowego opatrunku na trudno gojącą się ranę [23]



Rys. 3. Opatrunek hydrożelowy nałożony na ranę oparzeniową [23]

### **5.3. Wytwarzanie narządów hybrydowych**

Hydrożele są grupą biomateriałów, które mogą być wykorzystywane również w inżynierii biomedycznej. Pomocna jest przy tym wiedza z zakresu medycyny jak i metod stosowanych w inżynierii materiałowej.

Obecnie prowadzone są badania nad otrzymywaniem hybrydowych organów wewnętrznych. Mogłyby one zastąpić uszkodzone narządy np. trzustka czy wątroba. Prototyp takiej trzustki jest zbudowany z membrany otaczającej żywe komórki zwierzęce, która chroni je przed zniszczeniem

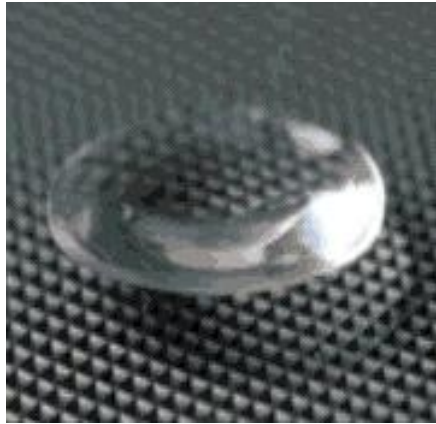
przez układ odpornościowy biorcy. Hydrożelowa membrana zbudowana z poli-alkoholu winylowego jest biokompatybilna z środowiskiem zewnętrznym. Nie ulega ona otorbieniu przez tkanki oraz jest przepuszczalna dla glukozy, insuliny a także tlenu. Opierając się na pochodnych celulozy oraz akrylanów konstruowane są prototypy nerki, strun głosowych i ścięgien, produkowanych z matryc hydrożelowych [23÷25].



Rys.4. Hydrożel stosowany do produkcji implantów narządowych [24]

#### **5.4. Produkcja soczewek kontaktowych**

Po raz pierwszy hydrożelowe soczewki wyprodukowano w 1960 roku z hydrożelu a dokładniej z 2-hydroksymetakrylenu. Jest to słabo usieciowany polimer używany do produkcji soczewek kontaktowych. Polimer ten zawiera w swojej strukturze grupy-OH dzięki czemu nabiera właściwości hydrofilowych [26]. W postaci nie związanej z wodą posiada cechy szkła organicznego pozbawionego elastyczności. dopiero po związaniu cząsteczek wody przybiera postać elastycznego i miękkiego materiału, który łatwo dopasowuje się do kształtu oka [13]. Tlen pobierany jest przez komórki rogówki bezpośrednio z powietrza, natomiast w przypadku zastosowania hydrożelowych soczewek jest on transportowany za pośrednictwem fazy wodnej hydrożelu [26]. Soczewka kontaktowa styka się z rogówką oka dlatego też materiały używane do produkcji soczewek powinny charakteryzować się biozgodnością z tkankami na powierzchni oka oraz być nietoksyczne. Jedną z głównych wad jakie posiadają soczewki kontaktowe produkowane z wykorzystaniem hydrożeli jest ich podatność na odkształcenia oraz ograniczona trwałość [26].



Rys. 5. Hydrożelowa soczewka kontaktowa [4]

### 5.5. Hydrożele jako systemy dostarczania leków

Materiały w formie hydrożelowych matryc pozwalają na nieprzerwane lub kontrolowane wypuszczenie zawartych w nich leków do płynów organizmu po ich wszczepieniu, wstrzyknięciu lub wprowadzeniu do organizmu inną drogą. Substancje te są zamykane w biozgodnych nanoformach takich jak: nanocząsteczki, nanokapsułki, układy micelarne oraz koniugaty. Wykorzystanie nanoform jak systemów dostarczania leków warunkuje:

- ukierunkowane dostarczanie leków;
- biozgodność;
- działanie leku w miejscu docelowym;
- poprawę trwałości chemicznej oraz enzymatycznej środków terapeutycznych [2, 5, 6].

Istnieją dwie różne koncepcje działania układów dostarczania leków. W pierwszej z nich wskutek spęcznienia hydrożelu następuje uwalnianie małych cząsteczek leku. Według drugiej koncepcji rozkładowi ulega matryca polimerowa zawierająca określoną dawkę leku. W związku z tym dyfuzja leku do otoczenia jest miarą szybkości tego procesu [3]. Na szybkość uwalniania leku z nanocząsteczki ma wpływ wielkość oczek w matrycy hydrożelu, a wielkość oczek zależy natomiast od stopnia usieciowania monomerów tworzących hydrożel.

Istotną wadą zastosowania takich hydrożeli nazywanych „inteligentnymi” jest ich wolny czas reakcji. Bodźcem powodującym zmiany w strukturze hydrożelu mogą być : temperatura, prąd, światło, ciśnienie, dźwięk, pole magnetyczne, jony, pH, rozpuszczalniki. Zastosowanie hydrożeli jako systemów dostarczania leków niesie jednak ze

sobą pewne problemy. Jest to materiał mający niską wytrzymałość na rozciąganie, może ulec przedwcześnie rozpuszczeniu. Dodatkowym problemem jest załadunek substancji leczniczej wewnątrz nanocząsteczki szczególnie, gdy mamy do czynienia z lekami hydrofobowymi [17].

## 6. Podsumowanie

Superabsorbenty należą do materiałów, które z wielkim powodzeniem można wykorzystywać do wielu badań w dziedzinie farmacji i medycyny. Na bazie tych związków możliwe jest otrzymywanie nowoczesnych materiałów, co powiązane jest niewątpliwie z procesami syntezy hydrofilowych polimerów z wybranymi i pożądanymi grupami funkcyjnymi a także układów wrażliwych na bodźce zarówno chemiczne jak i fizyczne tj. temperatura, światło, pH, elektrolity i inne. Badania nad modyfikacją fizyczną hydrożeli mogłyby zapewnić o wiele szybsze i kontrolowane uwalnianie substancji czynnej. Takie rozwiązanie z pewnością pomogłoby wielu pacjentom w rekonwalescencji, a także mogłoby zrewolucjonizować obecne metody leczenia.

## Literatura

1. Bereś J., Kołędkowska M. *Superabsorbenty* Chemik, vol. 45, no. 3, pp. 59-61, 1992
2. Kang H., Xie J., Patent J. Appl. Polym. Sci., no. 88, pp. 494-499, 2003
3. Tyliczszak B., Pielichowski K. *Charakterystyka matryc hydrożelowych-zastosowania biomedyczne superabsorbentów polimerowych*. Czas. Tech. Chem., vol. 104, pp. 159-167, 2007
4. Głados S., Maciejewski M. *Wiad. Chem.*, no. 52, pp. 101-123, 1998
5. Nałęcz M., *Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej*. Biomateriały, vol. 4. Warszawa: PAN, 2002
6. Bialik-Wąs K., Pielichowski K. *Polimerowe opatrunki hydrożelowe dla zastosowań biomedycznych*. Czas. Tech. Chem., vol. 108, pp. 39-52, 2011
7. Pluta J., Karolewicz B. *Hydrożele: właściwości i zastosowanie w technologii postaci leku. I. Charakterystyka hydrożeli*. Polim. Med., vol. 34, no. 2, pp. 1-31, 2004
8. Rosiak J.M., Ułański P. *Hydrogels for biomedical purposes*. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At., no. 55, pp. 139-151, 1995
9. Hennink W. E., van Nostrum C. F. *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 54, no. 1, pp. 13-36, Jan. 2002
10. Ułański P., Janik I., and Rosiak J. M., *Radiation formation of polymeric nanogels*. Radiat. Phys. Chem., vol. 52, no. 1-6, pp. 289-294, Jun. 1998
11. Kishi R., Hirasa O., Ichijo H. *Fast responsive poly(N-sopropylacrylamide) hydrogels prepared by  $\gamma$ -ray irradiation*. Polym. Gels Netw., vol. 5, no. 2, pp. 145-151, Apr. 1997

12. Łukaszek A., Karbarz M., Stojek Z., *Przejścia fazowe środowiskowo podatnych żeli polimerowych. Część I: Ogólna charakterystyka, podział i metody otrzymywania żeli*. Zesz. Nauk. SGSPSżko Główna Służby Pożarniczej, 2009
13. Szlezzyngier W., *Tworzywa sztuczne*, Fosze., vol. 4. Rzeszów, 2000
14. el Fray M., *Elastomery*, no. 4, pp. 10-14, 2005
15. Peppas N. A., Bures P., Leobandung W., *European J. of Pharm and Biopharmaceutics*. Eur. J Pharm Biopharm., vol. 50, pp. 27-47, 2000
16. Stachurek I. and Pielichowski K., *Ethylene oxide-containing (co) polymers in controlled drug delivery*. Arch. Mater. Sci., vol. 26, no. 4, pp. 279-301, 2005
17. Polaczek J., Dżiki E., Pielichowski J., *Polimery*, no. 1, pp. 61-65, 2003
18. Roweton S., Huang S. J., and Swift G., Poly (aspartic acid): synthesis, biodegradation, and current applications, *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 5, no. 3, pp. 175-181, 1997
19. Masayuki T., Masaki T., Tetsuro M., *Polymer* no. 11, pp. 2791-2795, 1997
20. Aylswerth J.D., *Farm. Chem.*, no. 2, pp. 64-65, 1996
21. Lis A., Szarek D., Laska J. *Praca poglądowa*. Polim Med, vol. 43, no. 2, pp. 59-80, 2013
22. Zdebiak P., el Fray M. *Perspektywy zastosowań hydrożeli polimerowych i elastomerów termoplastycznych jako materiałów chrzęstnopodobnych*. Inż. Biomater., vol. 9, pp. 27-35, 2006
23. Ułański P., Kadłubowski S., Rosiak J. M., *Synthesis of poly (acrylic acid) nanogels by preparative pulse radiolysis*. Radiat. Phys. Chem., vol. 63, no. 3, pp. 533-537, 2002
24. Kozicki M., Kujawa P., Rosiak J.M. *Pulse radiolysis study of diacrylate macromonomer in aqueous solution*. Radiat. Phys. Chem., vol. 65, no. 2, pp. 169-174, 2002
25. Floriańczyk Z., Penczek S. *Chemia polimerów*. tom III, Oficyna Wydawnicza Politech. Warsz. Warszawa, 1998



## **Matryce hydrożelowe – zastosowania superabsorbentów polimerowych w medycynie**

### **Streszczenie**

Tematem artykułu jest ogólna charakterystyka, a także opis właściwości oraz otrzymywania hydrożeli. Wśród tego typu materiałów możemy wyróżnić zarówno naturalne jak i te pochodzenia syntetycznego. Matryce hydrożelowe są bardzo często stosowane w medycynie. Do ich najważniejszych biomedycznych zastosowań należy użyć ich jako nośników leków oraz substancji stosowanych w inżynierii tkankowej. Superabsorbenty polimerowe mogą służyć do produkcji aktywnych opatrunków, stosowanych w przypadku osób z rozległymi poparzeniami lub trudno gojącymi się ranami. Hydrożele są w dużym stopniu podobne do ludzkiej tkanki stąd też ich biokompatybilność oraz biogodność stają się celem wielu prowadzonych obecnie prac badawczych. Dzięki opisanym w niniejszym artykule właściwościom jakie posiadają, znalazły one zastosowanie również w optometrii do produkcji soczewek kontaktowych, w leczeniu ciężkich oparzeń czy też trudno gojących się ran.

Słowa kluczowe: hydrożele, zastosowanie, medycyna

## **The hydrogel matrices – applications of absorbent polymers in medicine**

### **Summary**

The theme of this article is general characteristics, as well as a description of the property and to receive hydrogels. Among these types of materials can be distinguished both natural and those of synthetic origin. The hydrogel matrices are often used in medicine. Their most important biomedical applications należy użyć them as carriers of drugs and substances used in tissue engineering. Superabsorbents polymer can be used for the manufacture of active dressings used in patients with extensive burns or wounds difficult curative. Hydrogels are largely similar to human tissue and hence their bioavailability and biocompatibility become the goal of many ongoing research. Thanks described in this article, the properties they have, they were also used in the production of optometrii contact lenses in the treatment of severe burns or poorly healing wounds.

Keywords: hydrogels, applications, medicine

## **Mini-koliste cząsteczki DNA jako potencjalnie bezpieczne i wysoce efektywne nośniki w niewirusowym transferze genów**

### **1. Wstęp**

Terapia genowa w swoim założeniu zazwyczaj polega na wprowadzeniu genu terapeutycznego do komórek w celu usunięcia istniejącego defektu genetycznego. Można powiedzieć, że genoterapia celuje w przyczynę choroby, a nie tylko niweluje występowanie jej objawów. Krytycznym czynnikiem dla powodzenia tego typu terapii jest efektywne dostarczenie transgenu do komórek, w których ulegałby on wysokiej i długotrwałej ekspresji. W celu dostarczenia genów terapeutycznych do komórek oraz ochrony transgenu przed degradacją lub uszkodzeniem, wykorzystuje się nośniki genów. Wśród nich możemy wyróżnić nośniki zarówno wirusowe, jak i niewirusowe [1].

Obecnie najczęściej stosowanymi nośnikami w terapii genowej są wektory pochodzenia wirusowego, wykorzystujące naturalną zdolność wirusów do wnikania do wnętrza komórek. Wybór wektorów wirusowych, w szczególności jeżeli chodzi o terapię *ex vivo*, jest spowodowany odpowiednio wyższym poziomem transdukcji komórek wspomnianymi wektorami w porównaniu do poziomu transfekcji komórek, jaki uzyskuje się przy wykorzystaniu niewirusowych metod transferu genów [2]. W terapiach *in vivo* wybór nośnika nie jest już taki oczywisty, głównie ze względu na szereg niedogodności i zagrożeń jakie wiążą się z zastosowaniem wektorów wirusowych. Podstawowym ograniczeniem tych nośników jest ich mała pojemność oraz krótkotrwała ekspresja transgenu wprowadzanego do komórek [3]. Jednakże największym problemem, w związku z którym poszukuje się alternatywy w postaci niewirusowego

---

<sup>1</sup> arkadiusz\_goede@wp.pl, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

<sup>2</sup> m.gawronski@vp.pl, Studenckie Koło Naukowe Terapii Genowej, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

<sup>3</sup> woźniak.jkw@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Terapii Genowej, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

transferu genów, jest bezpieczeństwo stosowania. Większość nośników wirusowych jest bowiem silnie immunogenna i powoduje ostrą odpowiedź ze strony układu immunologicznego. Prawie wszystkie wektory wirusowe, cechujące się wzbudzeniem długotrwałej ekspresji transgeny, wbudowują go w losowe miejsce w genomie gospodarza, zwiększając ryzyko wystąpienia mutacji insercyjnych [4]. Rozwiązaniem omawianych wyżej problemów mogą być mini-koliste cząsteczki DNA będące bezpieczną i stosunkowo efektywną alternatywą w stosunku do wektorów wirusowych.

## **2. Budowa mini-kolistych cząsteczek nośnikowych**

Mini-koliste cząsteczki nośnikowe (*ang. minicircles*; MC) są dwuniciowymi kolistymi cząsteczkami DNA o superskręconej strukturze [5]. W procesie ich wytwarzania zostały pozbawione tzw. bakteryjnego szkieletu (*ang. bacterial backbone*; BB), w skład którego wchodzi geny oporności na antybiotyki, służące selekcjonowaniu komórek bakteryjnych produkujących nośnik plazmidowy oraz *ori* (*f1ori*) będące miejscem startu replikacji w komórkach bakteryjnych. Kaseta ekspresyjna MC nie różni się znacząco od typowej kasety ekspresyjnej występującej w tradycyjnych wektorach plazmidowych. W skład typowej kasety ekspresyjnej wektora plazmidowego wchodzi promotor, transgen, (najczęściej w postaci cDNA), oraz sygnał poliadenylacji. Niekiedy w celu intensyfikacji transkrypcji w kasecie umieszcza się również wzmacniacz (*ang. enhancer*). Zadaniem promotora jest wiązanie czynników transkrypcyjnych oraz polimerazy RNA, co zapewnia wydajną ekspresję genu terapeutycznego. Wysoki poziom ekspresji wprowadzanego genu terapeutycznego uzyskuje się poprzez wykorzystanie promotorów wirusowych, zapewniających wysoki poziom ekspresji takich jak: promotor wirusa SV40 (*ang. simian virus 40*), RSV (*ang. respiratory syncytial virus*) czy CMV (*ang. cytomegalovirus*) [6]. Innymi typami wykorzystywanych promotorów są promotory tkankowo swoiste oraz indukowalne. Wywoływana przez nie ekspresja sklonowanych genów, choć specyficzna tkankowo, charakteryzuje się jednak zazwyczaj niskim poziomem. Dlatego też naturalne, tkankowo-specyficzne promotory bardzo często poddaje się modyfikacjom, polegającym na zwielokrotnieniu wybranych sekwencji lub łączenia poszczególnych elementów pochodzących z różnych promotorów, co przekłada się na zwiększenie ich wydajności [1].

Kaseta ekspresyjna nie zawsze zawiera pojedynczy gen czy promotor, jednakże często obecność dwóch lub więcej promotorów kontrolujących geny, prowadzi do ich wzajemnego osłabiania się. Aby temu zapobiec najczęściej używa się tylko jednego promotora, a geny przedziela się sekwencją IRES (*ang. interal ribosome entry site*). Sekwencja IRES jest

wewnętrznym miejscem wiązania rybosomów umożliwiającym rozpoczęcie translacji w środkowej części nici mRNA, w efekcie czego z jednego transkryptu mogą być syntetyzowane dwa białka [7]. Drugim genem jest najczęściej gen reporterowy (np. GFP, *ang. green fluorescence protein*; lub gen kodujący  $\beta$ -galaktozydazę) umożliwiający ocenę poziomu transfekcji oraz ekspresji transgenu w komórkach [8].

### 3. Produkcja mini-kolistych cząsteczek nośnikowych

#### 3.1. Technika oparta na rekombinacji

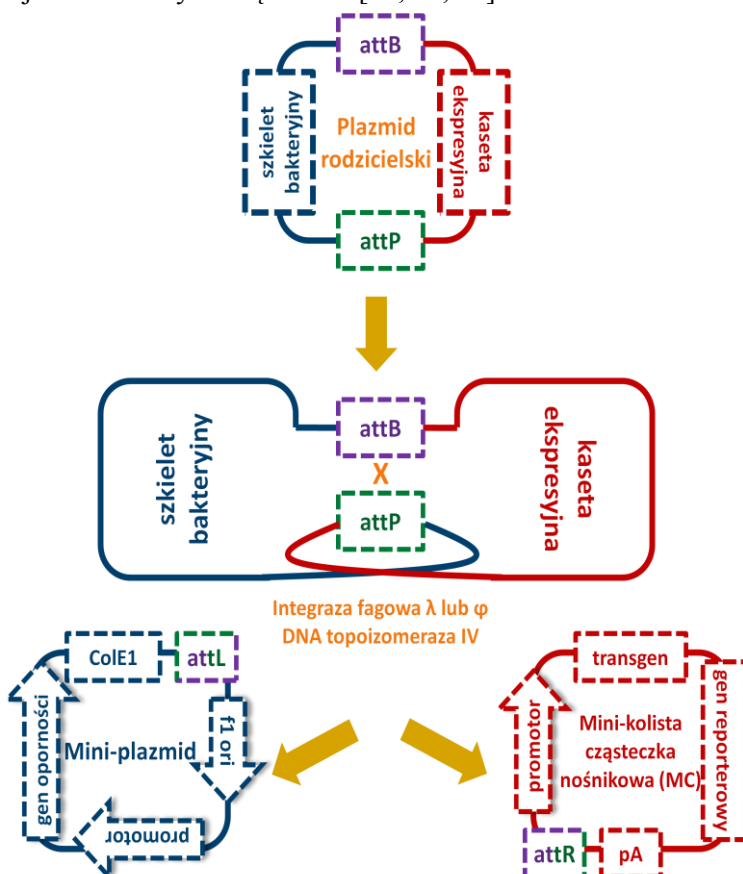
Technologia produkcji mini-kolistych cząstek nośnikowych składa się z dwóch etapów: procesu rekombinacji oraz ich oczyszczania. Samą produkcję MC prowadzi się w specjalnie do tego celu stworzonym szczepie bakterii *E. coli*, z wykorzystaniem rodzicielskiego plazmidu, na bazie którego powstaje cząsteczka mini-kolistego DNA. Zmodyfikowany genetycznie szczep bakterii *E. coli* pozwala zarówno na namnażanie plazmidu rodzicielskiego jak i produkcję mini-kolistych nośników [9].

Plazmid rodzicielski (*ang. parental plazmid*; PP) zawiera: kasetę ekspresyjną zawierającą najczęściej gen reporterowy (np. gen kodujący lucyferazę czy GFP) znajdującą się pod kontrolą promotora (np. SV40, CMV); gen oporności na antybiotyki (np. ampicylinę, kanamycynę); miejsca attP z faga  $\phi$ c31 (phi) lub  $\lambda$  (lambda) oraz sekwencję minimalną attB z chromosomu *E. coli*. Miejsca attP oraz attB występują w tej samej orientacji, zaś kasetę ekspresyjną z genem reporterowym, na końcu której umiejscowiony jest sygnał poliadenylacji oraz wzmacniacz, znajduje się pomiędzy miejscami attP oraz attB [9, 10].

Proces wycinania mini-kolistych cząsteczek nośnikowych z plazmidu rodzicielskiego zachodzi w procesie rekombinacji, w którym uczestniczy specyficznie indukowana, jednokierunkowa integraza najczęściej pochodząca z faga  $\phi$ c31 (phi) lub  $\lambda$  (lambda) – proces ten został przedstawiony na rysunku 1. W środowisku naturalnym integraza fagowa pośredniczy w integracji cyrkularnego genomu faga do chromosomom bakterii *E. coli*. W produkcji mini-kolistych cząsteczek DNA integrazę indukują się podwyższoną temperaturą (42°C w przypadku integrazy faga  $\lambda$ ) lub dostarczeniem arabinozy (w przypadku integrazy faga  $\phi$ c31). Reakcja rekombinacji przeprowadzana przez integrazę faga  $\lambda$  wymaga ponadto obecności białek FIS oraz IHF. Ta sama orientacja miejsc att w plazmidzie rodzicielskim umożliwia wycięcie super-skręconej molekuly podczas procesu rekombinacji i jej dekatencji (proces przeprowadzany przez topoizomerazę IV), co w efekcie prowadzi do powstania dwóch niewielkich, kolistych cząsteczek DNA. Jedna z nich, będąca mini-kolistą

cząsteczką nośnikową, zawiera wyłącznie kasetę ekspresyjną z genem reporterowym, promotorem oraz miejscem rekombinacji attR. Drugą cząsteczką, jaka powstaje w omawianym powyżej procesie rekombinacji, jest mini-plazmid składający się w głównej mierze ze szkieletu bakteryjnego, zawierający *ori*, gen oporności na antybiotyki oraz miejsce rekombinacji attL [9, 10, 11, 12].

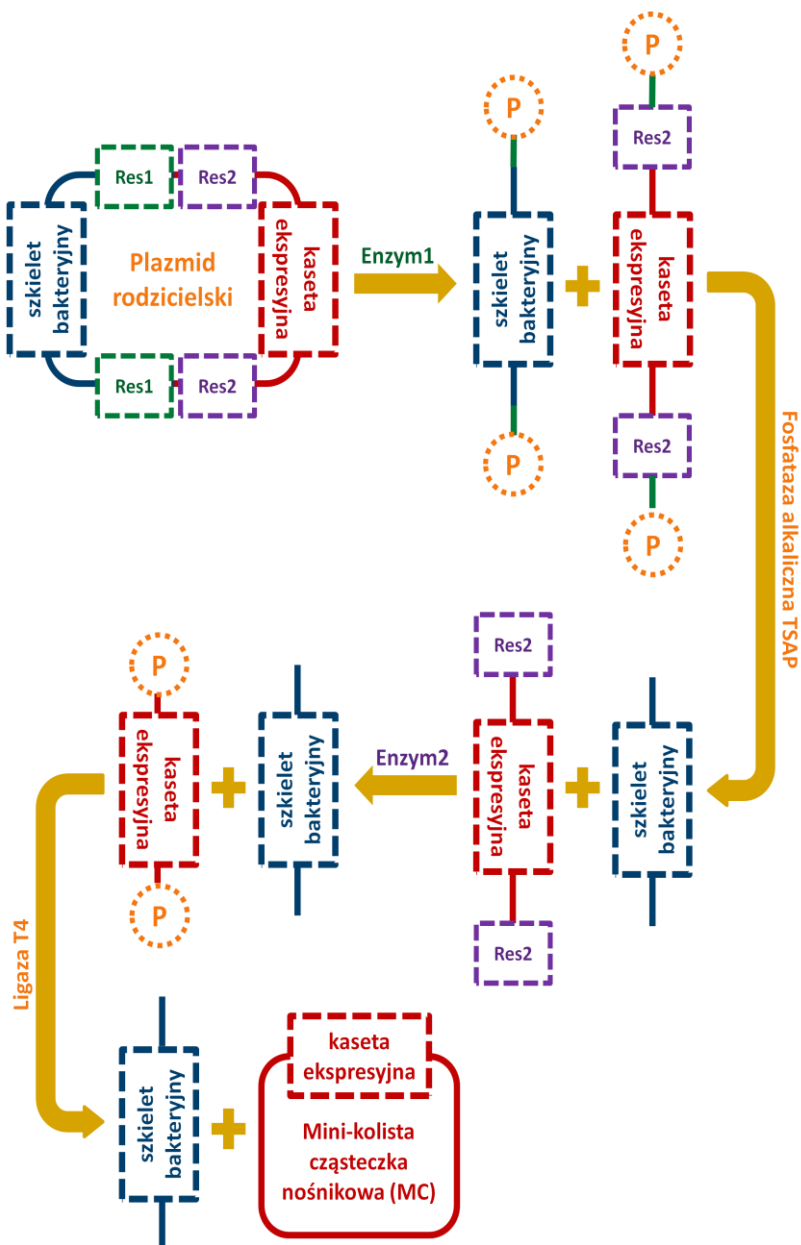
Produkcja mini-kolistych nośników przy zastosowaniu integrazy  $\phi$ c31, z racji wspomnianej wcześniej jednokierunkowości, jest teoretycznie bardziej efektywną metodą, w porównaniu do zastosowania innych rekombinaz takich jak np. Cre. Rekombinazy te przeprowadzają bowiem reakcję dwukierunkową, co może być powodem spadku wydajności produkcji mini-kolistych cząsteczek [13, 14, 15].



Rysunek 6. Schemat produkcji mini-kolistych cząsteczek nośnikowych metodą rekombinacji [opracowanie własne]

### 3.2. Technika oparta na reakcjach enzymatycznych

Inna strategia produkcji MC wykorzystuje szereg katalizowanych enzymatycznie reakcji, przez co jest szybka i nie wymaga specyficznych szczepów bakterii. Do plazmidu rodzicielskiego, z obu stron kasyety ekspresyjnej, w symetrii lustrzanej, wprowadzone zostają dwie pary sąsiadujących ze sobą miejsc restrykcyjnych (Res1 i Res2) przedstawionych na rysunku 2, rozpoznawane przez dwa różne enzymy restrykcyjne. Pierwszy enzym restrykcyjny przecina plazmid rodzicielski w dwóch miejscach restrykcyjnych (Res1) zlokalizowanych po obu stronach szkieletu bakteryjnego, natomiast drugi z enzymów dokonuje cięcia również w dwóch miejscach (Res2), jednakże zlokalizowanych po stronie kasyety ekspresyjnej. W wyniku trawienia restrykcyjnego pierwszym enzymem następuje oddzielenie kasyety ekspresyjnej od szkieletu bakteryjnego i powstanie dwóch liniowych cząsteczek DNA. Usunięcie grup fosforanowych poprzez działania termowrażliwej fosfatazy alkalicznej (*ang. thermosensitive shrimp alkaline phosphatase*; TSAP) w obu liniowych cząsteczkach DNA zapobiega ich ponownej recykulacji. Trawienie restrykcyjne drugim enzymem skutkuje utworzeniem tzw. „lepkich końców”, a dodatek ligazy T4 umożliwia cyrkulizację cząsteczek zawierających na swoim końcu grupy fosforanowe. Omawiana procedura umożliwia zatem selektywną cyrkulizację liniowych cząsteczek zawierających wyłącznie kasetę ekspresyjną, powodując powstanie mini-kolistych cząsteczek nośnikowych pobawionych zarówno szkieletu bakteryjnego, jak również sekwencji SCAR, które obecne są po rekombinacji w procedurze wykorzystującej fagowe integracy [16].



Rysunek 7. Schemat produkcji mini-kolistych cząsteczek nośnikowych metodą enzymatyczną [opracowanie własne]

### 3.3. Oczyszczanie mini-kolistych cząsteczek nośnikowych

Oczyszczanie mini-kolistych cząsteczek nośnikowych z otrzymanej w procesie produkcyjnym mieszaniny zawierającej zarówno mini-plazmidy, jak i plazmid macierzysty polega na wykorzystaniu różnic w wielkości i strukturze cząsteczek. Technika oparta na reakcjach enzymatycznych dostarcza dwie cząsteczki – kolistą cząsteczkę nośnikową oraz liniową postać mini-plazmidu zawierającego szkielet bakteryjny. W technice opartej na rekombinacji przeprowadzanej przez integrazy zazwyczaj wykorzystuje się cięcie enzymatyczne specyficznych miejsc restrykcyjnych występujących wyłącznie w szkielecie bakteryjnym, co w konsekwencji prowadzi do linearyzacji cząsteczek plazmidu rodzicielskiego oraz mini-plazmidów przy jednoczesnym zachowaniu kolistej struktury MC. Enzym rozpoznający te specyficzne miejsca może być kodowany w intronach i pozostawać pod kontrolą promotora występującego w plazmidzie rodzicielskim. Natomiast w dalszych etapach oczyszczania uzyskane po trawieniu restrykcyjnym liniowe cząsteczki DNA ulegają degradacji wywołanej trawieniem endonukleazami bakteryjnymi, w efekcie pozostawiając MC jedynym episomalnym DNA w komórkach bakteryjnych [5].

Szeroko stosowany rozdział cząsteczek DNA w żelu agarozowym umożliwia odseparowanie kolistych MC, które w żelu agarozowym migrują z inną szybkością niż cząsteczki liniowe. Jednakże oczyszczanie MC zarówno poprzez elektroforezę jak i wirowanie w gradiencie gęstości, ze względu na niewystarczająco wysoki stopień oczyszczenia nie jest metodą akceptowalną podczas pozyskiwania MC na potrzeby prób klinicznych [17].

Chromatografia powinowactwa wydaje się zatem najlepszą metodą oczyszczania MC. Jest to możliwe dzięki stworzeniu specyficznych miejsc (*ang. tag*) występujących w strukturze MC, wykazujących powinowactwo do białek wiążących DNA znajdujących się w złożu chromatograficznym. Późniejsze przepłukanie kolumny umożliwia wypłukanie wszystkich niezwiązanych specyficznie cząsteczek, zaś w ostatnim etapie, jakim jest elucja cząsteczek DNA ze złoża, uzyskuje się wysoko oczyszczone MC [17, 18].

### 3.4. Problemy podczas produkcji mini-kolistych cząsteczek nośnikowych

Głównym problemem związanym z produkcją MC jest niska wydajność tego procesu oraz kontaminacja plazmidem rodzicielskim. O ile chromatografia powinowactwa w większości przypadków rozwiązuje problem czystości produkowanych MC, o tyle problem wydajności procesu wciąż pozostaje wyzwaniem. Wydajność produkcji MC jest zależna od wielkości pozyskiwanych cząsteczek. Produkcja większych MC charakteryzuje się



wyższą wydajnością w porównaniu z wytwarzaniem mniejszych MC. Rozwiązanie problemu może tkwić w nieznacznym zmodyfikowaniu poszczególnych kroków w protokole produkcyjnym [18].

#### **4. Mini-koliste cząsteczki DNA jako nośniki genów w niewirusowym transferze przezbłonowym**

Niewirusowy transfer genów opiera się na przezbłonowym transporcie nośników, najczęściej plazmidów, czyli kolistych cząsteczek dwuniciowego DNA. Ich wielkość mieści się w przedziale 200pz – 100000pz, jednak wektory oparte na rekombinowanych plazmidach posiadają zazwyczaj mniejszy rozmiar (maksymalnie ok. 10000pz) [19]. Ujemny ładunek, hydrofilowość kwasów nukleinowych oraz stosunkowo duży rozmiar plazmidów sprawiają, że nie mogą one samoistnie przenikać przez błonę komórkową do wnętrza komórek. By wykorzystać plazmidowy DNA jako nośnik transgeny przeprowadza się jego kondensację z cząsteczkami innych nośników (tj. nośniki lipidowe, polimery kationowe, dendrymery, nanocząsteczki) lub stosuje fizyczne metody jego wprowadzania do komórki (np. elektroporację) [20]. Transport kompleksów kwasów nukleinowych z wymienionymi nośnikami zachodzi na drodze endocytozy, lub rzadziej fuzji przez zdestabilizowaną błonę komórkową [21, 22]. Na wydajność transfekcji ma wpływ głównie ładunek wypadkowy kompleksu jak i jego wielkość. Dlatego też dąży się do stworzenia jak najmniejszych nośników plazmidowych, o jak największej pojemności. Rozwiązaniem problemów z wielkością plazmidów mogą stać się MC, które jako koliste cząsteczki DNA przypominają plazmidy, lecz są całkowicie pozbawione szkieletu bakteryjnego co warunkuje nie tylko niewielkie rozmiary MC ułatwiające transport przez błony komórkowe, ale także ściśle koreluje z poziomem i czasem ekspresji wprowadzanego transgeny. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Darquet i wsp. (1997) wskazujące na ścisłą zależność pomiędzy wielkością wektora a poziomem uzyskiwanej ekspresji genu reporterowego [17]. Odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy wielkością nośników a współczynnikiem dyfuzji może być wyjaśnieniem niskiej biodostępności transgeny w terapiach *in vivo* [23, 24]. Usunięcie szkieletu bakteryjnego uniemożliwia MC replikację oraz integrację z genomem komórki, co zapobiega występowaniu mutacji insercyjnych oraz przypadkowym zmianom w genomie komórek gospodarza. Wydawałoby się, iż brak możliwości replikacji w komórkach eukariotycznych nie jest cechą korzystną gdyż wiąże się z krótszą ekspresją transgeny wprowadzanego za pomocą MC w porównaniu z ekspresją transgeny wprowadzanego do komórek przy użyciu wektorów plazmidowych. Z drugiej strony jednak obecność niemetylowanych grup CpG w sekwencji

szkieletu bakteryjnego tradycyjnych plazmidów może prowadzić do wzbudzenia reakcji immunologicznej, w wyniku której cząsteczka plazmidu jest rozpoznawana jako cząsteczka obca, co prowadzi do jej degradacji i w efekcie skrócenia ekspresji wprowadzanego transgenu. Ponadto sama obecność dodatkowych sekwencji bakteryjnych w plazmidzie może negatywnie wpływać na poziom ekspresji wprowadzanego genu [5, 25, 26, 27].

Mechanizm episomalnego wyciszenia transgenu w wektorze plazmidowym przez geny bakteryjne potwierdzono badaniami przeprowadzonymi przez Chen i wsp. (2005). Badania te wykazały od 10 do 100-krotny wzrost ekspresji transgenu przy wykorzystaniu liniowej cząsteczki DNA pozbawionej szkieletu bakteryjnego w porównaniu do kolistego plazmidu. Kowalencyjne przywiązanie tego regionu do kasety ekspresyjnej liniowej cząsteczki skutecznie obniżyło poziom ekspresji transgenu. Poziom ekspresji wywołanej wprowadzeniem transgenu za pomocą plazmidu i cząsteczki liniowej z kowalencyjnie przłączonym szkieletem bakteryjnym był podobny, co sugeruje, że za zmniejszenie ekspresji transgenu nie odpowiadała struktura nośnika (kolisty lub liniowy) ale geny bakteryjne. MC jako cząsteczki pozbawione szkieletu bakteryjnego nie powodują obniżenia ekspresji transgenu i umożliwiają zainicjowanie stosunkowo długiej i wysokiej ekspresji *in vivo* co wykazał Chen i współpracownicy [28, 29].

## **5. Przegląd wybranych badań dotyczących zastosowania mini-kolistych cząsteczek DNA jako nośników genów**

### **5.1. Badania *in vitro***

Darguet i wsp. (1999) przeprowadzili szereg badań *in vitro* porównujących poziom wzbudzonej ekspresji wprowadzanego genu reporterowego (np. lucyferazy,  $\beta$ -galaktozydazy) w komórkach fibroblastów oraz komórkach króliczych mięśni gładkich, po zastosowaniu nośnika plazmidowego oraz mini-kolistej cząsteczki nośnikowej. Cząsteczki plazmidowego oraz mini-kolistej nośnika kompleksowano z lipidami kationowymi, a następnie przeprowadzano transfekcję. Porównując komórki transfekowane mini-kolistym nośnikiem oraz nośnikiem plazmidowym stwierdzono od 2,5 do 5,5 razy wyższą aktywność genu reporterowego po zastosowaniu MC [17].

Podobne wyniki opisali Kobelt i wsp. (2013) prowadzący badania nad transfekcją kilku linii czerniaka oraz raka jelita grubego poprzez lipofekcję i elektroporację. Porównywano poziom ekspresji lucyferazy oraz GFP po zastosowaniu MC oraz wektora plazmidowego po 12, 24 i 48h od

transfekcji. Zanotowano średnio od 2 do 2,5 razy wyższą aktywność lucyferazy po elektroporacji i lipofekcji, kiedy użyto MC, w porównaniu z nośnikiem plazmidowym. Największą różnicę zaobserwowano w komórkach A375 oraz SKMel-5, które po lipofekcji wykazywały trzykrotny wzrost aktywności genu reporterowego oraz w komórkach A375, które po elektroporacji wykazywały czterokrotny wzrost aktywności po zastosowaniu MC, w porównaniu do nośnika plazmidowego [18].

W badaniu przeprowadzonym przez Chabot i wsp. (2013) porównywano procent komórek stransfekowanych przez równe ilości wektorów plazmidowych i MC. Odsetek komórek wykazujących ekspresję wprowadzanego genu GFP był znacząco wyższy w przypadku elektrotransferu MC do komórek B16, niż w przypadku zastosowania elektrotransferu plazmidu [30].

## **5.2. Badania *in vivo***

Darguet i wsp. (1999) oprócz badań *in vitro* testowali również możliwość zastosowania mini-kolistych cząsteczek nośnikowych w terapiach *in vivo*. Porównanie ekspresji genu reporterowego w komórkach mięśnia piszczelowego myszy oraz w komórkach raka głowy i szyi po iniekcji wskazuje na kilkudziesięciokrotnie większą aktywność lucyferazy oraz kilkunastokrotnie większą aktywność  $\beta$ -galaktozydazy po zastosowaniu MC w porównaniu do nośnika plazmidowego [17].

W celu porównania efektywności transfekcji komórek *in vivo* mini-kolistymi cząsteczkami nośnikowymi oraz plazmidem wprowadzano wspomniane koliste cząsteczki DNA do komórek A357 za pomocą strzykawki bezigłowej (*ang. jet injection*). Późniejsza analiza stransfekowanych guzów pobranych od myszy wykazała wyższą ekspresję wprowadzanego genu  $\beta$ -galaktozydazy w komórkach transfekowanych przy użyciu MC w porównaniu do tej, jaką wywołało użycie nośnika plazmidowego. Dodatkowo obszar stransfekowanej masy guza był większy, gdy do transfekcji użyto mini-kolistych cząsteczek nośnikowych [18].

Podobne badania wykonywali również Chabot i wsp. (2013). Wprowadzali oni gen reporterowy GFP za pomocą elektrotransferu cząsteczek plazmidu i mini-kolistych nośników do mysich komórek mięśnia piszczelowego. Fluorescencja GFP, reprezentująca poziom ekspresji wprowadzanego genu, była znacznie wyższa po zastosowaniu do transfekcji mini-kolistych cząsteczek nośnikowych, w porównaniu do nośnika plazmidowego, w całym okresie trwania eksperymentu, tj. od dnia pierwszego do osiemnastego. Również procent stransfekowanego obszaru mięśnia był większy w przypadku zastosowania MC w porównaniu do wykorzystania plazmidu [30].

## 6. Podsumowanie

Wykorzystanie mini-kolistych cząsteczek nośnikowych w porównaniu do innych metod wprowadzania genów do komórek ma wiele zalet. Usunięcie szkieletu bakteryjnego zapobiega wzbudzeniu reakcji immunologicznej oraz powstawaniu mutacji insercyjnych, co klasyfikuje mini-koliste cząsteczki nośnikowe jako jedną z najbezpieczniejszych metod wprowadzania genów do komórek. Brak szkieletu bakteryjnego w MC zapewnia niewielkie rozmiary tych nośników, polepszając tym samym ich możliwości transportu przez błony komórkowe. Metody produkcyjne oparte na specyficznie indukowalnych integrazach czy reakcjach enzymatycznych pozwalają na kontrolowaną produkcję MC, zaś zastosowanie chromatografii powinowactwa daje możliwość uzyskania wysokiego stopnia oczyszczenia cząsteczek MC, co jest warunkiem ich dalszego wykorzystania w próbach klinicznych. Analizując szereg badań nad zastosowaniem MC można stwierdzić, iż mini-koliste cząsteczki nośnikowe mogą stanowić dobrą i bezpieczną alternatywę dla innych metod wprowadzania genów do komórek *in vitro*, jak również w terapiach zarówno *ex vivo* jak i *in vivo*.

## Literatura

1. Szala S., *Terapia genowa*, Wydawnictwo Naukowe PWN., (2003)
2. Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L., *Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics*, *Nature Medicine.*, 1 (2001), s. 33-40
3. Kochanek S., *High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy*, *Human Gene Therapy.*, 15 (1999), s. 2451-2459
4. Ponder K.P., *Gene therapy for hemophilia*, *Current Opinion of Hematology.*, 5 (2006), s. 301-307
5. Huang M., Chen Z., Hu S., Jia F., Li Z., Hoyt G., Robbins R.C., Kay M.A., Wu J.C., *Novel minicircle vector for gene therapy in murine myocardial infarction*, *Circulation.*, 11 (2009), doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841155
6. Józkowicz A., Dulak J., *Nowe strategie wykorzystania wektorów plazmidowych i wirusowychw terapii genowej*, *Biotechnologia.*, 78 (2007), s. 7-21
7. Vagner S., Galy B., Pyronnet S., *Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites*, *EMBO reports.*, 10 (2001), s. 893-898
8. Śliwińska E., *Białko zielonej fluorescencji (GFP) – ekologiczny marker transformacji genetycznej i narzędzie do obserwacji procesów w żywej komórce*, *Biotechnologia.*, 56 (2002), s. 129-135
9. Darquet A.M., Cameron B., Wils P., Scherman D., Crouzet J., *A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle*, *Gene Therapy.*, 12 (1997), s. 1341-1349

10. Dietz W.M., Skinner N.E., Hamilton S.E., Jund M.D., Heitfeld S.M., Litterman A.J., Hwu P., Chen Z.X., Salazar A.M., Ohlfest J.R., Blazar B.R., Pennell C.A., Osborn M.J., *Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD8+ T-cell responses*, *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.*, 8 (2013), s. 1526-1535
11. Kay M.A., He C.Y., Chen Z.Y., *A Simple and rapid minicircle DNA vector manufacturing system*, *Nature Biotechnology.*, 12 (2010), s. 1287-1289
12. Chen Z.Y., He C.Y., Kay M.A., *Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo*, *Human Gene Therapy.*, 1 (2005), s. 126-131
13. Bigger B.W., Tolmachov O., Collombet J.M., Fragkos M., Palaszewski I., Coutelle C., *An araC-controlled bacterial Cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy*, *Journal of Biological Chemistry.*, 276 (2001), s. 23018-23027
14. Sadowski P., *Site-specific recombinases: Changing partners and doing the twist*, *Journal of Bacteriology.*, 165 (1986), s. 341-347
15. Gilbertson L., *Cre-lox recombination: Creative tools for plant biotechnology*, *Trends in Biotechnology.*, 21 (2003), s. 550-555
16. Dong Y., Aied A., Li J., Wang Q., Hu X., Wang W., *An in vitro approach for production of non-scar minicircle DNA vectors*, *Journal of Biotechnology.*, 3 (2013), s. 84-87
17. Darquet A.M., Rangara R., Kreiss P., Schwartz B., Naimi S., Delaère P., Crouzet J., Scherman D., *Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer*, *Gene Therapy.*, 2 (1999), s. 209-218
18. Kobelt D., Schleaf M., Schmeer M., Aumann J., Schlag P.M., Walther W., *Performance of high quality minicircle DNA for in vitro and in vivo gene transfer*, *Molecular Biotechnology.*, 1 (2013), s. 80-89
19. Brown T.A., *Genomy*, Wydawnictwo Naukowe PWN., (2001).
20. Cotton M., E. Wagner, *Non-viral approaches to gene therapy*, *Current Opinion in Biotechnology.*, 4 (1993), s. 705-710
21. Morille M., Passirani C., Vonarbourg A., Clavreul A., Benoit J.P., *Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer*, *Biomaterials.*, 24-25 (2008), s. 3477-3496
22. Trabulo S., Cardoso A.L., Mano M., De Lima M.C.P., *Cell-Penetrating Peptides –Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems*, *Pharmaceuticals.*, 3 (2010), s. 961-993
23. Ledley F., *Non viral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products*, *Human Gene Therapy.*, 6 (1995), s. 1129-1144
24. Jain R., *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review*, *Cancer Researches.*, 47 (1987), s. 3039-3051
25. Tan Y., Li S., Pitt B.R., Huang L., *The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo*, *Human Gene Therapy.*, 10 (1999), s. 2153-2161

26. Yew N.S., Zhao H., W I.H., *Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs*, *Molecular Therapy.*, 1 (2000), s. 255-262
27. Chen Z.Y., He C.Y., Meuse L., Kay M.A., *Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo*, *Gene Therapy.*, 11(2004), s. 856-864
28. Chen Z.Y., He C.Y., Ehrhardt A., Kay M.A., *Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo*, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy.*, 3 (2003), s. 495-500
29. Chen Z.Y., Yant S.R., He C.Y., Meuse L., Shen S., Kay M.A., *Linear DNAs concatemize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver*, *Molecular Therapy.*, 3 (2001), s. 403-410
30. Chabot S., Orio J., Schmeer M., Schleef M., Golzio M., Teissié J., *Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery*, *Gene Therapy.*, 1 (2013), s. 62-68

### **Mini-koliste cząsteczki DNA jako potencjalnie bezpieczne i wysoce efektywne nośniki w niewirusowym transferze genów**

#### **Streszczenie:**

Terapia genowa opiera się na dostarczeniu do wadliwie funkcjonujących komórek terapeutycznego materiału genetycznego. W tym celu najczęściej wykorzystuje się wektory wirusowe, aczkolwiek posiadają one szereg wad, które poważnie wpływają na możliwość ich aplikacji na potrzeby prób klinicznych. Dlatego też poszukuje się alternatywy w postaci nie-wirusowego transferu genów opartego głównie na stosowaniu plazmidów. Szczególne nadzieje wiążą się z wysoce zmodyfikowanymi mini-kolistymi cząsteczkami nośnikowymi. Mini-koliste nośniki, jako cząsteczki pozbawione bakteryjnego szkieletu wykazują niższą immunogenność i wydłużoną egzystencję w transfekowanych komórkach, a jednocześnie pozwalają osiągnąć dłuższą ekspresję transgeny. Badania wskazują także, iż mini-koliste nośniki umożliwiają dużo wydajniejszą transkrypcję transgeny a ich mały rozmiar wpływa na wyższą wydajność transfekcji komórek bakteryjnych. Ponadto nośniki te całkowicie pozbawione są możliwości integracji z genomem gospodarza, dzięki czemu ich stosowanie może być bezpieczniejsze w terapiach *in vivo* w porównaniu z innymi dotychczas stosowanymi wektorami. Cząsteczki te najczęściej otrzymywane są za pomocą jednej z dwóch technik. Pierwsza z nich wykorzystuje integrazy fagowe do wycinania szkieletu bakteryjnego, druga zaś zestaw enzymów restrykcyjnych. Jedynie wysoce oczyszczone cząsteczki mini-kolistych nośników mogą być wykorzystane w próbach klinicznych, dlatego też chromatografia powinowactwa jest preferowaną metodą ich oczyszczania. Właściwości mini-kolistych nośników, wynikające z ich unikalnej budowy, predestynują je do użycia w terapii genowej, w której bezpieczeństwo oraz wydajna transfekcja jest równie istotna, co długość, utrzymująca się na wysokim poziomie ekspresja genu terapeutycznego.

Słowa kluczowe: Terapia genowa, mini-koliste cząsteczki DNA, plazmidy, wektory, transfer genów

## **Minicircles as a potentially safe and highly effective vectors in non-viral gene transfer**

Abstract:

Gene therapy is primarily based on delivery of therapeutic genetic material to malfunctioning cells. Most commonly viral vectors are used for that purpose, although they have a number of disadvantages that significantly affect the possibility of their application in therapeutic strategies. Therefore, non-viral gene transfer is considered as a good alternative. In this field the most popular are methods that use plasmids as a vector. Minicircles are high hope for the future for several reasons. In numerous studies they show lower immunogenicity, mostly because they were devoid of bacterial backbone. In comparison with conventional plasmids, minicircles are less often mutated in transfected cells and display higher transfection efficiency, mostly because of their small size. Some studies also indicate that the minicircles, by being deprived of bacterial components, provide much more efficient transcription of the transgene. Furthermore, those vectors lack the ability to integrate into the genome of the host so their application appears to be safe *in vivo* therapies. Aforementioned particles are mostly obtained in one of two methods. First of them incorporates bacteriophageal integrases to excise bacterial backbone, second one uses set of restriction enzymes. Only highly purified particles can be used in clinical trials, therefore affinity chromatography is preferred as a method of purification. Properties of minicircles, resulting from their unique structure, make them an ideal tool for gene therapy, in which the safety and efficient transfection is as important as long-lasting high-level expression of the therapeutic gene.

Keywords: Gene therapy, minicircles, mini-circular vectors, plasmids, gene transfer

## **Chromosom Y w molekularnych badaniach kryminalistycznych**

### **1. Wstęp**

Głównym znaczeniem biologicznym chromosomu Y jest jego kluczowa rola w determinacji płci oraz procesach związanych z płodnością u mężczyzn. Zrozumienie jego genetyki ma zatem istotne znaczenie w medycynie. Nie jest to jednak jedyny powód, dla którego chromosom Y często pełni rolę obiektu badawczego. W ostatnich latach stał się on bowiem potężnym narzędziem w badaniach z zakresu genetyki populacji oraz kryminalistyki [1, 2].

Przez bardzo długi czas, chromosom Y uważany był za „nieużytek” genetyczny i funkcjonalny, składający się z dużej ilości bezwartościowego DNA oraz zawierający jedynie kilka genów [2, 3]. W ostatnich latach, wiedza na temat struktury i funkcji chromosomu Y została znacznie rozszerzona. Aktualnie wiadomo, że chromosom Y zawiera regiony nieulegające rekombinacji oraz obszary składające się z mikrosatelitarnego DNA, które charakteryzują się wysoką polimorficznością [1, 2]. Specyficzne cechy chromosomu Y, takie jak dziedziczenie w linii ojcowskiej, czy obecność dużych obszarów nierekombinujących sprawiają, że jest on unikalnym i silnym narzędziem do badań biomedycznych, genetyki populacji, czy badań ewolucyjnych [2].

Nowoczesne metody, oparte na analizie DNA, znajdują wiele zastosowań w genetyce sądowej. Przykładem ich praktycznego zastosowania może być badanie śladów biologicznych w celu uzyskania dowodów na obecność domniemanego sprawcy na miejscu zdarzenia poprzez porównanie profili genetycznych uzyskanych z analizy prób zabezpieczonych na miejscu zdarzenia z profilami genetycznymi osób podejrzanych. Analiza materiału genetycznego jest bardzo przydatna także do identyfikacji zwłok i ofiar masowej katastrofy oraz do badania powiązań rodzinnych. W ostatnich latach, genetyka sądowa, jako nauka bardzo szybko ewoluowała, co doprowadziło do utworzenia krajowych

---

<sup>1</sup>sylwia.nisztuk@up.lublin.pl, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>2</sup>magda.surdyka@gmail.com Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie



i międzynarodowych baz danych DNA, zawierających profile genetyczne podejrzanych i skazanych przestępców [4].

Aktualnie, dowody z analiz DNA odgrywają ważną rolę podczas rozprawy sądowej, ponieważ pomagają w identyfikacji sprawcy przestępstwa lub wykluczeniu udziału niewinnych podejrzanych [4]. Z tego względu, badania molekularne z zakresu genetyki sądowej muszą być wykonywane bardzo skrupulatnie i dokładnie tak, aby wyeliminować ewentualne błędy w dalszym postępowaniu śledczym.

Zidentyfikowane w obrębie chromosomu Y polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs, ang. Single Nucleotide Polymorphisms) pozwalają na przypisanie osób do wyróżnionych filogenetycznie haplogrup. Stały rozwój genetyki molekularnej i identyfikacja coraz większej liczby markerów genetycznych na chromosomie Y, zapewnia odpowiednie narzędzie do profilowania DNA w kryminalistyce, w sprawach związanych z ustalaniem ojcostwa, napaścią seksualną, identyfikacją osób zaginionych, czy określeniem pochodzenia etnicznego sprawców [1, 5].

## **2. Chromosom Y**

Chromosom Y jest jednym z najmniejszych chromosomów w ludzkim genomie, o wielkości około 60 Mpz (mega par zasad). Ok. 24Mpz całego chromosomu Y stanowi obszar euchromatyny, a ok. 30 Mpz – obszar heterochromatyny. Łącznie, tworzą one region nieulegający rekombinacji – NRY (ang. non-recombining region of Y), nazywany także regionem specyficznym dla mężczyzn – MSY (ang. male-specific region). Obejmuje on 95% całej długości chromosomu Y [3, 6]. W tym obszarze nie dochodzi do zjawiska crossing-over pomiędzy chromosomem X i Y w mejozie. Sekwencja MSY chromosomu Y zawiera, co najmniej 78 genów kodujących białka, które razem kodują 27 odmiennych białek. 12 z nich ulega ekspresji prawie we wszystkich tkankach organizmu [3]. Region NRY jest flankowany przez pseudoautosomalne regiony (PAR, ang. pseudoautosomal region), gdzie zjawisko crossing-over występuje naturalnie i zachodzi z wysoką częstością [2, 6]. Regiony pseudoautosomalne (PAR1 i PAR2) zlokalizowane są na końcu krótkiego ramienia (Yp) oraz na końcu długiego ramienia (Yq) chromosomu Y. Obejmują one odpowiednio 2,5 Mpz i 1 Mpz DNA [6, 7].

## **3. Chromosom Y w kryminalistyce**

### **3.1. Determinacja płci**

Genetyczne różnice pomiędzy mężczyznami i kobietami związane są z obecnością lub brakiem chromosomu Y, ponieważ to właśnie na nim

znajdują się regiony odpowiadające za determinację płci. Sekwencja DNA chromosomów płci jest specyficzna odpowiednio dla chromosomu X i Y. Allosomy zawierają jednak także regiony homologiczne, które są wykorzystywane w analizach mających na celu identyfikację płci [8].

Determinacja płci ma istotne znaczenie w badaniach kryminalistycznych, dotyczących przestępstw na tle seksualnym, poszukiwania osób zaginionych lub identyfikacji ofiar katastrof masowych. Obecnie, na rynku dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów opartych na analizie STR autosomalnych, które obejmują również gen kodujący amelogeninę, umożliwiającą identyfikację płci [9]. Przykładem tego typu zestawów są: AmpFISTR® NGM Select™ kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) i PowerPlex® 16 System (Promega Corp., Madison, WI) [10].

Problemem podczas analiz mających na celu ustalenie płci może być chimeryzm, wynikający z przeszczepu szpiku kostnego, czy rozbieżność między płcią biologiczną (ważną z punktu widzenia kryminalistyki), a płcią prawną, wynikającą z dokumentów osobistych [9]. Kolejną przyczyną, która może zaburzyć wyniki badań mających na celu ustalenie płci, jest ciąża, kiedy kobieta spodziewa się potomka płci męskiej. Podczas ciąży jest, bowiem czas, kiedy materiał genetyczny płodu może zostać wykryty w krwi matki i tym samym fałszować wyniki [9, 11]. Podczas analiz z zakresu genetyki sądowej wszystkie te wyjątkowe przypadki powinny być brane pod uwagę, ponieważ prawidłowa identyfikacja osobnicza śladów biologicznych ma kluczowe znaczenie dla powodzenia śledztwa [9].

### **3.1.1. Gen kodujący amelogeniny (AMELX/Y)**

Amelogenina jest wysoce konserwatywnym białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, zaangażowanym w procesy mineralizacji zębów. Jest kodowana przez gen znajdujący się w krótkim ramieniu chromosomu X (AMELX) i Y (AMELY). Zarówno AMELX, jak i AMELY ulegają ekspresji podczas rozwoju szkliwa zębów, natomiast gen AMELX wykazuje 10-krotnie wyższy poziom ekspresji niż jego odpowiednik zlokalizowany w chromosomie Y [12].

Pomimo, że geny AMELX i AMELY są homologiczne, różnią się od siebie pod względem wielkości i sekwencji nukleotydowej, dzięki czemu mogą być wykorzystywane, jako markery molekularne służące do identyfikacji płci [12].

Wykorzystując konserwatywne regiony, zaprojektowane zostały startery, które umożliwiają jednoczesną amplifikację obu alleli. Produkty takiej reakcji różnią się długością. Testy bazujące na genie AMELX/Y wykorzystują zestaw starterów, które flankują 6-nukleotydową delecję, zlokalizowaną w pierwszym intronie chromosomu X. Delecja ta,

zidentyfikowana została przez Santos i wsp. (1998) [14]. W wyniku przeprowadzonej reakcji PCR otrzymuje się dwa fragmenty genu kodującego amelogeninę, charakterystyczne dla chromosomu X i Y o długościach 106 i 112 pz lub 212 i 218 pz, w zależności od użytego testu identyfikacyjnego [8, 12, 14, 15].

Wiele przeprowadzonych badań wykazało jednak, że płęć określona za pomocą testu amelogeniny nie zawsze jest zgodna. Te rozbieżności wynikają ze zmienności strukturalnej chromosomu Y. Delecja w obrębie genu AMELY może skutkować brakiem produktu PCR, o charakterystycznej długości dla płci męskiej. Mężczyźni z taką delecją są wówczas błędnie identyfikowani, jako kobiety [10]. Delecja ta, występuje z różną częstością, w zależności od populacji (0,018-8%) [16]. Stwierdzono, że występuje ona znacznie częściej w populacjach indyjskich niż europejskich, czy afrykańskich [14, 17].

### **3.1.2. Gen determinujący płęć – SRY**

Genem odpowiedzialnym za determinację płci jest gen SRY (ang. *sex determining region Y*). Zlokalizowany jest on na krótkim ramieniu chromosomu Y, w pobliżu regionu pseudoautosomalnego. Składa się z pojedynczego eksonu kodującego białko zbudowane z 204 aminokwasów. Gen SRY produkuje czynnik determinujący rozwój jąder TDF (ang. *testis-determiningfactor*) [18].

Ustalanie płci jest istotnym kierunkiem badań w genetyce sądowej (szczególnie w przypadku gwałtów), dlatego też ze względu na zdarzające się pomyłki podczas analiz, wyłącznie w oparciu o analizy genu kodującego amelogeninę, coraz częściej wykonuje się badania identyfikacyjne również przy wykorzystaniu genu SRY w celu potwierdzenia uzyskanych wyników [16].

### **3.2. Zastosowanie Y-STR w genetyce sądowej**

Badanie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych chromosomu Y (Y-STR) znajduje duże zastosowanie w genetyce człowieka, antropologii i medycynie sądowej. Do cech, które czynią Y-STR unikalnymi należy przede wszystkim dziedziczenie wyłącznie w linii ojcowskiej oraz charakter haploidalny. Te cechy sprawiają, że analiza Y-STR jest często wykorzystywana w sprawach kryminalistycznych, w których materiałem dowodowym jest mieszanina materiału genetycznego kobiety i mężczyzny, np. w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Wiele badań wykazało, że analiza locimikrosatelitarnych chromosomu Y dostarcza wiarygodnych wyników także w przypadku ustalania pokrewieństwa oraz w badaniach

z zakresu genetyki sądowej, dotyczących m.in. identyfikacji sprawców przestępstw, czy identyfikacji ofiar katastrof masowych [19, 20, 21, 22].

Aktualnie, dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów do badania Y-STR. Najczęściej umożliwiają one analizę do 17 markerów mikrosatelitarnych, ponieważ przeprowadzone badania [19, 23, 24, 25] wykazały, że taka liczba pozwala na otrzymanie odpowiednio dużej siły dyskryminacji (Tab. 1). Ocena przydatności sekwencji mikrosatelitarnych do badań identyfikacyjnych jest szacowana poprzez określenie stopnia ich polimorficzności w danej populacji. Na podstawie liczby alleli w danym locus i częstości ich występowania w populacjach obliczane są wskaźniki określające przydatność STR do analiz [26].

Najważniejsze z nich to: siła dyskryminacji (PD, ang. *power of discrimination*) oraz prawdopodobieństwo zgodności (MP, ang. *match probability*). PD jest bezpośrednią miarą określającą przydatność markerów do analiz identyfikacyjnych. Siła dyskryminacji jest początkowo określana dla poszczególnych alleli w zestawie, a następnie szacowana jest tzw. kumulatywna siła dyskryminacji (PDc, ang. *cumulative power of discrimination*) dla całego zestawu STR. Siła dyskryminacji markerów zawartych w zestawach rutynowo stosowanych w badaniach identyfikacyjnych zazwyczaj osiąga wartość powyżej 0,9, a PDc jest bliskie jedności [26]. Wartość prawdopodobieństwa zgodności określana jest dla każdego badanego markera osobno, na podstawie frekwencji alleli w danym locus. Określa ono prawdopodobieństwo wystąpienia w jednej populacji dwóch losowo wybranych osób o identycznych genotypach [26]. Wartość MP ma kluczowe znaczenie w analizach z zakresu genetyki sądowej, ponieważ służy do określenia siły dowodowej wykonanych badań DNA [27].

Po wykonaniu analizy Y-STR konieczne jest oszacowanie częstości ustalonych haplotypów w danej populacji, co umożliwiają bazy danych Y-STR (np. YHRD, ang. Y Chromosome Haplotype Reference Database, <http://www.yhrd.org>) [28]. Baza YHRD jest efektem wielu lat pracy i ogromnego zaangażowania zespołów badawczych na całym świecie. Zawiera ona ponad 70 tysięcy haplotypów chromosomu Y z prawie 600 populacji całego świata. Pozwala to na oszacowanie częstości danego haplotypu na danym obszarze lub całym świecie [29, 30].

Największą wadą stosowania analizy sekwencji Y-STR w genetyce sądowej jest brak możliwości wykluczenia pochodzenia materiału biologicznego od krewnych podejrzanego w linii męskiej. Ze względu na sposób dziedziczenia sekwencji mikrosatelitarnych w obrębie rodziny, są one mało przydatne do rozwiązywania spraw, w które zamieszani mogą być krewni w jednej linii męskiej. Wynika to z niskiego tempa mutacji Y-STR, co powoduje, że różnice między osobami spokrewnionymi w linii męskiej występują bardzo rzadko [28]. Dodatkowo, ze względu na długość

sekwencji mikrosatelitarnych, ich analiza w przypadku materiału biologicznego, który uległ znacznej degradacji jest dużo trudniejsza. W takim przypadku lepszym rozwiązaniem jest analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism), ze względu na małe rozmiary amplikonów [31].

Metody oparte na analizie sekwencji mikrosatelitarnych, cechujących się wysoką polimorficznością pomiędzy osobami niespokrewnionymi są także bardzo dobrym narzędziem do badań genealogicznych oraz identyfikacji śladów biologicznych [31].

Tabela 1. Y-STR powszechnie stosowane w badaniach z zakresu genetyki sądowej w populacjach Polski [25]

Locus Y-STR	Oznaczenie wGenBank	Liczba Alleli	Motyw powtarzalny	Zmienność genu (GD, ang. <i>gene diversity</i> )
DYS19	AC017019	13-19	TAGA	0,757
DYS389I	AC004617	10-15	(TCTG)(TCTA)(TCTG)(TCTA)	0,417
DYS389II	AC004617	26-33	TCTA	0,718
DYS390	AC011289	21-27	(TCTA)(TCTG)	0,701
DYS391	AC011302	9-13	TCTA	0,504
DYS392	AC011745	7-15	TAT	0,403
DYS393	AC006152	10-16	AGAT	0,287
DYS437	AC002992	10-17	TCTA	0,449
DYS438	AC002531	7-14	TTTTTC	0,635
DYS439	AC002992	8-14	AGAT	0,710
DYS448	AC025227	17-23	AGAGAT	0,515
DYS456	AC010106	11-19	AGAT	0,720
DYS458	AC010902	12-20.2	GAAA	0,742
DYS635	AC004772	19-27	TSTA złożone	0,636
GATAH4.1	AC011751	17-23	TAGA	0,623
DYS385a/b	AC022486	8-20	GAAA	0,849

### 3.2.1. Ustalanie ojcostwa

Aktualnie, badania genetyczne mające na celu ustalenie ojcostwa opierają się przede wszystkim na polimorfizmie STR autosomalnych. Obecność ogromnej liczby loci mikrosatelitarnych w genomie stwarza, bowiem możliwość określenia indywidualnego profilu genetycznego poszczególnych osób. W Polsce stosowanych jest ponad 30 różnych loci STR w analizie genetycznej spornego ojcostwa [32]. Opiniowanie o ojcostwie pozwanego oparte jest zawsze na rachunku prawdopodobieństwa i nigdy nie pozwala na kategorię stwierdzenie, że dany mężczyzna jest ojcem dziecka. Rutynowo wykonywane badania z wykorzystaniem 15

locimikrosatelitarnych dają natomiast „szansę wykluczenia” na poziomie 99,9999%. W sytuacji, kiedy pozwany nie ma brata bliźniaka, wynik taki (99,9999%) stanowi podstawę do wydania opinii, że ojcostwo mężczyzny zostało potwierdzone z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością [32].

Pomimo, że badania mające na celu ustalanie ojcostwa wykonywane są przede wszystkim w oparciu o analizy STR autosomalnych, w niektórych przypadkach bardzo pomocna okazuje się analiza sekwencji mikrosatelitarnych chromosomu Y. Y-STR mogą zostać wykorzystane w tego typu analizie jedynie w stosunku do potomstwa płci męskiej, ze względu na specyficzny sposób dziedziczenia chromosomu Y [33]. Ogromną zaletą markerów Y-STR jest możliwość wykonania badań również wtedy, gdy domniemany ojciec dziecka nie żyje. Można wówczas pozyskać pełną informację na temat jego chromosomu Y od każdego jego krewnego w linii męskiej. Wynik taki nie wyklucza jednak ojcostwa, któregoś z tych krewnych [34].

Podstawą podczas ustalania ojcostwa i analiz kryminalistycznych jest bezbłędna interpretacja profili genetycznych, która z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością pozwala na wykluczenie ojcostwa pozwanego mężczyzny lub jego potwierdzenie.

### **3.2.2. Analiza zmieszanych śladów biologicznych**

Możliwość rozpoznania męskiego komponentu DNA w mieszaninie DNA ma istotne znaczenie w wielu sprawach sądowych. Haploidalny charakter markerów genetycznych, specyficznych dla chromosomu Y może pomóc w genetycznej charakteryzacji męskiego komponentu w wieloskładnikowej próbce DNA w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Materiał genetyczny sprawcy uzyskiwany jest z wymazów pochwy ofiary. Również pod paznokciami napadniętych kobiet mogą znajdować się minimalne ilości obcego DNA pochodzącego od napastnika [35].

Do badania śladów pochodzących z napaści seksualnej najczęściej wykorzystywanym narzędziem są sekwencje mikrosatelitarne. Dowody z tego typu przestępstw najczęściej występują w postaci zmieszanych śladów biologicznych pochodzenia żeńskiego (w przewodzie) i męskiego. W celu identyfikacji osobniczej komponentu męskiego można posłużyć się analizą STR autosomalnych, jednak w wielu przypadkach, wyniki takich badań mogą zawierać głównie allele żeńskie [36]. Komponent męski występuje wówczas na bardzo niskim poziomie, co sprawia lub nawet uniemożliwia odróżnienie profilu genetycznego sprawcy od profilu ofiary. To z kolei może spowodować, że cenne informacje dowodowe mogą zostać pominięte [35, 37].

Z tego względu, polimorficzne loci STR obecne w regionie NRY chromosomu Y i dziedziczące się jedynie w linii ojcowskiej, mogą

odgrywać kluczową rolę w rozwiązywaniu spraw, w których dowodem jest zmieszany materiał biologiczny [35]. Analiza polimorfizmów specyficznych dla mężczyzn pozwala na wyodrębnienie profilu genetycznego sprawcy, bez konieczności rozdzielania komponentu męskiego od żeńskiego. Badania z wykorzystaniem Y-STR są szczególnie przydatne w przypadku mieszanin zawierających nasienie kilku mężczyzn. Podstawowym ograniczeniem stosowania markerów Y-STR w genetyce sądowej jest możliwość różnicowania z ich użyciem jedynie mężczyzn niespokrewnionych w linii męskiej. W celu wiarygodnego odróżnienia dwóch jakichkolwiek osobników należy zastosować analizę sekwencji mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w autosomach. Niemniej jednak analiza Y-STR stanowi cenne narzędzie uzupełniające wyniki badań kryminalistycznych [37].

### **3.3. Y-SNP w badaniach populacyjnych**

Pochodzenie współczesnego człowieka jest przedmiotem zainteresowań środowiska naukowego i społeczeństwa. Analiza DNA w bardzo dużym stopniu przyczynia się do zrozumienia ewolucji człowieka. Ewolucja molekularna zakłada, że geny współczesnych populacji „opisują” ludzką historię, uwzględniając pochodzenie, migracje, dryf genetyczny oraz selekcję. Badając stopień zmienności genetycznej można próbować odtworzyć minione wydarzenia i wnioskować o pochodzeniu danych populacji [38, 39]. Wiele uwagi poświęca się w tym celu badaniom mitochondrialnego DNA oraz sekwencji chromosomu Y. Dostarczają one, bowiem informacji na temat linii matczynek i ojcowskich. Na podstawie polimorfizmów, które się w nich pojawiają można zatem wnioskować na temat historii populacji.

Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, zlokalizowanych w obrębie nieulegającego rekombinacji regionu chromosomu Y, jest szeroko wykorzystywana w antropologii molekularnej, jako narzędzie do badań ewolucyjnych. Różnice genetyczne pomiędzy poszczególnymi haplogrupami (haplogrupa – grupa haplotypów podobnych ze względu na wspólne pochodzenie) są wynikiem trwałych, dziedziczonych w linii męskiej polimorfizmów typu SNP [22, 40].

Badania dotyczące haplogrup chromosomu Y rozpoczęły się w latach 80. XX wieku, kiedy zidentyfikowano pierwszy polimorfizm w obrębie chromosomu uważanego wcześniej za niepolimorficzny [41]. Prowadzone analizy molekularne pozwoliły na identyfikację kolejnych polimorfizmów typu SNP i na tej podstawie haplogrup i subhaplogrup chromosomu Y. Aktualnie wyróżnia się 20 podstawowych haplogrup (A-T), wśród których

wyróżnia się specyficzne dla nich podgrupy. Każda haplogrupa jest definiowana przez określoną liczbę mutacji [39].

Przeprowadzone analizy genetyczne, w oparciu o markery molekularne chromosomu Y pozwoliły na określenie, kiedy powstał i skąd wywodzi się pierwszy chromosom Y, tzw. Y-chromosomalny Adam [42]. Najstarsza, haplogrupa A definiowana jest przez dwie mutacje (M91, P97). Jej występowanie jest ograniczone do kontynentu afrykańskiego. Kolejną haplogrupą na drzewie filogenetycznym jest haplogrupa – B, zdefiniowana przez 4 mutacje (M60, M181, P85, P90) i podobnie, jak haplogrupa A powstała w Afryce. Pierwszą haplogrupą, która wykształciła się poza kontynentem afrykańskim jest haplogrupa C. Osoby, które posiadają tę haplogrupę zamieszkują głównie Azję, Australię i Oceanię. Jest ona reprezentowana przez 5 mutacji: RPS4Y, M216, P184, P255 i P260 [39].

### **3.4. Ustalanie pochodzenia geograficznego i badania genealogiczne**

Badania kryminalistyczne mogą również obejmować analizy, mające na celu określenie pochodzenia etnicznego danej osoby. W przypadku męskiej części populacji mogą one zostać wykonane w oparciu o sekwencję nukleotydową chromosomu Y, która pozwala na określenie przynależności haplogrupowej i haplotypowej poszczególnych mężczyzn. Informacje takie mogą znacznie wzbogacić badania sądowe, dostarczając informacji o pochodzeniu etnicznym osoby, od której pochodzi analizowana próbka DNA męskiego [40]. W obrębie chromosomu Y, w tym celu wykorzystywane są dwa rodzaje markerów molekularnych: Y-SNP oraz Y-STR. Ze względu na niską częstość mutacji, polimorfizmy pojedynczych nukleotydów nie pozwalają na rozróżnienie dwóch mężczyzn, a jedynie na określenie, do jakiej podstawowej haplogrupy chromosomu Y należą. Umożliwia to jedynie wstępne wnioskowanie o pochodzeniu geograficznym danej osoby [43].

Od wielu lat, w celu skutecznego i wiarygodnego różnicowania osobniczego mężczyzn prowadzi się haplotypowanie z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych chromosomu Y. W porównaniu do Y-SNP, markery Y-STR cechują się, bowiem dużo wyższym tempem mutacji, a tym samym wykazują dużą zmienność w obrębie i pomiędzy populacjami [24, 44, 45]. Zestaw polimorfizmów mikrosatelitarnych dla danej osoby nazywany jest haplotypem i pozwala on na dodatkowe, bardziej szczegółowe rozróżnienie osób należących do tej samej haplogrupy [43, 46].

Aktualnie, genealodzy prowadzą także badania molekularne mające na celu określenie relacji pomiędzy chromosomami Y i nazwiskami [47,48]. W większości populacji ludzkich nazwiska, podobnie jak DNA, dziedziczą



się z pokolenia na pokolenie. Ludzie, którzy mają takie same nazwiska mogą, zatem oczekiwać, że są w mniejszym lub większym stopniu spokrewnieni pod względem genetycznym. Pewna część ludzkiego genomu (chromosom Y), jest dziedziczona podobnie jak nazwiska, ale tylko część potomstwa – synowie otrzymają po ojcu chromosom Y. Analizy takie, mogą w przyszłości zostać wykorzystane do śledzenia historii genealogicznych ludzi [49].

#### **4. Podsumowanie**

W ostatnich latach nastąpiła rewolucja w obszarze genetyki sądowej. Aktualnie zdecydowana większość przestępstw, tj. gwałty, morderstwa, czy kradzieże jest rozwiązywana dzięki badaniom DNA, w których profile genetyczne ofiar i sprawców uzyskiwane są ze śladów biologicznych. Tego typu analizy genetyczne mają na celu określenie, czy DNA pozyskane ze śladu biologicznego zabezpieczonego na miejscu zdarzenia, pochodzi od konkretnej osoby, a jeżeli nie to, czy można go dopasować do jakiegoś profilu genetycznego znajdującego się w stale rozwijających się bazach danych. Z tego względu, genetyka sądowa jest aktualnie jedną z najskuteczniejszych metod wykorzystywanych przez wymiar sprawiedliwości [50].

Chromosom Y, ze względu na dziedziczenie w linii ojcowskiej i haploidalny charakter, jest obecnie coraz częściej wykorzystywany do identyfikacji osobniczej w sprawach kryminalistycznych. W jego obrębie, najczęściej wykorzystywanym narzędziem w analizach z zakresu genetyki sądowej są polimorficzne markery mikrosatelitarne. Skuteczność analiz z użyciem Y-STR została wykazana w wielu dziedzinach, m.in. w przypadku badania spornego ojcostwa, czy analizy próbek będących mieszaniną DNA pochodzącego od kilku osób. Tego typu badania mają bardzo duże zastosowanie w przypadku przestępstw na tle seksualnym, w szczególności do identyfikacji osobniczej podejrzanych o gwałt zbiorowy [24].

W przypadku badań kryminalistycznych, ważnym aspektem jest także ustalenie płci i pochodzenia etnicznego. Ma to szczególne znaczenie podczas identyfikacji osób zaginionych lub ofiar katastrof masowych. Pozwala, bowiem na wstępną identyfikację osobniczą zabezpieczonych śladów biologicznych. Analizy mające na celu ustalenie płci muszą być zatem wykonywane z uwzględnieniem wszystkich ewentualności, które mogą fałszować otrzymany wynik [9].

Bardzo ważnym aspektem podczas prowadzenia badań genetycznych jest dokładność i precyzja, ponieważ każdy błąd podczas ustalania profili genetycznych już na początku może doprowadzić do poważnych konsekwencji podczas prowadzonego śledztwa.

## Literatura

1. Jobling M.A., Tyler-Smith C. *The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age*, Nature Reviews (Genetics), 4 (2003), s. 598-612
2. Roots S. *Human Y-chromosomal variation in European populations*, Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis, Tartu University Press (2004)
3. Ginalski K., Rychlewski L., Baker D., NGrishin.V. *Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome*, PNAS 101(8) (2004), s. 2305-2310
4. Schneider P.M. *Scientific standards for studies in forensic genetics*, Forensic Science International 165 (2007), s. 238-243
5. Butler J.M. *Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis*, Forensic Science Review 50 (2) (2003), s. 92-111
6. Quintana-Murci L., Fellous M. *The human Y chromosome: the biological role of a "functional wasteland"*, Journal of Biomedicine and Biotechnology 1:1 (2001), s. 18-24
7. Skatelsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., et al. *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes*, Nature 423(19) (2003), s. 825-837
8. Graham E.A.M. *Sex Determination*, Forensic Science, Medicine, and Pathology 2(4) (2006), s. 283-286
9. von Wurmb-Schwark N., Bosinski H., Ritz-Timme S. *What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis*, Journal of Forensic and Legal Medicine 14 (2007), s. 27-30
10. Kastelic V., Budowle B., Dobronič K. *Validation of SRY Marker for Forensic Casework Analysis*, Journal of Forensic Sciences 54(3) (2009), s. 551-555
11. Bianchi D.W. *Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review*, Placenta 25, Suppl A (2004), s. 93-101
12. Lattanzi W., Di Giacomo M.C., Lenato G.M., Chimienti G., Voglino G., Resta N., Pepe G., Guanti G. *A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome*, Human Genetics 116 (2005), s. 395-401
13. Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C. *Reliability of DNA-based sex tests*, Nature Genetics 18(2) (1998), s. 103
14. Thangaraj K., Reddy A.G., Singh L. *Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis*, International Journal of Legal Medicine 116 (2002), s. 121-123
15. Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P. *Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin*, International Journal of Legal Medicine 106 (1994), s. 190-193
16. Drobnič K. *A new primer set in a SRY gene for sex identification*, International Congress Series 1288 (2006), s. 268-270
17. Butler J.M. *Forensic DNA Typing* (2005), Elsevier

18. Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*, *Nature* 346 (1990), s. 240-244
19. Corach D., Riso L.F., Marino M., Penacino G., Sala R., Rottione A. *Y-STR typing in forensic casework*, *Forensic Science International* 118 (2001), s. 131-135
20. Prinz M., Ishii A., Coleman A., Baum H.J., Shaler R.C. *Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex*, *Forensic Science International* 120 (2001), s. 177-188
21. Cerri N., Ricci U., Sani I., Verzeletti A., De Ferrari F. *Mixed Stains from Sexual Assault Cases: Autosomal or Y-Chromosome Short Tandem Repeats?*, *Croatian Medical Journal* 44(3) (2003), s. 289-292
22. Lessig R., Zoledziewska M., Fahr K., Edelmann J., Kostrzewa M., Dobosz T., Kleemann W.J. *Y-SNP-genotyping – a new approach in forensic analysis*, *Forensic Science International* 154 (2005), s. 128-136
23. Sibille I., Duverneuil C., de la Grandmaison G.L., Guerrouache K., Teissiere F., Durigon M., de Mazancourt P. *Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa*, *Forensic Science International* 125 (2002), s. 212-216
24. Janica J., Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Skawrońska M., Sołtyszewski I., Berent J. *Polimorfizm loci Y-STR wśród ludności Polski północno-wschodniej w aspektach różnicowania etnicznego i przydatności w badaniach medyczno-sądowych*, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii LVIII* (2008), s. 17-21
25. Jacewicz R., Krajewski P., Ulewicz D., Piątek J., Jędrzejczyk M., Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Konarzewska M., Ossowski A., Parafiniuk M., Berent J. *Y-STR Polska – baza danych do oceny wartości dowodowej w genetyce sądowej*, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii LXI* (2011), s. 146-152
26. Radko A., Fornal A. *Metody statystyczne stosowane w analizach STR*, *EPISTEME* 16, t.II (2012), s. 219-228
27. Foreman L.A., Evett I.W. *Statistical analyses to support forensic interpretation for a new ten-locus STR profiling system*, *International Journal of Legal Medicine* 114 (2001), s. 147-155
28. Ballantyne K.N., Keerl V., Wollstein A., Choi Y., Zuniga S.B., Ralf A., Vermeulen M., de Knijff P., Kayser M. *A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages*, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012), s. 208-218
29. Lessig R., Edelmann J., Thiele K., Kozhemyako V., Jonkisz A., Dobosz T. *Results of Y-SNP typing in three different populations*, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1 (2008), s. 219-221
30. Roewer L. *Y Chromosome STR typing in crime casework*, *Forensic Science Medicine and Pathology* 5 (2009), s. 77-84
31. Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J. *Przydatność markerów SNP do analiz materiału biologicznego o wysokim stopniu degradacji*, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii LXIX* (2009), s. 118-123

32. Bal J. (red.) *Biologia molekularna w medycynie*, Elementy genetyki klinicznej (2011), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
33. Kayser M., Sajantila A. *Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis*, Forensic Science International 118 (2001), s. 116-121
34. Gusmão L., Brion M., Gonzales-Neira A., Lareu M., Carracedo A. *Y chromosome specific polymorphisms in forensic analysis*, Legal Medicine 1 (1999), s. 55-60
35. Sinha S.K., Budowle B., Arcot S.S., Richey S.L., Chakraborty R., Jones M.D., Wojtkiewicz P.W., Schoenbauer D.A., Gross A.M., Sinha S.K., Shewale J.G. *Development and Validation of a Multiplexed Y-Chromosome STR Genotyping System, Y-PLEX™6, for Forensic Casework*, Journal of Forensic Sciences 48 (2003), s. 1-11
36. Dettlaff-Kakol A., Pawlowski R. *First Polish DNA "manhunt" – an application of Y-chromosome STRs*, International Journal of Legal Medicine 116 (2002), s. 289-291
37. Redd A.J., Agellon A.B., Kearney V.A., Contreras V.A., Karafet T., Park H., de Knijff P., Butler J.M., Hammer F.M. *Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome*, Forensic Science International 130 (2002), s. 97-111
38. [http://genetics.stanford.edu/hppl/publications/PHSDP\\_1996\\_p24-32.pdf](http://genetics.stanford.edu/hppl/publications/PHSDP_1996_p24-32.pdf)
39. Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F. *New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree*, Genome Research 18 (2008), s. 830-838
40. Noveski P., Trivodalieva S., Efremov G.D., Plaseska-Karanfilska D. *Y Chromosome Single Nucleotide Polymorphisms Typing by SNaPshot Minisequencing*, Balkan Journal of Medical Genetics 13(1) (2010), s. 9-16
41. Casanova M., Leroy P., Boucekkine C., Weissenbach J., Bishop C., Fellous M., Purrello M., et al. *A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance*, Science 230 (1985), s. 1403-1406
42. Forster P., Rohl A., Lunnemann P., Brinkmann C., Zerjal T., Tyler-Smith C., Brinkmann B. *A Short Tandem Repeat-Based Phylogeny for the Human Y Chromosome*, The American Journal of Human Genetics 67 (2000), s. 182-196
43. de Knijff P., Kayser M., Caglia A., Corach D., Fretwell N., et al. *Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects*, International Journal of Legal Medicine 110 (1997), s. 134-140
44. Shi H., Dong Y-I., Wen B., Xiao C.J., Underhill P.A., Shen P., Chakraborty R., Jin L., Su B. *Y-Chromosome Evidence of Southern Origin of the East Asian-Specific Haplogroup O3-M122*, The American Journal of Human Genetics 77 (2005), s. 408-419
45. Mielnik-Sikorska M., Daca P., Woźniak M., Malyarchuk B.A., Bednarek J., Dobosz T., Grzybowski T. *Genetic data from Y chromosome STR and SNP loci in Ukrainian population*, Forensic Science International 7 (2013), s. 200-203
46. <http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1310/1310.5413.pdf>

47. Sykes B., Irven C. *Surnames and Y Chromosome*, The American Journal of Human Genetics 66 (2000), s. 1417-1419
48. King T.E., Jobling M.A. *What's in a name? Y chromosomes, surnames and the genetic genealogy revolution*, Trends in Genetics 25(8) (2009), s. 351-360
49. Jobling M.A. *Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis*, Forensic Science International 118 (2001), s. 158-162
50. Schneider P.M. *Scientific standards for studies in forensic genetics*, Forensic Science International 165 (2007), s. 238-243

## **Chromosom Y w molekularnych badaniach kryminalistycznych**

### Streszczenie

Chromosom Y jest jednym z najmniejszych chromosomów w ludzkim genomie. Jego szczególne cechy, tj. dziedziczenie wyłącznie w linii ojcowskiej, czy brak rekombinacji na prawie całej długości sprawiają, że jest on przydatnym narzędziem w badaniach kryminalistycznych. W przypadku, kiedy markery autosomalne nie mogą być wykorzystane, praktyczne zastosowanie w genetyce sądowej znajdują markery mikrosatelitarne chromosomu Y. Są one wykorzystywane nadużywając skalę w badaniach śladów zabezpieczonych w przypadku przestępstw na tle seksualnym oraz w szczególnych przypadkach podczas ustalania ojcostwa. Wykorzystując różnice pomiędzy allosomami kobiety i mężczyzny, analiza sekwencji chromosomu Y może także zostać wykorzystana w badaniach mających na celu ustalenie płci. Należy wówczas uwzględnić wszystkie ewentualności, które mogą fałszować otrzymany wynik.

Słowa kluczowe: amelogenina, chromosom Y, genetyka sądowa, haplogrupa, kryminalistyka

## **Y chromosome in forensic molecular studies**

### Abstract

Y chromosome is one of the smallest chromosomes in human genome. Its special features i.e. the inheritance only by the paternal line or lack of recombination on almost the entire length make Y chromosome useful in forensic studies. When the autosomal markers may not be used, practical use in forensic genetics may find microsatellite markers of Y chromosome. They are used for a large-scale in studies of traces secured in cases of sexual assaults and in specific cases of paternity determination. Because of the differences between male and female allosomes, the analysis of Y chromosome sequence may also be used in studies on sex determination, but it is necessary to take into account all eventualities that might falsify the results.

Keywords: Amelogenin , Y chromosome , forensic genetics , haplogroup , forensics

Kamil Myszczyński<sup>1</sup>, Łukasz Pauksto<sup>2</sup>, Tomasz Molcan<sup>2</sup>,  
Jan Paweł Jastrzębski<sup>2</sup>

## **Badanie ekspresji genów kluczem do poznania funkcjonowania organizmów – porównanie wiodących metod wysokoprzepustowych**

### **1. Wprowadzenie**

W każdym żywym organizmie magazynem informacji warunkującej właściwości oraz funkcjonowanie komórki jest DNA. W komórkach informacja ta jest przetwarzana poprzez mechanizm ekspresji genów polegający na uaktywnianiu wybranych zestawów genów. Informatywna zawartość genomów jest transkrybowana na cząsteczki RNA, które następnie mogą ulec translacji tworząc białka lub też bezpośrednio uczestniczyć w regulacji ekspresji genów. Profil transkrybowanego RNA (transkryptom) w określonych warunkach i określonym czasie stanowi odzwierciedlenie faktycznego stanu komórki, zaś porównanie transkryptomów w stanach patologicznych lub warunkach stresowych z transkryptomami zdrowych komórek pozwala na poznanie mechanizmów leżących u podstaw powstawania stanu chorobowego komórek [1].

Istnieje wiele metod badania ekspresji genów. W latach 90-tych metody analizy RNA bazowały głównie na reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR). Inną popularną metodą było badanie ekspresji genów poprzez zastosowanie PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR). Metody te zakładały analizę od jednego do maksymalnie kilkudziesięciu genów jednocześnie. Wraz z rozwojem technologii pojawiła się możliwość symultanicznej analizy setek, a nawet tysięcy genów przy użyciu technik wysokoprzepustowych. Zaliczamy do nich zarówno mikromacierze jak i sekwencjonowanie typu RNA-SEQ [2]. W poniższej pracy przedstawiona zostanie ogólna charakterystyka metod wysokoprzepustowych, z uwzględnieniem ich zalet, ograniczeń oraz sposobów analizowania danych numerycznych.

---

<sup>1</sup> kamil.myszczyński@gmail.com, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin. Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

<sup>2</sup> Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin. Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

## 2. Przebieg eksperymentu z wykorzystaniem mikromacierzy

Technologia mikromacierzy jest nadal powszechnie wykorzystywana zarówno w badaniach naukowych jak i analizach komercyjnych, głównie do analizy ekspresji genów, genotypowania (np. wykrywania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, tzw. SNP), detekcji miRNA oraz wielu innych analiz genomowych [3, 6].

Stosowanie mikromacierzy jest ograniczone do badań organizmów o poznanych genomach, dlatego rozwój tej technologii był możliwy stało się dzięki sukcesom genomiki strukturalnej i funkcjonalnej. Wiązały się one z lawinowym wzrostem ilości danych sekwencyjnych i gromadzeniem danych genetycznych w ogólnodostępnych biologicznych bazach danych nie tylko dla organizmów modelowych, takich jak: *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik), *Mus musculus* (mysz), *Caenorhabditis elegans* (nicień), ale praktycznie wszystkich organizmów badanych na świecie. Rozwój metod sekwencjonowania DNA umożliwił na przestrzeni ostatnich dwóch dekad poznanie sekwencji całych genomów, identyfikację oraz lokalizację genów na chromosomach wielu gatunków organizmów żywych. Obecnie (I kwartał 2015 roku) liczba zsekwencjonowanych genomów osiągnęła prawie 200 gatunków [4]. Na podstawie nagromadzonych informacji sekwencyjnych firmy opracowujące platformy mikromacierzowe mają możliwość projektowania sond cDNA lub oligonukleotydowych, komplementarnych dla poszczególnych genów danego gatunku. W zależności od typu platformy, badanego organizmu lub celu planowanego badania, chipy mikromacierzowe posiadają od kilkunastu tysięcy do nawet miliona punktów (ang. spot) czyli miejsc przyłączonych sond nukleotydowych [5].

Specyfika mikromacierzy zależy od danego producenta. Produkcja mikromacierzy bazuje na różnych technologiach, takich jak: precyzyjne umieszczanie sond na szklanej lub nylonowej membranie mikrochipa, drukowanie macierzy (Agilent), fotolitografi (Affymetrix) oraz elektrochemii stosowanej w przypadku macierzy mikroelektrodowych (CombiMatrix) [7].

### 2.1. Analiza laboratoryjna

Eksperyment mikromacierzowy, podobnie jak technika RNA-seq, dzieli się na dwie fazy. Pierwsza obejmuje część laboratoryjną, druga to analizy *in silico*. Pierwszy etap fazy laboratoryjnej to izolacja matrycowego RNA (mRNA), który następnie przepisuje się na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy w obecności wyznakowanych (najczęściej barwnikami fluorescencyjnymi) nukleotydów trójfosforanowych jako substratów. Tak przygotowana pula cDNA jest wprowadzana na powierzchnię mikromacierzy, gdzie w procesie hybrydyzacji łączy się z komple-

mentarnymi sondami nukleotydowymi. W wyniku tego procesu dochodzi do fluorescencji barwników znakujących transkrypt [8]. Emisja sygnału świetlnego ze zhybrydowanego materiału genetycznego zostaje wzbudzona poprzez światło lasera o sprecyzowanej długości fali (550 nm dla Cy3 – cyjanina 3 oraz 649 nm dla Cy5 – cyjanina 5). Podstawowa różnica między macierzą jedno- i dwukolorową wynika z użycia różnych barwników fluorescencyjnych. W przypadku macierzy jednokolorowej wykorzystuje się streptawidynę sprzężoną z fluoroforem. Natomiast w drugim przypadku stosuje się dwa oddzielne fluorochromy Cy3 i Cy5 dla próby badanej i referencyjnej. Połączenie wyznakowanych obu mieszanin reakcyjnych uwidacznia się na płycie w postaci emisji światła w zakresie barw zielona-żółta-czerwona. W zależności od przewagi liczby kopii danego transkryptu w porównywanych próbach, barwa świecenia pojedynczego punktu będzie w zakresie barw zielonych lub czerwonych. Barwie żółtej najczęściej przypisuje się zrównoważony poziom ekspresji w porównywanych transkryptomach. Wynikiem skanowania mikromacierzy jest cyfrowy zapis intensywności świecenia sond. Jest to efekt końcowy analizy laboratoryjnej eksperymentu mikromacierzowego.

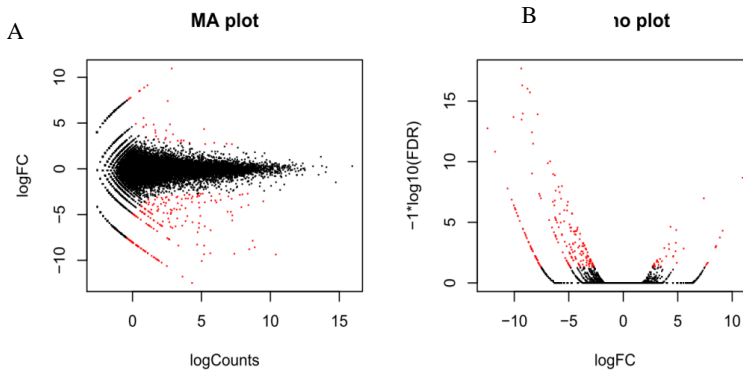
## 2.2. Analiza danych

Za początek fazy *in silico* uznaje się proces digitalizacji obrazów świecenia, powstałych w wyniku hybrydyzacji. Każdy z punktów znajdujących się na macierzy poddany zostaje dokładnej analizie cyfrowej. Analiza obrazów obejmuje lokalizację punktów, segmentację sygnałów (przypisanie każdego piksela obrazu do świecenia właściwego lub świecenia tła), numeryczne określenie wartości ekspresji genów oraz tła obrazu (w obrębie poszczególnych punktów i ostatecznie szacowanie jakości obrazu. Wartości numeryczne zapisywane są w odpowiednich formatach plików (\*.cel, \*.grp). Informacje zawarte w plikach należy dodatkowo zweryfikować w procesie kontroli jakości danych. Proces ten ma za zadanie oszacować czy podczas wykonywania eksperymentu laboratoryjnego nie doszło do poważnych błędów metodologicznych. Po zaakceptowaniu wyników pracy laboratoryjnej, w kolejnym etapie dane są normalizowane. Celem procesu normalizacji jest usunięcie z analiz wszystkich szumów, mogących wpłynąć na prawdziwość wyników. Za szum uważa się zmiany nie wynikające z biologicznych podstaw badanego procesu [9]. Każda analiza obciążona jest pewnym błędem statystycznym, jednakże aby nie doszło do falsyfikacji wyników badań należy pozbyć się błędów grubych. Dodatkowo proces normalizacji jest niezbędny w eksperymentach zakładających wielokrotną liczbę powtórzeń (n). W zależności od zastosowanej technologii i typu danych, podczas normalizacji stosuje się



szereg różnych działań (m.in. logarytmowanie, redukcję tła, iteracyjną regresję liniową), bazujących na algorytmach matematycznych [10]. Normalizacji podlegają zarówno pojedyncze macierze (ang. *within normalization*), jak i całe grupy macierzy, np. wszystkie macierze z puli próby kontrolnej eksperymentu (ang. *between normalization*). Efektem finalnym normalizacji jest ujednoczony zestaw danych, gotowy do analiz określających różnice w ekspresji genów (ang. *difference expression – DE*) (Rys. 1.) [11]. Wszystkie zabiegi i operacje *in silico* opisane powyżej są nazywane preanalizą.

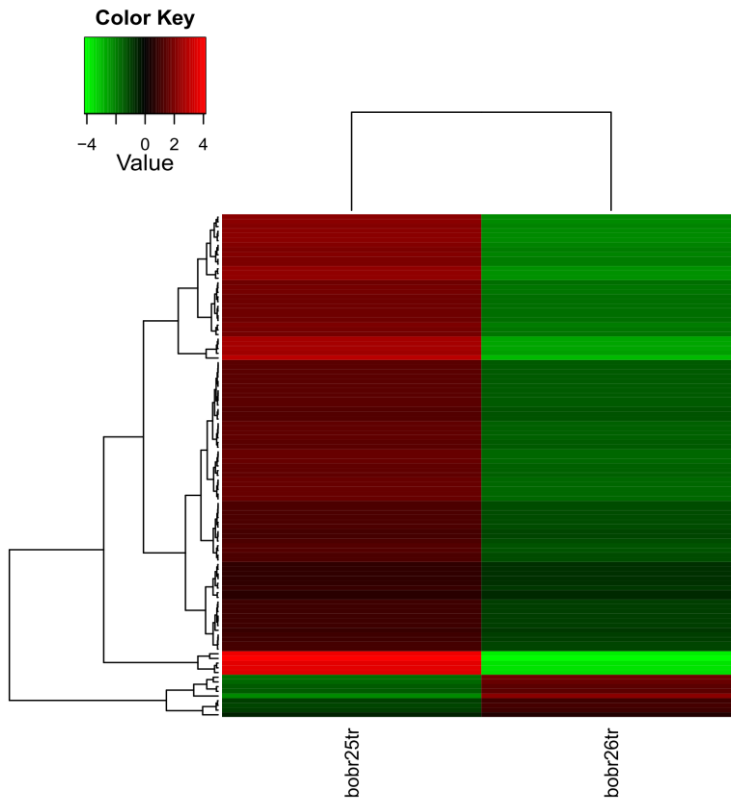
Analiza właściwa ma za zadanie wskazać geny o istotnych różnicach w ekspresji między badanymi komórkami. W każdym eksperymencie biologicznym stawiane są hipotezy badawcze, które na podstawie wyników tego eksperymentu są potwierdzone lub też odrzucone. W przypadku mikromacierzy mamy do czynienia z tysiącami hipotez badawczych, które zostają weryfikowane poprzez testowanie każdego genu pod kątem różnic w poziomie ekspresji. Stosunek zlogarytmowanych wartości fluorescencji obu prób nazywa się krotnością zmian ekspresji (ang. *fold change*). Na podstawie tego parametru szacowana jest wartość statystyczna „p-value” (parametryczny test t-student). W eksperymentach o bardziej skomplikowanych założeniach (np. wymagających wielokrotnych porównań), wykorzystywane są analizy wariancji (ANOVA). W ostatecznym układzie połączenie obu tych parametrów pozwala na selekcję genów o największych fluktuacjach pomiędzy badanymi obiektami (rys. 2) [12].



Rysunek 1. Wyniki analiz po normalizacji danych [opracowanie własne] A. Wykres MA plot przedstawiający rozkład ekspresji genów. Parametr logFC na osi Y opisuje różnicę w ekspresji pomiędzy badanymi próbami. Wartość 0 oznacza brak różnic w ekspresji, wartość dodatnie – zwiększenie ekspresji genu w jednej próbie względem drugiej, wartości ujemne zmniejszenie ekspresji genu w jednej próbie względem drugiej. Czarne kropki wskazują geny o braku różnic, czerwone kropki uwiadcniają geny o potencjalnych różnicach w poziomie ekspresji (po lewej) B. Wykres Volcano plot uwzględniający statystyczne wartości p-value (oś Y) w skali logarytmicznej  $-\log_{10}(\text{FDR})$

Opisywane wyżej etapy postępowania analizy *in silico* wykorzystują skomplikowane algorytmy matematyczne oraz statystyczne. Wykonanie takiej analizy wymaga zaawansowanych umiejętności bioinformatycznych oraz odpowiedniego oprogramowania. Istnieje wiele narzędzi bioinformatycznych dostępnych zarówno komercyjnie (np. GeneSpring) jak i na licencjach darmowych (przede wszystkim Bioconductor w pakiecie R) [13]. Pomimo że badanie mikromacierzowe zalicza się do analiz wysokoprzepustowych, nie wymagają one komputerów o dużych mocach obliczeniowych. Lista wyselekcjonowanych genów o różnej ekspresji poddana zostaje weryfikacji i usystematyzowaniu w analizach wyższego rzędu.

Poziom ekspresji genów jest miarą typowo relatywną, ponieważ wartości bezwzględna ilość transkryptomu w próbce badanej nie są tak ważne, co różnice wynikające z porównania poziomów ekspresji pomiędzy próbkami. O tym jaki jest poziom ekspresji genu w badanych warunkach, świadczy ilość transkryptów czyli matrycowego RNA. Intensywność świecenia pojedynczego punktu w eksperymencie mikromacierzowym jest wprost proporcjonalna do ilości zhybrydyzowanego mRNA. Duża intensywność świecenia punktów na mikromacierzy nie gwarantuje znaczących wyników badawczych bowiem geny niezbędne do przeżycia każdej komórki działają nieprzerwanie i ich ekspresja jest stale na dużym poziomie. Geny o takiej specyfice nazywamy genami metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes). Porównując ekspresję tego typu genów między komórkami w większości przypadków nie zauważa się różnic w ekspresji, chyba że badany proces doprowadza do zmiany funkcji komórek lub ich dysfunkcji [14].



Rysunek 2. Mapa termiczna - wykres przedstawiający różnice w ekspresji genów pomiędzy badanymi komórkami [opracowanie własne]. Czerwonym kolorem zaznaczono geny wykazujące zwiększoną ekspresję w jednej próbie w stosunku do drugiej, zielonym kolorem zaznaczono zmniejszoną ekspresję. Ciepłe kolory świadczą o wyższych różnicach

### **3. Przebieg eksperymentu z wykorzystaniem sekwencjonowania**

Wśród metod służących do pomiaru poziomu ekspresji genów, sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) jest obecnie najbardziej atrakcyjne. Wynika to głównie z faktu, iż analizy RNA-Seq dają możliwość nie tylko określenia poziomu ekspresji transkryptów danej próbki, ale także identyfikację nowych transkryptów, pojedynczych mutacji (w tym również delecji i insercji) oraz ,alternatywnego składowania genów [15].

#### **3.1. Analiza laboratoryjna**

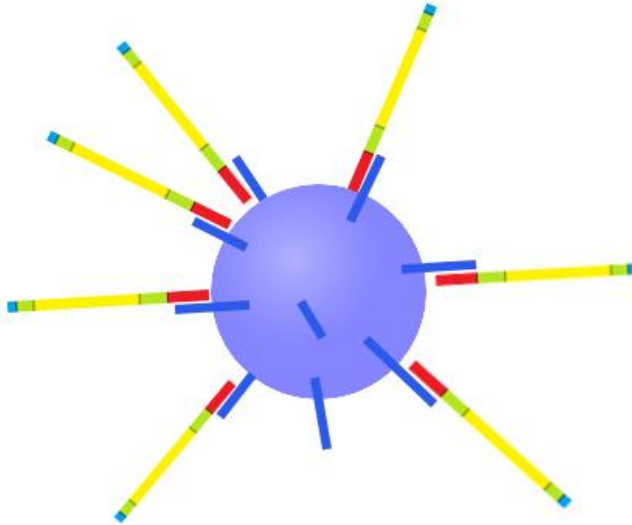
Analiza RNA-Seq rozpoczyna się od pobrania próbek z materiału badawczego oraz izolacji RNA. Izolacja RNA przebiega zwykle przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów. W tym celu często wykorzystuje się złoża magnetyczne (ang. magnetic beads) zawierające związane sekwencje nukleotydowe poli-T, do których przyłączają się komplementarne ogony poli-A mRNA (rys. 3.) [17]. Przed przystąpieniem do kolejnych etapów procedury należy sprawdzić jakość wyizolowanego RNA. W tym celu obecnie określa się najczęściej integralność RNA (RIN), przy czym RNA dobrej jakości przyjmuje wartość RIN co najmniej 8 w 10-cio stopniowej skali [18].

Następnym krokiem analizy laboratoryjnej jest fragmentacja mRNA. Do otrzymanych, krótkich odcinków mRNA przyłączane są losowe startery i przy pomocy odwrotnej transkryptazy zostaje zsyntetyzowana pierwsza nić cDNA. Po zakończeniu tego procesu usuwane jest matrycowe RNA, a w jego miejsce syntetyzowana jest druga nić cDNA, co skutkuje powstaniem dwuniciowych cząsteczek cDNA. Tak powstałe ds-cDNA posiada nierównej długości końce 3' oraz 5' (tzw. lepkie końce), dlatego są one przycinane w kolejnym etapie analizy. Następnie pojedyncze nukleotydy adeninowe zostają przyłączone na końcach 3' aby zapobiec łączeniu się ze sobą powstałych fragmentów. Tak przygotowane krótkie sekwencje cDNA są poddawane się przyłączaniu adapterów, które posiadają na końcu 5' pojedynczy nukleotyd tyminowy oraz różnego rodzaju komponenty biorące udział ich przyłączaniu do cDNA. Następnie, kompleksy cDNA z adapterami, poddawane są amplifikacji (ang. DNA enrichment) w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z użyciem starterów komplementarnych do fragmentów adapterów [19]. Końcowym etapem laboratoryjnej procedury sekwencjonowania transkryptomu jest sprawdzenie jakości otrzymanej biblioteki DNA pod kątem wielkości produktu oraz zanieczyszczeń. W tym celu przeprowadzana zostaje elektroforeza kapilarna oraz analiza elektroforogramu [19, 20]. Wynikiem laboratoryjnej części analizy RNA-Seq są krótkie (poniżej 100 nt) sekwencje cDNA [16]. Pomiedzy różnymi platformami do RNA-Seq mogą występować niewielkie różnice w metodologii.

a)



b)



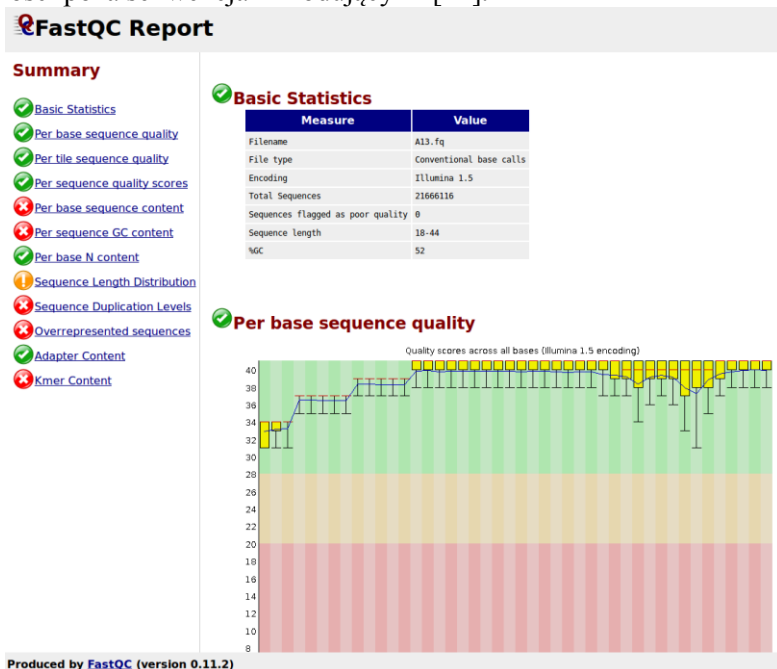
Rysunek 3. Schemat przedstawiający cząsteczkę dojrzałego mRNA eukariotycznego oraz sposób przyłączania mRNA do żołądź magnetycznych [opracowanie własne]; a) dojrzała cząsteczka mRNA eukariotycznego składa się z: 1 – czapeczki na końcu 5', 2 – obszaru nieulegającego translacji na końcu 5' (5'UTR), 3 – sekwencji kodującej, 4 – obszaru nieulegającego translacji na końcu 3' (3'UTR), 5 – ogona poli-A na końcu 3', b) cząsteczki mRNA z całej puli RNA wyizolowanego z komórki i są wychwytywane poprzez żołądź magnetyczny. Cząsteczki mRNA przyłączają się ogonami poli-A do łańcuchów poli-T (kolor niebieski) immobilizowanych na żołądź magnetycznym

### 3.2. Analiza danych

Drugą częścią eksperymentu opartego na technologii RNA-Seq jest bioinformatyczna analiza danych. Danymi początkowymi analizy bioinformatycznej transkryptów są miliony krótkich odczytów sekwencji nukleotydowych (ang. reads) zapisanych najczęściej w formacie FASTQ [15, 21].

Pierwszym krokiem analizy danych *in silico* jest ocena jakości otrzymanych odczytów. Dane należy sprawdzić pod kątem występowania w sekwencjach nukleotydów o niskiej jakości odczytu, bądź niespre-

cyzowanych (N), zawartości nukleotydów guaninowych i cytozynowych (ang. GC content), występowaniem adapterów, występowaniem duplikacji oraz rozkładu długości sekwencji (rys. 4.) [22]. Pośród odczytów RNA-Seq można wyróżnić następujące rodzaje: odczyty znajdujące się w obrębie jednego egzonu lub na granicy egzonów, odczyty obejmujące część egzonu oraz fragment sekwencji niekodującej lub też odczyty znajdujące się w załości poza sekwencjami kodującymi [11].



Rysunek 4. Ocena jakości odczytów przy użyciu programu FastQC [22].

Po sprawdzeniu jakości sekwencji należy usunąć odczyty, które nie spełniają kryteriów jakościowych (ang. preprocessing) takich jak: niska jakość sekwencji oraz obecność sekwencji pochodzących z etapu przygotowania bibliotek (np. adapterów). Dobrą praktyką jest usunięcie sekwencji zanieczyszczających próbki, pochodzących z innych organizmów niż badany organizm. Takie sekwencje mogą pojawiać się w otrzymanych danych laboratoryjnych z powodu zanieczyszczenia materiału genetycznego lub poprzez sekwencjonowanie na tym samym sekwencjonatorze prób pochodzących z różnych organizmów [23]. Zalecane jest również przycinanie sekwencji (ang. trimming) z uwagi na to, że końcowe odcinki sekwencji zwykle charakteryzują się występowaniem nukleotydów o niskiej jakości odczytu.

Kolejne etapy analizy bioinformatycznej są uzależnione od dostępności genomu referencyjnego badanego organizmu. Jeżeli jest on dostępny przeprowadza się mapowanie odczytów z wykorzystaniem sekwencji referencyjnej (rys. 5.). W przeciwnym razie należy składać transkryptom *de novo*. Zarówno mapowanie jak i składanie transkryptomu *de novo* są procesami skomplikowanymi obliczeniowo. Przyczyną złożoności obu procesów są: analiza milionów sekwencji naraz, znaczne wielkości genomów oraz występowanie wielu izoform tych samych genów [24].



Rysunek 5. Mapowanie odczytów do genu referencyjnego. Odczyty (kolor czarny) zostały dopasowane do genu referencyjnego (kolor zielony). Rozkład oraz liczebność zmapowanych odczytów jest miarą poziomu ekspresji danego genu. Opracowanie własne na podstawie [32].

Mapowanie transkryptów do genu referencyjnego polega na dopasowaniu odczytów RNA-Seq do znanej sekwencji kodującej z genomu badanego organizmu. Najczęściej stosowanymi programami w tym celu są m. in.: TopHat2 [25] Cufflinks [26] oraz Scripture [27]. Natomiast składanie genomu *de novo* polega na tworzeniu grup odczytów o podobnym układzie sekwencji nukleotydowych i odczytywanie dłuższych sekwencji konsensusowych (kontigów). Otrzymaną w ten sposób sekwencją przeszukuje bazy danych sekwencji kodujących w celu określenia funkcji oraz procesów biologicznych, w których zidentyfikowany transkrypt bierze udział. Do składania transkryptomu *de novo* wykorzystywane są programy bazujące na dwóch algorytmach: *overlap graph* oraz *De Bruijn graph*, a należą do nich: Trinity [28], SOAPdenovo [29] Oases [30].

Kluczowymi danymi otrzymanymi z mapowania lub składania transkryptów *de novo* jest liczba odczytów przypadająca na określony transkrypt. Dzięki przypisaniu każdego odczytu do konkretnej sekwencji kodującej możliwy jest pomiar poziomu ekspresji genów. Jej miarą są: iloraz liczby odczytów na liczbę nukleotydów egzonu oraz 1 mln na ogólną liczbę zmapowanych odczytów w próbce (RPKM) lub liczba odczytów na tysiąc nukleotydów na 1 mln na ogólną liczbę zmapowanych odczytów

w próbkę (FPKM). Porównanie ww. liczb pomiędzy badanymi genami prób dostarcza informacji o różnicach w ekspresji obu prób [31].

Ponadto analiza RNA-Seq może dostarczyć wielu dodatkowych informacji o badanym transkrypcie takich jak: identyfikacja nieopisanych wcześniej dla danego organizmu sekwencji kodujących, zmian wewnątrz struktur genów, niekodującego RNA i form genów oraz ustalenie ich funkcji [23].

#### **4. Podsumowanie**

Przez ponad dekadę mikromacierze były wiodącą technologią w badaniach ekspresji genów. Jej rewolucyjność polegała na możliwości badaniu wielu transkryptów jednocześnie przy relatywnie niskich kosztach. Mikromacierze w szybkim tempie zyskały popularność i uznanie wśród naukowców badających zmiany na poziomie transkryptomu, aczkolwiek technologia nie jest pozbawiona wad. Głównymi problemami przy jej stosowaniu jest: wymóg znajomości badanych sekwencji, ograniczenie analizy tylko do wybranych krótkich fragmentów DNA lub RNA, duże ryzyko błędów na poziomie detekcja-szumy-normalizacja. Główne założenia sekwencjonowania transkryptomu typu RNA-SEQ nie powielają niedoskonałości koncepcyjnych mikromacierzy gdyż sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. Next - Generation Sequencing) nie jest oparte o hybrydyzację transkryptomów ze zdefiniowanymi sondami czyli krótkimi odcinkami nukleotydowymi, specyficznymi dla konkretnych genów.

Jednakże największym problemem wszystkich badań wysoko-przepustowych jest wpływ tła a konkretnie tzw. szum tła, który w znaczący sposób może zmieniać lub wręcz wypaczyć wyniki badań. Dlatego zanim przeprowadzona zostanie właściwa analiza, wykonuję się serię analiz polegających na usunięciu zmienności niewynikających z biologicznych założeń eksperymentu. Szczególnie błędnie zaprojektowane sondy o niepecyficznym wiązaniu wpływają na zwiększenie szumu tła eksperymentów mikromacierzowych, powodując trudności w analizowaniu danych.

Pomimo pewnych ograniczeń mikromacierzy w stosunku do sekwencjonowania RNA nowej generacji, mają one taką zaletę że obróbka danych mikromacierzowych jest dotychczas lepiej poznana. Analizy danych tego typu obecnie są niemal rutynowo wykonywane, znacznie ułatwiając interpretację wyników.

Fundamentalną różnicą pomiędzy tymi metodami jest możliwość badania organizmów o nieznanym genomie metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA, co w przypadku mikromacierzy jest niemożliwe. Sekwencjonowanie nowej generacji typu RNA-SEQ pozwala na jakościowe i ilościowe oszacowanie wartości transkryptomu. Dostęp do



całej analizowanej sekwencji daje także możliwość odszukiwania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz alternatywnego składowania genów.

## Literatura

1. Finotello F., Di Camillo B. *Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis*, Briefings in Functional Genomics., 14 (2014), s. 130-142
2. Zhao S., Fung-Leung W-P., Bittner A, Ngo K., Liu X. *Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells*, PLoS ONE., 9.1 (2014), s. 1-13
3. Ahanda M.L., Endale, Fritz E.R., Estelle J., Hu Z.L, Madsen O., Groenen M.A., Beraldi D., Kapetanovic R., Hume D.A., Rowland R.R., Lunney J.K., Rogel-Gaillard C., Reecy J.M., Giuffra E. *Prediction of altered 3'-UTR miRNA-binding sites from RNA-Seq data: the swine leukocyte antigen complex (SLA) as a model region*, PLoS ONE., 11.7 (2012), s. 1-11
4. [http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced\\_genomes](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced_genomes)
5. Corral J. M., Vogel H., Aliyu O. M., Hensel G., Thiel T., Kumlehn J., Sharbel T. F. *A Conserved Apomixis-Specific Polymorphism Is Correlated with Exclusive Exonuclease Expression in Premeiotic Ovules of Apomictic Boechera Species*, Plant Physiology., 163.4 (2013), s. 1660-1672
6. Szeto C. Y. Y., Lin Ch. H., Choi S.Ch., Yip T.T. C., Ngan R. K. Ch., Tsao G. S. W., Lung Integrated M. L. *mRNA and microRNA transcriptome sequencing characterizes sequence variants and mRNA-microRNA regulatory network in nasopharyngeal carcinoma model systems*, FEBS Open Bio., 4 (2014), s. 128-140
7. Draghici S., Khatri P., Eklund A.C., Szallasi Z. *Reliability and Reproducibility Issues in DNA Microarray Measurements*, Trends in Genetics., 22.2 (2006), s. 101-109
8. Koltai H., Weingarten-Baror C. *Specificity of DNA microarray hybridization: characterization, effectors and approaches for data correction*, Nucleic Acids Research., 36.7 (2008), s. 2395-2405
9. Draghici S. *Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data*, Drug Discov., 7.11 (2002), s. 55-63
10. Schadt E. E., Li C., Su C., Wong W. H. *Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data*, J Cell Biochem., 2.80 (2000), s. 192-202
11. Smyth G. K., Speed T. P. *Normalization of cDNA microarray data*, Methods., 31(2003), s. 265-273
12. Cui X., Churchill G. *Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments*, Genome Biology., 4(2003), s.1-10
13. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li Ch., Maechler M., Rossini A.J, Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y.H., Zhang J. *Bioconductor: open*

- software development for computational biology and bioinformatics*, Genome Biology., 5 (2004), s. 1-16
14. Chang Ch. W., Cheng W. Ch., Chen Ch. R., Shu W.-Y., Tsai M.-L., Huang Ch.-L., I. Hsu C. *Identification of Human Housekeeping Genes and Tissue-Selective Genes by Microarray Meta-Analysis*, PLoS One., 6 (2011), s. 1-10
  15. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*, Nature Reviews Genetics., 10 (2009), s. 57-63
  16. Maekawa S., Suzuki A., Sugano S., Suzuki Y. *RNA Sequencing: From sample preparation to analysis*, Transcription factor regulatory networks., 6 (2014), s. 51-66
  17. Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*, Nature Methods., 5 (2008), s. 621-628
  18. Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*, BMC Molecular Biology., 7 (2006), s. 1-14
  19. Kumar R., Ichihashi Y., Kimura S., Chitwood D. H., Headland L. R., Peng J., Maloof J. N., Sinha N. R. *A high-throughput method for Illumina RNA-Seq library preparation*, Frontiers in Plant Science., 3 (2012), s. 1-10
  20. Lei T., Becker A., Ji Y. *Transcriptomic analysis of Staphylococcus aureus using microarray and advanced Next-Generation RNA-seq technologies*, Methods in Molecular Biology, 1085 (2014), s. 213-229
  21. Cock P. J. A., Fields C. J., Goto N., Heuer M. L., Rice P. M. *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*, Nucleic Acids Research., 38 (2010), s. 1767-1771
  22. Andrews S. *FastQC*, bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
  23. Korpelainen E., Tuimala J., Somervuo P., Huss M., Wong G. *RNA-seq data analysis: a practical approach*, CRC Mathematical and Computational Biology Series., 2014
  24. Kapranov P., St Lauren G., Raz T., Oszolak F., Reynolds C. P., Sorensen P. H. B., Reaman G., Milos P., Arceci R. J., Thompson J. F., Triche T. J *The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is 'dark matter' un-annotated RNA*, BMC Biology., 9 (2011), s. 1-15
  25. Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S. L. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in presence of insertions, deletions and gene fusions*, Genome Biology., 14 (2013), s. 1-13
  26. Trapnell C., Williams B. A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M. J., Salzberg S. L., Wold B. J., Pachet L. *Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*, Nature Biotechnology., 28 (2010), s. 511-515
  27. Guttman M., Garber M., Levin J. Z., Donaghey J., Robinson J., Adiconis X., Fan L., Koziol M. J., Gnirke A., Nusbaum C., Rinn J. L., Lander E. S., Regev A. *Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse*

- reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs*, Nature Biotechnology., 28 (2010), s. 503-510
28. Grabherr M. G., Haas B. J., Yassour M., Levin J. Z., Thompson D. A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B. W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. *Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome*, Nature Biotechnology., 29 (2011), s. 644-652
  29. Li R., Zhu H., Ruan J., Qian W., Fang X., Shi Z., Li Y., Li S., Shan G., Kristiansen K., Li S., Yang H., Wang J., Wang J. *De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing*, Genome Research., 20 (2010), s. 265-275
  30. Schulz M. H., Zerbino D. R., Vingron M., Birney E. *Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels*, Bioinformatics., 28 (2012), s. 1086-1092
  31. Garber M., Grabherr M. G., Guttman M., Trapnell C. *Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq*, Nature Methods., 8 (2011), s. 469-477
  32. Kearsse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markovitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. *Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*, Bioinformatics., 28 (2012), s. 1647-1649

## **Badanie ekspresji genów kluczem do poznania funkcjonowania organizmów – porównanie metod wysokoprzepustowych**

### Streszczenie

Rozwój badań molekularnych w ostatnim dziesięcioleciu pozwolił na zrozumienie etiologii wielu chorób oraz opracowanie metod skutecznego ich leczenia. Wyniki projektu poznania ludzkiego genomu pokazały, że analizy zmierzające jedynie do identyfikacji oraz lokalizacji genów człowieka są niewystarczające aby w pełni poznać mechanizmy odpowiedzialne za funkcjonowanie ludzkiego organizmu. Do tych celów niezbędne są analizy transkryptomu, które odkrywają rzeczywistą rolę genów w przebiegu szlaków metabolicznych w komórce. Rozwój genomiki funkcjonalnej umożliwił analizę funkcjonowania całych zestawów genów jednocześnie, przy czym. kompleksowe analizy genomiczne określa się jako metody wysokoprzepustowe. Jedną z pierwszych opracowanych metod tego typu były mikromacierze. Pomimo pewnych ograniczeń analizy mikromacierzowe nadal stanowią atrakcyjną metodę badawczą choć wraz z rozwojem metod sekwencjonowania RNA nowej generacji popularność tego analiz w środowisku naukowym znacznie wzrosła.

Celem niniejszej pracy jest zestawienie możliwości technologii mikromacierzy ekspresyjnych oraz sekwencjonowania transkryptomu pod kątem ich zastosowań w badaniach genomicznych. W pracy zostały ujęte ścieżki postępowania dla obu metod. Przedstawiono opis etapów pracy laboratoryjnej oraz analizę danych przeanalizowano pakiety statystyczne niezbędne do obróbki danych oraz sposoby wizualizacji wyników.

Słowa kluczowe: ekspresja genów, sekwencjonowanie RNA, analizy wysokoprzepustowe, mikromacierze, genomika

## **Gene expression analysis as key to understanding the functioning of organisms – comparison of high-throughput methods**

### **Abstract**

Development of molecular research in the last decade allowed better understanding of disease etiology and also made disease treatment more efficient. Results of the Human Genome Project, have shown that identification and localization of human genes are not sufficient for the purpose of understanding of human body biological machinery. For these purposes, gene expression analysis, which shows the true role of genes in metabolic pathways, seems to be necessary. Development of functional genomics facilitated analysis of the whole set of genes simultaneously and complexed genome analysis was named high-throughput methods. Microarrays was one of the first developed methods. The popularity of Next- Generation RNA Sequencing has highly increased among scientific community with a development of this technology.

The aim of this research is comparison of both technologies with regard to accuracy and reliability and also assessment of both gene expression microarrays and transcriptome sequencing technologies usage in genomic studies. This research describes possible pipelines for both methods. Each stage of laboratory work and data analysis have been described, the statistical packages for data analysis have been examined and also different ways of visualization of results have been proposed.

Keywords: gene expression, high-throughput analysis, RNA sequencing, microarray, genomics

## Terapeutyczne zastosowanie wybranych inhibitorów deacetylaz histonów (HDIs)

### 1. Wstęp

Epigenetyka to stosunkowo młoda dziedzina nauki badająca zmiany w obrębie materiału genetycznego, prowadzące do wzmocnienia lub utraty aktywności transkrypcyjnej genów. Modyfikacje te nie wynikają jednakże ze zmian w sekwencji nukleotydów. Mechanizmy epigenetyczne obejmują metylację i hydroksymetylację samego DNA, modyfikacje histonów (np. metylację, acetylację, sumoilację, ubikwitynację), przebudowę chromatyny zależną od ATP oraz interferencję RNA. Mechanizmy te uczestniczą w regulacji ekspresji licznych genów zaangażowanych w różnorodne procesy fizjologiczne i patologiczne, w tym w proces kancerogenezy [1].

Blisko 50 lat temu zaobserwowano silny związek pomiędzy hiperacetylacją/deacetylacją histonów, a odpowiednio nasileniem/represją aktywności wielu genów. Obserwacja ta, stała się podstawą poszukiwania nowej strategii terapeutycznej opartej na specyfice działania acetylaz i deacetylaz histonów. Deacetylazy histonów zmniejszając stopień acetylacji białek histonowych oraz indukując kondensację chromatyny, uczestniczą w hamowaniu transkrypcji wielu genów. Osłabiona ekspresja genów zaangażowanych w procesy apoptozy i różnicowania komórek związana jest z powstawaniem zarówno guzów litych, jak też nowotworów hematologicznych [2, 32].

Wśród standardowych metod leczenia nowotworów wymienić należy chirurgiczną resekcję, radio- czy chemioterapię. Stosowanie tradycyjnych metod ograniczone jest jednak licznymi skutkami niepożądanymi, a także występowaniem zjawiska oporności na chemioterapeutyki. Dlatego też niezwykle istotne wydaje się poszukiwanie cytostatyków nowej generacji, o możliwie jak najsłabszych działaniach ubocznych. Obiecującą grupę związków stanowią inhibitory deacetylaz histonów (HDIs, ang. *histone deacetylase inhibitors*). Mechanizm aktywności przeciwnowotworowej

---

<sup>1</sup>anna\_wawruszak@interia.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, [www.umlub.pl](http://www.umlub.pl)

<sup>2</sup>um.katarzyna.krol@gmail.com, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, [www.umlub.pl](http://www.umlub.pl)

<sup>3</sup>borzecka.ag@gmail.com, Katedra i Zakład Epidemiologii, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, [www.umlub.pl](http://www.umlub.pl)

oraz swoistość działania HDIs nie zostały jednak do końca poznane. Wiadomo natomiast, że HDIs poprzez regulację ekspresji szeregu genów są w stanie hamować wzrost komórek nowotworowych oraz indukować ich różnicowanie i apoptozę [2, 32].

## 2. Cel pracy

Celem poniższej pracy jest krótki przegląd literaturowy wybranych HDIs stosowanych w terapii chorób nowotworowych.

## 3. Modyfikacje epigenetyczne

Jeszcze do niedawna uważano, że ekspresja genów zależna jest jedynie od informacji zapisanej w sekwencji DNA. Zbiegiem lat okazało się, że modyfikacje białek histonowych powstałe na skutek działania różnych grup enzymów, takich jak metylazy, demetylazy, acetylazy czy deacetylazy, także wpływają na regulację ekspresji genów. Zmiany poziomu aktywności tych enzymów mogą w konsekwencji prowadzić do wystąpienia i rozwoju nowotworu. Zmiany w modyfikacjach histonów polegające na dysregulacji procesów acetylacji/deacetylacji powodują nadekspresję genów zaangażowanych w proces kancerogenezy [1]. W literaturze opisano wiele przykładów zależności pomiędzy występowaniem konkretnego nowotworu (rak sutka, okrężnicy, stercza), a istnieniem określonej modyfikacji reszt aminokwasowych białek histonowych [1]. Z przyczyn opisanych powyżej podejmowane są próby stosowania terapii, której celem jest odwrócenie negatywnych skutków niepożądanych modyfikacji (np. demetylacja DNA z użyciem leków demetylujących DNA czy deacetylacja reszt lizylowych histonów z wykorzystaniem inhibitorów deacetylaz histonów) [1].

### 3.1. Acetylotransferazy (HATs) i deacetylazy histonów (HDACs)

Acetylotransferazy (HATs, ang. *histone acetyltransferases*) i deacetylazy histonów (HDACs, ang. *histone deacetylases*) to enzymy katalizujące odpowiednio odwracalną acetylację/deacetylację białek histonowych. W badaniach wykazano, że pełnią one funkcję odpowiednio koaktywatorów i korepresorów transkrypcji. HATs katalizują reakcję acetylacji ε-aminowych reszt lizyny i wywołują zmiany konformacyjne nukleosomów, przez co uczestniczą w aktywacji transkrypcji licznych genów [2, 3]. HDACs to wielopodjednostkowe kompleksy białkowe indukujące deacetylację histonów, prowadząc do uzyskania zwartej struktury chromatyny i zahamowania transkrypcji. Na podsatwie lokalizacji komórkowej, budowy strukturalnej i aktywności chemicznej HDACs podzielono na cztery klasy: I (HDAC1, HDAC 2, HDAC 3, HDAC 8), II (HDAC4, HDAC5, HDAC 7, HDAC 9), III (HDAC 6, HDAC 10) oraz IV (HDAC 11) (Tabela 1.) [2, 4].

HDACs należące do klasy I, II, IV to klasyczne deacetylazy histonów zawierające w swoim centrum aktywnym atom cynku. Klasa III (rodzina sirtuin) do prawidłowego funkcjonowania wymaga utlenionej formy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego [2]. Wzmoczona ekspresja HDACs w komórkach nowotworowych związana jest ze zmniejszeniem stopnia acetylacji histonów i transkrypcyjnym wyciszeniem wielu genów [2].

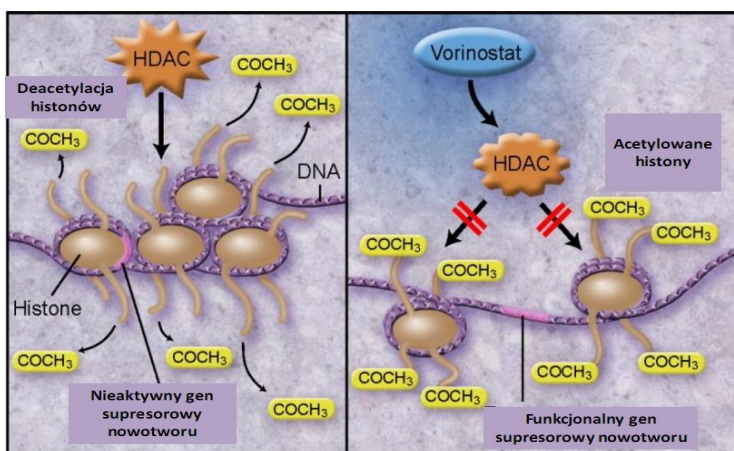
Tabela 1. Podział izoform deacetylaz histonów ze względu na lokalizację komórkową i ekspresję tkankową

<b>Klasa</b>	<b>Izoforma</b>	<b>Lokalizacja komórkowa</b>	<b>Ekspresja tkankowa</b>
<b>Klasa I</b>	HDAC1	Jądrowa	Wszechobecne
	HDAC2	Jądrowa	Wszechobecne
	HDAC3	Jądrowa	Wszechobecne
	HDAC8	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Wszechobecne
<b>Klasa II</b>	HDAC4	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Serce, mięśnie gładkie, mózg
	HDAC5	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Serce, mięśnie gładkie, mózg
	HDAC7	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Serce, mięśnie gładkie, łożysko, trzustka
	HDAC9	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Mięśnie gładkie, mózg
<b>Klasa III</b>	HDAC6	Cytoplazmatyczna	Nerki, wątroba, serce, trzustka
	HDAC10	Cytoplazmatyczna	Śledziona, nerki, wątroba
<b>Klasa IV</b>	HDAC11	Jądrowa/cytoplazmatyczna	Serce, mięśnie gładkie, nerki, mózg

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [5]

#### **4. Inhibitory deacetylaz histonów (HDIs) – mechanizm działania**

Inhibitory deacetylaz histonów to grupa cytostatyków nowej generacji hamująca aktywność deacetylaz histonów. HDIs reagując z katalityczną domeną HDACs blokują ich aktywność, zwiększając przy tym stopień acetylacji histonów rdzeniowych. Prowadzi to w konsekwencji do utworzenia chromatyny o otwartej konfiguracji i ekspresji nieprawidłowo wyciszonych genów (Rysunek 1.) [2, 7].



Rysunek 1. Mechanizm działania inhibitorów deacetylaz histonów na przykładzie Vorinostatu (SAHA) [6]

HDIs poprzez modulację struktury chromatyny, zmieniają ekspresję genów biorących udział w hamowaniu cyklu komórkowego, indukcji angiogenezy i apoptozy w komórkach nowotworowych. Co ciekawe, HDIs w odróżnieniu od wielu innych rutynowo stosowanych chemioterapeutyków, nie wykazują wysokiej toksyczności względem komórek prawidłowych ludzkiego organizmu [2, 7]. Nie do końca wiadomo dlaczego HDIs działają głównie na komórki nowotworowe, pomimo tego, że zwiększona acetylacja histonów występuje również w komórkach prawidłowych. Choć niektóre HDIs (SAHA) nie wykazywały działań niepożądanych u pacjentów leczonych klinicznie, wciąż nie dokońca wiadomo, jakie mogą być skutki odległe podawanego leku [32].

Ze względu na budowę strukturalną HDIs zostały podzielone na cztery klasy: kwasy hydroksyaminowe, cykliczne peptydy, benzamidy i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (Tabela 2.). Aktualnie, wiele związków o charakterze HDIs jest na etapie prób klinicznych, zarówno w monoterapii, jak i terapii skojarzonej z innymi lekami, a ponad 15 z nich zostało już zarejestrowanych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia różnych postaci nowotworów [2, 7].



Tabela 2. Klasyfikacja inhibitorów deacetylaz histonów [8÷26]

Klasa HDIs	Przykłady HDIs	Swoistość substratowa	Dostępność leków/faza badań klinicznych
Kwasy hydroksyaminowe	SAHA	HDAC 1, 2, 3, 4, 7, 9	Zatwierdzony przez FDA wlczeniu CTCL
	TSA	HDAC1, 2, 3, 4, 6, 7, 9	toksyczny
	Panobinostat	HDAC1, 2, 3, 4, 7, 9	II faza
	Belinostat	HDAC I i IIa, HDAC6	II faza
	Dacinostat	HDAC I i II	I faza
	PCI24781	HDAC I, IIb	I faza
Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	Maślan	HDAC I, IIa	II faza
	VPA	HDAC I i IIa	II faza, powszechny lek przeciwpadaczkowy
	AN-9	brak danych	II faza
Cykliczne tetrapeptydy	Apicidin	HDAC I i II	brak danych
	Romidepsyna	HDAC1, 2, 4, 6	Zatwierdzony przez FDA wlczeniu CTCL
Benzamidy	Entinostat	HDAC1, 2, 3, 9	II faza
	Mocetinostat	HDAC1, 2, 3, 11	II faza
	CI-994	Brak danych	II faza

#### 4.1. Kwas walproinowy

Kwas walproinowy (kwas 2-propylowalerianowy, VPA) to organiczny związek chemiczny, należący do grupy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. VPA stosowany jest od ponad 30 lat w leczeniu padaczki. Jego aktywność przeciwdrgawkową odkryto zupełnie przypadkiem podczas badań dotyczących substancji o podobnym charakterze, w których VPA

stosowany był jedynie jako rozpuszczalnik. Pierwsze próby kliniczne z użyciem kwasu walproinowego przeprowadzono w Europie już w 1964 roku [27, 28]. VPA należy do grupy inhibitorów deacetylaz histonów klas I i II  $\alpha$ . W badaniach potwierdzono aktywność przeciwnowotworową tej substancji, zarówno w guzach litych, jak też nowotworach hematologicznych, zarówno w monoterapii, jak i terapii skojarzonej [8, 29, 30]. W badaniach klinicznych II fazy przeprowadzanych na chorych z ostrą białaczką szpikową lub zespołami mielodysplastycznymi z użyciem kwasu walproinowego poprawę stanu zdrowia zaobserwowano u około 30% pacjentów. W badaniach klinicznych wykazano także, że VPA może modulować efektywność radiochemioterapii z użyciem temozolomidu (lek przeciwnowotworowy o działaniu alilującym) u pacjentów z glejakiem wielopostaciowym, zwiększając odpowiedź organizmu na stosowaną terapię [31]. Dane literaturowe podają przypadek chłopca ze złośliwym glejakiem wielopostaciowym niewrażliwym na radio- i chemioterapię. Doustne podawanie VPA w dawce trzykrotnie wyższej niż dawce stosowanej wleczeniu padaczki spowodowało stopniową redukcję wielkości guza, a po kilku miesiącach całkowitą jego remisję. Niestety po zaprzestaniu leczenia doszło do nawrotu choroby [32, 33]. VPA w terapeutycznych dawkach indukował ponadto różnicowanie komórek nowotworowych raka piersi w modelu *in vitro* oraz zmniejszał tempo wzrostu guza, a także jego naciekanie [32, 34].

## 4.2. Vorinostat

Vorinostat (SAHA) jest pochodną kwasu hydroksamowego, hamującą aktywność deacetylaz histonów I i II grupy. Działanie kliniczne SAHA potwierdzono między innymi w skórnej postaci chłoniaka T-komórkowego, szpiczaku mnogim, ziarnicy złośliwej, a także wielu guzach litych (rak piersi, prostaty, płuc). Vorinostat był pierwszym inhibitorem deacetylaz histonów oficjalnie zarejestrowanym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w leczeniu wspomnianej powyżej skórnej postaci chłoniaka T-komórkowego (2006 rok) [8]. W badaniach na zwierzętach SAHA redukował masę guzów piersi, płuc czy prostaty nawet o blisko 40%, nie wywołując przy tym silnych działań niepożądanych. W badaniach w modelu *in vitro* zauważono, że traktowanie komórek raka piersi vorinostatem skutkowało wzrostem ekspresji receptorów estrogenowych, co uwrażliwiało dotychczas niewrażliwe komórki na tamoksyfen (syntetyczny, przeciwnowotworowy lek niesteroidowy o działaniu antyestrogenowym) [32].

### 4.3. Romidepsyna

Romidepsyna jest inhibitorem deacetylaz histonów należącym do grupy depsipeptydów (grupa związków będąca estrami aminokwasów i hydroksykwasów). Jest to związek pochodzenia naturalnego, otrzymywany z bakterii *Chromobacterium volaceum*. W 2009 roku zarejestrowany pod nazwą Istodax® (Gloucester Pharmaceuticals Inc) do leczenia skórnej postaci chłoniaka T-komórkowego. Badania kliniczne z użyciem romidepsyny dotyczyły głównie nowotworów hematologicznych, takich jak szpiczak mnogi, zespół mielodysplastyczny, ostra i przewlekła białaczka szpikowa. Dotychczas nie potwierdzono antynowotworowego działania romidepsyny w guzach litych [8].

### 5. Podsumowanie

Inhibitory deacetylaz histonów to niezwykle interesująca grupa związków chemicznych. Mechanizm działania HDIs nie został jednak jeszcze do końca poznany, co wymaga dalszych badań. Ponadto nie do końca została wyjaśniona toksyczność poszczególnych związków należących do grupy HDIs, a szczególnie ich działanie odległe. Wyniki badań, zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych, wykazały synergistyczne działania HDIs z niektórymi cytostatykami, co mogłoby pozwolić na redukcję dawek standardowo stosowanych chemioterapeutyków. Być może w niedalekiej przyszłości HDIs zostaną włączone do grupy standardowo stosowanych terapeutyków w leczeniu chorób nowotworowych.

### Literatura

1. Kulczycka A., Bednarek I., Dzierżewicz Z. *Modyfikacje epigenetyczne jako potencjalne cele terapii antynowotworowych*, ANNALES ACADEMIAE MEDICAE SILESIENSIS, 67 (2013), s. 201-208
2. Grabarska A., Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M. *Acetylazy i deacetylazy histonów – znaczenie w patogenezie nowotworowych chorób hematologicznych*, Acta Haematologica Polonica 40 (2009), s. 787-798
3. Shahbazian M., Grunstein M. *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*, Annual Review of Biochemistry 76 (2007), s. 75-100
4. Lafon-Hughes L., Di Tomaso M., Mendez-Acuna L. *Chromatin –remodeling mechanisms incancer*, Mutation Research 658 (2008), s. 191-214
5. Abeywickrama C., Bradner J., Ponnala S. *Selective inhibitors of histone deacetylase isoform 6 and methods thereof* WO 2012178208 A2- zgłoszeniepatentowe
6. Kavanaugh S., White L., Kolesar J. *Vorinostat: A novel therapy for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma*, American Journal of Health-System Pharmacy 67 (201),s. 793-797

7. Pan L., Lu J., Huang B. *HDAC Inhibitors. A Potential New Category of Anti-Tumor Agent*, *CellMolecular Immunology*4 (2007), s. 337-343
8. Grabarska A., Dmoszyńska-Graniczka M., Nowosadzka E., Stepulak A. *Inhibitory deacetylaz histonów – mechanizmy działania na poziomie molekularnym i zastosowania kliniczne*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67 (2013), s. 722-735
9. Khan N., Jeffers M., Kumar S., Hackett C., Boldog F., Khrantsov N., Qian X., Mills E., Berghs S., Carey N., Finn P., Collins L., Tumber A., Ritchie J., Jensen P., Lichenstein H., Sehested M. *Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors*, *BiochemicalJournal* 409 (2008), s. 581-589
10. Mann B., Johnson J., Cohen M., Justice R., Pazdur R. *FDAapproval summary: vorinostat for treatment of advanced primarycutaneous T-cell lymphoma*, *Oncologist* 12(2007), s. 1247-1252
11. Dickinson M., Ritchie D., DeAngelo D., Spencer A., Ottmann O., Fischer T., Bhalla K., Liu A., Parker K., Scott J., Bishton M., Prince H. *Preliminary evidence of disease response to the panacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in refractory HodgkinLymphoma*, *British Journal of Haematology* 147 (2009), s. 97-101
12. Mai A., Altucci L. *Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*41 (2009), s. 199-213
13. Mackay H., Hirte H., Colgan T., Covens A., MacAlpine K., Grecni P., Wang L., Mason J., Pham P., Tsao M., Pan J., Zwiebel J., Oza A. *Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours*, *European Journal of Cancer*, 46 (2010), s. 1573-1579
14. Qian X., Ara G., Mills E., LaRochelle W., Lichenstein H., Jeffers M. *Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer*, *International Journal Cancer* 122(2008), s. 1400-1410
15. de Bono J., Kristeleit R., Tolcher A., Fong P., Pacey S., Karavasilis V., Mita M., Shaw H., Workman P., Kaye S., Rowinsky E., Aherne W., Atadja P., Scott J., Patnaik A. *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of LAQ824, a hydroxamate histone deacetylase inhibitor with a heat shock protein-90 inhibitory profile, in patients with advanced solid tumors*, *Clinical Cancer Research* 14 (2008), s. 6663-6673
16. Lopez G., Liu J., Ren W., Wei W., Wang S., Lahat G., Zhu Q., Bornmann W., McConkey D., Pollock R., Lev D. *Combining PCI-24781, a novel histone deacetylase inhibitor, with chemotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma*, *Clinical Cancer Research* 15 (2009), s. 3472-3483
17. McMahon L., Tamary H., Askin M., Adams-Graves P., Eberhardt R., Sutton M., Wright E., Castaneda S., Faller D., Perrine S. *A randomized phase II trial of arginine butyrate with standard local therapy in refractory sickle cell leg ulcers* *British Journal of Haematology*, 151 (2010), s. 516-524

18. Carew J., Giles F., Nawrocki S. *Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy*, Cancer Letters, 269 (2008), s.7-17
19. Munster P., Marchion D., Bicaku E., Lacevic M., Kim J., Centeno B., Daud A., Neuger A., Minton S., Sullivan D. *Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC*, Clinical Cancer Research 15 (2009), s. 2488-2496
20. Takai N., Narahara H. *Histone deacetylase inhibitor therapy in epithelial ovarian cancer*, Journal Oncology (2010), s.1-6
21. Grant C., Rahman F., Piekarczyk R., Peer C., Frye R., Robey R., Gardner E., Figg W., Bates S. *Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors*, Expert Review of Anticancer Therapy 10 (2010), s. 997-1008
22. Kim H., Bae S. *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs*, American Journal of Translational Research, 3 (2011), s.166-179
23. Hauschild A., Trefzer U., Garbe C., Kaehler K., Ugurel S., Kiecker F., Eigentler T., Krissel H., Schott A., Schadendorf D. *Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma*, Melanoma Research, 18 (2008), s.274-278
24. Khan N., Jeffers M., Kumar S., Hackett C., Boldog F., Khramtsov N., Qian X., Mills E., Berghs S., Carey N., Finn P., Collins L., Tumber A., Ritchie J., Jensen P., Lichenstein H., Sehested M. *Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors*, Biochemistry Journal 409 (2008), s. 581-589
25. Noureen N., Rashid H., Kalsoom S. *Identification of type-specific anticancer histone deacetylase inhibitors: road to success*, Cancer Chemotherapy Pharmacology, 66 (2010), s. 625-633
26. Le Tourneau C., Siu L. *Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor*, Expert Opinion on Investigational Drugs, 17 (2008), s. 1247-1254
27. Mirowska D., Członkowski A. *Właściwości farmakologiczne kwasu walproinowego*, Postępy Psychiatrii i Neurologii 10 (2010), s. 3-9
28. Enna S., Coyle J. *Pharmacological management of neurological and psychiatric disorders*, NJ: The MacGraw-Hill Companies Inc, (1998), s. 27-51
29. Atmaca A., Al-Batran S., Maurer A., Neumann A., Heinzl T., Hentsch B., Schwarz S., Hovelmann S., Gottlicher M., Knuth A., Jager E. *Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial*. Brain Journal Cancer 97 (2007), s. 177-182
30. Kuendgen A., Knipp S., Fox F., Strupp C., Hildebrandt B., Steidl C., Germing U., Haas R., Gattermann N. *Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia* Annales Hematology 84 (2005), s. 61-66

31. Ververis K., Hiong A., Karagiannis T., Licciardi P. *Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents*, *Biologics: Targets and Therapy* 7 (2013), 47-60
32. Stepulak A., Stryjecka-Zimmer M., Kupisz K., Polberg K. *Inhibitory deacetylaz histonów jako potencjalne cytostatyki nowej generacji* *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 59 (2005), s. 68-74
33. Witt O., Schweigerer L., Driever P., Wolff J., Pekrun A. *Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child*, *Pediatric Blood Cancer* 43 (2004), s. 181
34. Gottlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P., Heinzel T. *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells*, *EMBO Journal*, 20 (2001), s. 6969-6978

## **Terapeutyczne zastosowanie wybranych inhibitorów deacetylaz histonów**

### **Streszczenie**

Inhibitory deacetylaz histonów (HDIs) to nowa klasa związków o udokumentowanym działaniu przeciwnowotworowym. Ich działanie polega na blokowaniu aktywności deacetylaz histonów, zwiększeniu stopnia acetylacji histonów i przywróceniu nieprawidłowo transkrypcyjnie wyciszonych genów. W pracy opisano trzy HDIs, które oficjalnie zostały zaaprobowane przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia pacjentów. W związku z tym, że romidepsyna i SAHA stosowane są w leczeniu skórnej postaci chłoniaka T-komórkowego, a VPA w leczeniu padaczki, istnieje potencjalna możliwość zastosowania ich w terapii innych nowotworów hematologicznych, a także guzów litych. Wiele spośród HDIs, zarówno w monoterapii, jak też w terapii skojarzonej z innymi cytostatykami, jest na etapie badań klinicznych na chorych z nowotworami hematologicznymi i guzami litymi (rak pęcherza, prostaty, płuc czy piersi). Inhibitory deacetylaz histonów są bardzo dobrze tolerowane przez organizm ludzki, a działania niepożądane obserwowane są dość rzadko.

Słowa kluczowe: inhibitory deacetylaz histonów, deacetylazy histonów, kancerogeneza, cytostatyki nowej generacji

## **Therapeutic use of the selected histone deacetylase inhibitors**

### **Abstract**

Histone deacetylase inhibitors (HDIs) are a new class of compounds of proven antitumor activity. They work by blocking the activity of histone deacetylases, increasing the level of histone acetylation and restoring incorrectly transcriptionally silenced genes. This manuscript describes three HDIs, which officially have been approved by the US Food and Drug Administration in the treatment of patients. Therefore, the romidepsin and SAHA used in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, and VPA in the treatment of epilepsy, there is a potential possibility of use these drugs in the treatment of the other hematologic malignancies, and solid tumors. Many of the HDI, either alone or in combination with other cytostatics, is in the phase of clinical trials in patients with hematologic malignancies, and solid tumors (bladder, prostate, lung, breast cancer). Histone deacetylase inhibitors are very well tolerated by the human body, and adverse events were observed were quite rare.

Keywords: histone deacetylase inhibitors, histone deacetylase, carcinogenesis, a new generation of cytotoxic drugs

## Zmienność sekwencji genu GPX1 u człowieka i zwierząt modelowych

*“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.”*

Charles Darwin, *„The Origin of Species”*

### 1. Wstęp

Ewolucja to proces nieustannej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Proces powolny, z perspektywy ludzkiego życia wręcz niezauważalny. Jednak nagromadzenie pojedynczych zmian w wielomiliardowych genomach w pewnym momencie osiąga taki poziom, który jest równoznaczny z powstaniem nowego gatunku. Na tempo ewolucji istotny wpływ wywiera presja środowiskowa. Stąd też powstające gatunki oraz sama ewolucja jest efektem nieustającej interakcji genom-środowisko. Szczególnie istotnej presji selekcyjnej podlegają konserwatywne ewolucyjnie mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, które chronią organizm przed szkodliwym działaniem wolnych rodników.

Wolne rodniki wywierają szkodliwy wpływ na makromolekuły istotne biologicznie, powodując utlenianie nie tylko nici DNA, co jest przyczyną mutacji i nowotworów [1], ale także utlenianie lipidów i białek [2, 3], co prowadzi do powstania związków patologicznych, a w efekcie do chorób np. układu krwionośnego (utlenianie LDL – frakcji lipoprotein o niskiej gęstości) [4] lub układu nerwowego (odkładanie patologicznych białek) [5]. Do źródeł wolnych rodników, należą zarówno procesy wewnątrzkomórkowe związane z oddychaniem, czy detoksykacją, jak i czynniki egzogenne takie jak promieniowanie, czy dym papierosowy [3].

W celu utrzymania homeostazy niezbędne było wykształcenie mechanizmów chroniących organizm przed dewastującym działaniem reaktywnych cząsteczek. W ciągu tysięcy lat mechanizmy musiały być

---

<sup>1</sup>markowx@wp.pl, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

doskonalone, tak aby coraz lepiej dopasowywać się do nowych źródeł zagrożenia. Jednakże wysoka konserwatywność podstawowych elementów układu antyoksydacyjnego, obserwowana np. między owadami [6], oraz ssakami (baza HomoloGene na platformie NCBI) przeczy takiemu założeniu. Próbą kompromisu w tej kwestii jest szukanie śladów ewolucji i zmienności nie w części kodującej białko, a w rejonie intronowym oraz obszarach nie ulegających translacji.

### **1.1. Antyoksydacyjne działanie peroksydazy glutationowej (GPX1)**

Jednym z enzymów odpowiadających za ochronę antyoksydacyjną jest peroksydaza glutationowa (GPX) –selenoenzym, który katalizuje redukcję nadtlenu wodoru [7]. Enzym GPX występuje w kilku formach, z których najpowszechniejsza w organizmie jest GPX1 obecna w cytozolu wielu komórek tworzących tkanek. Działanie antyoksydacyjne to pojęcie bardzo szerokie, ale przez to także mało precyzyjne. Redukcja stresu oksydacyjnego, a więc proces odbywający się na poziomie molekularnym (jonowym) ma przełożenie na stan komórki, tkanki, organu, a w rezultacie na cały organizm. Makroskopowo trudne do zauważenia zmiany powodowane przez wolne rodniki pociągają za sobą ogromne konsekwencje na niższych stopniach organizacji. Enzym GPX1 może przeciwdziałać schorzeniom, których podłożem są wolne rodniki, do tego typu patologii należy między innymi osteoporoza [8], czy retinopatia wcześniaków [9]. Tak jak w przypadku każdego genu również przy ekspresji GPX1, istnieją fizjologiczne granice, po przekroczeniu których występują stany patologiczne, nadekspresja GPX1 może między innymi powodować insulinooporność [10, 11].

Enzymy antyoksydacyjne pełnią jeszcze jedną istotną funkcję, która w pewnym sensie jest sumą działań podrzędnych, a mianowicie mogą wpływać na długość życia. Według wolnorodnikowej teorii starzenia wraz z wiekiem spada wydajność działania systemów antyoksydacyjnych, w efekcie czego działanie wolnych rodników prowadzi do nagromadzenia szkodliwych zmian, które są naprawiane z coraz mniejszą wydajnością [12]. Doniesienia co do wpływu enzymu GPX1 na długość życia są niejednoznaczne. Według części badaczy aktywność enzymu prawdopodobnie nie jest skorelowana z długością życia, co potwierdzają badania na modelach zwierzęcych z wyciszonym genem GPX1 [13, 14]. Jednak według innych badań, dotyczących genomu ludzkiego, polimorfizm SNP w genie GPX1 może być związany z długością życia [15]. Rozbieżność wyników może być spowodowana ogromną liczbą czynników decydujących o długowieczności, jednak nie ma wątpliwości co do tego, że peroksydaza glutationowa, zmniejsza stres oksydacyjny, a także redukuje stopień



uszkodzeń powodowanych przez wolne rodniki [13, 16]. Enzymy antyoksydacyjne, w tym także GPX1 wykazują działanie plejotropowe. Poprzez swoją aktywność mają wpływ na wiele procesów fizjologicznych. Presja selekcyjna, której podlega układ antyoksydacyjny, wpływa bezpośrednio na zdolność do obrony przed wolnymi rodnikami, ale w sposób pośredni na wiele innych procesów i układów. Dlatego tak ważne z perspektywy ewolucji jest nieustanna próba dostosowania mechanizmów antyoksydacyjnych, nie tylko do zmieniających się warunków środowiska, ale także do rosnącego stopnia złożoności organizmów.

## **1.2. Struktura genetyczna i ewolucja GPX1**

Peroksydaza glutationowa typu 1 zarówno w przypadku człowieka jak i zwierząt modelowych ma zbliżoną strukturę, składa się z dwóch egzonów, oraz występującego między nimi intronu (rysunek 1). W przypadku człowieka gen jest zlokalizowany na ramieniu krótkim trzeciego chromosomu. Podobna struktura egzonowo-intronowa jest zachowana w przypadku zwierząt modelowych. Jednak gen kodujący występuje nie tylko u ssaków, jego aktywność została zanotowana także u ptaków, płazów, czy ryb [17].

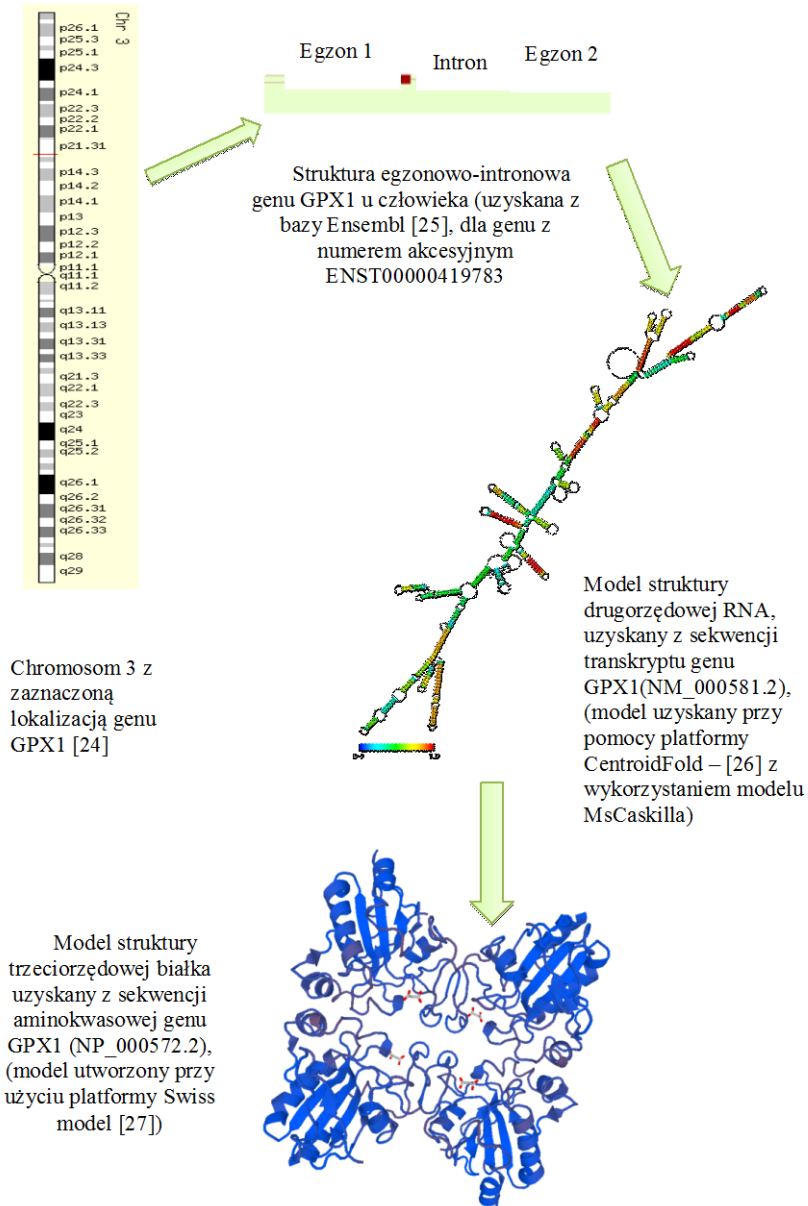
Pierwotnie osobniki jednokomórkowe i proste eukarionty radziły sobie z wolnymi rodnikami, dzięki fizycznym barierom, lub aktywnemu usuwaniu np. nadtlenu wodoru, w miarę włączania go w szlaki metaboliczne jonów żelaza, miedzi, czy selenu powstały enzymatyczne systemy antyoksydacyjne [18]. Jak dotąd nie wskazano wspólnego przodka, u którego po raz pierwszy pojawiła się peroksydaza glutationowa, jednak badania prowadzone dla całej rodziny białek GPX, wskazują na powstanie trzech dużych grup. Do pierwszej grupy zalicza się między innymi kręgowce i stawonogi, grupę drugą reprezentują grzyby i bakterie, a do grupy trzeciej włączono rośliny. Możliwe, że wszystkie trzy grupy wywodzą się od wspólnego przodka [19]. W przypadku każdej z tych grup doszło do rozdzielenia na kolejne podgrupy w efekcie czego powstał typ 1 peroksydazy glutationowej. Przedstawione grupy dzielą znaczne dystanse filogenetyczne, co więcej między przedstawicielami występują diametralne różnice, zarówno w złożoności, jak i w środowisku życia. Różne drogi ewolucyjne genu są wyrazem adaptacji do różnych warunków życia. W przypadku osobników bliżej spokrewnionych sekwencja aminokwasowa jest konserwatywna, co nie oznacza, że sam gen nie podlega zmianom.

Gen kodujący enzym GPX1 składa się z części kodującej, oraz fragmentów niekodujących. Zazwyczaj źródeł zmienności dopatruje się w sekwencjach egzonowych, które kodują białka. Polimorfizm w pojedynczym nukleotydzie sekwencji kodującej może wpłynąć na zmianę

aminokwasu, a tym samym na strukturę całego białka. Zmiany we fragmentach egzonowych mają duże znaczenie, pojedyncza substytucja, może skutkować około 10% spadkiem aktywności peroksydazy glutationowej w stosunku do formy wyjściowej [8]. Geny kodujące enzymy antyoksydacyjne, były i są poddawane silnej presji środowiskowej, dlatego mogą ulegać dynamicznej ewolucji. Jednak wysoka konserwatywność w sekwencji aminokwasowej pomiędzy człowiekiem, a organizmami modelowymi sugeruje inny, bardziej subtelny sposób zmian i regulacji ekspresji.

Modyfikacje w strukturze intronowej mogą mieć istotne konsekwencje dla procesu ekspresji. Zmiany w sekwencji niekodującej zwykle nie wpływają na sekwencję produktu końcowego, jakim jest białko, jednak pozornie nieistotne zmiany w intronach mogą odgrywać kluczową rolę w procesach regulacji ekspresji, poprzez np. zmiany miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, w ten sposób modyfikacja zazwyczaj nie prowadzi do powstania nowego produktu, a do próby dostosowania już istniejącej struktury do zmieniających się warunków. Co więcej istnieją doniesienia, że introny mogą także wpływać na strukturę produktu, poprzez wpływ na alternatywne składanie transkryptu, a nawet występować w dojrzałym transkrypcie na skutek wstrzymania intronu [20].

Ogromne znaczenie intronów dla aktywności ekspresji potwierdza przegląd dokonany przez Le Hira i współpracowników [21], którzy sugerują, że introny są związane z niemal każdym z etapów metabolizmu mRNA. Dobrym przykładem pokazującym rolę intronów w procesie transkrypcji dają przytoczone w ich pracy przykłady, wykazujące do 100 razy mniejszą wydajność transkrypcji pozbawionego intronów transgenu myszy w porównaniu do kompletnego genu [22], czy wręcz utraty zdolności do transkrypcji genu dehydrogenazy pozbawionego intronów [23]. Obszary intronowe są ważnym źródłem zmienności, która może mieć istotne znaczenie w ewolucji, a co za tym idzie w adaptacji do zmieniających się warunków środowiska.



Rysunek 1. Schemat ekspresji genu GPX1 u człowieka [opracowanie własne w oparciu o dostępne bazy danych]

## 2. Cel pracy

Praca ma na celu porównanie stopnia podobieństwa w poszczególnych elementach genu GPX1 (egzon 1, 2 i intron) u człowieka i zwierząt modelowych. Potencjalne różnice mogą pomóc w znalezieniu tendencji według której następują zmiany w genie między człowiekiem, a gatunkami uznanymi za modelowe. Dodatkowo obserwacja zmian w genie kodującym enzym antyoksydacyjny może pomóc w śledzeniu zmian, które mogą być odpowiedzią na wzrastającą presję oksydacyjną wywołaną zarówno zmianami w środowisku, jak i wzrastającą komplikacją organizmów. Gen GPX1, został wybrany z powodu swojej stosunkowo prostej struktury. Jest on zbudowany tylko z dwóch egzonów i jednego intronu, przez co może stanowić dobry model do badań zarówno nad zmianami w ekspresji wynikającymi z mutacji, jak i alternatywnego splicingu.

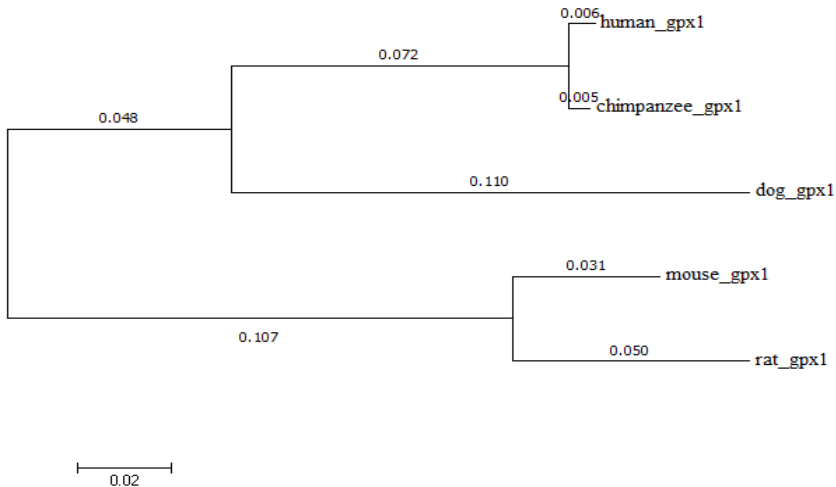
## 3. Materiały i metody

Z bazy NCBI pozyskano sekwencję genu GPX1 dla człowieka i zwierząt modelowych – szympansa, psa, myszy i szczura (NC\_000003.12, NC\_006490.3, NC\_006602.3, NC\_000075.6, NC\_005107.4), dla każdej sekwencji uzyskano sekwencję intronową poprzez porównanie sekwencji transkryptu (NM\_000581.2, NM\_001077512.2, NM\_001115119.1, NM\_008160.6, NM\_030826.3) do sekwencji całego genu. Sekwencje aminokwasowe również pozyskano z bazy NCBI (NP\_000572.2, NP\_001070980.2, NP\_001108591.1, NP\_032186.2, NP\_110453.3). Drzewo filogenetyczne utworzono przy pomocy programu MEGA6, wykorzystując metodę największego prawdopodobieństwa zgodnie z parametrami i modelem Tamura-Nei[28]. Stopień identyczności analizowanych fragmentów oceniono przy pomocy programu Jalview [29]. Zawartość par GC w genie została określona przy użyciu pakietu Genomatix: DNA SequenceToolbox (30). Rozmieszczenie par GC w genie obliczono porównując zawartość dinukleotydów w określonym fragmencie genu do zawartości par GC w całym genie.

## 4. Analiza wyników

Organizmem modelowym o najbardziej zbliżonej do człowieka strukturze genu peroksydazy glutationowej jest szympan, najmniejsze podobieństwo występuje u szczura (tabela 1 i rysunek 2). Warto zauważyć, że obszarem najbardziej zmiennym jest intron który wykazuje niespełna 70% podobieństwa między analizowanymi zwierzętami, a człowiekiem, w przypadku egzonów podobieństwo wynosi ponad 80%. Nawet w przypadku gatunków blisko spokrewnionych – myszy i szczura podobieństwo w sekwencji intronowej wynosi niewiele ponad 80%,

podczas gdy podobieństwo w egzonach u tych gatunków przekracza 90%. W przypadku gatunków bardziej odległych filogenetycznie, tj. psa i myszy podobieństwo między egzonami wynosi prawie 80%, natomiast w sekwencji intronowej zaledwie 52%.



Rysunek 2. Drzewo filogenetyczne wykreślone w oparciu o sekwencję genu *GPX1*, przedstawiające relacje filogenetyczne pomiędzy człowiekiem i zwierzętami modelowymi. Długość gałęzi określa dystanse filogenetyczne występujące między analizowanymi gatunkami (opracowanie własne przy użyciu programu MEGA 6 [28])

Przeprowadzona analiza potwierdza fakt, że największą zmiennością cechuje się obszar sekwencji niekodujących. Duża zmienność w obszarze intronowym może być istotnym czynnikiem wpływającym na regulację ekspresji. Introny mogą nie tylko działać jako miejsca *cis* regulatorowe [31], ale też wpływać na formę produktu poprzez wpływ na proces alternatywnego splicingu, zarówno na jego indukcję, jak i supresję [32]. Mechanizmy alternatywnego splicingu (składania egzonów), dotyczą prawdopodobnie wszystkich genów, a za jego istotnym znaczeniem przemawia przykład przytoczony przez Wysokińskiego i Błasiaka [33] w którym podają, że liczba izoform pojedynczego białka *Dscamu Drosophilamelanogaster*, dwukrotnie przekracza liczbę wszystkich genów u tego organizmu. Ogromny wpływ zmian w sekwencjach intronowych potwierdza patogeneza rodzinnej dysautonomii, w której pojedyncza zmiana synonimiczna w sekwencji intronowej, powoduje pominięcie całego egzonu podczas składania transkryptu [34].

Gen GPX1 zawiera stosunkowo krótki fragment intronowy i jest złożony tylko z dwóch egzonów, z tych powodów może być stosunkowo prostym modelem do badań zarówno mechanizmów alternatywnego splicingu, jak też wpływu sekwencji intronowych na ekspresję. Fakt istnienia zjawiska alternatywnego splicingu w genie GPX1 potwierdza obecność w bazie NCBI dwóch wariantów transkrypcyjnych (NM\_000581.2 i NM\_201397.1). Mechanizmami regulujący proces są wspomniane już elementy *cis* regulatorowe, które mogą być położone zarówno w regionach egzonowych, jak i intronowych, które mogą działać zarówno wzmacniająco, jak i wyciszająco na transkrypcję [32, 33]. Częstotliwość występowania alternatywnego splicingu może być miarą stopnia złożoności organizmu, w przypadku gromad uważanych za bardziej rozwinięte (ssaki, ptaki), zjawisko to występuje częściej, niż u ryb czy płazów [35]. Niewątpliwie, alternatywny splicing znacznie zwiększa potencjał adaptacyjny genomu, z jednej matrycy może być uzyskane wiele produktów, o różnych właściwościach. O intensywności procesu i ilości wariantów możliwych do uzyskania podczas alternatywnego splicingu w dużej mierze decyduje zawartość sekwencji niekodujących, dlatego też istnieje pogląd, że stopień złożoności organizmu zależy również od zawartości sekwencji niekodujących [36]

Tabela 1. Podobieństwo w sekwencji genu GPX1 między człowiekiem i zwierzętami modelowymi

Gatunek	Egzon 1 - % podobieństwa między gatunkami				Średnie podobieństwo sekwencji genu GPX1 człowieka do sekwencji genu GPX1 zwierząt modelowych w %
	szympans	pies	mysz	szczur	
człowiek	97,31	81,52	77,68	76,83	83,34
szympans		85,93	81,55	83,08	
pies			80,81	79,7	
mysz				90,4	
Gatunek	Intron - % podobieństwa między gatunkami				
	szympans	pies	mysz	szczur	
człowiek	96,01	63,09	57,95	60,5	
szympans		64,51	58,4	60,33	
pies			52,78	56,59	
mysz				83,11	
Gatunek	Egzon 2 - % podobieństwa między gatunkami				84,05
	szympans	pies	mysz	szczur	
człowiek	99,72	82,36	77,05	77,05	
szympans		89,26	81,65	82,29	
pies			77,09	76,08	
mysz				91,26	

Źródło: opracowanie własne w oparciu o dane z bazy NCBI

Sekwencja aminokwasowa wykazuje większe podobieństwo w obrębie analizowanych gatunków, aniżeli średnie podobieństwo egzonów. Może to być spowodowane mutacjami synonimicznymi, w przypadku których zmiany w sekwencji nukleotydowej, nie powodują zmiany w sekwencji aminokwasowej. Taki stan wynika z degeneracji kodu genetycznego. W zależności od stopnia różnicy różne warianty transkrypcyjne mogą dawać heterogeniczne izoformy białka. Mimo, że produkt końcowy, a więc białko ma zbliżoną strukturę aminokwasową może różnić się właściwościami takimi jak powinowactwo do substratów, hydrofobowość, czy swoistość [33]. Szczególnie duże różnice pomiędzy średnim podobieństwem egzonów, a sekwencją aminokwasową jest widoczna w przypadku organizmów, które dzielą większe dystanse ewolucyjne. Pomiędzy człowiekiem, a psem średnie podobieństwo egzonów wynosi około 82%, natomiast sekwencji aminokwasowej aż 94%. Szczur i mysz wykazują 77% podobieństwo do sekwencji człowieka, w sekwencjach egzonowych, w przypadku sekwencji aminokwasowej podobieństwo jest prawie o 10% większe. Wysoka konserwatywność sekwencji aminokwasowej sugeruje, że w czasie milionów lat ewolucji następowały niewielkie zmiany, jednak pełniejszy obraz można otrzymać analizując strukturę genu. Ewolucji mógł ulegać nie tyle sam produkt końcowy, co raczej jego kontekst, struktura odpowiedzialna za regulację, jak wspomniano wcześniej nawet synonimiczna zmiana w jednym nukleotydzie może w ogromnym stopniu zmieniać właściwości białka [8], nie wpływając na jego sekwencję aminokwasową. Dodatkowo wysoka zmienność w sekwencji intronowej może być również związana z próbami dostosowania właściwości produktu do środowiska. Za istotną rolę intronów w adaptacji przemawia struktura genów w bardzo plastycznym i zdolnym do zmian układzie nerwowym, gdzie wśród genów ulegających wzmożonej ekspresji dominują geny o długich fragmentach intronowych [36].



Tabela 2. Podobieństwo w sekwencji aminokwasowej genu GPX1 między człowiekiem i zwierzętami modelowymi

Gatunek	% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej				Średnie podobieństwo sekwencji aminokwasowej genu GPX1 człowieka do sekwencji aminokwasowej genu GPX1 zwierząt modelowych w %
	szympans	pies	mysz	szczur	
człowiek	99,01	94,15	85,22	85,71	91,02
szympans		93,17	86,07	86,57	
pies			83,9	85,07	
mysz				94,53	

Źródło: opracowanie własne w oparciu o dane z bazy NCBI

Dla analizowanych gatunków zbadano zawartość par GC w poszczególnych elementach genu. W przypadku człowieka, szympana i psa zawartość dinukleotydów GC w egzonie drugim utrzymuje się na zbliżonym poziomie – stanowią one około 60% wszystkich dinukleotydów. W przypadku intronu zauważalna jest większa zawartość par GC u psa w stosunku do pozostałych organizmów. Egzon pierwszy zarówno u człowieka, szympana jak i psa zawiera niemal 70% par GC. Znaczące różnice występują w strukturze genu myszy i szczura, gdzie zawartość GC w intronie spada w stosunku do pozostałych organizmów o ponad 10%, a w stosunku do psa o ponad 15%. Również pozostałe części genu myszy i szczura zawierają mniej di nukleotydów guaninowo-cytozynowych, egzon pierwszy o prawie 8% mniej a egzon drugi o około 7%. W miarę ewolucji mogła wystąpić tendencja do zwiększenia zawartości całkowitej liczby par GC, aż do osiągnięcia pewnego optymalnego poziomu.

Istnieją liczne doniesienia o związku między zawartością par GC, a profilem ekspresji [37, 38]. Większa ilość par GC, mogła zwiększyć możliwości regulacji ekspresji, zarówno poprzez zmianę miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, stworzenie nowych wariantów transkryp-

cyjnych, czy też wreszcie powstanie nowych miejsc akceptorowych dla grup metylowych, które mogą wyciszać wybrane obszary genu.

Tabela 3. Udział par GC w poszczególnych elementach genu GPX1 u człowieka i zwierząt modelowych wyrażona w %

	człowiek	szympan	pies	mysz	szczur
Zawartość par GC w egzonie 1	68%	69%	69%	63%	61%
Zawartość par GC w intronie	62%	62%	66%	50%	51%
Zawartość par GC w egzonie 2	59%	61%	58%	53%	52%

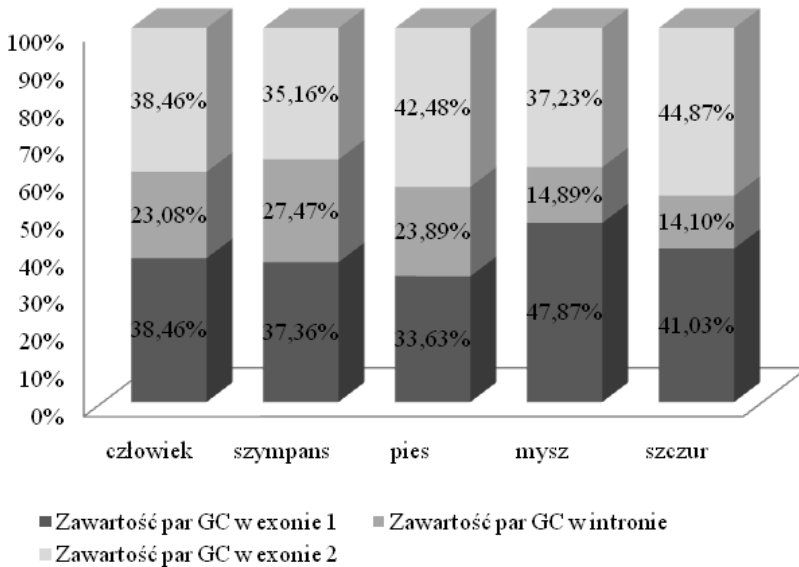
Źródło: opracowanie własne w oparciu o dane z bazy NCBI

Oprócz udziału par GC w genie GPX1, przeanalizowano również ich rozkład w poszczególnych elementach sekwencji (rysunek 1). Największe różnice zauważono w sekwencji intronowej, gdzie u myszy i szczura występuje niespełna 15% całkowitej liczby par GC. U pozostałych zwierząt modelowych i człowieka liczba wartość ta przekracza 20%. Zauważalna jest tendencja do gromadzenia większej ilości par GC we fragmentach intronowych, przez organizmy wyżej usystematyzowane. Zwiększenie zawartości tych dinukleotydów w sekwencji niekodującej może zwiększać możliwości regulacyjne ekspresji.

Zawartość par GC w obszarach intronowych jest związana z długością intronu, zawartość par GC spada wraz ze wzrostem długości fragmentu [39]. Taka zależność jest charakterystyczna dla ssaków, ptaków, oraz płazów, w przypadku genomów tych organizmów występuje ujemna korelacja między zawartością par GC, a długością intronów, przeciwna zależność jest zaobserwowano między innymi u ryb, roślin, czy bezkręgowców [40]. Istotne znaczenie dinukleotydów GC w ekspresji genów sugeruje Lercher i współpracownicy [41], którzy stwierdzili, że geny szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu są zlokalizowane w obszarach o dużej zawartości GC, oraz zawierają krótkie fragmenty intronowe [40]. Te warunki spełnia analizowany gen GPX1, co może potwierdzać jego dużą rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu.

Zawartość par GC może być związana ze zjawiskiem alternatywnego splicingu, w przypadku organizmów wyżej zorganizowanych występuje tendencja do gromadzenia większej ilości par GC w obszarach genów.

Możliwe, że te dinukleotydy stanowią rodzaj zaznaczenia dla mechanizmów alternatywnego splicingu [40] i tym samym mają wpływ na ostateczny kształt transkryptu. Istotne znaczenie par intronów i zawartych w nich par GC, potwierdza też Kalari, przyznając, że głównym miejscem wiązania czynników regulujących transkrypcję są sekwencje niekodujące. Dodatkowo pierwsze egzony i introny, które są szczególnie zasobne w pary GC, pełnią kluczową rolę w ekspresji informacji genetycznej [42]. W przedstawionych wynikach można zauważyć tendencję do zwiększania zawartości par GC w sekwencji intronowej człowieka i szympansa w stosunku do organizmów odległych filogenetycznie myszy i szczura, wyjątek stanowi intron psa, który zawiera najwięcej par GC, co może być spowodowane udomowieniem. Psy w dużej mierze są narażone na takie same czynniki generujące wolne rodniki co człowiek, tak więc obecna struktura genetyczna może być spowodowana próbą dostosowania do antropogenicznego środowiska.



Rysunek 1. Rozkład par GC w genie *GPXI* u człowieka i zwierząt modelowych; Źródło: opracowanie własne w oparciu o dane z bazy NCBI

## 5. Podsumowanie

Najbardziej zmiennym fragmentem genu *GPXI* jest intron, w sekwencji którego średnie podobieństwo człowieka do zwierząt modelowych wynosi 69%, podczas gdy podobieństwo egzonów wynosi średnio 83%. Podobieństwo w sekwencji aminokwasów między człowiekiem, a innymi

badanymi organizmami wynosi 91% i jest znacznie wyższe niż podobieństwo egzonów, co można tłumaczyć mutacjami synonimicznymi.

Rosnąca ilość doniesień o wielopoziomowej regulacji ekspresji sugeruje istnienie precyzyjnych i skomplikowanych mechanizmów, dla których zmiana pojedynczego nukleotydu może mieć ogromne znaczenie. Duża konserwatywność sekwencji aminokwasowej, może nie w pełni oddawać dynamikę zmian ewolucyjnych pomiędzy człowiekiem, a zwierzętami modelowymi. Polimorfizm w sekwencji nukleotydowej, zwłaszcza we fragmencie intronowym, może być źródłem zmienności adaptacyjnej, oraz głównym celem presji selekcyjnej.

## Literatura

1. Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F., Loguercio C. *Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis*, International Journal of Cancer., 121 (2007), s. 2381-2386
2. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chemo-Biological Interactions., 10;160 (1) (2006), s. 1-40
3. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. *Free radicals, antioxidants in disease and health*, International Journal of Biomedical Science., 4 (2008), s. 89-96
4. Niki E. *Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited*, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition., 48(1) (2011), s. 3-7
5. Reddy P. H. *Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease*, Journal of Neurochemistry., 96 (2006), s. 1-13
6. Corona M., Robinson G. E. *Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny*, Insect Molecular Biology., 15 (2006), s. 687-701
7. Lei X.G., Cheng W.H., McClung J.P. *Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1*, Annual Review of Nutrition., 27 (2007), s. 41-61
8. Mlakar S. J., Osredkar J., Prezelj J., Marc J. *The Antioxidant Enzyme GPX1 Gene Polymorphisms Are Associated with Low BMD and Increased Bone Turnover Markers.*, Disease Markers., 29(2) (2010), s. 71-80
9. Tan S.M., Stefanovic N., Tan G., Wilkinson-Berka J.L., de Haan J.B. *Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 (GPx1) exacerbates retinopathy of prematurity in mice*, Investigative Ophthalmology & Visual Science., 54(1) (2013), s. 555-562
10. Yang W.H., Park S.Y., Ji S., Kang J.G., Kim J.E., Song H., Mook-Jung I., Choe K.M., Cho J.W. *O-GlcNAcylation regulates hyperglycemia-induced GPX1 activation*, Biochemical and Biophysical Research Communications., 391(1) (2010), s. 756-761
11. McClung J.P., Roneker C.A., Mu W., Lisk D.J., Langlais P., Liu F., Lei X.G. *Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase*, Proceedings of the National Academy of Sciences., 101 (2004), s. 8852-8857

12. Harman D. *Free Radical Theory of Aging: An Update*, Annals of the New York Academy of Sciences., 1067 (2006), s. 10-21
13. Zhang Y., Ikeno Y., Qi W., Chaudhuri A., Li Y., Bokov A., Thorpe S.R., Baynes J.W, Epstein C., Richardson A., Van Remmen H. *Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity*, The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences., 64(12) (2009), s. 1212-1220
14. Pérez V. I., Bokov A., Van Remmen H., Mele J., Ran Q., Ikeno Y., Richardson A., *Is the Oxidative Stress Theory of Aging Dead?*, Biochimica et Biophysica Acta., 1790(10) (2009), s. 1005-1014
15. Soerensen M., Christensen K., Stevnsner T., Christiansen L. *The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old*, Mechanisms of Ageing and Development., 130(5) (2009), s. 308-314
16. Baliga M. S., Wang H., Zhuo P., Schwartz J. L., Diamond A. M. *Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage*, Biological Trace Element Research., 115(3) (2007), s. 227-242
17. Mariotti M., Ridge P. G., Zhang Y., Lobanov A. V., Pringle T. H., Guigo R., Hatfield D. L., Gladyshev V. N. *Composition and Evolution of the Vertebrate and Mammalian Selenoproteomes*, PLoS ONE., 7(3) (2012), s. 1-18
18. Benzie I.F., *Evolution of antioxidant defence mechanisms*, European Journal of Nutrition., 39(2) (2000), s. 53-61
19. Margis R., Dunand C., Teixeira F. K., Margis-Pinheiro M. *Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview*, FEBS Journal., 275 (2008), s. 3959-3970
20. Galante P. A. F., Sakabe N. J., Kirschbaum-Slager N., De Souza S. J. *Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome*, RNA., 10(5) (2004), s. 757-765
21. Le Hir H., Nott A., Moore M.J. *How introns influence and enhance eukaryotic gene expression*, Trends in Biochemical Sciences., 28(4) (2003), s. 215-220
22. Brinster R. L., Allen J. M., Behringer R. R., Gelinis R. E., Palmiter R. *D.Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 85(3) (1988), s. 836-840
23. McKenzie R. W., Brennan M. D. *The two small introns of the Drosophila affinis juncta Adh gene are required for normal transcription*, Nucleic Acids Research., 24(18) (1996), s. 3635-3642
24. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1>
25. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000233276;r=3:49357176-49358600](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000233276;r=3:49357176-49358600)
26. <http://www.ncrna.org/>
27. <http://swissmodel.expasy.org/>
28. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*, Molecular Biology and Evolution., 30 (2013), s. 2725-2729

29. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M., Barton G.J. *Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*, Bioinformatics., 25 (2009), s. 1189-1191
30. Genomatix Software GmbH 2015, <http://www.genomatix.de/cgi-bin/tools/tools.pl>
31. Wittkopp P.J., Kalay G. *Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence*, Nature Reviews Genetics., 13(1) (2011), s. 59-69
32. Wang Z., Burge C.B. *Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code*, RNA., 14(5) (2008), 802-813
33. Wysockiński D., Błasiak J. *Perspektywy wykorzystania interferencji RNA w terapii chorób związanych z zaburzeniami alternatywnego składania RNA*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej., 66 (2012), s. 683-695
34. Ward A. J., Cooper T. A. *The Pathobiology of Splicing*, The Journal of Pathology, 220(2) (2010), s. 152-163
35. Chen L., Bush S.J., Tovar-Corona J.M., Castillo-Morales A., Urrutia A.O. *Correcting for differential transcript coverage reveals a strong relationship between alternative splicing and organism complexity*, Molecular biology and evolution., (2014), s. 1-12
36. Taft R. J., Pheasant M., Mattick J. S. *The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity*, Bioessays., 29 (2007), s. 288-299
37. Rao Y. S., Chai X. W., Wang Z. F., Nie Q. H., Zhang X. Q. *Impact of GC content on gene expression pattern in chicken*, Genetics, Selection, Evolution., 45(9) (2013), s. 1-7
38. Arhondakis S., Clay O., Bernardi G. *GC level and expression of human coding sequences*, Biochemical and Biophysical Research Communications., 367(3) (2008), s. 542-545
39. Zhu L., Zhang Y., Zhang W., Yang S., Chen J.-Q., Tian D. *Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes*, BMC Genomics., 10 (47) (2009), s.1-12
40. Amit M., Donyo M., Hollander D., Goren A., Kim E., Gelfman S., Lev-Maor G, Burstein D., Schwartz S., Postolsky B., Pupko T., Ast G. *Differential GC content between exons and introns establishes distinct strategies of splice-site recognition*, Cell Reports., 31 1(5) (2012), s. 543-556
41. Lercher M. J., Urrutia A.O., Pavlicek A., Hurst L. D. *A unification of mosaic structures in the human genome*, Human Molecular Genetics., 12 (2003), s. 2411-2415
42. Kalari K.R., Casavant M., Bair T.B., Keen H.L., Comeron J.M., Casavant T.L., Scheetz T.E. *First exons and introns -a survey of GC content and gene structure in the human genome*, In Silico Biology., 6(3) (2006), s. 237-242

## Zmienność sekwencji genu GPX1 u człowieka i zwierząt modelowych

Streszczenie

Zmiany ewolucyjne prowadzą do lepszego dostosowania organizmów do dynamicznie zmieniających się warunków środowiska. Niewątpliwie jednym z czynników wymuszających takie zmiany jest stres związany z działaniem wolnych rodników, a zwłaszcza reaktywnych form tlenu. Reaktywne cząsteczki powodują uszkodzenia istotnych biologicznie makromolekuł, takich jak lipidy, białka, czy kwasy nukleinowe. Organizmy w celu ochrony przed szkodliwym wpływem tych cząsteczek wykształciły systemy antyoksydacyjne, których znaczenie adaptacyjne jest bardzo istotne. Jednym z enzymów antyoksydacyjnych jest peroksydaza glutationowa (GPX) – selenoenzym, który katalizuje redukcję nadtlenu wodoru.

W pracy porównano sekwencje genu GPX1 pomiędzy człowiekiem, a organizmami modelowymi takimi jak szympan, pies, szczur, mysz. Analizowane sekwencje uzyskano z dostępnych baz bioinformatycznych. Sekwencje podzielono na fragmenty egzonowe i intronowe, a następnie zbadano stopień podobieństwa pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Największe różnice między człowiekiem, a organizmami modelowymi stwierdzono w sekwencji intronowej, gdzie podobieństwo sekwencji genu GPX1 człowieka do sekwencji genu GPX1 psa, myszy i szczura wynosi prawie 70% podczas gdy sekwencje egzonowe tego genu były w około 84% identyczne między człowiekiem, a organizmami modelowymi.

Wyniki potwierdzają fakt, że najbardziej zmiennym obszarem genomu są obszary niekodujące, które mimo, że nie wpływają na strukturę produktu to pełnią istotną rolę w ekspresji. Wysoki polimorfizm sekwencji niekodujących może wpływać na zmiany w wiązaniu czynników transkrypcyjnych, oraz przebieg splicingu a przez to na jakość i ilość transkryptu. Polimorfizm w sekwencji nukleotydowej, zwłaszcza we fragmencie intronowym, może być źródłem zmienności adaptacyjnej, oraz głównym celem presji selekcyjnej. Słowa kluczowe: ewolucja, polimorfizm, antyoksydacja, peroksydaza glutationowa

## Variability of GPX1 gene sequence in human and animal models

Abstract

Evolutionary changes lead to better adaptation of organisms to rapidly changing environmental conditions. Undoubtedly, one of the factors which forces these changes is the stress associated with the effects of free radicals, particularly reactive oxygen species. Reactive molecules cause damage of the biologically important macromolecules such as lipids, proteins, and nucleic acids too. Organisms in order to protect against the harmful effects of these molecules developed antioxidant systems whose adaptive significance is very important. One of the antioxidant enzymes is glutathione peroxidase (GPX) – selenoenzyme which catalyzes the reduction of hydrogen peroxide.

In the study compared the GPX1 gene sequences between human and model organisms such as the chimpanzee, dog, rat, mouse. Analyzed sequences were obtained from the available bioinformatics databases. The sequences were divided into exonic and intronic fragments, and then the degree of similarity between species was examined. The largest differences between the human and model organisms were found in intronic sequence, wherein the similarity of the human sequence of GPX1 gene, to the sequence of GPX1 of dog, mouse and rat is almost 70%, whereas the exonic sequences of this gene was almost in 84% identical between human and model organisms.

The results confirm the fact that the most variable parts of the genome are non-coding regions, which, although they do not affect the structure of the product they play an important role in the expression. High polymorphism in non-coding sequences can affect the changes in the binding of transcription factors and process of splicing and thereby the quality and quantity of the transcript. Polymorphism in the nucleotide sequence, especially in sequences of introns, can be a source of adaptive variability, and the main purpose of selective pressure.

Keywords: evolution, polymorphism, antioxidation, glutathione peroxidase

# Wykorzystanie genetyki molekularnej w ochronie zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich

## 1. Wstęp

Genetyka molekularna to bardzo dynamicznie rozwijająca się dyscyplina, wykorzystywana w wielu obszarach życia. W ostatnich latach nabrała także ogromnego znaczenia w hodowli zwierząt, gdzie coraz częściej tradycyjne metody hodowlane ustępują najnowszym metodom, opartym głównie na genetyce molekularnej. Jej wykorzystanie ma na celu przede wszystkim uzyskiwanie postępu w hodowli zwierząt. Różne techniki i metody analizy molekularnej pozwalają na poszukiwanie genetycznego podłoża ważnych z ekonomicznego punktu widzenia cech zwierząt gospodarskich. Jednak należy zwrócić uwagę na możliwości jakie niesie za sobą wykorzystanie genetyki molekularnej w taksonomii, ocenie pochodzenia, ocenie zmienności genetycznej zwierząt.

Polska należy do krajów, gdzie istnieje długoletnia tradycja ochrony gatunków zagrożonych. Kluczowym elementem oceny statusu zagrożenia danego gatunku lub rasy jest ocena zmienności genetycznej jej osobników. Uzyskanie informacji dotyczących genetycznego zróżnicowania osobników pozwala na wnioskowanie dotyczące procesów jakie miały wpływ na obecną populację oraz o ich sile. Poznanie puli genetycznej populacji pozwala więc na podjęcie działań mających na celu ochronę jej osobników. W tego typu badaniach znajdują zastosowanie różne techniki oraz metody genetyki molekularnej.

## 2. Cel pracy

Celem pracy był opis prowadzonych w Polsce działań na rzecz ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich z uwzględnieniem możliwości wykorzystania różnych metod oraz technik genetyki molekularnej do oceny zmienności genetycznej, określenia unikalności danej rasy, oszacowania zróżnicowania oraz opisanie struktury genetycznej populacji.

---

<sup>1</sup> karolina\_kasprzak@onet.pl, Katedra Hodowli i Ochrony Zasobów Genetycznych Bydła, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

<sup>2</sup> kingakdawidy@op.pl, Katedra Hodowli i Technologii Produkcji Trzody Chlewnej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

<sup>3</sup> malwina.merska@interia.pl, Katedra Biochemii i Toksykologii, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl



### **3. Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w Polsce**

Przyjęcie w 1992 roku Konwencji o różnorodności biologicznej spowodowało konieczność podjęcia działań w zakresie ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w Polsce. Do trzech głównych celów Konwencji należą: ochrona różnorodności biologicznej, zrównoważone użytkowanie jej elementów oraz sprawiedliwy i równy podział korzyści, wynikający z użytkowania różnorodności biologicznej, m.in. poprzez stworzenie warunków dostępu do zasobów genetycznych i transferu odpowiednich technologii [1]. Ponadto, ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich oraz opracowanie strategii racjonalnego ich użytkowania wynika ze zobowiązań przyjętych przez Polskę na forum FAO w 2009 roku [2]. Zgodnie z ustawodawstwem międzynarodowym, 25 kwietnia 2012 roku Polska przyjęła „Strategię zrównoważonego rozwoju wsi, rolnictwa i rybactwa na lata 2012-2020” wskazując m.in. na konieczność podjęcia racjonalnego użytkowania zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich. Następstwem przyjęcia dokumentu było rozpoczęcie prac nad wdrożeniem Krajowej strategii oraz podjęcie działań, uznanych za priorytetowe, mających na celu ograniczenie postępującego ubożenia i zwiększenie niedostatecznego obecnie wykorzystania bioróżnorodności zwierząt gospodarskich, stanowiących integralną część ekosystemów rolniczych [1].

Polska na tle innych krajów europejskich wyróżnia się stosunkowo dobrze zachowanymi zbiorowiskami naturalnymi oraz bogactwem występujących w nich gatunków, form roślin oraz ras zwierząt użytkowych. Zachowanie genetycznie unikalnych ras i odmian ma znaczenie priorytetowe w walce z utratą różnorodności genetycznej wszystkich gatunków [3]. Monitoring różnorodności biologicznej jest złożonym procesem bazującym na gromadzeniu informacji, tworzeniu baz danych oraz udostępnianiu informacji o stanie jej elementów (m.in. genotypów, gatunków, ekosystemów). Porównanie uzyskanych danych umożliwia ocenę kierunków i tempa zachodzących zmian oraz ich prognozowanie [4].

Celem wielu prowadzonych w kraju badań naukowych jest rozpoznanie uwarunkowania genetycznego ważnych ekonomicznie cech użytkowych zwierząt czy też cech adaptacyjnych. Badania tego typu opierają się także na ocenie dystansu genetycznego jak i określeniu unikalności genetycznej danej populacji. Charakterystyka molekularna stanowi więc ważny instrument w oszacowaniu zróżnicowania, opisie i ocenie struktury genetycznej populacji [5]. Genetyka molekularna okazuje się również niezbędna w tzw. „zarządzaniu genetycznym” małymi populacjami, gdzie

celem jest ograniczenie efektu inbredu [1]. Bardzo istotnym w kontekście wykorzystania metod oraz technik genetyki molekularnej jest Priorytet 6 Światowego Planu Działań na rzecz Zasobów Genetycznych. Założenia pkt 6.2 oraz 6.3 koncentrują się odpowiednio na: wykorzystaniu osiągnięć genomiki w pracach hodowlanych oraz uwzględnieniu w programach hodowlanych działań na rzecz utrzymania zmienności genetycznej [6]. Wykorzystanie markerów molekularnych nabiera więc istotnego znaczenia w przypadku tych ras, które objęte są ochroną zasobów genetycznych [7].

### **3.1. Opis metod i technik genetyki molekularnej w ochronie zasobów genetycznych**

Różnorodność biologiczna rozpatrywana jest na trzech poziomach organizacji przyrody: ekosystemowym, gatunkowym oraz genetycznym (wewnątrzgatunkowym). Wszystkie poziomy są ze sobą ściśle powiązane. Różnorodność genetyczna wynika z występowania mutacji w łańcuchu DNA. Ich obecność warunkuje indywidualne cechy każdego osobnika. Różnorodność genetyczna stanowi główne źródło bioróżnorodności oraz prowadzi do powstawania nowych gatunków [9]. Ocena stanu bioróżnorodności, rozpoznanie oraz określenie występowania charakterystycznych cech poszczególnych ras możliwe jest zarówno przy wykorzystaniu tradycyjnych metod hodowlanych jak i technik analizy molekularnej [10].

Markery molekularne są szeroko rozpowszechnionymi narzędziami do szybkiego wykrywania i charakteryzowania zmienności genetycznej. W aspekcie szybkości i dokładności oceny markery molekularne stały się w ostatnich latach bardzo popularne w ocenie zróżnicowania genetycznego osobników. Istnieją jednak pewne ograniczenia w użyciu markerów, głównym z nich jest dobór właściwego markera. Jak podają Nageswara-Rao i Soneji [11] wybór markera warunkowany jest liczbą dostępnych do analiz loci, odpowiednio wysokim stopniem polimorfizmu analizowanego miejsca a także kosztami wynikającymi z analiz. Markery molekularne dziedziczone są w prosty Mendlowski sposób, charakteryzują się łatwością analizy [12] dzięki czemu mogą być wykorzystane do szybkiego wykrywania zmienności genetycznej [11]. Markery molekularne umożliwiają detekcję różnic w sekwencjach DNA wynikających z mutacji: insercji, delecji, inwersji lub duplikacji fragmentów DNA [13]. Istnienie polimorfizmu może wpływać na aktywność enzymów białkowych, samych białek oraz ich receptorów, mając także modyfikacyjny wpływ na szlaki metaboliczne [14, 15]. Powstałe mutacje mogą mieć różny charakter: „funkcjonalny” lub „neutralny” [16]. Dlatego, bardzo istotny jest wybór odpowiedniego markera, uwzględniającego różny poziom ekspresji zmian powstałych na skutek mutacji oraz ich funkcję w organizmie.

Pierwszym etapem, decydującym o powodzeniu dalszych analiz jest właściwe pobranie materiału biologicznego oraz odpowiednie przeprowadzenie izolacji DNA. Wysoką wydajność ekstrakcji gwarantuje użycie gotowych, komercyjnych zestawów do izolacji DNA.

Większość technik wykorzystywanych w badaniach zmienności genetycznej bazuje na reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction). Technika ta polega na namnażaniu z całkowitego DNA jego wyselekcjonowanych fragmentów [17, 18]. Reakcja zachodzi dzięki zdolności DNA do samopowielania a także zastosowaniu enzymu – polimerazy, specyficznych odcinków DNA (starterów) oraz obecności w mieszaninie reakcyjnej wolnych nukleotydów. Reakcja przebiega w czterech etapach, w zmiennych warunkach temperaturowych:

1) denaturacja dwuniciowego DNA (temp. ok. 94-95°C) - powstanie jednoniciowego DNA na skutek rozplecenia podwójnej helisy oraz zatrzymania reakcji enzymatycznych,

2) przyłączanie starterów – przebiega w warunkach obniżonej temperatury, specyficznych dla zaprojektowanych sekwencji starterów (ok. 54- 60°C)

3) synteza nici komplementarnej (tzw. wydłużanie) – zachodzi w temperaturze ok. 72°C, wolne nukleotydy przyłączane są dzięki katalizującej reakcją polimerazie. W efekcie powstaje dwuniciowe DNA.

4) wydłużanie końcowe – pozwala na dokończenie procesów z etapów poprzednich [19].

Bardzo duże znaczenie dla uzyskania wyników ma właściwa optymalizacja warunków reakcji PCR [20], ustalenie optymalnej ilości DNA, ilości i stężenia reagentów, temperatury przyłączania starterów oraz liczby powtórzeń każdego z cykli temperaturowych. Technika PCR może podlegać różnym modyfikacjom. Jej zasada działania we wszystkich analizach jest podobna, jednak odpowiednie modyfikacje pozwalają na analizę różnych markerów molekularnych. Jedną z modyfikacji techniki PCR jest metoda PCR – RFLP. Metoda ta wykorzystuje enzymy restrykcyjne, rozpoznające typowe sekwencje w łańcuchu DNA. Interpretacja wyników związana jest z analizą długości fragmentów restrykcyjnych, które są efektem mutacji punktowych. Zmiana jednego nukleotydu na inny może powodować powstanie miejsca rozpoznawanego przez enzym lub zanik takiej sekwencji (wtedy cięcie nie występuje) [21]. Ostatnim etapem analizy restrykcyjnej jest przeprowadzenie elektroforezy oraz określenie długości fragmentów restrykcyjnych.

W ostatnich latach dużą popularność w analizach zyskał mikro-satelitarny polimorfizm w postaci krótkich, tandemowych powtórzeń (STR). Sekwencje mikrosatelitarne są to proste powtórzenia składające się z dwu-, trzy- lub czteronukleotydowych sekwencji zwanych motywami. Najczęściej są to jednak dwunukleotydowe motywy powtórzeń. Często

motyw taki może być, regularnie przerywany inną sekwencją. Jako odcinki niekodujące ulokowane są zazwyczaj w intronach jednak czasami znajdujemy je również w eksonach w postaci mniejszej liczby powtórzeń. Dzięki dużemu zróżnicowaniu ilości powtórzeń motywu podstawowego jego polimorfizm jest ogromny, co w połączeniu z prostym mendelowskim dziedziczeniem tworzy idealny obiekt badań. Markery mikrosatelitarne stosowano w licznych badaniach do wyjaśnienia procesu udomowienia oraz migracji bydła [22, 23, 24] a także charakterystyki pogłowia bydła [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]. Wykorzystanie alleli mikrosatelitarnych jest pomocne także przy podejmowaniu decyzji dotyczących ochrony zwierząt [32].

W analizach polimorfizmu mikrosatelitarnego także zastosowanie znalazła metoda PCR. Po rozdziale na żelu lub po hybrydyzacji ze znaną sondą możliwa jest identyfikacja długości sekwencji mikrosatelitarnej występującej u badanego osobnika pod względem analizowanego loci. Możliwe jest także zastosowanie metody multiplex PCR, w wyniku której otrzymywany jest cały zestaw prążków do przeanalizowania. Tę metodę identyfikacji mikrosatelitów wykorzystuje się często w kontroli pochodzenia zwierząt, w celu sprawdzenia poprawności zapisów, do procesu szacowania wartości hodowlanej czy też weryfikacji pochodzenia szczególnie cennych osobników. Obecnie, w tego typu badaniach wykorzystywany jest zestaw 11 markerów mikrosatelitarnych DNA: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, który stanowi minimalny zestaw zalecany przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG do kontroli pochodzenia [8]. Sekwencje mikrosatelitarne są równomiernie rozsianymi elementami w genomie. Dzięki temu znalazły wiele praktycznych zastosowań. Między innymi wykorzystywane są w poszukiwaniu genów cech ilościowych QTL oraz przy tworzeniu map genetycznych [32].

Tego typu analizy pozwalają na poznanie różnic w sekwencji DNA, czyli układu zasad w łańcuchu kwasu dezoksyrybonukleinowego. Różnice pomiędzy osobnikami wynikają ze zmian struktury kwasów nukleinowych często tak małych jak podstawienie jednego nukleotydu drugim [33]. Dlatego też, szybki rozwój technik molekularnych prowadzi do stopniowego zastępowania mikrosatelitów przez markery SNP [1].

#### **4. Podsumowanie**

Wykorzystanie metod oraz technik genetyki molekularnej ma ogromne znaczenie w ochronie zasobów genetycznych. Wyniki analiz stanowią źródło informacji o puli genetycznej danej rasy, procesach jakie populacja przeszła a także o sile tych procesów. Jednak, jednym z warunków skutecznego doskonalenia i użytkowania zwierząt gospodarskich jest dobre rozpoznanie cech fenotypowych i ich uwarunkowań genetycznych zarówno w doskonalonych jak i chronionych populacjach zwierząt. Działania

zmierzające do określenia zmienności genetycznej poszczególnych populacji, ras i linii zwierząt gospodarskich powinny stanowić przedmiot badań ośrodków naukowych we współpracy ze związkami hodowców a także być szeroko rozpowszechniane wszystkim zainteresowanym podmiotom.

## Literatura

1. Martyniuk E., Krupiński J., Chełmińska A. *Krajowa strategia zrównoważonego użytkowania i ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich*. Warszawa : Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2013
2. FAO. Preparation of national strategies and action plans for animals genetic resources . Rome : FAO Animal Production and Health Guidelines, 2009. strony 1-84
3. Sodhi M., Mukesh M., Prakash B., Ahlawat S.P.S, Sobti R.C. *Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Tharpakar breed of Indian zebu (Bos indicus) cattle, a major breed of Rajasthan*. Journal of Genetics. 85, 2006, Tom 3, strony 165-170
4. Stawicka, J. *Ochrona różnorodności biologicznej*. [aut. książki] P. Hewelke. Zasoby przyrodnicze szansą zrównoważonego rozwoju. 2007, strony 13-42
5. Semik E., Krawczyk J. *The State of Poultry Genetics Resources and genetic diversity of hen populations*. Annals of Animal Science. 2011, Tom 11, 2, strony 179-189
6. FAO. The Global Plan of Action for Animal Genetic Resources for Food and Agriculture FAO. Rome : brak nazwiska, 2007
7. Hedrick W.P. *Conservation genetics: where are we now?* Trends in Ecology and Evolution. 2001, Tom 16, 11
8. Radko A., Rychlik T., Szumiec A. *Kontrola rodowodów bydła rasy Limousine w oparciu o mikrosatelitarne loci uzupełniającego zestawu markerów DNA*. Roczniki Naukowe Zootechniki. 2011, Tom 38, 2, strony 161-168
9. Urbisz A. *Ocena bioróżnorodności jako jeden z ważnych czynników ekorozwoju*. Problemy Ekorozwoju: studia filozoficzno-sozologiczne. 2010, Tom 5, 1, strony 91-94
10. Krupiński J, i inni. *Strategiczne kierunki rozwoju produkcji zwierzęcej uwarunkowane oczekiwaniem społecznym, ochroną środowiska, i dobrostanem zwierząt*. Polish Journal of Agronomy. 2011, 7, strony 59-67
11. Nageswara R i Soneji M.J.R. *Molecular Genetic Markers: What? Why? Which one for Exploring Genetic Diversity?* The Science Advisory Board. 2008
12. Schulman A.H., Flavell A.J. i Ellis T.H.N. *The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants*. Methods of Molecular Biology. 2004, 260, strony 145-173
13. Kurzawski M. i Drożdżik M. *Współczesne metody genotypowania i ich zastosowanie w farmakogenetyce. Metody molekularne w farmakologii klinicznej - od teorii do zastosowań* . 2009

14. Buchowicz J. *Biotechnologia molekularna. Modyfikacje genetyczne, postępy, problemy*. Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009. strony 103, 104, 106-110
15. Grajek W. *Przeciwwłeniace w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Warszawa : Wydawnictwo Naukowo - Techniczne , 2007. strony 427-432, 436
16. Marsjan P.A. i Oldenbroek J.K. *Molecular Markers, a tool for exploring genetic diversity*. [aut. książki] *Research report FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome : brak nazwiska, 2007, strony 359-379
17. McPherson M.J., Hames B.D. i Taylor G.R. *PCR 2: A Practical Approach*. Oxford University Press. 1995
18. Słomski R. *Analiza DNA. Teoria i praktyka*. Poznań : Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2008
19. Zagajska-Neubauer M. i Dubiec A. *Techniki i markery molekularne w badaniach zmienności genetycznej ptaków*. Notatki ornitologiczne. 2007, 48, strony 193-206
20. Kidd K.K. i Rauno G. *Optimizing PCR*. [aut. książki] M.J. McPherson, B.D. Hames i G.R. Taylor. *PCR 2: A Practical Approach* . brak miejsca : Oxford University Press, 1995
21. Nowak Z. i Gruszczyńska J. *Wybrane techniki i metody analizy DNA*. Warszawa : SGGW, 2007. strony 56, 21-23
22. Bradley D.G., i inni. *Zebu-taurine variation in Y chromosome DNA: a sensitive assay for introgression in West African trypanotolerant cattle population*. *Animal Genetics*. 1994, 25, strony 7-12
23. Loftus R.T., i inni. *Evidence of two independent domestications of cattle*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91, strony 2757-2761
24. Bruford M.W., Bradley D.G. i Luikart G. *DNA markers reveal the complexity of livestock domestication*. *Nat. Rev. Genet*. strony 900-910
25. Kantanen J., i inni. *Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds*. *J. Hered*. 2000, 91, strony 446-457
26. Tambasco D.D., i inni. *Characterizacao molecular de Animals da raca Nellore utilizando microsatelites e genes candidates*. *Rev. Bras. Zootech*. 2000, 29, strony 1044-1049
27. Beja-Pereira, A., i inni. *Genetic characterization of Southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites*. *J. Hered*. 2003, 94, strony 243-250
28. Dorji T., i inni. *Genetic diversity in indigenous cattle population in Bhutan: implications for conservation*. *Asian-Aust J.Anim.Sci*. 2003, 16, strony 946-951
29. Jordana J., i inni. *Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by F-statistics*. *J.Anim.Genet*. . 2003, 120, strony 73-87
30. Metta M., i inni. *Genetic characterization of the Indian cattle breeds, Ongole and Deoni (Bos indicus), using microsatellite markers - a preliminary study*. *BMC Genetics*. 2004, 5, str. 16
31. Mukesh M., i inni. *Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analyzed with 20 microsatellites*. *J. Anim. Breed. Genet*. 2004, 121, strony 416-424

32. Sunnucks P. *Efficient genetic markers for population biology*. Trends in Ecology and Evolution. 2000, Tom 15, 5, strony 199-203
33. Bał J. *Biologia molekularna w medycynie*. Elementy genetyki klinicznej. Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007. strony 142-147, 151-154

### **Wykorzystanie genetyki molekularnej w ochronie zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich**

#### Streszczenie

Zasoby genetyczne zwierząt gospodarskich stanowią bardzo ważny element bioróżnorodności. Ich znaczenie jest ogromne w kontekście tradycji, kultury, historii ale także ze względu na wysoką jakość uzyskiwanych od tych zwierząt produktów. Dlatego, konieczne są wszelkie działania mające na celu utrzymanie populacji rodzimych ras zwierząt gospodarskich. Prowadzone obecnie metody ochrony zostają stopniowo uzupełniane najnowszymi osiągnięciami, wykorzystującymi techniki oraz metody analizy molekularnej. Ich wykorzystanie pozwala na oszacowanie struktury genetycznej danej populacji, ocenę jej zmienności genetycznej oraz opis procesów które daną populację ukształtowały. Celem pracy był opis stosowanych metod oraz technik genetyki molekularnej wykorzystywanych w ochronie zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich.

Słowa kluczowe: ochrona zasobów genetycznych, genetyka molekularna, zmienność genetyczna

### **The use of molecular genetics in the conservation of livestock animals genetic resources**

#### Abstract

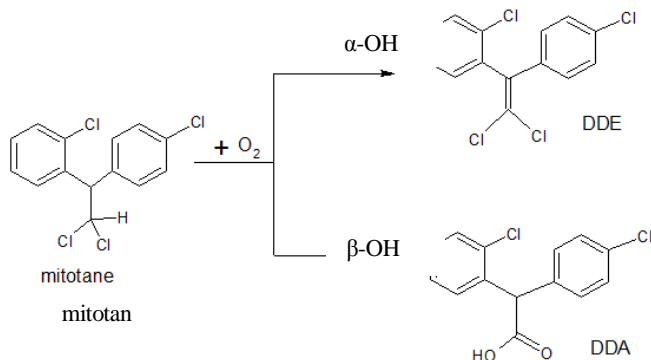
Genetic resources of livestock animals constitute very important element of biodiversity. Their importance is enormous in the context of tradition, culture and history, but also because of the high quality of the obtained from these animals products. Therefore, we should take necessary measures to maintain the populations of native livestock animal breeds. Currently provided methods of protection are gradually supplemented by the latest achievements, which use techniques and methods of molecular analysis. Their usage allows to estimate the genetic structure of the population, to assess the genetic variation and to describe processes that influenced on the current populations. The aim of this study was to describe the methods and techniques used in molecular genetics and their application in the conservation of genetic resources of livestock animals.

Keywords: conservation of genetic resources, molecular genetics, genetic variation

## Metoda HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu krwi z przeznaczeniem do badań farmakokinetyki u ludzi

### 1. Wstęp

Mitotan ((2,4'-dichlorodifenylo)dichloroetan, o,p'-DDD) jest chlorowanym dwupierścieniowym związkiem aromatycznym, używanym pierwotnie jako insektycyd. Obecnie mitotan stosowany jest w terapii nieoperacyjnego raka kory nadnerczy. Wykazano również, że lek wydłuża przeżycie wolne od nawrotu choroby u pacjentów z radykalnie wyciętym rakiem nadnercza [1,2]. Mechanizm działania mitotanu nie jest w pełni wyjaśniony ale przypuszcza się, że lek działa cytotoksycznie na komórki kory nadnerczy poprzez toksyczny wpływ na mitochondria [3]. Mitotan jest metabolizowany w wątrobie do kwasu octowego 1,1-(o,p'-dichlorodifenylo) (DDA) w procesie  $\beta$ -hydroksylacji oraz w mniejszej ilości do (o,p'-dichlorodifenylo)-2,2 dichloroetenu (DDE) w procesie  $\alpha$ -hydroksylacji [4] (Rysunek 1).



Rysunek 1. Metabolizm mitotanu

<sup>1</sup> mkaraz@ump.edu.pl, Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, www.ump.edu.pl

<sup>2</sup> anczykowska.a@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, www.ump.edu.pl

<sup>3</sup> 19karola01@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, www.ump.edu.pl



Dane dotyczące aktywności biologicznej metabolitów mitotanu są niejednoznaczne. Przypuszcza się, że DDA może wykazywać działanie farmakologiczne, podczas gdy DDE jest metabolitem nieaktywnym [5]. Skuteczność mitotanu zależy od jego stężenia w osoczu, które powinno znajdować się w zakresie 14-20 mg/l. Stężenie leku poniżej 14 mg/l może skutkować brakiem efektu terapeutycznego, podczas gdy stężenie powyżej 20 mg/l naraża pacjenta na wystąpienie działań niepożądanych, głównie ze strony układu nerwowego i pokarmowego [2]. Tylko u 35% pacjentów leczonych mitotanem zaobserwowano kliniczną odpowiedź na lek [6]. Może to być spowodowane słabą korelacją między zastosowaną dawką a stężeniem mitotanu w osoczu. Ponadto obserwuje się dużą zmienność międzyosobniczą parametrów farmakokinetycznych. Biologiczny okres półtrwania mitotanu może wynosić od 18 do 159 dni, co wiąże się z kumulacją leku w tkance tłuszczowej [7]. W celu poprawy skuteczności leczenia mitotanem zaleca się monitorowanie jego stężenia w osoczu u pacjentów poddawanych terapii tym lekiem. Do tej pory opublikowano kilka metod HPLC przeznaczonych do oznaczania stężeń mitotanu oraz jego metabolitów w osoczu krwi [4, 8-10]. Jednakże, wymagały one ekstrakcji analitów do ciała stałego [4], zastosowania gradientowego przepływu fazy ruchomej [8] lub stosunkowo długiego czasu analizy sięgającego 20 min [9, 10].

## **2. Cel pracy**

Celem badań było opracowanie prostej i szybkiej metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV przeznaczonej do terapeutycznego monitorowania stężenia mitotanu w osoczu u pacjentów z rakiem kory nadnerczy.

## **3. Materiały i metody**

### **3.1. Odczynniki**

Wzorzec mitotanu ((2,4'-dichlorodifenylo)dichloroetan, o,p'-DDD) o czystości  $\geq 98\%$  otrzymano z firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Niemcy), natomiast wzorzec klopidoogrelu (CLP) o czystości 99% z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie. Do przygotowania roztworów analitów oraz fazy ruchomej wykorzystywano metanol o czystości wymaganej do HPLC (Merck, Niemcy). Stosowano również wodę demineralizowaną (0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Seradest, USF 1900, USF Seral, Niemcy). Osocze wolne od leków uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu.

## **3.2. Metoda HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu krwi**

### **3.2.1. Warunki pracy aparatu HPLC**

Do oznaczania mitotanu w próbkach osocza wykorzystano chromatograf cieczowy Agilent 1100 z detektorem UV (Agilent Technologies, USA). Rozdział mitotanu i CLP, zastosowanego jako wzorzec wewnętrzny, prowadzono na kolumnie LiChrospher RP-C18 (125mm×4,6 mm, 5µm) w temperaturze 20°C. Faza ruchoma o składzie metanol:woda (85:15, v:v) przepływała z szybkością 0,8 ml/min. Całkowity czas analizy wynosił 7 min. Absorbancje badanych związków mierzono przy długości fali światła UV,  $\lambda = 230$  nm. Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl. Zbieranie oraz opracowywanie danych przeprowadzono za pomocą programu ChemStation (Agilent Technologies, USA).

### **3.2.2. Roztwory podstawowe i wzorcowe**

Sporządzono roztwór podstawowy mitotanu o stężeniu 1 g/l w metanolu. Z roztworu tego przygotowano roztwory wzorcowe mitotanu o stężeniu 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 i 80,0 mg/l w metanolu. Ponadto, przygotowano roztwór podstawowy CLP o stężeniu 1 g/l w metanolu, z którego przygotowano roztwór wzorcowy CLP o stężeniu 50 mg/l w metanolu.

### **3.2.3. Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej**

Do 100 µl osocza wolnego od leków dodawano 50 µl roztworów wzorcowych mitotanu o podanych wyżej stężeniach oraz 50 µl roztworu wzorcowego CLP o stężeniu 50 mg/l. Uzyskane w ten sposób próbki zawierały mitotan w stężeniach: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 i 40,0 mg/l oraz CLP w stężeniu 25 mg/l.

Następnie wytrącano białka zawarte w osoczu poprzez dodanie 50 µl bezwodnego acetonitrylu i intensywne wytrząsanie przez 30 s. Powstały osad odwirowywano przez 10 min przy 15000 obr/min w temperaturze 20°C. Następnie pobierano 100 µl supernatantu i powtórnie wirowano w powyższych warunkach. 20 µl uzyskanego supernatantu nastrzykiwano do kolumny chromatograficznej. W analogiczny sposób przygotowywano próbkę zerową oraz próbkę nie obciążoną analitami. W przypadku próbki zerowej do 100 µl osocza dodawano 50 µl roztworu wzorcowego CLP o stężeniu 50 mg/l, 50 µl metanolu oraz 50 µl acetonitrylu, natomiast próbka nie obciążona analitami zawierała 100 µl osocza, 100 µl metanolu oraz 50 µl acetonitrylu.

Wg powyższej procedury przygotowano 6 krzywych wzorcowych.

### 3.2.4. Walidacja metody HPLC-UV

Wyznaczono następujące parametry walidacyjne opracowanej metody HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu ludzkim: selektywność, liniowość, precyzję i dokładność, wykrywalność (LOD) oraz oznaczalność (LOQ) oraz trwałość w warunkach przechowywania próbek.

#### 3.2.4.1. Selektywność

Selektywność metody została określona poprzez porównanie chromatogramu uzyskanego po nastrzyknięciu próbki nie obciążonej analitami z chromatogramami otrzymanymi po obciążeniu osocza mitotaniem oraz CLP. Interferencje pochodzące od matrycy zbadano wykorzystując próbki przygotowane z użyciem osocza nieobciążonego lekami pochodzącego od różnych probantów.

#### 3.2.4.2. Liniowość

Krzywa wzorcowamitotanu została przedstawiona jako zależność stosunku pola powierzchni piku analitu i pola powierzchni piku CLP. Zakres krzywej wzorcowej obejmował stężeniamitotanu: 0,5 - 40,0 mg/l. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczono parametry regresyjne krzywej wzorcowej: współczynnik kierunkowy - a, współczynnik przesunięcia - b oraz współczynnik korelacji - r. Statystyczną istotność współczynnika b określono za pomocą testu t-Studenta. Wartość testową f, obliczano ze wzoru:

$$f = |b|/S_b \quad (1)$$

gdzie: f – wartość testowa, |b| – wartość bezwzględna współczynnika przesunięcia,  $S_b$  – błąd standardowy. Następnie obliczoną wartość f porównywano z wartością  $t_{\alpha}$  odczytaną z tablic dla n-2 stopni swobody (n – ilość punktów krzywej wzorcowej) przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

Liniowość krzywych wzorcowych potwierdzono za pomocą testu Mandela (Mandel's fitting test), przy poziomie ufności 95%. O liniowości metody świadczyła wartość testowa  $TV < F_{kryt}[11]$ .

#### 3.2.4.3. Oznaczalność (LOQ), precyzja i dokładność

LOQ określono jako najmniejsze stężenie mitotanu, które można oznaczyć z odpowiednią precyzją (względne odchylenie standardowe  $RSD \leq 20\%$ ) oraz dokładnością (błąd względny  $\leq 20\%$ ).

Precyzję metody wyrażono jako względne odchylenie standardowe (RSD):

$$RSD = SD/C_{sr} \cdot 100 \% \quad (2)$$

gdzie: RSD – względne odchylenie standardowe [%], SD – odchylenie standardowe oznaczonych stężeń mitotanu,  $C_{sr}$  – średnie oznaczone stężenie mitotanu.

Dokładność oznaczeń wyrażono jako błąd względny:

$$\text{błąd} = |C_{\text{sr}} - C_{\text{nom}}| / C_{\text{nom}} \cdot 100\% \quad (3)$$

gdzie: błąd – błąd względny [%],  $C_{\text{sr}}$  – średnie oznaczone stężenie,  $C_{\text{nom}}$  – stężenie nominalne.

Zarówno precyzję, jak i dokładność metody w ciągu dnia (intra-day) obliczono dla czterech różnych stężeń (wysokie, średnie, niskie i LOQ) mitotanu, poprzez oznaczenie 5 niezależnych próbek o danym stężeniu przygotowanych zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (Rozdz. 3.2.3). Precyzję i dokładność metody pomiędzy dniami (inter-day) wyznaczono natomiast dla wszystkich nominalnych stężeń z krzywej wzorcowej mitotanu, przy czym liczba powtórzeń dla każdego stężenia wynosiła 6. Metodę uznano za dostatecznie dokładną i precyzyjną, jeżeli RSD i błąd względny były mniejsze niż 15%, z wyłączeniem LOQ (20%).

#### **3.2.4.4. Trwałość mitotanu w warunkach przechowywania próbek**

Trwałość mitotanu określano dla dwóch stężeń (niskiego i wysokiego), przez porównanie stężeń analitu oznaczonych w próbkach przechowywanych w określonych poniżej warunkach, ze stężeniami oznaczanymi w próbkach przygotowanych bezpośrednio przed analizą. Próbki uznawano za trwałe w warunkach przechowywania, jeżeli ich stężenie nie zmieniło się o więcej niż  $\pm 15\%$  w porównaniu do stężenia oznaczonego w próbkach przygotowanych bezpośrednio przed analizą. Analizowano wpływ następujących warunków na trwałość analitów:

- przechowywanie próbki w temperaturze 20°C przez 24 godziny (trwałość krótkoterminowa);
- przechowywanie próbki w temperaturze -20°C przez okres 3 miesięcy (trwałość długoterminowa);
- trzykrotny cykl zamrażania i rozmrażania.

#### **3.2.5. Sprawdzenie użyteczności opracowanej metody w warunkach *in vivo***

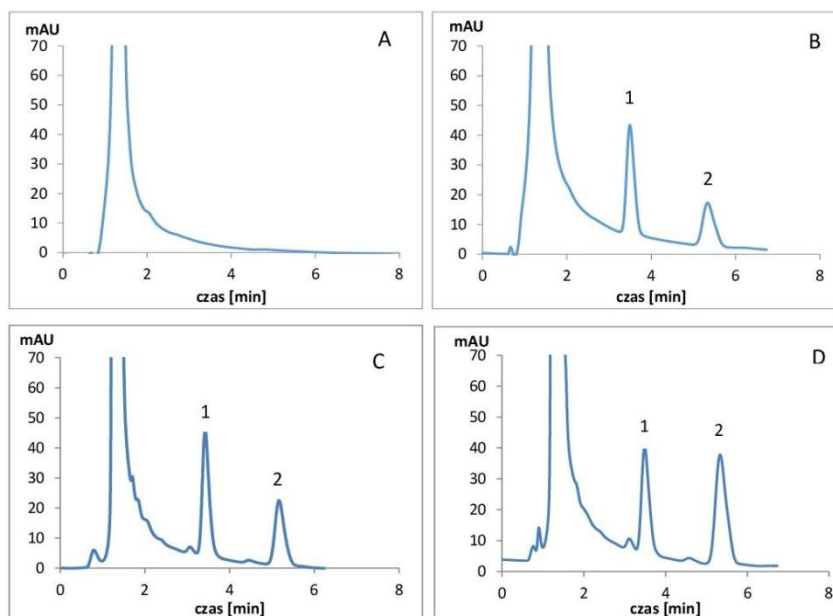
Użyteczność opracowanej metody sprawdzono poprzez oznaczenie stężeń leku w osoczu pacjenta pediatrycznego z rakiem kory nadnerczy poddawanego terapii mitotaniem. Próbki krwi o objętości ok. 5 ml pobierano do systemów aspiracyjno-próżniowych (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Austria) w następujących przedziałach czasowych: po 2 miesiącach (dawka 10g/dobę) oraz po 3 miesiącach trwania terapii (dawka 6g/dobę). Po odwirowaniu przez 10 min z szybkością 3000 obr/min uzyskane osocze mrożono w temp. -20°C do czasu przeprowadzenia analizy.

## 4. Analiza wyników

### 4.1. Wyniki walidacji metody HPLC

#### 4.1.1. Selektywność

Na Rysunku 2 przedstawiono chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbki nieobciążonej analitami (A), próbki zawierającej mitotan w stężeniu 10 mg/l (B) oraz chromatogramy uzyskane po nastrzyknięciu próbki przygotowanej z osocza pacjenta leczonego mitotaniem (C, D). W zastosowanych warunkach uzyskano zadowalający rozdział mitotanu oraz CLP, a czasy retencji wynosiły odpowiednio: 3,5 min dla CLP oraz 5,3 min dla mitotanu. Nie stwierdzono interferencji pochodzących od związków endogennych obecnych w osoczu.



Rysunek 2. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek osocza: (A) próbka nieobciążona analitami, (B) próbka osocza obciążona mitotaniem i CLP o stężeniach odpowiednio 10 mg/l i 25 mg/l, (C) próbka pacjenta, w której oznaczono stężenie mitotanu 14,2 mg/l, (D) próbka pacjenta, w której oznaczono stężenie mitotanu 28,9 mg/l. Pík 1 pochodzi od CLP natomiast pik 2 – od mitotanu

#### 4.1.2. Liniowość

Liniowość metody została wyznaczona dla zakresu stężeń mitotanu w osoczu 0,5 – 40,0 mg/l. Uśrednione równanie krzywej wzorcowej zamieszczono w Tabeli 1. Równanie przyjęło postać  $y = ax$ , ponieważ wartość współczynnika przecięcia  $b$  nie różniła się istotnie od zera. Liniowy przebieg krzywej wzorcowej potwierdzono testem Mandela ( $TV = 1,52 < F_{kryt} = 21,20$ ).

#### 4.1.3. LOD, LOQ, precyzja i dokładność

LOD i LOQ dla mitotanu wynosiły odpowiednio 0,25 i 0,5 mg/l. LOQ zostało wyznaczone z precyzją określoną przez  $RSD \leq 11,9\%$  oraz z dokładnością wyrażoną przez błąd względny  $\leq 12,0\%$ . Wyniki badania precyzji i dokładności metody w ciągu dnia oraz pomiędzy dniami dla pozostałych poziomów stężeń mieściły się w granicach:  $RSD = 1,7-11,9\%$ ; błąd oznaczeń = 0,4-13,0%. Szczegółowe dane zamieszczono w Tabeli 1.

Tabela 1. Precyzja i dokładność metody HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu krwi

Stężenie nominalne (mg/l)	Średnie oznaczone stężenie (mg/l)	Dokładność (błąd, %)	Precyzja (RSD, %)
W ciągu dnia (n = 5)			
0,5	0,55	10,0	11,9
2,5	2,82	12,8	1,8
10,0	10,27	2,7	1,7
30,0	29,88	0,40	2,4
Międzydniami (n = 6)			
0,5	0,56	12,0	10,6
1,0	1,13	13,0	11,9
2,5	2,77	10,8	9,3
5,0	5,52	10,4	8,8
10,0	10,66	6,6	8,0
20,0	20,28	1,4	6,5
30,0	29,62	1,3	3,3
40,0	39,85	0,4	3,2

$$y = 0,0512 \cdot x \quad (r = 0,9997)$$

#### 4.1.4. Trwałość mitotanu w warunkach przechowywania

Mitotan był stabilny w badanych warunkach, odpowiadających warunkom przechowywania próbek klinicznych (Tabela 2).

Tabela 2. Wyniki badania trwałości mitotanu w próbkach osocza podczas przechowywania w różnych warunkach (n = 3)

Stężenie nominalne [mg/l]	2,5	30,0
Trwałość krótkoterminowa (24 godziny w temp. 20°C)		
Stężenie oznaczone [mg/l]	2,25	32,97
Błąd oznaczeń [%]	10,0	9,9
Trwałość długoterminowa (3 miesiące w -20°C)		
Stężenie oznaczone [mg/l]	2,86	34,37
Błąd oznaczeń [%]	14,4	14,6
Trwałość w czasie trzech cykli zamrażania i rozmrażania		
Stężenie oznaczone [mg/l]	2,76	30,71
Błąd oznaczeń [%]	10,4	2,4

## 4.2. Wyniki oznaczania mitotanu w osoczu krwi pacjenta

Użyteczność opracowanej metody potwierdzono poprzez zastosowanie jej do oznaczenia stężeń mitotanu w próbkach osocza pacjenta pediatrycznego ze zdiagnozowanym rakiem kory nadnerczy. Chromatogramy próbek osocza pacjenta przedstawiono na Rysunku 2 (C i D). Stwierdzono, że po podaniu dawki 10g/dobę oznaczone stężenie mitotanu (C=14,2 mg/l) po 2 miesiącach trwania terapii było niższe niż po podaniu dawki 6g/dobę po 3 miesiącach trwania terapii (C = 28,9 mg/l). Należy zaznaczyć, że stężenie 28,9 mg/l znajduje się powyżej zakresu terapeutycznego mitotanu. Uzyskane wyniki potwierdzają słabą korelację pomiędzy stosowaną dawką mitotanu a jego stężeniem w osoczu w czasie trwania terapii, co może być spowodowane kumulacją leku w tkance tłuszczowej i jego późniejszym uwalnianiem do krwi [12]. Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność monitorowania stężeń mitotanu w osoczu pacjentów w celu modyfikacji dawkowania leku. Jest to konieczne dla zapewnienia skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii.

## 5. Podsumowanie

Opracowana metoda HPLC-UV charakteryzuje się prostą metodyką przygotowania próbek i krótkim czasem analizy. Ponadto jest odpowiednio selektywna, precyzyjna i dokładna i spełnia kryteria walidacyjne dla metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania leków w płynach biologicznych. W związku z tym metoda ta może być stosowana do terapeutycznego monitorowania mitotanu w osoczu krwi pacjentów z rakiem kory nadnerczy.

## Literatura

1. De Francia S., Ardito A., Daffara F., Zaggia B., Germano A., Berruti A., Di Carlo F. *Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview*, *Minerva Endocrinologica*, 37 (2012), s. 9-23
2. Terzolo M., Angeli A., Fassnacht M., Daffara F., Tauchmanova L., Conton P.A., Rossetto R., Buci L., Sperone P., Grossrubatscher E., Reimondo G., Bollito E., Papotti M., Saeger W., Hahner S., Koschker A.C., Arvat E., Ambrosi B., Loli P., Lombardi G., Mannelli M., Bruzzi P., Mantero F., Allolio B., Dogliotti L., Berruti A. *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*, *The New England journal of medicine.*, 356 (2007), s. 2372-2380
3. Hescot S., Slama A., Lombès A., Paci A., Remy H., Leboulleux S., Chadarevian R., Trabado S., Amazit L., Young J., Baudin E., Lombès M. *Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells*, *Endocrine-Related Cancer.*, 20 (2013), s. 371-381
4. Mornar A., Sertic M., Turk N., Nigovic B., Korsic M. *Simultaneous analysis of mitotane and its main metabolites in human blood and urine samples by SPE-HPLC technique*, *Biomedical Chromatography.*, 26 (2012), s. 1308-1314
5. Hermesen I.G., Fassnacht M., Terzolo M., Houterman S., den Hartigh J., Leboulleux S., Daffara F., Berruti A., Chadarevian R., Schlumberger M., Allolio B., Haak H.R., Baudin E. *Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 96 (2011), s. 1844-51
6. Wooten M.D., King D.K. *Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature*, *Cancer.*, 72 (1993), s. 3145-3155
7. Moolenaar A.J., van Slooten H., van Seters A.P., Smenk D. *Blood levels of o,p'-DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment*, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.*, 7 (1981), s. 51-54
8. De Francia S., Pirro E., Zappia F., De Martino F., Sprio A.E., Daffara F., Terzolo M., Berruti A., Di Carlo F., Ghezzi F. *A new simple method for measuring mitotane and its two principal metabolites. Tests in animals and mitotane-treated patients.*, *Journal of Chromatography B.*, 837 (2006), s. 69-75
9. Garg M.B., Sakoff J.A., Ackland S.P. *A simple HPLC method for plasma level monitoring of mitotane and its two main metabolites in adrenocortical cancer patients*, *Journal of Chromatography B.*, 879 (2011), s. 2201-2205
10. Nakazawa M., Egawa M., Tanaka T., Aiyama R. *Simple method for determining mitotane concentration in human blood plasma*, *Chromatography.*, 31 (2010), s. 103-106



11. Loco J.V., Elskens M., Croux C., Beernaert H. *Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient*, Accreditation and Quality Assurance., 7 (2002), s. 281-285
12. von Slooten H., van Seters A.P., Smeenk D., Moolenaar A.J. *O,p'-DDD (mitotane) levels in plasma and tissues during chemotherapy and at autopsy*, Cancer Chemotherapy and Pharmacology., 9 (1982), s. 85-88

## **Metoda HPLC-UV oznaczania mitotanu w osoczu krwi z przeznaczeniem do badań farmakokinetyki u ludzi**

### Streszczenie

Mitotan jest lekiem stosowanym u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem kory nadnerczy. Skuteczność mitotanu zależy od jego stężenia we krwi, które powinno znajdować się w zakresie 14-20 µg/ml. W związku z tym celowe jest prowadzenie terapii monitorowanej stężeniem leku u pacjentów leczonych mitotanem.

Celem badań było opracowanie metody HPLC z detekcją UV przeznaczonej do terapeutycznego monitorowania stężenia mitotanu w osoczu u pacjentów z rakiem kory nadnerczy.

Rozdział mitotanu oraz wzorca wewnętrznego – klopidogrelu w próbkach osocza po uprzednim strąceniu białek z użyciem acetonitrylu, przeprowadzono w kolumnie LiChrospher RP 18, przy przepływie fazy ruchomej o składzie metanol-woda (85:15, v:v) z szybkością 0,8 ml/min. Absorbancje badanych związków mierzono przy długości fali światła UV,  $\lambda = 230$  nm. Opracowaną metodę poddano walidacji. Wykrywalność i oznaczalność mitotanu w osoczu wynosiły odpowiednio 0,25 i 0,5 µg/ml. Liniowy zakres krzywych wzorcowych obejmował stężenia leku z zakresu 0,5-40 µg/ml. Metoda była odpowiednio precyzyjna i dokładna, o czym świadczyły wartości współczynnika zmienności (Wz)  $\leq 12\%$  i błędów oznaczeń  $\leq 13\%$ . Opracowaną metodę z powodzeniem zastosowano do oznaczeń stężeń leku w osoczu pacjenta pediatrycznego z rakiem kory nadnerczy poddawanego terapii mitotanem.

Podsumowanie: Opracowana metoda HPLC-UV spełnia kryteria walidacyjne dla metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania leków w płynach biologicznych. W związku z tym powyższa metoda może być stosowana do terapeutycznego monitorowania mitotanu w osoczu krwi pacjentów z rakiem kory nadnerczy.

Słowa kluczowe: mitotan, rak kory nadnerczy, terapeutyczne monitorowanie leku, walidacja

## **HPLC-UV method for analysis of mitotane in human plasma devoted to pharmacokinetic study in humans**

### **Abstract**

Mitotane is an antineoplastic medication used in the treatment of adrenocortical carcinoma. Efficacy of the therapy with mitotane is limited by its plasma concentration, which should cover the range of 14-20 µg/ml. Therefore, therapeutic monitoring of mitotane in plasma should be performed in patients with adrenocortical carcinoma treated with the drug.

The aim of the study was to elaborate HPLC method with UV detection devoted to therapeutic monitoring of mitotane in plasma of patients with adrenocortical carcinoma.

Mitotane and the internal standard - clopidogrel were separated in the LiChrospher RP 18 column after plasma protein precipitation with acetonitrile. The mobile phase composed of methanol-water (85:15, v:v) was pumped with the flow rate of 0,8 ml/min. Absorbance of the analytes was measured at  $\lambda = 230$  nm. The elaborated method was validated. Limits of detection and quantitation amounted to 0,25 and 0,5 µg/ml, respectively. Calibration curve of mitotane was linear in the range of 0,5 - 40 µg/ml. The method was adequately precise and accurate, which was confirmed by the values of coefficient of variation (CV)  $\leq 12\%$  and error of estimation  $\leq 13\%$ . The validated method was applied for determination of mitotane concentrations in plasma of pediatric patient suffered from adrenocortical carcinoma and treated with the drug.

**Conclusion:** The elaborated HPLC-UV method fulfills the validation requirements for analysis of drugs in biological samples. Therefore, the method may be applied for therapeutic monitoring of mitotane in plasma samples of patients with adrenocortical carcinoma.

**Keywords:** adrenocortical carcinoma, mitotane, therapeutic drug monitoring, validation

# **Przegląd spopularyzowanych i najczęściej stosowanych metod spektroskopowych w dziedzinach nauk medycznych i farmaceutycznych**

## **1. Wstęp**

Początku spektroskopii jako nauki można doszukiwać się już około XVI wieku w pracach Newtona, który to przy pomocy pryzmatu rozszczepił światło i uzyskał obraz widma słonecznego, wyjaśniając przy tym zagadnienie koloru. W jego ślady po tym przełomowym odkryciu poszli inni uczeni tacy jak m.in. Kartezjusz czy w późniejszym okresie Joseph von Fraunhofer i tym samym po szeregu odkryć i uporządkowaniu faktów rozwinęła się spektroskopia optyczna. Dziś oprócz zjawiska spektroskopii optycznej, mamy szereg różnych innych metod spektroskopowych, a wiele z nich z powodzeniem wykorzystywane są w medycynie, farmacji i wielu innych dziedzinach nauki i życia.

## **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najszerszej wykorzystywanych w sektorze nauk medycznych i farmaceutycznych metod spektroskopowych, które wykorzystywane są m.in. do diagnostyki i określenia stopnia zaawansowania patologicznych zjawisk w wybranych jednostkach chorobowych.

---

<sup>1</sup> alicjajanicka@wp.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Studenckie Koło Naukowe Biofizyki przy Zakładzie Biofizyki

<sup>2</sup> anna.cwynar@vp.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej

<sup>3</sup> blanka@cm.umk.pl, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Biofizyki

### **3. Omówienie**

#### **3.1. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)**

Przez ostatnie 20 lat bardzo mocno rozwinęły się techniki identyfikacji różnych bakterii za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Identyfikacja ta jest możliwa dzięki specyficznym właściwościom różnych szczepów mikroorganizmów, które powodują, że widmo jest specyficzne dla konkretnych szczepów komórek, a nawet dokładnie przedstawia wszystkie składniki komórkowe m.in. białka, polisacharydy czy kwasy nukleinowe [1]. W celu odróżnicowania widma jednego szczepu bakterii od innego stosuje się m.in. hierarchiczną analizę skupień (HCA – Hierarchical Cluster Analysis), analizę dyskryminacyjną (DA – Discriminant Analysis), analizę zmiennych kanonicznych (CVA – Canonical Variate Analysis), analizę funkcji dyskryminacyjnej (DFA – Discriminant Function Analysis), jednak najlepsze wyniki identyfikacji bakterii uzyskuje się dzięki sztucznym sieciom neuronowym (ANN – Artificial Neural Networks). Ostatnia z metod osiąga tak wysoką wybiórczość identyfikacji dzięki elastyczności w działaniu sieci neuronowych, przez co metoda uznawana jest za bardzo dokładną, eliminuje szумы i rozpoznaje już niewielkie różnice między widmami [1].

Godnym uwagi tematem może okazać się wykorzystanie metod spektroskopii FTIR do oceny wodorowych wiązań w ziołowych hydrożelach. Hydrożele roślinne cieszą się dużym zainteresowaniem w dziedzinach nauk farmaceutycznych i biotechnologicznych. Są one sieciami trójwymiarowych polimerów polisacharydów, a hydrożele alginianowe cechują się świetną absorpcją wody i dobrym uwalnianiem związków chemicznych. Im wyższy stopień oczyszczenia żeli tym bardziej bezbarwny żel. Różnego rodzaju śluzy, barwniki, antocyjany czy garbniki powodują zabarwienie. Już w czasie procesu otrzymywania żeli, mogą zachodzić niekorzystne dla efektu końcowego procesy zmian strukturalnych w hydrożelu, takie jak zmiana struktury związku stabilizowanej wiązaniami wodorowymi, depolaryzacja czy też rozpuszczalność w wodzie. To właśnie do zidentyfikowania tych niekorzystnych zmian, może posłużyć technika FTIR. Widma wskazują miejsca, które uległy zmianom w obrębie wiązań wodorowych, jak i wskazują obszary drgań atomów węgla i wodoru w grupach funkcyjnych hydrożelu, które są ważne dla znaczenia aktywności biologicznej hydrożeli. Jest to ważne dla badań strukturalnych prowadzonych nad substancjami naturalnymi, które są aktywne biologicznie, a wszelkie zmiany w ich strukturze mogą doprowadzić do zmian ich aktywności [2].

### 3.2. Diagnostyka fotodynamiczna PDD poszerzona o badanie spektralne

Metodą używaną do wczesnego wykrywania zmian jeszcze przed nowotworowych w powłokach ciała jest PDD czyli diagnostyka fotodynamiczna (photodynamic diagnosis). Jest to umożliwione dzięki zastosowaniu technik endoskopowych. Wzbudzana i wymuszana jest tutaj fluorescencja dzięki temu, że do tkanek został wprowadzony fotouczulacz. Dzieje się to dzięki światłu monochromatycznemu i zakłada się przy tym, że obszary transformowane nowotworowo będą w sposób selektywny gromadzić egzogeny fotouczulacz. Naukowcy stwierdzili, że samo obrazowanie w ten sposób zmian nowotworowych nie jest wystarczające dla przyszłej diagnostyki danej zmiany. W celu precyzyjnego rozpoznania i zwiększenia czułości metody występuje potrzeba dokładnego pomiaru długości fali światła fluorescencyjnego wysyłanego przez tkanki zmienione patologicznie. W związku z tym metoda diagnostyki PDD została poszerzona o badanie spektralne umożliwiające dokładnie określenie zmiany nowotworowej poprzez określenie rozkładu widma światła wysyłanego przez struktury patologiczne. Taka metoda, stwarza olbrzymie możliwości już w diagnostyce klinicznej pacjenta *in vivo* dla zaobserwowania skali zmian na podstawie widm emitowanych ze struktur patologicznie zmienionych tkanek [3].

### 3.3. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, polega na pochłanianiu promieniowania elektromagnetycznego o określonej częstotliwości w próbce zawierającej niesparowane elektrony, kiedy to próbka ta zostaje umieszczona w stałym polu magnetycznym. Zastosowanie spektroskopii EPR może być bardzo różne. Może ona służyć np. do badania mechanizmu działania leków. Jest to realne dzięki możliwości badania próbek biologicznych w tym także krwi. Jak podaje Zawada (4) przykładem na wykorzystanie spektroskopii EPR w określaniu mechanizmu działania leków może być Triapine czyli 3-aminopiridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. To inhibitor reduktazy rybonukleotydowej występujący u pacjentów z guzami litymi opornymi na leczenie. W pobranej krwi od pacjentów którzy byli leczeni tym lekiem w widmie krwinek jednojądrzastych pobranych z krwi obwodowej pacjentów zaobserwowano reaktywne formy tlenu (RFT), aktywność ze strony kompleksu Fe-transferyna, a możliwie także od hemu, miedzi (II) lub też żelaza o niskim stopniu utlenienia. Jak donosi autor podstawą działania leku jest chelatowanie żelaza, a także miedzi [4].

Podobnie można badać toksyczność leków i tu przykładem są antybiotyki aminoglikozydowe oddziaływujące z jonami metali cynku i miedzi występującymi w organizmie, co ma wpływ na ilość rodników tworzących się w kompleksach DOPA-melaniny. Połączenie się takiego kompleksu biopolimeru z antybiotykiem silnie zwiększa intensywność wysyłanego sygnału przez rodniki melaniny [4].

Dzięki spektroskopii EPR można także badać rodnikowe produkty sterylizacji radiacyjnej, która podobnie jak sterylizacja termiczna służy utrzymaniu jałowości preparatów farmaceutycznych. Sterylizacja radiacyjna jest jednak metodą mogącą wpływać na aktywność biologiczną leku poprzez oddziaływanie na strukturę substancji, a spektroskopia elektronowego spinowego rezonansu pomaga w dokładnym określeniu powstałych w procesie wolnych rodników. Najpopularniejsze i najbardziej efektywne nośniki leku jakimi są takie alifatyczne polimery jak kwas polimlekowy (PLA) czy też kwas poliglikolowy (PGA), mogą na drodze degradacji radiacyjnej wytwarzać najwięcej rodników. Nośniki te w związku z tym, że są wrażliwe na temperaturę, poddawane są sterylizacji radiacyjnej i w efekcie właśnie tego procesu dochodzi do powstania rodników. To właśnie do określenia ilości i do identyfikacji tych rodników, zwłaszcza trwałych, wykorzystuje się spektroskopię EPR w połączeniu z na przykład techniką Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR), co ułatwia określenie centrów paramagnetycznych. Ważny tu jest skład polimeru, a także jego skala przemiany, ponieważ od tego zależy ilość i rodzaj centrów paramagnetycznych. Kiedy polimer nie uległ przemianie widmo EPR nie jest zależne od rodzaju emitowanego promieniowania, natomiast w przeciwnej sytuacji przy promieniowaniu gamma obserwuje się większą ilość rodników niż przy promieniowaniu typu beta. W związku z tym ważne jest kontrolowanie stosowanych dawek w sterylizacji z użyciem promieniowania elektromagnetycznego przy pomocy dozymetrii EPR, ponieważ ilość rodników powstałych w procesie może wpływać na aktywność biologiczną leku. Jak ogólnie wiadomo przy procesach metabolicznych zachodzących w organizmie, dochodzi do powstania krótko żyjących rodników. To właśnie tu wykorzystana może zostać spektroskopia EPR do rejestracji tychże powstających rodników, dzięki wykorzystaniu pułapek spinowych, a więc za pomocą wykorzystania związków nieparamagnetycznych, które tworzą z rodnikami kompleksy spinowe. Tak można między innymi badać stres oksydacyjny powstały pod wpływem spożycia alkoholu czy też można wykryć i zidentyfikować wolne rodniki powstające pod skórą na skutek promieniowania UV [4].

### **3.4. Wykorzystanie spektroskopii w bliskiej podczerwieni NIRS**

Ogólnie znanym problemem, który dotyka coraz większą rzeszę ludzi (badania epidemiologiczne wskazują na 3-10% grupę z całej populacji z tendencją wzrostową 15-20% społeczeństwa powyżej 70 r.ż.) jest przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych (PNKD). Jest to zwyrodnienie spowodowane złym dotlenieniem mięśni poprzez ich słabe ukrwienie. W diagnostyce tego typu schorzenia pomocna okazuje się technologia spektroskopowa NIRS. W odróżnieniu od metod diagnostycznych, które pomagają tylko w ocenie morfologii czy też ocenie przepływu krwi przez naczynie tętnicze lub też jak w badaniu metodą z wykorzystaniem lasera Dopplera - oceniają mikrokrążenie wierzchnich tkanek, tak metoda spektroskopii w bliskiej podczerwieni jest w stanie zmierzyć zawartości utlenowanej hemoglobiny także w głębokich tkankach. Metoda NIRS jest bezinwazyjna, używana od lat 80. XX wieku, nie wywołuje powikłań, a po połączeniu z testem okluzyjnym, możliwe jest wywołanie niedokrwienia kończyny, takie samo jak w trakcie chromania przestankowego. Możliwe jest określenie zużycia tlenu w tkankach, ocena metabolizmu tkankowego czy też ocena prawidłowo zachodzącego mikrokrążenia [5].

Technologia NIRS została po raz pierwszy opisana w 1977r przez Jobsisa. Jest to znana aczkolwiek niezbyt rozpowszechniona w użyciu bezinwazyjna metoda pozwalająca na ocenę stopnia jak i określenia postępu wysycenia tlenem tkanek organizmu. Spektroskopia w bliskiej podczerwieni jest łatwą i bezinwazyjną dla pacjenta metodą badawczą. Ułatwia znacznie ocenę leczenia i jego skuteczności po operacji w sposób obiektywny [5].

### **3.5. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (MR)**

Jedną z technik spektroskopii absorpcyjnej jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. To technika mająca zastosowanie w wielu dziedzinach w tym i w medycynie (tomografia). Ten rodzaj spektroskopii pozwala określić strukturę, właściwości oraz ułożenie w przestrzeni, atomów cząsteczek lub też tkanek [6].

W medycynie spektroskopia rezonansu magnetycznego jest narzędziem służącym do określenia stężenia konkretnych związków w wybranym narzędziu. Głównie ma to znaczenie przy badaniu unaczynienia w OUN. W wyniku badania otrzymywane jest widmo z maksimami, a każdemu z nich przypisana jest konkretna substancja. Na podstawie wyników takiego badania, można określić stężenie substancji występujących w mózgu oraz stwierdzić czy nadmiar lub też brak konkretnych związków w danej części mózgu jest prawidłowy, mieści się w normie czy też świadczy o zachodzeniu procesów patologicznych. Badanie spektroskopowe

tkanki mózgowej może pomóc w postawieniu diagnozy u chorych z udarem mózgu, guzami jak i innymi licznymi schorzeniami, a na podstawie uzyskanych wyników można pośrednio ocenić rokowania i przebieg dalszego procesu leczenia [7].

Technika spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, nuclear magnetic resonance) jest wykorzystywana między innymi przy projektowaniu leków czyli na przykład do poszukiwania ich nowych struktur i określenia mocy wiązania się liganda do receptora. W dziedzinach nauk medycznych istotną rolę przypisuje się metodzie MRI czyli obrazowaniu rezonansem magnetycznym (magnetic resonance imaging). Metoda ta pozwala na zobrazowanie dowolnej płaszczyzny z przekroju ciała [8].

Spektroskopia ta, ma bardzo ciekawe zastosowanie w połączeniu jej z techniką CP-MAS (cross polarization magic angle spinning) służąc do badania składu chemicznego kości. Oznacza to, że ta technologia umożliwia rejestrowanie i analizowanie otrzymanych widm w fazie stałej. Spektroskopia NMR może być wykorzystana do badania mięśni gładkich, a konkretnie ich metabolizmu jak i również do badań diagnostycznych mięśnia sercowego w stanie hipoksji dzięki życiu pierwiastków izotopowych różnego rodzaju w tym m.in.  $^1\text{H}$  czy też  $^{31}\text{P}$  [8].

U osób dotkniętych chorobą popromienna ten rodzaj spektroskopii może zostać wykorzystany przy badaniach moczu i krwi. W tym wypadku metodą NMR można określić czas, który minął u chorego od chwili napromieniowania, dzięki określeniu zmian zachodzących w stężeniach związków charakterystycznych dla różnych etapów tej choroby [8].

Coraz częściej także w neuroradiologii używana jest technika spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS). W tej technice analizowane są metabolity tkankowe, których łącznie do tej pory rozpoznawanych jest około 80 metodą spektroskopii MR jednak do analiz wykorzystuje się ok. 15 z nich. Spektroskopia rezonansu magnetycznego ma bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych, niedokrwiennych, zapalnych, neurodegeneracyjnych, dysplazji korowych, heterotopii i wielu innych. Spektroskopia rezonansu magnetycznego jest coraz częściej używana do badań pacjentów z padaczką częściową jak i padaczką uogólnioną. U pacjentów z padaczką objawową, diagnoza odgrywa dużą rolę, ponieważ jest ona następstwem zmian w ośrodkowym układzie nerwowym takich jak guzy pierwotne, ropnie mózgu, czy np. zmiany zapalne. U pacjentów z padaczką uogólnioną spektroskopia rezonansu magnetycznego wykonywana jest w celu zidentyfikowani przyczyny tej padaczki, a więc zaburzeń metabolicznych w tkance nerwowej. Dla przykładu w padaczce skroniowej ze stwardnieniem hipokampa (MTLE), która jest padaczką częściową, zaobserwowano różne stężenia metabolitów w obrębie hipokampu w analizie MRS, a także



w badaniu wolumetrycznym – różną objętość struktur hipokampu. To właśnie spektroskopia rezonansu magnetycznego pomaga określić właściwe umiejscowienie ogniska padaczkorodnego i skwalifikować do zabiegu. Spektroskopia MR jest także przeprowadzana u pacjentów z uogólnionymi padaczkami np. młodzieńczą padaczką z napadami nieświadomości (JAE), czy też młodzieńczą padaczką miokloniczną (JME). Dane literaturowe donoszą, że po przeprowadzeniu badań stwierdza się, że u pacjentów z JME zarejestrowany jest spadek N-acetyloasparginianu w polu płatów czołowych, natomiast u pacjentów z JAE w obszarze wzgórz zarejestrowano znaczne zmniejszenie stosunku N-acetyloasparginianu do chromu, w porównaniu z grupą kontrolną. Spektroskopia MR jak donosi literatura, nie jest wyłącznie wykorzystywana w diagnostyce miejsca ogniska padaczkowego, ale może już także posłużyć do monitorowania postępów w leczeniu padaczki tak i chirurgicznie jak i farmakologicznie. Jest możliwe dzięki obserwacji zachodzących zmian w ilości metabolitów porównując wyniki sprzed jak i po czy w trakcie trwania terapii [9].

### **3.5.1. Spektroskopia protonowa HMRS**

Spektroskopia protonowa HMRS (proton [hydrogen] MR spectroscopy) używana jest do diagnostyki zmian wewnątrzczaszkowych znacznie częściej niż spektroskopia fosforowa. Jak już wspomniano, przeanalizowanie składu chemicznego tkanek jest możliwe do uzyskania za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS, magnetic resonance spectroscopy). Odbywa to się dzięki przesunięciu chemicznej częstotliwości drgań, która jest cechą charakterystyczną dla określonych produktów metabolizmu. Metabolity te, dzięki temu badaniu można zidentyfikować i dokładnie określić ilościowo. Klinicznie do tego typu zmian patologicznych stosowane są dwie metody spektroskopowe. Technika pojedynczego woksela SVS (Single Voxel Spectroscopy), a także metodę polecaną do oceny guzów wewnątrzczaszkowych, tzw. technikę przesunięcia chemicznego CSI (chemical shift imaging) zwaną inaczej wielowoselową (multivoksel). W wyniku takiego badania otrzymujemy widmo spektroskopowe, a metabolity oceniane w tym badaniu to m.in. kreatyna (energetyczny marker komórki), N-acetyloasparginian (wskaźnik aksonów), mioinozytol (marker gleju astrocytarnego), cholina (wskaźnik metabolizmu mielin i błon komórkowych), mleczany (markery glikolizy beztlenowej a także martwicy), lipidy (występują, gdy dochodzi do rozpadu błony komórkowej lub do martwicy). Interpretacja wyniku polega na zanalizowaniu uzyskanych wyników i obliczeniu stosunku metabolitów. Stopień złośliwości guzów opiera się więc na porównaniu stężeń metabolitów w obszarach patologicznych z obszarami uznanymi za zdrowe

w drugiej półkuli. Uznano zatem na tej podstawie, że im większe stężenie choliny, a przy tym występowanie mleczanów i lipidów oraz niższe stężenie N-acetyloasparginianu tym wyższy jest stopień zaawansowania złośliwości nowotworu. Dzięki metodzie spektroskopii można zróżnicować guzy mózgu na konkretne rodzaje poprzez widma spektralne i tak na przykład widmo z maksimami mleczanu i alaniny z wysokim prawdopodobieństwem wskazują, iż badacz ma do czynienia z oponiakami [10].

#### **4. Podsumowanie**

Metody spektroskopowe można podzielić ogólnie ze względu na rodzaj emitowanego promieniowania na radiospektroskopowe oraz na spektroskopowe. Do technik spektroskopii zalicza się spektroskopie: optyczną, neutronową, mikrofalową, rentgenowską, promieniowania  $\gamma$ , promieniowania  $\alpha$ , promieniowania  $\beta$  [11].

W niniejszej pracy opisane zostało m.in. zastosowanie spektroskopii w podczerwieni. Ten rodzaj spektroskopii dzieli się na: podczerwień bliską NIR (near infrared), środkową MIR (mid infrared) i daleką FIR (far infrared). Poruszony został temat spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) na przykładzie identyfikacji różnych mikroorganizmów jak i do badania i analizy wiązań wodorowych w hydrożelach. Po krótko omówiona została także, spektroskopia elektronowego spinowego rezonansu (EPR) inaczej zwana spektroskopią elektronowego rezonansu paramagnetycznego polegająca na pochłanianiu promieniowania elektromagnetycznego o określonej częstotliwości. Najwięcej uwagi poświęcono jednak najczęściej wykorzystywanej w medycynie i farmacji metodzie spektroskopowej jaką jest spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS).

MRS to technika wykorzystywana powszechnie głównie w chorobach mózgu i zwyrodnieniach układu nerwowego takich jak m.in.: nowotwory, padaczki, schizofrenia, choroba Alzheimera i wiele innych. Spektroskopia rezonansu magnetycznego umożliwia monitorowanie zmian metabolicznych zachodzących w tkankach a przez to określenie skuteczności wykorzystywanej w leczeniu terapii.

## Literatura

1. Dziuba B. *Identyfikacja wybranych gatunków i podgatunków bakterii z rodzaju Lactococcus z zastosowaniem spektroskopii FTIR i sztucznych sieci neuronowych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6 (2012), s. 103-117
2. Pielesz A., Biniś D., Wieczorek J., *FT-IR spectroscopic analysis in monitoring of hydroxyl stretching vibrations in plant hydrogels*, Polimery w Medycynie, 4 (2011), s. 33-42
3. Kwiatek S., Kawczyk-Krupka A., Latos W., Synakiewicz E., Stołtny D., Kościarz-Grzesiok A., Cieślak G., Sieroń A., *Spektroskopia fluorescencyjna w diagnostyce raka podstawnomórkowego skóry oraz leukoplakii jamy ustnej*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica 4 (2008), s. 219-223
4. Zawada K., *Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie*, Farmacja Polska, 65 (2009), s. 224-228
5. Krosny T., Dąbek P., Staszkiwicz W., Lewszuk A., *Ocena zaburzeń ukrwienia u pacjentów z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych za pomocą analizy NIRS (spektroskopia w bliskiej podczerwieni)*, Postępy Nauk Medycznych 8 (2012), s. 628-635
6. <http://laboratoria.net/download/Artyku%C5%82y/Spektroskopia%20magnetycznego%20rezonansu%20j%C4%85drowego%20-%20wprowadzenie.pdf>
7. [http://www.radiologia24.pl/spektroskopia\\_rezonansu\\_magnetycznego.htm](http://www.radiologia24.pl/spektroskopia_rezonansu_magnetycznego.htm)
8. Jodłowska E., Myka A., Adamus J., Czaja K., Drabińska B., Popielarska H., Kruk J., *NMR w nowoczesnej farmacji i medycynie - znaczenie i przykłady wykorzystania*, Farmacja Polska, 69 (2013), s. 188-195
9. Michalska J., Kociemba W., Steinborn B., Stajgis M., Paprzycki W., *Rola spektroskopii rezonansu magnetycznego w padaczce*, Neurologia dziecięca, 17 (2008), s. 61-64
10. Czarnecka A., Zimny A., Szewczyk P., *Zaawansowane techniki rezonansu magnetycznego w diagnostyce guzów wewnątrzczaszkowych*, Polski Przegląd Neurologiczny 6 (2010), s. 27-37
11. Dębczak A., Ryczkowski J., *Spektroskopia IR w badaniach adsorbentów i katalizatorów*, Nauka dla Gospodarki, 2 (2012), s. 175-203

## **Przegląd spopularyzowanych i najczęściej stosowanych metod spektroskopowych w dziedzinach nauk medycznych i farmaceutycznych**

### Streszczenie

Metody spektroskopowe są ogólnie i powszechnie wykorzystywane w różnych dziedzinach nauki, w tym także w farmacji medycynie i biotechnologii. Spektroskopia optyczna pozwala zidentyfikować zarówno ilościowo jak i jakościowo, różnego rodzaju związki chemiczne. Jest to istotna cecha, ze względu na fakt, że to od budowy chemicznej związku, zależy jego oddziaływanie na organizm ludzki. Rezonansowa spektroskopia Ramanowska (RS, Spektroskopia Ramana) z wysoką wydajnością służy do analizy ciał stałych, cieczy i gazów. Spektroskopia elektronowego spinowego rezonansu odgrywa istotną rolę w badaniu mechanizmu działania leków jak i także w badaniu ich toksyczności. Natomiast spektroskopia rezonansu magnetycznego przyczynia się w głównej mierze do diagnozowania, monitorowania i określania zmian zachodzących głównie w ośrodkowym układzie nerwowym.

Słowa kluczowe: Spektroskopia, Spektroskopia Rezonansu Magnetycznego, Widmo

## **An overview of the popularized and most commonly used spectroscopic methods in the fields of medical and pharmaceutical sciences**

### Abstract

The spectroscopic methods are generally and commonly used in various branches of science, for example in pharmacy, medicine and biotechnology. The optical spectroscopy allows to identify different chemical compounds when it comes to their amount and quality. It is a significant feature because the chemical structure of a compound influences its impact on an organism. The Raman spectroscopy with high efficiency is used to analyze the solids, liquid and gas. The Electron Paramagnetic Resonance Has a significant role when it comes to studying the mechanism of drug actions and in studying their toxicity. The magnetic resonance spectroscopy contributes to the diagnosis, monitoring and determination of the changes in the central nervous system.

Keywords: Spectroscopy, Spectrum, Magnetic Resonance Spectroscopy

## **Metoda sieciowania włókien kolagenowych w terapii schorzeń rogówki – zastosowanie i skuteczność kliniczna**

### **1. Wstęp**

W ostatnich latach zwrócono uwagę na możliwość zastosowania sieciowania włókien kolagenowych rogówki przy użyciu promieniowania UVA w terapii schorzeń rogówki przebiegających z jej ścięciem. Celem niniejszej pracy jest przegląd aktualnych protokołów zabiegowych, zastosowania oraz skuteczności klinicznej wspomnianej procedury.

### **2. Budowa rogówki**

Rogówka jest wypukłą, przezroczystą warstwą zewnętrzną przedniej części gałki ocznej leżącą do przodu od źrenicy. Rogówka wchodzi w skład układu optycznego oka, będąc pierwszym oraz posiadającym największą moc łamiącą (skupiającą) elementem tego układu. Prawidłowa rogówka ma około 11mm średnicy. Grubość rogówki waha się w granicach od 0,7-0,8mm na obwodzie oraz od 0,4-0,5mm w centrum. Prawidłową rogówkę cechuje fizjologiczny astygmatyzm, czyli różnica pomiędzy mocą skupiającą dwóch głównych południków (90° i 180°). Wartość astygmatyzmu fizjologicznego nie przekracza 0,5 dioptrii cylindrycznych (Dcyl). Histologicznie rogówka składa się z 6 warstw, rozpoczynając od najbardziej powierzchniowej warstwy nabłonka rogówki a kończąc na najbardziej wrażliwej, położonej wewnątrz i niezdolnej do regeneracji, pojedynczej warstwie komórek śródbłonka. Warstwa środkowa rogówki, czyli zrąb rogówki, składa się na 90% grubości całej tkanki i zbudowany

---

<sup>1</sup> kurzak.ewa@gmail.com; Uniwersyteckie Centrum Okulistyki i Onkologii, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 5 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Klinika Okulistyki Katedry Okulistyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, www.sum.edu.pl

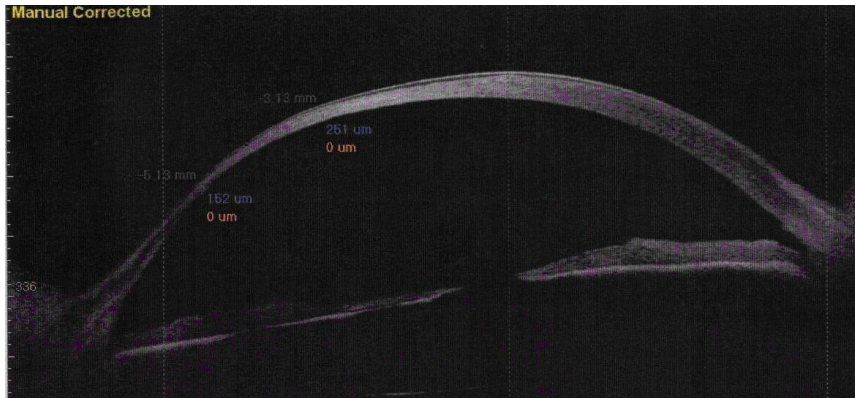
<sup>2</sup> pkucharzewski@yahoo.com; Uniwersyteckie Centrum Okulistyki i Onkologii, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 5 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, szpitalceglana.pl

<sup>3</sup> mrukwa@szpitalceglana.pl; Uniwersyteckie Centrum Okulistyki i Onkologii, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 5 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Klinika Okulistyki Katedry Okulistyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, www.sum.edu.pl

jest z około 200-400 warstw włókien kolagenowych typu I oraz V z rozszanymi pomiędzy nimi keratocytami. Na grubość rogówki wpływa także stopień uwodnienia, co jest szczególnie widoczne w obrzęku rogówki. Rogówka nie posiada naczyń krwionośnych, jest natomiast szczególnie dobrze unerwiona czuciowo.

### 3. Choroby rozstrzeniowe rogówki

Ektazje, czyli choroby rozstrzeniowe rogówki to grupa rzadkich chorób wrodzonych o niejasnym sposobie dziedziczenia, których wspólną cechą jest patologiczne ścieńczenie i uwypuklenie rogówki skutkujące narastającym astygmatyzmem krótkowzrocznym, a co za tym idzie spadkiem ostrości wzroku. Do ektazji zaliczamy m.in. stożek rogówki, zwyrodnienie brzeżnie przezroczyste rogówki, rogówkę kulistą [2]. Wyróżnić można także ektazje nabyte, czyli jatrogenne występujące m.in. jako powikłanie laserowej korekcji wzroku[3].



Rysunek 1. Stożek rogówki w badaniu ultrasonograficznym przedniego odcinka oka [materiał własny]

Stożek rogówki [Rys.1.] jest najczęstszą i najlepiej poznaną ektazją rogówki. Występuje z częstością około 1/2000 osób, z czego około 10% przypadków ma podłoże rodzinne. Stożek rogówki występuje stosunkowo często w takich chorobach genetycznych jak zespół Downa, zespół Marfana czy wrodzona łamliwość kości. Choroba objawia się zwykle obuocześnie, z synchroniczną manifestacją objawów co następuje zwykle przed ukończeniem przez chorego drugiej dekady życia. Chory skarży się na postępujący spadek ostrości wzroku będący efektem narastającego astygmatyzmu. Dokładne podłoże choroby nie jest znane [4]. W badaniach biochemicznych skrawków rogówek stwierdzono m.in. niskie stężenie oksydazy lizylowej, enzymu odpowiedzialnego za fizjologiczny proces sieciowania kolagenu. W aspekcie mechanicznym stożek rogówki

charakteryzuje zmniejszona sztywność. Dodatkowo w przeciwieństwie do rogówki prawidłowej, w której ciśnienie wywierane jest na płaszczyznę rogówki równomiernie, w przypadku stożka punkt maksymalnego ciśnienia umiejscowiony jest w pierścieniu ścięczenia. Leczenie dobierane jest indywidualnie [5]. W początkowych stadiach wystarczająca jest korekcja okularowa, następnie stosowane są twarde, modelowane soczewki kontaktowe. Kolejnym krokiem są metody operacyjne wliczając w to sieciowanie włókien kolagenowych (ang. *collagen cross-linking CXL*), pierścienie śródrogówkowe, a w ostateczności przeszczep rogówki.

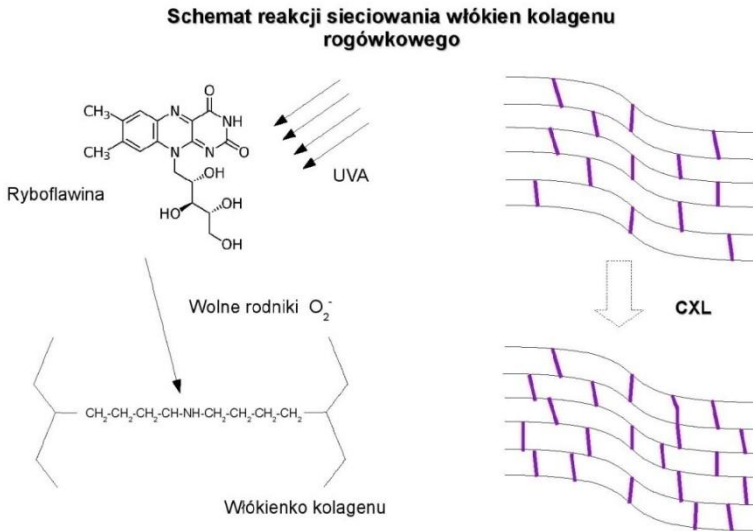
#### **4. Sieciowanie włókien kolagenowych rogówki**

Sieciowanie polimerów oznacza wytworzenie wiązań kowalencyjnych bądź jonowych pomiędzy sąsiadującymi ze sobą łańcuchami polimerów np. białek. Sieciowanie polimerów zarówno występujących w materiałach organicznych jak i sztucznych jest wykorzystywane od lat m.in. w stomatologii czy bioinżynierii przy produkcji klejów tkankowych.

Pierwsze badania nad zastosowaniem CXL w okulistyce prowadził Wollensak i wsp. z Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie począwszy od 1990 roku. Założenia metody opierały się na spostrzeżeniu, że stożek rogówki występuje znacznie rzadziej w populacji ludzi starszych, zwłaszcza obciążonych wywiadem diabetologicznym. Założono, że przyczyną takiej sytuacji jest postępujący z wiekiem proces glikozylacji oraz utleniania elementów składowych zrębu rogówki, przede wszystkim włókien kolagenu rogówkowego [6]. Postanowiono sztucznie odtworzyć ten proces w kontrolowanych warunkach, zamykając proces trwający latami w ograniczonej czasowo jednorazowej procedurze.

Początkowe protokoły procedury CXL bazowały wyłącznie na wykorzystaniu promieniowania UVA o długości fali 370nm celem wytworzenia dodatkowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy sąsiadującymi włóknami kolagenowymi. Promieniowanie generowane było przez specjalną lampę zawierającą szereg diod. Jednak już pierwsze badania efektywności zabiegu w warunkach *in vitro* wykazały przenikanie promieniowania UVA poza rogówkę. Jedyne około 30% energii promieniowania absorbowane było przez rogówkę, podczas gdy leżąca za nią soczewka pochłaniała około 50% energii co stanowiło poważne ryzyko powikłań soczewkowych w postaci zaćmy wtórnej [7]. Protokół uzupełniono więc o poprzedzający naświetlanie etap wysycenia rogówki substancją światłoczułą celem zintensyfikowania absorpcji rogówkowej. W tym celu wykorzystano ryboflawinę, inaczej witaminę B2. Pod wpływem UVA ryboflawina osiąga stan wzbudzenie i generuje powstanie wolnych rodników oraz tlen singletowy w zależności od dostępności tlenu,

które następnie stymulują wytwarzanie wiązań kowalencyjnych pomiędzy aminokwasami włókien kolagenowych. Dodatkowo ryboflawina działa jako niezależna, fizyczna bariera rogówki. Tak powstał pierwszy protokół CXL zwany protokołem drezdeńskim [8][Rys.2.].



Rysunek 2. Schemat zabiegu CXL [opracowanie własne]

W formie ostatecznej protokół drezdeński zapewnia retencję około 95% energii promieniowania na poziomie rogówki. Pomiędzy nabłonkiem a śródbłonkiem rogówki obserwuje się około 20-krotny spadek natężenia promieniowania z początkowych  $3\text{mW/cm}^2$  do  $0,15\text{mW/cm}^2$  [9]. Takie natężenie jest wartością około dwukrotnie niższą od dawki bezpiecznej dla komórek śródbłonka, którą Wollensak i wsp. określili na  $0,36\text{mW/cm}^2$  [10]. Oznacza to, że wrażliwe struktury gałki ocznej nie zostają narażone na szkodliwe promieniowanie.

Protokół drezdeński – etapy:

1. Znieczulenie miejscowe (roztwór proksymetakainy);
2. Usunięcie centralnych 7-9mm nabłonka rogówki;
3. Kontrolna pachymetria (dolna granica grubości rogówki  $400\mu\text{m}$ );
4. Aplikacja 0,1% roztworu ryboflawiny w 20% dekstranie powtarzana co 5 minut przez kolejne 30 minut [Rys.3.];



5. Naświetlanie rogówki promieniowaniem UVA (370 nm,  $3\text{mW}/\text{cm}^2$ ) przez kolejne 30 minut z ciągłą aplikacją roztworu ryboflawiny co 5 minut [Rys.4.];
6. Podanie miejscowego antybiotyku i założenie opatrunkowej, miękkiej soczewki nagałkowej.



Rysunek 3. Aplikacja ryboflawiny na rogówkę pozbawioną nabłonka [materiał własny]  
oraz Rysunek 4. Naświetlanie rogówki promieniowaniem UVA [materiał własny]

Postępowanie pozabiegowe skupia się na profilaktyce zakażeń. Przez 7 dni po zabiegu stosuje się antybiotyki miejscowe. Soczewkę opatrunkową zakłada się w celu przyspieszenia odbudowy warstwy nabłonka rogówki i tym samym zmniejszenia dolegliwości bólowych pacjenta. Soczewkę taką usuwa się około 3-4 dnia po zabiegu pod warunkiem całkowitej reepitelializacji. Następnie stosuje się sterydoterapię miejscową, której dawkę stopniowo zmniejsza się do całkowitego odstawienia leku po 6-8 tygodniach.

Wskazaniem do zabiegu sieciowania jest brak możliwości korekcji wady za pomocą szkieł okularowych lub twardych soczewek kontaktowych co prowadzi do szybko narastającego astygmatyzmu lub/ oraz nietolerancji soczewek kontaktowych przez pacjenta. Poza kryterium progresji astygmatyzmu istnieją jeszcze wskazania dotyczące wieku pacjenta. VII Międzynarodowy Kongres CXL ustalił następujące kryteria kwalifikacyjne do zabiegu CXL w przypadku stożka rogówki: kwalifikacji podlega każdy pacjent poniżej 27 roku życia. Jeśli pacjent przekroczył 27 rok życia zaleca się obserwacje pod kątem progresji choroby [11].

## 5. Efekty kliniczne zabiegu CXL

Bezpośrednio po zabiegu ostrość wzroku pacjentów poddanych zabiegowi CXL ulega przejściowemu obniżeniu głównie ze względu na pozabiegowy obrzęk rogówki. Ostrość wzroku zwykle wraca do wartości wyjściowych po kilku, kilkunastu miesiącach. Nieznacznej poprawie ulegają natomiast wartości keratometrii i refraktometrii, tj. obserwowane jest spłaszczenie południków astygmatyzmu. Przed wszystkim jednak obserwowane jest trwałe zahamowanie progresji choroby potwierdzone kilkuletnimi obserwacjami chorych [12]. Usztywnienie rogówki wzrasta o około 300% [13], co jest skutkiem zwiększenia średnicy włókien kolagenowych oraz ich reorganizacji w prawidłowe przestrzenne układy.

Jak wynika z poniższej tabeli [Tab. 1.] ostrość wzroku pacjentów poddanych zabiegowi CXL w około dwuletnich obserwacjach poprawia się średnio o jedną linijkę w logarytmicznej skali ostrości wzroku [14, 15, 16].

Tabela 1. Zestawienie wyników trzech badań prospektywnych dotyczących chorych z zaawansowanym stożkiem rogówki poddanych zabiegowi CXL

Badanie	Liczba oczu	Wyniki
Viswanathan i Males. 2013	76	Poprawa Kmax* o 0,96+/-2,33D Poprawa logMAR BCVA** o 0,05+/-0,13
Hersh i wsp. 2011	71	Poprawa Kmax* o 1,7+/-3,9D Poprawa logMAR BCVA** o 0,12+/-0,23
Lamy i wsp. 2013	68	Poprawa Kmax* o 0,61D Poprawa logMAR BCVA** o 0,16

\*Kmax – maksymalna wartość keratometrii; \*\*logMAR BCVA – najlepsza skorygowana okularami ostrość widzenia oceniana w logarytmicznej skali ostrości wzroku [opracowanie własne]

Zabiegom CXL poddawani są najczęściej chorujący na stożek rogówki. W przypadku innych ektazji tj. zwyrodnienia brzeżnego przezroczystego, mała liczba chorych uniemożliwia przeprowadzenie dużych badań prospektywnych. Z uzyskanych jak dotąd danych wynika jednak, że zabieg sieciowania nie jest w tej grupie równie efektywny. Progresja choroby ulega co prawda zahamowaniu jednak nie obserwuje się wpływu CXL na wymienione powyżej parametry. Niektórzy badacze postulują, że może być to efektem maksymalnego działania wiązki promieniowania w obrębie

centralnej części rogówki, podczas gdy patologiczne ścięczenie tkanki w zwyrodnieniu brzeżnym przezroczystym lokalizuje się głównie na obwodzie rogówki [17].

## **6. Alternatywne protokoły CXL**

Protokół drezdeński zawiera etap polegający na mechanicznym usunięciu rogówki. Ma to na celu ułatwienie przenikania ryboflawiny w obszar zrębu rogówkowego. Usunięcie nabłonka wiąże się jednak z większym ryzykiem powikłań takich jak zakażenie i pooperacyjny ból. Badaniom poddano protokoły pomijające ten etap zabiegu, pozostawiające nienaruszony nabłonek. Taka wersja CXL nosi potoczną nazwę „epi-ON” w przeciwieństwie do standardowego protokołu czyli „epi-OFF”. Pozostawienie nienaruszonego nabłonka skutkowało zmniejszeniem pooperacyjnego obrzęku rogówki oraz odczuwalnego bólu. Wartości keratometrii i ostrości wzroku wykazywały duże wahania w zależności od badania. Część prac wykazała powrót do wyjściowych wartości opisywanych parametrów, niektóre nawet ich pogorszenie. W swojej pracy Hafezi wykrył, że stężenie ryboflawiny w procedurze „epi-ON” jest około 40-krotnie niższe [18], co potwierdzało wcześniejsze obserwacje Wollensak i wsp. dotyczące zmniejszonego o 20% efektu biomechanicznego przy zachowanym nabłonku [19]. W kolejnych próbach zastosowano szereg metod mających na celu zwiększanie penetracji ryboflawiny tj. wykorzystanie roztworu EDTA czy elektroforezę. Jak dotąd najbardziej obiecującym wydaje się zastosowanie hipoosmolarnego roztworu ryboflawiny z 0,44% NaCl [20].

Natężenie promieniowania (gęstość mocy promieniowania) o wartości  $3\text{W}/\text{cm}^2$  w czasie 30min skutkuje całkowitą dawką pochłoniętej energii o wartości  $5,4\text{ J}/\text{cm}^2$ . Prawo wzajemności Bunsen-Roscoe zakłada, że sumaryczna wartość energii pochłoniętej pozostanie taka sama jeśli wartości natężenie promieniowania oraz czasu ekspozycji ulegną odwrotnie proporcjonalnej zmianie tzn. przy skróceniu czasu naświetlania z jednoczesnym zwiększeniem natężenia sumaryczna dawka pochłoniętej energii pozostanie niezmienną. Mimo, że prawo to oparte jest na modelach materiałów sztucznych, zostało ono wykorzystane przy opracowywaniu kolejnych protokołów, przyspieszonych i ultraszybkich.

Wykazano, że sztywność rogówki wzrasta wraz z rosnącym natężeniem promieniowania aż do wartości  $45\text{mW}/\text{cm}^2$  [21]. Powyżej tego pułapu nie zaobserwowano dalszego wzrostu usztywnienia.

W jednym z najnowszych badań dotyczących przyspieszonych protokołów CXL Taneri i wsp. opisali sześć różnych typów zabiegów ze względu na użyty roztwór ryboflawiny, czas ekspozycji oraz natężenie

promieniowania [22]. Najlepszymi wynikami charakteryzowała się grupa 5., poddana krótkiemu dwuetapowemu protokołowi z użyciem roztworów ParaCel i VibeX Xtra z około trzy minutowym czasem naświetlania, w której nie obserwowano niewydolności śródbłonna oraz bólu pooperacyjnego. Jedynie w przypadku pacjentów z pierwszej grupy wykazano mniejsze (0 przypadków) ryzyko uszkodzenia śródbłonna jednocześnie stwierdzając mniejszą penetrację roztworu ryboflawiny w tej grupie, co potencjalnie może wiązać się z gorszymi efektami końcowymi. Należy zaznaczyć, że były to obserwacje krótkoterminowe, niepozwalające na wykluczenie mniej korzystnych efektów długoterminowych w porównaniu z protokołem standardowym.

## **7. Nowe zastosowania metody sieciowania włókien kolagenowych**

Innymi wskazaniami do zabiegu CXL są zabiegi łączone. Polegają one na jednoczasowym lub dwuetapowym przeprowadzeniu CXL oraz metody chirurgicznej już stosowanej w terapii stożka rogówki, mowa tu przede wszystkim o śródrogówkowych obręczach oraz chirurgii fotorefrakcyjnej tj. protokół Ateński [23]. Zabiegi te mają na celu natychmiastowe zmniejszenie wartości patologicznego astygmatyzmu u chorych, nie są jednak w stanie zatrzymać progresji zmian. Zabieg CXL został wprowadzony jako udoskonalenie powyższych metod, zapewniając utrwalenie efektów.

Poza obszarem chorób rozstrzeniowych zabiegi sieciowania kolagenu znalazły zastosowanie w terapii chorób infekcyjnych, owrzodzeń chemicznych rogówki oraz patologii przebiegających z obrzękiem rogówki. W aspekcie chorób infekcyjnych wywołanych przez bakterie udowodniono antybakteryjne działanie ryboflawiny oraz promieniowania UVA [24]. Dodatkowo sieciowanie kolagenu sprawia, że rogówka staje się bardziej oporna na rozkład enzymatyczny (stymulowany przez enzymy bakteryjne). Niestety podobnych wyników nie udało się uzyskać w obserwacjach zakażeń grzybiczych. Zabieg CXL poprzez wzmocnienie struktury włókien kolagenowych zwiększa również oporność rogówki na obrzęk. Dotychczasowe badania wykazały jednak, że efekt ten jest tymczasowy i utrzymuje się około trzech miesięcy po CXL [25].

## **8. Podsumowanie**

Zabieg sieciowania włókien kolagenu rogówkowego jest stosunkowo nową procedurą stosowaną przez okulistów przede wszystkim w terapii chorób rozstrzeniowych rogówki. Wprowadzenie zabiegu CXL umożliwiło zaproponowanie wielu chorym rozwiązania alternatywnego do przeszczepu rogówki, będącego jednocześnie procedurą o wiele mniej obciążającą.

Wraz z kolejnymi badaniami prospektywnymi wiedza na temat potencjalnych korzyści i zagrożeń wynikających z CXL umożliwi lepsze dostosowanie poszczególnych rozwiązań do indywidualnych potrzeb każdego pacjenta.

## **Literatura**

1. Maurice D.M., *The structure and transparency of the cornea*. Journal of Physiology. 136 (1957), s. 263-286
2. Krachmer J.H., Feder R.S., Belin M.W., *Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders*. Survey of Ophthalmology. 28 (1984), s. 293-322
3. Randleman J.B. et al. *Risk factors and prognosis for corneal ectasia after LASIK* Ophthalmology. 110 (2003), s. 267-275
4. Rabinowitz Y.S., *Keratoconus*. Survey of Ophthalmology. 42 (1998), s. 297-319
5. Espandar L., Meyer J., *Keratoconus: Overview and update on treatment*. Middle East African Journal of Ophthalmology. 17 (2010), s. 15-20
6. Kamiy K. Shimizu, Ohmoto F., *Effect of aging on corneal biomechanical parameters using the ocular response analyzer*. Journal of Refractive Surgery. 25 (2009), s. 888-93
7. Spoerl E., Huhle M., Seiler T. *Induction of cross-links in corneal tissue*. Experimental Eye Research. 66 (1998), s.97-103
8. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T.. *Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus*. American Journal of Ophthalmology. 135 (2003), s. 620-627
9. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M. et al. *Endothelial damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit*. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 9 (2003), s. 1786-90
10. Wollensak G., Spoerl E., Reber F. et al. *Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro*. Ophthalmic Research. 35 (2003), s. 324-8
11. Shetty R., Nagaraja H., Jayadev C. et al. *Accelerated Corneal Collagen Cross-Linking in Pediatric Patients: Two-Year Follow-Up Results*. BioMed Research International. 2014 (2014)
12. Hashemi H., Seyedian M.A., MirafTAB M. et al. *Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet A irradiation for keratoconus: long-term results*. Ophthalmology 120 (2013), s.1515-1520
13. Knox Cartwright N.E., Tyrer J.R., Marshall J.. *In vitro quantification of the stiffening effect of corneal cross-linking in the human cornea using radial shearing speckle pattern interferometry*. Journal of Refractive Surgery. 28 (2012), s. 503-508
14. Viswanathan D., Males J.. *Prospective longitudinal study of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus*. Clinical and Experimental Ophthalmology. 41 (2013), s. 531-536
15. Hersh P.S., Greenstein S.A., Fry K.L. *Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results*. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 37 (2011), s. 149-60

16. Lamy R., Netto C.F., Reis R.G. . *Effects of corneal cross-linking on contrast sensitivity, visual acuity, and corneal topography in patients with keratoconus*. Cornea. 32 (2013), s. 591-6
17. Koller T., Schumacher S., Fankhauser F. 2nd et al. *Riboflavin/ultraviolet A crosslinking of the paracentral cornea*. Cornea. 32 (2013), s. 165-168
18. Hafezi F. . Paper: *CXL: Epithelium On or Off? CXL Congress 2012*.
19. Wollensak G., Iomdina E.. *Biomechanical and histological changes after corneal cross-linking with and without epithelial debridement*. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 35 (2009), s. 540-6
20. Raiskup F., Pinelli R., Spoerl E.. *Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking*. Current Eye Research. 37 (2012), s. 234-238
21. Hammer A., Richo O., Arba Mosquera S.. *Corneal Biomechanical Properties at Different Corneal Cross-Linking (CXL) Irradiances*. Investigative Ophthalmology. and Visual Science. 55 (2014), s. 52881-2884
22. Taneri S., Oehler S., Lytle G. et al. *Evaluation of Epithelial Integrity with Various Transepithelial Corneal Cross-Linking Protocols for Treatment of Keratoconus*. Journal of Ophthalmology. 2014 (2014)
23. Kanellopoulos A.J., Asimellis G.. *Keratoconus management: long-term stability of topography- guided normalization combined with high-fluence CXL stabilization (the Athens Protocol)*. Journal of Refractive Surgery. 30 (2012), s. 88-93
24. Iseli H.P., Thiel M.A., Hafezi F. et al. *Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts*. Cornea. 27 (2008), s. 590-594
25. Arora R., Manudhane A., Saran R.K. et al. *Role of corneal collagen cross-linking in pseudophakic bullous keratopathy: a clinicopathological study*. Ophthalmology. 120 (2013), s. 2413-2418
26. Spoerl E., Hoyer A., Pillunat L.E. et al. *Corneal Cross-Linking and Safety Issues*. The Open Ophthalmology Journal. 5 (2011), s. 14-16

## **Metoda sieciowania włókien kolagenowych w terapii schorzeń rogówki – zastosowanie i skuteczność kliniczna**

### **Streszczenie**

Sieciowanie włókien kolagenowych zostało wprowadzone do terapii chorób rogówki na przełomie mileniów. Założenia metody bazowały na obserwacji naturalnego procesu usztywniania się rogówki postępującego wraz z wiekiem pacjenta, a będącego skutkiem procesów oksydacyjnych zachodzących w zrębie rogówki. Sztuczne przyśpieszenie tego procesu stało się możliwe poprzez zastosowanie na odsłonięty zrąb rogówki roztworu fotouczulającej ryboflawiny (witamina B<sub>2</sub>) z jednoczasową ekspozycją tkanki na promieniowanie UVA. Ekspozycja taka powoduje absorpcję energii przez cząsteczki ryboflawiny i osiągnięcie przez nie stanu wzbudzonego. W stanie wzbudzonym ryboflawina generuje wolne rodniki tlenowe, które następnie stymulują wytwarzanie połączeń kowalencyjnych pomiędzy sąsiadującymi włóknkami kolagenowymi. Trwałość powstałych połączeń warunkuje efektywność zabiegu w terapii chorób rozstrzeniowych rogówki tj. schorzeń przebiegających ze ścięciem i zniekształceniem rogówki. Najliczniejszą grupą pacjentów kwalifikowanych do zabiegu sieciowania włókien kolagenowych są chorzy z rozpoznaniem i szybko postępującym stożkiem rogówki.

Efektem zabiegu jest zahamowanie progresji choroby, zmniejszenie wartości astygmatyzmu krótkowzrocznego oraz poprawa ostrości wzroku. W odpowiedzi na względną uciążliwość jednogodzinnego zabiegu, pierwotny protokół zabiegu stopniowo ewoluował. Redukcji uległ czas ekspozycji, co zostało zrównoważone zwiększeniem mocy promieniowania. Obecnie dostępne są protokoły krótkie oraz ultrakrótkie, w których cały zabieg zamyka się w czasie kilku minut. Dotychczasowe obserwacje pacjentów poddanych zabiegowi sieciowania włókien kolagenowych nie wykazały długofalowych skutków ubocznych zabiegu, przy założeniu prawidłowej kwalifikacji chorych. W ostatnich latach zwrócono uwagę na możliwość zastosowania sieciowania włókien kolagenowych w schorzeniach przebiegających z obrzękiem rogówki tj. keratopatia pęcherzowa, owrzodzenia czy infekcyjne zapalenia rogówki. Praca ta ma na celu przegląd aktualnych protokołów zabiegowych, zastosowania i skuteczności klinicznej zabiegu.

Słowa klucze: Sieciowania włókien kolagenu, stożek rogówki, ryboflawina, promieniowanie UVA

### **The method of collagen fibers cross-linking in the therapy of diseases of the cornea - application and clinical efficacy**

#### **Abstract**

Cross-linking of collagen fibers has been introduced for the treatment of diseases of the cornea at the turn of the millennia. Principle of the method was based on the observation of the natural process of progressive corneal stiffening with age as the effect of oxidation processes which occur in the corneal stroma. Artificial acceleration of this process became possible by the application to the exposed corneal stroma photosensitising solution of riboflavin (vitamin B2) with continuous tissue exposure to UV-A. The exposure results in the absorption of energy by molecules of riboflavin so to achieve their excited state. The riboflavin excited state generates free radicals, which then stimulate the production of covalent links between neighboring collagen fibrils. The durability of connections determines the effectiveness of the procedure in the treatment of ectatic diseases, ailments associated with thinning and distortion of the cornea. The largest group of patients eligible for cross-linking are those with diagnosed and progressive keratoconus. The treatment halts disease progression, reduces the value of myopic astigmatism and improves visual acuity. In response to the burdensome one hour long treatment, primary treatment protocol gradually evolved. Exposure time was reduced while radiation power increased. Currently available protocols are short and ultra - short, in which the whole procedure closes in a few minutes. To the date observations of patients undergoing the procedure of collagen cross-linking showed no long-term side effects of treatment, assuming a correct qualification of patients. In recent years, attention has been paid to the possibility of crosslinking extending into diseases characterized by corneal edema such as bullous keratopathy, ulcers or infectious keratitis. This work aims to provide an overview of current treatment protocols, the application and effectiveness of clinical treatment.

Key words: collagen cross-linking, keratoconus, riboflavin, UV-A

## Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej

### 1. Wstęp

Medycyna sądowa stanowi swoisty pomost łączący nauki medyczne i prawne. Najważniejszymi zadaniami tej fascynującej gałęzi medycyny jest próba ustalenia przyczyny zgonu oraz opiniowanie w sprawach karnych i cywilnych. Intensywny rozwój nauk przyrodniczych oraz technicznych spowodował wyodrębnienie się istotnych działów medycyny sądowej. Należą do nich między innymi: toksykologia sądowa, serohematologia sądowa oraz genetyka sądowa.

### 2. Rola i zadania toksykologii sądowej

Jedno z kluczowych pytań, jakie stawiają sobie specjaliści medycyny sądowej podczas analizy nagłych, nienaturalnych, niespodziewanych zgonów dotyczy obecności w organizmie denata substancji obcych, które mogłyby stać się pośrednią lub bezpośrednią przyczyną zgonu. Odpowiedzi na te i inne pytania są najważniejszą rolą toksykologii sądowej [1]. Dziedzina ta zajmuje się stwierdzaniem obecności różnych ksenobiotyków w organizmie denata bądź podejrzanego (*postmortem toxicology* lub *antemortem toxicology*) i ich identyfikacją. Analiza jakościowa pozwala na stwierdzenie obecności danego związku, a pomiar ilościowy na określenie wielkości przyjętej dawki ksenobiotyku. Należy jednak zaznaczyć, że kolejnym bardzo istotnym, a wręcz kluczowym zadaniem toksykologów sądowych jest właściwa interpretacja otrzymanych wyników badań laboratoryjnych. Z jednej strony muszą oni odpowiedzieć na pytania, jaki jest efekt biologiczny przyjęcia danej substancji, w jaki sposób została ona przyjęta, czy wykryta ilość może być dawką śmiertelną, a wreszcie czy dana substancja może mieć pochodzenie endogenne [2]. Z drugiej strony toksykolog sądowy musi mieć pewność wiarygodności uzyskanego wyniku

---

<sup>1</sup> martais91@onet.eu, Studenckie Koło Naukowe Analityki Sądowej i Chemii Kryminalistycznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, www.umed.wroc.pl

<sup>2</sup> olga.loska@umed.wroc.pl, Zakład Praktycznej Nauki Zawodu Analityka, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, www.umed.wroc.pl



oraz świadomość ewentualnych interferencji i błędów fazy przed-analitycznej [3].

### **3. Problematyka fazy przedanalizycznej w odniesieniu do badań toksykologicznych.**

W najnowszych rekomendacjach z zakresu diagnostyki laboratoryjnej wiele uwagi poświęca się wpływowi fazy przedanalizycznej na wynik badania laboratoryjnego. Towarzystwa naukowe różnych specjalności ujednolicają informacje na temat właściwego pobierania, transportu i przechowywania materiału biologicznego do badań laboratoryjnych [4]. Również w przypadku badań z zakresu medycyny sądowej dysponujemy zaleceniami Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w sprawie pobierania materiału sekcyjnego do badań toksykologicznych [5]. Normalizuje się również techniki dotyczące wykonywania pomiarów stężenia alkoholu i opiniowania w sprawach trzeźwości [6].

Niestety pomimo tych zaleceń faza przedanalizyczna wciąż okazuje się być dużym wyzwaniem współczesnej toksykologii sądowej. Należy podkreślić, że każdy fałszywy wynik badania laboratoryjnego może nieść za sobą bardzo poważne konsekwencje prawne dla potencjalnego oskarżonego [7]. Najczęstszymi problemami fazy przedanalizycznej są:

- sposób pobrania materiału biologicznego;
- sposób zabezpieczenia materiału do badań laboratoryjnych;
- stopień zaawansowania rozkładu gnilnego pobranego materiału biologicznego;
- stopień odwodnienia materiału;
- warunki przechowywania materiału oraz transport do laboratorium;
- ilość zabezpieczonego materiału;
- dostępność rutynowych materiałów biologicznych.

Spośród przedstawionych zagadnień często największym problemem (szczególnie w przypadku badań toksykologicznych *post-mortem*) jest, jakość i dostępność rutynowych materiałów biologicznych.

## **4. Rutynowo pobierane materiały biologiczne w medycynie sądowej**

Wybór odpowiedniego materiału biologicznego do badań toksykologicznych ma istotne znaczenie w toku całej analizy. Choć w dużej mierze zależy od konkretnego przypadku, historii sprawy i dostępności materiału, za rutynowe próbki biologiczne uważa się krew, mocz, żółć i ciało szkliste oka [8]. Należy jednak zaznaczyć, że przedstawiony „panel” dotyczy badań toksykologicznych wykonywanych pośmiertnie, a materiał biologiczny pobierany jest podczas sądowo-lekarskiej sekcji zwłok. Natomiast w przypadku spraw karnych toczących się wobec podejrzanych rutynowo pobieranymi w Polsce materiałami do badań ante-mortem są krew i mocz.

### **4.1. Krew**

Krew jest najpopularniejszym, łatwo dostępnym i podstawowym materiałem do badań toksykologicznych. Sposób pobierania materiału do analizy uzależniony jest od specyfiki badań. W przypadku badań ante-mortem jest ona pobierana z żyły pośrodkowej łokcia przy pomocy tzw. zamkniętego systemu pobierania krwi [9].

Bardziej problematyczne jest uzyskanie próbki krwi do badań pośmiertnych. W wielu sytuacjach ze względu na stan zwłok uzyskanie materiału biologicznego, nadającego się do analizy toksykologicznej jest bardzo trudne (np. z powodu zaawansowanego rozkładu gnilnego), lub wręcz niemożliwe (w przypadku ekshumacji) [10]. Wiele problemów w późniejszej analizie sprawia również, jakość uzyskanej próbki. Jest to związane z hemolizą, procesem gnilnym, obecnością licznych skrzepów, zmienionym składem komórkowym czy też zmienną zawartością wody w materiale biologicznym. Wszystkie wymienione interferencje finalnie powodują trudności w interpretacji uzyskanych wyników badań toksykologicznych. Wielu naukowców zwraca szczególną uwagę na problematykę końcowej analizy wyników stężeń alkoholu etylowego we krwi. Z badań doświadczalnych wiadomo, że z jednej strony alkohol etylowy powstaje również w wyniku procesów tanatochemicznych („endogenny alkohol etylowy”), ale z drugiej strony jego stężenie może być zaniżone na skutek utleniania przez bakterie alkoholu etylowego do kwasu octowego [11]. Stąd interpretacja wyników pośmiertnych badań toksykologicznych wymaga uwzględnienia wielu czynników, w tym także procesów dyfuzji wpływających na rozmieszczenie ksenobiotyków w organizmie denata.

Nie bez znaczenia jest również samo miejsce pobrania, badania naukowe wskazują, że stężenie etanolu w badaniach „post-mortem” jest wyższe we krwi pobranej z jamy serca w porównaniu do krwi pobranej z naczyń obwodowych [12].

## **4.2. Mocz**

Kolejnym rutynowo pobieranym do badań toksykologicznych materiałem biologicznym jest mocz. Wysoka koncentracja różnych ksenobiotyków i ich metabolitów w moczu wynika z faktu, iż nerki są głównym narządem odpowiedzialnym za eliminację toksyn z organizmu [13]. W odniesieniu do przedstawionych wcześniej problemów fazy przedanalizycznej mocz jest materiałem biologicznym, który nie wymaga specjalnego przygotowania do badań. Na skutek przesączenia kłębuszkowego pozbawiony jest białek, lipidów czy innych związków o dużej masie cząsteczkowej. Znacznie ułatwia to proces analizy toksykologicznej [14]. Jednak już sama interpretacja otrzymanych wyników badań toksykologicznych często okazuje się być znacznie trudniejsza niż sam proces analizy.

Jednym z aspektów, który należy wziąć pod uwagę jest wpływ wartości pH moczu na profil jakościowy i ilościowy wydalanych z organizmu ksenobiotyków. Narkotyki lub leki o charakterze słabo zasadowym (np. amfetamina) będą skuteczniej eliminowane z moczem o odczynie kwaśnym. Z kolei ksenobiotyki o odczynie słabo kwasowym będą skuteczniej przenikać do moczu o charakterze zasadowym [15].

Kolejnym problemem okazuje się słaba zależność pomiędzy stężeniem ksenobiotyku w próbce moczu a jego efektem toksycznym dla organizmu oraz niewielka korelacja otrzymanych wyników analiz toksykologicznych we krwi i w moczu [16].

Wszystko to sprawia, że analiza próbek moczu ma zwykle charakter jakościowy, a jej wyniki są interpretowane wraz z wynikami analiz pozostałych materiałów biologicznych [17].

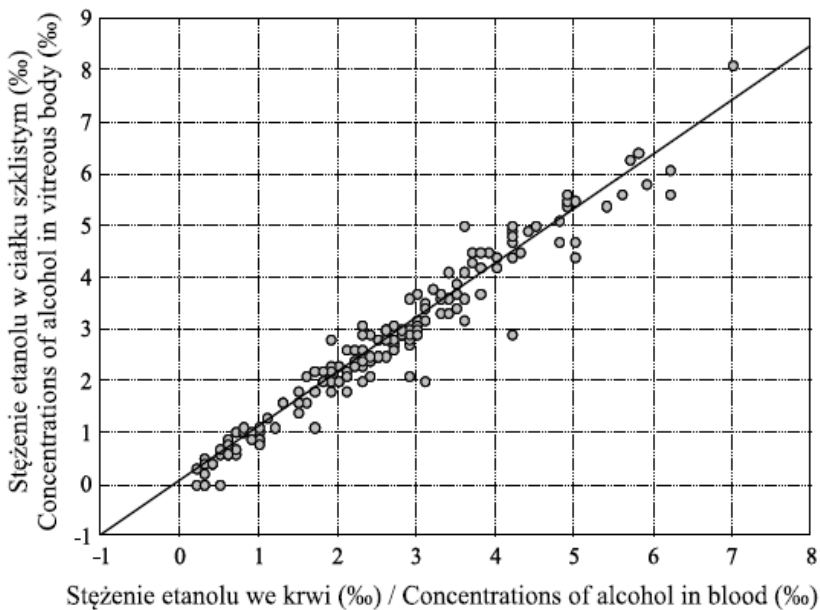
## **4.3. Żółć**

Żółć to gęsty żółto-zielony płyn wytwarzany przez hepatocyty w wątrobie a magazynowany w pęcherzyku żółciowym [18]. Stanowi ona pewnego rodzaju magazyn, w którym przechowywane są ksenobiotyki i ich metabolity, szczególnie substraty dla transportera błonowego glikoproteiny P [19]. Analiza toksykologiczna próbek żółci wykonywana jest wyłącznie w przypadku badań post-mortem. Podczas autopsji materiał ten pobierany jest przez nakłucie pęcherzyka żółciowego za pomocą sterylnej strzykawki, a następnie analizowany pod kątem występowania substancji toksycznych. Ze względu na dużą zawartość kwasów żółciowych i substancji endogennych niektóre etapy analizy mogą wymagać modyfikacji [20]. Interpretując uzyskane wyniki należy pamiętać, że stężenia ksenobiotyków są zwykle wyższe w próbkach żółci niż w analogicznych próbkach krwi [21]. Uważa się, że może to mieć związek z pośmiertną dyfuzją substancji

toksycznych z żołądka. Przykładem może być kokaina i jej główne metabolity (benzoiloeckgonina i ekgonina), które wykrywa się w żółci w ilości 3-6 razy wyższej niż we krwi [22]. Opisano również przypadki, w których pomimo negatywnych wyników badań krwi pod kątem substancji odurzających potwierdzono ich obecność za pomocą analizy próbek żółci [23].

#### 4.4. Ciało szkliste

Podobnie jak żółć, ciało szkliste jest materiałem biologicznym wykorzystywanym wyłącznie w przypadku pośmiertnych badań toksykologicznych. Stanowi dobrą alternatywę w przypadku problemów, z jakością i dostępnością innych podstawowych materiałów biologicznych. W wielu opracowaniach na temat przydatności ciała szklanego w badaniach toksykologicznych podkreśla się fakt, iż ze względu na budowę anatomiczną i swoją lokalizację materiał ten jest mniej podatny na procesy rozkładu, przemiany biochemiczne i kontaminację [24]. Ponadto wielokrotnie dokonano oceny stopnia korelacji wyników analiz toksykologicznych krwi i ciała szklanego. Efekt jednej z takich prac przedstawia poniższy wykres.



Wykres 1. Zależność stężeń etanolu we krwi i ciałku szklanym. Współczynnik korelacji wynosi 0,975,  $p = 0,000001$  [24]

Analizując powyższy wykres można zauważyć bardzo dobrą korelację wyników krew *versus* ciało szkliste ( $r=0,975$ ), co zostało potwierdzone również w innych badaniach [25]. Ponadto według danych literaturowych porównanie stężeń etanolu we krwi i ciele szklistym może dostarczyć informacji na temat fazy farmakodynamicznej, w której nastąpił zgon. W tym celu można powołać się na założenie zgodne z Prawem Ficka, iż alkohol rozprzestrzenia się według następującego schematu: krew-płyn mózgowo rdzeniowy- ciało szkliste- przychłonka. Natomiast w okresie eliminacji obserwujemy odwrotną kolejność. Zgonie z przedstawionym założeniem wyższe stężenie alkoholu etylowego w ciele szklistym wskazuje na fazę wchłaniania, a niższe na fazę eliminacji [26].

## 5. Alternatywne materiały biologiczne

Dotychczas omówione materiały biologiczne wykorzystywane są rutynowo w pracowniach toksykologicznych. W przypadku badań *ante-mortem* problem z dostępnością i jakością próbek biologicznych występuje bardzo rzadko. Ogromnym wyzwaniem toksykologii sądowej są jednak pośmiertne badania toksykologiczne. W wielu sytuacjach pozyskanie materiału biologicznego jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe. Szczególnym wyzwaniem są sytuacje dotyczące ciał w stanie gnilnego rozkładu bądź zwłok pochodzących z ekshumacji. W przytoczonych przykładach analiza toksykologiczna oparta na aktualnych schematach badań nastęrcza wiele trudności, stąd konieczne jest opracowanie nowych metod i poszukiwanie alternatywnych materiałów biologicznych.

### 5.1. Szpik kostny

Materiałem, który cechuje się dobrą dostępnością, umiejscowieniem, które nadaje mu wysoką odporność na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych i może być pobrany nawet w przypadku ekshumacji jest szpik kostny [27]. Aktualne, nieliczne dane dotyczące badań toksykologicznych z wykorzystaniem szpiku kostnego pochodzą wyłącznie z publikacji zagranicznych.

Pierwsze informacje na ten temat pochodzą z roku 2001, i dotyczą wykrywania opiatów w kościach oraz szpiku. Naukowcy z Grecji dokonali oceny koncentracji morfiny w alternatywnych materiałach biologicznych metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), a także wykazali liniową zależność pomiędzy stężeniem badanej substancji w krwi oraz szpiku kostnym. Co ważne, materiał pozyskiwano nie tylko z bieżących sekcji, ale również z ekshumacji. Raikos i wsp. podkreślają, że bogate ukrwienie oraz lipidowa matryca czynią szpik użytecznym materiałem klinicznym. „Dalsze badania w tym obszarze są niezbędne,

a z racji swojego potencjału nie mogą zostać zignorowane przez toksykologów oraz patologów sądowych” – dodają [28].

Kolejne badania zaprezentowane przez naukowców z University Medical School w Osace, dotyczyły pośmiertnej oceny stężenia etanolu w płynie osierdziowym oraz aspiracie szpiku kostnego. Potrzeba przeprowadzenia eksperymentalnych badań toksykologicznych wynikała z konieczności rozwiązania problemu braku dostępności standardowych próbek biologicznych w wielu sytuacjach klinicznych. Badania w Osace obejmowały 140 przypadków autopsji, jednak analizę zawartości etanolu w szpiku kostnym wykonano tylko w przypadkach uprzedniego wykrycia etanolu powyżej 0, 1 mg/ml w krwi, stąd badanie za pomocą chromatografii gazowej wykonano tylko w 20 przypadkach. Stwierdzono jednak dobrą korelację wyników szpik kostny vs krew obwodowa ( $r=0.98$ ), stężenie etanolu w aspiracie szpiku kostnego była minimalnie niższa (vs krew obwodowa) lub zbliżona (vs krew z jamy sercowej) do stężenia we krwi [29]. W rezultacie uznano, że szpik kostny może być użytecznym materiałem w analizach toksykologicznych, szczególnie, jako bardzo dobra alternatywa w przypadku braku próbek krwi. Jednak jak podkreśla Maeda i wsp., aby móc wprowadzić przytoczoną analizę do rutynowej oceny toksykologicznej potrzeba dalszych badań na większej populacji badanych [30].

Wszystkie opublikowane do tej pory prace łączy wspólne stanowisko naukowców, że szpik kostny ma bardzo dużą szansę stać się rutynowym materiałem do badań toksykologicznych, pozwalającym na przeprowadzenie analiz w sytuacjach, w których do tej pory nie było to możliwe, bądź było bardzo trudne. Jednak pomimo wykazania przydatności szpiku kostnego w zakresie określania stężenia etanolu, amfetaminy, metamfetaminy, fenobarbitalu czy morfiny, nadal pozostaje problem interpretacyjny wyników. Jest on związany z brakiem rzetelnych opracowań dotyczących stężeń terapeutycznych, toksycznych i śmiertelnych różnych ksenobiotyków w szpiku kostnym [31].

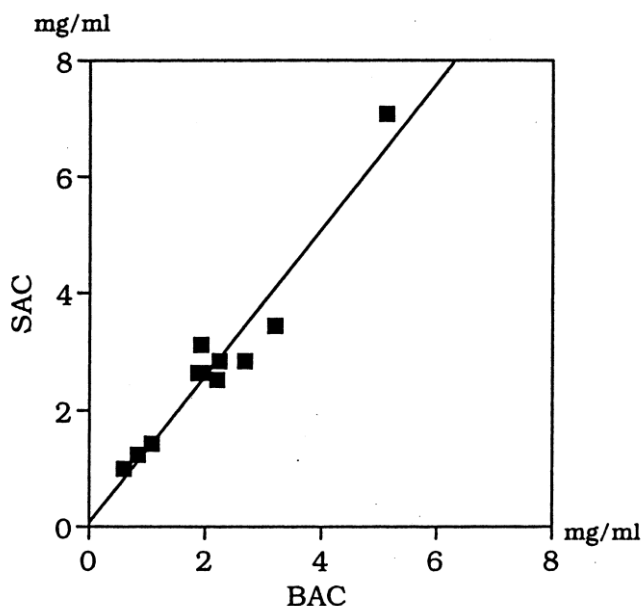
## 5.2. Płyn osierdziowy

Kolejnym alternatywnym materiałem biologicznym, o którym wspomniano już w powyższych akapitach jest płyn osierdziowy. Substancja ta produkowana jest przez osierdzie trzewne, a wypełniając jamę osierdziową znacznie redukuje tarcie podczas pracy serca. Do tej pory opublikowano niewiele prac oceniających użyteczność płynu osierdziowego w badaniach toksykologicznych. Jednak dostępne publikacje wskazują na dość dobrą korelację wyników stężeń ksenobiotyków we krwi i płynie osierdziowym [32]. Ponadto jedno z badań wskazują na większą użyteczność płynu osierdziowego w szacowaniu ilościowego stężenia

ksenobiotyków w porównaniu do moczu i żółci. Te ostatnie według autorów są bardziej użyteczne pod kątem analizy jakościowej [33].

### 5.3. Maź stawowa

Do najważniejszych zalet mazi stawowej, jako alternatywnego materiału biologicznego należy: anatomiczna izolacja, mała podatność na zmiany gnilne, niewielkie ryzyko dyfuzji ksenobiotyków z otaczających narządów [34]. Podobnie jak w przypadku płynu osierdziowego na chwilę obecną dysponujemy niewielką liczbą publikacji szerzej omawiających użyteczność mazi stawowej w badaniach toksykologicznych. Wyniki jednego z opublikowanych badań prezentuje poniższy wykres.



Wykres 2. Zależność stężeń etanolu we krwi (BAC) i mazi stawowej (SAC). Współczynnik korelacji  $r=0,97$ ,  $n=11$  [34].

W badaniu uzyskano bardzo dobre współczynniki korelacji wyników krew *versus* maź stawowa dotyczących stężenia alkoholu etylowego ( $r=0,97$ ). Jednak liczba analizowanych próbek była bardzo mała ( $n=11$ ). Konieczne są wobec tego dalsze badania nad potencjalnym wykorzystaniem mazi stawowej w toksykologii sądowej, z uwzględnieniem większej liczby badanych.

## 5.4. Włosy i paznokcie

Analiza toksykologiczna włosów staje się w dzisiejszych czasach coraz popularniejsza. Choć włosy jako materiał do badań toksykologicznych opisano w rozdziale dotyczącym alternatywnych materiałów biologicznych, należy zaznaczyć, że określenie to nie zawsze jest w pełni wiarygodne. W przeciwieństwie do przedstawionych powyżej alternatywnych materiałów biologicznych włosy mogą być wykorzystane nie tylko w diagnostyce pośmiertnych zatruc, ale również w celu sprawdzenia czy dana osoba przyjmuje substancje niedozwolone. W niektórych przypadkach więc, włosy stanowią jedyny materiał pozwalający na wykazanie stanu abstynencji od narkotyków.

Dokładne mechanizmy na drodze, których ksenobiotyki są obecne we włosach nie są jeszcze do końca poznane. Możliwe scenariusze w tym przypadku to włączenie substancji z krwi podczas procesu tworzenia i wzrostania włosa, dyfuzja ksenobiotyków z potem i łojem (na skutek porowatej struktury włosa) oraz adsorpcja z otoczenia zewnętrznego [35].

Opisano natomiast wiele czynników wpływających na wynik analizy toksykologicznej włosów. Są to czynniki biologiczne, osobnicze i środowiskowe. W literaturze możemy znaleźć kilka bardzo ciekawych przykładów. Jeden z autorów udowodnił, że stężenie kodeiny we włosach po podaniu doustnym zależy od zawartości melaniny [36]. W innych badaniach ustalono, że po przyjęciu tej samej dawki ksenobiotyku u osoby z czarnymi włosami możemy odnotować wyższe stężenie danej substancji niż u osoby o włosach blond [37]. Co ciekawe wciąż trwają badania oceniające genetyczną zmienność depozycji ksenobiotyków we włosach.

Do badań toksykologicznych pobiera się fragmenty włosów o długości od 3 do 6 cm z tylnej części głowy. Ma to związek głównie z mniejszą zmiennością tempa wzrostu włosów w tym miejscu [38].

Analiza toksykologiczna włosów złożona jest z kilku etapów [39]:

- Przygotowanie włosów (segmentacja na krótkie odcinki);
- Inkubacja w metanolu;
- Ekstrakcja np. ciec-ciecz;
- Właściwa analiza, zwykle za pomocą metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas.

Wyniki badań toksykologicznych wymagają właściwej interpretacji, szczególnie w odniesieniu do ustalenia źródła danego ksenobiotyku w organizmie pacjenta. Wielu autorów sugeruje, że przed analizą włosy powinny zostać poddane procedurze oczyszczenia, aby uniknąć kontrowersji związanych z potencjalnym ryzykiem egzogenego zanieczyszczenia włosów ksenobiotykami [40]. Jednak pomimo tych



trudności analiza toksykologiczna włosów wydaje się szczególnie interesującym tematem, ze względu na jej bardzo szerokie zastosowanie.

Podobnie jak w przypadku włosów również paznokcie mogą być materiałem do badań umożliwiającym retrospektywną analizę ewentualnego narażenia na ksenobiotyki. Dzięki analizie paznokci pod kątem obecności metali ciężkich czy też narkotyków, możemy ustalić z pewnym przybliżeniem jak dawno doszło do zatrucia oraz jak długo dane zatrucie trwało. Zgodnie z danymi literaturowymi paznokcie posłużyły między innymi do wykrycia narażenia na takie metale jak: tal, arsen, ołów [41]. Paznokcie jako alternatywny materiał do badań okazał się kluczowy w przypadku nagłego zgonu 3-miesięcznego dziecka. Podczas autopsji pobrano fragment paznokcia, w którym wykryto kokainę, oznaczony poziom ksenobiotyku świadczył o prenatalnym narażeniu na ten narkotyk [42].

## **5.5. Tkanka mięśniowa i tkanka tłuszczowa**

Omawiając alternatywne materiały do badań toksykologicznych należy zwrócić również uwagę na użyteczność tkanki mięśniowej oraz tłuszczowej w toksykologii sądowej.

W przypadku tkanki mięśniowej możemy wyróżnić kilka praktycznych zastosowań. Fragmenty mięśnia sercowego mogą posłużyć do oszacowania poziomu glikozydów nasercowych, leków antymalarycznych czy też imipraminy, w kontekście ewentualnego zatrucia [5]. Z kolei zaletami mięśni szkieletowych, jako materiału do badań są dostępność oraz mniejsza podatność na rozkład w porównaniu do narządów wewnętrznych. Z publikacji dotyczących poziomu ksenobiotyków w mięśniach szkieletowych wynika, że współczynnik korelacji krew-mięśnie zależy od czasu, jaki upłynął od zgonu do pobrania materiału oraz od objętości dystrybucji danego związku. Uściślając wyższa objętość dystrybucji dawała lepszy wskaźnik korelacji w porównaniu do ksenobiotyków o małej objętości dystrybucji [43]. Praktycznym przykładem wykorzystania mięśni, jako materiału do badań może być diagnostyka zatruc cyjankami. Uważa się, że poziom stężenia cyjanków w tkankach może być lepszym wskaźnikiem narażenia w porównaniu do poziomu wyznaczonego we krwi pełnej. Ma to związek głównie z bardzo krótkim okresem półtrwania związków cyjanków [44].

Ciekawym materiałem biologicznym jest również tkanka tłuszczowa. Choć jest ona pewnego rodzaju rezerwuarem substancji lipofilnych, co może znacząco utrudniać przebieg analizy toksykologicznej opisano kilka przypadków oznaczania amfetaminy czy też kokainy w tkance tłuszczowej. Jednak dużym problemem okazała się w tym przypadku właściwa interpretacja uzyskanych wyników [45].

## 5.6. Smółka

Kolejnym alternatywnym materiałem biologicznym jest smółka. Pod pojęciem smółki rozumiemy pierwsze masy kałowe noworodka, fizjologicznie pojawiające się w ciągu pierwszych dwóch dni życia. Smółka zawiera między innymi złuszczone nabłonek jelit, kwasy żółciowe czy też pozostałości wód płodowych [46]. Analiza toksykologiczna smółki pozwala na ocenę ewentualnego narażenia na szkodliwe działanie ksenobiotyków w okresie życia płodowego. Wśród substancji, które udało się oznaczyć w smółce znajdują się między innymi kokaina oraz estry etylowe kwasów tłuszczowych (tzw. FAEEs – fatty acid etyl esters) [10]. Oznaczanie FAEEs, powstałych na skutek estryfikacji wolnych kwasów tłuszczowych etanolem, może być użyteczne do diagnostyki płodowego zespołu alkoholowego (FAS). W kilku pracach doświadczalnych wykazano podwyższone stężenie wspomnianych estrów u matek spożywających alkohol w czasie ciąży. Poziom ten zależny był od ilości i częstotliwości spożywanego alkoholu. Warto zaznaczyć, że FAEEs można oznaczyć również we krwi obwodowej, jako marker spożycia alkoholu etylowego [47].

## 6. Podsumowanie

Dzięki intensywnemu rozwojowi nauk medycznych i technicznych dysponujemy obecnie wieloma szybkimi i precyzyjnymi metodami analitycznymi. Część z nich jak np. chromatografia gazowa znalazły zastosowanie w toksykologii sądowej. Jednak pomimo najnowocześniejszych technik badawczych wciąż częstym problemem w toku analizy toksykologicznej staje się, jakość i dostępność próbek biologicznych. Problem ten często udaje się rozwiązać dzięki wykorzystaniu w badaniach toksykologicznych alternatywnych materiałów biologicznych. Dzięki takim rozwiązaniom możliwe jest wydanie rzetelnego i wiarygodnego wyniku badania nawet w przypadku trudnych spraw. Stąd konieczność dalszych badań nad poszukiwaniem i oceną użyteczności alternatywnych materiałów biologicznych w toksykologii sądowej.

## Literatura

1. D.Bliski, K.Kordel, A.Pietruszyński, J.Pobocho, A.Wilmowska-Pietruszyńska, T.Zyss, *Opiniodawstwo sądowo-lekarskie*, Urban&Partner, 2013, s.142-148
2. K.S.Borowiak, A.Machoy-Mokrzyńska, *Wybrane zagadnienia z toksykologii ogólnej i ostrych zatruc*, Pomorski Uniwersytet Medyczny (2003), str. 46-53
3. S. Raszeja, *Dziś i jutro tanatologii sądowo-lekarskiej*, Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 57 (2007), s. 420-426

4. Bursztyńska J., MEusebio.O., Kraszula Ł., Kuna P., Pietruczuk M., *Analysis of pre-analytical, analytical and post-analytical phases of cardiac troponin I (cTnI) assay at the medical diagnostic laboratory of the University Clinical Hospital*, Diagnostyka Laboratoryjna, 50 (2014), s. 29-35
5. Berent J. *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w sprawie pobierania materiału sekcyjnego do badań toksykologicznych*, Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 62 (2012), s. 127
6. Zuba D. *Zasady przeprowadzania pomiarów stężenia alkoholu oraz opiniowania w sprawach trzeźwości – omówienie*, Prokuratura i Prawo, 4 (2005), s. 117-127
7. Gut W., *Wpływ czynników pozaanalitycznych na wynik sądowej analizy chemiczno-toksykologicznej i jego interpretację. Część II. Stan materiału do badań toksykologiczno-sądowych i jego wpływ na wynik analizy*, Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminalistyki, 4 (1995), s. 271-278
8. Plebani M., Carraro P. *Mistakes in a stat laboratory: types and frequency*, Clinical Chemistry, 43 (1997), s. 1348-1351
9. Flanagan R.J., Connally G. *Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem.*, Toxicological Reviews, 1, (2005), s. 51-62
10. Karch S.B., *Postmortem toxicology of abused drugs*, CRC Press, (2007), s. 24-26, 101-115
11. Trela F.M. *Badania porównawcze stężeń alkoholu w żółci, w ciałku szklistym i we krwi pobranych ze zwłok*, Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 50 (2000), s. 227-233
12. Pelissier-Alicot A.L., Coste N., Bartoli C., Piercecchi-Marti M.D., Sanvoisin A., Gouvernet J., Leonetti G. *Comparison of ethanol concentrations in right cardiac blood, left cardiac blood and peripheral blood in a series of 30 cases*, Forensic Science International, 1 (2006), s.35-39
13. Seńczuk W., *Toksykologia*, PZWL, (2002), s. 114-117
14. Skopp G. *Preanalytic aspects in postmortem toxicology*, Forensic Science International, 142 (2004), s.75-100
15. Wolff K., Farrell M., Marsden J., Monteiro M.G., Ali R., Welch S., Strang J., *A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness*, Addiction 94 (1999), s. 1279-1298
16. Klaassen C.D., Watkins J.B., *Podstawy toksykologii*, MedPharm (2014), str. 585-587
17. Szukalski B., *Metody analizy środków uzależniających*, Instytut Psychiatrii i Neurologii (1997), str. 72-75
18. Wajgt A., Wiśnicka-Wódzka E., *Drogi żółciowe – budowa anatomiczna i prawidłowy obraz USG*, Przewodnik Lekarza, 9 (2000), s. 111-113
19. Elferink R.P.O., Meijer D.K., Kuipers F., Jansen P.L., Groen A.K., Groothuis G.M., *Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport.*, Biochimica et Biophysica Acta, 2 (1995), s.215-268
20. Agarwal A., Lemos N., *Significance of bile analysis in drug-induced deaths*, Journal of Analytical Toxicology, 1 (1996), s. 61-63
21. Vanbinst R., Koenig J., Di Fazio V., Hassoun A., *Bile analysis of drugs in postmortem cases*, Forensic Science International, 128 (2002), s.35-40

22. Mullet W.M., *Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70 (2007), s. 263-273
23. Sims D.N., Lokan R.J., James R.A., Felgate P.D., Felgate H.E., Gardiner J., Vozzo D.C., *Putrefactive Pleural Effusions as an Alternative Sample for Drug Quantification*, American Journal of Forensic Medicine & Pathology, 20 (1999), s.343-346
24. DiMaio V.J., DiMaio D., *Medycyna sądowa*, Urban &Partner (2003), s. 455-457
25. Mackey-Bojack S., Kloss J., Apple F., *Cocaine, Cocaine Metabolite, and Ethanol Concentrations in Postmortem Blood and Vitreous Humor*, Journal of Analytical Toxicology, 24 (2000), s.59-65
26. Trela F.M., *Badania nad rozmieszczeniem alkoholu etylowego w ustroju człowieka w aspekcie sądowo-lekarskim.*, Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 35 (1985), s.213-227
27. Maeda H., Zhu B-L., Ishikawa T., Oritani S., Michiue T., Li D-R., Zhao D., Ogawa M., *Evaluation of post-mortem ethanol concentrations in pericardial fluid and bone marrow aspirate*, Forensic Science International, 161 (2006), s. 141-143
28. Raikos N., Tsoukali H., Njau S.N., *Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow*, Forensic Science International, 123 (2001), s. 140-141
29. Tominaga M., Ishikawa T., Michiue T., Oritani S., Koide I., Kuramoto Y., Ogawa M., Maeda H., *Postmortem analyses of gaseous and volatile substances in pericardial fluid and bone marrow aspirate*, Journal of Analytical Toxicology, 37 (2013), s. 147-151
30. Tominaga M., Michiue T., Ishikawa T., Kawamoto O., Oritani S., Ikeda K., Ogawa M., Maeda H., *Postmortem analyses of drugs in pericardial fluid and bone marrow aspirate*, Journal of Analytical Toxicology, 37 (2013), s.423-429
31. Tattoli L., Tsokos M., Sautter J., Anagnostopoulos J., Maselli E., Ingravallo G., Delia M., Solarino B., *Postmortem bone marrow analysis in forensic science: Study of 73 cases and review of the literature*, Forensic Science International, 234 (2014), s.72-78
32. Moriya F., Hashimoto Y., *Pericardial fluid as an alternative specimen to blood for postmortem toxicological analyses*, Legal Medicine, 1 (1999), s.86-94
33. Contreras M.T., Gonzales M., Gonzales S., Ventura R., Valverde J.L., Hernandez A.F., Pla A., Vingut A., Segura J., de la Torre R., *Validation of a procedure for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of cocaine and metabolites in pericardial fluid*, Journal of Analytical Toxicology, 2 (2007), s. 75-80
34. Ohshima T., Kondo T., Sato Y., Takayasu T., *Postmortem alcohol analysis of the synovial fluid and its availability in medico-legal practices*, Forensic Science International, 90 (1997), s.131-138
35. Kintz P., *Value of hair analysis in postmortem toxicology*, Forensic Science International, 142 (2004), s. 127-134

36. Kronstrand R., Forstberg-Peterson S., Kagedal B., Ahlner J., Larson G., *Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content*, *Clinical Chemistry*, 45 (1999), s. 1485-1494
37. Henderson G.L., Harkey M.R., Zhou C., *Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair: race as a factor*, *Journal of Analytical Toxicology*, 22 (1998) s. 156-165
38. Wennig R., *Potential problems with the interpretation of hair analysis results*, *Forensic Science International*, 107 (2000), s.5-12
39. Sachs H., Kintz P., *Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992*, *Journal of chromatography. Biomedical sciences and applications*, 1 (1998), s. 147-161
40. Cone E.J., Yousefnejad D., Darwin W.D., Maguire T., *Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures*, *Journal of Analytical Toxicology*, 15 (1991), s. 250-255
41. Chen K.L., Amarasiriwardena C.J., Christiani D.C., *Determination of total arsenic concentrations in nails by inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Biological trace element research*, 67 (1999), s. 109-125
42. Skopp G., Pötsch L., *A case report on drug screening of nail clippings to detect prenatal drug exposure*, *Therapeutic Drug Monitoring*, 19 (1997), s. 386-389
43. Langford A.M., Taylor K.K., Pounder D.J., *Drug concentration in selected skeletal muscles*, *Journal of forensic sciences*, 43 (1998), s. 22-27
44. Mniszek W., Smolik E., Kozera G., *Analiza przyczyn zbiorowego wypadku śmiertelnego w zakładzie przeróbki benzolu*, *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Zarządzania Ochroną Pracy w Katowicach*, 2 (2006), s. 35-46
45. Levisky J.A., Bowerman D.L., Jenkins W.W., Johnson D.G., Karch S.B., *Drugs in postmortem adipose tissue: evidence of antemortem disposition*, *Forensic Science International*, 121 (2001), 157-160
46. Iwańczak F., Iwańczak B., *Zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego u niemowląt*, *Nowa Pediatria*, 3 (2002), s. 128-131
47. Moore C., Jones J., Lewis D., Buchi K., *Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens*, *Clinical Chemistry*, 49 (2003), s. 133-136

## **Rutynowe i alternatywne materiały biologiczne w toksykologii sądowej**

Streszczenie:

Współcześnie toksykologia sądowa jest jedną z dynamicznie rozwijających się dziedzin medycyny. Za główną przyczynę można przyjąć stale zwiększającą się liczbę zatruć alkoholem oraz środkami psychoaktywnymi. Jednym z kluczowych elementów właściwej i rzetelnej diagnostyki laboratoryjnej zatruć jest prawidłowe pobranie oraz zabezpieczenie materiału biologicznego do badań toksykologicznych. Rutynowo wykorzystywana w tym celu jest krew obwodowa. Często, w przypadku badań post-mortem, pobranie tego materiału okazuje się problematyczne lub wręcz niemożliwe ze względu na różny stopień zaawansowania gnilnego zwłok.

Obecnie standardowo do badań toksykologicznych zabezpiecza się oprócz krwi również inne materiały, głównie mocz (badania ante-mortem) i ciało szkliste oka oraz żółć (badania post-mortem) . Jednak i w przypadku tych materiałów często pojawiają się problemy

dostępności oraz jakości próbki biologicznej. Trudności te dotyczą przede wszystkim pośmiertnych badań toksykologicznych.

Stąd bezsprzeczna potrzeba poszukiwania alternatywnych materiałów biologicznych do badań toksykologicznych. Analiza światowej literatury z dziedziny medycy i toksykologii sądowej wskazuje na bardzo duże zainteresowanie badaczy wspomnianym problemem. Wciąż trwają badania nad ustaleniem przydatności płynu osierdziowego, mazi stawowej, włosów oraz szpiku kostnego, jako alternatywnych materiałów biologicznych do badań toksykologicznych. Dotychczasowe doniesienia z tego zakresu wskazują na bardzo dobre współczynniki korelacji plyn osierdziowy vs krew obwodowa oraz szpik kostny vs krew obwodowa. Warto podkreślić, że badania te dotyczą bardzo wielu substancji, do których należą między innymi: etanol, amfetamina, aceton, czy też związki z grupy opiatów. Analizy te pozwalają również na lepsze wyjaśnienie procesów fizyko-chemicznych zachodzących po śmierci, które mogą wpływać na uzyskane wartości analiz toksykologicznych.

Słowa kluczowe: badania toksykologiczne, materiał biologiczny, toksykologia sądowa

### **Routine and alternative biological materials in forensic toxicology**

Forensic toxicology is today one of the fast-growing areas of medicine. This situation is caused by continuously increasing number of alcohol and psychoactive drugs overdose. One of the most important elements of a proper and reliable laboratory diagnosis of poisoning is collection and storing of biological specimens for toxicological analyses. Routinely used for this purpose is the peripheral blood. Infrequently, in post-mortem analysis, picking up this material is turns out to be problematic or simply impossible on account of different degree of the putrefactive progress of the body. Currently, apart from blood also other materials are being preserved for toxicological analyses, mainly urine (in ante-mortem analysis) and vitreous humour and bile (in post-mortem analysis) However also in these cases problems of the availability and qualities of the biological sample often appear. These difficulties mainly concern on tests performed post-mortem.

Thus searching alternative biological materials for toxicological analyses is necessary. Analysis of world literature in the field of forensic medicine and toxicology indicates a very strong interest in this problem.

Studies are currently underway to determining the usefulness of pericardial fluid, synovial fluid, hairs and bone marrow aspirate as alternative biological materials in toxicological analyses. Previous publications show a very good correlation coefficients pericardial fluid vs peripheral blood and bone marrow aspirate vs peripheral blood. It is worth noting that these studies involve a lot of different substances, for example: ethanol, acetone, amphetamines, cocaine or opiates group of compounds. These analyzes also allow for a better explanation of the physical and chemical processes that occur after death, which may influence for the obtained values in the toxicological studies

Keywords: toxicological analysis, biological materials, forensic toxicology

## Systemy monitorowania on-line reakcji polimeryzacji

### 1. Wprowadzenie

Monitorowanie procesu polimeryzacji jest ważne począwszy od podstawowych badań naukowych aż do prowadzenia procesu produkcyjnego i przetwórczego polimerów. Dostarcza informacji o kinetyce i mechanizmie, niezbędnych do rozwoju nowych materiałów i udoskonalania technik analitycznych i kontroli, i optymalizacji warunków prowadzenia samego procesu [1]. Minimalne zmiany parametrów procesu powodować mogą znaczne zmiany we właściwościach końcowego produktu. W ostatnich latach monitorowanie w czasie rzeczywistym reakcji chemicznych stało się priorytetowym kierunkiem w zapewnieniu jakości produktu końcowego oraz optymalizacji procesu produkcyjnego. Trend ten spowodowany jest rosnącymi wymaganiami gospodarczymi i prawnymi odnośnie jakości produktów i ochrony środowiska [2]. Przemysł potrzebuje szybkich, niezawodnych, nieinwazyjnych i tanich metod kontroli procesu.

Konwencjonalne techniki polegają na pomiarze parametrów fizycznych tj. temperatura, ciśnienie, lepkość, prędkość przepływu i in. Parametry te, jednak nie dostarczają wszystkich niezbędnych informacji by w pełni kontrolować proces. Obszar analiz on-line i in-line procesu polimeryzacji poszerza się ze względu na zwiększone zapotrzebowanie na produkty polimerowe wysokiej jakości, a tym samym redukcję kosztów wytwarzania produktów o niewystarczającej jakości. Techniki monitorowania w czasie rzeczywistym reakcji dostępne na rynku różnią się precyzją, czułością, szybkością, złożonością aparatury oraz ilością pozyskiwanych danych procesowych w jednostce czasu [3].

Celem niniejszego artykułu jest charakterystyka technik monitorowania on-line reakcji polimeryzacji zarówno i określenie ich przydatności zastosowania w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej. W artykule opisano podstawowe zasady działania technik monitorowania i kontroli reakcji polimeryzacji w czasie rzeczywistym, ich wady i zalety w zakresie stosowalności oraz nowatorskie rozwiązania w śledzeniu przebiegu procesów wytwarzania materiałów polimerowych.

---

<sup>1</sup> ikaminska@chemia.pk.edu.pl, Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska.

## **2. Densytometria**

Densytometria jest zaliczana do pośrednich metod monitorowania postępu reakcji polimeryzacji. Technika ta opiera się na różnicach gęstości pomiędzy różnymi komponentami w reaktorze. Różnice te są podstawą wyznaczenia konwersji monomeru. W standardowych warunkach reakcji, gęstość monomerów wynosi ok. 0,8-0,9 g/cm<sup>3</sup> i wzrasta odpowiednio dla polimerów [4]. Dokładne ustalenie gęstości składników reaktora, umożliwia wykonania bilansu masowego do obliczenia ilości powstałego polimeru w funkcji czasu, a stąd obliczenie chwilowej konwersji.

Densytometr w kształcie U-rurki jest najpowszechniejszym aparatem stosowanym do pomiarów on-line. Połączenie densytometru z pompą, która w sposób ciągły recyrkuje mieszaninę reakcyjną przez komórkę pomiarową w stałej temperaturze jest typowym układem pomiarowym. Densytometr wyposażony jest w czułą termoparę. Zasada działania densytometru opiera się na pomiarach okresu drgań w U-rurce wypełnionej badaną cieczą [5]. Częstotliwość pomiarów jest korelowana z pomiarami gęstości. Zmierzona gęstość składników reaktora jest odnoszona do indywidualnych składników według matematycznie rozbudowanej zależności stosunku całkowitej masy do całkowitej objętości, gdzie uwzględnia się m.in. gęstość rozpuszczalnika, kopolimeru i monomeru, oraz masę molową rozpuszczalnika i monomeru. W przypadku np. polimeryzacji emulsyjnej uwzględnia się masę i objętość emulgatora i innych dodatków [6].

Pomimo prostoty pomiarów densymetrycznych nie można pominąć również kilku aspektów, na które należy zwrócić uwagę przed rozpoczęciem pomiarów. Problemem mogą być pęcherzyki powietrza w przewodach przepływowych oraz w U-rurce. Dodatkowo w przypadku polimeryzacji, w której uczestniczy więcej niż jeden monomer, jest konieczne prowadzenie oddzielnych pomiarów dla każdego monomeru by móc uzyskać objętości do obliczanej konwersji. Ponadto potrzebne są bardzo dokładnie wartości gęstości nawet do czterech cyfr znaczących, w celu rzetelnego wyznaczenia konwersji w próbce mieszaniny polimeryzującej. Jednakże, otrzymanie takich precyzyjnych danych nie zawsze jest możliwe. Dodatkowe utrudnienia pojawiają się w polimeryzacji emulsyjnej z powodu np. od flokulacji [7].

Jak widać pomiary densytometryczne posiadają wiele ograniczeń, szczególnie dla wieloskładnikowych układów polimeryzujących. Technika densytometrii zdecydowanie sprawdza się w homopolimeryzacji, gdzie zależność pomiędzy gęstością i składem kompozycji reakcyjnej jest wiarygodnym parametrem w monitorowaniu on-line postępu polimeryzacji.



### 3. Konduktometria

Przewodność elektryczna właściwa cieczy jest ilościową miarą zdolności cieczy do przewodzenia prądu elektrycznego i w dużej mierze zależy od stężenia, rodzaju jonów oraz od temperatury [8]. Technika ta jest często stosowana w wyznaczaniu krytycznego stężenia micelnarnego (*ang.* CMC – *Critical micelle concentration*) dla anionowych surfaktantów. Liniowa zależność w stałej temperaturze wzrostu przewodności od stężenia surfaktantu do momentu osiągnięcia CMC jest punktem wyjścia w monitorowaniu zmian zachodzących w trakcie reakcji. W momencie osiągnięcia CMC, zaczynają formować się micelle surfaktantu i w miarę wzrostu agregacji, a tym samym malejącej ruchliwości miceli, dynamika zmian przewodnictwa również ulega zmianie [9]. Podejście to sprawdza się w polimeryzacji emulsyjnej, gdzie powstające micelle monomeru reagują na zmiany stężenia jonowych surfaktantów. Tym sposobem możliwe jest monitorowanie postępu polimeryzacji poprzez zmiany przewodnictwa skorelowane ze zmianami stężenia surfaktantu i obserwację np. zarodkowania cząsteczek lub koagulację. W momencie wzrostu polimerowych miceli, na ich powierzchni adsorbują się z fazy wodnej cząsteczki surfaktantu. Na skutek tego ich ruchliwość jest ograniczona w porównaniu do cząsteczek surfaktantu niezaadsorbowanych, co skutkuje spadkiem w przewodności. Kolejno obserwuje się wzrost w przewodnictwie, spowodowany ubytkiem monomeru, który uwalnia niewielki ilości surfaktantu do fazy ciągłej mieszaniny reakcyjnej. Zależność ta, pozwala na korelację pomiędzy przewodnością a lokalizacją surfaktantu i dalej pozwala przewidzieć ilość cząstek powstałych w polimeryzacji w emulsji [3, 10].

Do pomiarów konduktometrycznych stosuje się czujniki/sensory konduktometryczne bezpośrednio umieszczane w medium polimeryzującym. Różnią się między sobą budową, zasadą działania i odpowiedzi.

Tak więc monitorowanie zmian w konduktywności sprawdzi się przede wszystkim w polimeryzacji emulsyjnej (np. styrenu) lub miniemulsyjnej, gdzie jako stabilizatory stosuje się surfaktanty (np. laurylosulfonian sodu), również w badaniach żelowania polimerów emulsyjnych, do klasyfikacji surfaktantów czy też w procesach koagulacji cząstek [11]. Pomiar konduktometryczne również są często stosowane w kontrolowaniu procesów w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

### 4. ACOMP- Technika ciągłego automatycznego monitorowania on-line reakcji polimeryzacji

Technika ACOMP (*ang.* *Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization Reactions*) jest nowatorską techniką badania reakcji polimeryzacji i badania właściwości polimerów poprzez zautomatyzowane,

ciągłe monitorowanie w czasie rzeczywistym reakcji polimeryzacji. W 1998 roku pojawiła się pierwsza praca na temat metody ACOMP i od tamtej pory stała się ona ważną techniką monitoringu on-line polimeryzacji [3]. Stosowana jest m.in. w reakcjach polimeryzacji i kopolimeryzacji, kontrolowanej polimeryzacji (ang. *CRP-Control Radical Polymerization*) przebiegających według mechanizmu wolnorodnikowego w celu otrzymania niezależnego modelu pomiarów średniej masy i jej dystrybucji dla ko/polimeru. ACOMP sprawdza się także w badaniach przebiegu polimeryzacji w układach homo i heterogenicznych, w reaktorach okresowych, półokresowych oraz typu ciągłego, w syntezie (ko)polimerów o różnej architekturze (gradientowych, blokowych) [12]. Odgrywa kluczową rolę w zrozumieniu kinetyki i mechanizmów reakcji polimeryzacji oraz optymalizacji zarówno w skali laboratoryjnej jak i na poziomie instalacji produkcyjnej w skali przemysłowej. ACOMP funkcjonuje jako zielona technologia przyszłości w przemyśle wytwórczym polimerów m.in. ze względu na potencjalne oszczędności energii, redukcji odpadów, ograniczenia zanieczyszczeń oraz oszczędności dla producentów. ACOMP jest zawsze dostosowana do chemii procesu polimeryzacji – chemia nie jest zaburzana lub zmieniana względem metody monitorowania. Pomiary powadzone są na poziomie możliwie najbardziej podstawowym. Nie ma potrzeby stosowania empirycznych modeli i systemów kalibracji [13].

Podstawową zasadą ACOMP jest wyodrębnianie w sposób ciągły i rozcieńczanie strumienia lepkiej mieszaniny reakcyjnej z reaktora podawanej kolejno do linii detektorowej, gdzie dzięki uprzedniej ekstrakcji i rozcieńczeniu sygnały detektorów charakteryzują właściwości pojedynczych polimerów, a nie ich wzajemne oddziaływania/interakcje.

W metodzie ACOMP w sposób ciągły ekstrahowane są małe porcje (strumienie) (0,01-0,5 ml/min) z reaktora, rozcieńczane za pomocą wybranego rozpuszczalnika (np. tetrahydrofuran, octan butylu) do bardzo niskich stężeń polimeru, tak by podstawowe właściwości polimeru mogły być scharakteryzowane przez wybraną kombinację detektorów przepływowych [14]. Dodatkowym etapem jest tzw. kondycjonowanie tj. filtracja, odgazowanie, inwersja faz itp. Wewnątrz reaktora, mieszanina polimeryzująca jest mieszana w odpowiedniej temperaturze reakcji za pomocą gazu inertnego-azotu pod ciśnieniem. Kompozycja polimerowa tuż po opuszczeniu reaktora jest natychmiast schładza do temperatury pokojowej, aby uniknąć dalszej polimeryzacji w przewodach. Poziom rozcieńczenia jest taki, aby stężenie polimeru w podzespole detektorów mieściło się w zakresie  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup> [15]. Strumień rozcieńczony jest w sposób ciągły i doprowadzany do ustalonej kombinacji detektorów. Dzięki temu możliwe jest ciągłe rejestrowanie kinetyki, konwersji

monomeru, zmiany średniej masy cząsteczkowej, wewnętrznej lepkości i innych cech, jak również zjawisk nieoczekiwanych tj.: mikrokryształizacja, mikrożelowanie czy też przedczesna terminacja łańcucha polimerowego. Czas między podaniem a wykrywaniem jest ściśle funkcją sprawności pompy i objętości rur, i wynosi zazwyczaj od 10 do 100 sekund [16].

Stanowisko pomiarowe składa się z dwóch podzespołów tj. z procesora czołowego w skład którego wchodzi pompy, komory mieszania, filtry (rys. 1). Drugi podzespół to tzw. część funkcjonalna, którą stanowi szereg detektorów (rys.1). Dla części procesorowej zastosowano kilka rozwiązań m.in. komorę mieszania pod wysokim ciśnieniem z dwiema pompami HPLC- jedną dla procesu ekstrakcji, drugą do rozcieńczania. Natomiast standardowa konfiguracja w części detektorowej obejmuje detektory wielokątowego rozpraszania światła, detektor różnicowy współczynnika załamania światła i UV/VIS oraz wiskozymetr kapilarny. Mogą być dodatkowo zastosowane detektory: fluorescencyjny, podczerwieni oraz przewodności właściwej [17].



Rysunek 8. Uproszczony schemat systemu ACOMP (opracowanie własne na podstawie [3])

Zaletami ACOMP jest wielofunkcyjność, możliwość prowadzenia podstawowych pomiarów bez potrzeby stosowania empirycznych modeli oraz kalibracji, duża ilość przetwarzanych danych i dostarczanych informacji o przebiegu polimeryzacji oraz separacja podzespołu detektorów od środowiska reakcyjnego. Wadą natomiast jest złożoność mechaniczna procesora oraz opóźnienia czasowe pomiędzy operacją ekstrahowania składników mieszaniny reakcyjnej a wykonaniem pomiaru przez system detektorów i ich odpowiedzią oraz niewielki, lecz ciągły strumień odpadów [3, 18].

W porównaniu do innych technik np. NIR i Raman, ACOMP oprócz konwersji (ko)monomeru dodatkowo pozwala określić średnią masę cząsteczkową polimeru, lepkość wewnętrzną oraz uśrednione właściwości

polimeru, istotne w jego końcowej charakterystyce i zastosowaniu. Również dostarcza natychmiast informacji o niepożądanych zjawiskach tj.: mikrożelowanie, pojawianie się zmętnienia, niekontrolowane, przedwczesne zakończenie polimeryzacji.

ACOMP stwarza nowe horyzonty w polimeryzacji wolnorodnikowej, stopniowej, kontrolowanej (ko)polimeryzacji rodnikowej, w reakcjach szczeplenia, sieciowania i multiblokowej syntezie polimerów oraz ich modyfikacjach.

## 5. Spektroskopia w bliskiej podczerwieni NIR

Po raz pierwszy technikę NIR (*ang. NIR-Near Infrared Spectroscopy*) do monitorowania kinetyki polimeryzacji kationowej zastosowano w latach 90-tych uzyskując dobre rezultaty, co stanowiło o przydatności tej metody w śledzeniu postępu i kontroli reakcji polimeryzacji. Większość technik spektroskopowych w dużej mierze nadaje się do jakościowej i ilościowej charakterystyki systemów polimerowych oraz dostarczają cennych informacji na poziomie molekularnym o stopniu reakcji i jakości końcowego produktu. Metoda NIR jest kluczową techniką spektroskopową stosowanych w chemii polimerów [19].

Obszar NIR mieści się w zakresie długości fal 800-2500 nm widma elektromagnetycznego. Region ten obejmuje pasma pochodzące od nadtonów czyli drgań harmonicznym od tonu podstawowego oraz kombinacji drgań podstawowych związanych z atomami wodoru grup funkcyjnych np. -NH, -OH, -CH [20].

Obecny zaawansowany rozwój technik spektroskopowych w tym NIR idzie w parze z opracowaniem aparatury analitycznej o wysokiej precyzji i czułości, stąd w porównaniu do tradycyjnych technik laboratoryjnych, NIR charakteryzuje się takimi zaletami jak: szybkość i niezawodność oznaczeń, łatwe przygotowanie próbki, mnogość analiz z jednej operacji oraz nieniszczący charakter analiz. Dodatkową zaletą jest zastosowanie światłowodów, co stanowi nowe perspektywy w monitorowaniu procesów polimeryzacji. Zastosowanie czujników podłączonych do spektrometru za pomocą włókien światłowodowych umożliwia bezpośrednie pomiary na linii produkcyjnej bez potrzeby ingerencji w proces produkcyjny [21]. NIR dostarcza danych kinetycznych i strukturalnych w czasie rzeczywistym prosto z reaktora, gdzie umieszczona jest sonda ze światłowodem. Przez co nie ma potrzeby pobierania próbek, co pozwala zaoszczędzić czas i uniknąć błędów pomiarowych. Dostęp do szerokiej gamy czujników (transmisji, dyfuzji) pracujących na różnych trybach sprawia, że technika NIR może być zastosowana do analizy prawie każdego rodzaju polimeru i monitorowania różnych systemów polimeryzujących [22].

Do tej pory technika NIR była stosowana m.in. do badania polimeryzacji w masie, roztworze, emulsji i suspensji, do wyznaczenia konwersji monomeru, średniej masy cząsteczkowej polimeru i średniego rozmiaru cząstek. Zastosowanie analizatora NIR w procesie polimeryzacji umożliwia nie tylko monitorowanie zaniku wiązań podwójnych monomerów, ale pozwala analizować pozostałości rozpuszczalników, monomerów i dodatków. Analiza NIR pozwala ustalić właściwości fizyczne takie jak masa cząsteczkowa, stopień rozgałęzienia, taktyczność, temperatura topnienia, gęstość i lepkość [23].

Wadą związaną z zakresem widma NIR jest to, że monomery powinny w tym obszarze wykazywać absorpcję i dodatkowo korzystne jest, kiedy pasma absorpcji monomerów nie pokrywają się. Aby uprościć pomiary i interpretację wyników otrzymanych techniką NIR, w sytuacji nakładania się widm absorpcyjnych, stosuje się wieloczynnikową metodę częściowych mniejszych kwadratów (ang. PLS-partial least squares). Dzięki kombinacji NIR z regresją PLS z powodzeniem można monitorować w czasie rzeczywistym średni rozmiar cząstek w polimeryzacji suspensyjnej np. styrenu. NIR sprawdza się także do badania właściwości reologicznych polimeru [24]. Mianowicie, za pomocą światłowodowej spektroskopii NIR można monitorować w czasie rzeczywistym wskaźnik szybkości płynięcia płynnej kompozycji polimerowej lub też lepkość kopolimerów. Za pomocą techniki NIR można wyznaczyć liczbę grup hydroksylowych np. w polioliach [25].

Obecna aparatura NIR może być zainstalowana zarówno w laboratorium, jak i przy linii produkcyjnej lub bezpośrednio podłączona do strumienia procesowego, suszarki, wylączarki lub reaktora. Tryb pomiarów i lokalizacja analizatora NIR, podyktowane są właściwościami optycznymi próbki, selektywnością i czułością metody, czasem trwania procesu oraz ogólnymi wymogami w zakresie kontroli i monitorowania.

Technika spektroskopii bliskiej podczerwieni może być zastosowana zarówno jako technika *in-line*, *on-line* oraz *at-line*. Mianowicie w trybie *in-line* analizator NIR jest włączony bezpośrednio do procesu za pomocą światłowodów. Sonda wykonana ze stali nierdzewnej lub innego materiału umieszczona jest bezpośrednio do portu zainstalowanego w strumieniu procesowym lub naczyniu reakcyjnym. Taka konfiguracja analizatora jest przeznaczona dla analizy określonego rodzaju próbki i najlepiej nadaje się do monitorowania procesu w obiegu zamkniętym. Wyniki uzyskuje się do 10 sekund. Wadą tej strategii jest zintegrowanie długiej ścieżki optycznej z dynamiką płynnego strumienia procesowego co może utrudniać analizę i transmisję danych [26].

W trybie *on-line* analizator jest sprzężony z procesem za pomocą pętli i wykonuje analizy dla konkretnych rodzajów próbek w czasie <10 sekund [21]. Pomiary prowadzone są przy ciągłym przepływie próbki przez

komórkę przepływową z bocznymi strumieniami pozwalającymi na jej kondycjonowanie tj. ogrzewanie, sączenie, odgazowanie. Podobnie jak w trybie *in-line*, monitorowanie *on-line* zapewnia optymalną analizę i kontrolę badanego układu reakcyjnego.

Natomiast w trybie *at-line* analizator NIR umiejscowiony jest w pobliżu strumienia procesowego. Takie rozwiązanie stosowanie jest tam gdzie monitoring *in-line* i *on-line* jest niemożliwy np. w polimeryzacji emulsyjnej. Próbkę pobierane są manualnie, co znacznie opóźnia uzyskanie i analizę wyników [26].

Podsumowując technika spektroskopii w bliskiej podczerwieni ze względu na możliwość stosowania jej w układach polimeryzujących różnego rodzaju (w emulsji, w bloku, w suspensji itd.) jest wszechstronną i uniwersalną metodą monitorowania polimeryzacji. Biorąc pod uwagę korzyści ekonomiczne i jakościowe analiz NIR, technika ta coraz częściej staje się przydatnym narzędziem w monitorowaniu procesów produkcyjnych polimerów.

## 6. Technika FPT – technologia sond fluorescencyjnych

Polimery są systemami, w których ocena lokalnych parametrów jest możliwa za pomocą technik fluorescencyjnych. Obecnie popularne jest projektowanie fluorescencyjnych czujników molekularnych, zwanych też sondami fluorescencyjnymi. Zależność widma emisji fluorescencji takiego specjalnego fluorofora od właściwości jego otoczenia (np. polarność, protoczność, pH) dostarcza informacji o zachodzących zmianach fizycznych i chemicznych w środowisku reakcji. Ogromne zapotrzebowanie na nowe fluorofory do różnych zastosowań, sprawiło, że są one przedmiotem intensywnych badań prowadzonych przez chemików [27].

Jedną ze spektroskopowych technik monitorowania w czasie rzeczywistym jest technologia sond fluorescencyjnych FPT (*ang. Fluorescence Probe Technology*). Jest ona nową metodą, stosowaną do śledzenia przebiegu *on-line* i *in-situ* procesów polimeryzacji i fotopolimeryzacji, za pomocą specjalnych fluorescencyjnych czujników molekularnych zwanych sondami fluorescencyjnymi. Istotną ich cechą jest wrażliwość na zmiany polarność i/lub mikrolepkości polimeryzującej kompozycji. Znakowanie monomerów sondami fluorescencyjnymi pozwala na uzyskanie produktu polimerowego o pożądanych właściwościach oraz badanie dynamiki procesów polimeryzacji, ich kinetyki, mechanizmów, w przełożeniu na prowadzenie procesu produkcyjnego w skali przemysłowej w optymalnych warunkach [28, 29].

Sondy fluorescencyjne stanowią jedno z ważniejszych zagadnień związanych ze spektroskopią fluorescencyjną. Uzyskanie informacji o monitorowanym procesie zależy od właściwości spektralnych

zastosowanego fluoroforu. Sonda fluorescencyjna absorbuje i emituje energię o określonej długości fali. Porcja energii i długość fali emitowanej zależą od właściwości fluorofora, ale też od środowiska reakcji w jakim się znajduje. Cechy charakterystyczne cząsteczki sondy to m.in. pierścień aromatyczny, sztywna struktura przestrzenna oraz grupy funkcyjne odpowiadające za fluorescencję. Aby sonda fluorescencyjna mogła być zastosowana do śledzenia konkretnego procesu powinna być fotostabilna, dobrze rozpuszczalna w środowisku reakcji, i powinna wykazywać wysoką wydajność kwantową. Istotne cechy sondy to także czułość i czas odpowiedzi. Istnieje wiele rodzajów sond fluorescencyjnych, a wybór odpowiedniej zależy od właściwości środowiska reakcyjnego, w którym sonda zostanie umieszczona [30, 31].

Działanie technologii FPT opiera się na procesie absorpcji określonej długości fali przez zastosowaną w eksperymencie cząsteczkę sondy fluorescencyjnej oraz analizę otrzymanego widma fluorescencyjnego przy użyciu spektrofotometru.

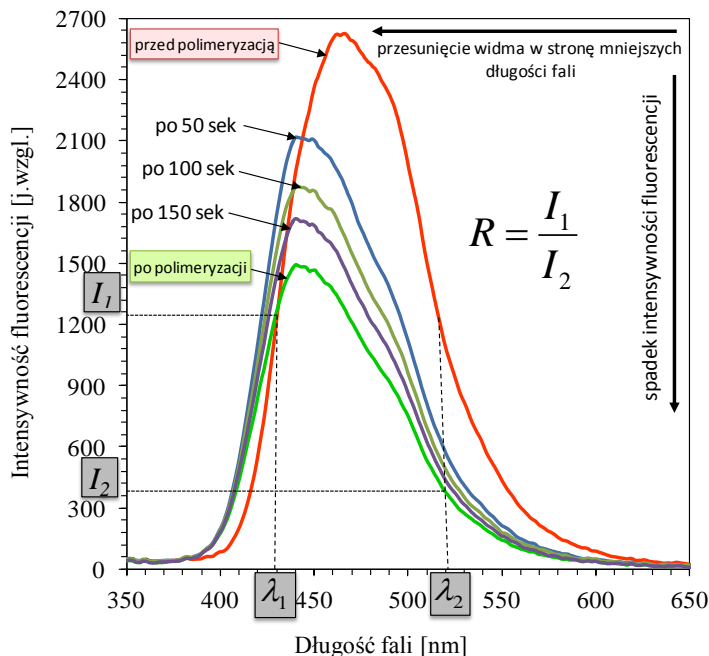
W technologii FPT, przynajmniej jeden z parametrów opisujących fluorescencję musi ulegać zmianom w zależności od zmian zachodzących w otoczeniu. Wśród parametrów, za pomocą których można skorelować zmiany zachodzące w środowisku ze zjawiskiem fluorescencji są: stosunek intensywności fluorescencji monomer/ekscymer, długość fali odpowiadająca maksymalnej emisji ( $\lambda_{\max}$ ), intensywność przy  $\lambda_{\max}$ , czas życia fluorescencji oraz zakres długości fal emisji. Wybór odpowiedniego parametru, który będzie najlepiej odzwierciedlał zmiany w środowisku reakcji zależy od właściwości fizykochemicznych badanego układu [32].

Monitorowanie postępu reakcji jest możliwe po dodaniu sondy fluorescencyjnej do układu reakcyjnego w bardzo małej ilości rzędu 0,01-0,5% [31]. Źródło światła z układu pomiarowego powoduje wzbudzenie cząsteczki sondy na wyższe poziomy energetyczne, a zmiany polarności i mikrolepkości, w różnym stopniu wpływają na stabilizację ich stanów wzbudzonych. Oddziaływanie cząsteczek sondy z cząsteczkami środowiska reakcyjnego zachodzi według następujących prawidłowości:

- zmniejszenie polarności środowiska powoduje zwiększenie luki energetycznej między energią stanu wzbudzonego, a energią stanu podstawowego;
- wzrost mikrolepkości środowiska uniemożliwia cząsteczkom sondy przejście do najbardziej korzystnej energetycznie konformacji stanu wzbudzonego [33].

Emitowane kwanty światła ze stanu energetycznego, w którym znalazła się cząsteczka sondy stanowią źródło informacji o zmianach w układzie reakcyjnym. Efektem tych zmian może być zmiana intensywności

fluorescencji, zmiana położenia widma fluorescencyjnego sondy – przesunięcie widma w stronę fal krótszych oraz zmiana kształtu widma (rys. 2).



Rysunek 2. Zmiany widma fluorescencyjnego przykładowej sondy 7-amino-4-trifluorometyloksymaryny (Sigma Aldrich) w trakcie fotopolimeryzacji monomeru metakrylowego

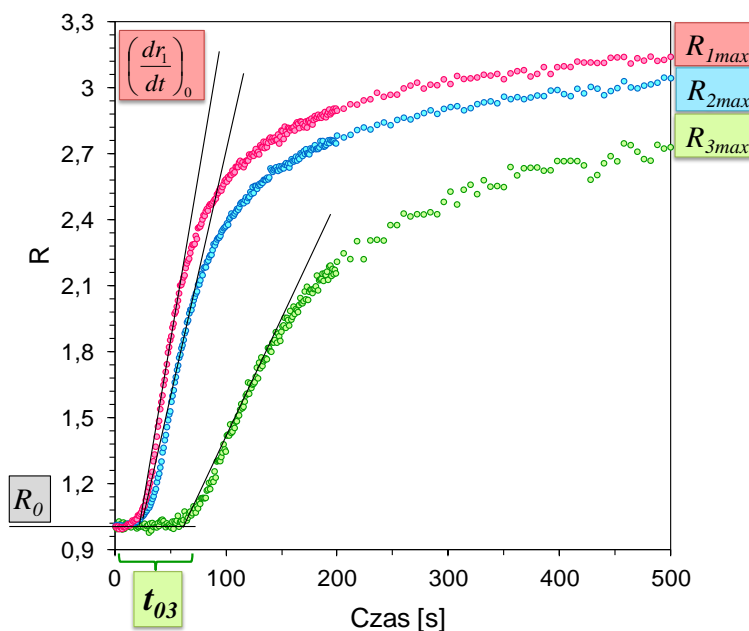
Parametrami kinetycznymi wykorzystywanymi w technologii FPT w celu kontroli jakości i śledzenia postępu reakcji fotopolimeryzacji są (rys. 3):

- pomiar stosunku intensywności fluorescencji ( $R$ ), mierzony przy dwóch różnych długościach fali po obu stronach maksimum widma fluorescencyjnego sondy;
- początkowy stosunek intensywności fluorescencji ( $R_0$ );
- czas indukcji ( $t_0$ );
- nachylenie krzywej konwersji  $(dr/dt)_{\max}$ .

Stosunek intensywności fluorescencji ( $R$ ), mierzony jako stosunek intensywności ( $I_1$ ) przy mniejszej długości fali ( $\lambda_1$ ) do intensywności ( $I_2$ ) przy większej długości fali ( $\lambda_2$ ) (rys. 2) wzrasta w miarę postępu polimeryzacji i jest proporcjonalny do stopnia konwersji grup funkcyjnych monomeru. Początkowy stosunek intensywności fluorescencji ( $R_0$ ), mierzony przed polimeryzacją, jest wskaźnikiem identyczności składu



kompozycji fotoutwardzalnych. Jest mierzony przy dwóch ustalonych długościach fali. Parametr ten dostarcza informacji o powtarzalności składu kompozycji w oparciu o czułość na zmiany w ilościach poszczególnych składników, czy też obecności obcego składnika w oryginalnej kompozycji. Wartość  $R_0$  wskazuje także czy kompozycja jest świeża czy była już składowana przez dłuższy czas. Mianowicie, gdy zmierzone  $R_0$  jest większe od podawanej standardowej wartości, można wtedy wywnioskować, iż proces polimeryzacji już się rozpoczął. Czas indukcji ( $t_0$ ) jest miarą czystości monomerów, gdyż informuje o obecności inhibitorów polimeryzacji, które zabezpieczają kompozycję monomerową przed spontaniczną polimeryzacją. Im większa jest wartość  $t_0$  tym więcej jest inhibitorów w kompozycji i tym dłużej można ją składować w ciemności zanim zacznie się spontaniczna polimeryzacja. Nachylenie krzywej w początkowym etapie polimeryzacji  $(\frac{dr_1}{dt})_0$  zależy od stężenia fotoinicjatora i jego efektywności inicjowania. Zbyt dużą szybkość początkową fotopolimeryzacji można zmniejszyć np. poprzez zmniejszenie stężenia fotoinicjatora, rozcieńczając kompozycję nową porcją bez jego zawartości. W przypadku gdy szybkość początkowa jest zbyt mała, to poprzez dodanie większej ilości fotoinicjatora, można przyspieszyć proces polimeryzacji (rys.3) [34, 35].



Rysunek 3. Profile kinetyczne z opisem parametrów kinetycznych na przykładzie fotopolimeryzacji różnych kompozycji polimeryzujących otrzymanych metodą FPT

Podsumowując technika sond fluorescencyjnych FPT może być stosowana w reakcjach gdzie ulegają zmianie lepkość lub polarność. Jest metodą wysoce czułą i szybką, dostarczającą powtarzalnych danych kinetycznych. Sprawdza się przede wszystkim w monitorowaniu szybkich reakcjach fotopolimeryzacji.

## 7. Podsumowanie

W związku z rosnącą potrzebą ciągłego monitorowania i kontroli procesów polimeryzacji, możliwość śledzenia postępu reakcji na każdym z jej etapów oraz sterowanie jej przebiegiem nabiera kluczowego znaczenia ze względu na wydajność procesu, jakość otrzymywanego produktu końcowego oraz redukcję kosztów surowców i energii. Celem monitorowania procesów polimeryzacji jest m.in.: bezpośrednie kontrolowanie i pozyskiwanie informacji o stanie procesu w dowolnym czasie, na każdym etapie, skrócenie czasochłonnych pomiarów, wykrywanie błędów procesowych na bieżąco oraz oszczędność materiałów i kosztów. Przy wyborze odpowiedniej metody kontroli należy mieć na uwadze zasadę iż: sposób monitorowania powinien być dopasowany do chemii procesu polimeryzacji- chemia nie zmienia się aby dopasować się do zastosowanej metody monitorowania. W niniejszym artykule opisane techniki monitorowania *on-line* i *in situ* reakcji polimeryzacji w różnym stopniu spełniają wymienione powyżej wymagania. Właściwości fizykochemicznych polimeryzującego systemu będą determinować o wyborze odpowiedniej techniki. Aczkolwiek wiele metod kontroli procesów polimeryzacji jest jeszcze w fazie rozwoju i są stosowane jedynie w warunkach laboratoryjnych tj. *off-line*. Dostępne aktualnie metody kontroli polimeryzacji i rozwój nowych technologii są weryfikowane pod kątem ich wykonalności i opłacalności.

## Podziękowania

Badania realizowane w ramach projektu LIDER finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr projektu LIDER/014/471/L4/12/NCBR/2013.

## Literatura

1. Hamielec A. E., Tobita H., *Polymerization Processes*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000
2. Florenzano F. H., Strelitzki R., Reed W. F., *Absolute Online Monitoring of Polymerization Reactions*, *Macromolecules*, 1998, 31(21) s.7226-7238
3. Alb A. M., Drenski M. F., Reed W. F., *Implications to Industry: Perspective. Automatic continuous online monitoring of polymerization reactions (ACOMP)*, *Polymer International*, 2008(57) s.390-396

4. Canegallo S., Storti G., Morbidelli M., Carrà S., *Densimetry for on-line conversion monitoring in emulsion homo- and copolymerization*, Journal of Applied Polymer Science, 1993(47) s.961-979
5. Tjiam C., Gomes V.G., *Online Inferential Measurement of Conversion and Molar Mass in Emulsion Polymerization Controlled by Chain Transfer*, Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012, 51(4) s. 1490
6. Abbey K.J., *Polymerization Kinetics by Precision Densimetry, Emulsion Polymers and Emulsion Polymerization*, ACS Symposium Series, 2009, 165(21) s.345-356
7. Hergeth W.D., *On-Line Monitoring of Chemical Reactions*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006
8. Salleo A., Kline R. J., DeLongchamp D. M., Chabinye M. L., *Microstructural characterization and charge transport in thin films of conjugated polymers*, Advanced Materials, 2010(22), s. 3812-3838
9. LFJ N., RQF J., van Well W., van Herk AM., German A L, *Determination of the maximum swellability of polymer by monomer using conductivity measurements*, Journal of Colloid and Interface Science, 1995, 175(2), s. 461-469
10. Zhao F., Sudol E. D., Daniels E. S., Klein A., El-Aasser M. S., *Online conductivity and stability in the emulsion polymerization of N-butyl methacrylate: Nonreactive versus reactive systems*, Journal of Applied Polymer Science, 2012(126), s. 1267-1276
11. Santos Jr G. P., Martins C, Fortuny M., Santos A.F., i in., *In-Line and In Situ Monitoring of Ionic Surfactant Dynamics in Latex Reactors Using Conductivity Measurements and Ion-Selective Electrodes*, Industrial & Engineering Chemistry Research, 2007, 46(5), s. 1465-1474
12. Reed W. F., Alb A. M., Mignard E., i in., *Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization Reactions (ACOMP)*, Polymeric Materials: Science and Engineering, 2003(88), s. 476-478
13. Mignard E., Guerret O., Bertin D., Reed W.F., *Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization Reactions (ACOMP) of High Viscosity Reactions*, Polymeric Materials: Science and Engineering, 2003(88), s. 314-316
14. Kreft T., Reed W. F., *Direct Monitoring of the Cross-Over from Diffusion-Controlled to Decomposition-Controlled Initiation in Free Radical Polymerization*, Macromolecular Chemistry and Physics, 2008(209), s. 2463-2474
15. Çatalgil-Giz H., Giz A., Alb A.M., Reed W.F., *Absolute Online Monitoring of Acrylic acid Polymerization and the Effect of Salt and pH on Reaction Kinetics*, Journal Applied Polymer Science, 2004(91), s. 1352-1359
16. Reed W.F., *Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization reactions (ACOMP)*, Feature Article, Polymer News, 2004(29), s. 271-279
17. Grassl B., Reed W. F., *Online polymerization monitoring in a continuous tank reactor*, Macromolecular Chemistry and Physics, 2002(203), s. 586-597
18. Alb A. M., Drenski M. F., Reed W. F., *Implications to Industry: Perspective. Automatic continuous online monitoring of polymerization reactions (ACOMP)*, Polymer International, 2008(57), s. 390-396
19. Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983

20. Florenzano F. H., Fleming V., Enohnyaket P., Reed W. F., *Coupling of Near Infra-Red spectroscopy to Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization Reactions*, European Polymer Journal 2005 (41), s. 535-545
21. Burns D.A., Ciurczak E.W., *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Third Edition (Practical Spectroscopy Series vol.35), Taylor&Francis Group, 2008
22. Heigel N.i in., *NIR for polymer research quality control and reaction monitoring*, Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2007(15), s. 269-278
23. Hansen M. G., Vedula S., *In-line fiber-optic near-infrared spectroscopy: Monitoring of rheological properties in an extrusion process*, Part I, Journal of Applied Polymer Science, 1998(68), s. 859-872
24. Lachenal G., *Dispersive and Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy of Polymeric Materials*, Vibrational Spectroscopy, 1995(1), s. 93-100
25. Jones C., Brown J. A., *Polyether Polyol Monitoring Using Near Infrared Process Photometers*, Journal of Advanced Instruments, 1989(38), s. 429-438
26. Barton II F.E., *Theory and principles of near infrared spectroscopy*, Spectroscopy Europe 2002(14), s.12
27. Pączkowski J., *Sondy fluorescencyjne jako narzędzie badawcze w chemii polimerów*, Polimery, 2005, 50 (7-8), s. 520-529
28. Bajorek A., Pączkowski J., *Sondy spektroskopowe. Wpływ łańcucha polimerowego na właściwości fotofizyczne, cząsteczek wykazujących istnienie stanu TICT*, Polimery, 2000(45),, s.11-12
29. Bosch P., Catalina F., Corrales T., *Fluorescent Probes for Sensing Processes in Polymers*, Chemistry European Journal. 2005(11), s.4314-4325
30. Loutfy R. O., *Fluorescence probes for polymer free-volume*, Pure & Applied Chemistry, 1986, 58 (9), s. 1239-1248
31. Wang Z. J., Song J. C., Bao R., Neckers D. C., *Fluorescence Probes for Monitoring Polymerization Processes*, Journal of Polymer Science: Part B Polymer Physics, 1996(34), s. 325-333
32. Jager W. F., Volkers A. A., Neckers D. C., *Solvatochromic Fluorescent Probes for Monitoring the Photopolymerization of Dimethacrylates*, Macromolecules, 1995, 28 (24), s. 8153-8158
33. Peinado C., Alonso A., Salvador E. F., Baselga J., Catalina F., *Following in situ photoinitiated polymerization of multifunctional acrylic monomers by fluorescence and photocalorimetry simultaneously*, Polymer, 2002 (43), s. 5355-5361
34. Kamińska I., Ortyl J., Popielarz R., *Applicability of quinolizino-coumarins for monitoring free radical photopolymerization by fluorescence spectroscopy*, Polymer Testing, 2014(42), s.99-107
35. Bosch P., Fernández-Arizpe A., Mateo J.L., Corrales T., Peinado C., *New fluorescent probes for monitoring the polymerization reaction. Part 3: pulsed-laser polymerization of acrylic adhesives*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2004(167), s. 229-236

## **Systemy monitorowania on-line reakcji polimeryzacji**

### Streszczenie

Spektrum metod syntezy polimerów jest bardzo szerokie. Projektowanie nowych związków polimerowych idzie w parze z rozwojem nowych metod ich wytwarzania i charakteryzowania. Celem monitorowania procesów polimeryzacji jest m.in.: bezpośrednie kontrolowanie i pozyskiwanie informacji o stanie procesu w dowolnym czasie, na każdym etapie, skrócenie czasochłonnych pomiarów, wykrywanie błędów procesowych na bieżąco oraz oszczędność materiałów i kosztów. Śledzenie w czasie rzeczywistym reakcji polimeryzacji to przede wszystkim analiza kinetyki procesu i mechanizmu, a także analiza jakościowa i ilościowa. Niniejszy artykuł stanowi przegląd literaturowy technik monitorowania reakcji polimeryzacji on-line tj.: spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIR), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), densytometria, konduktometria, metoda ACOMP oraz FPT (Technologia Sond Fluorescencyjnych).

Słowa kluczowe: monitorowanie on-line, polimeryzacja, FPT, DSC, ACOMP

## **On-line monitoring of polymerization reactions systems**

### Abstract

The field of methods for the synthesis of polymers is very broad. Design of new polymer compounds goes hand in hand with the development of new methods for their preparation and characterization. The purpose of monitoring of polymerization processes is i.a.: direct control and acquisition of information about the process at any time, at any stage, shortening time-consuming measurements, error detection process online as well as saving materials and costs. Real-time monitoring of the polymerization reaction is primarily kinetics and mechanism analysis and also qualitative and quantitative analysis. This article is a literature review of the online monitoring of polymerization reaction techniques i.e.: near infrared spectroscopy (NIR), differential scanning calorimetry (DSC), densitometry, conductometry, ACOMP method and FPT technique (Fluorescent Probes Technology).

Keywords: on-line monitoring, polymerization, FPT, DSC, ACOMP

# Telemanipulator RobIn Heart i jego zastosowanie w medycynie

## 1. Wprowadzenie

Rosnąca w Polsce ilość osób wymagających w mniejszym lub większym stopniu opieki medycznej skłania do przemyśleń nad wdrażaniem nowoczesnych rozwiązań na rynek usług medycznych. Niewątpliwie jednym z najprężniej rozwijających się aspektów wspomnianych rozwiązań jest telemedycyna, której szczególnym działem są roboty medyczne. Artykuł ma na celu przedstawienie dokonań w tej dziedzinie, ze szczególnym uwzględnieniem polskiej rodziny manipulatorów RobIn Heart.

## 2. Telemedycyna

Telemedycyna (gr. *tele* – „na odległość”) w dzisiejszym świecie uznawana jest za nowoczesną formę świadczenia usług medycznych[1].

Według prof. Pawła Januszewicza jest to „możliwość bezpośredniego, bezpiecznego, archiwizowanego on-line słowno-wizualnego zdalnego kontaktu w czasie rzeczywistym pomiędzy osobą zainteresowaną, a fachowym pracownikiem ochrony zdrowia, dietetykiem, psychologiem, etc. Kontakty te, wykorzystujące najnowsze możliwości technologiczne telefonii komórkowej i Internetu umożliwiają monitorowanie lub interaktywną wymianę informacji i danych dotyczących zdrowia i choroby, w tym danych uzyskiwanych z diagnostycznych urządzeń peryferyjnych” [2].

Stanowi połączenie elementów telekomunikacji, medycyny oraz systemów informatycznych. Wykorzystanie zaawansowanych technologii pozwala na pokonanie barier geograficznych między pacjentem a jednostką świadczącą usługi medyczne i znacząco zwiększa do nich dostęp. Ma to istotne znaczenie szczególnie dla mieszkańców małych miast i wsi, w których brak jest specjalistycznych placówek opieki zdrowotnej. Obecnie telemedycyna umożliwia między innymi: interaktywne wideokonferencje pomiędzy lekarzami specjalistami, lekarzem i pacjentem, przesyłanie na

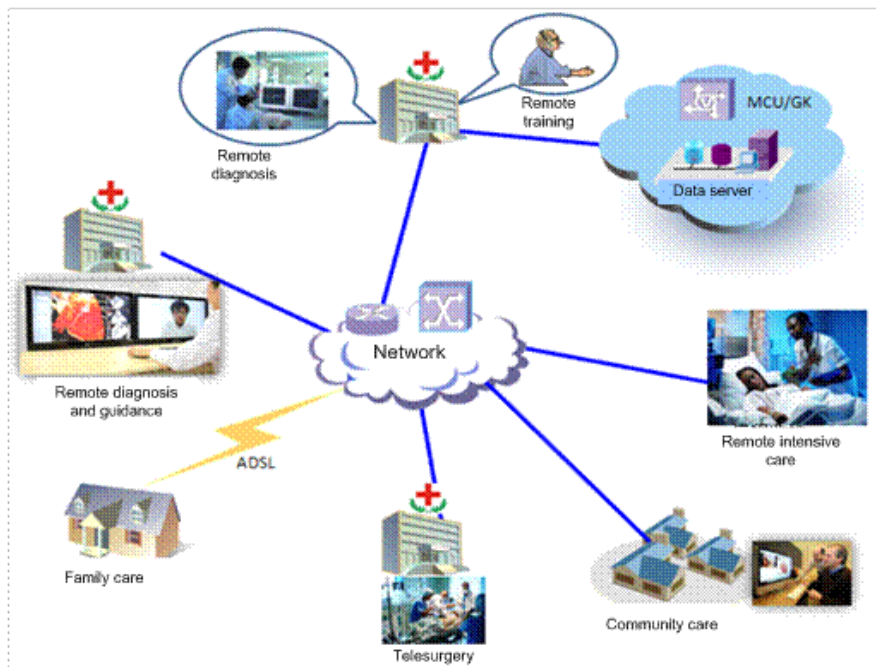
---

<sup>1</sup> lukasz.jaworski1@pollub.edu.pl, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

<sup>2</sup> robert.karpinski@pollub.edu.pl, Koło Naukowe Technologii Materiałów, Wydział Mechaniczny Politechnika Lubelska

<sup>3</sup> d.gaska@pollub.pl, Instytut Technologicznych Systemów Informatycznych, Wydział Mechaniczny, Politechnika Lubelska

odległość obrazów statycznych i dynamicznych, zdjęć rentgenowskich, echogramów, EKG, USG, MRI, tomografii komputerowej, a nawet przeprowadzanie operacji na odległość z wykorzystaniem robotów medycznych (rys. 1)[3].



Rys. 1 Przykładowy system telemedyczny [4].

### 3. Roboty medyczne

Telemedycyna w ostatnich latach przeżywa bardzo dynamiczny rozwój w wielu kierunkach. Najważniejsze z nich to: teledermatologia, teleradiologia, teleopieka domowa, telerehabilitacja oraz szeroko rozumiana telechirurgia i robotyka medyczna.

Najnowszym osiągnięciem telemedycyny jest wykorzystywanie robotów podczas zabiegów chirurgicznych. Specjalnie zaprojektowane do tego celu urządzenia cechują się ogromną precyzją. Pozwala to na przeprowadzenie zabiegu przy wykonaniu minimalnego cięcia i maksymalnym zawężeniu pola operacyjnego. Ma to ogromny wpływ na czynniki takie jak utrata krwi, ilość stosowanych środków przeciwbólowych, a w efekcie krótszą hospitalizację[3].

Przed przystąpieniem do omówienia samych urządzeń warto zapoznać się z podstawowymi definicjami robota i robotyki .

**Robot** jest to urządzenie techniczne przeznaczone do realizacji niektórych funkcji manipulacyjnych i lokomocyjnych człowieka, posiadające określony poziom energetyczny, informacyjny i inteligencji maszynowej [5].

**Robotyka**, jako dyscyplina techniczna, zajmuje się syntezą pewnych funkcji człowieka poprzez wykorzystanie mechanizmów, czujników, zespołów wykonawczych i komputerów [6].

**Roboty medyczne** stanowią wielki potencjał dla chirurgii, zwiększając jej precyzję i ułatwiając dostęp małoinwazyjny do obszaru operacji. Dzisiaj są to głównie telemanipulatory [6].

Podstawowa klasyfikacja zaproponowana przez Taylora w 1998 roku obejmuje:

- Roboty zastępujące asystenta chirurga – podczas operacji trzymają kamerę laparoskopową i kierują ją zgodnie z potrzebami chirurga;
- Telemanipulatory chirurgiczne – roboty sterowane zdalnie przez chirurga;
- Pasywne manipulatory nawigacyjne – informujące chirurga o dokładnym położeniu trzymanego przez niego narzędzia;
- Systemy dokładnego pozycjonowania – manipulator przemieszczający się do zaplanowanego miejsca i blokujący narzędzie w tej pozycji;
- Systemy dokładnego przemieszczania – manipulatory przemieszczające się po zaplanowanej trajektorii narzędzia;

Do dodatkowych kategorii należą:

- Manipulatory diagnostyczne – usprawniające diagnostykę nieinwazyjną, np. rezonans magnetyczny, tomografię, gastroskopię;
- Manipulatory rehabilitacyjne – usprawniające narządy ruchu [7].

Robot chirurgiczny jest telemanipulatorem, przy pomocy którego operator zdalnie wykonuje różne zadania, sterując ruchem końcówki roboczej przymocowanego do ramienia roboczego narzędzia pracującego jako chwytak, nożyczki, nóż koagulujący lub innego narzędzia [8].

Obecnie do przeprowadzania zabiegów chirurgicznych stosowane są trzy roboty chirurgiczne: da Vinci Surgical System, ZEUS Robotic Surgical System oraz AESOP Robotic System.



### **Da Vinci Surgical System**

Robot da Vinci jest dziełem amerykańskiej firmy Intuitive Surgical. Jego głównym zadaniem jest wspomaganie operacji chirurgicznych z naciskiem na jak najmniejszą inwazyjność. System składa się z dwóch odrębnych części – konsoli chirurgicznej, która odpowiada za sterowanie oraz robota medycznego, posiadającego do 4 ramion mających bezpośredni kontakt z pacjentem. Trzy ramiona wyposażone są w narzędzia chirurgiczne EndoWrist. Dwa z nich reprezentują prawą i lewą rękę chirurga trzecie natomiast ma służyć zwiększeniu wydajności. Czwarte ramię odpowiada za sterowanie kamerą endoskopową znajdującą się w ciele pacjenta. System wizyjny robota da Vinci wyposażony jest w kamery, dostarczające trójwymiarowy obraz ciała pacjenta o wysokiej jakości oraz sprzęt do jego przetwarzania [9,10]. Od grudnia 2010 jeden z robotów da Vinci znajduje w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu [10].



Rys. 2 Robot chirurgiczny da Vinci Surgical System [11]



Rys. 3 Konsola sterownicza robota da Vinci [3]

### **ZEUS Robotic Surgical System**

Zeus został stworzony przez amerykańską firmę Computer Motion. Jest robotem wykorzystywanym w chirurgii laparoskopowej do zabiegów małoinwazyjnych. Robot ten posiada trzy ramiona robocze – dwa z nich spełniają rolę prawej i lewej ręki chirurga. Trzecie ramie służy do trzymania kamery i jest sterowane głosem. Ważną zaletą robota Zeus jest możliwość przeprowadzenia zabiegu na bijącym sercu bez otwierania klatki piersiowej. Wykonywane jest tylko minimalne nacięcie między żebrami [12]. Pierwszą osobą, która przeprowadziła zabieg za pomocą robota Zeus jest prof. Andrzej Bochenek z Kliniki Kardiochirurgii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.



Rys. 4 Zabieg operacyjny wykonywany przy pomocy robota ZEUS [9]

W trakcie testów jest robot RobIn Heart stworzony przez zespół naukowców z Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze w współpracy z uczonymi z takich ośrodków naukowych jak Politechnika Śląska, Politechnika Łódzka czy Politechnika Warszawska.

### **Konstrukcja RobIn Heart**

Telemanipulator RobIn Heart zbudowany jest z dwóch zasadniczych elementów: zamocowanego na wolnostojącej podstawie lub do stołu operacyjnego ramienia oraz kiści, służącej do mocowania narzędzi. Czynności manipulacyjne realizowane są za pomocą siłowników elektrycznych oraz przekładni, których parametry zmieniać się mogą w zależności od generacji urządzenia.

Podstawą działania RobIn Heart jest zachowanie tzw. stałopunktowości kinematycznej. Zjawisko to, w warunkach klinicznych, pozwala na umieszczenie narzędzia w ciele pacjenta przez otwór o średnicy od 5 do 10 mm (zwany portem) w taki sposób, by miało pewien określony zakres ruchów zbliżony do przegubu kulowego, bez możliwości zmiany pozycji w obrębie portu. Rozwiązanie to pozwala na zmniejszenie inwazyjności zabiegu, a w efekcie skrócenie czasu hospitalizacji i rekonwalescencji pacjenta [14, 15].

Wyżej wymieniony efekt uzyskano przede wszystkim dzięki specjalnej budowie ramienia manipulatora, które wyposażono w układ równoległowodów, pozwalających na zwiększenie precyzji ruchów dzięki usztywnieniu konstrukcji ramienia, oraz zastosowaniu wielu stopni swobody przy projektowaniu kiści, z czego bezpośrednio wynika manewrowość narzędzia [16].

Każde z urządzeń z serii RobIn Heart różni się nieznacznie od pozostałych nie tylko wymienionymi wcześniej elementami napędowymi, ale również ilością ramion, która zależy od tego, ile osób na sali operacyjnej jedno urządzenie ma zastępować – tylko lekarza, asystenta zapewniającego tor wizyjny dla chirurga czy może obu? Dodatkowym kryterium różnicującym jest funkcja przypisana robotowi.

Począwszy od prototypowego RobIn Heart 0 po RobIn Heart 1 i 2 główne zadanie ramienia manipulatora polegało na poruszaniu narzędziem zamontowanym przez operatora w kiści. Niewątpliwym mankamentem była konieczność ręcznej zmiany narzędzia, co powodowało skomplikowanie procedur, a w związku z tym wydłużenie czasu zabiegu. Na potrzeby robota RobIn Heart 3 opracowano nowe projekty narzędzi chirurgicznych z wymiennymi końcówkami roboczymi. To nowatorskie rozwiązanie, nie stosowane dotychczas przez konstruktorów robotów chirurgicznych, daje możliwość zastosowania automatycznej lub półautomatycznej wymiany narzędzi, co znacząco skróciło czas wykonywania operacji [17].

Kolejnym etapem ewolucji był robot RobIn Heart Vision, który podczas operacji przejmował funkcję asystenta odpowiadającego za zapewnienie toru wizyjnego. Cel ten zrealizowano poprzez zamocowanie do ramienia endoskopu, przy pomocy którego można było, na tej samej zasadzie jak w poprzednich urządzeniach (a w szczególności RobIn Heart 1, na bazie którego opracowano Vision), obserwować jamę otrzewnej, m.in. celem koordynacji działań drugiego manipulatora [18]. Uzyskane doświadczenia wskazały na potrzebę stworzenia konstrukcji o szerszych możliwościach zastosowań praktycznych [19]. Potrzeba ta znalazła odzwierciedlenie w postaci modelu RobIn Heart PortVisionAble, który po 5 miesiącach prac zadebiutował dnia 18 grudnia 2014 roku na Międzynarodowej Konferencji Roboty Medyczne 2014 w Zabrzu. Manipulator ma konstrukcję modułową, z elementami, które można sterylizować. Lekką konstrukcję zapewnia mu poliwęglanowa budowa, oparta na wykorzystaniu technologii druku 3D. Jego prosta budowa i mała waga ułatwia transport. Nie wymaga specjalnej sali operacyjnej jak jego zagraniczni koledzy, gdyż można go zainstalować przy stole operacyjnym. Wyżej wymienione cechy w połączeniu ze stosunkowo niską ceną stawiają go na dobrej pozycji do skutecznego wejścia na rynek robotów medycznych [20].

W 2010 roku pierwszy eksperyment na zwierzęciu przeprowadzono przy pomocy RobIn Heart mc<sup>2</sup>, będącego połączeniem wcześniejszych rozwiązań w zakresie wykonywania i obserwacji zabiegu. Stanowi zupełnie oryginalne w skali światowej rozwiązanie konstrukcyjne: układ ramion 2+1, gdzie dwa zewnętrzne ramiona są ramionami narzędziowymi, a środkowe jest wyposażone w platformę, na której mogą pracować dwa narzędzia robocze oraz tor wizyjny. Ten układ jest zakodowany w skrócie mc<sup>2</sup> (**m**anually and **t**wo **c**omputer controlled tools robot). Trzy ramiona zamocowane są na jednej kolumnie. Mechatroniczne narzędzia można montować na ramieniu robota lub w specjalnym uchwycie ręcznym – co powoduje, że asystent może w każdej chwili dodać w pole operacyjne orientowane za pomocą ręki i sterowane za pomocą odpowiednich przycisków manualnie narzędzia o takiej samej funkcjonalności [10, 19].

### **System sterowania RobIn Heart**

Niezbędnym elementem każdego manipulatora jest konsola sterownicza. W przypadku telemanipulatorów chirurgicznych, jakimi są urządzenia należące do rodziny RobIn Heart, odgrywa ona kluczową rolę, gdyż bezpośrednio wpływa na efekt i precyzję oraz bezpieczeństwo operacji.

Podstawowym zadaniem układu zadajnika ruchu jest mapowanie działań operatora (chirurga) przetwarzanych następnie przez układ sterujący, wypracowujący sygnały sterujące dla ramienia wykonawczego. Na etapie projektowania określono następujące wymagania dla układu sterującego manipulatora:

- określanie z zadaną częstotliwością próbkowania pozycji dłoni i przetwarzanie jej na ruchy narzędzia wykonawczego;
- zapewnienie wymaganej dokładności i rozdzielczości ruchów;
- przeskalowywanie zakresu ruchu dłoni na zakres ruchu narzędzia;
- eliminacja efektu drżenia rąk operatora [13].

W latach 2000-2006 w Pracowni Biocybernetyki FRK opracowano kilka projektów urządzeń typu Master zadających ruch robotu wykorzystujących zarówno komendy głosowe lekarza jak i zadania sprecyzowane ruchem dłoni za pomocą różnego rodzaju zadajników [13].

Konsola RobIn Heart Shell rozwiązuje zarówno problem ergonomii operowania, jaki i optymalizuje położenie wszystkich elementów wpływających na skuteczność pracy chirurga stanowiąc wygodne miejsce pracy. Jej funkcjonalność można ująć następująco:

1. Całość konstrukcji odpowiada naturalnej sytuacji pracy chirurga „we wnętrzu pacjenta”. Uchwyt sterujący położeniem narzędzia można wygodnie ustawić względem operatora. Chirurg trzyma jakby za końcówkę

narzędzia. Punkt stały, przegub obrotowy znajduje się na wysokości głowy operatora.

2. Monitor obserwacyjny znajduje poniżej, pod niewielkim kątem do poziomu – podobnie jak pole operacyjne podczas operacji chirurgicznej.

3. Chirurg operuje uchwytami nad monitorem równocześnie obserwując efekt – ruch narzędzi.

4. Podnosząc wzrok o niewielki kąt ma przed oczami monitor umożliwiający obserwację informacji diagnostycznych wykonanych przed operacją, bazy doradczej oraz sygnałów monitorujących stan pacjenta podczas operacji. Konfiguracja monitora dotykowego może być zmieniona bezpośrednio palcem, głosem, pedałem lub innym zadajnikiem ruchu.

5. Pedały są umieszczone w wygodnej pozycji umożliwiając sterowanie kamery endoskopowej lub odsprzęglając cały układ mechaniczny[14].

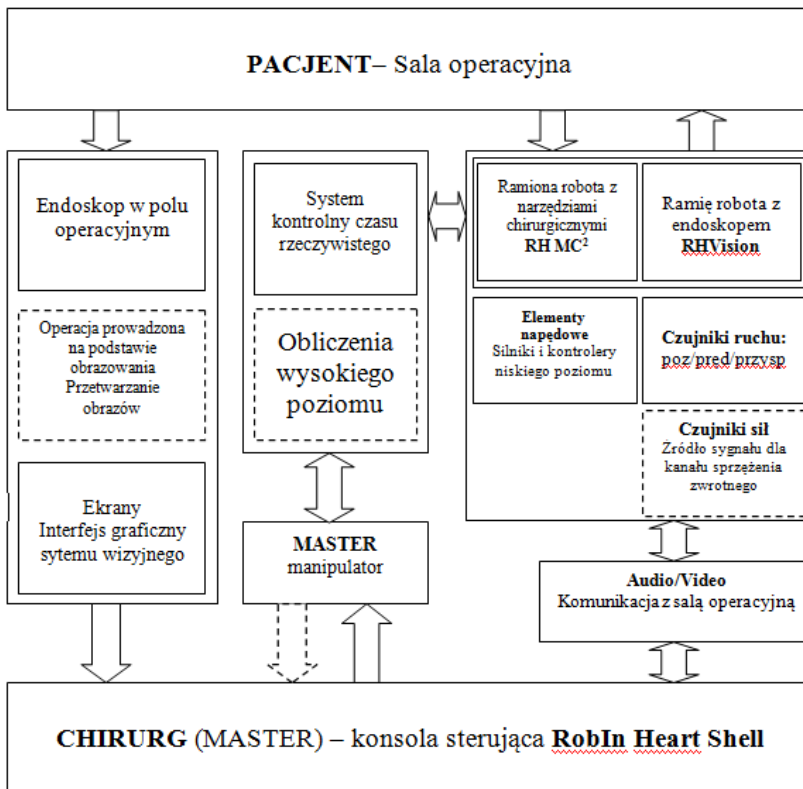


Rys. 5 Konsola RobInHeart Shell (po lewej); model nowego zadajnika ruchu ramienia (po prawej)[15]

Naturalna idea operatora umieszczonego wewnątrz przestrzeni operacji uzyskana została przez zawieszenie przegubu obrotowego zadajników ruchu nad głową operatora oraz monitora (2D lub 3D) w części dolnej – operator patrzy swobodnie w dół pod wybranym kątem[13].

Operator przesuwa w wygodne położenie zadajniki ruchu o kształcie przypominającym narzędzie, operuje zadajnikami bezpośrednio nad monitorem co daje wygodną (szczególnie w fazie uczenia) możliwość równoczesnej obserwacji ruchu dłoni z zadajnikiem oraz efektu zadanego ruchu (ruchu narzędzi w polu operacyjnym zobrazowanym na monitorze). Pod monitorem, w dobranej przez chirurga lokalizacji znajdują się pedały do sterowania torem wizyjnym i odsprzęgania układu mechanicznego. W konsoli zamocowane są minimum dwa monitory: jeden obserwacyjny

nad kolanami operatora, drugi wyżej na wprost – monitor techniczny. Zadajnik ruchu sterowany jest intuicyjnie: ruch w dół oznacza ruch w dół narzędzia w polu operacji itp. Trzymadło w kształcie długopisu lub wygodny, oryginalny uchwyt i podwieszenie dłoni (ze sprężyną równoważącą system mechaniczny zadajnika) pozwala na swobodne poruszanie palcami, które za pomocą zacisków (jak pęseta), przycisków, pokręteł, mikrodźwistików w wygodny, nie zakłócając stabilnemu sterowaniu orientacją narzędzia pozwala sterować znaczną liczbą dodatkowych stopni swobody (ruchów elementów z przegubami typu nadgarstek narzędzia lub funkcji narzędzi)[21].



Rys. 6 Struktura dwustronnego systemu kontroli RobIn Heart – współpraca z otoczeniem sali operacyjnej i jej pracowników [22]

Monitor techniczny jest może być podzielony wg uznania operatora na kilka obszarów. Wśród opcji są: panel ustawiania parametrów sterowania (szybkość działania, skala ruchu, poziom odcięcia drżenia itp.), monitoring stanu pacjenta (EKG, Ciśnienie, Pulsoksymetr, Saturacja itp.), program

doradczy (inteligentna baza danych obejmująca informacje diagnostyczne pacjenta, historię choroby, plan operacji, modelowanie operacji, zadaną choreografię narzędzi i dobór narzędzi w różnych fazach operacji), okno widoku panoramicznego pola operacji, okno kontaktu z tutorem, ekspertem, doradcą. Komputer może być sterowany przez monitor dotykowy lub niektóre opcje sterowane głosem [14]. Wygodna ażurowa konstrukcja umożliwi dopasowanie wszystkich elementów wpływających na ergonomię pracy oraz kontakt z otoczeniem (jeśli konsola znajduje się na sali operacyjnej). Układ przekazu informacji umożliwia w wygodny sposób zarówno kontakt ze światem zewnętrznym, jak i korzystanie on-line z systemu doradczego [13].

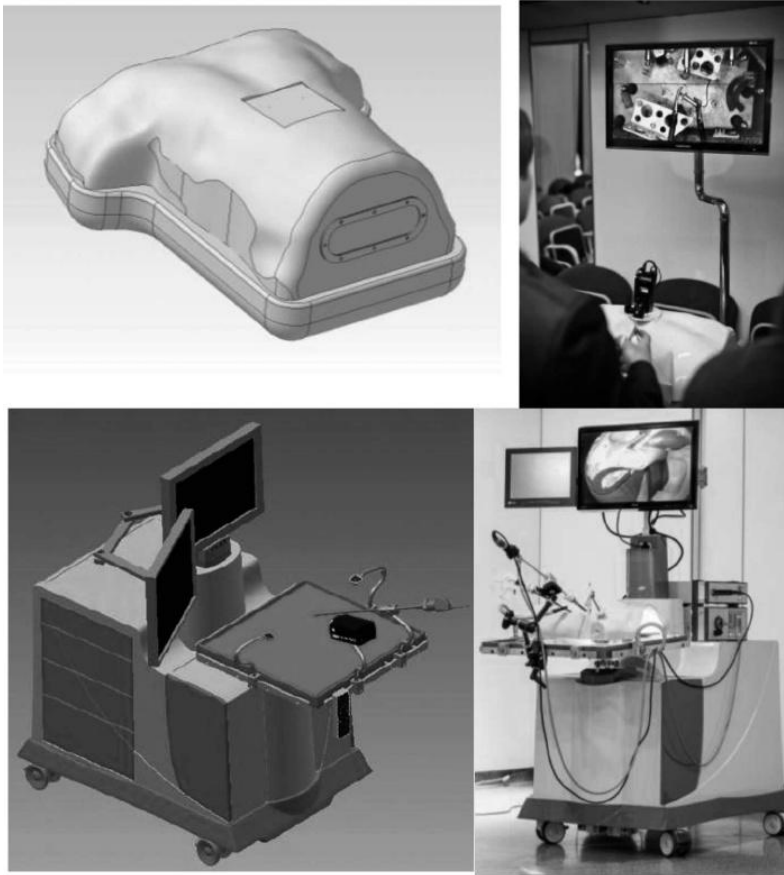
### **Testy manipulatorów RobIn Heart**

Proces wdrożenia zrobotyzowanych narzędzi chirurgicznych obejmuje:

- eksperymenty laboratoryjne na stanowiskach komputerowych (wirtualna sala operacyjna);
- laboratoryjne testy funkcjonalne i techniczne robotów;
- laboratoryjne eksperymenty i trening na modelach zawierających;
- tkanki naturalne;
- eksperymenty na żywych zwierzętach.

Na potrzeby fazy pierwszej (polegającej na przeprowadzaniu eksperymentów na wirtualnej sali operacyjnej) opracowano stanowiska ćwiczeniowe odzwierciedlające warunki na Sali operacyjnej podczas eksperymentu. Stanowiskami tymi są prostszy *nBody* oraz bardziej złożony *nBox*, zawierający system hydrauliczny pozwalający na przeprowadzanie bardziej zaawansowanych symulacji [22].

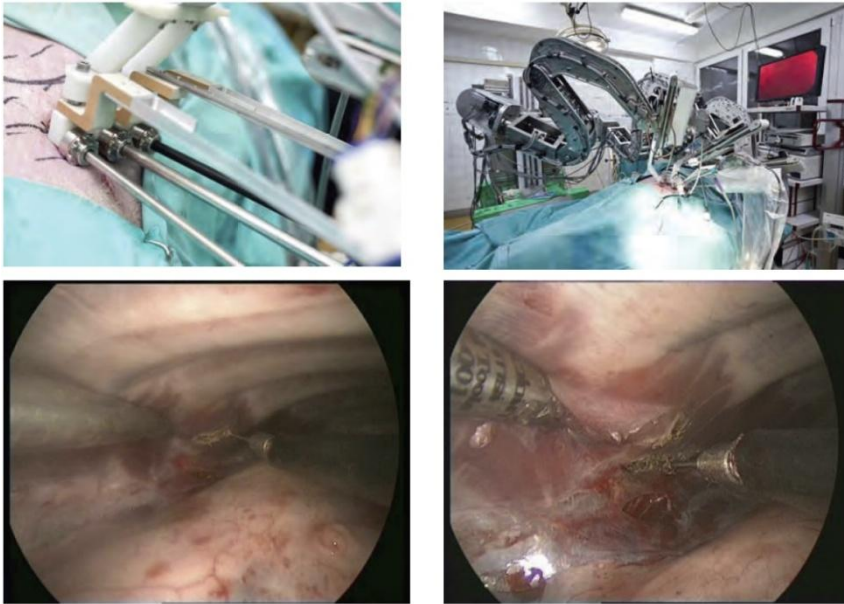




Rys. 7 Stanowiska ćwiczeniowe nBody (na górze) i nBox (na dole) [22]

Ze względów etycznych i praktycznych ostatnia faza eksperymentalna powinna obejmować minimalną liczbę zwierząt, być doskonale zaplanowana i przeprowadzona przez fachowy, wyćwiczony w innowacyjnym charakterze eksperymentu zespół [23]. Historia wdrożenia klinicznego dwóch robotów amerykańskich Zeus (już wycofany z rynku) i da Vinci wskazuje, że standardem jest wykorzystanie w fazie laboratoryjnej serc wieprzowych oraz w fazie eksperymentów na zwierzętach: świni domowej lub psów [8].

Roboty sprawdzono podczas badań laboratoryjnych oraz trzech eksperymentów na zwierzętach. Zgromadzone doświadczenie stanowiło podstawę dla wytyczonych prac konstrukcyjnych i wykonawczych robotów [10]. Wspomniane eksperymenty przeprowadzone zostały w Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach-Ligocie.



Rys. 8 Testy RobIn Heart mc<sup>2</sup> w maju 2010 r. [10]

Test pierwszy, który odbył się w dniach 21 i 22 stycznia 2009 roku, obejmował niemal wszystkie modele prototypowe ramion narzędziowych robota, RobIn Heart Vision oraz innowacyjne, mechatroniczne narzędzia chirurgiczne nowej generacji - RobIn Heart Uni System. Istotą eksperymentu było usunięcia woreczka żółciowego oraz elementy operacji naprawczych zastawki mitralnej i trójdzielnej [8].

Dnia 17 maja 2010 roku w warunkach zbliżonych do klinicznych poddano ocenie prototyp nowego robota RobIn Heart mc<sup>2</sup>. Podczas tego eksperymentu wykonano elementy operacji na sercu związanej z pomostowaniem naczyń wieńcowych [10].

Celem następnego testu, mającego miejsce na konferencji Roboty Medyczne 2010 w dniu 10 grudnia 2010 roku, było zaprezentowanie możliwości manipulatora podczas pierwszej w Polsce teleoperacji na dystansie Fundacja Rozwoju Kardiologii w Zabrze a Centrum Medycyny Doświadczalnej [23].

W kolejce do badań przedklinicznych i klinicznych stoi RobIn Heart PortVisionAble, czekający na opinię Komisji Etycznej.

#### **4. Podsumowanie**

Telemedycyna to gałąź nauki zajmująca się szeroko rozumianą medycyną na odległość. Jednym z jej zastosowań są roboty medyczne,

a w szczególności roboty chirurgiczne, takie jak daVinci czy ZEUS. Obserwując poczynania zagranicznych firm Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii, mająca siedzibę w Zabrze, przy udziale naukowców z wielu uczelni opracowała szereg rozwiązań, które przyczyniły się do powstania rodziny RobIn Heart, obejmującej roboty różnego typu i zastosowania. Przeprowadzone we współpracy ze Śląskim Uniwersytetem Medycznym testy wykazały wysoką skuteczność manipulatorów oraz ich ogromny potencjał na salach operacyjnych. Jeden z robotów, RobIn Heart PortVisionAble, jest na prostej drodze do testów klinicznych i wprowadzenia do produkcji na szeroką skalę. Pozostaje mieć nadzieję, że rodzimy projekt zdoła skutecznie wejść na rynek opanowany od lat przez firmy zachodnie.

## **Literatura**

1. Siebert J., Rumiński J.: *Telemedycyna*. Forum Med. Rodz. 2007; t. 1, nr 1, s. 1-10, streszcz. pol
2. Januszewicz P.: *Telemedycyna – nowe narzędzie medycyny XXI wieku*. Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, Rzeszów 2012, 3, 274-276
3. <http://www.ki.univ.rzeszow.pl/telemedycyna/index.php> stan z dnia 28.12.2014
4. [http://www.telepresenceoptions.com/images/zte\\_telemedicine\\_architecture.gif](http://www.telepresenceoptions.com/images/zte_telemedicine_architecture.gif) stan z dnia 28.12.2014
5. <http://www.robotyka.com/teoria.php/teoria.5#> stan z dnia 28.12.2014
6. Rohr K., Ulanecka M., Jakubowski M.: *RobInheart – rodzina robotów medycznych*. <http://RobInheart.pl/index.php/pl/o-robotach>, stan z dnia 28.12.2014
7. Taylor R.H.: *Robots as Surgical Assistants: Where We Are, Wither We are Tending, and How to Get There*. Conference Proceedings Metropole Hotel, Solihull, 1998
8. Nawrat Z., Kostka P., Dybka W., Rohr K., Podśędkowski L., Śliwka J., Cichoń R., Zembala M., Religa G.: *Pierwsze eksperymenty na zwierzętach robota chirurgicznego RobIn Heart*. Pomiary Automatyka Robotyka, 2/2010, str. 539-545
9. <http://www.intuitivesurgical.com/> stan z dnia 28.12.2014
10. Nawrat Z.: *Pierwszy eksperyment In vivo robota chirurgicznego RobIn Heart mc<sup>2</sup> – raport*. Pomiary Automatyka Robotyka, 2/2011, str. 613-618
11. <http://sahealth.com/dotAsset/48fbb74f-a0e7-47fa-a1ca-4b5e24385ae3.jpg> stan z dnia 28.12.2014
12. <http://www.computermotion.com/> stan z dnia 28.12.2014
13. Nawrat Z., Kostka P., Małota Z.: *Ergonomiczne stanowisko operatora robota chirurgicznego RobInHeart – prace projektowe, konstrukcyjne i badawcze 2009-2010*. Pomiary Automatyka Robotyka, 2/2011, str 619-626
14. Nawrat Z., Kostka P., Małota Z., Dybka W., Rohr K.: *Optymalizacja interfejsu chirurg-telemanipulator. Zintegrowana konsola sterująca systemu RobIn Heart*. Pomiary Automatyka Robotyka, 2/2010, str 546-553

15. Nawrat Z.: *RobInHeart.pl 2 – Budowa robota kardiochirurgicznego*. [http://www.robotyka.com/fundacja\\_wiadomosc.php/wiadomosc.15](http://www.robotyka.com/fundacja_wiadomosc.php/wiadomosc.15) stan z dnia 28.12.2014
16. Podśędkowski L.: *RobIn Heart 0, 1, and 3 – mechanical construction development*. Bulletin Of The Polish Academy Of Sciences – Technical Sciences, Vol. 53, 1/2005, str. 79-85
17. Podśędkowski L.: *Łódzkie ramię RobIn Heart 3 – tym naprawdę można pracować*. Roboty Medyczne (Medical Robots) pod redakcją Zbigniewa Nawrata, Tom 1, str. 135-145. Zabrze 2007
18. Nawrat Z., Podśędkowski L., Kostka P., Dybka W., Rohr K., Kandora A., Małota Z.: *RobIn Heart Vision – telemanipulator toru endoskopowego*. Roboty Medyczne (Medical Robots) pod redakcją Zbigniewa Nawrata, Tom 1, str. 79-90. Zabrze 2007
19. Nawrat Z.: *RobIn heart PortVisionAble – dlaczego budujemy nowego robota?* Inżynier i Fizyk Medyczny, vol. 2, 3/2013, str. 151-154
20. <http://www.RobInheart.pl/index.php/pl/aktualnosci/53-debiut-pva> stan z dnia 28.12.2014
21. Nawrat Z., Dybka W., Kostka P., Rohr K.: *RobIn Heart Shell – konsola sterowania robotem chirurgicznym RobIn Heart*. Roboty Medyczne (Medical Robots) pod redakcją Zbigniewa Nawrata, Tom 1, str. 99-108. Zabrze 2007
22. Nawrat Z., Kostka P.: *RobIn Heart Surgery Robotic System. Challenges in mechanical construction, control system and staff training before first clinical application*. Archive Of Mechanical Engineering, Vol. 61, 1/2014
23. Nawrat Z., Kostka P.: *RobIn Heart: przygotowania do debiutu klinicznego*. Pomiar Automatyka Robotyka, 2/2012, str 416-419

## **Telemanipulator RobIn Heart i jego zastosowanie w medycynie**

### Streszczenie

Artykuł zawiera ogół informacji dostępnych na temat robotyki medycznej, w szczególności zaś mówi o polskim robocie RobIn Heart. Zawarto w tekście wyjaśnienie terminu „telemedycyna” oraz przedstawiono głównych konkurentów polskiego urządzenia – roboty DaVinci i ZEUS. Opisano podstawowe cechy konstrukcji robota RobIn Heart oraz systemu sterowania. Zaprezentowano kolejne generacje robota, opisując różnice w budowie. Przedstawiono informacje dotyczące testów robotów rodziny RobIn Heart.

Słowa Kluczowe: telemedycyna, telemanipulator, robot medyczny, RobIn Heart

## **Remote manipulator RobIn Heart and its application in medicine**

### Abstract

The article contains general information available on medical robotics, with polish RobIn Heart robot in particular. The text includes a clarification of the term "telemedicine" and presents the main competitors of the polish device—the DaVinci Surgical System and the ZEUS Robotic Surgical System. It describes the basic design features and control system of the RobIn Heart robot. The article presents next generations of basic design and describes differences in construction between them. It provides information on trials of RobIn Heart family's robots.

Keywords: telemedicine, telemanipulator, remote manipulator, medical robot, RobIn Heart

Wioleta Kobiela<sup>1</sup>, Mateusz Stojko<sup>2</sup>, Paulina Musiał<sup>3</sup>, Aleksandra Moździerz<sup>4</sup>,  
Dorota Olczyk<sup>5</sup>, Małgorzata Juszko-Piekut<sup>6</sup>, Jerzy Stojko<sup>7</sup>

## Ocena kliniczna skuteczności terapeutycznej maści propolisowo-pyłkowej

### 1. Wstęp

Skóra stanowi niezwykle rozległy narząd, spełniający ważne dla ustroju funkcje. Chroni organizm przed wpływem środowiska zewnętrznego ulegając ciągłemu złuszczeniu usuwając tym samym szkodliwe dla niej substancje. Bierze udział w termoregulacji dzięki wydzielaniu potu oraz zmianom warstwie brodawkowatej skóry, której naczynia krwionośne w razie potrzeby rozszerzają się lub zwężają. Spełnia funkcję izolującą za pomocą włosów i podskórnej warstwy tłuszczowej, zawierającej w swoim składzie nie tylko tłuszcz, ale także węglowodany, białka i sole mineralne, zamieniając się na okres niedożywienia organizmu w magazyn energii. Jej zadaniem jest ponadto zatrzymanie płynów w organizmie (wyjątek stanowi regulacja temperatury ciała) jednocześnie zabezpieczając wchłonięciu większych ilości wody do organizmu.

---

<sup>1</sup> wiolakobiela@gmail.com, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>2</sup> mateusz.stojko@gmail.com, SKN przy Zakładzie Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>3</sup> paulinna.musial@gmail.com, SKN przy Zakładzie Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>4</sup> amozdzierz@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>5</sup> dolczyk@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>6</sup> mpiekut@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

<sup>7</sup> jstojko@sum.edu.pl, Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

Skóra bierze także czynny udział w przemianie wodno-elektrolitowej, a dzięki zdolności wytwarzania brązowego barwnika-melaniny pochłania promieniowanie chroniąc tym samym głębiej leżące komórki skóry przed uszkodzeniem. Dodatkową funkcją jest zapobieganie przedostaniu się bakterii do ustroju, a w przypadku skaleczenia, zranienia wytworzenie lekko kwaśnego odczynu. Jest także organem czuciowym w zakresie ucisku, dotyku, czucia bólu, temperatury [1, 2, 3, 4].

Pod względem budowy histologicznej skóra (*dermis*) składa się z trzech warstw: naskórka (*epidermidis*), skóry właściwej (*dermis/corium*) oraz tkanki podskórnej (*tela subcutanea*).

„Oparzeniem nazywa się zmiany zapalne lub martwicze powłok i tkanek powstałe w wyniku działania różnego rodzaju energii po przekroczeniu możliwości ochronnych organizmu“ [5].

Oparzenia możemy podzielić ze względu na przyczynę:

- Ciepłne:
  - gorącym płynem - najczęściej spotykane, obejmują pośrednią warstwę skóry,
  - płomieniem – zazwyczaj dotyczą pełnej grubości skóry,
  - błyskowe – w wyniku wybuchu, najczęściej występują na dłoniach/twarzy,
  - kontaktowe – u osób nieprzytomnych,
  - elektryczne – powodują nie tylko oparzenie skóry, ale także mięśni i głębszych tkanek,
- chemiczne;
- spowodowane promieniowaniem;
- mieszane [5].

Światowa Organizacja Zdrowia w 2012 roku oszacowała, iż u 195 000 osób rocznie na świecie oparzenia są przyczyną zgonu [6]. Statystycznie oparzenia gorącą cieczą i płomieniem należą do najczęściej spotykanych. Ich rokowanie zależy przede wszystkim od głębokości i powierzchni poparzonych powłok ciała. Przyjmuje się, że temperatura 42°C mająca przez 6 godzin kontakt ze skórą wywoła taką samą zmianę jak 7 minut i temperatura 47°C lub 1 minuty i 70°C.

Najczęściej stosowaną metodą pozwalającą na określenie rozległości oparzenia jest reguła dziewiątek wg Wallace'a – powierzchnia głowy, każdej z kończyn górnych wynosi 9%, tułów przedni i tylni oraz każda z kończyn dolnych stanowi 18%, a okolice narządów płciowych stanowią 1%.

Natomiast jeśli chodzi o głębokość rany oparzeniowej wyróżniamy 4 stopnie:

- stopień pierwszy – powierzchowna warstwa skóry:
  - skóra sucha, zaczerwieniona, bolesna, często łuszcząca się,

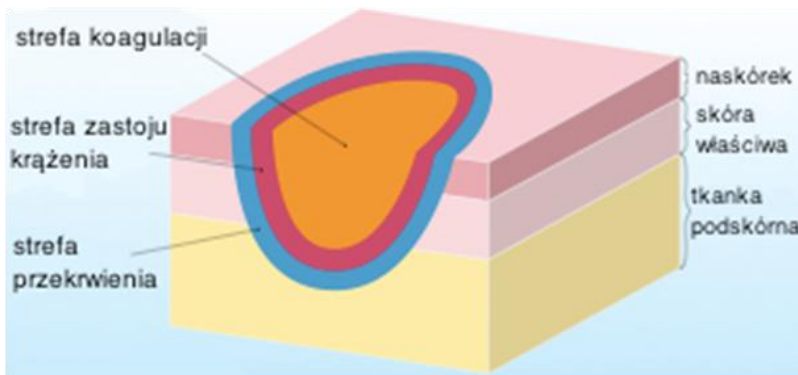
- blizna nie występuje,
- najczęściej bez pęcherzy,
- keratynocyty migrują z przydatków skóry tworząc nową warstwę nad skórą właściwą i błoną podstawną,
- stopień drugi – powierzchowna warstwa skóry:
  - skóra wilgotna, czerwona, bardzo bolesna,
  - gojenie powyżej 14 dni skutkuje bliznami przerostowymi,
  - zawsze powstają pęcherze – na dnie których występuje martwica lub skóra właściwa,
  - przydatki skóry nienaruszone,
  - jeśli powierzchnia oparzenia jest powyżej 20% osocze ucieka na zewnątrz, spada ciśnienie krwi i upośledzona zostaje perfuzja. Często dochodzi do hipoglikemii;
- stopień trzeci – pełna grubość skóry:
  - skóra sucha, twarda, woskowata, przybierająca zabarwienie białoszare lub ciemnoczerwone, niewrażliwa na ból,
  - zawsze pozostają blizny, najczęściej nadmierne bliznowacenie z przykurczami,
  - martwica obejmuje głębokie warstwy skóry właściwej z możliwością naruszenie tkanki podskórnej,
  - przydatki skóry zniszczone,
  - migracja keratynocytów z brzegów rany jako jedyny sposób próby odtworzenia nowego naskórka z możliwością wsparcia przeszczepem skóry,
- stopień czwarty – pełna grubość skóry:
  - martwica obejmuje tkankę podskórną, tłuszczową, kości i mięśnie [5, 7, 8].

Organizm, którego powierzchnia skórna uległa oparzeniu reaguje poprzez odpowiedź miejscową i ogólnoustrojową.

W przypadku miejscowej odpowiedzi ustroju można wyróżnić 3 strefy:

- Strefa koagulacji – miejsce największego uszkodzenia, będące centrum oparzenia i zawierające martwe tkanki;
- Strefa zastoju krążenia – to powierzchnia w sąsiedztwie najbardziej uszkodzonych tkanek. W tym obszarze występuje zmniejszenie perfuzji. Z powodu ciągłego niedokrwienia tkanki są narażone na uszkodzenie;
- Strefa przekrwienia – to strefa zwiększonej perfuzji, w której tkanki znajdują się najdalej od miejsca zadziałania czynnika uszkadzającego. Tkanki z tego obszaru nie ulegają bezpośredniemu uszkodzeniu, a jedynie możliwe jest zakażenie z sąsiednich okolic [9, 10].

Graficznie strefy te zostały przedstawione na rysunku 1.



Rysunek 1. Trzy strefy miejscowej odpowiedzi ustroju po oparzeniu [6]

Zazwyczaj, jeżeli powierzchnia oparzenia jest większa niż 30% powierzchni ciała dochodzi do odpowiedzi ogólnoustrojowej, w której zostaje zwiększony przepływ płynów w naczyniach krwionośnych, a białka wewnątrznaczyniowe przedostają się poza naczynie z jednoczesnym skurczem łożyska naczyniowego. Przemiana metabolitów zachodzi nawet trzykrotnie szybciej, a mediatory reakcji zapalnej powodują skurcz oskrzeli, skąd konieczność udzielenia możliwie natychmiast pierwszej pomocy [9].

Istnieje kilka sposobów leczenia rany oparzeniowej – leczenie otwarte, z zastosowaniem opatrunku lub leczenie chirurgiczne. Natomiast coraz częściej sięga się po produkty naturalne, szczególnie produkty pszczele w szczególności miód, propolis, pszczeli pyłek kwiatowy.

Niezwykle ważny i istotny dla poprawy standardów leczenia oparzeń jest odpowiedni dobór modelu badawczego. Zwraca się uwagę na kurczliwość rany, stopień epitelializacji i bliznowacenie. Sullivan i wsp. przeprowadził badanie mające na celu sprawdzenie zgodności różnych modeli badawczych w stosunku do skóry człowieka, na którą badane preparaty mają wpływać i pomagać w leczeniu oparzenia. Wykazał, iż skóra świni jest anatomicznie i fizjologicznie podobna do ludzkiej w 78%, podczas gdy u małych zwierząt podobieństwo jest w 53%. Badania *in vitro* wykazują 57% zgodność. Singer i McClain wskazali region przykręgowy jako najlepszy obszar do badań, który nie przeszkadza zwierzęciu w poruszaniu się i leżeniu [11, 12]. Bardziej szczegółowo skórą świnią jako modelem badawczym zajął się Branski i wsp. zwracając uwagę na szereg podobieństw. Grubość naskórka (zależy od lokalizacji) u świni wynosi 30-140  $\mu\text{m}$ , podczas gdy u człowieka w granicach 50-120  $\mu\text{m}$ .



Podobna jest także grubość warstwy rogowej naskórka. Unaczynnienie obu rodzajów skór jest podobne. Skład macierzy pozakomórkowej jest prawie identyczny - w obu przypadkach 95 % stanowi kolagen, a 2 % włókna elastyczne. Fakt ten jest istotny z punktu skurczów występujących po oparzeniu. Skóry te nie mają gęstego owłosienia. W przeciwieństwie do skóry gryzoni nie podlegają tak szybkiemu naskórkowaniu, a proces ten przebiega w podobnym czasie jak u człowieka [13]. Autorzy zwracają również uwagę na wielkość świni (badania najczęściej wykonywane są na świnich ważących od 40-65 kg), wskazując, że na jednym osobniku możemy wykonać kilka ran oparzeniowych i różnymi związkami je zaopatrywać [11, 13].

Udzielenie pierwszej pomocy w przypadku oparzenia ma kluczowe znaczenie w dalszym prognozowaniu. Działania te powinny obejmować możliwie najszybsze usunięcie poszkodowanego od źródła ciepła/prądu, schłodzenie miejsca, które uległo oparzeniu w czasie nie dłuższym niż 20 minut od momentu zadziałania czynnika patologicznego. Jeśli pacjent odczuwa silny ból należy podać mu doustnie dostępny środek przeciwbólowy oraz zabezpieczyć ranę w miarę możliwości jałowym opatrunkiem [9].

Jednym z czynników mających największy wpływ na gojenie się rany oparzeniowej jest zakażenie. To czynnik, który powoduje nie tylko wydłużenie się procesu gojenia, ale także może powodować śmierć pacjenta.

Rana bezpośrednio po oparzeniu jest bakteriologicznie czysta. Natomiast w wyniku zadziałania czynnika termicznego uszkodzona zostaje naturalna warstwa ochronna skóry i zostaje stworzone idealne miejsce do rozwoju mikroorganizmów pochodzących nie tylko ze środowiska zewnętrznego, ale także z fizjologicznej flory bakteryjnej tkanej sąsiadujących, przewodu pokarmowego i błon śluzowych górnych dróg oddechowych [14, 15].

Do najczęściej stosowanych preparatów w otwartej metodzie leczenia oparzeń należy krem z solą srebrową sulfatiazolu, produkowany od 1986 r. przez Zakłady Farmaceutyczne Jelfa w Zielonej Górze pod nazwą handlową Argosulfan (1 g kremu zawiera 20 mg soli srebrowej sulfatiazolu). Krem ten wykazuje szerokie spektrum działania w stosunku do bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, ze szczególnym uwzględnieniem *Pseudomonas Aeruginosa* i grzybów, bez wywoływania ich odporności. Sól srebrowa sulfatiazolu o masie cząsteczkowej 362,1 jest praktycznie nierozpuszczalna (rozpuszczalność wynosi  $0,145 \text{ mg l}^{-1}$ ) i charakteryzuje się najmniejszą rozpuszczalnością wśród połączeń srebra z innymi sulfonamidami (iloczyn rozpuszczalności wynosi  $1,58 \cdot 10^{-13}$ ). Sól ta ponadto charakteryzuje się dużą trwałością ( $\log K=4,18$ ) oraz niskim

stopniem dysocjacji ( $pK_{SO}=12,8$ ). Preparat ten, będący połączeniem atomu Srebra z sulfonamidem wykazuje niewielką toksyczność i dobrą tolerancję preparatu. Według badań przeprowadzonych na świnkach morskich w 1999 r. przez Katedrę i Zakład Farmacji Stosowanej AM w Gdańsku średnio po 7,9 dniach od momentu zakażenia rany oparzeniowej *Pseudomonas Aeruginosa*, krem Argosulfanem eliminował całkowicie tę bakterię.

Jony srebra zawarte w omawianym preparacie wiążą się do błony komórkowej mikroorganizmu zaburzając jej przewodnictwo i hamując bakteryjne enzymy oddechowe. Zaburzają także ważne procesy replikacji i ekspresji genów w komórce poprzez wiązanie się z kwasami nukleinowymi.

Niepokojącym zjawiskiem jest narastająca oporność drobnoustrojów w stosunku do jonów srebra, szczególnie tych rosnących w postaci biofilmu.

Jedynym problemem wynikającym ze stosowania tej maści wydaje się kumulacja srebra w organizmie, mogąca powodować działania niepożądane, szczególnie u osób uczulonych na sulfonamidy. Metabolizm srebra polega na tworzeniu specyficznych kompleksów srebra z proteinami, minimalizując toksyczność tego pierwiastka. W eliminacji z organizmu bierze udział wątroba oraz nerki. Największe stężenia po 6 dniowym badaniu polegającym na codziennej aplikacji kremu Argosulfan na ranę oparzeniową stwierdzono w wątrobie. Jego ilość wynosiła ponad  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  [16, 17, 18].

W czasach ogromnego rozwoju technologicznego organizm ludzki narażony jest na działanie szkodliwych czynników, powodujących jego uszkodzenie, a nawet śmierć. W związku z tym poszukuje się najskuteczniejszych metod ochrony zdrowia i leczenia najróżniejszych dolegliwości. Świadomość możliwych skutków ubocznych spowodowanych preparatami syntetycznymi powoduje coraz większe zainteresowanie produktami naturalnymi.

Pszczeli pyłek kwiatowy to zbiór męskich komórek rozrodczych roślin wyższych, powstający w pylnikach.

Produkt ten zostaje zebrany z kwiatów przez pszczoły *Apis mellifera*, wymieszany z niewielką ilością śliny lub nektaru i przeniesiony do komórek plastra w postaci obnóży. Ta postać to jedyne, naturalne źródło witamin, lipidów, białek, aminokwasów i minerałów niezbędnych do wzrostu i rozwoju pszczół.

Propolis (z języka greckiego propoliso – wyrównanie, zaklejanie) nazywany zamiennie kitem pszczelim zbierany jest przez pszczoły zarówno z pączków kwiatów jak i z kory niektórych drzew liściastych (brzoza, topola, olcha), iglastych (świerk, jodła, sosna), łądyg i młodych gałęzi, ogonków liści i kory (wierzba, śliwa, słonecznik). Ta lepka substancja o charakterystycznym gorzkim smaku przyjmuje kolory od brązowego do

żółtego. Kit pszczeli potrzebny jest pszczołom do zabezpieczania otworu wlotowego w chłodniejsze dni, uszczelniania wszelkich szczelin w ulu i korygowania nierówności wewnątrz, chroniąc ul przed drobnoustrojami, a także do przymocowania plastrów do beleczek ramek.

Propolis charakteryzuje się stosunkowo bogatym, zróżnicowanym składem chemicznym zależnym od rodzaju rośliny z której jest wytwarzany przez pszczoły, szerokości geograficznej i różnic genetycznych pszczół. W skład wchodzi: związki fenolowe, substancje lipidowo-woskowe, flawonoidy, terpeny, biopierwiastki i inne. [19, 20, 21, 22, 23, 24].

## **2. Cel pracy**

Celem i założeniami doświadczenia było uzyskanie odpowiedzi w jaki sposób przebiegały procesy naprawcze ran oparzeniowych zaopatrywanych maścią propolisowo-pyłkową z 5 % dodatkiem pszczelego pyłku kwiatowego i 5 % dodatkiem propolisu, czy dodatek ekstraktu pszczelego pyłku kwiatowego usprawnił procesy naprawcze w aspekcie badań i obserwacji klinicznych oraz czy zastosowany apiterapeutyk wykaże się wyższą skutecznością terapeutyczną w stosunku do rany oparzeniowej niż preparat Argosulfan.

## **3. Materiały i metody**

Do badań eksperymentalnych zostały wykorzystane 2 świnię rasy Biała Zwisloucha, o masie ciała około 40 kg i wieku 16 tygodni. Zarówno w okresie przystosowawczym i doświadczalnym przebywały w standardowych warunkach zoohigienicznych oraz karmione były pełnowartościową mieszanką paszową.

20-dniowe doświadczenie polegało na obserwacji i pobieraniu wycinków z ran oparzeniowych, które zostały wykonane według założeń standardowego modelu Hoekstra, zgodnego z Holenderskim Prawem Badań na Zwierzętach oraz protokołem doświadczalnym Komitetu Dobroczynności przy Uniwersytecie w Amsterdamie.

Wszystkie zabiegi inwazyjne wykonywano w znieczuleniu ogólnym.

Do premedykacji zastosowano chlorowoderek ketaminy w dawce 3mg/kg m.c. (preparat Bioketan) i chlorowoderek ksylazyny w dawce 1mg/kg m.c. (preparat Xylapan). W celu całkowitej anestezji używano soli sodowej tiopentalu w dawce 5 mg/kg m.c. (preparat Tiopental). Dla przedłużenia działania przeciwbólowego podawano Novalgina.

U każdego zwierzęcia biorącego udział w doświadczeniu wykonano 18 ran oparzeniowych skóry, wielkości 1,5 cm x 3 cm w równych odstępach po dwóch stronach kręgosłupa. W celu uzyskania rany

oparzeniowej na 10 sekund przykładano mosiężny klocek o wymiarach rany i wadze 10 dag, rozgrzany do 170°C.

Podczas całego przebiegu doświadczenia rany zaopatrywane były maścią z Argosulfanem i maścią propolisowo-pyłkową regularnie, w równych odstępach czasowych 2 razy dziennie z jednoczesną oceną stanu klinicznego. Testowane apiterapeutyki w postaci 5 % maści pyłkowej i maści propolisowo-pyłkowej (5% dodatek pszczelego pyłku kwiatowego i 5% dodatek propolisu) zostały przygotowane w Zakładzie Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Maści sporządzono na podłożu maściowym – wazelinie.

#### **4. Wyniki**

Po wykonaniu łącznie 36 ran oparzeniowych obraz kliniczny w 1 dobie był jednakowy – silne zaczerwienienie okolicy przyrannej, obrzęk, wysięk, zmiany martwicze.

Do wstępnej analizy postanowiono porównać rany w 5 dobie, w której obraz kliniczny uległ istotnemu zróżnicowaniu i w ostatniej, 20 dobie eksperymentu.

W 5 dobie doświadczenia rana oparzeniowa, która nie była niczym zaopatrywana wykazywała duży obrzęk z widocznym stanem zapalnym wokół rany. Strup był twardy, mocno przytwierdzony do rany.

W okolicy przyrannej rany oparzeniowej zaopatrywanej kremem Argosulfan stwierdzono występowanie stanu zapalnego, bez obecności płynu wysiękowego w ranie. Strup był twardy, mocno przylegający do rany. W miejscach odsłonięcia strupa widoczny rozpoczęty proces gojenia.

W ranie oparzeniowej, która była zaopatrywana maścią propolisowo-pyłkową stwierdzono brak obrzęku i stanu zapalnego okolicy przyrannej. Strup był zdecydowanie cieńszy niż w przypadku ran grupy K. Zauważalne rozpoczęte procesy gojenia.

W 20 dobie po wykonaniu ran oparzeniowych analizując wygląd rany niczym nie smarowanej przez cały okres trwania doświadczenia stwierdzono obecność grubego, twardego strupa przylegającego miejscami do rany. Brak był natomiast obrzęku i stanu zapalnego.

Rana z Argosulfanem charakteryzowała się odchodzącym strupem od rany z widoczną ziarniną pod. Brak obrzęku i cech stanu zapalnego. Nie stwierdzono zmniejszenia obszaru rany.

Analizując obraz rany zaopatrywanej maścią propolisowo-pyłkową zaobserwowano brak stanu zapalnego i obrzęku. Wielkość rany uległa zmniejszeniu z jednoczesnym brakiem strupa i widocznym

zaawansowanym procesem epitelializacji. W centralnym miejscu rany zauważono miejscowe niezasklepienie się rany.

Wyniki zebrano w tabeli 1 i tabeli 2.

Tabela 1. Makroskopowe porównanie ran w 5 dobie po oparzeniu

Podgrupa badawcza	Zmiany makroskopowe
K1	Twardy strup, okolica przyrana nadal obrzęknięta, widoczny stan zapalny w okolicy przyrannej
K2	Strup nieco cieńszy niż w przypadku rany K1, pod strupem zauważalna ziarnina, widoczny stan zapalny w okolicy przyrannej
D1	Obrzęk i stan zapalny okolicy przyrannej niewidoczny, miejscami cienki i elastyczny strup, widoczna ziarnina,

Źródło: opracowanie własne

Tabela 2. Makroskopowe porównanie ran w 20 dobie po oparzeniu

Podgrupa badawcza	Zmiany makroskopowe
K1	Twardy strup, silnie przylegający w części centralnej rany, widoczny stan zapalny w okolicy przyrannej, pod strupem widoczna ziarnina
K2	Strup elastyczny, odchodzący od brzegów rany, pod strupem widoczna ziarnina, brak obrzęku i stanu zapalnego
D1	Brak strupa, rana pokryta różowym nabłonkiem, powierzchnia rany uległa znacznemu zmniejszeniu, widoczne cechy wygojenia, brak obrzęku i stanu zapalnego okolicy przyrannej

Źródło: opracowanie własne

## 5. Wnioski

W efekcie przeprowadzonych wstępnych obserwacji klinicznych wyciągnięto następujące wstępne wnioski:

- zastosowany apiterapeutyk usprawnił procesy naprawcze w obrębie rany oparzeniowej;
- wykazano większą skuteczność naprawczą badanego preparatu w porównaniu do rutynowo stosowanego kremu Argosulfan;
- nie zaobserwowano w warunkach klinicznych żadnych objawów niepożądanych;
- całkowita ocena skuteczności terapeutycznej maści propolisowo-pyłkowej wymaga dalszych zaplanowanych na kolejnych etapach badań doświadczalnych analiz laboratoryjnych pod postacią: badań histopatologicznych oraz oznaczeń immunohistochemicznych markerów tkanki łącznej.

## Literatura:

1. Sawicki W. *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, (2008), s. 144-155
2. Lippert H. *Anatomia*, Urban&Partner, Tom I (1998), s. 82-95
3. Stevens A., Lowe J. *Histologia*, Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, (1994), s. 348-353
4. Adamski Z., Kaszuba A. *Dermatologia dla kosmetologów*, Elsevier Urban & Partner, (2010), s. 3-9
5. Strużyna J. *Wczesne leczenie oparzeń*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, (2006), s. 15-316
6. Murphy F., Amblum J. *Treatment for burn blisters: debride or leave intact*, *Emergency Nurse*, 22 (2014), s. 24-27
7. Christophers E., Stander M. *Zarys dermatologii i wenerologii*, Urban&Partner, (1999), s. 159-160
8. Stevens A., Lowe J. *Patologia*, Lublin: Czelej, (2004), s. 142-143.
9. Hettiaratchy S., Dziwulski P. *ABC oparzeń*, Górnicki Wydawnictwo Medyczne, (2007), s.1-26
10. Tiwari V. *Burn wound: How it differs from other wounds?*, *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45 (2012), s. 364-373
11. Iddelkoop E., Van den Bogaerdt A. *Porcine wound models for skin substitution and burn treatment*, *Biomaterials*, 25 (2004), s. 1559-1567
12. Shi-Yuan S., Wen-Ling W. *The pig as an experimental model for mid-dermal burns research*, *Burns*, 40 (2014), s.1679-1688
13. Branski K. L., Mittermayr R. *A porcine model of full-thickness burn, excision and skin autografting*, *Burns*, 34 (2008), s. 1119-1127
14. Szmytkowska K. *Assessment of burn wound bacteriology in heat injuries treated with Silver Sulphadiazine vs. Glycerol-preserved human skin allografts*, *Surg Childh Int*, 10 (2002), s. 81-84

15. Sikora A., Ziółkowski G., Niedźwiadek J. *Zakażenie rany oparzeniowej w aspekcie mikrobiologicznym*, Sepsis, 2 (2009), s. 89-93
16. Stożkowska W., Janici S. *Ocena biofarmaceutyczna preparatów z solą srebrną sulfatiazolu przeznaczonych do leczenia oparzeń*, Dermatologia Kliniczna i Zabiegowa, 1 (1999), s.53-57
17. Marszałek B., Daniluk-Matras I. *Porównawcza ocena bakteriologiczna ran oparzeniowych leczonych Argosulfanem i skórą ludzką konserwowaną. Bydgoskie Zeszyty Lekarskie*, 10 (1995), s. 27-29
18. Kurnatowski W. *Zastosowanie Preparatu Argosulfan do miejscowego leczenia Ran Oparzeniowych i Owrzodzeń skóry*, Ter Lek, 38 (1988), s. 2
19. Tichonow A., Sodzawiczny K. *Pylek kwiatowy - obnóże pszczele w farmacji i medycynie. Teoria, technologia, zastosowanie lecznicze*, Apipol-Farma, (2008), s. 12-40, 79-86
20. Olczyk P., Komosińska-Vassev K., Olczyk K. *Propolis-skład chemiczny, właściwości, zastosowanie*, Farmacja Polska, 63 (2007), s.1103-1106
21. Oberrisser W. *Miód, propolis, pyłek, воск*, Multico Oficyna Wydawnicza, (2009), s.7-62
22. Kędzia B., Holderna-Kędzia E. *Produkty pszczele w żywieniu i suplementacji diety*, Postępy Fitoterapii, 4 (2006), s. 213-222
23. Ulusoy E., Kolayli S. *Phenolic composition and antioxidant properties od Anzer Bee Pollen*, Journal of Food Biochemistry, 38 (2014), s. 73-82
24. Kędzia B., Kolderna-Kędzia E. *Właściwości biologiczne i działanie lecznicze pyłku kwiatowego zbieranego przez pszczoły*, Postępy Fitoterapii, (2005), s. 3-4, 103-108

## **Ocena kliniczna skuteczności terapeutycznej maści propolisowo-pyłkowej**

### Streszczenie

Światowa Organizacja Zdrowia w 2012 roku oszacowała, iż u 195 000 osób rocznie na świecie przyczyną zgonu są oparzenia. Statystycznie oparzenia gorącą cieczą i płomieniem należą do najczęściej spotykanych. Coraz częściej w leczeniu oparzeń sięga się po produkty naturalne, szczególnie produkty pszczele w szczególności miód, propolis, pszczeli pyłek kwiatowy.

Do badań eksperymentalnych zostały wykorzystane 2 świny rasy Biała Zwisloucha, o masie ciała około 40 kg i wieku 16 tygodni. Doświadczenie trwało 20 dni i polegało na obserwacji i pobieraniu wycinków z ran oparzeniowych, które zostały wykonane według założeń standardowego modelu Hoekstra. Każdego dnia 2 razy dziennie rany zaopatrywano maścią propolisowo-pyłkową i Argosulfanem – złotym standardem w leczeniu oparzeń.

W efekcie przeprowadzonych wstępnych obserwacji klinicznych wyciągnięto następujące wstępne wnioski: zastosowany apiterapeutyk usprawnił procesy naprawcze w obrębie rany oparzeniowej.

Wykazano większą skuteczność naprawczą badanego preparatu w porównaniu do rutynowo stosowanego kremu Argosulfan I nie zaobserwowano w warunkach klinicznych żadnych objawów niepożądanych.

Słowa kluczowe: oparzenia, świnia, skóra, propolis, pszczeli pyłek kwiatowy

## **Clinical evaluation of the therapeutic effectiveness of an propolis-bee pollen ointment**

### **Abstract**

The World Health Organization in 2012 year estimated that 195 000 people per year in the world are burned. Statistically scalding hot liquid and flame are among the most common. Natural products, especially products in particular honey jelly, propolis, beepollen are more and more often used in the treatment of burns. For the experimental tests have been used two pigs race Biała Zwisłoucha, weighing about 40 kg and aged 16 weeks. The experiment lasted 20 days and involved the observation and the collection of extracts from burn wounds that have been made according to the standard Hoekstra model. Every day, 2 times a day wound supplied – propolis-bee pollen ointment and Argosulfan - the gold standard in the treatment of burns.

As a result, conducted preliminary clinical observations drawn the following preliminary conclusions: tested ointment improved repair processes within the burn wound. Was more effective repair of the test formulation compared to the cream routinely used Argosulfan and not observed in clinical conditions no adverse effects.

Keywords: burns, pig, skin, propolis, bee pollen



## **Wpływ fazy przedanalizycznej na wynik badania laboratoryjnego**

### **1. Wstęp**

Dokładne rozpoznanie choroby możliwe jest dzięki prężnemu rozwojowi nauki. Nowoczesne metody diagnostyki laboratoryjnej opierają się na skomplikowanej aparaturze pomiarowej, dzięki której istnieje możliwość dokładniejszej diagnozy, co z kolei przyczynia się do wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego. Dlatego też wyniki badań muszą być wiarygodne. Tak naprawdę tylko takie wyniki stanowią źródło informacji o faktycznym stanie klinicznym pacjenta. W związku z tym, konieczne jest przestrzeganie określonych procedur dotyczących postępowania z materiałem biologicznym. W każdym laboratorium medycznym funkcjonuje system kontroli jakości, co daje gwarancje poprawności analitycznej wyniku. Cały proces badania laboratoryjnego można podzielić na trzy główne etapy: przedlaboratoryjny, laboratoryjny i polaboratoryjny. Aby unikać błędów na wszystkich etapach postępowania diagnostycznego, należy poznać czynniki, które mają wpływ na wiarygodność badań. Już na samym początku procesu diagnostycznego ogromne znaczenie ma prawidłowe przygotowanie się pacjenta do badania. Istotne jest także dobranie odpowiedniej probówki z antykoagulantem, prawidłowe jej opisanie, użycie odpowiedniej techniki pobierania krwi na poszczególne badania, przechowywanie oraz transport pobranego materiału biologicznego. Popelniane błędy na etapie przedlaboratoryjnym uniemożliwiają niestety uzyskanie prawidłowych wyników i szacuje się, że mogą one stanowić 46–68,2% wszystkich popełnianych błędów. Błędy przedanalizyczne często są związane z nieprzestrzeganiem procedur pobierania, przechowywania i transportu materiału biologicznego do laboratorium, a także z nieprawidłowym przygotowaniem pacjenta do badań. Ponadto mają one również związek z wieloma zjawiskami fizjologicznymi które dotyczą chorego (ciąża, cykl miesięczny) [1].

---

<sup>1</sup>magdalenaosiak@op.pl, Zakład Genetyki Klinicznej, I Wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

<sup>2</sup>natalia.pajak@op.pl, Zakład Genetyki Klinicznej, I Wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

Należy pamiętać, że zgodny ze stanem klinicznym pacjenta wynik, to składowa wielu czynników, każdego z etapów diagnostyki laboratoryjnej. Momentem rozpoczęcia procesu badania diagnostycznego jest już samo jego zlecenie. Kolejne etapy analizy materiału biologicznego to przygotowanie pacjenta, przygotowanie i opisanie próbek, pobranie materiału do badań, analiza, uzyskanie i interpretacja wyniku.

## **2. Czynniki mające wpływ na wynik badania laboratoryjnego związane bezpośrednio z pacjentem**

### **2.1. Wiek i płeć**

Bardzo ważną informacją, znajdującą się na zleceniu badań jest płeć i wiek pacjenta. Dla wielu oznaczanych parametrów zakres norm różni się w zależności od płci oraz od wieku badanego. Wiek może wpływać na zmiany stężenia różnych składników krwi (noworodki, niemowlęta, dzieci w wieku szkolnym, osoby w podeszłym wieku). U noworodków można zaobserwować zmiany w liczbie erytrocytów i w stężeniu hemoglobiny, gdzie notuje się znacznie wyższe wartości w porównaniu do wartości u osób dorosłych. Po narodzinach, w ciągu kilku pierwszych dni, obserwuje się w tętnicach podwyższone ciśnienie parcjalne tlenu, a co za tym idzie dochodzi do szybkiego niszczenia erytrocytów. W wyniku tego procesu, zawartość wolnej hemoglobiny wzrasta, a to z kolei prowadzi do wzrostu stężenia bilirubiny. Bilirubina jest produktem metabolizmu hemu (głównie hemoglobiny, z której rozpadu pochodzi 80% dobowej produkcji bilirubiny) znajdującego się w krwinkach czerwonych. W osoczu krwi znajduje się zarówno bilirubina wolna jak i bilirubina sprzężona. Obie te frakcje składają się na bilirubinę całkowitą. Bilirubina wolna (inaczej bilirubina pośrednia) powstaje z hemu po rozpadzie krwinek czerwonych, łączy się z białkami krwi (dokładnie z albuminami), a następnie jest wychwytywana przez komórki wątroby, gdzie sprzężana jest z kwasem glukuronowym. Taka sprzężona bilirubina, nazywana bilirubiną bezpośrednią, zostaje wydalona następnie do żółci.

Wiadomym jest, że u noworodków nie jest w pełni rozwinięta funkcja wątroby, głównie mechanizmy wątrobowego sprzężania bilirubiny są jeszcze niedojrzałe, dlatego też obserwowany jest wzrost stężenia bilirubiny [1-4].

Innym parametrem, zależnym od wieku, jest aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP). Izofорма kostna ALP jest produkowana i uwalniana przez aktywne osteoblasty. Uczestniczy w procesie mineralizacji kości. Największy wzrost aktywności tego enzymu jest obserwowany w okresie wzrostu kostnego (12-14 lat) [2, 4].

Sztandarowym przykładem parametru, którego stężenie jest skorelowane z wiekiem, jest bez wątpienia cholesterol całkowity i LDL-cholesterol, których stężenie wzrasta wraz z wiekiem badanego pacjenta. W przypadku tych parametrów różnice w stężeniu są także związane z płcią [2, 6].

Poza wyżej wymienionym przykładem i poza poziomem hormonów płciowych, wiele parametrów biochemicznych i hematologicznych jest powiązanych z płcią. Różnice można stwierdzić między innymi w stężeniu hemoglobiny, żelaza, kreatyniny, aktywności kinazy kreatyny oraz w wartościach hematokrytu.

Oznaczanie stężenia hemoglobiny jest jedną ze składowych badania morfologii krwi, będącym podstawowym badaniem stosowanym w hematologii. Hemoglobina (Hb, HGB) jest białkiem zawartym w erytrocytach, którego zasadniczą funkcją jest przenoszenie tlenu z płuc do tkanek organizmu. Poziom hemoglobiny, zależny także od wieku, u kobiet jest mniejszy, ze względu na comiesięczną utratę pewnych ilości krwi podczas krwawienia miesięczkowego. Prawidłowe stężenie hemoglobiny dla osób dorosłych wynosi u kobiet 11-15 g/dl, a u mężczyzn 12-17 g/dl. Innym parametrem, oznaczanym w morfologii krwi jest hematokryt, który dostarcza informacji, jaki procent krwi stanowią elementy morfotyczne (konkretnie erytrocyty). Wartości hematokrytu (HCT) są różne w zależności nie tylko od płci, ale także wieku badanej osoby. Dla dorosłych normy hematokrytu to 37-47% u kobiet oraz 40-45% u mężczyzn. Wyjątkowo wysokie wartości hematokrytu występują fizjologicznie u noworodków. W pierwszych dniach życia parametr ten może sięgać nawet 60% [2, 4, 5].

Z kolei jeśli chodzi o różnice, które występują w poziomie żelaza we krwi kobiet i mężczyzn, stają się nieistotne po przekroczeniu 65 roku życia [2].

Aktywność kinazy kreatynowej (CK) i stężenie kreatyniny to kolejne przykłady parametrów zależnych od płci. CK jest enzymem obecnym w komórkach różnych tkanek. Występuje zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach, katalizując odwracalną reakcję fosforylacji kreatyny. Szczególnie wysoką aktywność CK obserwuje się w komórkach, które cechują się nasilonym metabolizmem energetycznym. Największą zawartość CK stwierdza się w mięśniach szkieletowych. U mężczyzn zwykle poziom masy mięśniowej jest wyższy, dlatego też aktywność CK jest wyższa [2, 4].

## **2.2. Rasa**

Bez wątpienia rasa ma wpływ na wynik niektórych parametrów laboratoryjnych i należy ją uwzględnić przy interpretacji wyniku badania. U Afroamerykanów (obu płci) obserwuje się znacznie niższą liczbę

leukocytów we krwi, w porównaniu z pacjentami rasy europejskiej. Różnica ta jest spowodowana niższą liczbą granulocytów. W przypadku liczby monocytów jest odwrotnie – wyższa ich liczba występuje u rasy afroamerykańskiej. Natomiast zawartość hemoglobiny, hematokryt, czy też liczba limfocytów jest porównywalna u obu ras. Ponadto znaczne różnice wykazano w stężeniu witaminy B12, które było 1,35 razy wyższe u rasy afrykańskiej w porównaniu z rasą europejską [2].

### **2.3. Dieta i głodzenie**

Powszechnie wiadomo, że dieta jest jednym z głównych czynników fazy przedanalizycznej, wpływających na szereg parametrów laboratoryjnych. Przyjęcie pojedynczego, nawet niskokalorycznego posiłku przed pobraniem krwi do badań, w istotny sposób zmienia poziom wielu oznaczanych rutynowo parametrów, prowadząc z reguły do wzrostu ich stężenia (np. wzrost stężenia glukozy, trójglicerydów) lub może wiązać się z ogólnoustrojową reakcją na posiłek lub spożywane pokarmy (wzrost OB, wzrost leukocytozy, spadek stężenia fosforanów). Zmiany w wynikach badań mogą być spowodowane wchłanianiem mierzonych substancji (np. glukoza, trójglicerydy, aminokwasy), ich metabolizmem (mocznik, amoniak, frakcje lipidowe) lub regulacją metabolizmu związaną z przyjęciem posiłku lub jego brakiem (kwas moczowy, związki ketonowe, niektóre enzymy). Przykładem wpływu posiłku na badany parametr może być stosowanie diety bogatobiałkowej i wysokopurynowej, która wpływa na podwyższenie poziomu amoniaku, mocznika i kwasu moczowego. Z kolei dieta ubogobiałkowa skutkuje obniżeniem stężenia prealbuminy i białka wiążącego retinol [2, 6]. W wyniku długotrwałego, trwającego ponad cztery tygodnie głodzenia, we krwi można zaobserwować obniżenie stężenia między innymi cholesterolu, trójglicerydów oraz mocznika. Z kolei stężenie kreatyniny i kwasu moczowego ulega podwyższeniu [2].

Zależność stężenia wielu substancji od ostatniego posiłku, stworzyła konieczność standaryzacji sposobu przygotowania się pacjenta do pobrania materiału do badań. W dniu poprzedzającym badanie należy stosować normalną dietę, spożyć wieczorny posiłek (bez tłustych, kalorycznych dań), zwłaszcza w przypadku badań poziomu glukozy i lipidogramu. W tych przypadkach zalecane jest powstrzymanie się od posiłku przez 14 godzin przed badaniem, kobiety w ciąży ok. 6. W dniu badania pacjent powinien pozostawać na czczo, to znaczy powstrzymać się od posiłku przez około 12 godzin przed badaniem. Dopuszczalne jest przyjęcie niewielkich ilości wody, natomiast nie wolno nic jeść, a nawet żuć gumy [4].

### **2.3.1. Kawa**

Kawa, a właściwie kofeina zawarta w tym napoju może wpływać na poziom niektórych parametrów. Źródłem kofeiny jest nie tylko kawa, ale może być nim również herbata, kakao, liście ostrokrzewu paragwajskiego (yerba mate) i nasiona guarany. Kofeina wpływa na wzrost wartości przesączania kłębuszkowego (GFR) i na spadek wchłaniania zwrotnego elektrolitów w kanalikach nerkowych na skutek zahamowania nerkowych receptorów adenozyliny. Skutkiem działania kofeiny jest także wzrost stężenia glukozy we krwi, który może następować na dwóch drogach. Pierwszą z nich jest inhibicja fosfodwuestraz, które odpowiadają za degradację cAMP (cyklicznego AMP). cAMP inicjuje w ten sposób glikogenolizę. Ponadto stężenie glukozy wzrasta na drodze glukoneogenezy, która jest stymulowana przez adrenalinę. Kofeina podnosi poziom wolnych kwasów tłuszczowych na drodze aktywacji lipazy. Wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych powoduje tzw. efekt wypierania, który znacznie utrudnia oznaczanie hormonów i leków wiążących się z albuminą. Okazuje się jednak, że kofeina nie jest odpowiedzialna za znamienne zmiany w lipidogramie. W kawie oprócz kofeiny istnieją jeszcze dwa związki – cafestol i kahweol, odpowiedzialne za wzrost stężenia cholesterolu całkowitego i LDL w surowicy osób pijących ten napój [2,7,8].

### **2.3.2. Alkohol (alkohol etylowy)**

Wpływ oddziaływania alkoholu etylowego na organizm ludzki zależy od ilości wypitego alkoholu, osobniczych predyspozycji oraz czasu systematycznego spożywania. Niektóre z tych zmiennych są stosowane do diagnozowania i monitorowania leczenia uzależnienia od alkoholu. Zmiany obserwowane po spożyciu alkoholu możemy podzielić na dwie grupy: ostre i przewlekłe.

Po pojedynczym spożyciu alkoholu przejściowo możemy obserwować występowanie kwasicy mleczanowej, ketonemi, hiperlipidemii, a synteza albuminy w wątrobie zostaje zahamowana. Jednak systematyczne przyjmowanie etanolu skutkuje osłabieniem całkowitej syntezy białek i glikoprotein. W wyniku jednorazowego przedawkowania etanolu dochodzi do inhibicji glukoneogenezy w wątrobie, przez to poziom glukozy w surowicy spada, a wzrasta stężenie mleczanów. Etanol zostaje metabolizowany do aldehydu octowego, a następnie do octanu czego efektem jest tworzenie w wątrobie kwasu moczowego. Dodatkowo octany i mleczany obniżają poziom wodorowęglanów czego skutkiem jest kwasica metaboliczna [9-10].

Przewlekłe efekty działania etanolu obserwowane są u osób uzależnionych i dotyczą one głównie aktywności enzymów wątrobowych. W tych przypadkach obserwowany jest wzrost aktywności gamma-glutamylotransferazy (GGT). Na skutek działania hepatotoksycznego etanolu dochodzi do wzrostu aktywności dehydrogenazy glutaminowej (GDH) oraz aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej, a także poziomu bilirubiny. U osób uzależnionych obserwowane jest zaburzenie degradacji triglicerydów we krwi, a przez to ich poziom jest podwyższony. Przewlekłe działanie alkoholu etylowego na komórki szpiku podczas erytropoezy prowadzi do podwyższenia średniej objętości krwinki czerwonej (MCV). Przyczyną zmian w morfologii krwinki czerwonej mogą być spowodowane niedoborem kwasu foliowego oraz witaminy B12. Związane jest to z zaburzeniami wchłaniania u osób uzależnionych [9, 10, 11].

W związku z tym ogólnym zaleceniem jest, aby krew do analizy była oddawana przynajmniej po dwóch dobach od spożycia alkoholu etylowego [11, 12].

### **2.3.3. Papierosy**

Natężenie zmian w badaniu laboratoryjnym po paleniu papierosów jest uzależnione od ilości i postaci wypalonego tytoniu (papierosy, cygaro) a także od techniki palenia. Niektóre z parametrów zmieniają się niezwykle szybko, podczas gdy zmiana innych następuje bardzo powoli. Nawet wypalenie jednego papierosa w drodze do laboratorium może mieć ogromny wpływ na wynik analizy. Podczas godziny od wypalenia 1-5 papierosów obserwujemy wzrost poziomu adrenaliny, aldosteronu, kortyzolu, kwasów tłuszczowych i wolnego glicerolu. U osób uzależnionych od nikotyny, długotrwale palących papierosy obniżony jest poziom HDL, konwertazy angiotensyny (ACE), prolaktyny, beta-karotenoidów i selenu. Jednocześnie odnotowywany jest wzrost poziomu LDL, erytrocytów (RBC), hematokrytu, MCV, białych krwinek (głównie monocyty, limfocyty, neutrofile), ołowiu, fibrynogenu, miedzi, kadmu i CEA (nawet dwa razy wyższy niż u osób niepalących) [2,8].

### **2.4. Aktywność fizyczna**

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na poprawność wyników jest stopień pobudzenia organizmu wywołany wysiłkiem fizycznym przed badaniem. Krew do badań laboratoryjnych nie powinna zostać pobrana od osób, które w ostatnich godzinach były narażone na wysiłek fizyczny. Aktywność fizyczna w okresie poprzedzającym badanie ma wpływ na wiele parametrów diagnostycznych. Wysiłek o umiarkowanej intensywności może obniżyć stężenie glukozy, cholesterolu i trójglicerydów. Z kolei nadmierny

wysiłek fizyczny, przekraczający normalne wytrenowanie pacjenta, prowadzi do wzrostu stężenia białka, albumin, kreatyniny, kwasu moczowego, fosforanów, oraz enzymów pochodzenia mięśniowego, takich jak: kinaza kreatynowa aminotransferaza asparaginowa (AspAT) i dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Natomiast stężenie tyroksyny się obniża. Nawet w przypadku jednorazowego wysiłku (proporcjonalnie do jego intensywności) dochodzi do zmniejszenia się objętości osocza, czego konsekwencją jest zwiększenie jego osmolalności i podwyższenie stężenia hematokrytu. Jednorazowy, lecz intensywny wysiłek może powodować uszkodzenie erytrocytów. Dlatego też we krwi pobranej bezpośrednio po wysiłku stwierdza się hemolizę powysiłkową.

## **2.5. Wysokość nad poziomem morza**

Niektóre parametry zmieniają swe wartości w zależności od wysokości nad poziomem morza. Adaptacja organizmu do wysokości trwa zazwyczaj kilka tygodni, natomiast zaledwie kilka dni trwa powrót do wartości, które są typowe dla poziomu morza. Na dużych wysokościach można zaobserwować istotny wzrost stężenia (nawet do 65%) białka C-reaktywnego (CRP). CRP jest silnie reagującym białkiem ostrej fazy, którego stężenie już po dwóch godzinach od urazu lub zakażenia, może wzrosnąć 20-krotnie, a przy nasileniu odczynu zapalnego, po 48 godzinach może osiągnąć stężenie 100-krotnie wyższe. Inne parametry których wzrost stężenia obserwuje się na dużych wysokościach to:  $\beta 2$  globulina (wzrost do 43%), hematokryt i hemoglobina (wzrost do 8%). Z kolei wraz ze wzrostem wysokości nad poziomem morza spadek wartości parametrów dotyczy: osmolalności surowicy, aktywności reninowej osocza oraz stężenia transferryny w surowicy (białko odpowiedzialne w organizmie za przenoszenie jonów żelaza do tkanek). Z reguły badanie na osmolalność surowicy wykonywane jest po to, by ocenić gospodarkę wodno-elektrolitową oraz by rozpoznać hiponatremię (niski poziom sodu) [2,4].

## **2.6. Rytm dobowe**

Poziom niektórych parametrów krwi znacznie zmienia się w zależności od pory dnia. Sztandarowym parametrem, który podlega rytmom dobowym jest poziom kortyzolu. Najwyższe stężenia kortyzolu obserwujemy w godzinach porannych, a najniższe w późnych godzinach wieczornych. Zmiany okołodobowe kortyzolu może doprowadzić do otrzymania niewiarygodnego wyniku doustnego testu tolerancji glukozy, gdy będzie on wykonywany w godzinach popołudniowych. Pora wykonania badania ma wpływ na oznaczenie niektórych jonów. Zawartość  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$  we krwi jest najniższa w nocy, a najwyższa w godzinach rannych. Natomiast

stężenie fosforanów wykazuje maksimum nocą, a rano przyjmuje wartości najniższe. Dodatkowo wartość procentowa żelaza osiąga szczyt w godzinach popołudniowych, a minimum około północy. Z tego względu przedziały wartości referencyjnych, dla parametrów diagnostycznych opracowuje się na podstawie stężeń otrzymanych pomiędzy godziną 7 a 9 rano [2].

Omawiając wpływ rytmu dobowego na wynik badania laboratoryjnego, należy jeszcze wspomnieć o rytmie sezonowym, czyli zmienności spowodowaną porą roku. Obserwuje się, że poziom trójiodotyroniny (T3) jest o 1/5 niższy w lecie porównując do zimy, natomiast 25-hydroksycholekalcyferol wykazuje wyższe stężenie w surowicy latem [2].

## **2.7. Cykl menstruacyjny**

Oprócz parametrów typowych zmieniających się podczas cyklu miesięcznego jakimi są hormony płciowe, inne parametry możemy też odnotowywać w zmienionych ilościach. Hormony takie jak hormon folikulotropowy, hormon luteotropowy, estrogeny i progesteron posiadają w trakcie cyklu swój specyficzny profil, który zmienia się praktycznie każdego dnia. Niektóre parametry, mogą zmieniać się w zależności właśnie od tych hormonów, przykładowo stężenie aldosteronu w osoczu jest prawie dwukrotnie wyższe przed owulacją w porównaniu do fazy folikularnej. Tak samo renina wykazuje znaczny wzrost tuż przed owulacją. Natomiast poziom cholesterolu podczas owulacji spada. W trakcie krwawienia miesięczkowego obniżeniu ulegają stężenia żelaza i fosforanów [2].

## **3. Wpływ właściwego pobrania krwi na wynik badania laboratoryjnego**

Obecnie dostępnych jest na rynku wiele zestawów do szybkiego pobierania krwi. Są to próbówki opatrzone kolorowym korkiem w zależności od zawierającego antykoagulantu, bądź aktywatora krzepnięcia. Istotny jest nie tylko właściwy dobór antykoagulantu do zleconych badań, ale również kolejność pobierania krwi do różnych probówek. Prawidłowa kolejność napelnianych probówek zapobiega otrzymaniu nieprawidłowych wyników niektórych badań no stężenia potasu, wapnia czy wartości INR (znormalizowany czas protrombinowy).

Według zaleceń CLSI (ClinicalLaboratoryStandardsInstitute) prawidłowa kolejność pobierania poszczególnych próbek przedstawia się następująco:

- próbówka na posiew krwi;
- próbówka z cytrynianem (najpierw na OB, potem badania koagulologiczne);
- próbówka przeznaczona do uzyskania surowicy;



- próbówka z heparyną;
- próbówka z EDTA;
- próbówka z inhibitorem glikolizy.

Próbka pobierana do badań koagulologicznych musi być zawsze pobrana przed próbką na skrzep, z tego względu, że obecne w próbkach w których uzyskujemy surowicę stosowane są aktywatory krzepnięcia. Ewentualna kontaminacja aktywatorem krzepnięcia próbki na badania koagulologiczne może zafałszować wynik. Z kolei próbówka z zawierająca EDTA powinna być napełniana po próbce na skrzep. Pobranie krwi na EDTA przed próbką przeznaczoną do uzyskania surowicy, może wpłynąć na zafałszowanie (podwyższenie) poziomu potasu w oznaczanej próbce [14].

W zależności od firmy produkującej próbówki do pobierania krwi kolory korków mogą nieznacznie się różnić między sobą. Generalnie przyjmuje się, że próbówki do uzyskanie surowicy mają korek czerwony i mogą być dostępne w trzech wersjach: z aktywatorem wykrzepiania, granulatem i żelom separującym. Próbówki do koagulologii zawierają buforowany roztwór cytrynianu sodowego o stężeniu 3,2% i 3,8% posiadają one korek jasnoniebieski. Próbówki z zielonym korkiem zawierają heparynę sodową lub litową, są powszechnie używane do analizy osocza w chemii klinicznej. Korek fioletowy oznacza, że w próbce znajduje się wersenian potasu (K2EDTA lub K3EDTA). Próbówki z EDTA są stosowane do analizy hematologicznej krwi pełnej i niektórych badań biochemicznych. Do tego podstawowego zestawu próbek często dodaje się jeszcze jedną zawierającą fluorek sodu w celu oznaczenia poziomu glukozy, posiada ona korek szary. Poziom glukozy w próbce pobranej na skrzep bardzo szybko się obniża, gdyż jest zużywana przez komórki krwi znajdujące się w skrzepie. Fluorek sodu jest inhibitorem glikolizy i pozwala na utrzymanie poziomu glukozy nawet do 24 godzin [13, 14].

#### **4. Wpływ warunków transportu na wynik badania laboratoryjnego**

Wiarygodność wyniku analizy w dużym stopniu jest też uzależniona od warunków i sposobu transportu. Krew oddana na różne badania posiada odmienne zalecenia co do temperatury i czasu trwania transportu. Również istotnym elementem dotyczącym transportu jest prawidłowe oznakowanie i zabezpieczenie materiału biologicznego. Każde próbka uzyskana od pacjenta powinna być właściwie opisana lub wyraźnie oznakowana pozwalając na jednoznaczną identyfikację. Wszystkie próbki powinny być transportowane w specjalnych do tego celu przeznaczonych pojemnikach uniemożliwiających ich mechaniczne uszkodzenie.

Opracowano kilka istotnych zasad dotyczących prawidłowego transportu próbek z materiałem biologicznym. Pierwszą z nich jest delikatne obchodzenie się z próbkami. Intensywne wstrząsanie próbki krwi może przyczynić się do powstania hemolizy, a tym samym niekorzystnie wpływać na oznaczane parametry. W przypadku próbek na surowicę i osocze, najlepiej jest gdy zostaną one odwirowane w ciągu godziny od pobrania, a następnie dostarczone do laboratorium w ciągu kolejnych 45 minut. Należy pamiętać również o tym, że niektóre oznaczane parametry (porfiryny, bilirubina, kwas foliowy, kinaza kreatynowa) mogą ulec degradacji pod wpływem promieni słonecznych. Dlatego pojemniki do transportu powinny być szczelne i nieprzezroczyste. W przypadku badań molekularnych transport krwi nie powinien przekraczać dłużej niż 24 godziny od pobrania. Próbki powinny być przetransportowane w specjalnej przenośnej lodówce lub w pojemniku styropianowym z wkładami chłodzącymi w specjalnych statywach. Unika się również mrożenia próbek krwi, aby nie doszło do lizy i uszkodzenia komórek. W przypadku niektórych badań mikrobiologicznych próbkę można umieścić w pojemniku zawierającym podłoże transportowe, które wydłuża czas transportu nawet do 24 godzin [2, 15].

## 5. Podsumowanie

Uzyskanie rzetelnego wyniku badania laboratoryjnego jest składową zastosowania właściwej wystandaryzowanej metody badawczej oraz odpowiedniej jakości próbek. Należy pamiętać że krew do badań jest szczególnie narażona na wpływ wielu czynników, które w istotny sposób mogą zmieniać wartość wyniku. Istnieje wiele czynników niezwiązanych bezpośrednio z wykonaniem analizy, które w istotny sposób wpływają na interpretację badań laboratoryjnych. Mogą być one związane z niewłaściwym przygotowaniem pacjenta do badań, błędnym pobraniem materiału biologicznego oraz jego niewłaściwym przechowywaniem i transportem.

## Literatura

1. Jaksz-Recmanik E., Bobiński R *Błędy przedlaboratoryjne w praktyce pielęgniarstwa*, Problemy Pielęgniarstwa.,19 (2011), s. 386-390
2. Guder W.G., Narayanan S., Wisser H., Zawata B. *Próbki: od pacjenta do laboratorium. Wpływ zmienności przedanalizycznej na jakość wyników badań laboratoryjnych*, MedPharm Polska., (2009), Warszawa, ISBN 978-83-62283-99-6
3. <https://portal.abczdrowie.pl/bilirubina-calkowita-we-krwi>
4. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Elsevier Urban& Partner., (2010), Wrocław, ISBN:978-83-7609-137-2

5. <http://www.kardiolo.pl/hematokryt.htm>
6. <http://www.invicta.pl/upload/PZPOZ/ODCINEK%201%20INVICTA.pdf>
7. Robertson D., Frölich J.C., Carr R.K., Watson J.T., Hollifield J.W., Shand D.G., Oates J.A. *Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure*, The New England Journal of Medicine.,298 (1978), s.181-186
8. <http://dolinabiotechnologiczna.pl/nowe-doniesienia/diagnostyka-nowosci/w-zasadzie-to-jestem-na-czczo-czyli-o-wplywie-uzywek-na-zmiany-metaboliczne/>
9. Leppäluoto J., Vuolteenaho O., Arjamaa O., Ruskoaho H. *Plasma immunoreactive atrial natriuretic peptide and vasopressin after ethanol intake in man*, Acta Physiologica Scandinavica., 144 (1992),s.121-127
10. Sobuta E. *Czynniki przedanalizyczne dotyczące pacjenta wpływające na wyniki badań laboratoryjnych*, Badanie i Diagnoza.,6 (2000), s. 43-47
11. Rico H. *Alcohol and bone disease*, Alcohol and Alcoholism., 25 (1990), s.345-352
12. Plebani M., Carraro P. *Mistakes in stat laboratory: types and frequency*, Clinical Chemistry., 43(1997), s. 1348-1351
13. Ernst D.J., Ballance L.O., Calam R.R., McCall R., Smith S., Szamisi D.I., Warunek D.J. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*, Clinical and laboratory standards institute., 27 ISBN 1-56238-650-6
14. [http://pzcormay.pl/index.php?id\\_kategorii=72&lang=\\_pl](http://pzcormay.pl/index.php?id_kategorii=72&lang=_pl)
15. Kiechle F.L., Betsou F., Blakney J., Calam R.R., Catalasan I.M., Raj P., Sadek W., Smith S.A., Tang Y., Tomazic-Allen S. *Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests H18-A4*, Clinical and laboratory standards institute., 30 ISBN 1-56238-724-3

## Wpływ fazy przedanalizycznej na wynik badania laboratoryjnego

### Streszczenie

Bez wątpienia każdy z nas zetknął się chociaż raz w życiu z badaniami laboratoryjnymi. Właściwa diagnostyka wielu jednostek chorobowych zależy od rzetelnie i prawidłowo wykonanej analizy. Na wynik badania laboratoryjnego, odzwierciedlający faktyczny stan chorego, wpływa nie tylko sam proces pomiaru wykonany zgodnie z panującymi standardami, ale również istotną rolę odgrywa faza przedanalizyczna. Na ten etap składa się wiele czynników min. przygotowanie pacjenta do badania, moment pobrania próbki, właściwe jej opisanie oraz transport do laboratorium. Niektóre źródła podają, że błąd pomiaru związany z tą fazą stanowi aż 45% podczas gdy błąd pomiaru w fazie analitycznej to tylko 10%.

Zalecenia dotyczące przygotowania pacjenta do badań są uzależnione zarówno od parametru który ma być oznaczany jak i rodzaju materiału, który ma zostać pobrany. Najczęściej analizy są wykonywane w krwi pełnej obwodowej. To, co spożywamy wpływa na obraz krwi, a także może zakłócić wyniki. W szczególności obfitość i jakość ostatnich przed pobraniem próbki posiłków. Również pora pobrania próbki ma olbrzymie znaczenie. Zmiany fizjologiczne, jakie zachodzą w organizmie, są podporządkowane rytmom dobowym, dlatego trzeba brać to pod uwagę, szczególnie jeżeli chodzi o oznaczenie poziomu hormonów. Dlatego najlepiej badania krwi wykonywać w godzinach porannych, na czczo. Ponadto tak prozaiczne rzeczy jak aktywność fizyczna, stres czy spożywanie kawy

ma znaczący wpływ na niektóre parametry. Z tego powodu bardzo ważna jest wiedza na temat wyżej wymienionych czynników, mających wpływ na wynik odzwierciedlający funkcjonowanie organizmu.

Słowa kluczowe: faza przedanalizyczna, błąd przedlaboratoryjny

### **The impact of preanalytical phase on the laboratory tests outcomes**

#### **Abstract**

No doubt every one of us has come across laboratory tests , at least once in a lifetime. Proper diagnosis of many types of diseases depends on a reliable and properly carried out analysis. The laboratory test result, which reflects the real condition of the patient, is not only affected by the measurement process carried out in accordance with prevailing standards but also the preanalytical phase plays a significant role. This stage consists of a number of factors, including: preparation of the patient for testing, the moment of taking samples, labelling and a transport to the laboratory. Some sources claim that the measurement error associated with this phase even 45%, while the measurement error in the analytical phase is only 10%. Recommendations for the patient's preparation for the study are dependent both on the parameter to be determined as well as on the type of material to be taken.

Most analyzes are carried out in peripheral blood. What we consume contributes to the blood count, and may interfere with the results. In particular, the abundance and quality of the last meal before taking samples. Also, the time of taking samples has huge importance. Physiological changes that occur in the body, are subordinate to daily rhythms, so you need take it into consideration, especially when it comes to determination of the hormones' level.

Keywords: preanalytical phase, prelaboratory mistake

## Indeks autorów:

Adamczyk M.....	115	Merska M.....	200
Anczykowska A.....	208	Michniowski A.....	7
Bielińska I.....	80	Mierzejewska Ż. A.....	45
Borzęcka A.....	173	Molcan T.....	158
Cwynar A.....	219	Moździerz A.....	33, 285
Dudek I.....	103	Mrukwa-Kominek E.....	229
Dziedzic J.....	67	Musiał P.....	33, 285
Gadomska-Gajadhur A.....	91	Myszczyński K.....	158
Galas D.....	7	Nisztuk-Pacek S.....	144
Gawroński M.....	130	Niścior M.....	115
Gąska D.....	270	Olczyk D.....	33, 285
Goede A.....	130	Ortyl J.....	255
Górnjak B.....	18	Osiak M.....	297
Iskierka M.....	240	Pająk N.....	297
Janicka A.....	219	Pauksztó Ł.....	158
Jarosz A.....	103	Popielarz R.....	255
Jastrzębski J. P.....	158	Rusinek R.....	67
Jaworski Ł.....	270	Ruśkowski P.....	91
Juszko-Piekut M.....	33, 285	Skoda M.....	103
Kamińska I.....	255	Smagowski W.....	67
Karaźniewicz-Łada M.....	208	Smyl-Golianek M.....	67
Karpiński R.....	18, 270	Stefanowicz A.....	80
Kasprzak K.....	200	Stojko J.....	33, 285
Kobiela W.....	33, 285	Stojko M.....	33, 285
Kowalczyk M.....	183	Surdyka M.....	144
Kropiwek K.....	200	Szymanowski H.....	55
Król-Turmińska K.....	173	Szyszkowska A.....	7
Kruk A.....	91	Tarnawska K.....	115
Kucharzewski P.....	229	Wandtke T.....	80
Kula Z.....	55	Wawruszak A.....	173
Kurzak E.....	229	Wiśniewska K.....	208
Laska A.....	55	Woźniak J.....	130
Loska O.....	240	Ziomkowska B.....	219
Maksymiuk J.....	18		