

# **Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce**

## **Nauki ścisłe i przyrodnicze**



[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

Poznań 2022

**Redakcja naukowa**

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

**Wydawca**

Młodzi Naukowcy

[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

[wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com](mailto:wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com)

**ISBN (całość 978-83-66743-68-7)**

**ISBN (wydanie online 978-83-66743-82-3)**

**ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-81-6)**

Data wydania: październik 2022

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

**Spis treści**

<b>1. Zastosowanie termografii w medycynie</b>	<b>7</b>
<i>Dzmitry Aleinikau, Barbara Pytel</i>	
<b>2. Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych</b>	<b>12</b>
<i>Małgorzata Dostatni, Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński</i>	
<b>3. Rola wychwytu zwrotnego wybranych neuroprzekaźników w etiologii chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych</b>	<b>19</b>
<i>Małgorzata Dostatni, Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński</i>	
<b>4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera jako narzędzie do badania preparatów lipopolisacharydów bakteryjnych</b>	<b>25</b>
<i>Arkadiusz Głowacki, Katarzyna Durlik-Popińska, Paulina Żarnowiec, Wiesław Kaca</i>	
<b>5. Formowanie biofilmu przez <i>Proteus mirabilis</i></b>	<b>32</b>
<i>Dawid Gniazdo, Aleksandra Omelaniuk, Weronika Brudz, Dawid Gmiter</i>	
<b>6. Metody zwalczania biofilmu <i>Proteus mirabilis</i></b>	<b>38</b>
<i>Dawid Gniazdo, Aleksandra Omelaniuk, Weronika Brudz, Dawid Gmiter</i>	
<b>7. Motyw azyrydino-2-fosfonianów w syntezie aminofosfonianów i ich pochodnych</b>	<b>44</b>
<i>Klarek Mateusz, Rapp Magdalena</i>	
<b>8. Entomopatogenne właściwości bakterii <i>Pseudomonas entomophila</i></b>	<b>52</b>
<i>Jakub Kordaczuk</i>	
<b>9. Correlation between virulence of <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Candida albicans</i> in <i>Galleria mellonella</i> infection</b>	<b>57</b>
<i>Jakub Kordaczuk</i>	
<b>10. Wpływ wybranych adaptogenów na ośrodkowy układ nerwowy</b>	<b>62</b>
<i>Sandra Romanis, Małgorzata Dostatni, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński</i>	
<b>11. Modelowanie menopauzy u samic gryzoni</b>	<b>68</b>
<i>Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński</i>	
<b>12. Metody wykrywania błędów w procesie Powder Bed Fusion</b>	<b>74</b>
<i>Piotr Sawicki, Bogdan Dybała</i>	
<b>13. Wizja komputerowa i przetwarzanie obrazu w monitorowaniu procesów PBF</b>	<b>83</b>
<i>Piotr Sawicki, Bogdan Dybała</i>	
<b>14. Woda plazmowana – jej właściwości i zastosowanie</b>	<b>90</b>
<i>Paulina Siedlecka, Jolanta Małajowicz</i>	
<b>15. Problematyka wyboru drukarki 3D dla metali na podstawie analizy literatury</b>	<b>96</b>
<i>Skrzek Kinga, Dybała Bogdan, Emilia Mazgajczyk, Mariusz Hetmańczyk</i>	



Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk ścisłych oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

*Redakcja*



## **1. Zastosowanie termografii w medycynie**

Application of thermography in medicine

Dzmitry Aleinikau, Barbara Pytel

Instytut Fizyki, Uniwersytet Opolski, ul. Oleska 48, 45-052 Opole, Polska

Dzmitry Aleinikau: dimaaley22@gmail.com

Słowa kluczowe: kamera termowizyjna, promieniowanie cieplne, temperatura, termografia.

### **Streszczenie**

Dane z literatury przedmiotu wskazują, że wykrywanie promieniowania podczerwonego emitowanego m. in. przez ciało człowieka, może pełnić dużą rolę pomocniczą w badaniach medycznych. W pracy przedstawiono w sposób syntetyczny, metody pomiaru temperatury, przede wszystkim te, stosowane w termometrii oraz omówiono promieniowanie cieplne. Opisano pokrótce termometrię i związaną z nią termowizję oraz termografię. Wyszczególniono zasady działania kamery termowizyjnej oraz przedstawiono sposób przeprowadzenia pomiarów z jej wykorzystaniem. W niniejszej pracy, przedstawiono również publikacje naukowe dotyczące zastosowania termowizji w różnych dziedzinach medycyny.

### **1. Wstęp**

Termometria to gałąź fizyki, która zajmuje się opracowaniem metod i przyrządów do pomiaru temperatury. Zadanie termometrii obejmuje: ustalanie skal temperatury, tworzenie testów porównawczych, opracowywanie metod klasyfikacji i kalibracji przyrządów do pomiaru temperatury, a także ich wykorzystywanie w nauce i technice. Termometria w swoim rozwoju przeszła długą i trudną drogę do osiągnięcia jedności pomiarów temperatury. Od czasów starożytnych znana jest metoda jakościowej oceny temperatury za pomocą wrażeń dotykowych. Stąd powstały pojęcia: gorący, ciepły, zimny. Z termometrią ściśle związana jest termografia, która jest bezinwazyjną techniką pomiarową, umożliwiającą rejestrację emitowanego z badanej powierzchni promieniowania podczerwonego w zakresie 9 – 14 mikrometrów. Wyniki, przedstawiane są w postaci barwnych map rozkładu temperatury. Jeśli chodzi o medycynę, to termografia pozwala rejestrować promieniowanie podczerwone, które jest emitowane przez ciało ludzkie (Gossorg 1988).

Rozróżniamy aktywną i pasywną termografię. W aktywnej termografii stosowane są kamery termowizyjne. Pewne źródło energii powinno tworzyć kontrast temperaturowy między badanym obiektem, a tłem. Aktywne podejście jest konieczne, gdy badany obiekt jest w równowadze termicznej z otoczeniem. Zaś pasywną termografię stosuje się, gdy temperatura badanego ciała znacznie różni się od temperatury tła (Gossorg 1988).

W badaniach fizjologicznych ważne jest, aby osoba poddana badaniu czuła się tak swobodnie, naturalnie i komfortowo, jak to tylko możliwe. Podłączenie do ciała człowieka czujników kontaktowych może mieć wpływ na jego stan psychofizyczny, co może mieć kolejno wpływ na wyniki danych eksperymentalnych i oparte na nich wnioski. Termografia medyczna pozwala spełnić powyższe warunki. Jednocześnie jest to nowoczesna metoda diagnostyczna, która obecnie zyskuje coraz większą popularność ze względu na coraz lepsze, czulsze i tańsze kamery, nieinwazyjność oraz natychmiastową informację zwrotną. Ponadto, ze względu na to, że termografia jest bezdotykową metodą pomiaru, może być szczególnie przydatna w diagnostyce ran pooperacyjnych, obrzęków, zmian zapalnych skóry oraz wielu innych przypadkach, gdzie inne metody mogłyby spowodować zabrudzenie ran lub infekcję (Skrzek 2014).

### **2. Opis zagadnienia**

#### **2.1 Promieniowanie cieplne**

Każde ciało o temperaturze powyżej zera bezwzględnego, oddaje środowisku swoją energię w postaci promieniowania nazywanego cieplnym. Promieniowanie cieplne lub inaczej termiczne jest

to rodzaj promieniowania elektromagnetycznego, które powstaje w wyniku ruchu naładowanych elektrycznie cząstek w materii. Maksimum rozkładu natężenia promieniowania dla obiektów o temperaturze pokojowej przypada na długość fali ok. 10 mikrometrów. Wynika to z prawa przesunięć Wiena. Prawo Wiena opisuje promieniowanie elektromagnetyczne emitowane przez ciało doskonale czarne. Ciało doskonale czarne definiujemy jako ciało, które całkowicie pochłania padające na nie promieniowanie. Wraz ze wzrostem temperatury maksimum to przesuwa się w kierunku fal krótszych, przy czym wysokość maksimum rośnie zgodnie ze wzorem:

$$\lambda_{max} = \frac{b}{T}$$

Gdzie  $b$  – stała Wiena,  $T$  – temperatura w K.

Zgodnie z tym prawem ciało doskonale czarne o temperaturze ciała ludzkiego ( $T \sim 310$  K) ma maksymalną intensywność promieniowania przy długości fali około 10 mikrometrów, co odpowiada zakresu podczerwieni. Obecnie prawo przesunięcia Wiena można wyprowadzić matematycznie z prawa Plancka, które opisuje rozkład widmowy promieniowania ciała doskonale czarnego. W takim przypadku, możliwy jest m.in. zdalny pomiar temperatury tych obiektów oraz obserwacja za pomocą urządzeń rejestrujących wysyłane promieniowanie (Houghton i Smith 1975).

Ludzka skóra ma wysoki współczynnik promieniowania ( $\epsilon = 0,98$ ), którego wartość jest zbliżona do wartości współczynnika promieniowania ciała doskonale czarnego ( $\epsilon = 1$ ). Zmiana temperatury powierzchni ciała człowieka, prowadzi do znacznej zmiany mocy emitowanego promieniowania podczerwonego wykrywanego przez kamerę termowizyjną. Niski współczynnik odbicia skóry w dalekiej podczerwieni minimalizuje wpływ nagranych przedmiotów środowiskowych na określenie jej temperatury (Skripal 2007).

Niejednorodny rozkład powierzchniowy temperatury ciała człowieka w niezmiennych warunkach otoczenia, wynika z obecności naczyń krwionośnych, w tym włosowatych, w skórze i warstwach podskórnych, mięśni, narządów wewnętrznych, a także tłuszczu podskórnego. Oprócz tego, jest jeszcze ściślej związany z procesami wewnątrz ciała ludzkiego (Skripal 2007).

## 2.2 Metody pomiaru temperatury

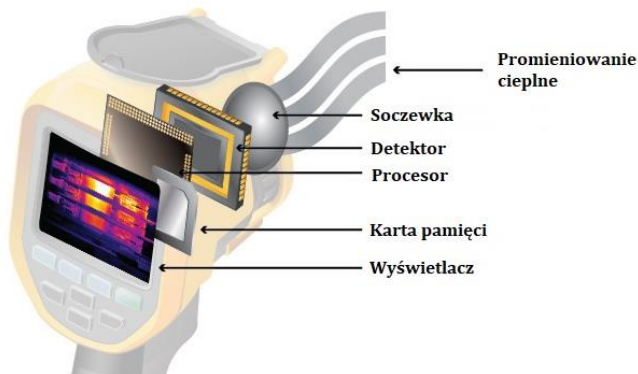
W zależności od tego, w jakim celu mierzymy temperaturę oraz z jaką dokładnością, można wyróżnić kilka sposobów pomiaru temperatury. Na przykład, jeśli chodzi o oddziaływanie pomiędzy badanym obiektem, a czujnikiem temperaturowym, to można wyróżnić dotykową i bezdotykową metodę. W dotykowej metodzie czujnik, np. termometr, styka się z badanym obiektem. W metodzie bezdotykowej pomiar zwykle prowadzi się poprzez pomiar promieniowania elektromagnetycznego emitowanego przez ciało lub ilości emitowanej energii. Jednym z bezdotykowych urządzeń do pomiaru temperatury jest pirometr (Minkina i in. 2000). Zaś kamera termowizyjna to także bezdotykowe urządzenie do obserwacji rozkładu temperatury badanej powierzchni. Rozkład temperatury jest wyświetlany na wyświetlaczu jako kolorowy obraz, w którym różne wartości temperatury odpowiadają różnym kolorom.

## 2.3 Kamera termowizyjna

Kamera termowizyjna to urządzenie do obserwacji rozkładu temperatury badanej powierzchni. Rozkład temperatury jest wyświetlany na wyświetlaczu jako kolorowy obraz, w którym różne temperatury odpowiadają różnym kolorom. Głównymi elementami kamery termowizyjnej są matryca i obiektyw, które stanowią około 90% całkowitego kosztu kamery. Ponieważ obiektywów nie można wykonać ze szkła, które nie przepuszcza promieniowania podczerwonego, do tworzenia soczewek stosuje się rzadkie i drogie materiały (na przykład german). Nowoczesne kamery termowizyjne są zwykle budowane na podstawie specjalnych matrycowych czujników temperatury – bolometrów. Czyli matryc miniaturowych termorezystorów cienkowarstwowych. Promieniowanie podczerwone zebrane i skupione na matrycy przez obiektyw kamery termowizyjnej ogrzewa elementy matrycy zgodnie z rozkładem temperatury obserwowanego obiektu. Wysoka czułość kamer termowizyjnych jest realizowana dzięki obecności wysoce czułych półprzewodnikowych odbiorników promieniowania z antymonidu indu, rtęci, kadmu, telluru itp. Promieniowanie podczerwone jest skoncentrowane przez system specjalnych soczewek i trafia na fotodetektor, który



jest wrażliwy na określoną długość fali widma podczerwonego. Promieniowanie, które dostaje się do niego, prowadzi do zmiany właściwości elektrycznych fotodetektora, który jest rejestrowany i wzmacniany przez obwód elektroniczny. Odebrany sygnał jest przetwarzany cyfrowo, a wartość ta jest przesyłana do jednostki wyświetlającej informacje. Procesor kamery pobiera sygnał z każdego piksela i przy zastosowaniu obliczeń matematycznych tworzy kolorową mapę temperatury pozornej obiektu. Każda wartość temperatury jest przedstawiona innym kolorem. Uzyskana matryca kolorów jest przesyłana do pamięci i do wyświetlacza kamery pod postacią obrazu temperatury (termogramu) danego obiektu. Czulość detektora na promieniowanie ciepłe jest tym wyższa, im niższa jest jego temperatura własna. Na ekranie kamery termowizyjnej widzimy wartości mocy promieniowania podczerwonego w każdym punkcie pola widzenia kamery termowizyjnej, wyświetlane zgodnie z określoną paletą kolorów (czarno-biała lub kolorowa) (Kriksunov i in. 1987), (Madura i in. 2014).



**Rys. 1.** Budowa kamery termowizyjnej (Madura i in. 2014).

Podczas każdego badania termowizyjnego powinny zostać uwzględnione czynniki wpływające na dokładność i jakość pomiaru. Warunki atmosferyczne, szczególnie te związane z różnego rodzaju opadami deszczu lub śniegu wpływają na obniżenie temperatury powierzchni badanego obiektu. Jednak nie tylko czynniki pogodowe mogą zafałszować wyniki badania termowizyjnego. Szczególnie istotne są czynniki techniczne, m.in. współczynnik emisyjności i refleksyjności danej powierzchni, temperatura atmosfery oraz odległość kamery od ciała promieniującego. Każdy obiekt emituje promieniowanie podczerwone, czyli wytwarza energię. To właśnie jest jego emisyjność, która uzależniona jest od materiału lub podłoża danego obiektu. Niska emisyjność obiektów oznacza, iż odbijają one promieniowanie słoneczne. Dotyczy to najczęściej materiałów metalowych. One również posiadają wysoką refleksyjność, czyli zdolność do odbijania zmiennych ilości światła, jakie pada na daną powierzchnię. Nie uwzględnienie tych parametrów, może wpłynąć na błędny wynik pomiaru kamerą termowizyjną. Konieczność podania tych parametrów może być jednak bardzo kłopotliwa dla operatora, ponieważ nie istnieją zwykle proste sposoby na dokładne określenie emisyjności i temperatury atmosfery w rzeczywistej sytuacji. Parametry te sprawiają na ogół mniej problemów, jeśli w otoczeniu nie ma dużych i silnych źródeł promieniowania (Madura i in. 2014), (Skripal i in. 2007), (Szarek i in. 2010).

### 3. Przegląd literatury

Kamera termowizyjna w medycynie jest przyrządem wykorzystywanym w omówionej metodzie do oceny rozległości i nasilenia stanu zapalnego lub niedokrwiennego w badanej tkance, na podstawie zjawiska termoemisji, wynikającej z lokalnego wzmoczonego lub obniżonego ukrwienia i metabolizmu tkankowego (Kruszewski 1971). Termowizja medyczna ma zastosowanie w prawie każdej dziedzinie np. onkologii, laryngologii, okulistyce, dermatologii, jak również chirurgii czy neurologii.

W pracy (Szarek i in. 2010) opisano wykorzystanie termowizji do diagnostyki medycznej. W tej pracy zostały zarejestrowano szereg map temperaturowych powierzchni badanego ciała, dzięki czemu można było wykreślić obszary o podwyższonej temperaturze. Jedno z badań przeprowadzono na pacjencie, u którego zastosowano endoprotezoplastykę stawu biodrowego z dojsciem operacyjnym

tylnym. Zastosowanie kamery termowizyjnej pozwoliło na precyzyjne określenie temperatury w obszarze rany, co jest niemożliwe w przypadku dotykowych metod pomiarowych. W kolejnym badaniu grupa osób poddanych badaniom termowizyjnym wykonywała zestaw ćwiczeń rehabilitacyjnych. Zarejestrowane mapy temperaturowe przed i po wysiłku, pozwoliły na sprawdzenie stopnia ukrwienia mięśni, a co za tym idzie poprawność zastosowanej rehabilitacji ruchowej.

Termografia znalazła też zastosowanie w położnictwie i ginekologii. W czasie ciąży zmienia się wzór rozkładu temperatur, co można również zobaczyć na termogramie. Termograficznymi objawami ciąży są hipertermia piersi, zmiana temperatury brzucha, stopniowe rozprzestrzenianie się hipertermii w górnej i dolnej części brzucha, a hipotermia w środkowej części (Andreev i in. 2016).

Analiza termiczna pomiarów przeprowadzonych śródoperacyjnie z powierzchni kory mózgowej, pozwala na bezinwazyjne wyznaczenie granic funkcjonalnie ważnego obszaru kory oraz określenie lokalizacji guzów mózgu zdiagnozowanych innymi metodami obrazowania. Badania takie przeprowadzano na szczurach. Temperatura powierzchni guzów różni się od temperatury powierzchni tkanek nieobjętych zmianą chorobową. Pozwala to na dokładniejsze zlokalizowanie guza nowotworowego. Zaobserwowano również, że przy odcięciu unaczynienia guza, wyraźnie obniża się jego temperatura, pomimo tego, że zabieg odbywa się metodą koagulacji bipolarnej, która powoduje wydzielanie ciepła w tkance. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że termografia śródoperacyjna powierzchni kory mózgowej wykorzystywana w czasie procedur neurochirurgicznych może być najlepszym sposobem dokładnej oceny umiejscowienia ośrodków funkcjonalnych względem tkanki patologicznej, co może zminimalizować ryzyko groźnych powikłań (Kaczmarska i in. 2014).

Wykazano, że lokalny wzrost temperatury w obszarze powierzchniowych żył kończyn dolnych wskazuje na prawdopodobieństwo zakrzepowego zapalenia żył. Wykorzystano termografię do obserwacji zmian miażdżycowych naczyń, które również prowadzą do zaburzenia przepływu krwi i zmiany temperatury. Metoda termografii pozwala na zarejestrowanie obecności blaszek miażdżycowych (Bagavathiappan i in. 2009).

Termowizja stosowana jest też w okulistyce. Prowadzono prace z wykorzystaniem termowizji do obrazowania zaburzeń ukrwienia siatkówki w diagnostyce retinopatii cukrzycowej, zwyrodnieniu plamki związanym z wiekiem, a także w zapaleniach spojówek oraz tylnego odcinka oka. Termowizja okazała się szczególnie pomocna w przypadku utrudnionego wglądu w dno oka, z powodu zmętnienia struktur anatomicznych przedniego odcinka gałki ocznej. Za schorzeniem okulistycznym najczęściej ocenianym za pomocą kamery termowizyjnej jest zespół suchego oka. Wykazano, że oczy chore mają temperaturę niższą niż zdrowe, co może wynikać z niższej emisji promieniowania cieplnego gałki ocznej, wywołanej przez zaburzoną strukturę filmu łzowego (Sodi A i in. 2014), (Klamann MKJ i in. 2013).

W otorynolaryngologii termografia stosowana jest w diagnostyce procesów zapalnych oraz nowotworów zatok szczękowych i czołowych. W takich przypadkach określone są strefy hipertermii. W nowotworach złośliwych krtani na termogramach przedniej powierzchni szyi wizualizowane są charakterystyczne ogniska hipertermii patologicznej, posiadające skłonności do rozprzestrzeniania się na sąsiednie obszary ciała. Ponadto termografia pozwala zdiagnozować porażenia i niedowłady przy uszkodzeniu nerwów twarzowych, a nawet alergiczny nieżyt nosa (Mekshina i in. 2012).

Termografia w onkologii jest szeroko rozpowszechniona. Nowotwory złośliwe charakteryzują strefę hipertermii odpowiadającą obszarom infiltracji z różnicą temperatury z otaczającymi tkankami. Obrazowanie termiczne pozwala wykryć guz piersi znacznie wcześniej niż jest to możliwe w przypadku mammografii. Możliwe jest wykrycie wczesnych przerzutów drogą limfogenną. Ponadto, termografia umożliwia kontrolę skuteczności terapii antynowotworowych (radioterapia, chemioterapia) (Minkina i in. 2000), (Kennedy i in. 2009).

#### **4. Podsumowanie i wnioski**

Wraz z pojawieniem się detektorów podczerwieni o coraz wyższej czułości temperaturowej i rozdzielczości przestrzennej, termowizja promieniowania cieplnego staje się coraz tańszą,

dokładniejszą, alternatywną metodą badań przesiewowych oraz wczesnego wykrywania patologii. Może być także wykorzystywana do monitorowania skuteczności leczenia i rehabilitacji. Każdego roku przeprowadza się coraz więcej badań potwierdzających wysoką skuteczność, wiarygodność i bezpieczeństwo termografii. Taka diagnostyka jest całkowicie bezinwazyjna i nie wpływa na zdrowie pacjenta. A w porównaniu z innymi urządzeniami medycznymi, jak ultrasonograf, rentgen czy tomograf koszty zakupu i eksploatacji urządzeń termowizyjnych są znacząco niższe.

Oprócz wyznaczania termogramów badanych obszarów, aktualnie możliwa jest także ich cyfrowa analiza, co umożliwi wykorzystanie rozległych analiz ilościowych w obrazie. Ze względu na szereg zalet termografii jak bezdotykowość, szybkość uzyskania informacji w czasie rzeczywistym oraz dokładność uważa się, że zastosowanie termografii w medycynie może znaleźć w przyszłości zastosowanie w jeszcze szerszych obszarach medycyny.

Prowadząc badania termograficzne należy jednak zawsze pamiętać, że aby uzyskać rzetelne i wiarygodne wyniki, należy bezwzględnie stosować się do zaleceń metodologicznych i norm pomiarowych. Warunkuje to uzyskanie poprawnych wyników, umożliwiających ich porównywanie oraz poprawną ich interpretację, a co za tym idzie, uniknięcie błędów diagnostycznych.

## 5. Literatura

- Andreev RS, Kalenov YN, Yakushkin AV i in. (2016) Capabilities of infrared thermography for detection of morphofunctional human characteristics (of children and adults). *Bulletin of Moscow University* 23 (3) 49–58.
- Bagavathiappan S i in. (2009) Infrared thermal imaging for detection of peripheral vascular disorders. *Journal of Medical Physics/Association of Med. Physicists of India*. Jan;34(1):43.
- Gossorg J (1988) Termografia podczerwieni. Podstawy, technika, zastosowanie. Mir.
- Houghton J, Smith SD (1975) Fizyka Podczerwieni. Wyd. PWN.
- Kaczmarska K, Czernicki Z, Kastek M, i in. (2014) Zastosowanie termowizji do śródoperacyjnej oceny metabolizmu i funkcji mózgu – doniesienia wstępne. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica Inżynieria Biomedyczna*, vol. 20, nr 2, 73-79.
- Kennedy DA, Lee T, Seely D (2009) A comparative review of thermography as a breast cancer screening technique. *Integrative Cancer Therapies* Mar;8(1):9-16.
- Klamann MKJ i in. (2013) Ocular surface temperature gradient is increased in eyes with bacterial corneal ulcers. *Ophthalmic Res* 49:52-6.
- Kriksunov L, Padalko GA (1987) Kamery termowizyjne: podręcznik. Technika.
- Kruszewski S (1971) Zastosowanie termografii i termowizji w medycynie. *Pol Przegl Radiol Med Nukl*;35(4):441-4.
- Madura H, Sosnowski T, Bieszczad G (2014):Termowizyjne kamery obserwacyjne - budowa, zastosowania i krajowe możliwości realizacji. *Przegląd Elektrotechniczny* 90 9, 5-8.
- Mekshina LA, Usynin VA, Stolyarov VV, i in. (2012) Thermal imaging in the diagnosis of obliterating diseases of lower limb arteries. *Siberian Medical Journal* 27 (2) 15–22.
- Minkina W i in. (2000) Podstawy pomiarów termowizyjnych. *Pomiary, Automatyka, Kontrola* 46:7–14.
- Minkina W, Rutkowski P, Wild W (2000) Podstawy pomiarów termowizyjnych. *Pomiary, Automatyka, Kontrola* 48 4, 5-8.
- Skrípál A, Sagaidachny A, Usanov D (2007) Diagnostyka termowizyjna biomedyczna, wyd. Uniwersytetu Saratowskiego.
- Skrzek A (2014) Biomedyczne zastosowania termowizji. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej.
- Sodi A i in. (2014) Ocular surface temperature in age-related macular degeneration. *J Ophthalmol* 2014:281010.
- Szarek A (2010) Wykorzystanie zjawiska termografii do diagnostyki medycznej. *Aktualne Problemy Biomechaniki* 4 195-200.

## **2. Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych**

The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases

Małgorzata Dostatni, Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

Opiekun naukowy: dr Irena Majkutewicz

Dostatni Małgorzata: gosia.dostatni99@gmail.com

Słowa kluczowe: mikrobiom, neuroprzebieżniki, schizofrenia, choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera

### **Streszczenie**

Mikrobiom jelitowy to zbiór tysięcy gatunków bakterii, które występują w przewodzie pokarmowym człowieka, zasiedlając jelito cienkie oraz (w większym stopniu) jelito grube. Tworzony jest przez szacowaną na ponad 100 bilionów liczbę komórek bakteryjnych. Pełni szereg istotnych funkcji w organizmie człowieka, takich jak produkcja witamin, wspomaganie trawienia, reakcje immunologiczne, utrzymanie prawidłowej homeostazy, jest również niezbędny do komunikacji z ośrodkowym układem nerwowym, która zachodzi za pośrednictwem osi jelitowo-mózgowej. Tematyka ta zyskała ogromną popularność w ostatnich latach, stąd ciągle rośnie liczba badań, których wyniki sugerują, że mikrobiom moduluje także procesy poznawcze, emocjonalne, behawioralne oraz wpływa na odczuwalny nastrój czy poziom lęku. Wzajemne, dwukierunkowe oddziaływanie pomiędzy mikrobiotą jelitową a mózgiem jest tak złożone, że zaczęto również szukać powiązań między patogenizacją chorób neuropsychiatrycznych czy neurodegeneracyjnych a występowaniem zaburzeń w mikrobiomu jelitowego.

### **1. Wstęp**

Mikrobiom jelitowy stał się jednym z głównych obiektów badań ostatnich lat. Stanowi go zbiór tysięcy gatunków bakterii zasiedlających przewód pokarmowy człowieka, głównie jelito grube oraz, w mniejszym stopniu, jelito cienkie. Szacuje się, iż jest on tworzony przez ponad 100 bilionów komórek bakteryjnych (Generoso i in. 2021), jego masa może osiągać nawet do 2 kg, a liczba mikroorganizmów występujących w przewodzie pokarmowym człowieka szacowana jest na około 100-krotnie wyższą niż łączna liczba wszystkich komórek eukariotycznych tworzących ciało człowieka (Kim i Shin 2018). Mikrobiom pełni wiele istotnych funkcji w organizmie gospodarza, takich jak wspomaganie trawienia, produkcja witamin, udział w reakcjach immunologicznych, wspomagając tym samym utrzymanie homeostazy (Ruciński i Kurowska 2018). Oś jelitowo-mózgowa to system odpowiadający za komunikację między układem pokarmowym a ośrodkowym układem nerwowym (OUN), który działa dwukierunkowo (Generoso i in. 2021). Sygnalizacja za pośrednictwem osi jelito-mózg jest realizowana przy udziale wielu komponentów, takich jak neurotransmitery, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), tryptofan, kinurenina, a także dzięki szlakom immunologicznym czy hormonalnym. Wciąż rośnie liczba badań sugerujących, iż mikrobiom odpowiada nie tylko za modulację funkcji układu pokarmowego, ale oddziałując na mózgowie, wpływa także na zachowanie gospodarza, jego samopoczucie oraz wyższe procesy poznawcze. Aktualnie trwa wiele badań, które mają na celu ukazać związki między zakłóceniami występującymi w mikrobiocie jelitowej a zaburzeniami neuropsychiatrycznymi (np. depresją, zaburzeniami lękowymi, schizofrenią) czy chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimerera czy choroba Parkinsona.

### **2. Komponenty osi jelitowo mózgowej**

Za komunikację na drodze osi jelitowo mózgowej odpowiada równolegle wiele komponentów. Jednym z tych elementów są neuroprzebieżniki. Neurotransmiterami nazywamy

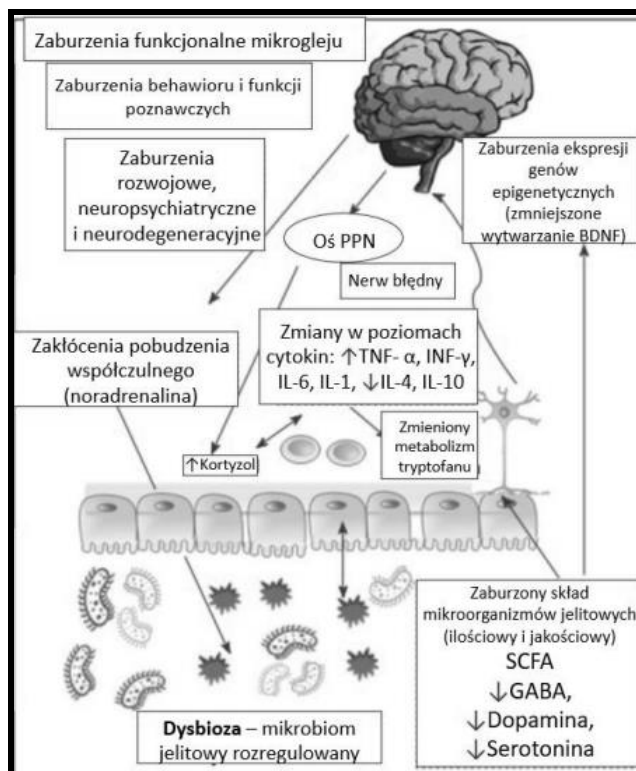
związki chemiczne, których cząsteczki przenoszą sygnał w obrębie synaps chemicznych między neuronami oraz pomiędzy komórkami nerwowymi a komórkami mięśniowymi lub gruczołowymi. Neuroprzekaźniki, takie jak serotonina (5-HT), dopamina (DA), noradrenalina (NE), acetylocholina (ACh) czy kwas gamma-aminomasłowy (GABA) odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu OUN, a zakłócenia w tych systemach neurotransmiterowych wiążą się z patogenezą wielu chorób neurodegeneracyjnych czy neuropsychiatrycznych. Synteza i uwalnianie niektórych neuroprzekaźników może zachodzić pośrednio lub bezpośrednio w wyniku aktywności konkretnych gatunków mikroorganizmów jelitowych (Tab. 1). Przykładem jest rodzaj *Bacillus*, którego przedstawiciele mogą wytwarzać dopaminę, ale również *Escherichia* czy *Candida*, które poprzez wykorzystanie tryptofanu pochodzącego z żywności są w stanie syntetyzować serotoninę. Zakłada się, iż jest to jedna z dróg, dzięki którym mikrobiota może modulować działanie OUN (Sun i in. 2020).

**Tab. 1.** Neuroprzekaźniki i metabolity wytwarzane przez mikrobiom jelitowy.

<b>Neuroprzekaźnik/ Metabolit</b>	<b>Bakterie jelitowe</b>
<b>Serotonina</b>	<i>Streptococcus, Escherichia coli, Akkermansia muciniphila</i>
<b>Dopamina</b>	<i>Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus</i>
<b>Glutaminian</b>	<i>Lactobacillus, Campylobacter jejuni, Coryneform, Bacteroides vulgatus</i>
<b>GABA</b>	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium, Pseudomonas, Escherichia coli</i>
<b>Acetylocholina</b>	<i>Lactobacillus, Bacillus</i>
<b>SCFA</b>	<i>Faecalibacterium, Bifidobacterium longum, Clostridium symbiosum, Lactobacillus fermentum</i>
<b>Noradrenalina</b>	<i>Bacillus, Escherichia coli</i>
<b>Melatonina</b>	<i>Bifidobacterium</i>
<b>Histamina</b>	<i>Lactobacillus spp., Enterococcus</i>
<b>Tyramina</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>

Kolejnym istotnym komponentem odpowiadającym za komunikację w osi jelitowo-mózgowej są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*short-chain fatty acids*, SCFA). Powstają one na drodze beztlenowej fermentacji niestrawionych węglowodanów złożonych. Należą do nich m.in. kwas octowy, masłowy czy propionowy. SCFA odpowiadają za inhibicję deacetylaz histonowych, dzięki temu mogą wiązać się z receptorami sprzężonymi z białkami G. Wskutek tego chodzi o indukcję sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. W związku z tym procesem, SCFA odgrywają istotną rolę w komunikacji pomiędzy mikrobiotą a mózgiem (Kim i Shin 2018). Nerw błędny stanowi główny element szlaku neuronalnego odpowiadającego za dwukierunkową komunikację układu pokarmowego oraz OUN. Jest on najdłuższym nerwem czaszkowym, który sięga do jamy brzusznej i unerwia większość narządów występujących w jej obrębie, składa się w 80% z włókien czuciowych oraz 20% włókien ruchowych. Istotnym jest fakt, że włókna czuciowe nie mają bezpośredniej styczności z mikrobiotą jelitową, ponieważ nie przechodzą przez nabłonek ścian jelita. Za bezpośrednią komunikację z mikrobiomem odpowiadają zatem włókna ruchowe, które oddziałują na komórki enteroendokrynne. Dzieje się to dzięki uwolnieniu serotoniny, która aktywuje receptor 5-hydrotryptaminy-3 (Generoso i in. 2021). Układ immunologiczny również odgrywa istotną rolę w komunikacji jelita-mózg. Jego podstawowym zadaniem jest utrzymywanie odporności, a jakiegokolwiek nieprawidłowości pomiędzy układem immunologicznym a mikrobiotą mogą powodować stan zapalny, który z kolei może przyczynić się do rozwoju wielu chorób. Odpowiedź

immunologiczna ze strony organizmu może doprowadzić do wzrostu przepuszczalności jelit, co skutkuje swobodniejszym przepływem patogenów do krwiobiegu. Dochodzi wtedy do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, co powoduje wzrost przepuszczalności bariery krew-mózg i może doprowadzić do pobudzenia komórek mikrogleju (Abdel-Haq i in. 2019). Jakikolwiek zaburzenia dotyczące wymienionych komponentów osi jelitowo-mózgowej mogą indukować różnego rodzaju dysfunkcje w organizmie człowieka, zaburzając ogólną homeostazę. Mogą także prowadzić do dysbiozy czyli rozregulowania mikrobioty jelitowej. Dysbioza zachodzi w wyniku zmian składu mikroorganizmów, zarówno ilościowych, jak i jakościowych. Do konsekwencji utrzymującej się dysbiozy należą przede wszystkim: zmniejszenie wytwarzania neuroprzekazników przez bakterie jelitowe oraz indukcja zmian w profilu wydzielania cytokin przez komórki odpornościowe – zwiększenie produkcji cytokin o charakterze prozapalnym (np. czynnika martwicy nowotworów alfa, TNF- $\alpha$ ; interferonu gamma – IFN- $\gamma$ ; interleukiny 1 i 6 – IL-1 i IL-6), przy jednoczesnym hamowaniu wytwarzania cytokin przeciwzapalnych, głównie interleukiny 10 (IL-10). Czynnikiem prowadzącym do dysbiozy może być wiele, zaczynając od nieprawidłowej diety, przyjmowania nadmiernej ilości farmaceutyków (lub nieuzasadnione ich stosowanie), przede wszystkim antybiotyków i niesteroidowych leków przeciwzapalnych; zwiększonego poziomu stresu, kończąc na ostrych lub przewlekłych stanach zapalnych oraz różnorodnych infekcjach (Rys. 1).



**Rys. 1.** Schemat przedstawiający mikrobiom jelitowy w stanie dysbiozy. Źródło: Cenit i in. 2017, zmodyfikowane.

### 3. Mikrobiom jelitowy a choroby neuropsychiatryczne oraz neurodegeneracyjne

Choroba Parkinsona (Parkinson's disease, *PD*) jest jedną z chorób neurodegeneracyjnych, która polega na stopniowej degeneracji neuronów znajdujących się w układzie pozapiramidowym, co wiąże się z obecnością przewlekłego stanu zapalnego w OUN i tkankach obwodowych. W miarę postępowania choroby, ogniska stanu zapalnego zwiększają się, w komórkach nerwowych odkładają

się nierozpuszczalne włókna i złogi alfa-synukleiny (ASN), białka cytozolowego, które w zdrowych neuronach ma formę niewielkich monomerów. Patologiczne formy tego białka odkryto również poza mózgiem – w nerwach przywspółczulnych oraz w komórkach układu pokarmowego. Co ciekawe u myszy transgenicznych z nadprodukcją ASN, u których występowały objawy PD, do rozwoju choroby doszło wyłącznie w grupie gryzoni z zachowaną mikrobiotą jelitową – myszy pozbawione mikroorganizmów i przechowywane w sterylnych warunkach charakteryzowała normalna aktywność ruchowa, pomimo wysokiego stężenia ASN (Sampson i in. 2016). Dodatkowo, skład mikrobioty jelitowej u pacjentów cierpiących na PD sprzyja stanowi prozapalnemu (Genoroso i in. 2021). Kolejnym dowodem na występowanie związku PD z mikrobiotą był eksperyment, w którym odkryto różnice w mikrobiomie pochodzącym z próbki kału osób chorych oraz zdrowych. W innych badaniach zaobserwowano, że zaburzenia związane z układem pokarmowym, takie jak zaparcia czy biegunki, często poprzedzają wystąpienie objawów motorycznych u chorych (Köhler i in., 2016). U pacjentów cierpiących na PD odnotowano znaczny spadek liczebności bakterii z rodzaju *Prevotellaceae*, który wynosił aż do 77,6% mniej w porównaniu do osób zdrowych. Odkryto także zależność między wzrostem liczebności *Enterobacteriaceae* a problemami z chodem oraz ogólną niestabilnością postawy (Scheperjans i in. 2015). Przeprowadzono badanie, w którym chorzy na PD otrzymywali suplementację probiotyczną takimi szczepami jak *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus fermentum*, *L. reuteri* i *L. acidophilus*. Zaobserwowano znaczny spadek w wynikach testu oceniającego objawy choroby Parkinsona wg. Towarzystwa Zaburzeń Ruchu, doszło także do zmniejszenia uszkodzeń oksydacyjnych oraz stężenia białka C-reaktywnego (Tamtaji i in. 2019b).

Choroba Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną polegającą na obumieraniu komórek nerwowych (szczególnie w formacji hipokampa), co prowadzi do otępienia, upośledzenia pamięci, a w późniejszych stadiach choroby - także do śmierci pacjenta. Patogeneza AD wciąż nie jest do końca poznana, choć uważa się, że do rozwoju tej choroby przyczyniają się choroby cywilizacyjne (cukrzyca, otyłość, choroby sercowo-naczyniowe), agregacja nieprawidłowych form białek ( $\beta$ -amyloidu i hiperfosforylowanych form białka tau), przewlekłe stany zapalne, stres oksydacyjny, a także czynniki genetyczne. W badaniach, w których u pacjentów stosowano codziennie suplementację probiotyczną, stwierdzono, że ma ona pozytywny wpływ na bogactwo ilościowe i jakościowe mikrobiomu jelitowego – wykazano znaczny wzrost liczebności *Facea libacterium prausnitzii*, gatunku który odpowiedzialny jest za syntezę SCFA; odnotowano także zmniejszenie przepuszczalności jelit (Leblhuber i in. 2018). Dowiedziono również, iż po suplementacji probiotycznej *B. longum* oraz *Lactobacillus spp.* u chorych dochodzi do znacznej poprawy funkcji poznawczych, a także ogólnego metabolizmu (Genoroso i in. 2021). Prowadzone były także badania, w których osoby cierpiące na AD przez 12 tygodni przyjmowały probiotyk wraz z selenem, co skutkowało zmniejszeniem stężenia markerów stanu zapalnego, zmniejszeniem poziomu stresu oksydacyjnego, a pacjenci wykazywali poprawę w testach odpowiadających za ocenę funkcji poznawczych (Tamtaji i in. 2019a). Można zatem wysnuć wniosek, iż przywrócenie homeostazy w mikrobiomie jelitowym wpływa skutecznie na poprawę funkcji poznawczych, samopoczucia pacjenta czy zmniejszenie stanu zapalnego u osób cierpiących na AD.

Depresja jest chorobą neuropsychiatryczną, która w ostatnich latach, stając się jedną z chorób cywilizacyjnych, przyczyniła się do dramatycznego wzrostu liczby pacjentów na nią cierpiących. Jej etiologia jest niezwykle złożona i wciąż nie do końca poznana. Zaobserwowano jednak, że mikrobiota jelitowa pacjentów ze zdiagnozowaną depresją znacznie różni się od mikrobioty osób zdrowych (Mörkl i in. 2020). U zdrowego dorosłego człowieka w mikrobiomie jelitowym występują głównie gatunki bakterii z rodzajów *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, natomiast skład mikrobioty osób cierpiących na depresję jest znacznie uboższy. Wiele badań wykazuje jednak różnorodne zmiany w składzie mikrobiomu, a nie konkretne zaburzenie, które można by uznać za wzorzec powtarzający się u pacjentów z depresją. Wciąż trwają badania, które mają na celu ustalenie czy zaburzenia występujące w mikrobiocie jelitowej są genozą zaburzeń depresyjnych, czy jedynie jednym z ich skutków. W jednym z eksperymentów wykazano, że przeszczep kału od pacjentów ze zdiagnozowanymi zaburzeniami depresyjnymi szczurom germ-free (wolnym od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów i pasożytów) doprowadziło do

nieprawidłowości syntezy tryptofanu, co poskutkowało wystąpieniem zachowań przypominających lęk i depresję u tych zwierząt. Badanie to, jako pierwsze, dowiodło, iż stan mikrobioty jelitowej może być faktyczną przyczyną powstania depresji (Winter i in. 2018). W ostatnich latach przeprowadzono doświadczenia, które miały ocenić wpływ suplementacji probiotycznej (wykorzystano gatunki z rodzajów *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*) na odczuwany nastrój, jednak pozytywne zmiany odnotowano tylko u tych pacjentów, którzy przed suplementacją wykazywali mocne objawy depresyjne (Ng i in. 2018). W badaniu z udziałem pacjentów z depresją lekooporną stwierdzono, że zastosowanie suplementacji probiotycznej *Clostridium butyricu* wraz z równoległym leczeniem farmakologicznym, doprowadziło do znacznej redukcji objawów depresyjnych (Stopińska i in. 2021). W innym badaniu wykazano, że różne szczepy *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* i *Bifidobacterium infantis* łagodzą zarówno objawy depresyjne, jak i zachowania związane z lękiem u gryzoni (Generoso i in., 2021). Dowiedziono także, iż kombinacja probiotycznych szczepów *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 okazała się skuteczna w zwiększaniu oporności człowieka na stres (Cenit i in. 2017). Co ciekawe, niektóre doniesienia sugerują, że sama rola diety może odgrywać istotną rolę w patogenezie depresji. Według takich doniesień dieta śródziemnomorska może mieć wpływ prewencyjny, natomiast dieta zachodnia wydaje się sprzyjać ryzyku rozwoju tej choroby (Zhernakova i in. 2016).

Schizofrenia jest kolejną chorobą neuropsychiatryczną, której patogeneza do dziś nie jest jasna, choć wśród najważniejszych czynników wymienia się podłoże genetyczne oraz czynniki środowiskowe doświadczane na wczesnych etapach życia, m.in. narażenie na ostry lub przewlekły stres. Schizofrenia objawia się zaburzeniami psychotycznymi, które zniekształcają rzeczywistość, zakłócają prawidłowe postrzeganie, odbiór oraz przetwarzanie informacji. Pacjenci doświadczają halucynacji i urojeń, ale także zubożenia, apatii, anhedonii (niemożności odczuwania przyjemności), trudności w komunikacji i aktywności społecznej. W ostatnich badaniach wykazano, iż pacjenci ze zdiagnozowaną schizofrenią wykazują znaczne różnice w składzie mikrobioty jelitowej w porównaniu do osób zdrowych. Główne różnice polegają na obniżonej liczebności bakterii z gromady *Proteobacteria*, a także gatunków *Haemophilus spp.*, *Sutterella spp.* i *Clostridium spp.*, natomiast liczba przedstawicieli z rodzaju *Anaerococcus* była zwiększona (Generoso i in. 2021). W innym badaniu zaobserwowano z kolei zwiększoną liczebność *Bacteroides*, *Coprococcus sp.* oraz *Ruminococcaceae*, które wiąże się z takimi objawami jak obniżony nastrój, zaburzenia depresyjne, zwiększenie ryzyka rozwoju chorób serca czy nasileniem objawów negatywnych samej schizofrenii (Nguyen i in. 2019). Przeprowadzono także eksperyment polegający na przyjmowaniu suplementacji probiotycznej oraz witaminy D3 przez osoby chore. Po zakończeniu suplementacji, pacjenci wykazywali znaczną poprawę wyników w Skali Zespołów Pozytywnych i Negatywnych, a także zwiększenie zdolności antyoksydacyjnych organizmu (Okubo i in. 2019).

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) należą do zaburzeń neurorozwojowych, które występują zazwyczaj już we wczesnym dzieciństwie. Autyzm określany jest jako całe spektrum różnych zachowań, które u każdego chorego mogą wyglądać nieco inaczej. Zazwyczaj objawia się on upośledzeniem funkcji społecznych, poznawczych, zaburzeniami w komunikacji, które mogą przejawiać się na przykład brakiem mowy czy sztywnymi wzorcami zachowań, zainteresowań, które są powtarzalne i ograniczone. Równocześnie z ASD bardzo często występują zaburzenia związane z układem pokarmowym - biegunki, zaparcia lub wzdęcia, co wskazuje na związek między ASD a mikrobiotą jelitową (Lefter i in. 2019). W jednym z badań wykazano, iż w nasilonych przypadkach autystycznych występuje wzrost liczebności i różnorodności gatunkowej *Bacteroides* (Tomova i in. 2015). Przeprowadzono również doświadczenia, które opierały się na przeszczepie mikrobioty kałowej osób zdrowych osobom ze spektrum autyzmu, co doprowadziło do zmniejszenia się negatywnych objawów ze strony przewodu pokarmowego. Przeprowadzono także testy behawioralne i psychologiczne, w których pacjenci również wykazali poprawę w częstości i nasileniu objawów ASD (Generoso i in. 2021). W innym badaniu, w którym brały udział dzieci ze spektrum autyzmu, zauważono także znaczny wzrost SCFA w próbkach kału po przyjmowanej suplementacji (Wang i in. 2012). Przeprowadzono również badanie na mysim modelu ASD, w którym dowiedziono, że podawanie maślanu łagodzi objawy tego zaburzenia, zaś stosowanie kwasu propionowego poprzez infuzję do komór bocznych mózgu powodowało nasilenie objawów autystycznych. Dokładna rola



SCFA w spektrum autyzmu wciąż nie jest do końca jasna, jednak coraz więcej badań sugeruje ścisły związek tych neurometabolitów bakteryjnych z ASD (Kratsman i in. 2016).

#### **4. Podsumowanie**

Mikrobiom jelitowy odgrywa niezwykle istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Coraz więcej badań potwierdza związek stanu dysbiozy z rozwojem wielu chorób, jednak wciąż nie ustalono jednoznacznie czy zmiany występujące w mikrobiocie powstają na skutek już trwających procesów chorobotwórczych w organizmie, czy mają jednak charakter pierwotny i przyczyniają się do patogenezы chorób zarówno neuropsychiatrycznych, jak i neurodegeneracyjnych. Z pewnością koniecznością jest kontynuowanie badań w tym zakresie, aby umożliwić w przyszłości opracowanie nowego sposobu farmakoterapii, jak i również prewencji w celu minimalizacji wystąpienia i rozwoju wielu zaburzeń.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2019/35/N/NZ4/00908 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

#### **5. Literatura**

- Cenit MC, Nuevo IC, Codoñer-Franch P, et al. (2021) Gut microbiota and attention deficit hyperactivity disorder: new perspectives for a challenging condition. *European Child & Adolescent Psychiatry* 26(9): 1081-1092.
- Generoso JS, Giridharan VV, Lee J, et al. (2021) The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Brazilian Journal of Psychiatry* 43: 293-305.
- Kim YK, Shin C (2018) The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments. *Current Neuropharmacology* 16(5): 559-573.
- Köhler CA, Maes M, Slyepchenko A, et al. (2016) The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design* 22: 6152-6166.
- Kratsman N, Getselter D, Elliott E (2016) Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the frontal cortex of an autism model. *Neuropharmacology* 102: 136-145.
- Leblhuber F, Steiner K, Schuetz B, et al. (2018) Probiotic supplementation in patients with Alzheimer's dementia: an explorative intervention study. *Current Alzheimer Research* 15: 1106-1113.
- Lefter R, Ciobica A, Timofte D, et al. (2019) A descriptive review on the prevalence of gastrointestinal disturbances and their multiple associations in autism spectrum disorder. *Medicina* 56(1): 11.
- Mörkl S, Butler MI, Holl A, et al. (2020) Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. *Current Nutrition Reports* 9(3): 171-182.
- Ng QX, Peters C, Ho CYX, et al. (2018) A meta-analysis of the use of probiotics to alleviate depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders* 228: 13-19.
- Nguyen TT, Kosciółek T, Maldonado Y, et al. (2019) Differences in gut microbiome composition between persons with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects. *Schizophrenia Research* 204: 23-29.
- Ruciński J, Kurowska E (2018) Neuroimmunologiczne i neuroendokrynne funkcje mikrobiomu jelitowego. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki przyrodnicze, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy, Poznań, Część XI* 99-105.
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167(6): 1469-1480.e12.
- Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, et al. (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders* 30: 350-358.

- Stopińska K, Radziwoń-Zaleska M, Domitrz I (2021) The Microbiota-Gut-Brain Axis as a Key to Neuropsychiatric Disorders: A Mini Review. *Journal of Clinical Medicine* 10(20): 4640.
- Sun LJ, Li JN, Nie YZ (2020) Gut hormones in microbiota-gut-brain cross-talk. *Chinese Medical Journal (Engl.)* 133(7): 826-833.
- Tamtaji OR, Heidari-Soureshjani R, Mirhosseini N, et al. (2019a) Probiotic and selenium co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Nutrition* 38: 2569-2575.
- Tamtaji OR, Taghizadeh M, Daneshvar Kakhaki R, et al. (2019b) Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* 38: 1031-1035.
- Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, et al. (2015) Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior* 138: 179-187.
- Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, et al. (2012) Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive Diseases and Sciences* 57: 2096-2102.
- Winter G, Hart RA, Charlesworth RPG, et al. (2018) Gut microbiome and depression: what we know and what we need to know. *Reviews in the Neurosciences* 29(6): 629-643.
- Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. (2016) Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 352: 565-569.

### **3. Rola wychwyty zwrotnego wybranych neuroprzekaźników w etiologii chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych**

The role of selected neurotransmitter reuptake in the neuropsychiatric and neurodegenerative diseases etiology

Małgorzata Dostatni, Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

Opiekun naukowy: dr Irena Majkutewicz

Dostatni Małgorzata: gosia.dostatni99@gmail.com

Słowa kluczowe: neurotransmitery, transporter, synapsa, depresja, choroba Parkinsona

#### **Streszczenie**

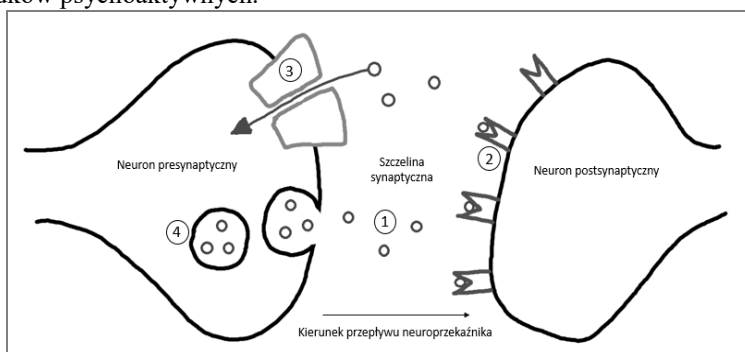
Wychwyt zwrotny jest mechanizmem, który umożliwia reabsorpcję neuroprzekaźnika ze szczeliny synaptycznej za pomocą wybranych transporterów, aby mogły one zostać ponownie wykorzystane lub ulec rozkładowi przez specyficzne enzymy. Prawidłowe stężenie neuroprzekaźników w przestrzeni synaptycznej jest niezwykle ważne dla zachowania homeostazy całego organizmu, ponieważ to przez ten mechanizm regulowana jest siła, z jaką pobudzany jest receptor komórki postsynaptycznej, a więc zależy od niego siła sygnalizacji międzykomórkowej, przede wszystkim w układzie nerwowym. Utrzymujące się wahania stężenia wybranych neurotransmiterów takich jak serotonina, dopamina czy noradrenalina, mogą przyczyniać się do rozwoju poważnych zaburzeń lub chorób. Zbyt niski poziom serotoniny oraz noradrenaliny ma istotny związek z występowaniem takich zaburzeń jak depresja czy zaburzenia lękowe, a podczas ich leczenia wykorzystuje się farmaceutyki, których działanie oparte jest na mechanizmie wychwyty zwrotnego tych neuroprzekaźników. Zakłócenia w układzie dopaminergicznym związane są procesem neurodegeneracyjnym w chorobie Parkinsona, a także występują w trakcie przyjmowania substancji o charakterze narkotycznym, co często przyczynia się do powstania uzależnienia. Podsumowując, mechanizm wychwyty zwrotnego neuroprzekaźników odgrywa niezwykle istotną rolę w etiologii i przebiegu wielu chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych, stanowi również ważny element w badaniach mających na celu ulepszenie metod terapeutycznych lub opracowanie nowych środków leczniczych.

#### **1. Wstęp**

Etiologia oraz przebieg wielu chorób neuropsychiatrycznych czy neurodegeneracyjnych ma związek z zaburzeniami stężeń takich neuroprzekaźników jak serotonina, dopamina czy noradrenalina. Neuroprzekaźniki, inaczej neurotransmitery to specyficzne związki chemiczne, które mają za zadanie przenosić sygnał między neuronami, a także w przypadku połączeń neuron-komórka gruczołowa i neuron-komórka mięśniowa. Tego typu sygnalizacja międzykomórkowa zachodzi w obrębie tzw. synaps chemicznych (Longstaff 2012). Neurotransmitery podlegają mechanizmowi wychwyty zwrotnego, który polega na reabsorpcji wybranego neuroprzekaźnika ze szczeliny synaptycznej za pomocą transporterów, czyli wyspecjalizowanych białek przENOŚNIKOWYCH (Rys. 1).

Proces wychwyty zwrotnego reguluje stężenie neuroprzekaźnika w przestrzeni synaptycznej, co skutkuje regulacją siły bodźca, który pobudza receptory na błonie postsynaptycznej. Dzięki temu mechanizmowi neuroprzekaźniki mogą zostać ponownie wykorzystane przez komórkę nerwową lub ulec rozkładowi przez specjalne enzymy. W związku z tym, wychwyt zwrotny neuroprzekaźników odgrywa niezwykle ważną rolę w zachowaniu stanu homeostazy nie tylko układu nerwowego, ale również w kontekście funkcjonowania całego organizmu. Co niezwykle istotne, mechanizm działania wielu związków farmakologicznych (np. leków przeciwdepresyjnych) opiera się na blokowaniu wychwyty zwrotnego, głównie poprzez hamowanie aktywności transportera danego neuroprzekaźnika. W konsekwencji dochodzi do wzrostu stężenia neurotransmitera w przestrzeni synaptycznej, a co za tym idzie – do silniejszego i/lub częstszego pobudzania konkretnych receptorów. Wskutek tego procesu często może dojść do złagodzenia objawów

w przypadku zaburzeń takich jak depresja, zaburzenia lękowe, czy choroba Alzheimera (Kandel i in. 2013). Z zahamowaniem prawidłowego działania transporterów i zbytnim pobudzeniem receptorów związek mają również substancje o charakterze odurzającym i uzależniającym. Wciąż trwa wiele badań, które mają na celu poznanie dokładnej roli zakłóceń wychwytu zwrotnego neuroprzebieżników w etiologii zaburzeń i chorób neuropsychiatrycznych oraz neurodegeneracyjnych. Nie ustają także badania nad opracowaniem nowych substancji farmakologicznych będących agonistami wybranych transporterów, aby w przyszłości umożliwić powstanie nowych, skutecznych terapii chorób, które obecnie uznane są jako nieuleczalne lub w przypadku których dostępne metody leczenia są niewystarczające, np. choroba Parkinsona, choroba Alzheimera czy silne uzależnienie od różnorodnych środków psychoaktywnych.



**Rys. 1.** Schemat wychwytu zwrotnego neuroprzebieżnika. 1 – neuroprzebieżnik, 2 – receptor, 3 – transporter, 4 – pęcherzyk synaptyczny.

## 2. Neuroprzebieżniki – serotonina, dopamina, noradrenalina

Zarówno serotonina, dopamina, jak i noradrenalina należą do grupy neuroprzebieżników monoaminowych. Są one związane z wieloma procesami nie tylko w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), ale także w całym organizmie. Biorą udział w kontroli procesów behawioralnych, fizjologicznych czy poznawczych (Tab. 1). Serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT), która jest pochodną tryptaminy, wytwarzana jest w jądrach szwu zlokalizowanych w pniu mózgu, zaś poza OUN, innym, ważnym miejscem jej produkcji jest błona śluzowa jelit. Do funkcji 5-HT należy między innymi regulacja temperatury ciała, zwiększanie ciśnienia krwi oraz krzepliwości, regulacja skurczów mięśni gładkich. Bezpośrednio wpływa także na apetyt i w zależności od przyjętego pokarmu, potrafi go zwiększyć lub zahamować. Serotonina i melatonina, która jest metabolitem 5-HT, biorą również udział w regulacji snu. Stężenie serotoniny ma duży wpływ na odczuwany nastrój i zachowanie człowieka, na odczuwanie bólu, procesy uczenia się i pamięci, czy odbieranie bodźców, jest potocznie nazywana „hormonem szczęścia” (Kandel i in. 2013). Zbyt niskie stężenie serotoniny może objawiać się dysforią (obniżeniem nastroju), bezsennością, przewlekłym zmęczeniem, a w niektórych przypadkach może skutkować nawet zachowaniami agresywnymi (Bacqué-Cazenave i in. 2020).

Noradrenalina (norepinefryna, NE) należąca do grupy katecholamin (monoamin katecholowych) wytwarzana jest w miejscu sinawym zlokalizowanym w pniu mózgu, zaś poza OUN, wydzielana jest przez włókna zazwojowe części współczulnej autonomicznego układu nerwowego oraz, razem z adrenaliną, przez rdzeń nadnerczy. NE ma także bardzo szeroki zakres działania w organizmie człowieka, a dodatkowo jej aktywność jest niejednorodna, ponieważ kierunek wywoływanych przez nią zmian zależy od miejsca i receptora, na który oddziałuje. Do jej głównych funkcji należy przekazywanie informacji w obrębie współczulnego układu nerwowego, związanych przede wszystkim z przystosowaniem organizmu do sytuacji stresowej (reakcja alarmowa – „walcz lub uciekaj”). Przejawia się to m.in. wpływem pobudzającym na mięsień sercowy, co skutkuje wzrostem częstości akcji serca. Jej działanie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego opiera się na wprowadzaniu organizmu w stan wzmożonego czuwania, wskutek czego prowadzi do zwiększenia

poziomu uwagi i koncentracji. Zbyt wysokie stężenie noradrenaliny może jednak powodować zaburzenia na tle lękowym i skutkować uczuciem ciągłego niepokoju.

Dopamina (DA), podobnie jak NE, należy do grupy katecholamin i jest syntetyzowana głównie w neuronach istoty czarnej, brzusznyemu polu nakrywy śródmózgowia (VTA) oraz (choć w znacznie mniejszym stopniu) komórkach rdzenia nadnerczy. Dopamina, tak jak pozostałe neuroprzekaźniki z grupy monoamin, ma niezwykle szeroki zakres funkcji w organizmie człowieka, jest neuromodulatorem, co oznacza, że efekt jej oddziaływania zależy od miejsca wydzielania i receptora, do którego się przyłącza. DA stanowi główny neuroprzekaźnik w mózgowym układzie nagrody, w skład którego wchodzi VTA i jądro półleżące. Jest to część układu limbicznego, która ulega pobudzeniu w momencie gdy zaspokojone zostaną podstawowe potrzeby człowieka, związane m.in. z przyjmowaniem pożywienia lub czynnościami seksualnymi. Co więcej, układ nagrody może zostać także aktywowany w innych sytuacjach, które wiążą się z poczuciem satysfakcji i przyjemności (Stahl i in. 2013). Działanie dopaminy w układzie nagrody ma także istotny związek z procesami poznawczymi oraz emocjonalnymi (Kandel i in. 2013). DA w układzie pozapiramidowym bierze udział w procesach ruchowych, regulacji napięcia mięśniowego oraz koordynacji ruchowej. Zbyt niskie stężenie dopaminy, do którego dochodzi poprzez degenerację neuronów dopaminergicznym w istocie czarnej śródmózgowia, odgrywa niezwykle istotną rolę w chorobie Parkinsona. Choroba ta objawia się utratą kontroli nad własnymi ruchami, samoistnym drżeniem mięśni, a w późniejszych jej stadiach pacjenci mają znaczne problemy z poruszaniem się. Dopamina pełni także istotną funkcję w regulacji wydzielniczej hormonów, takich jak gonadotropina i prolaktyna w podwzgórzu (Kandel i in. 2013).

### **3. Transportery monoamin czyli SERT, DAT I NET**

Wśród rodziny transporterów monoamin (MAT) możemy wyróżnić trzy rodzaje transporterów: transporter noradrenaliny (NET), transporter serotoniny (SERT), transporter dopaminy (DAT). Wszystkie z wymienionych transporterów są białkami, które występują na presynaptycznych błonach komórkowych w miejscu gdzie przebiegają specyficzne szlaki neurotransmiterowe. Do zadań MAT należy wychwycenie neuroprzekaźnika, który znajduje się w szczelinie presynaptycznej, aby przenieść go do wnętrza neuronu. Następnie zostaje on zamknięty w pęcherzyk synaptyczny lub ulega rozłożeniu poprzez enzymy nazywane monoaminooksydazami. Sam proces wychwyty odbywa się w tempie jednej cząsteczki neuroprzekaźnika na sekundę. Występowanie transporterów monoamin ogranicza się głównie do ośrodkowego układu nerwowego, jednakże zarówno SERT, jak i NET występują także w komórkach tucznych, płytkach krwi oraz w komórkach nadnerczy. Mechanizm działania wielu środków farmakologicznych dostępnych komercyjnie koncentruje się na aktywności MAT, uniemożliwiając zachodzenie procesu wychwyty zwrotnego neuroprzekaźnika, dzięki czemu więcej cząsteczek neurotransmitera pozostaje w szczelinie synaptycznej. Leki takie znacznie łagodzą lub nawet niwelują objawy zarówno chorób neurodegeneracyjnych oraz neuropsychiatrycznych. Terapię, która wykorzystuje mechanizm wychwyty zwrotnego neuroprzekaźnika stosuje się u pacjentów z depresją, zaburzeniami lękowymi, zespołem nadpobudliwości psychoruchowej (ADHD), zespołem stresu pourazowego (PTSD), schizofrenią czy chorobą Parkinsona. MAT mają także silny związek z mechanizmem powstawania uzależnień oraz ich możliwym leczeniem (Aggarwal i Mortensen 2018).

### **4. Terapie chorób neuropsychiatrycznych i neurodegeneracyjnych wpływające na poziom neuroprzekaźników**

Zaburzenia związane z wahaniami stężeń neuroprzekaźników czyli ich zbyt wysokim lub zbyt niskim poziomem dostępnym dla elementu presynaptycznego są ściśle powiązane z etiologią, a także przebiegiem wielu chorób, takich jak depresja, zaburzenia lękowe, ataki lęku panicznego, zaburzenia snu i apetytu, PTSD, a nawet choroba Parkinsona. Mechanizm wychwyty zwrotnego wykorzystywany jest w wielu środkach farmakologicznych stosowanych w terapii wymienionych wyżej zaburzeń i chorób. Najpowszechniej stosowanym typem takich leków są selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (**selective serotonin reuptake inhibitor**, SSRI). Mechanizm

działania opiera się na hamowaniu transportera SERT, co skutkuje pozostaniem serotoniny w szczelinie synaptycznej, a więc wzrostem jej stężenia. Dzięki temu procesowi dochodzi do nasilenia sygnalizacji pomiędzy neuronami. W pierwszych tygodniach przyjmowania leków z grupy SSRI, skutek blokowania SERT, może dojść do obniżenia się wrażliwości autoreceptorów 5-HT, których funkcją jest stymulacja uwalniania jej z zakończeń aksonów. Może to doprowadzić do znacznego obniżenia stężenia serotoniny w neuronach, ponieważ jej uwalnianie jest tymczasowo zablokowane. U pacjentów może paradoksalnie dojść wtedy do pogorszenia stanu, wzmocnienia się myśli samobójczych oraz ogólnego obniżenia nastroju. Po około 2-3 tygodniach przewlekłej terapii lekami z grupy SSRI, autoreceptory ulegają odhamowaniu, w związku z czym uwalnianie serotoniny z zakończeń nerwowych zwiększa się.

Inną grupą farmaceutyków, opartą na tym samym mechanizmie co SSRI, są leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (*serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*, SNRI). Podstawową różnicą między tymi dwiema grupami farmaceutyków jest fakt, że SNRI oddziałują zarówno na SERT, jak i NET. Przyjmuje się, że SNRI wykazują większe korzyści terapeutyczne, w porównaniu do SSRI, takie jak lepsza skuteczność przeciwdepresyjna i szybsze działanie, wszystko jednak zależy od jednostki chorobowej, do której leki te są stosowane (Aggarwal i Mortensen 2018). SNRI, w przeciwieństwie do SSRI, mają także pośredni wpływ na transmisję dopaminergiczną. Zahamowanie wychwytu zwrotnego NE działa hamująco na DAT w obszarze kory przedczołowej, dzięki czemu w niektórych przypadkach farmakoterapia lekami SNRI może przynosić lepsze efekty, łagodząc przy tym zaburzenia funkcji poznawczych i motywacyjnych (Stahl i in. 2013). Ta grupa leków stosowana jest zarówno w leczeniu zaburzeń lękowych, zaburzeń depresyjnych, napadów lęku panicznego, jak i w terapii PTSD. Warto podkreślić, iż zarówno SSRI, jak i SNRI, nie wpływają na zwiększenie wydzielania neuroprzekaźników, hamują one jedynie ich wchłanianie. W przypadku wieloletniego przyjmowania SSRI lub SNRI w niektórych przypadkach przerwania lub odstawienia farmakoterapii może dojść do wystąpienia zespołu odstawiennego, jednak zakłada się, że spowodowane jest to raczej wystąpieniem uzależnienia psychicznego, aniżeli fizycznego (Henssler i in. 2019).

Omawiając farmaceutyki wpływające na stężenie monoamin w przestrzeni synaptycznej, warto także wspomnieć o inhibitorach monoooksydazy (MAO). Monoaminoooksydazy są enzymami, które odpowiadają za rozkład 5-HT, DA i NE po wcześniejszym przetransportowaniu ich przez transportery MAT. Inhibitory MAO (IMAO) były pierwszymi terapeutykami, które przynosiły efekty w leczeniu depresji. Ich mechanizm polegał na nieselektywnej i nieodwracalnej inhibicji MAO, co skutkowało zwiększeniem stężenia neuroprzekaźników w szczelinach synaptycznych. Stosunkowo szybko zostały jednak wycofane z rynku ze względu na ich hepatotoksyczność oraz zwiększanie ciśnienia tętniczego. W ciągu kolejnych lat powstawały nowe generacje leków z grupy IMAO, tym razem jednak były to już inhibitory selektywne nieodwracalne, a następnie selektywne odwracalne (Laban i Saadabadi 2020). Przykładem jest selegilina – substancja, która aktualnie używana jest zarówno w farmakoterapii depresji, jak i choroby Parkinsona. Ma ona silne działanie hamujące proces deaminacji dopaminy, co w połączeniu z lewodopą (L-DOPA, lek stosowany w terapii choroby Parkinsona) opóźnia postęp choroby (Jiang i in. 2020).

Mechanizm działania wielu substancji o charakterze psychoaktywnym ma niezaprzeczalny związek z monoaminami i ich transporterami. Istotną rolę w tym procesie pełni układ nagrody. Substancje psychostymulujące, takie jak amfetamina i jej pochodne oraz kokaina, powodują aktywację układu dopaminergicznego. Objawia się to zwiększeniem poziomu dopaminy w jądrze półleżącym przegrody i korze oczodołowo-czołowej po zażyciu danej substancji (Szukalski 2009). Kokaina należy do nieselektywnych inhibitorów SERT, DAT i NET, najsilniej jednak wpływa na DAT, uniemożliwiając przyłączenie się do niego DA, co powoduje wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika w przestrzeni synaptycznej. Amfetamina zwiększa wydzielanie DA z neuronów. Zażywanie tych substancji skutkuje pojawieniem się pozytywnego wzmocnienia i stymulacją komórek prążkowania brzuszno poprzez zwiększenie stężenia DA w przestrzeni neuronalnej, co wywołuje euforyczną odpowiedź organizmu (Solinas i in. 2019). Wraz z kolejnymi dawkami dochodzi do wystąpienia zjawiska tolerancji farmakologicznej, co oznacza, że aby dalej otrzymywać efekt pobudzenia, wymagane jest kolejne zwiększenie dawki przyjmowanej substancji. W momencie

odstawienia substancji uzależniającej, uaktywniony zostaje system odpowiedzi stresowej, a neurony dopaminergiczne cechują się obniżoną reakcją na bodźce. Dochodzi do powstania mechanizmu negatywnego wzmocnienia, a osoba uzależniona odczuwa potrzebę dostarczenia danej substancji do organizmu, nie po to aby wywołać efekt euforyczny (wzmocnienie pozytywne), ale aby uniknąć negatywnych skutków odstawienia. Etap oczekiwania na kolejną dawkę, który powiązany jest z odczuwaniem pragnienia przyjęcia narkotyku aktywuje struktury korowe, dochodzi do ponownej aktywacji neuronów dopaminergicznych w obszarach związanych z pamięcią i emocjami, takich jak ciało migdałowate oraz hipokamp (Koob i in. 2016). Aktualnie trwają wysiłki mające na celu opracowanie antagonistów kokainy, którzy mogliby w sposób konkurencyjny lub niekonkurencyjny zapobiegać wiązaniu kokainy z DAT bez wywoływania efektów stymulacyjnych – w tym efektu euforycznego (Aggarwal i Mortensen 2018).

## 5. Podsumowanie

Opisane neuroprzekaźniki należące do rodziny monoamin, tj. serotonina, dopamina i noradrenalina oraz związane z nimi transportery wychwytu zwrotnego pełnią istotną rolę w utrzymaniu homeostazy nie tylko OUN, ale również całego organizmu. Wychwyt zwrotny neurotransmiterów ze szczeliny synaptycznej ma ogromne znaczenie w patogenezie, jak i przebiegu wielu chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych, ale także w ich możliwym leczeniu farmakologicznym (Tab. 1). W wielu przypadkach wciąż nie wiadomo jednak czy zmiany pojawiające się w stężeniach neuroprzekaźników mają charakter pierwotny i stanowią powód rozwijających się patologii, czy powstały na skutek trwającego już stanu patologicznego i mają charakter wtórny. Z pewnością, niezbędne jest kontynuowanie badań nad mechanizmem wychwytu zwrotnego, a także nad potencjalnymi agonistami transporterów, które być może w przyszłości zrewolucjonizują obecnie stosowane metody farmakoterapii.

**Tab. 1.** Podsumowanie najważniejszych informacji na temat wybranych neuroprzekaźników oraz ich transporterów.

<b>Neuro-przekaźnik</b>	<b>Serotonina</b>	<b>Dopamina</b>	<b>Noradrenalina</b>
<b>Miejsce syntezy</b>	Głównie jądra szwu pnia mózgu oraz błona śluzowa jelit	Głównie istota czarna, brzuszne pole nakrywki śródmózgowia (VTA), komórki rdzenia nadnerczy	Miejsce sinawe oraz komórki rdzenia nadnerczy
<b>Rola w organizmie</b>	Regulacja snu, apetytu, temperatury ciała, skurcze mięśni gładkich, zwiększenie ciśnienia krwi i krzepliwości, regulacja nastroju i zachowania	Procesy ruchowe, koordynacja ruchowa, regulacja napięcia mięśniowego, kontrola wydzielania hormonów, układ nagrody, regulacja procesów poznawczych i emocjonalnych	Sygnalizacja w obrębie ukł. współczulnego, pobudzenie pracy mięśnia sercowego, hamowanie mięśni gładkich pęcherza moczowego, wzmaganie glikogenolizy, aktywacja lipolizy
<b>Transporter odpowiedzialny za wychwyt zwrotny</b>	Transporter serotoniny (SERT)	Transporter dopaminy (DAT)	Transporter noradrenaliny (NET)
<b>Znaczenie w medycynie i patologii</b>	Leki – selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny  Depresja, bezsenność, zaburzenia apetytu, przewlekłe zmęczenie stany lękowe, ataki lęku panicznego, PTSD, choroba Parkinsona, proces powstawania uzależnienia		

## **6. Literatura**

- Aggarwal S, Mortensen O (2018) Overview of Monoamine Transporters. *Current Protocols in Pharmacology* 79: 12.16.1-12.16.17.
- Bacqué-Cazenave J, Bharatiya R, Barrière G, et al. (2020) Serotonin in Animal Cognition and Behavior. *International Journal of Molecular Sciences* 21(5): 1649.
- Henssler J, Heinz A, Brandt L, et al. (2019) Antidepressant Withdrawal and Rebound Phenomena. *Deutsches Arzteblatt International* 17(116): 355-361.
- Jiang D-Q, Li M-X, Jiang L-L, et al. (2020) Comparison of selegiline and levodopa combination therapy versus levodopa monotherapy in the treatment of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Aging Clinical and Experimental Research* 32: 769-779.
- Kandel ER, Schwartz JM, Jessell TM, et al. (2013) *Principles of Neural Science*. Wydawnictwo McGraw-Hill Education, New York.
- Kazula A, (2014) Mechanizmy działania selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) w depresji. *Farmacja polska* 70: 711-724.
- Laban ST, Saadabadi A (2020) *Monoamine Oxidase Inhibitors (MAOI)*. StatPearls Publishing.
- Longstaff A (2012) *Krótkie wykłady Neurobiologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Solinas M, Belujon P, Fernagut PO, et al. (2019) Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research. *Journal of Neural Transmission*, 126: 481-516.
- Stahl SM, Lee-Zimmerman C, Cartwright S, et al. (2013) Serotonergic drugs for depression and beyond. *Current Drug Targets* 14: 578-585.
- Szukalski B (2009) Neurobiologiczne podstawy uzależnienia od narkotyków. *Farmacja Polska* 65: 655-664.



#### **4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera jako narzędzie do badania preparatów lipopolisacharydów bakteryjnych**

Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a tool for the research of bacterial lipopolysaccharide preparations

Arkadiusz Głowacki, Katarzyna Durlik-Popińska, Paulina Żarnowiec, Wiesław Kaca

Instytut Biologii, Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
Opiekun naukowy: mgr. Katarzyna Durlik-Popińska

Arkadiusz Głowacki: roarek@wp.pl

Słowa kluczowe: Lipopolisacharyd, endotoksyna, FTIR, ATR-FTIR

##### **Streszczenie**

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), jest metoda fizykochemiczną coraz częściej stosowaną w celu badania materiału biologicznego. Celem pracy była próba wykorzystania FTIR do analizy stopnia zanieczyszczenia preparatów lipopolisacharydów (LPS) bakterii *Proteus mirabilis*. Preparaty te różniły się pod kątem sposobu przygotowania. Dzięki zastosowaniu właściwego zakresu fal promieniowania podczerwonego MIR (ang. *mid-infrared*) 4000 – 600  $\text{cm}^{-1}$  uzyskano widma charakterystyczne dla preparatów LPS. Analiza wyników wykazała różnice w pasmach absorpcji w postaci przejść oscylacyjno – rotacyjnych dla określonych molekuł takich jak białka, lipidy czy kwasy nukleinowe. Dzięki analizie porównawczej możliwe było wyróżnienie preparatów cechujących się najniższym stopniem zanieczyszczenia.

##### **1. Wstęp**

Lipopolisacharyd (LPS) to makrocząsteczka stanowiąca główny składnik błony zewnętrznej (OM, ang. *outer membrane*) bakterii Gram-ujemnych. LPS jest niezbędny do utrzymania integralności OM, ponadto spełnia szereg dodatkowych funkcji takich jak wirulentność, oporność na substancje antibakteryjne oraz ochrona przed stresem środowiskowym. LPS zbudowany jest z trzech głównych regionów, mianowicie: lipidu A - kotwiczącego makrocząsteczkę w błonie zewnętrznej komórki bakteryjnej, sacharydowego rdzenia cechującego się obecnością cząsteczek Kdo (kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonoowego) oraz polisacharydowego łańcucha O-swoistego – regionu położonego najbardziej dystalnie względem komórki. Łańcuch O-swoisty to najbardziej heterogenny, charakterystyczny dla poszczególnych szczepów, fragment LPS mający kontakt ze środowiskiem zewnętrznym komórki. Wysokie zróżnicowanie łańcucha O-swoistego determinuje pulę około 90 różnych składników monosacharydowych oraz substancji niewęglowodanowych. Zmienność budowy chemicznej łańcucha O-swoistego stanowi ważną podstawę dla schematów serotypowania wielu bakterii Gram-ujemnych i jest wykorzystywana do identyfikacji szczepów w celach taksonomicznych i epidemiologicznych ([Wongthong i in. 2020](#)). Najbardziej konserwatywnym z kolei regionem LPS jest lipid A. Region ten jest niezbędny dla przeżycia komórki Gram-ujemnej LPS, a dzięki konserwatywnej budowie stanowi wzorzec molekularny PAMP (ang. *pathogen associated molecular patterns*) selektywnie rozpoznawany przez nieswoisty układ odpornościowy (Putkar i in. 2015). Lipid A jest toksyczny ze względu na silne właściwości immunogenne. Już w niewielkich ilościach (kilka pikogramów na mililitr) może aktywować komórki układu immunologicznego (m.in. makrofagi) oraz indukować stany zapalne, produkcję interleukin, czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) itp. W wyższych stężeniach, w wyniku niekontrolowanej, nadmiernej reakcji immunologicznej może prowadzić do sepsy, wstrząsu septycznego i śmierci organizmu. Ze względu na silnie toksyczny charakter, w badaniach klinicznych, farmakologicznych ważne jest monitorowanie obecności i stężenia cząsteczek LPS w preparatach o charakterze terapeutycznym (Mamat i in. 2015). Z drugiej strony właściwości immunogenne LPS są wykorzystywane podczas produkcji szczepionek, gdzie lipid A może stanowić adjuwant zwiększający efektywność produkcji przeciwciał (Ledov i in. 2019).

Budowa, funkcja, właściwości immunologiczne, a także potencjalne zastosowanie jest ciągle rozwijającym się przedmiotem badań i dyskusji. Dobrze znane są testy kontroli obecności endotoksyn jak np. LAL (ang. *limulus amoebocyte lysate*) (Harm i in. 2021) oraz test aktywacji makrofagów (MAT, ang. *monocyte activation test*) (Solati i in. 2022). W badaniach preparatów LPS pomocne są również techniki oparte na elektroforezie (np. SDS-PAGE), Western blot oraz techniki immunoenzymatyczne (Matsukawa i in. 2021). W większości jednak są to techniki czasochłonne, wymagające odpowiednich odczynników oraz uprzedniego przygotowania badanej próby. Dlatego też adaptacja metod fizykochemicznych takich jak spektroskopia w podczerwieni do badań preparatów LPS stwarza nowe możliwości pozwalające na szybką, małoinwazyjną i tanią analizę niosącą informację o składzie chemicznym testowanej makrocząsteczki.

Tradycyjna spektroskopia FTIR wykorzystuje proces matematyczny tzw. transformację Fouriera do przełożenia surowych danych w postaci interferogramu na rzeczywiste widmo. Możliwe jest to dzięki temu, że cząsteczki charakteryzują odpowiednie zmiany energii oscylacyjnej oraz energii rotacyjnej. Cząsteczka napromieniowywana światłem podczerwonym pochłania określoną ilość padającego promieniowania z określoną częstotliwością (energiją), przez co wzbudza drgania atomów w cząsteczce, które ulegają wibracji na jeden z wielu sposobów, powodując: odkształcanie, rozciąganie czy też zginanie. Różne wiązania chemiczne pochłaniają promieniowanie podczerwone w różnych zakresach liczby falowej, przez co tworzą unikalny wzór absorpcji podczerwieni, który wytwarza charakterystyczne pasma w ich widmach. Otrzymane w ten sposób wyniki dostarczają informacje na temat obecnych w próbce makrocząsteczek takich jak białka, lipidy, węglowodany oraz kwasy nukleinowe (Wang i Wang 2021).

FTIR pozwala na bezpośredni wgląd w obecność LPS na komórce bakteryjnej, bez wcześniejszego przygotowania. W przypadku bakterii każda komórka wykazuje specyficzne widmo „odcisk palca”, które w literaturze określane jest jako podstawa charakterystyki szczepów metodą FTIR (Deidda i in. 2021). Zjawisko to można porównać z widmami innych preparatów bakteryjnych za pomocą hierarchicznego lub niehierarchicznego grupowania do oceny ich podobieństwa. Podstawowym założeniem jest, że pokrewne szczepy są bardziej podobne w swoim składzie (np. elementy ściany komórkowej), co prowadzi do korelacji w porównywanych widmach FTIR. Cecha ta znajduje zastosowanie do typowania izolatów bakteryjnych na poziomie szczepu czy gatunku, dzięki czemu staje się atrakcyjnym narzędziem w celach badań klinicznych. Niektóre badania wykorzystujące FTIR opisują patogenne działanie bakterii pod kątem klinicznym czy też epidemiologicznym takich drobnoustrojów jak *Escherichia Coli* (Preisner i in. 2010), *Salmonella enterica* (Nyarko i in. 2014), *Staphylococcus aureus* (Guliey i in. 2020) czy też *Proteus mirabilis* (Żarnowiec i in. 2017). Ponadto spektroskopia FTIR wykorzystana została do różnicowania oraz charakteryzowania komórek drobnoustrojów w oparciu o składniki błony zewnętrznej takie jak LPS, fosfolipidy i lipoproteiny (Stuart 2004).

Niniejsza praca przedstawia zastosowanie spektroskopii FTIR w charakterystyce czystości preparatów przygotowanych różnymi metodami.

## **2. Materiały i metody**

### **2.1 Preparaty LPS:**

Siedem preparatów LPS *P. mirabilis* S1959 (O3) różniących się metodyką otrzymywania: nieoczyszczony LPS *P. mirabilis* O3 S1959 (R) wyizolowany za pomocą metodą fenol/woda, preparat otrzymany z LPS *P. mirabilis* O3 S1959 hodowanych w obecności kolistyny (Col), deacylowany LPS *P. mirabilis* O3 S1959, LPS *P. mirabilis* O3 S1959 po ultrawirowaniu (W), LPS *P. mirabilis* O3 S1959 po elektrodializie (E), oczyszczone frakcje LPS *P. mirabilis* O3 S1959 na kolumnie Sephadex (FI, FII), polisacharyd *P. mirabilis* O3 S1959 (PS). Sucha masa bakteryjna *P. mirabilis* S1959 (O3), komercyjny preparat LPS *Salmonella abortus equi* (Sigma, USA). Badane LPS pochodzą z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach (UJK).

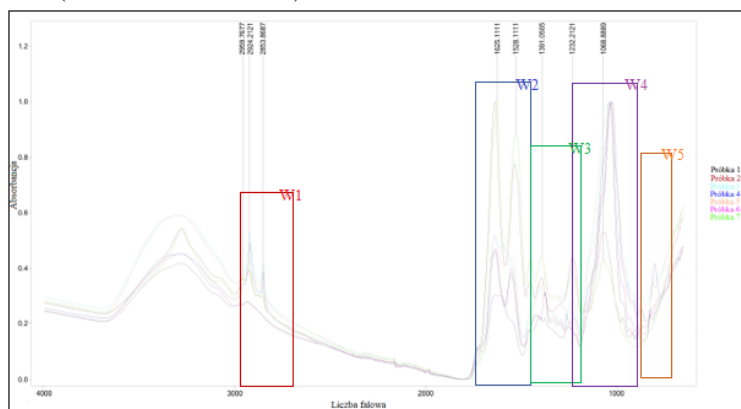
Widmo ATR-FTIR uzyskano wykorzystując Spektrofotometr Spotlight 400 FTIR z oprogramowaniem (Perkin Elmer). Zachowując stałą temperaturę w laboratorium (20°C), po dokładnym oczyszczeniu acetonem kryształu ZeSn, nanoszono próbkę LPS w ilości około 3mg.

Próbkę dociskano do kryształu ustalając około 70% wartości siły docisku. Widma mierzone w zakresie  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  z rozdzielczością  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Każde uzyskane widmo stanowiło średnią 32 interferogramów.

Poziom białka i kwasów nukleinowych ustalono również metodą UV-VIS wykorzystując spektrofotometr NanoDrop 2000 z oprogramowaniem (Thermo Fisher). Do badania wykorzystano preparaty rozpuszczone (zawieszone w wodzie w przypadku suchej masy bakteryjnej) w stężeniu  $1 \text{ mg/ml}$ .

### 3. Wyniki i dyskusja

Preparaty LPS otrzymane różnymi metodami izolacji oraz oczyszczania mogą różnić się stopniem zanieczyszczenia, ilością składników lipidowych i sacharydowych (Ridley i in. 2000). Analiza widma ATR-FTIR wybranych preparatów bakteryjnych umożliwiła analizę ich składu chemicznego. Pomiary zostały wykonane w zakresie liczb falowych charakterystycznych dla związków biologicznych MIR ( $4000 \text{ cm}^{-1} - 600 \text{ cm}^{-1}$ ).

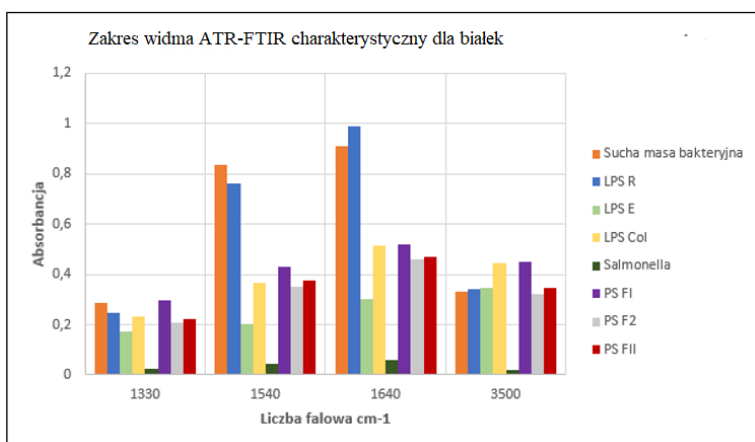


**Rys. 1.** Widma ATR-FTIR preparatów *P. mirabilis* odpowiednio: P1 – PS S1959 F2, P2 – LPS S1959 R, P3 – LPS S1959 Col, P4 – LPS S1959 E, P5 – PS S1959 F1, P6 – PS S1959 FII, P7 – Sucha masa bakteryjna.

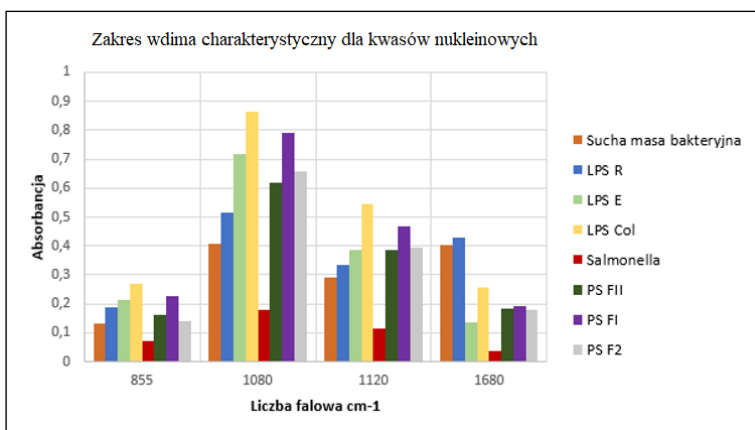
Analiza widm przedstawionych preparatów wykazała znaczne zróżnicowanie w ich składzie chemicznym. Pasma obecne w widmie możemy podzielić na regiony charakterystyczne dla (W) dla: kwasów tłuszczowych (W1  $3000 \text{ cm}^{-1} - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ), peptydy i białka (W2  $1800 \text{ cm}^{-1} - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ), białka przenoszące fosforany i kwasy tłuszczowe (W3  $1500 \text{ cm}^{-1} - 1200 \text{ cm}^{-1}$ ), węglowodany (W4  $1200 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$ ), region „odcisku palca” (W5) (Gonciarz i in. 2020). Różnice zauważyć można w całym zakresie liczb falowych, szczególnie w zakresach charakterystycznych dla białek i kwasów nukleinowych. Co wskazuje na możliwość wykorzystania widm FTIR do analizy składu chemicznego preparatów izolowanych i oczyszczanych różnymi metodami oraz występujących w nich zanieczyszczeń.

Do oceny zanieczyszczenia preparatów składnikami białkowymi analizowano charakterystyczne dla nich pasma:  $3500 \text{ cm}^{-1}$  (amid A; N=H, O=H);  $1640 \text{ cm}^{-1}$  (amid I; C=O, C=N);  $1540 \text{ cm}^{-1}$  (amid II; C=O);  $1330 \text{ cm}^{-1}$  (amid III; C-H, C-C). Wyniki przedstawione na rysunku (Rys. 2) pokazują jak preparaty LPS różnią się między sobą poziomem absorbancji pasm charakterystycznych dla zanieczyszczeń pochodzenia białkowego. Obserwowane różnice w poziomie absorbancji pomiędzy pasmami charakterystycznymi dla białek pomiędzy lipopolisacharydami izolowanymi różnymi metodami świadczą o skuteczności metody do oceny zanieczyszczeń białkowych preparatów. Absorbancja nieoczyszczonego LPS *P. mirabilis* O3 S1959 wynosiła 0,25 dla liczby falowej  $1330 \text{ cm}^{-1}$ , 0,76 dla  $1540 \text{ cm}^{-1}$ , 0,99 dla  $1640 \text{ cm}^{-1}$  oraz 0,34 dla  $3500 \text{ cm}^{-1}$ . Kontrolę pozytywną czystości preparatu stanowiło widmo FTIR komercyjnego LPS wyizolowanego ze

szczepu *Salmonella* dla którego poziom absorpcji wynosił odpowiednio 0,03; 0,04; 0,06; 0,02. Kontrolę negatywną stanowiło widmo FTIR suchej masy bakteryjnej dla którego poziom absorpcji wynosił odpowiednio 0,28; 0,83; 0,91; 0,33. Analiza otrzymanych wyników potwierdza, że najwyższą absorpcją charakteryzują się pasma dla preparatu nieoczyszczonego LPS oraz suchej masy bakteryjnej natomiast najniższy poziom absorpcji obserwujemy w widmie FTIR preparatu komercyjnego. Pozostałe preparaty również różnią się między sobą absorpcją w zakresie liczb falowych charakterystycznych dla białek, co może wskazywać na duże różnice w poziomie zanieczyszczeń pochodzenia białkowego w zależności od zastosowanej metody izolacji i oczyszczania lipopolisacharydu.



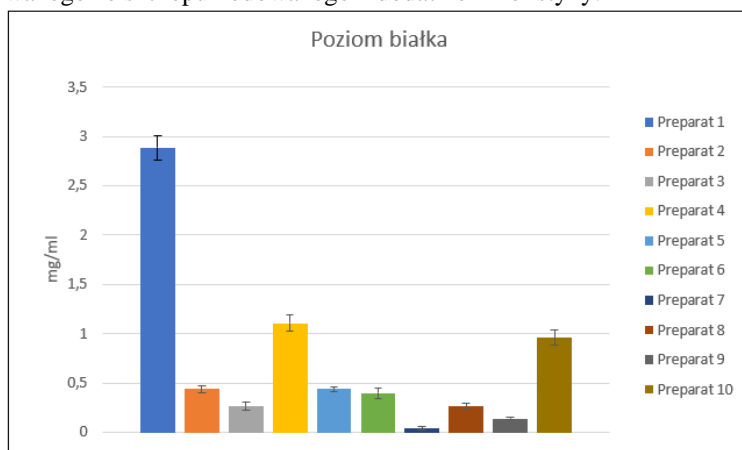
**Rys. 2.** Poziom absorpcji pasm widma ATR-FTIR charakterystycznych dla białek wybranych preparatów lipopolisacharydów.



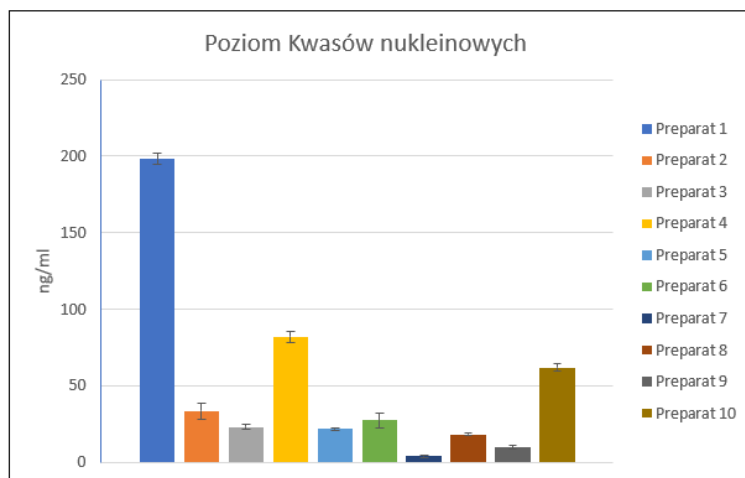
**Rys. 3.** Poziom absorpcji pasm widma ATR-FTIR charakterystycznych dla kwasów nukleinowych wybranych preparatów lipopolisacharydów.

Do oceny zanieczyszczenia preparatów kwasami nukleinowymi analizowano charakterystyczne dla nich pasma: 1680 cm<sup>-1</sup> dla kwasu rybonukleinowego (RNA), 1120 cm<sup>-1</sup> dla rybozy, 1080 cm<sup>-1</sup> dla kwasu deoksyrybonuleinowego (DNA) oraz 855 cm<sup>-1</sup> dla RNA, PO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Poziom absorpcji dla nieoczyszczonego LPS *P. mirabilis* O3 S1959 wynosił 0,19 dla liczby falowej 855 cm<sup>-1</sup>, 0,52 dla 1080 cm<sup>-1</sup>, 0,38 dla 1120 cm<sup>-1</sup> oraz 0,43 dla 1680 cm<sup>-1</sup>. Kontrolę pozytywną stanowił LPS *Salmonella* dla którego poziom absorpcji pasm charakterystycznych dla kwasów

nukleinowych wynosił odpowiednio 0,07; 0,18; 0,11; 0,04. Kontrolę negatywną stanowiła sucha masa bakteryjna, dla której poziom absorbancji wynosił 0,13; 0,41; 0,29; 0,40. Najniższy poziom absorbancji obserwowano dla pasm widma FTIR preparatu komercyjnego, co wskazuje na bardzo niski poziom zanieczyszczeń. Natomiast najwyższy poziom absorbancji obserwowano dla widma preparatu izolowanego ze szczepu hodowanego z dodatkiem kolistyny.



**Rys. 4.** Poziom stężenia białek metodą UV-VIS wybranych preparatów: P1 – LPS 1959 R, P2 – Sucha masa bakteryjna, P3 – LPS S1959 Col, P4 – PS S1959 FII, P5 – PS S1959 FI, P6 – LPS S1959 W, P7 – PS S1959, P8 S1959 A, P9 – S1959 E, P10 – komercyjny LPS *Salmonella*.



**Rys. 5.** Poziom stężenia kwasów nukleinowych metodą UV-VIS wybranych preparatów: P1 – LPS 1959 R, P2 – Sucha masa bakteryjna, P3 – LPS S1959 Col, P4 – PS S1959 FII, P5 – PS S1959 FI, P6 – LPS S1959 W, P7 – PS S1959, P8 S1959 A, P9 – S1959 E, P10 – komercyjny LPS *Salmonella*.

Do porównania wyników widma wykorzystano metodę UV-VIS, która pokazuje poziom białek (Rys. 4) oraz kwasów nukleinowych (Rys. 5) w badanych preparatach. Analiza wyników wykazała najwyższy poziom zarówno dla kwasów nukleinowych (198 ng/ml) jak i białek (2,9 mg/ml) dla nieoczyszczonego preparatu LPS *P. mirabilis* O3 S1959. Natomiast sucha masa bakteryjna oraz preparat komercyjny wykazały znacznie mniejszy poziom zanieczyszczenia z porównanym preparatem. Odpowiednio sucha masa bakteryjna 33,5 ng/ml dla kwasów nukleinowych oraz 0,44 mg/ml dla białek, oraz preparat komercyjny 61,9 ng/ml dla kwasów nukleinowych oraz 1 mg/ml dla

białek. Niski poziom białka otrzymany dla suchej masy bakteryjnej można tłumaczyć tym, że materiał nie był rozpuszczony, a jedynie zawieszony w wodzie co mogło skutkować zaniżonym wynikiem.

Dla obu metod charakterystyczna jest tendencja, przy której preparaty o najwyższym poziomie absorbancji oraz stężeniu białek wykazywały równie wysoki poziom dla kwasów nukleinowych. Ponadto to samo można zauważyć dla preparatów które cechowały się niskim stężeniem tych składników.

#### **4. Wnioski**

Podsumowując, obecna praca przedstawiała zastosowanie metody FTIR w ocenie czystości preparatów endotoksyn bakteryjnych. Dzięki analizie ATR-FTIR, uzyskano informacje na temat poziomu zanieczyszczenia preparatów endotoksyn. Wyniki te w zestawieniu z UV-VIS potwierdziły różnice w poziomie stężenia białek oraz kwasów nukleinowych preparatów izolowanych za pomocą różnych metod. Wyniki badań wskazują, że spektroskopia w podczerwieni może być przydatnym narzędziem do oceny zanieczyszczeń oraz kontroli czystości preparatów endotoksyn. Dalsze badania nad większą liczbą próbek mogą umożliwić standaryzację metody spektroskopii w podczerwieni przy badaniach czystości oraz kontroli jakości preparatów endotoksyn. Spektroskopia FTIR może służyć jako uzupełniająca metoda kontroli czystości izolacji preparatów lipopolisacharydowych.

#### **5. Literatura**

- Deidda F, Bozzi Cionci N, Cordovana M i in. (2021) Bifidobacteria Strain Typing by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Frontiers in microbiology* 12: 692975.
- Gonciarz W, Lechowicz Ł, Urbaniak M, i in. (2020) Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with *H. pylori* Infection in Children and Presumable Consequent Delayed Growth. *Journal of Clinical Medicine* 9(12): 3852.
- Guliev R R, Suntsova AY, Vostrikova TY, i in. (2020) Discrimination of *S. aureus* strains from coagulase-negative Staphylococci and other pathogens by FTIR spectroscopy. *Analytical Chemistry* 7;92(7): 4943-4948.
- Harm S, Schildböck C, Strobl K, i in. (2021) An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the *Limulus* ameocyte lysate test. *Scientific Reports* 11: 4192.
- Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, i in. (2019) Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine* 37(8) 1062–1072.
- Mamat U, Wilke K, Bramhill D, i in. (2015) Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* 14: 57.
- Matsukawa S, Kai S, Seo H, i in. (2021) Activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor exacerbates lipopolysaccharide-induced wasting of skeletal muscle cells by increasing interleukin-6 production. *PloS one* 16(5): e0251921.
- Nyarko EB, Puzey KA, Donnelly CW, (2014) Rapid Differentiation of *Listeria monocytogenes* Epidemic Clones III and IV and Their Intact Compared with Heat-Killed Populations Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Food Science* 79(6): M1189–96.
- Preisner O, Guiomar R., Machado J, i in. (2010) Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics for Differentiation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Phage Types. *Applied and Environmental Microbiology* 76(11): 3538-3544.
- Putker F, Bos MP, Tommassen J (2015) Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Reviews* 39(6): 985–1002.
- Ridley BL, Jeyaretnam BS, Carlson RW (2000) The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient *Rhizobium* lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method. *Glycobiology* 10(10): 1013–1023.

- Solati S, Zhang T, Timman S (2022) The monocyte activation test detects potentiated cytokine release resulting from the synergistic effect of endotoxin and non-endotoxin pyrogens. *Innate Immunity* 28(3-4): 130-137.
- Stuart BH (2004) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Analytical Techniques in the Sciences.*
- Wang R, Wang Y (2021) Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Oral Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci* 22(3): 1206.
- Wongthong S, Tippayawat P, Wongwattanukul M, i in. (2020) Attenuated total reflection: Fourier transform infrared spectroscopy for detection of heterogeneous vancomycin—intermediate *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(2): 22
- Żarnowiec P, Czerwonka G, Kaca W (2017) Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool in Analysis of *Proteus mirabilis* Endotoxins. *Methods Mol Biol* 1600: 113–124.

## 5. Formowanie biofilmu przez *Proteus mirabilis*

Biofilm formation by *Proteus mirabilis*

Dawid Gniazdo, Aleksandra Omelaniuk, Weronika Brudz, Dawid Gmitter

Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Opiekun naukowy: dr. Grzegorz Czerwonka

Dawid Gniazdo: gniazdodawid@gmail.com

Słowa kluczowe: zakażenia dróg moczowych, CAUTI, adhezja komórek, struwit i hydroksyapatyt, fimbrie

### Streszczenie

*Proteus mirabilis* jest Gram-ujemną bakterią zasiedlającą środowisko wodne, gleby, nawozy naturalne i jelita ssaków. Jest to jedna z bakterii powodujących zakażenia dróg moczowych związanych z cewnikami. Jej zdolność do wywoływania takich zakażeń jest związana głównie z tworzeniem biofilmów na powierzchniach cewników. Biofilmy te rozwijają się na wszystkich materiałach cewnikowych, a bakteria ta jest zdolna do przyczepienia się do każdego z nich. *Proteus mirabilis* wykazuje ekspresję czynników wirulencji związanych z adhezją, ruchliwością, unikaniem odporności, zdobywaniem składników odżywczych czy uszkodzaniem gospodarza. Czynniki istotne dla tworzenia biofilmu *P. mirabilis* obejmują czynniki adhezyjne, białka zaangażowane w produkcję LPS, transportery, czynniki transkrypcyjne, systemy dwuskładnikowe, czynniki komunikacyjne i enzymy. Badania nad biofilmem pozwalają na lepsze zrozumienie procesu chorobowego, wywoływanego przez te bakterie, a w konsekwencji doprowadzają do opracowania nowych metod zapobiegania i leczenia. Ze względu na oporność na leczenie przeciwdrobnoustrojowe poszukuje się również alternatywnych metod eliminacji tychże biofilmów.

### 1. *Proteus mirabilis*

*Proteus mirabilis* jest Gram-ujemną bakterią o kształcie pałeczki, dobrze znaną ze zdolności do produkcji ureazy (enzymu hydrolizującego mocznik) oraz charakterystycznej ruchliwości na płytkach agarowych. *P. mirabilis* należy do klasy Gammaproteobacteria i przez długi czas była uznawana za członka rzędu Enterobacterales, rodziny *Enterobacteriaceae*. Jednak stworzenie zrekonstruowanego drzewa filogenicznego przez jedną z grup spowodowało zmianę klasyfikacji rzędu Enterobacterales, umieszczając *P. mirabilis* w nowej rodzinie – *Morganellaceae* (Armbruster i in. 2018). Jest to bakteria beztlenowa, która wydziela polisacharyd, umożliwiający przyczepianie się do powierzchni takich jak cewniki, przewody dożylnie i inne narzędzia medyczne. Jest zdolna do fermentacji maltozy – nie wykazuje takiej zdolności w przypadku laktozy (Jamil i in. 2022). *Proteus mirabilis* można znaleźć w wielu różnych środowiskach – glebie, wodzie i ściekach (Armbruster i in. 2018). Jest również częścią mikrobioty jelitowej człowieka wraz z gatunkami takimi jak *Klebsiella* i *Escherichia coli*. Jest bakterią oportunistyczną, wywołującą zakażenia u ludzi (Jamil i in. 2022).

Nawet 90% zakażeń wywoływanych przez bakterie *Proteus* są spowodowane występowaniem *P. mirabilis*. Zakażenia *proteusem* są zakażeniami endogennymi. Wykazano, że gatunki wywołujące zakażenia pochodzą ze skolonizowanej skóry bądź błony śluzowej jamy ustnej pacjentów oraz od personelu pracującego w szpitalu lub ośrodku opieki długoterminowej (Jamil i in. 2022).

*Proteus mirabilis* jest przyczyną 1-10% wszystkich zakażeń układu moczowego (UTI) w zależności od obszaru geograficznego badania, rodzaju pobranych próbek i charakterystyki badanych pacjentów. W badaniu przeprowadzonym w Ameryce Północnej gatunek ten był przyczyną 4% z prawie 3000 przypadków UTI. W 2006 roku UTI w Stanach Zjednoczonych były przyczyną 11 milionów wizyt lekarskich (Schaffer i Pearson 2015).

UTI występują najczęściej u osób w wieku od 20 do 50 lat, pośród których częściej diagnozowane są u kobiet. U zdrowych kobiet *Proteus* stanowi 1-2% wszystkich UTI (najczęściej *E. coli*), natomiast w szpitalnych UTI stanowi 5% (Jamil i in. 2022).



*Proteus mirabilis* występuje bardzo często przy powikłaniach związanych z zakażeniami układu moczowego na przykład u pacjentów z uszkodzonym rdzeniem kręgowym lub nieprawidłowościami anatomicznymi i przyczynia się do powstawania zakażeń układu moczowego związanych z cewnikami (CAUTI). Szczególnie narażeni na CAUTI są pacjenci podczas długotrwałego cewnikowania – głównie ci w podeszłym wieku. *P. mirabilis* jest również częstym czynnikiem wywołującym bakteriemie (śmiertelność u pacjentów geriatrycznych sięga nawet 50%) (Schaffer i Pearson 2015). W Stanach Zjednoczonych bakteriemia przy zakażeniach układu moczowo-płciowego występuje u 35% pacjentów (Jamil i in. 2022).

Zakażenia dróg moczowych oraz CAUTI, spowodowane obecnością *P. mirabilis*, dają powikłania takie jak tworzenie się kamieni pęcherzowych i nerkowych (kamica moczowa), a nawet mogą prowadzić do uszkodzenia nerek bądź bakteriemii (Armbruster i in. 2018).

U osób zakażonych *P. mirabilis* może dojść do zapalenia cewki moczowej oraz pęcherza moczowego, zapalenie gruczołu krokowego i odmiedniczkowe zapalenie nerek. Zapalenie cewki moczowej objawia się dysurią, ropomoczem oraz częstomoczem. Objawy te są często lekceważone przez pacjentów, dlatego że mają łagodny przebieg. Z kolei zapalenie pęcherza moczowego objawia się ostrą dysurią, małą objętością oddawanego moczu oraz częstomoczem. U pacjentów może wystąpić również gorączka, która może wskazywać na poważniejszy stan, taki jak odmiedniczkowe zapalenie nerek, bakteriemia lub zbliżająca się sepsa. Zapalenie gruczołu krokowego występuje u mężczyzn w ostrzejszym stadium infekcji. Objawy podczas zakażenia są podobne do zapalenia pęcherza moczowego, jednak częściej występuje gorączka i mogą pojawić się dreszcze. Odmiedniczkowe zapalenie nerek występuje jako powikłanie jednego z wyżej wymienionych schorzeń i dlatego pacjent może skarżyć się na objawy zapalenia cewki moczowej lub zapalenia pęcherza moczowego (Jamil i in. 2022).

Leczenie niepowikłanego zakażenia układu moczowego wywołanego przez *P. mirabilis* polega na ambulatoryjnym 3-dniowym leczeniu przy użyciu trimetoprimu/sulfametoksazolu lub doustnie fluorochinolonom (np. cyprofloksacyna). Ostre, niepowikłane odmiedniczkowe zapalenie nerek może być leczone ambulatoryjnie fluorochinolonomi- zalecane jest stosowanie leczenia trwającego od 7 do 14 dni. Alternatywą dla powyższej kuracji jest jednorazowe podanie ceftriaksonu lub gentamycyny, a następnie trimetoprimu/sulfametoksazolu, doustnie fluorochinolonomu lub cefalosporyny przez okres od 7 do 14 dni (Jamil i in. 2022).

Inne bakterie takie jak *Klebsiella* i *E. coli* mogą wywoływać podobne objawy kliniczne jak UTI czy bakteriemia, dlatego konieczne jest wykonanie posiewu bakterii umożliwiającego identyfikację organizmu wywołującego zakażenie i właściwe ukierunkowania terapii (Jamil i in. 2022).

## **2. Proces adhezji**

### **2.1 Adhezja**

Adhezja jest pierwszym i zarazem kluczowym etapem w formowaniu biofilmu przez bakterie. To w zależności od osiągnięcia sukcesu w przyłączeniu się do powierzchni komórek gospodarza zależy, czy bakterii uda się zasiedlić organizm pacjenta. Proces ten polega na związaniu się komórek bakteryjnych z tkankami gospodarza lub wnikięciu do wnętrza komórek eukariotycznych. Dodatkowo proces ten umożliwia bakterii wiązanie się do powierzchni materiałów biomedycznych, czego efektem jest wcześniej wspomniane CAUTI. Proces adhezji rozpoczyna się w momencie, gdy struktury powierzchniowe, takie jak fimbrie, trimeryczne autotransportery, glikokaliks oraz właściwości hydrofobowe błony komórkowej, umożliwiają wiązanie się bakterii ze specyficznymi ligandami na komórkach gospodarza lub z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (Alamuri i in. 2010; Różalski i in. 2007).

Proces adhezji rozpoczyna się w momencie, gdy bakteria „wyczuje” zmiany w pH, osmolalności i rotacji flagelli, które spowodowane są bliskością powierzchni. Kluczowym czynnikiem w procesie adhezji jest energia przyciągania i odpychania powierzchni, reprezentowane przez oddziaływania van der Waalsa i oddziaływania kolumbowski. Adhezje można podzielić na dwa etapy: adhezja odwracalna i nieodwracalna (Li i in. 2021).

Adhezja odwracalna ma miejsce w momencie inicjacji procesu przyłączania się bakterii do powierzchni. W tym czasie komórki wciąż mogą oderwać się od powierzchni i powrócić do postaci planktonicznej. Wykorzystywane są tutaj fimbrie i flagelle w obecności adhezyn oraz zewnątrzkomórkowe polimery bakteryjne (EPS) (Li i in. 2021).

Adhezja nieodwracalna etapem następującym po adhezji odwracalnej. Proces ten przebiega powoli i charakteryzuje się stopniowym zmniejszaniem odległości pomiędzy komórki oraz zwiększaniem siły oddziaływania pomiędzy komórką bakteryjną a powierzchnią. Dochodzi również do zmiany ekspresji genetycznej, która zaczyna być ukierunkowana na formowanie biofilmu (Li i in. 2021).

## 2.2 Fimbrie

Czynnikiem wirulencji mającym istotny wpływ na proces adhezji są fimbrie, które zapewniają bakterii *P. mirabilis* zdolność do ruchu, hemaglutynacji, agregacji i adhezji (Alamuri, Praven i in. 2010). Fimbrie to struktury białkowe, które przypominają włoski występujące na powierzchni komórki. Dzięki nim oraz adhezynom *P. mirabilis* może łączyć się specyficznie z nabłonkiem błony śluzowej dróg moczowych. Do tej pory odkryto i opisano 17 typów fimbrii, z czego 10 z nich koduje w swoich operonach homolog MrpJ – jest to białko regulatorowe, które znajduje się na początku i końcu operonu. Umożliwia ono koordynację ruchliwości oraz adhezji. Najlepiej opisanymi fimbriami są: MR/PM, MR/KH, fimbrie PM, fimbrie nieaglutynujące (Schaffer JN i Pearson MM 2015; Yuan F. i in. 2021), ich charakterystykę przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 1).

**Tab. 1.** Charakterystyka fimbrii *Proteus mirabilis*. Opracowanie własne (Kuan i in. 2014; Rocha i in. 2007; Rózalski i in. 1997; Scavone i in. 2016; Schaffer i Pearson 2015).

Rodzaj fimbrii	Znaczenie
MR/P	Zmutowane szczepy (pozbawione fimbri MR/P) wykazywały niższe wskaźniki adhezji niż szczep <i>P. mirabilis</i> typu dzikiego i były znacznie mniej skuteczne w indukowaniu efektów genotoksycznych i cytotoksycznych w porównaniu do typu dzikiego. Mutanty wykazywały również niższą efektywność kolonizacji dolnych i górnych dróg moczowych, chociaż ich wirulencja nie została zmniejszona.
PMF	PMF pełnią rolę w kolonizacji pęcherza, natomiast kwestia kolonizacji nerek przez szczepy pozbawione PMF jest dyskusyjna.
UCA/NAF	Ogrywiają rolę w adhezji do komórek nabłonka dróg moczowych in vitro. Fimbrie UCA odgrywiają ważną rolę w kolonizacji dróg moczowych.
ATF	Fimbrie ATF odgrywiają rolę w przetrwaniu <i>P. mirabilis</i> w środowisku zewnętrznym ze względu na optymalną temperaturę ekspresji.
PMP	Sugeruje się, że fimbrie PMF odgrywiają rolę w adhezji <i>P. mirabilis</i> w pęcherzu i nerkach.

## 2.3 Trimeryczne autotransportery adhezyn (TAA)

Trimeryczne autoransportery adhezyn (TAA) jest to szeroko rozpowszechniona pośród bakterii Gram-ujemnych rodzina zewnętrznych białek membranowych. TAA są włóknami trimerycznymi, których strukturę można podzielić na 3 podjednostki: głowę, łądygę i kotwicę. Głowy i łądygi zbudowane są z analogicznych, konserwowanych bloków, które w toku ewolucji uległy znacznej rearanżacji, czego efektem jest wysoka różnorodność tych struktur pomiędzy gatunkami. Natomiast kotwica jest homogeniczna i stanowi element definiujący wszystkie TAA. TAA odgrywiają znaczącą rolę w patogenie zakażenia pełniąc różne funkcje, takie jak: promowanie adhezji do komórek gospodarza lub do białek zewnątrzkomórkowej macierzy (ECM), cytotoksyczności, zdolności do autoagregacji. Przykładowym zastosowaniem TAA przez *P. mirabilis* jest użycie białka

AipA w procesie adhezji do komórek nabłonka moczowego. Białko to ułatwia ten proces poprzez zapewnienie bakterii zdolności do wiązania ECM (Bassler i in. 2015; Praveen i in. 2010).

#### 2.4 Glikokaliks

Glikokaliks zbudowany jest z rozpuszczalnych i ujemnie naładowanych polisacharydów, które przyłączone są do O-swoistych łańcuchów polisacharydów, tworząc otoczkę. Dzięki posiadaniu łańcuchów polisacharydów bakterie mają zdolność do wiązania się za pośrednictwem lektyn lub oddziaływań elektrostatycznych z glikolipidami na powierzchni błony komórkowej komórek gospodarza. Otoczka złożona z glikokaliksu zapewnia bakteriom ochronę przed fagocytami, bakteriofagami i przeciwciałami, oraz dodatkowo umożliwia bakteriom rozprzestrzenianie się poprzez ruch ślizgowy (Różalski i in. 2007; Różalski i in. 2012).

#### 2.5 Hydrofobowość

Hydrofobowość błony komórkowej bakterii, która osiągana jest poprzez brak otoczki, redukcję części O-swoistej LPS oraz struktury błony komórkowej takie jak np. fimbrie, zapewniają bakterii zdolność do przylegania do komórek gospodarza. Dodatkowo, ważną zdolnością bakterii jest zdolność do modyfikowania charakteru swojej powierzchni z hydrofobowego do hydrofilowego poprzez zmiany w składzie LPS-u bądź fimbrii. Umożliwia to bakteriom dostosowanie się do potrzeb danego środowiska, co sprzyja zjawisku adhezji (Różalski i in. 2007).

### 3. Biofilm

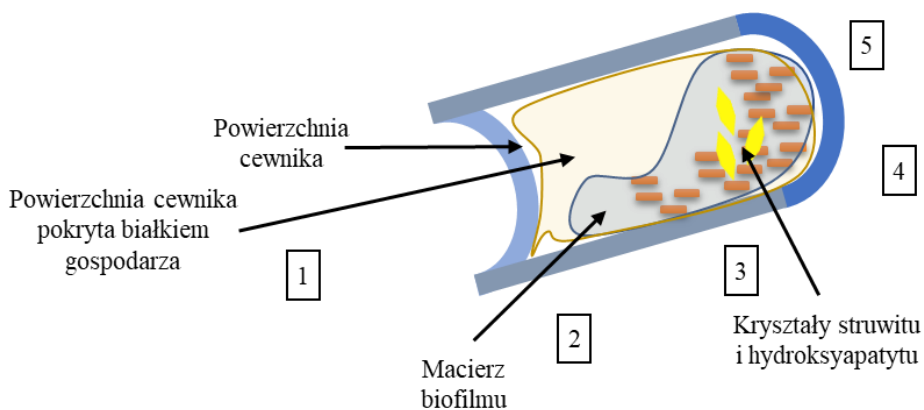
Biofilm jest zbiorem wielu drobnoustrojów, które tworzą agregaty, co ułatwia im przytwierdzenie się do powierzchni, co umożliwia im przetrwanie niekorzystnych dla nich warunków środowiskowych. Bakterie tworzące biofilm, mają zdolność do wywoływania chorób przewlekłych, ponieważ biofilm zapewnia bakteriom ochronę przed układem odpornościowym gospodarza dzięki zmniejszeniu działalności układu dopełniacza oraz zmniejszeniu aktywności fagocytów. Antybiotyki, wykazują zmniejszoną skuteczność w leczeniu chorób wywołanych biofilmami nawet 1000-krotnie (Roy i in. 2018).

Tworzenie biofilmów na wyrobach medycznych prowadzi do zakażeń narządów wewnętrznych np. zakażenie dróg moczowych spowodowane rozwijaniem się biofilmu w cewnikach. Zakażenie dróg moczowych jest jednym z najczęstszych zakażeń szpitalnych (Gayani i in. 2021). Na bazie danych opracowanych przez niemiecki zespół badawczy zakażenia układu moczowego stanowią 21,6% wszystkich zakażeń szpitalnych, z czego za 60% tych zakażeń, odpowiadają zakażenia powiązane z zastosowaniem cewnika. To w cewnikach tworzą się bakteryjne biofilmy, które powodują poważne zagrożenia w opiece zdrowotnej, głównie przez to, że zwiększają one odporność bakterii na antybiotyki oraz układ immunologiczny gospodarza. Daje on bakteriom możliwość np. dalszej kolonizacji organizmu, wtórnych zakażeń krwi. Najczęściej występującymi bakteriami w zakażeniach układu moczowego są *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* oraz *Proteus mirabilis*. Bakteriuria powiązana z cewnikiem w większości odpowiedzialna jest za zakażenia bezobjawowe; tylko 5% zakażeń wymaga leczenia, z czego aż 10% przypadków kończy się śmiercią (Kranz i in. 2020).

*Proteus mirabilis* tworzy charakterystyczny biofilm krystaliczny. W jego składzie poza wydzielonymi przez bakterie zewnątrzkomórkowymi substancjami polimerowymi w których wnętrzu znajdują się bakterie, zawarte są również kryształy hydroksyapatytu i struwitu, które nadają bakteriom dodatkową ochronę przed czynnikami biobójczymi. Głównymi dwoma czynnikami wirulencji, które odpowiadają za tworzenie biofilmu krystalicznego są polisacharydy kapsułkowe oraz enzym ureaza. Enzym ureaza odpowiada za katalizę mocznika do amoniaku co skutkuje wzrostem wartości pH. Efektem wzrostu pH jest wytrącenie wcześniej wspomnianych kryształów fosforanu amonowo - magnezowego oraz hydroksyapatytu fosforanu wapnia. Wytrącone kryształy przyczyniają się do formowania kamieni moczowych w pęcherzu i nerkach o etiologii bakteryjnej. *Proteus mirabilis* produkuje również polisacharydy otoczkowe (CPS), które odpowiadają za przyspieszenie wzrostu kryształów mineralnych, a także mają wysokie powinowactwo do wiązania kationów metali w moczu

poprzez oddziaływania elektrostatyczne oraz niskie powinowactwo do jonów  $Mg^{2+}$ , co pomaga bakteriom w tworzeniu biofilmu (Wasfi i in. 2020).

Formowanie biofilmu krystalicznego zostało dobrze opisane w przypadku CAUTI (Rys. 1). Rozpoczyna się ono od migracji bakterii *P. mirabilis* poprzez ruch pełzający z okolic okołocewkowych na powierzchnie cewnika. Następnie bakteria przy użyciu fimbrii przyczepiają się do powłoki białkowej, pochodzącej z płynów ustrojowych gospodarza lub bezpośrednio do powierzchni cewnika. Następuje rozpoczęcie wytwarzania egzopolisacharydów, czego następstwem jest formowanie biofilmu. Produkowana przez *P. mirabilis* ureaza, powoduje rozkład mocznika w amoniak, czego skutkiem jest podnoszenie się pH i wystąpienie środowiska alkalicznego. Następnym wzrostu poziomu pH jest wytrącanie się kryształów fosforanu magnezu i wapnia, które tworzą kryształy struwitu i hydroksyapatytu. Następuje ureolityczna biomineralizacja, czyli inkorporacja powstałych kryształów do struktury biofilmu. Z czasem rozwijający się biofilm doprowadza do niedrożności cewnika (Wasfi i in. 2020).



**Rys. 1.** Tworzenie biofilmu krystalicznego przez *P. mirabilis*: 1. *P. mirabilis* migruje poprzez ruch pełzający z okolicy okołocewkowych na powierzchnie cewnik; 2. Fimbrie przyczepiają się do powłoki białkowej pochodzącej z płynów ustrojowych gospodarza lub bezpośrednio do powierzchni cewnika. Następuje rozpoczęcie wytwarzania egzopolisacharydów, czego następstwem jest formowanie biofilmu; 3. Produkowana przez *P. mirabilis* ureaza, powoduje rozkład mocznika w amoniak, czego skutkiem jest podnoszenie się pH i wystąpienie środowiska alkalicznego. Następnym wzrostu poziomu pH jest wytrącanie się kryształów fosforanu magnezu i wapnia, które tworzą kryształy struwitu i hydroksyapatytu; 4. Następuje ureolityczna biomineralizacja, czyli inkorporacja powstałych kryształów do struktury biofilmu; 5. W pełni rozwinięty biofilm powoduje niedrożność cewnika. Opracowanie własne (Wasfi i in. 2020).

Zdolność do tworzenia biofilmu krystalicznego przez *P. mirabilis* jest możliwa dzięki działaniu operonów fimbrialnych, które są odpowiedzialne za wytwarzanie aż 17 różnych struktur fimbrialnych. Fimbrie *P. mirabilis* odpowiadają za lepszą przyczepność do tkanek, komórek gospodarza oraz do cewników. Warstwę kondycjonującą, którą bakteria tworzy na cewnikach nazywa się dodatkowym receptorem dla fimbrii, który ułatwia tworzenie biofilmu (Pelling i in. 2019).

#### 4. Podsumowanie

*Proteus mirabilis* jest jednym z wielu patogenów powodujących zakażenia układu moczowego. Ponadto bakteria ta występuje w wodzie, glebie oraz naturalnej florze jelit ssaków. Dzięki zdolności do wydzielania polisacharydu, potrafi przyczepić się do powierzchni wyrobów biomedycznych takich jak: narzędzia medyczne, przewody dożylnie oraz cewniki urologiczne. Tworzenie biofilmu na powierzchniach materiałów medycznych jest bardzo dużym problemem

współczesnej medycyny. Zjawisko to jest powszechne w przypadku *Proteus mirabilis*, ze względu na fakt tworzenia przez bakterie biofilmu krystalicznego. W jego skład wchodzi krysztale hydroksyapatytu oraz struwitu, dzięki czemu bakterie zyskują dodatkową ochronę przed czynnikami biobójczymi. Proces cewnikowania ułatwia namnożenie się tych bakterii w sprzyjających dla nich warunkach środowiskowych. Na chwilę obecną nie ma skutecznych sposobów na poradzenie sobie z problemem CAUTI. Przyjęte rozwiązania jedynie opóźniają pojawienie się biofilmu. To z kolei skutkuje opóźnieniem w pojawieniu się zakażeń, na przykład bakteriurii, charakteryzującego się dysurią, częstomoczem, wymiotami czy gorączką. Badania nad biofilmem pozwalają naukowcom na lepsze zrozumienie całego procesu chorobowego i możliwością znalezienia rozwiązania tego problemu.

## 5. Bibliografia

- Alamuri P., Löwer M., Hiss JA. i in. (2010) Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*." *Infection and immunity* 78(11):4882-4894
- Armbruster CE., Mobley H., Pearson MM (2018) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 8(1).
- Bassler J., Hernandez Alvarez B.H., Marcus D i in. (2015) A domain dictionary of trimeric autotransporter adhesins. *International Journal of Medical Microbiology* 305(2): 265-275.
- Gayani B., Dilhari A., Kottegoda N i in. (2021) Reduced Crystalline Biofilm Formation on Superhydrophobic Silicone Urinary Catheter Materials. *ACS Omega* 6(17): 11488–11496.
- Jamil RT., Foris LA., Snowden J (2022) *Proteus Mirabilis* Infections. Allama Iqbal Medical College, St. George's University University of Nebraska Medical Center.
- Kranz J., Schmidt S., Wagenlehner F i in. (2020) Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Adult Patients. *Dtsch Arztebl Int.* 117(6): 83-88.
- Kuan, L., Schaffer J. N., Zouzias, C. D i in. (2014) Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. *Journal of Medical Microbiology* 63(7): 911–922.
- Li, Y., Li, X., Hao, Y i in. (2021). Biological and Physiochemical Methods of Biofilm Adhesion Resistance Control of Medical-Context Surface. *International journal of biological sciences* 17(7): 1769–1781.
- Pelling, J., Nzakizwanayo, S., Milo, E. L i in. (2019) Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Letters in Applied Microbiology* 68(4): 277-293.
- Roy R., Tiwari M., Donelli G i in. (2018) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9(1): 522-554.
- Różalski A., Kwil I, Iwona., Torzewska A i in. (2007) *Proteus* bacilli: features and virulence factors. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* 61: 204-219.
- Różalski A., Torzewska A., Moryl M i in. (2012) *Proteus* sp. – an opportunistic bacterial pathogen – classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. *Folia Biologica et Oecologica* 8: 1–17.
- Różalski, A., Sidorczyk, Z., Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1): 65–89.
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L i in. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathogens and Disease* 74(5).
- Schaffer JN, Pearson MM (2015) *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr* 3(5).
- Wasfi R., Hamed S.H., Amer M.A i in. (2020) *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 10(414).
- Yuan F., Huang Z., Yang T i in. (2021) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *105(5-6):354-361.*

## **6. Metody zwalczania biofilmu *Proteus mirabilis***

### Biofilm management methods

Dawid Gniazdo, Aleksandra Omelaniuk, Weronika Brudz, Dawid Gmiter

Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Opiekun naukowy: dr. Grzegorz Czerwonka

Dawid Gniazdo: gniazdodawid@gmail.com

Słowa kluczowe: eradykacja komórek bakteryjnych, strategie przeciwbiofilmowe, nowe metody terapeutyczne

### **Streszczenie**

*Proteus mirabilis* to Gram ujemna bakteria, która jest częstą przyczyną zakażeń dróg moczowych związanych z cewnikami (CAUTIs). Jej zdolność do wywoływania takich zakażeń jest związana głównie z tworzeniem tzw. biofilmów krystalicznych na powierzchniach cewników, które mogą doprowadzić do utraty ich drożności. Bakterie osadzone w krystalicznych biofilmach stają się wysoce odporne na konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe oraz na działanie układu odpornościowego. Ze względu na oporność na leczenie przeciwdrobnoustrojowe, w wielu badaniach poszukiwano alternatywnych metod eliminacji biofilmów *P. mirabilis*. Obecny przegląd skupia się na mechanizmie usuwania biofilmów *P. mirabilis*. Metody leczenia obejmują naturalne i syntetyczne związki ukierunkowane na czynniki wirulencji, a także nowatorskie strategie, które pozwalają zwalczać bakterie.

### **1. Wstęp**

Tworzenie biofilmu przez gatunki drobnoustrojów daje im zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych i zwiększa ich oporność na antybiotyki oraz układ odpornościowy gospodarza. Stwierdzono, że bakterie wykorzystujące taką możliwość mają 10-1000 razy większą oporność na związki przeciwdrobnoustrojowe. Do głównych przyczyn powodujących wzrost tej oporności należy macierz biofilmu, która utrudnia przenikanie środków przeciwdrobnoustrojowych przez jej warstwy oraz fizjologiczne właściwości komórek drobnoustrojów – zwłaszcza komórek przetrwalnikowych. Zwiększenie oporności komórek bakteryjnych poprzez utworzenie biofilmu przyczynia się do występowania bakteryjnych infekcji chronicznych, które są poważnym utrudnieniem w procesie leczenia. Bakterie są odpowiedzialne za występowanie ciągłego stanu zapalnego w ranie, co doprowadza do zakłócenia normalnego procesu gojenia się rany. Poważnym problemem medycznym jest również biofilm formowany przez bakterie z rodzaju *P. mirabilis*, ważnego patogenu układu moczowego (zakażenia układu moczowego, UTI) (Wasfi i in. 2020; Percival i McCarty 2015). Biofilm *P. mirabilis* charakteryzuje się odkładaniem w macierzy kryształów struwitu i hydroksyapatytu, które powstają w wyniku krystalizacji zapoczątkowanej przez alkalizację środowiska. Alkalizacja ta jest skutkiem rozkładu mocznika przez enzym ureaza, który jest wysoce wydajnie produkowany przez komórki *P. mirabilis*. Ten charakterystyczny dla *P. mirabilis* typ biofilmu jest często określany jako biofilm krystaliczny. Jednocześnie, jak w przypadku wielu innych drobnoustrojów, komórki *P. mirabilis* w formie biofilmu charakteryzują się wyższym poziomem lekooporności. Co ciekawe, formowanie biofilmu przez *P. mirabilis* prowadzi również do wielu interakcji z innymi gatunkami bakteryjnymi, co ma często negatywne skutki i prowadzić może do nasilenia infekcji. Interakcje te mogą powodować również nabywanie genów oporności na antybiotyki w wyniku horyzontalnego transferu genów (Gmiter i Kaca 2022).

### **2. Metody zwalczania biofilmu**

#### **2.1 Środki przeciwdrobnoustrojowe**

Tworzeniu biofilmu przez *P. mirabilis* towarzyszy zwiększenie oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR). W celu przeciwdziałania nabywaniu oporności stosuje się metody

mające na celu zwiększenie skuteczności stosowanych środków leczniczych. Jedną z takich metod jest podawanie środka przeciwdrobnoustrojowego w odstępach czasowych. Wraz z czasem komórki przetrwałę tracą tolerancję na zastosowany środek przeciwdrobnoustrojowy. Metoda ta została zaproponowana do eliminowania biofilmów i ich komórek przetrwalnikowych. Aby proces leczenia przyniósł pozytywne efekty, czas stosowania środka musi ściśle korelować z czasem wymaganym do utraty tolerancji komórek przetrwałych. Niestety brak pełnego zrozumienia mechanizmów, biorących udział w osiągnięciu tolerancji przez bakterie, utrudnia stosowanie powyższej metody (Wasfi i in. 2020).

Przeprowadzono również badania mające na celu sprawdzenie wpływu minimalnego stężenia hamującego (MIC) i stężenia podprogowego (sub-MIC) antybiotyków na hamowanie bakterii do przylegania komórek do powierzchni plastikowych, hamując przy tym tworzenie biofilmu. W badaniach wykazano, że największą aktywność wykazała ciprofloksacyna, redukując przy tym tworzenie biofilmu do 93% (stężenie antybiotyku odpowiadające 1/2MIC). Niższe stężenia ciprofloksacyny wykazały mniejsze zahamowanie tworzenie biofilmu (Wasfi i in. 2020).

Dalsze badania nad ciprofloksacyną dotyczyły wpływu pH na jej skuteczność antibakteryjną przeciwko formie planktonicznej, jak i rosnącej w biofilmie. Wykazano, że wraz ze wzrostem pH z 5 do 9 powoduje wzrost aktywności bakteriostatycznej i bakteriobójczej powyższego antybiotyku. Wyniki te uzasadniają użycie ciprofloksacyny w leczeniach infekcji *P. mirabilis*, które poprzez aktywność enzymu- ureazy- powodują wzrost pH w środowisku (Irwin i in. 2013).

W celu kontrolowania tworzenia się biofilmu w cewnikach przy użyciu środków przeciwdrobnoustrojowych zastosowano kilka strategii. Po pierwsze, adsorbowanie środków przeciwdrobnoustrojowych na powierzchni cewnika oraz stosowanie zmodyfikowanych materiałów powlekających, co prowadzi do zahamowania przylegania bakterii (Singha i in. 2016). Klinicznie przepadano cewniki pokryte srebrem i antybiotykami. Na tej podstawie stwierdzono, że traktowanie cewnika płynem, w którym zawieszono lub rozpuszczono środki przeciwdrobnoustrojowe umożliwia przyleganie cząsteczek tego środka do powierzchni cewnika. W konsekwencji proces ten zapobiega późniejszemu przyleganiu drobnoustrojów. Przykładem tej strategii jest zastosowanie mieszaniny kwasu migdałowego i mlekowego względem cewników silikonowych. Druga strategia to stosowanie zmodyfikowanych powłok na cewniku o działaniu przeciwdrobnoustrojowym w celu zapobiegania kolonizacji *P. mirabilis*. Powłoki srebrne i cewniki silikonowe pokryte nitrofurazonem wykazały znaczące zapobieganie bakteriurii związanej z cewnikami podczas krótkotrwałego cewnikowania pacjentów hospitalizowanych (Johnson i in. 2012).

Srebro jest dobrze znanym czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym. Ma ono zdolność do wiązania się do wielu bakteryjnych struktur komórkowych takich jak np. peptydoglikan, bakteryjne DNA oraz bakteryjne białka przyczyniając się do zwiększania przepuszczalności błon komórkowych. Cząsteczki srebra indukują wewnątrzkomórkowe utlenianie oraz zakłócają metabolizm bakteryjny. Zwiększając stosunek powierzchni cząsteczek srebra do ich objętości, co możliwe jest poprzez użycie nanocząstek srebra (AgNPs- silver nanoparticles), zwiększa się wydajność działania przeciwdrobnoustrojowego. Poza właściwościami cytotoksycznymi względem bakterii, cząsteczki srebra wykazują również właściwości toksyczne względem komórek ssaczych, takich jak osteoblasty czy mezenchymalne komórki macierzyste. Jednakże skutki uboczne w wyniku stosowania srebra dla komórek ssaczych przejawiają się dopiero w momencie zastosowania wysokich dawek srebra. W przypadku stosowania małych ilości srebra, negatywny wpływ na ludzki organizm nie występuje (Xie i in. 2019; Brennan i in. 2015).

Wykazano, że srebro skutecznie redukuje biofilmy bakteryjne, a jego skuteczność zależy od stężenia. Kluczową właściwością cząsteczek srebra w jest zapobieganie formowaniu biofilmu już przy zastosowaniu niskich stężeń oraz szerokie spektrum działania, niezależnie od rodzaju bakterii (Percival i McCarty 2015).

## 2.2 Substancje fitochemiczne

W przeszłości rośliny były uważane za bogate źródło szerokiej gamy związków bioaktywnych, znanych jako fitochemikalia. Zyskały one szczególne zastosowanie ze względu na aktywność przeciwbiofilmową. Działanie to przypisywano ich zdolności do hamowania czynników

wirulencji związanych z formowaniem biofilmu, w tym: adhezji drobnoustrojów do powierzchni, aktywności ureazy i wytwarzania macierzy egzopolisacharydowej (Ahmed i Urooj 2009).

Przykładem zastosowania substancji pochodzenia roślinnego mogą być liczne badania wykazujące korelację pomiędzy spożywaniem żurawiny a zapobieganiem UTI. Związki obecne w żurawinie zakłócają przyleganie bakterii do komórek urofitalnych, co z kolei uniemożliwia komórkom kolonizację dróg moczowych. Początkowo wykazano, że fruktoza – jeden z głównych składników żurawiny – blokuje fimbrie typu 1, z kolei drugi składnik – proantocyjanidy – hamują oporne na mannozę fimbrie typu P. Dalsze badania wykazały, że również bakterie *P. mirabilis* potraktowane wyciągiem z żurawiny wykazywały niższą zdolność adhezji do komórek linii HT1376 o 75% (Wasfi i in. 2020).

Kolejnym związkiem fitochemicznym, który wykazuje działanie hamujące na biofilm *P. mirabilis*, jest ekstrakt z *Ibicella lutea* – rośliny występującej na wschodzie Ameryki Południowej. Ma ona zdolność do hamowania różnicowania rojowego *P. mirabilis*, co skutkuje zahamowaniem ruchu flagellarnego, jak i tworzenia biofilmu (Wasfi i in. 2020). Istotną rolę w tworzeniu biofilmów przez *P. mirabilis* odgrywa zasadowe pH moczu warunkowane przez aktywność enzymu – ureazy. Wykazano, że związkiem hamującym produkcję ureazy jest allicyna – pozyskiwana z czosnku – która ogranicza tworzenie biokrystalicznego biofilmu nawet o 35%. Ma ona również zdolność do penetracji błony komórkowej bakterii i wewnątrzkomórkowego hamowania enzymu ureazy (Sosa i Zunino 2009).

Stwierdzono również, że kurkumina, silny inhibitor quorum sensing – swoistej formy komunikacji komórek bakteryjnych, w stężeniach poniżej poziomu MIC, zmniejsza produkcję polisacharydów i ruchliwość komórek, a tym samym ogranicza tworzenie biofilmu. Związek ten może również hamować tworzenie się mikrokolonii i prowadzić do degradacji już uformowanego, dojrzalego, biofilmu *P. mirabilis* (Wasfi i in. 2020).

### 2.3 Apiterapia

W apiterapii czynnikiem leczniczym jest miód, który jest jednym z naturalnych zamienników dla antybiotyków. Miód stał się więc obiektem zainteresowania pod kątem jego działania na biofilm bakteryjny. Badania pokazują, że miodem, który cechuje się największą skutecznością antybakteryjna względem *P. mirabilis* był miód manuka, produkowany przez pszczoły *Leptospermum scopiarum* w Nowej Zelandii. Jego aktywność przeciwbakteryjna zależy od następujących czynników: zawartości węglowodanów, wysokiej osmolarności, niskiego poziomu pH (które odpowiada za działanie antybakteryjne również w przypadku innych typów miodów) wraz z charakterystycznymi dla miodu manuka związkami: leptosynie wraz z metyloglioksałem. Dodatkowo miód manuka cechuje się wysoką zawartością fenoli, flawonoidów i brakiem nadtlenu wodoru (Kwiecińska-Piróg i in. 2020; Wasfi i in. 2020).

Miód manuka zapobiega wiązaniu się bakterii z ludzkimi białkami takimi jak fibronektyna, fibrynogen i kolagen. Dodatkowo uniemożliwiają bakteriom wiązanie się z ludzkimi komórkami keratynocytów. Zawarty w miodzie manuka metyloglioksał wraz ze stresem osmotycznym, który wywoływany jest przez nadtlenuk wodoru, przyczyniają się do rozbijania ścian komórkowych bakterii, a enzymy i peptydy produkowane przez pszczoły mogą działać przeciwbakteryjnie. Badania wykazują, że miód manuka hamuje aktywność metaboliczną *P. mirabilis* (w zależności od stężenia) od 1,88% do 30% (Kwiecińska-Piróg i in. 2020; Wasfi i in. 2020).

### 2.4 Repozycjonowanie leków

Repozycjonowanie leków polega na wykorzystaniu wcześniej poznanych i zarejestrowanych leków przygotowanych do leczenia określonych stanów chorobowych, w nowy sposób, który pozwala na znalezienie dla nich zastosowania w nowych terapiach, skierowanych przeciwko innym jednostkom chorobowym. W leczeniu infekcji *P. mirabilis* swoje zastosowanie znalazły m.in. ambroksol, fluoksetyna i tiorydazyna (Wasfi i in. 2020).

Ambroksol jest lekiem odkrztusnym i mukolitycznym, powszechnie stosowanym w leczeniu astmy i przewlekłym zapaleniem oskrzeli. W przypadku zastosowania leku w leczeniu *P. mirabilis* udowodniono, że hamuje on zdolność do wzrostu rozpełzłego (lub rojenia się). Rojenie się jest



jednym z czynników odpowiadających za sukces procesu adhezji i w dalszej kolejności utworzenia biofilmu. Dodatkowo ambroksol posiada zdolność do degradacji dojrzałego biofilmu (Abbas 2013).

Fluoksetyna i tiorydazyna to leki, które są używane odpowiednio w leczeniu depresji i psychozy. Dodatkowo fluoksetyna i tiorydazyna są inhibitorami kanału transportera Bcr/CflA, który odpowiada prawdopodobnie za zarządzanie odpadami w trakcie dojrzewania biofilmu, co umożliwiłoby ciasno upakowanym w macierzy biofilmu komórkom eliminację toksycznych produktów metabolizmu. Przypuszcza się, że blokowanie Bcr/CflA wpływa hamująco na biosyntezę flagelii oraz następuje zmniejszenie poziomu ekspresji genów powiązanych z ruchliwością. Powodem tego jest ograniczenie zdolności do wzrostu rozpełzłego, które w połączeniu z omówionym wcześniej zaburzonym systemem zarządzania odpadami, zmniejsza skuteczność tworzenia biofilmu (Wasfi i in. 2020; Nzakizwanayo i in. 2017).

## 2.5 Terapia Fagowa

Terapia fagowa jest coraz częściej używana ze względu na wzrost występowania chorób spowodowanych bakteriami wielolekoopornymi. Dodatkowo jest dobrą alternatywą dla leczenia antybiotykami chemicznymi (Kortright i in. 2019). Najważniejszym elementem terapii fagowej są bakteriofagi, czyli wirusy, które mają zdolność do infekowania i replikowania w komórkach bakterii (Gordillo Altamirano i Barr 2019). Bakteriofagi wykazują się wąskim spektrum działania, co pozwala eliminować bakterie patogenne bez negatywnego wpływu na florę bakteryjną gospodarza. Jednakże, podobnie jak w przypadku antybiotyków, powstają szczepy odporne na fagi, a penetracja dojrzałego biofilmu jest trudnym wyzwaniem przez fakt istnienia dużej liczby nieaktywnie metabolicznych komórek. W celu usprawnienia procesu fagoterapii łączy się ją z innymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi. Taka terapia, fagowo-lekowa, ma mniejsze szanse na niepowodzenie (Yazdi i in. 2018).

Terapia fagowa polega na likwidacji bakterii za pomocą wprowadzenia do jej komórek wirulentnych fagów (Gordillo Altamirano i Barr 2019). Cały proces odbywa się podczas cyklu litycznego bakteriofagów, w którym fagi przyczepiają się do białkowych receptorów na powierzchni atakowanej bakterii, po czym wprowadzają własny genom do bakterii. Genom fagowy ulega replikacji a następnie uwalnia się z bakterii na drodze lizy komórek. Proces jest powtarzany wielokrotnie, ponieważ nowo powstałe fagi atakują kolejne wrażliwe komórki bakteryjne. Największą zaletą terapii fagowej jest możliwość samonamnażania się fagów, które w tej terapii działają jak lek przeciwko bakteriom (Kortright i in. 2019).

W obszarze terapii fagowej wyróżniamy również: infekcją pierwotną, która obejmuje początkową infekcję bakterii przez bakteriofaga oraz infekcję wtórną, czyli infekowanie bakterii przez nowo powstałe fagi (Chang i in. 2018).

*Proteus mirabilis* może tworzyć biofilm krystaliczny, któremu powstaniu mogą zapobiegać bakteriofagi. Niestety wykazano, że aplikowanie bakteriofagów przed kolonizacją przez komórki zapobiegają tworzeniu się biofilmu, to jednak terapia fagowa jest nieskuteczna względem dojrzałego biofilmu *P. mirabilis*. Wynika to z faktu, że bakteriofagi nie są w stanie dotrzeć do starszych warstw biofilmu *P. mirabilis* (Wasfi i in. 2020).

Wykazano kilka podstawowych czynników ułatwiających atakowanie komórek bakteryjnych przez fagi. Jednym z nich jest obecność jonów takich jak  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{MgCl}_2$ . Są one odpowiedzialne za zwiększanie infekcyjności bakteriofagów poprzez zwiększenie ich stężenia na powierzchni komórki bakteryjnej, co pozwala na sprawniejszą translokację kwasów nukleinowych fagów (Wasfi i in. 2020).

## 3. Podsumowanie

*Proteus mirabilis* jest jedną z głównych przyczyn CAUTI. Infekcje te są skomplikowane ze względu na wyjątkową zdolność *P. mirabilis* do tworzenia krystalicznych biofilmów. W porównaniu z ich planktonicznymi odpowiednikami, komórki osadzone w biofilmach są znacznie mniej wrażliwe na leczenie przeciwdrobnoustrojowe i odpowiedź immunologiczną gospodarza. W wielu badaniach oceniano hamujący wpływ różnych środków przeciwdrobnoustrojowych na biofilmy *P. mirabilis*. Stwierdzono powszechną zgodność co do skuteczności cyprofloksacyny w hamowaniu tworzenia

biofilmu i eliminacji wcześniej uformowanych biofilmów. Zaobserwowano, że cykliczne podawanie środków przeciwdrobnoustrojowych pozwala na zapobieganie powstawania szczepów opornych, co ma duże znaczenie w terapiach anty-biofilmowych. Inne badania dotyczyły działania przeciwbiofilmowego różnych związków fitochemicznych. Wiele fitochemikaliów wykazało obiecujące działanie przeciwbiofilmowe, wpływając hamująco na: przylegania drobnoustrojów do powierzchni czy aktywności ureazy i wytwarzania macierzy egzopolisacharydowej. Apiterapia należy do naturalnych alternatyw, których aktywność przeciwbiofilmowa została wykazana w niektórych badaniach. Przebadano kilka rodzajów miodu i udowodniono, że największy wpływ na hamowanie tworzenia się biofilmu i likwidację wcześniej uformowanych biofilmów *P. mirabilis* ma miód manuka. W niektórych badaniach zalecano również ponowne wykorzystanie niektórych, wcześniej już zarejestrowanych leków takich jak ambroksol, fluoksetyna i tiorydazyna. Zainteresowanie w leczeniu biofilmów bakteryjnych wzbudza jeszcze terapia fagowa. Wykazano, że bakteriofagi skutecznie uniemożliwiają tworzenie biofilmów, jednakże mają problem ze zwalczaniem dojrzałych biofilmów, w których znajdują się duże liczby komórek nieaktywnych metabolicznie.

Wszystkie strategie terapeutyczne wymienione w tym przeglądzie mogą być brane pod uwagę przy zwalczaniu biofilmów *P. mirabilis*. Każda z nich wykorzystuje unikalne mechanizmy działania, co pozwala na stosowanie strategii łączonych w celu uzyskania lepszych wyników. Konieczne są jednak dalsze badania w celu sprawdzenia skuteczności *in vivo* niektórych z tych produktów oraz zapewnienia ich tolerancji i braku toksyczności.

#### 4. Bibliografia

- Abbas HA (2013) Ambroxol blocks swarming and swimming motilities and inhibits biofilm formation by *Proteus mirabilis* isolated from diabetic foot infection. *Asian Journal of Pharmacy and Technology* 3(3): 109-116.
- Ahmed F, Urooj A (2009) Glucose-lowering, hepatoprotective and hypolipidemic activities of stem bark of *Ficus racemosa* in streptozotocin-induced diabetic Rats. *Journal of Young Pharmacist* 1(2), 160–164.
- Brennan SA, Fhoghlú CN, DeVitt BM i in. (2015) Instructional review: General orthopaedics silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *The Bone & Joint Journal* 97-B(5): 582–589.
- Chang RYK, Wallin M, Lin Y i in. (2018) Phage Therapy for Respiratory Infections. *Advanced Drug Delivery Reviews* 133: 76–86.
- Gmiter D, Kaca W (2022) Into the understanding the multicellular lifestyle of *Proteus mirabilis* on solid surfaces. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12:864305.**
- Gordillo Altamirano FL, Barr JJ (2019) Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews* 32(2).
- Irwin NJ, McCoy CP, Carson L (2013) Effect of pH on the *in vitro* susceptibility of planktonic and biofilm-grown *Proteus mirabilis* to the quinolone antimicrobials. *Journal of Applied Microbiology* 115(2): 382-389.**
- Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA (2012) In vitro comparison of nitrofurazone- and silver alloy-coated foley catheters for contact-dependent and diffusible inhibition of urinary tract infection-associated microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(9): 4969–4972.
- Kortright KE, Chan BK, Koff JL i in. (2019) Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host & Microbe* 25(2): 219-232
- Kwiecińska-Piróg J, Przekwas J, Majkut M i in. (2020) Biofilm Formation Reducing Properties of Manuka Honey and Propolis in *Proteus mirabilis* Rods Isolated from Chronic Wounds. *Microorganisms*. 8(11).
- Nzakizwanayo J, Scavone P, Jamshidi S i in (2017) Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Scientific Reports* 7(1).
- Percival SL, McCarty SM (2015) Silver and Alginates: Role in Wound Healing and Biofilm Control. *Advances in Wound Care* 4(7):407-414.
- Singha P, Locklin J, Handa H (2016) A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomaterialia* 50: 20–40.

- Sosa V, Zunino P (2009) Effect of *Ibicella lutea* on uropathogenic *Proteus mirabilis* growth, virulence, and biofilm formation. *The Journal of Infection in Developing Countries* 3(10): 762–770.
- Wasfi R, Hamed SM, Amer MA i in. (2020) *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10(414).
- Xie K, Zhou Z, Guo Y i in (2019) Long-Term Prevention of Bacterial Infection and Enhanced Osteoinductivity of a Hybrid Coating with Selective Silver Toxicity. *Advanced Healthcare Material* 8(5).
- Yazdi M, Bouzari M, Ghaemi EA (2018) Isolation and Characterization of a Lytic Bacteriophage (vB\_PmiS-TH) and Its Application in Combination with Ampicillin against Planktonic and Biofilm Forms of *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infection. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 28(1): 37-46.

## 7. Motyw azyrydino-2-fosfonianów w syntezie aminofosfonianów i ich pochodnych

Aziridine-2-phosphonates motif in synthesis of aminophosphonates and their derivatives

Klarek Mateusz, Rapp Magdalena

Zakład Syntezy i Struktury Związków Organicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Opiekun naukowy: prof. UAM dr hab. Magdalena Rapp

Klarek Mateusz: matkla@amu.edu.pl

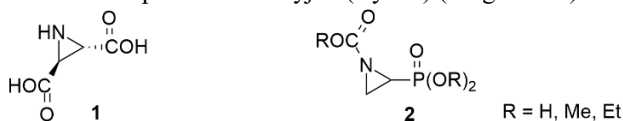
Słowa kluczowe: pierścienie trójczłonowe, związki azotowe, związki fosforowe, reakcje otwierania pierścienia, związki heterocykliczne

### Streszczenie

Poniższy artykuł jest zbiorem wybranych przykładów azyrydino-2-fosfonianów, które zostały omówione pod kątem ich syntezy oraz reaktywności chemicznej w stosunku do określonych nukleofili, a także wykorzystaniu ich jako środków aktywnych biologicznie. W niniejszej pracy przedstawiono szereg różnorodnych metod syntezy, które w dużej mierze opierają się na prostych reakcjach wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji lub addycji do wiązania C=N, z uwzględnieniem stereochemii reakcji. Utworzenie trójczłonowego pierścienia cyklicznego, podstawionego grupą fosfonianową wykazującą efekt wyciągania elektronów, powoduje stosunkowo wysoką reaktywność tytułowych związków, czego dowodem są poniżej omówione reakcje otwarcia pierścienia. Użycie takich nukleofili, jak np. aminy, halogenki czy tiole daje możliwość szerokiej funkcjonalizacji w kierunku tworzenia pochodnych aminofosfonianów. W artykule poruszono także aspekt biologiczny, wskazując na możliwość zastosowania fosfonoazyrydyn jako środków antybakteryjnych, a także przeciwnowotworowych.

### 1. Wstęp

Azyrydyny – nazwane przez Sweeney'a brzydkimi kuzynami epoksydów (Sweeney 2002) – stanowią stale rozwijającą się grupę związków w syntetycznej chemii organicznej, dającą możliwość otrzymania różnorodnych produktów aminowych. Znaczne naprężenie pierścienia, szacowane wg. teorii Beyera na około 111 kJ/mol, wiąże się z dużą reaktywnością tytułowych związków heterocyklicznych, które mogą ulegać regioselektywnemu otwarciu pierścienia. Pomimo stosunkowo dużej reaktywności chemicznej, szkielet azyrydynowy występuje w strukturach związków naturalnych, wykazujących aktywność biologiczną, czy też w farmaceutykach (np. azynomycyna B lub mitomycyna – środki przeciwnowotworowe). O dużym zainteresowaniu azyrydynami świadczy stale rosnąca liczba publikacji z wyszukiwanym hasłem "azyrydyny" - bazując na danych ze Scopus®, tylko od 2000 roku liczba ta wynosi 4335. Znaczący wpływ na stabilność oraz reaktywność azyrydyn, mają podstawniki przyłączone do pierścienia, powodując odpowiednią aktywację lub dezaktywację pierścienia. Szczególnie duży obszar badań, poświęcono azyrydino-2-karboksyłanom, które stanowią cenny materiał wyjściowy w syntezie czynnych optycznie, funkcjonalizowanych aminokwasów i ich pochodnych (Davis i in. 2002). W celu znaczącego polepszenia właściwości biologicznych, często dochodzi do zastąpienia karboksylanów, ich bioizosterycznymi zamiennikami, takimi jak grupa fosforanowa lub fosfonianowa. Udowodniono, że nawet proste strukturalnie związki takie jak (2*S*, 3*S*)- kwas azyrydynodikarboksyłowy (1) lub *N*- podstawiony azyrydino-2-fosfonian (2) wykazują skuteczne działanie przeciwbakteryjne (Rys. 1) (Singh 2016).



**Rys. 1.** Azyrydyny wykazujące aktywność przeciwbakteryjną.

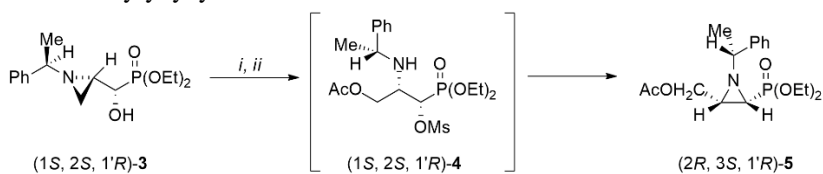
## 2. Opis zagadnienia

Pomimo stale rosnącego zainteresowania nowoczesną syntezą organiczną, wciąż istnieje stosunkowo mało doniesień literaturowych dotyczących syntezy azyrydyn z grupą fosfonianową lub fosforanową i ich dalszych transformacji. Duża atrakcyjność tytułowych związków wynika z wpływu elektrojennego atomu azotu oraz ekstremalnie napiętej struktury pierścienia, który wykazuje dużą reaktywność chemiczną i względnie łatwo ulega reakcjom z nukleofilami. Wśród znanych procedur otwarcia pierścienia najpowszechniejszą drogą do wysoce funkcjonalizowanych  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -aminofosfonianów jest reakcja addycji nukleofilowej do pierścienia trójczłonowego. Ponadto, jedne z najnowszych badań, wskazują na zastosowanie di- oraz monoestrów fosfonoazyrydyn jako związków o działaniu biologicznym, dzięki czemu mogą zostać wykorzystane w syntezie leków przeciwnowotworowych oraz przeciwbakteryjnych. Niniejszy artykuł stanowi zwięzły zbiór literaturowy przedstawiający wybrane przykłady syntezy, reaktywności oraz zastosowania azyrydino-2-fosfonianów i ich pochodnych.

## 3. Przegląd literatury

### 3.1 Metody syntezy azyrydino-2-fosfonianów

Jedną z najprostszych metod otrzymywania azyrydino-2-fosfonianów jest wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja na drodze prostej reakcji substytucji atomu halogenu lub innej grupy łatwo opuszczającej (np. tosyłanowa – OTs lub mesyłanowa – OMs). Tematyka ta została obszernie zbadana przez Wróblewskiego i współpracowników. Jedną z istotniejszych prac opisuje możliwość przekształcenia 1-hydroksypropylofosfonianów do 1,2-epiiminopropylofosfonianów (5) (Rys. 2). Osiągnięto to na drodze transformacji nieaktywowanego azyrydino-2-hydroksymetylofosfonianu (3) z kwasem octowym, a następnie przez *O*-mesylację grupy hydroksylowej i prostą, zachodzącą w obrębie jednej cząsteczki, cyklizację (Wróblewski, Drozd 2011). Analogicznym przykładem jest praca Dolence'a, która przedstawia odrębną syntezę dwóch enancjomerów *N*-podstawionych azyrydino-2-fosfonianów (Dolence i in. 2004). Wychodząc z odpowiednich estrów dietylowych (*S*)- lub (*R*)-fosfonoseryny, poprzez reakcję *O*-mesylowania możliwa jest wewnątrzcząsteczkowa substytucja grupy łatwo opuszczającej, prowadząca do czystego enancjomeru fosfonoazyrydiny.

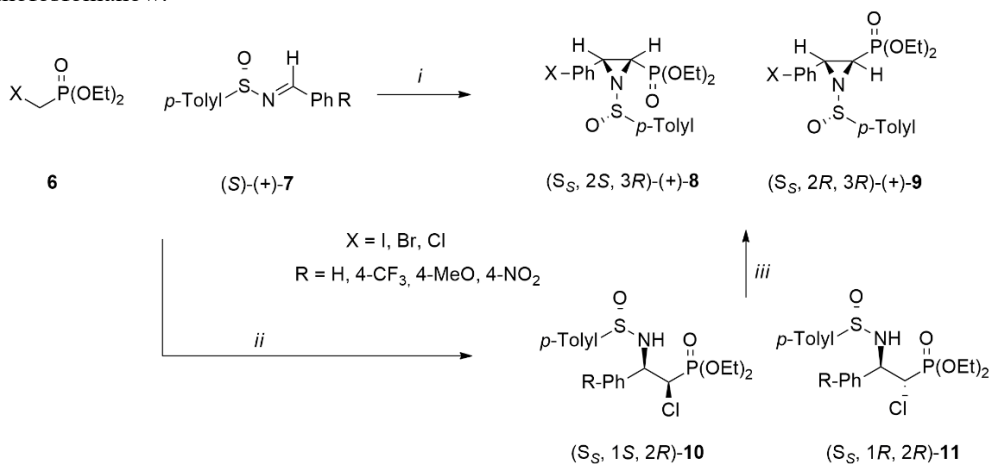


**Rys. 2.** Synteza azyrydino-2-fosfonianu (5) na drodze cyklizacji 1-hydroksypropylo-fosfonianu (4).  
 Warunki reakcji: *i* – AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 89%; *ii* – MsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 93%.

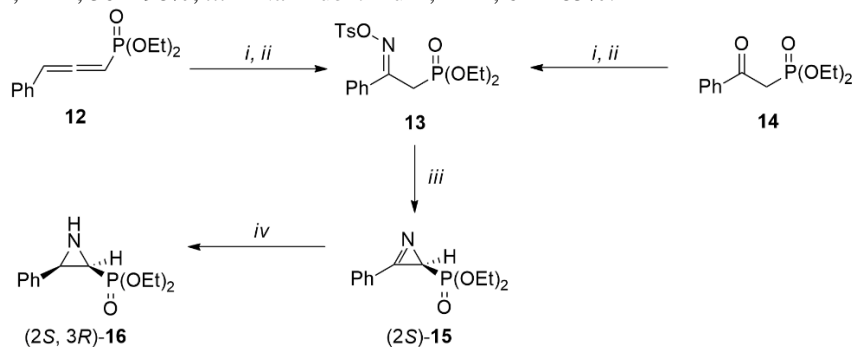
Inną metodą syntezy fosfonoazyrydyn jest reakcja typu Darzensa – podstawionych sulfinimin (7) z halogenometylenofosfonianem dietylu (6). Reakcja prowadziła do izomerycznej mieszaniny *cis* oraz *trans* azyrydyn (8, 9), niemożliwych do rozdzielania za pomocą metod chromatograficznych (Rys. 3). Aby obejść ten problem, produkty pośrednie –  $\alpha$ -chloro- $\beta$ -aminofosfoniany (10, 11) zostały wyizolowane i poddane odrębnej cyklizacji z użyciem *n*-butylolitu lub wodoru sodu, co w rezultacie doprowadziło do czystych enancjomerycznych produktów (8 – 2*S*, 3*R*) oraz (9 – 2*R*, 3*R*) (Davis i in. 2002). Ponadto wykazano, że wprowadzenie dużej sterycznej grupy *tert*-butylowej zastępującej grupę *p*-toluילową powoduje powstawanie tylko jednego izomeru (8 – 2*S*, 3*R*).

Synteza azyrydino-2-fosfonianów może przebiegać również przy użyciu zmodyfikowanej reakcji Nebera z zastosowaniem  $\beta$ -oksymofosfonianu (13) otrzymanego z fosfonianowej pochodnej allenowej (12) oraz hydroksyloaminy (Rys. 4) (Palacios i in. 2003). Związek (13) otrzymano jako mieszaninę izomerów *E/Z* w stosunku 40:60, które zostały rozdzielone. Związek wyjściowy (13)

otrzymano również na drodze prostej dwuetapowej procedury obejmującej kondensację hydroksyloaminy z  $\beta$ -ketofosfonianem (14), a następnie reakcję oksymu z chlorkiem *p*-toluenosulfonylu. Zaletą metody drugiej jest synteza tylko jednego izomeru geometrycznego – (*E*) – oksymofosfonianu (13). Proces ten został rozszerzony do asymetrycznej syntezy azyrynofosfonianu (15), przy dodaniu w reakcji stechiometrycznych ilości chiralnych zasad alkaloidowych, takich jak sparteina (SP), chinidyna (QN), hydrochinidyna (HQ) czy chinina (Q). Użycie tylko jednego izomeru geometrycznego oksymu (13) nie wpływa na większą enancjoselektywność procesu cyklizacji (*iii*). Konfiguracja absolutna azyrynofosfonianów została ustalona poprzez redukcję podstawionego azyryny (15) do azyrydyny (16) i otwarcie pierścienia prowadzące do powstania znanych, optycznie czynnych aminofosfonianów.

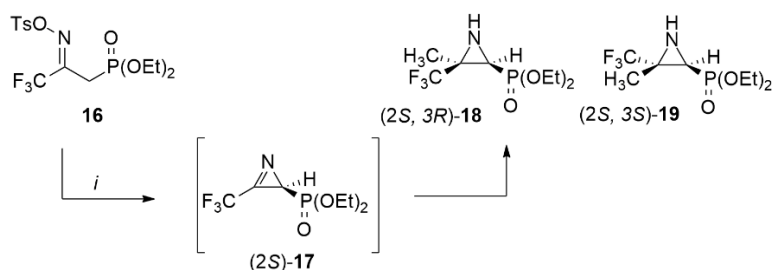


**Rys. 3.** Synteza podstawionych izomerów *N*-*p*-toluilosulfonylo azyrydino-2-fosfonianu (8, 9) na drodze intramolekularnej cyklizacji. *Warunki reakcji:* *i* – LiHMDS, THF, 17 – 71%, *ii* – LiHMDS lub *n*-BuLi, THF, 50 – 98%, *iii* – NaH lub *n*-BuLi, THF, 64 – 85%.



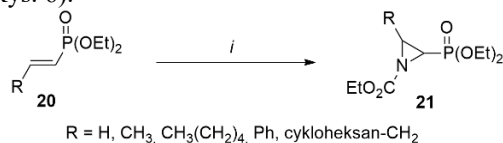
**Rys. 4.** Asymetryczna synteza azyrydino-2-fosfonianu (16) z  $\beta$ -oksymofosfonianu (13). *Warunki reakcji:* *i* – NH<sub>2</sub>OH·HCl, Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>, 74%.; *ii* – TsCl, py, 35%; *iii* – SP lub QN lub HQ lub Q, benzen, 49 – 97%, *iv* – NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 81 – 91%.

W kolejnych latach, powyższy protokół syntetyczny został rozszerzony o dodatkowe wprowadzenie grupy fluoroalkilowej do pierścienia heterocyklicznego (Palacios i in. 2006). Ponadto, odkryto możliwość dalszych transformacji na drodze addycji nukleofilowej odczynnika Grignarda do oksymofosfonianu (16) w wyniku czego otrzymano fluoroalkilowe pochodne azyrydino-2-fosfonianu ze znaczną przewagą *cis*-azyrydyny (18/19 – 75:25) (Rys. 5). Funkcjonalizację azyryny przeprowadzono również przy pomocy nukleofilu takich jak tiofenol oraz imidazol. W obu przypadkach zaobserwowano addycję do wiązania podwójnego i tworzenie wyłącznie jednego izomeru geometrycznego *trans*-azyrydino-2-fosfonianu z wydajnościami odpowiednio 45% i 69%.



**Rys. 5.** Addycja związku Grignarda do azyrynofosfonianu (17). *Warunki reakcji:* *i* –  $\text{CH}_3\text{MgBr}$ , THF/ $\text{Et}_2\text{O}$ , 55 – 73%

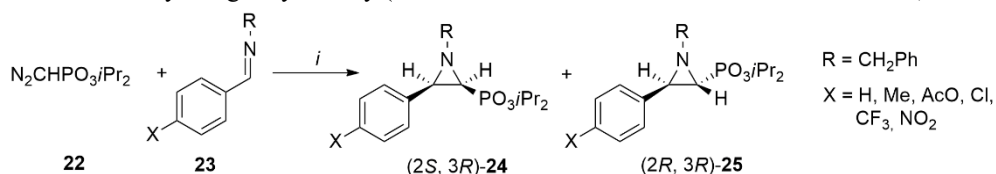
Inną drogą prowadzącą do azyrydino-2-fosfonianów jest reakcja addycji nitrenów do podstawionych olefin. Jednym z najczęściej używanych prekursorów nitrenowych jest *N*-{[(4-nitrobenzylo)sulfonylo]oksy}karbaminian etylu ( $\text{NsONHCO}_2\text{Et}$ ) w połączeniu z trietyloaminą lub nieorganicznymi zasadami, takimi jak tlenek wapnia lub węglan potasu (Fazio i in. 2000). Addycja do wiązania  $\text{C}=\text{C}$  winylofosfonianu (20) prowadziła do cyklicznego produktu aminowego (21) z wydajnościami <46% (Rys. 6).



**Rys. 6.** Azyrydynowanie winylofosfonianów (20). *Warunki reakcji:* *i* –  $\text{NsONHCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{CaO}$ , <46%.

Winylofosfoniany posłużyły również jako substrat w reakcji z [*N*-(*p*-toluenosulfonylo)imino]fenylojodanem ( $\text{PhI}=\text{NTs}$ ) jako źródłem azotu w obecności triflattu miedzi (II) (Kim i Rhie 1997). Katalizowane jonami miedzi azyrydynowanie związku (20) prowadziło do utworzenia *N*-tosylo azyrydino-2-fosfonianów z wydajnościami do 95%. Udowodniono, że znaczący wpływ na szybkość tworzenia azyrydiny miała polarność użytego rozpuszczalnika. Reakcja prowadzona w benzenie wymagała prowadzenia reakcji przez minimum 3 dni, podczas, gdy zastąpienie benzenu acetonitrylem, prowadziło do utworzenia produktu w ciągu 10 minut.

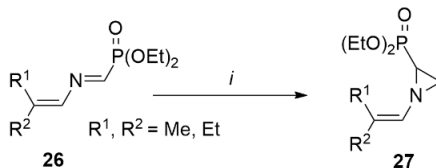
Inna strategia polegała na wykorzystaniu kwasów w katalizowanej reakcji azyrydynowania diazometylofosfonianem diizopropylu (22, DIDAMP) podstawionej aryloiminy (23) (Pellicciari i in. 2007). Największą selektywność uzyskano w obecności triflattu indu (III), co prowadziło do otrzymania tylko jednego izomeru fosfonoazyrydiny (24) (dla niepodstawionego pierścienia aromatycznego, 23:  $\text{X} = \text{H}$ ,) (Rys. 7). Potwierdzono, że wpływ na wydajność oraz diastereoselektywność ma podstawnik przyłączony do pierścienia aryloiminy (23). Największe wydajności produktu uzyskano poprzez wprowadzenie atomu chloru lub grupy acetylowej do pierścienia aromatycznego aryloiminy ( $\text{Cl}$ : *cis/trans* 79%/12%,  $\text{OAc}$ : *cis/trans* 68%/18%).



**Rys. 7.** Azyrydynowanie podstawionej aryloiminy (23) za pomocą DIDAMP (22). *Warunki reakcji:* *i* – DIDAMP,  $\text{In}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *cis* (24): 40 – 79%, *trans* (25): <30%.

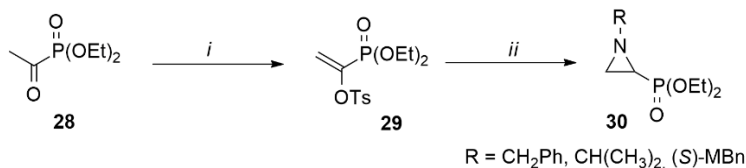
Odmianą, równie skuteczną metodą syntezy podstawionych azyrydino-2-fosfonianów jest wykorzystanie 1-fosfono-2-azadienów w procesie cykloadycji (Stevens i in. 1999). Reakcja azadienów (26) z nadmiarem diazometanu prowadziła do otrzymania 1-winylo-2-fosfonoazyrydyn (27) z wydajnościami w przedziale 68 – 93% (Rys. 8). Chociaż związki karbenowe chętnie reagują

z olefinowym wiązaniem podwójnym tworząc odpowiednie cyklopropany, w tym przypadku nie obserwowano tego zjawiska, co powiązano z efektem wyciągania elektronów przez grupę fosfonianową. W związku z brakiem dowodów na tworzenie pośrednich pochodnych triazolinowych, założono, że mechanizm reakcji przebiega poprzez addycję karbenu do wiązania iminowego C=N.



**Rys. 8.** Azyrydynowanie fosfonoazidienów (26). *Warunki reakcji:* *i* – CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, THF, 68 – 93%.

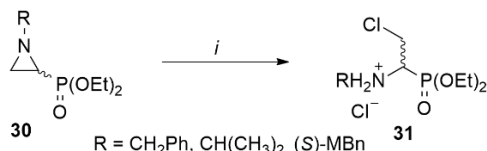
Znane są także przykłady wykorzystania reakcji Gabriela – Cromwella w syntezie fosfonoazyrydyn. Jedną z pierwszych reakcji została przeprowadzona przez Berlina (Rengaraju, Berlin 1972), w której ogrzewając dibromometylenofosfonian w obecności amoniaku, otrzymano azyrydino-2-fosfonian z 62% wydajnością. Metoda ta została zmodyfikowana przez Dogana (Dogan i in. 2011), który zaproponował inny materiał wyjściowy – łatwo otrzymany na drodze reakcji Michaelisa-Arbuzowa – acetylofosfonian (28). Konwersja związku (28) do odpowiedniego tosyliku (29), a następnie reakcja z szeregiem różnorodnych amin prowadziła do otrzymania szerokiej gamy nieaktywowanych azyrydino-2-fosfonianów (30) (Rys. 9). W pracy nie określono konfiguracji centrum stereogenicznego zsyntetyzowanych związków.



**Rys. 9.** Synteza azyrydynofosfonianów (30) na drodze zmodyfikowanej reakcji Gabriela – Cromwella. *Warunki reakcji:* *i* – TsCl, DBU, CH<sub>3</sub>CN, 87%, *ii* – RNH<sub>2</sub>, DBU, CH<sub>3</sub>CN, 50 – 96%.

### 3.2 Reaktywność azyrydino-2-fosfonianów

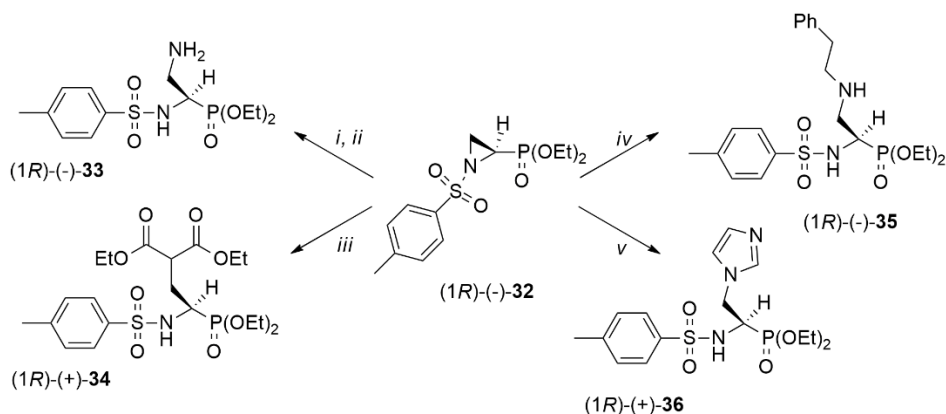
Racemiczne, nieaktywowane fosfonoazyrydiny (30) otrzymane w zmodyfikowanej reakcji Gabriella – Cromwella zostały poddane prostej reakcji otwarcia pierścienia z gazowym chlorowodorem w wyniku czego zsyntetyzowano szereg  $\beta$ -chloro- $\alpha$ -aminofosfonianów (Polat – Cakir i in. 2018). Reakcja zachodzi regioselektywnie – anion chlorkowy atakuje atom węgla z mniejszą przeszkodą steryczną, po wcześniejszym przyłączeniu protonu do atomu azotu (Rys. 10).



**Rys. 10.** Reakcja otwarcia pierścienia nieaktywowanej fosfonoazyrydiny (30) z użyciem gazowego HCl. *Warunki reakcji:* *i* – HCl(g), Et<sub>2</sub>O, 60 – 95%.

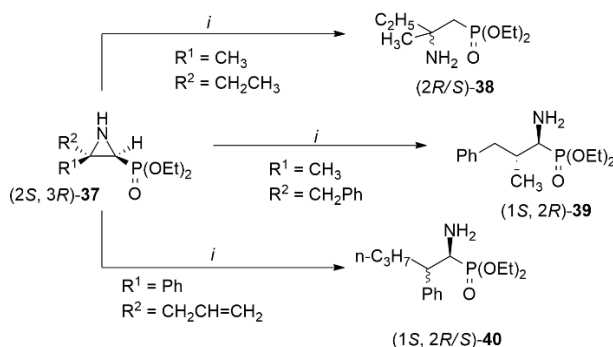
Wykazano, że czysty enenacjomerycznie, aktywowany grupą tosyłową azyrydino-2-fosfonian (32) może bezpośrednio reagować z nukleofilami: węglowymi, azotowymi, siarkowymi, fosforowymi, wodorkami i fluorkami, umożliwiając prostą i wydajną syntezę szerokiej gamy podstawionych  $\alpha$ -aminofosfonianów (Dolence i in. 2004). We wszystkich sprawdzonych przypadkach atak nukleofila zachodzi na atomie węgla C-3 ze względu na najmniejszą zawadę steryczną (Rys. 11). W przypadku nukleofili tiolowych, konieczny był dodatek stechiometrycznych ilości tri-*n*-butylofosfiny w celu znaczącego zwiększenia wydajności produktu otwarcia pierścienia.





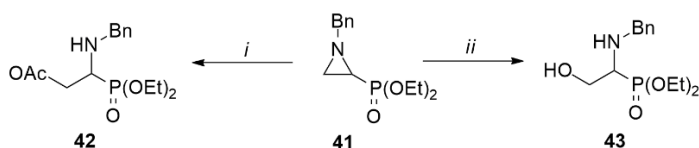
**Rys. 11.** Reakcja otwarcia pierścienia *N*-tosylowanej fosfonoazyrydyny (32) z wybranymi nukleofilami. *Warunki reakcji:* *i* – NaN<sub>3</sub>, DMF; *ii* – 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C, 70%; *iii* – NaH, malonian dietylu, 81%; *iv* – fenyloetyloamina, CH<sub>3</sub>CN, 71%; *v* – imidazol, CH<sub>3</sub>CN, 78%.

Znane są także liczne przykłady selektywnego otwarcia pierścienia azyrydynowego przy użyciu mrówczanu amonu (Palacios, i in. 2005). W obecności Pd/C mrówczan amonu ulega rozkładowi na wodór, dwutlenek węgla i amoniak. Gazowy wodór generowany *in situ*, adsorbowany jest na powierzchni metalu, ulegając reakcji z pierścieniem. Na regioselektywność otwarcia azyrydyny (37) bezpośredni wpływ mają podstawniki przyłączone do atomu węgla C-3 (Rys. 12). Obecność grupy metylowej oraz etylowej powoduje otwarcie pierścienia z utworzeniem racemicznej mieszaniny β-aminofosfonianów (38), podczas gdy w przypadku R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>Ph, obserwowano tworzenie pojedynczego izomeru *anti* α-aminofosfonianu (39). Inną stereochemię uzyskano w przypadku zastosowania związku z podstawnikami R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, gdzie zaobserwowano powstanie mieszaniny izomerów *syn/anti* w stosunku 50:50 (40). Warunki reakcji sprzyjały również uwodornieniu grupy alilowej do ugrupowania *n*-propylowego.



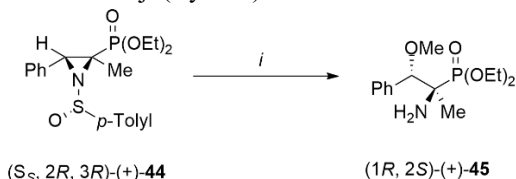
**Rys. 12.** Regio- i stereoselektywność reakcji otwarcia pierścienia *N*-niepodstawionej fosfonoazyrydyny (37) z mrówczanem amonu. *Warunki reakcji:* *i* – NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH, 58% (38), 73% (39), 54% (40).

Zaproponowana przez Wróblewskiego (Wróblewski, Drozd 2011) metoda otwarcia pierścienia *N*-alkilo azyrydino-2-hydroksymetylofosfonianów z kwasem octowym, została rozszerzona i sprawdzona na prostych azyrydynofosfonianach (Dogan i in. 2019). Reakcja prowadzona w czystym kwasie octowym, dała oczekiwany produkt otwarcia podstawiony grupą acetylową (42) z 96% wydajnością. Jednak, gdy ten sam substrat poddano reakcji z kwasem trifluoroctowym w acetonie, otrzymano β-hydroksy-α-aminofosfonian (43) z 82% wydajnością (Rys. 13).



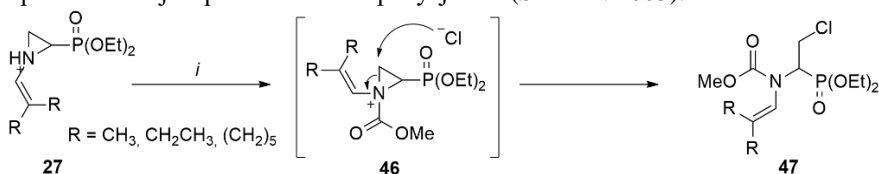
**Rys. 13.** Reakcje otwarcia pierścienia nieaktywowanej fosfonoazyrydyny (41) z kwasami karboksylowymi. *Warunki reakcji:* *i* – CH<sub>3</sub>COOH, 96%; *ii* – CF<sub>3</sub>COOH, aceton, 82%.

Aktywacja *N*-alkilo fosfonoazyrydyn może odbyć się także przy pomocy kwasów Lewisa (Davis i in. 1999). Potraktowanie 2-metyloazyrydyno-2-fosfonianu (44) metanolem w obecności eteratu BF<sub>3</sub>xOEt<sub>2</sub> prowadziło do pochodnej β-metoksy-α-metylofosfonofenylo-alaniny (45) z całkowitą kontrolą regiochemii reakcji (Rys. 14).



**Rys. 14.** Reakcja otwarcia pierścienia fosfonoazyrydyny (44) katalizowanej kwasem Lewisa. *Warunki reakcji:* *i* – MeOH, BF<sub>3</sub>xOEt<sub>2</sub>, 90%.

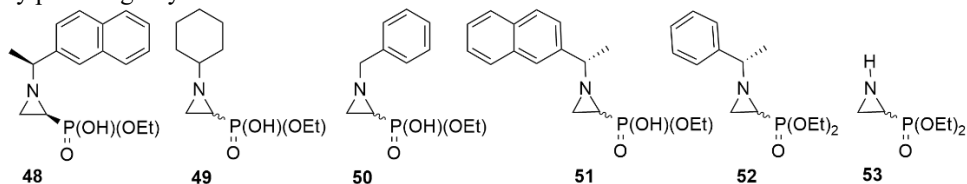
W przypadku nieaktywowanych azyrydyno-2-fosfonianów, uniwersalnym reagentem jest także chloromrówczan metylu, który przyłączając się do atomu azotu, aktywuje azyrydynę (Vanderhoydonck i in. 2007). Anion chlorkowy otwiera trójczłonowy pierścień z całkowitą regioselektywnością przy atomie węgla C-3 (Rys. 15). Obserwowany kierunek reakcji, jest zupełnie przeciwny w stosunku do analogicznej reakcji nieaktywowanych azyrydyno-2-karboksylianów, w których preferowane jest podstawienie w pozycji C-2 (Sim i in. 2003).



**Rys. 15.** Reakcja otwarcia pierścienia fosfonoazyrydyny (27) chloromrówczanem metylu. *Warunki reakcji:* *i* – ClCO<sub>2</sub>Me, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 – 61%.

### 3.3 Aktywność biologiczna kwasów azyrydyno-2-fosfonowych i ich estrów

Pomimo niewielu doniesień literaturowych dotyczących zastosowania azyrydyno-2-fosfonianów w biologii lub medycynie, jedne z najnowszych prac dowiodły, że kwasy azyrydynofosfonowe i ich estry wykazują ciekawą aktywność biologiczną (Khan 2019). Cytotoksyczność komórkowa tych związków testowana była względem linii komórkowych raka jelita grubego HCT-116 i linii fibroblastów okrężnicy CCD-18Co. Trzy z dziewięciu (48 – 50) zsyntetyzowanych pochodnych kwasu fosfonowego wykazywały wyższą cytotoksyczność niż związek referencyjny (Rys. 16). Potwierdzono, że wpływ na cytotoksyczność otrzymanych związków miał rodzaj grupy ochronnej na atomie azotu. Nie obserwowano znaczącej różnicy w aktywności między poszczególnymi diastereoizomerami.



**Rys. 16.** Przykłady kwasów azyrydyno-2-fosfonowych i ich estrów wykazujących aktywność biologiczną.

Jako kontynuację poprzednich badań biologicznych (Khan i in. 2020), określono aktywność przeciwbakteryjną rozszerzonej serii kwasów azyrydynofosfonowych i ich estrów (48 – 53). Porównując aktywność wobec sześciu testowanych rodzajów bakterii (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*), wskazano, iż fosfonoazyrydyny (52 – 53) wykazywały wyższe wartości inhibicji niż ich odpowiednie monoestry (48 – 51). W przypadku bakterii *Acetobacter baumannii*, wszystkie z przebadanych związków wykazywały taką samą wartość (250 µg) minimalnego stężenia hamującego (MIC), jak referencyjny antybiotyk – chloramfenikol (CHL). Powyższe badania świadczą o dużej aktywności biologicznej azyrydyn podstawionych atomem fosforu i stanowią świetny materiał wyjściowy do kontynuowania testów nad potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi oraz przeciwbakteryjnymi.

#### 4. Podsumowanie

O ile tematyka syntezy i reaktywności  $\alpha$ - jak i  $\beta$ -aminofosfonianów, była przedmiotem licznych badań przez wiele lat i doczekała się pokaźnej kolekcji artykułów przeglądowych, o tyle chemia fosfonoazyrydyn w tym obszarze jest jak na razie stosunkowo słabo poznana. W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił wzrost zainteresowania tą grupą związków, zazwyczaj jednak są to pojedyncze prace, na podstawie których trudno formułować ogólne wnioski dotyczące reaktywności chemicznej oraz biologicznej azyrydino-2-fosfonianów. Reasumując, powyższy zbiór literaturowy świadczy o dużym potencjale syntetycznym tytułowych związków i może stanowić inspirację do kontynuowania rozwoju tej tematyki. Uzasadniony, zatem wydaje się fakt, poszukiwania nowych protokołów syntetycznych oraz badania aktywności biologicznej azyrydyn podstawionych atomem fosforu, w kontekście odkrycia nowych związków o dużym znaczeniu biologicznym.

#### 5. Literatura

- Dolence, E. K., Roylance, J. B. (2004) Optically active diethyl N-(p-toluenesulfonyl)-aziridine 2-phosphonates as chiral synthons for the synthesis of  $\beta$ -substituted  $\alpha$ -amino phosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry* 15(20), 3307-3322.
- Khan, R., Dogan, O., Guven, K. (2020) N-Substituted aziridine-2-phosphonic acids and their antibacterial activities. *Organic Communications*, 13(2), 51 – 56.
- Khan, R., Ulasan, S., Banerjee, S., et al. (2019) Synthesis, characterization and evaluation of cytotoxic activities of novel aziridinyl phosphonic acid derivatives. *Chemistry & Biodiversity*, 16(11), e1900375.
- McCoull, W., Davis, F. A. (2000) Recent synthetic applications of chiral aziridines. *Synthesis* 2000(10), 1347-1365.
- Palacios, F., Aparicio, D., de Retana, A. M. O., et al. (2003). Asymmetric synthesis of 2H-aziridine phosphonates, and  $\alpha$ - or  $\beta$ -aminophosphonates from enantiomerically enriched 2H-azirines. *Tetrahedron: Asymmetry* 14(6), 689-700.
- Palacios, F., Ochoa de Retana, A. M., Alonso, J. M. (2005) Reaction of 2 H-Azirine phosphine oxide and-phosphonates with nucleophiles. Stereoselective synthesis of functionalized aziridines and  $\alpha$ - and  $\beta$ -aminophosphorus derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* 70(22), 8895-8901.
- Polat-Cakir, S., Beksultanova, N., Dogan, Ö. (2018) Synthesis of  $\beta$ -chloro- $\alpha$ -aminophosphonate derivatives via the regioselective ring opening of unactivated aziridine-2-phosphonates. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 193(12), 858-864.
- Singh, G. S., D'hooghe, M., De Kimpe, N. (2007) Synthesis and reactivity of C-heteroatom-substituted aziridines. *Chemical reviews* 107(5), 2080-2135.
- Sweeney, J. B. (2002) Aziridines: epoxides' ugly cousins? *Chemical Society Reviews* 31(5), 247-258.
- Wróblewski, A. E., Drozd, J. (2011) Synthesis of four stereoisomers of protected 1, 2-epiimino-3-hydroxypropylphosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry* 22(2), 200-206.

## **8. Entomopatogenne właściwości bakterii *Pseudomonas entomophila***

Jakub Kordaczuk

Katedra Immunobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie

Jakub Kordaczuk : jakub.kordaczuk@o2.pl

### **Streszczenie**

W 2001 roku grupa francuskich naukowców wyizolowała z muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, pochodzącej z Gwadelupy, nowy szczep bakterii, któremu nadano nazwę gatunkową *Pseudomonas entomophila*. Sekwencjonowanie genomu bakteryjnego ujawniło, że koduje on szereg czynników wirulencji, takich jak toksyny owadobójcze, lipazy zewnątrzkomórkowe i proteazy. *P. entomophila* jest w stanie wytwarzać cyjanowodór i liczne metabolity. Jest jedyną bakterią z grupy *Pseudomonas* o właściwościach entomopatogennych. W środowisku naturalnym do zakażenia *P. entomophila* dochodzi przez połknięcie lub uszkodzenie naskórka owada.

### **1. Wstęp**

Badanie mechanizmów interakcji gospodarz-patogen pozwala zrozumieć molekularną rolę poszczególnych elementów układu odpornościowego owadów oraz czynników wirulencji patogenów. W 2001 roku grupa francuskich naukowców wyizolowała nowy gatunek bakterii *Pseudomonas entomophila* z *Drosophila melanogaster* (Dieppois i in. 2014; Sarris i Scoulica 2011). Sekwencjonowanie genomu bakteryjnego ujawniło, że koduje on szereg potencjalnych czynników wirulencji, w tym możliwe związki przeciw owadom (Sarris i Scoulica 2011). Pełna sekwencja *P. entomophila* wynosi 5,9 Mb i dostarcza cennych informacji na temat pokrewieństwa ewolucyjnego i czynników wirulentnych, które posiada *P. entomophila*. Zakażenie bakteriami *P. entomophila* następuje poprzez spożycie lub w wyniku uszkodzenia naskórka owada. Pomimo cennych informacji dostarczonych przez badania z muszką owocową, wiele ważnych informacji na temat tego szczepu nie zostało jeszcze odkrytych (Vodovar i in. 2005; Vodovar i in. 2006).

### **2. Morfologia i właściwości *P. entomophila***

*Pseudomonas entomophila* zalicza się do pałeczek Gram-ujemnych. Strukturę bakterii wyróżnia jedna polarna wici na biegunie komórki. Ten szczep jest ściśle tlenowy, katalazo- i oksydazo-dodatni. *P. entomophila* ma zdolności hemolityczne, co wykazano po inkubacji na agarze wraz z płytkami z krwią. Wykryto zewnątrzkomórkową aktywność proteazy. Stwierdzono, że *P. entomophila* posiada zdolności fluorescencyjne. Bakterie te tolerują szeroki zakres temperatur (4°C–42°C) i pH (3–10), jednak optymalna temperatura wzrostu to 30°C i zakres pH 5–9 (Shanbhag i Tripathi 2009; Shahbaz -Mohammadi i Omidinia 2011). Genom *P. entomophila* został zsekwencjonowany w 2006 roku. Wykazano, że jego wielkość to 5888780 par zasad. Spośród wszystkich zidentyfikowanych genów tylko 67% ma znaną funkcję. Należy zauważyć, że wielkość genomu *P. entomophila* jest kilkakrotnie mniejsza w porównaniu z genami innych bakterii z grupy *Pseudomonas*. Mniejszy rozmiar genomu *P. entomophila* nie jest wynikiem zmian ewolucyjnych (Vodovar i in. 2005; Vodovar i in. 2006). Analiza genomu przy użyciu BLAST pomogła zidentyfikować rdzeń genomu, który składa się na 1002 geny. Analiza genomu *P. entomophila* również potwierdza ścisły związek genetyczny z *P. putida*. 70,2% genów szczepu *P. entomophila* ma swoje ortologi w genomie *P. putida*. Spośród wszystkich genów budujących genom *P. entomophila* tylko 50 genów znajduje się w innych bakteriach z grupy *Pseudomonas*, ale nie w *P. putida*. 34 geny obecne w szczepie *P. putida*, budują genom innych bakterii z grupy *Pseudomonas*, ale nie występują w *P. entomophila*. Genom *P. entomophila* został w znacznie mniejszym stopniu przemodelowany przez ruchome elementy genetyczne i insercje bakteriofagów w stosunku do innych bakterii z grupy *Pseudomonas*, a przede wszystkim *P. putida* (Vodovar i in. 2005; Vodovar i in. 2006). Genom *P. entomophila* zawiera sześć przypuszczalnie aktywnych transportaz i jest pozbawiony intronów typu

II, co jest jedną z głównych różnic między genomami obu szczepów (Dieppoiss i in. 2014; Sarris i Scoulica 2011).

### **3. Wirulencja *Pseudomonas entomophila***

Bakterie *Pseudomonas entomophila* posiadają szereg czynników wirulencji zakodowanych w swoim genomie. Jednym z głównych elementów pozwalających na skuteczną walkę z gospodarzem są proteazy. Genom *P. entomophila* koduje trzy proteazy serynowe (pseen3027, pseen3028, pseen4433) i jedną proteazę alkaliczną (pseen1550), która nie jest kodowana przez genom *P. putida* (Liehl i in. 2006). Proteaza alkaliczna jest alkaliczną metaloproteinazą – homologiem AprA, której główną funkcją jest ochrona bakterii przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Białko AprA występuje w dużych ilościach w supernatancie bakteryjnym *P. entomophila*, co potwierdza jego ważną funkcję w patogennych mechanizmach działania na organizm owada (Dieppoiss i in. 2014). Dodatkowo sekwencja genomu *P. entomophila* zawiera geny dla czterech katalaz, dwóch dysmutaz ponadtlenkowych, trzech reduktaz wodoronadtlenkowych i jedenastu transferaz S-glutationowych (Dieppoiss i in. 2014). *P. entomophila* jest zdolny do wytwarzania białka kompleksu TccC – toksyny owadobójczej, co jest charakterystyczne tylko dla bakterii entomopatogennych. Jego genom koduje białka bardziej odległe spokrewnione z TccC i TcdB, których funkcja w mechanizmie wirulencji nie została jeszcze zbadana. Genom *P. entomophila* koduje szereg wirulentnych czynników odpowiedzialnych za wiązanie z powierzchnią komórek gospodarza, które wpływają na adhezję bakterii i kolonizację organizmu owada. Głównymi związkami odpowiedzialnymi za adhezję są geny kodujące hemaglutyninę nitkowatą oraz białko adhezji powierzchniowej. Genom bakteryjny *P. entomophila* zawiera geny kodujące układy wydzielnicze typu I (T1SS) odpowiedzialne za dostarczanie białek bezpośrednio do komórek gospodarza. Istnieje pojedyncze locus konserwatywnego rdzenia typu VI genu układu wydzielniczego. Ponadto w genomie znajdują się geny kodujące białka VgrG i Hcp, które są homologami T6SS. Szczep *P. entomophila* nie zawiera układu wydzielniczego typu III, który jest obecny u innych bakterii chorobotwórczych. Fakt ten sugeruje istotną rolę układu wydzielniczego typu IV w mechanizmie oddziaływań gospodarza z patogenem (Dieppoiss i in. 2014; Sarris i Scoulica E. 2011; Zozaya-Hinchliffen i in. . 2010). Trzy rzędy owadów: Diptera, Lepidoptera i Coleoptera są znane z podatności na infekcje *P. entomophila*. Istnieją doniesienia o zdolności tych bakterii do infekowania *Dictyostelium discoideum* i *Cenorhabditis elegans*. Skutek zakażenia szczepem *P. entomophila* zależy od drogi zakażenia, a także od ilości bakterii zakażających organizm gospodarza. Infekcje larw *D. melanogaster* przez nakłucie i wprowadzenie pasty bakteryjnej do wnętrza ciała zabijają żywiciela w ciągu 24 godzin. Zakażenie muszki owocowej przez infekcję naturalną – doustnie, wpływa na wolniejszy rozwój infekcji, a efekt śmiertelny różni się w zależności od dawki patogenu. Naturalnie zakażony *D. melanogaster* przez dodanie do zawiesiny bakterii spożywczych OD600 = 50–100 prowadzi do kolonizacji gospodarza w ciągu 2-3 dni (Dieppoiss i in. 2014). Zakażenie owadów niższą dawką bakterii – OD600 = 5–25, powoduje śmiertelne działanie po 4 dniach. Zakażenie *P. entomophila* o stężeniu mniejszym niż OD600=1 nie ma śmiertelnego wpływu na *D. melanogaster* (Buchon i in. 2009; Vallet-Gely i in. 2010) Zjadliwość *P. entomophila* zależy od zdolności nabłonka jelitowego do obrony organizmu gospodarza, a także wytwarzania i dystrybucji czynników wirulencji, które zaburzają homeostazę organizmu (Dieppoiss i in. 2014).

### **4. Rola metabolitów w infekcji *Pseudomonas entomophila***

Genom *Pseudomonas entomophila* koduje pięć głównych grup genów zebranych w klastry, których produktami są metabolity wtórne. Pierwsza grupa koduje peptyd nierybosomalny i odpowiada za produkcję cyjanowodoru. pozostałe cztery klastry kodują peptydy nierybosomalne, które są odpowiedzialne za syntezę składników budujących lipopeptydy i poliketyd (Dieppoiss i in. 2014). Zdolność do wytwarzania cyjanowodoru – HCN przez bakterie *P. entomophila* pozwala zaliczyć go do grupy bakterii cyjanogennych. Poziom produkcji HCN zależy od dostępności tlenu i w tym przypadku nie wpływa znacząco na poziom zjadliwości szczepu. Spośród wszystkich grup klastrów genów NRPS w *P. entomophila* jeden z nich może mieć istotny wpływ na zjadliwość

bakterii. Klaster składa się z genów pseen0131, pseen0132, pseen0133 (Vodovar i in. 2005; Vodovar i in. 2006). Produkcja metabolitów wtórnych nie wpływa istotnie na zdolność zabijania owadów, jednak istotne może być infekowanie organizmów należących do innych grup. Genom *P. entomophila* koduje chitynazy, lipazy, proteazy i niescharakteryzowane hydrolazy. Enzymy te wykazują aktywność hydrolityczną i mogą degradować polimery obecne w środowisku, a także w ciele owada. W sekwencji nukleotydujowej *P. entomophila* rejestrowane są również geny kodujące związki o właściwościach bioremidalnych, liczne transportery i elementy regulatorowe pozwalające na adaptację do różnych warunków środowiskowych. Zdolność do syntezy szeregu metabolitów wtórnych, a także wielu genów kodujących czynniki wirulencji, pozwala *P. entomophila* na kolonizację szeregu nisz ekologicznych – gleby, ryzosfery i systemów wodnych (Vodovar i in. 2006; Shahbaz-Mohammadi i Omidinia, 2011). Jednak bakteria ta nie jest patogenem roślin (nie ma genów kodujących enzymy trawiące składniki roślin). Wykazano, że bakterie *P. entomophila* uczestniczą w promocji wzrostu roślin, przeciwdziałając rozwojowi patogenów grzybowych (Chattopadhyay i in. 2004; Vodovar i in. 2006). Zdolność do wzrostu i rozwoju w wielu różnych środowiskach, a także właściwości wirulencji *P. entomophila* są regulowane przez dwuskładnikowy układ GacS/GacA. (Vodovar i in., 2006). Jego głównymi elementami są kinaza serynowa i regulator odpowiedzi. System ten spełnia ważną rolę w adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych oraz aktywacji czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych (Heeb i Haas 2001).

### **5. Interakcje molekularne pomiędzy *P. entomophila* i *Drosophila melanogaster***

Układ odpornościowy owadów składa się wyłącznie z mechanizmów odporności wrodzonej. Obejmuje on odpowiedź humoralną i komórkową. Badania nad wpływem zakażenia *Drosophila melanogaster* przez *Pseudomonas entomophila* wykazały, że patogen aktywuje szereg elementów układu odpornościowego gospodarza. Wśród elementów odpowiedzi humoralnej *D. melanogaster* należy wymienić peptydy odpornościowe. Drosomycyna, Dipterycyna i Attacyna są wytwarzane przez komórki nabłonka jelitowego w odpowiedzi na zakażenie bakteriami Gram-ujemnymi. Synteza tych peptydów rozpoczyna się po zidentyfikowaniu charakterystycznego dla bakterii Gram-ujemnych peptydoglikanu typu kwasu diaminopimelinowego (DAP). DAP jest aktywatorem szlaku sygnałowego Imd odpowiedzialnego za regulację ekspresji peptydów przeciwbakteryjnych. Zakażenie *P. entomophila* stymuluje syntezę peptydów odpornościowych związanych z układem pokarmowym *D. melanogaster*. Udowodniono, że aktywacja szlaku Imd i zwiększenie syntezy peptydów odpornościowych przeciwko infekcji a tym samym zwiększa szansę na pokonanie infekcji (Kuraishi i in. 2011; Vodovar i in. 2005). U zakażonego owada dochodzi do zwiększonej syntezy innych składników humoralnej odpowiedzi immunologicznej. W wyniku zakażenia *P. entomophila* dochodzi do zwiększonej syntezy lizozymu. Lizozym jest syntetyzowany ciele tłuszczowym i jest środkiem bakterioobójczym o działaniu litycznym. Chociaż większym bodźcem do syntezy lizozymu jest infekcja bakteryjna Gram-dodatnia w przypadku infekcji *P. entomophila* również przedstawiono to zjawisko. Z powodu infekcji obserwuje się dramatyczny wzrost syntezy lizozymu. występuje również dramatyczny wzrost tego składnika odpowiedzi humoralnej owada. Kolejnym ważnym elementem układu odpornościowego owadów, którego aktywność ulega zmianie, jest układ oksydazy fenolowej. W wyniku zakażenia *P. entomophila* stwierdza się obecność lipopolisacharydu na powierzchni bakterii Gram-ujemnych. System oksydazy fenolowej u owadów bierze udział w procesie gojenia i melanizacji naskórka owada (Vodovar i in. 2006).

### **6. Morfologia *Drosophila melanogaster* po infekcji *Pseudomonas entomophila***

Opisano interakcję *Pseudomonas entomophila* z owadem *Drosophila melanogaster*. Głównym narządem żywiciela, który jako pierwszy został uszkodzony w wyniku infekcji jest jelito (Amcheslavsky 2009). Infekcja muszki owocowej jest zwykle spowodowana spożyciem żywności zanieczyszczonej bakteriami - zwykle owoców. Doniesiono, że w warunkach laboratoryjnych *D. melanogaster* łatwiej zaraża się zawiesiną bakterii w roztworze sacharozy. Mucha po zakażeniu zatrutym pokarmem *P. entomophila* przestaje jeść inne pokarmy (Dieppois i in. 2014). Nie wiadomo, czy zjawisko to jest wywoływane bezpośrednio przez bakterie i czy jest wynikiem uszkodzenia

układu pokarmowego przez entomopatogen (Vallet-Gely i in. 2008; Dieppois i in. 2014). Komórki bakteryjne, które dostają się do jelita, nadal mogą się dzielić i przemieszczać, kolonizując kolejne odcinki przewodu pokarmowego. Zbadanie mechanizmu interakcji między *P. entomophila* i *D. melanogaster* pozwoliło prześledzić kolejne etapy zmian morfologicznych wywołanych przez patogen w organizmie owada. Zakażenie *P. entomophila* powoduje zmiany morfologiczne komórek budujących jelito *D. melanogaster*. Mikrokosmki komórek nabłonka jelitowego stają się zdeformowane. W późniejszych stadiach komórki nabłonka jelitowego ulegają rozpadowi. Około 24 godziny po zakażeniu bakteriami nie obserwuje się zmian w budowie barier ochronnych (błony perytroficznej). Fakt ten dowodzi, że głównym elementem zaangażowanym w walkę z patogenem jest jelito. W pierwszym dniu po zakażeniu bakterie nie pojawiają się w hemocelu *D. melanogaster* (Vallet-Gely i in. 2008). Zakażenie nabłonka jelitowego prowadzi do wybuchu oksydacyjnego, który ogranicza rozwój bakterii w jelitach. Zdolność *P. entomophila* do syntezy białek odpowiedzialnych za odporność na stres oksydacyjny pozwala bakteriom przetrwać nieprzyjemne warunki w organizmie gospodarza (Dieppois i in. 2014). W przewodzie pokarmowym owadów odczyn pH jest kwaśny, a jego wartości mieszczą się w zakresie pH=2-3. W układzie pokarmowym wytwarzanych jest szereg substancji o działaniu przeciwbakteryjnym, np. lizozym. Duża tolerancja na warunki zewnętrzne pozwala na przeżycie *P. entomophila* nawet przy kwaśnym pH i w obecności lizozymu. W jelitach owadów, w wyniku infekcji, NADPH Duox wytwarza reaktywne formy tlenu. Bakterie *P. entomophila* są odporne na reaktywne formy tlenu, co zwiększa odporność na pierwszą linię obrony (Ha EM i in. 2005; Mulet i in. 2012).

## 7. Podsumowanie

*Pseudomonas entomophila* jest jedynym entomopatogennym szczepem z rodzaju *Pseudomonas*, który może infekować owady drogą pokarmową. Pełna sekwencja genomu tego szczepu zidentyfikowała szereg potencjalnych czynników wirulencji. Dotychczas badania koncentrowały się na zrozumieniu mechanizmu interakcji patogen-gospodarz z wykorzystaniem muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Niewiele jednak wiadomo o działaniu wspomnianego entomopatogenu na inne gatunki owadów. Przeanalizowano entomopatogenne właściwości *P. entomophila* także na innym przedstawicielu Lepidoptera – ćmy woskowej *Galleria mellonella*, która jest szeroko stosowana jako organizm modelowy w badaniach odporności wrodzonej i interakcji gospodarz-patogen. (Vodovar i in. 2005; Vodovar i in. 2006; Dieppois i in. 2014).

## 8. Piśmiennictwo

- Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT i in. (2009) Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 9;4(1): 49-61.
- Buchon N, Broderick NA, Poidevin M (2009) *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell & Host Microbe*, 5(2): 200-211.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2004) Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 33–54.
- Dieppois G, Opota O, Lalucat J i in. (2014) *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. *Springer*: 25-34.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity *Science*, 310: 847-850.
- Heeb S, Haas D (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.*, 14(12): 1351-63
- Kamala-Kannan S, Lee KJ, Park SM i in. (2010) Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol.* 50(2): 200-205.
- Kuraishi T, Binggeli O, Opota O i in. (2011) Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(38): 15966-71.

- Liehl P, Blight M, Vodovar N i in. (2006) Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila*/*Pseudomonas* Infection Model. *PLoS PATHOGEN*
- Mulet M, Gomila M, Lemaitre B i in. (2012) Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 35(3): 145-9.
- Sarris P, Scoulica E (2011) *Pseudomonas entomophila* & *Pseudomonas mendocina*: Potential models for studying the bacterial Type VI Secretion System. *Infection, Genetics and Evolution* 11(6): 1352-1360.
- Shahbaz-Mohammadi H, Omidinia E (2011) Screening and characterization of proline dehydrogenase flavoenzyme producing *Pseudomonas entomophila*. *Iran J Microbiol.* 3(4): 201-9.
- Shanbhag S, Tripathi S (2009) Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* mid gut. *J Exp Biol.* 212(Pt 11): 1731-44.
- Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L i in. (2010) Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Appl Environ Microbiol.* 76(3): 910–921.
- Vallet-Gely I, Opota O, Boniface A i in. (2010) A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol.* 12(11): 1666-79.
- Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S i in. (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotechnol.* 24(6): 673-9.
- Vodovar N, Vinals M, Liehl P i in. (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(32): 11414 –11419.
- Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH i in. (2010) Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 48(5): 1812-9.



## **9. Correlation between virulence of *Bacillus thuringiensis* *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* in *Galleria mellonella* infection**

Jakub Kordaczuk

Maria Curie-Skłodowska University, Department of Immunobiology, Lublin Poland

Jakub Kordaczuk : jakub.kordaczuk@o2.pl

### **Streszczenie**

Host-pathogen interactions are both an important subject of applied sciences such as medicine, veterinary, phytopathology and a necessary element of understanding of the biology and evolution of live organisms. *Galleria mellonella* is a moth of the family Pyralidae. *Galleria mellonella* is found throughout the world. The larvae of *G. mellonella* are also often used as a model organism in research. *G. mellonella* can become infected with this bacterium through the gastrointestinal tract, through which spores or vegetative cells enter the larvae, causing intestinal perforation. The elimination of these pathogens takes place thanks to little specialized defense mechanisms. If the infection is severe, the insects die as a result of the secretion of toxins by the pathogen and mechanical damage to the body.

### **1. Introduction**

*Galleria mellonella* can be infected by many species of bacteria, fungi and viruses. All these pathogens can be divided into three groups: general, specialist and opportunistic. The first of them infect naturally different hosts, and specialists are able to infect only a small group of insects. Opportunistic parasites, on the other hand, may occasionally gain access to injured or weakened insect organisms where they are ingested by non-specialized immune mechanisms.

### **2. Characteristics of *Galleria mellonella***

*Galleria mellonella* belongs to the order of the Lepidoptera, to the family of the Pyralidae. In most cases, it inhabits hives inside bee nests, feeding on wax. For this reason, it can be considered a pest of bees and, more rarely, of bumblebees. Their life cycle is usually around 7-8 weeks. The larvae hatch from the egg and go through 6 stages of development, which lasts 5-6 weeks at a temperature of 25-28 ° C. Then, transitional forms are formed between the larva and the pupa, and then the pupae. After their appearance, adult forms (imago) appear after about two weeks. *Galleria mellonella* is considered to be an excellent model for studying the immune response of insects and many virulence factors of various pathogens. We can also include human pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus fumigatus*. The larvae of the greater moth are used to study interactions with natural insect pathogens. These include *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana*, which are not pathogenic for humans and therefore can be used in agriculture for the production of bioinsecticides. *Galleria mellonella* is a relatively cheap and easy to breed model organism. Another frequently used microorganism is the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. The larvae are large enough to obtain hemolymph and hemocytes, and to isolate organs for further analysis. The disadvantage of this organism is that its genome is not fully sequenced and there is no method of creating mutant strains. Hemolymph *Galleria mellonella* is very rich in many proteins synthesized by various tissues, mainly the adipose body and hemocytes (Wojda 2016).

### **3. Natural pathogens of *Galleria mellonella***

Specialist parasites have virulence factors that enable invasion of a narrow group of insects. At the same time, they induce a specialized immune response. This is a sign of host-pathogen co-evolution. For example, as they multiply, these specialized parasites produce virulence factors that inhibit or destroy the relevant peptides and proteins of the infected host. Opportunistic pathogens do not have specialized mechanisms for penetrating into the insect's body. The elimination of these pathogens takes place thanks to little specialized defense mechanisms. If the infection is severe, the

insects die as a result of the secretion of toxins by the pathogen and mechanical damage to the body. Such pathogens include the Gram-positive bacterium *Bacillus thuringiensis* the filamentous fungus *Beauveria bassiana*, which interact with *Galleria mellonella* larvae and *C. albicans*, one of the most widespread human fungal pathogens (Konecka et al. 2011)

#### **4. Bacillus thuringiensis**

*Bacillus thuringiensis* belongs to the species *Bacillus* and to the family Bacillaceae. It is a gram-positive bacterium, which is a rod, which shows high mobility due to the presence of the peritrich flagella, and also produces endospores. It was discovered in Japan by isolating material from *Bombyx mori* larvae, and its species name was introduced by Berliner in 1911. It causes infections in the gastrointestinal tract of invertebrates. It is a bacterium that is widespread all over the world and can be found in the soil. The action of the Cry and Cyt crystal proteins leads to paralysis of the digestive or general system, after which the insect larva does not feed and dies (Konecka et al. 2011; Sierpińska 2000).

*G. mellonella* can become infected with this bacterium through the gastrointestinal tract, through which spores or vegetative cells enter the larvae, causing intestinal perforation. The pathogens then reach the hemocoel, causing sepsis. *B. thuringiensis* can also get directly into the insect's body cavity through wounded epidermis. During the stationary phase of growth, *Bacillus thuringiensis* produces spores accompanied by parasporal crystals containing the plasmid-encoded Cry (delta endotoxins) and Cyt (cytolytic) insecticides (Sierpińska 2000).

During the infection process, *B. thuringiensis* produces phospholipases, proteases, cytotoxins and other components that have the ability to break down the host's defense barriers. During the stationary growth phase, the bacterium produces zinc-dependent metalloproteinases that digest the antimicrobial peptides of the infected host. *B. thuringiensis* parasporal crystals contain toxins and are ingested by the insect larvae. In the intestine, these crystals are dissolved and the proteolytic toxins are activated and bind to the inner membrane of the intestine. After intestinal perforation, bacterial cells enter the hemolymph, where they proliferate. It is worth mentioning that it is thanks to the different crystalline toxins produced by individual strains of bacteria that the high specificity of a given *B. thuringiensis* strain for a given insect species takes place (Wojda 2016).

#### **5. Beauveria bassiana**

*Beauveria* includes 17 cosmopolitan species, entomopathogenic fungi, of which the most widespread is *Beauveria bassiana*. This fungus was described in the early nineteenth century by the Italian scientist Agostino Bassi, as a factor etiological disease of the mulberry silkworm called white muscardine. Later cases of infection by *B. bassiana* for other insect species, including those that are loss-making in agriculture or spread disease. For this reason it was decided use *Beauveria* as an insecticide. Today it is known more than 700 species of insects belonging to 15 orders susceptible to infection by *Beauveria*. Although *B. bassiana* is so-called generalist, that is a pathogen capable of infecting many different species of arthropods, single strains of this fungus show host specificity, which is related with a different gene expression profile at an early stage of infection (Wang et al. 2017).

*B. bassiana* produces three types of spores: air conidia on solid medium, blastospores in liquid medium and conidia immersed under condition nutrient restriction. All three types of cells are capable of infecting insects, although they have a different degree virulence and differ in morphology, biochemical and gene expression profile. One of the basic differences are the surface properties of cells (Dias et al. 2008). Air conidia are hydrophobic, therefore they are better adapted to adhesion to the insect cuticle, they have a negative one charge on the surface, contain haemagglutinin and sugar-binding proteins. Aerial conidia unlike blastospores and conidia submerged on their own surface have a layer of the so-called "Rodlet layer". Hydrophobins - responsible proteins - participate in the formation of this layer for its hydrophobic surface properties (Holder et al. 2007). Two coding genes are known in *B. bassiana* hydrophobins: *hyd1* and *hyd2*. In addition to giving the surface properties hydrophobic, the product of the *hyd1* gene additionally affects virulence as well distribution of

molecular patterns on the cell surface, and *hyd2* - for adhesion. Air conidia easily and permanently bind to hydrophobic surfaces, hydrophilic blastospores bind to hydrophilic surfaces. The blastospores are high surface to volume ratio as they obtain the nutrients from a liquid environment. After depletion of nutrients, blastospores both *in vitro* and *in vivo*, they are replaced with filamentous bodies. *In vivo*, blastospores differ from *in vitro* obtained blastospores: the former have thinner cell walls, which is associated with lower gene activity coding for chitin synthase and glucan synthase. Conidia when immersed, they have properties intermediate between air conidia and blastospores, and bind both hydrophilic and hydrophobic surfaces (Fang et al. 2005; Holder et al. 2007).

## 6. *Candida albicans*

Fungi of the species *Candida* are part of the microbiome in at least half of the human population. They are present on the mucous membranes of the digestive tract, genitourinary and respiratory systems of healthy people. However, in terms of impaired immunity, these fungi cause the so-called candidiasis of two types: non-juvenile surface and systemic with a high rate of mortality (Wibawa 2016). Among the fungi of the species *Candida* the most common is *C. albicans*, one of the most widespread human fungal pathogens. *C. albicans* is an organism with no known form gender. It poses a serious problem because of the high resistance to antibiotics, a variety of strategies to avoid defense reactions the host and virulence factors it is endowed with, such as pleomorphism or phenotypic variation. This fungus, along with other pathogenic organisms, may be used in research on the mechanisms of immunity congenital. For this type of research, as previously mentioned, they are used insects. It is known that after infection with *C. albicans*, *G. mellonella* larvae fired a series of defensive reactions effective with relatively low numbers administered fungal cells, while high doses of the pathogen led to the death of the insect (Bergin et al. 2006). The fungus colonized the internal organs of the *G. mellonella*. In response to infection with *C. albicans*, the moth larvae activated cellular response, mainly nodulation and humoral, increasing the expression of genes encoding immune peptides (galiomycin, gallerimycin and transferrin). The course of infection of the *G. mellonella* with *C. albicans* is different from infection with entomopathogenic fungi due to a different set of virulence factors. One of the basic characteristics of *C. albicans* is dimorphism, or ability to create two types of cells: yeast-like cells that multiply by budding, such as, for example, *S. cerevisiae*, and the hyphae, forming mycelium, and capable of producing yeast-like cells (Dunphy et al. 2003). Both of these types of cells are encountered during infection and are therefore well understood, however they do not exhaust the possibilities of *C. albicans*. It also creates so-called pseudohyphae, chlamidospores and filamentous hyphae. So it is an organism pleomorphic (Staniszewska et al. 2012). Cells yeast-like and true hyphae perform separate functions in the course of infection. The first are found in healthy hosts and are used to spread the fungus in the body, and the hyphae are specialized to penetrate deep into the tissues (Ortiz-Urquiza and Keyhani 2016). Their formation is associated with onset of disease and non-hyphae-forming strains usually are not pathogenic. The change in morphotype depends from environmental factors. The formation of hyphae is regulated by over 40 genes and occurs at temperatures above 35 °C, pH > 6.8, low content oxygen, nutrient deficiency and the presence of certain compounds chemical, e.g. N-acetylglucosamine or carbon dioxide (Staniszewska et al. 2012). *C. albicans* is capable of autoinduction hyphae formation: in conditions of starvation, the fungus alkalizes the environment. Other factors promoting the formation of hyphae are the so-called contact sensing, i.e. solid ground sensing and quorum sensing - the fungus "chooses" the hyphae form of growth in conditions of low cell density. The process of hyphae invasion into host tissues begins with adhesion *C. albicans* to epithelial cells, which is made possible by the hydrophobicity of the cells of the fungus, the presence of fimbriae and adhesins - molecules that facilitate adhesion (Staniszewska et al. 2012a). Among the putative adhesins of *C. albicans* are mannan, chitin, agglutinin-like sequence proteins (ALS) family of eight proteins Hpw1 (Hyphal wall protein 1), which also participates in the formation of biofilm, Sap protease (secreted aspartyl proteinase) and others (Mayer et al. 2013). The invasion of hyphae into the tissues takes place according to two mechanisms. The first is the so-called induced endocytosis that occurs as a result of the secretion of proteins by *C. albicans* onto its surface, the so-called invasive, which induces the uptake of fungal cells by the host cells' functions. The invasins are the adhesin Als2 and the protein Ssa1, belonging to the heat shock proteins from the

group of Hsp70. The second is the active penetration mechanism, which is not exactly known, but possibly with the help of Saps aspartyl proteinases (Mayer et al. 2013; Wibawa 2016). The type of invasion depends on the tissue colonized e.g. to of gastrointestinal epithelial cells *C. albicans* penetrates through penetration active, and to the cells of the oral cavity epithelium through active penetration and endocytosis induced. Another feature of *C. albicans* is phenotypic variation, and that is the best known one the phenotype change is a "switch" between white and white opaque phenotypic switching. The differences between the two phenotypes include incl. colony appearance cell shape, cell surface structure, germination conditions, gene expression profile, including different expression of proteases aspartyl Saps and virulence (Mayer et al. 2013; Wibawa 2016). Phenotype change is considered a virulence factor as it can be used to avoid the host's defensive response. For example "Switching" the phenotype from white to dull makes the fungal cells "invisible" for neutrophils, because matte cells do not have chemoattractants (Höfs et al. 2016). Another property that promotes virulence of *C. albicans* is its ability to form biofilm. Both yeast-like cells and cells are involved in this proces and hyphae. It consists of the following phases: cell adhesion yeast-like to solid medium, cell proliferation and start of growth filamentous maturation during which the matrix is accumulated extracellular and dispersion, i.e. detachment of yeast-like cells from biofilm, which may inhabit other places in the body (Mayer et al. 2013; Wibawa 2016). Biofilm is more resistant to environmental factors and stress physical and chemical, antifungal substances, and immune responses host than individual *C. albicans* cells. This is a serious problem in medicine, and most drugs are less effective against biofilm (Mayer et al., 2013; Wibawa, 2016). The immunity of the cells included of the biofilm increases, among others due to the increased activity of the drug efflux pumps (drug efflux pumps), metabolic plasticity and the protection provided by the extracellular matrix (Höfs et al. 2016; Wibawa 2016).

## 7. Summary

Studying the mechanisms of host-pathogen interaction allows us to understand the molecular role of the individual elements of the insect's immune system and pathogen virulence factor. *Galleria mellonella* is a well-known research model willingly used in scientific research. Research using this organism allows you to deepen knowledge in the field of immunobiology, evolutionary biology and microbiology. Analyzes of interactions with many pathogens allowed for the development of effective preparations that protect agricultural crops against pests. Research using *Candida albicans* allows us to better understand the virulence factors at the disposal of this opportunistic human pathogen. Perhaps in the future, they will allow the development of effective drugs or therapies that will be effective in combating candidiasis.

## 8. Bibliography

- Bergin D, Murphy L, Keenan J et al. (2006) Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes and Infection* 8: 2105-2112
- Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L et al. (2008) Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 301-306
- Dunphy GB, Oberholzer U, Whiteway M et al. (2003) Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Canadian Journal of Microbiology* 49: 514-524
- Fang W, Leng B, Xiao Y et al. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence, *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 363-370
- Höfs S, Mogavero S, Hube B (2016) Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology* 54(3): 149-169

- Holder DJ, Kirkland BH, Lewis MW, Keyhani NO (2007) Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology* 153: 3448-3457
- Konecka E, Kaznowski A, Baranek (2011) Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. *Postępy Mikrobiologii* 50,4:303–311
- Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence* 4(2): 119-128
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO (2016). *Molecular Genetics of Beauveria bassiana Infection in Insects*. W: B. Lovett, R.J. St Leger, *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Academic Press
- Sierpińska A., *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasów- alternatywa dla insektycydów chemicznych , 2000/2002, PRACE INSTYTUTU BADAWCZEGO LEŚNICTWA, Seria A 71-99.
- Staniszewska M., Bondaryk M., Piłat J., Siennicka K., Magda U., Kurzątkowski W., 2012. Czynniki zjadliwości *Candida albicans*, *Przegląd Epidemiologiczny* 66: 629-633
- Wang JJ, Bai WW, Zhou W et al. (2017). Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grow on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. *Journal of Invertebrate Pathology* 145: 45-54
- Wibawa T (2016) The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. *Journal of Medical Science* 48(1):58-68
- Wojda I (2016) Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* 1-16

## **10. Wpływ wybranych adaptogenów na ośrodkowy układ nerwowy**

The influence of selected adaptogens on the central nervous system

Sandra Romanis, Małgorzata Dostatni, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

Opiekun naukowy: dr Irena Majkutewicz

Romanis Sandra: s.romanis.596@studms.ug.edu.pl

Słowa kluczowe: funkcje poznawcze, stres, lęk, depresja, substancje roślinne

### **Streszczenie**

W dzisiejszym świecie ciężko uniknąć narażenia na nadmiar negatywnych bodźców zewnętrznych, a przewlekły stres dotyka większości ludzi. Prowadzi to do wzrostu zachorowalności na depresję, bezsenność, stany lękowe, a także na choroby neurodegeneracyjne. Często konwencjonalna terapia farmakologiczna nie uzyskuje satysfakcjonującego poziomu skuteczności, a czasami sięgający nawet 50% odsetek pacjentów w ogóle na nią nie reaguje. Sprostać temu problemowi mogą adaptogeny, czyli bioaktywne związki roślinne pomagające dostosować się organizmowi do nowych warunków, między innymi dzięki obniżeniu poziomu stresu. Warto podkreślić, że rośliny i grzyby lecznicze służą jako główne źródło związków biologicznie aktywnych i od czasów starożytnych stanowią integralną część tzw. medycyny naturalnej wykorzystywanej do leczenia różnych zaburzeń i chorób. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie mechanizmu działania adaptogenów oraz scharakteryzowanie wybranych roślin o działaniu adaptogennym: Ashwagandhy, różenca górskiego i szafranu uprawnego. Substancje bioaktywne o właściwościach adaptogennych mogą być alternatywą leczenia lub stanowić terapię wspomagającą w przypadku wielu zaburzeń związanych ze stresem i lękiem.

### **1. Wstęp**

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) dzięki mechanizmowi plastyczności synaptycznej może tworzyć nowe połączenia międzyneuralne oraz przebudowywać te już istniejące, nawet w wieku dorosłym. Dzięki temu nadal możliwe jest uczenie się, ale także adaptacja do nowych warunków środowiska zewnętrznego (i wewnętrznego organizmu) oraz samonaprawa (przynajmniej w pewnym stopniu) tkanki nerwowej w przypadku jej uszkodzenia. Układ nerwowy jest podatny na wiele czynników zewnętrznych, takich jak dieta, nadmiar sztucznego oświetlenia, hałas i stres psychospołeczny, co w efekcie oddziałuje na nasze samopoczucie, jakość snu, a także funkcje kognitywne. Z tego powodu występuje coraz większe zapotrzebowanie na środki i czynności wspomagające funkcjonowanie organizmu. Coraz częściej w centrum uwagi badaczy, a także potencjalnych pacjentów, znajdują się naturalne związki niepowodujące poważnych skutków ubocznych oraz posiadające szersze spektrum oddziaływania na organizm w porównaniu do leków. Takimi związkami są adaptogeny, które obejmują kategorię ziołowych produktów leczniczych i odżywczych, promujących zdolności adaptacyjne, odporność i przetrwanie organizmów narażonych na sytuacje stresowe. Od czasów starożytnych ludzie stosowali leki ziołowe z roślin lub ich ekstraktów pochodzących z kwiatów, nasion, kory, liści lub korzeni, aby zapobiegać lub leczyć wiele rodzajów chorób. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie mechanizmu działania adaptogenów oraz scharakteryzowanie wybranych roślin o działaniu adaptogennym, które mogą być alternatywą leczenia lub stanowić terapię wspomagającą w przypadku wielu zaburzeń związanych ze stresem i lękiem, a także chorób neurodegeneracyjnych.

### **2. Adaptogeny – ogólna charakterystyka, mechanizm działania**

Adaptogeny to związki roślinne mające aktywne działanie na organizm i ułatwiające przystosowanie się do nowych warunków środowiskowych m.in. poprzez obniżenie hormonów stresu. Posiadają zdolność do regulacji ekspresji niektórych genów związanych z zaburzeniami charakterystycznymi dla starzenia się organizmu i reakcji zapalnych o niskim nasileniu. Ponadto

wiele adaptogenów to korzenie roślin lub grzyby, które dzięki polisacharydowej budowie oddziałują jako prebiotyki na mikrobiotę jelitową (mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy wielu zwierząt i człowieka), przyczyniając się do korzystnych zmian składu bakteryjnego poprzez promowanie wzrostu i rozwoju gatunków probiotycznych, o których wiadomo, że mają prozdrowotny wpływ na organizm gospodarza. Mikroorganizmy probiotyczne indukują wzrost wytwarzania m.in. witamin, neuroprzekazników i niezbędnych krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (*short chain fatty acids*, SCFA). SCFA, do których należy octan, propionian i maślan, mają szereg właściwości zdrowotnych, m. in. modulują funkcjonowanie układu odpornościowego, wykazując znaczny potencjał przeciwzapalny (Czajkowska i Szponar, 2018). Wiele z efektów wywoływanych przez adaptogeny jest tożsamy z korzyściami przyjmowania prebiotyków, co nasuwa hipotezę, że część zalet adaptogenów może być wzmacniana poprzez wpływ na mikrobiom. Takie zalety to między innymi poprawa odporności oraz wpływ na funkcje poznawcze i poziom lęku. Jednak należy pamiętać, że wiele dostępnych suplementów adaptogennych to ekstrakty - izolowane związki aktywne danych roślin, które powstają po pozbyciu się frakcji polisacharydowej, a prebiotyki stanowią niestrawialne dla organizmu włókna roślinne będące pożywką dla mikroorganizmów jelitowych. Adaptogeny wykazują plejotropowe działanie pod względem farmakologicznym, jednak najczęściej wykorzystywane są w celu łagodzenia przewlekłego stresu i zmęczenia z nim związanego, zniwelowania zaburzeń snu i ograniczenia spadku wydajności funkcji poznawczych. Stosowane są również jako wsparcie w łagodzeniu objawów zaburzeń psychicznych, ale także niektóre z nich mają zdolność do poprawy funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego, działają antyoksydacyjnie oraz mogą regulować wydzielanie hormonów płciowych. Najpowszechniej stosowanym adaptogenem polecanym przy długotrwałym stresie i objawach takich jak zmęczenie, zaburzenia snu i pogorszenie funkcji poznawczych jest Ashwagandha oraz różeniec górski. Wartą uwagi rośliną jest także szafran, powszechnie znana przyprawa o wielu prozdrowotnych właściwościach.

### **3. Ashwagandha (*Withania somnifera*)**

*Withania somnifera* (WS), czyli witania ospała, powszechnie znana jako Ashwagandha lub żeńszeń indyjski, jest krzewem należącym do rodziny roślin psiankowatych (*Solanaceae*). Roślina ta posiada dużą zawartość związków aktywnych biologicznie - witanolidów w nadziemnej części rośliny oraz glukowitanolidów w korzeniu. W celach leczniczych wykorzystuje się głównie korzenie, ale swoje zastosowanie mają także owoce i liście. (Speers i in. 2021). Za preparaty zawierające skuteczną dawkę witanolidów uważa się produkty standaryzowane na ich obecność wynoszącą minimum 5-7%. W badaniu nad poprawą pamięci i funkcji kognitywnych u osób dorosłych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi udowodniono, że 8-tygodniowa suplementacja WS wykazuje działanie prokognitywne, w związku z czym chroni organizm przed negatywnymi skutkami starzenia się, jakim jest m.in. spadek wydajności funkcji poznawczych (Choudhary i in. 2017). Dowiedziono, że Ashwagandha wykazuje również właściwości neuroprotektoryjne chroniące przed rozwojem chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, prowadząca do otępienia spowodowanego atrofią neuronów hipokampa, czy choroba Parkinsona objawiająca się zaburzeniami ruchowymi spowodowanymi postępującą degeneracją neuronów dopaminergicznych. Wykazano, 30-dniowa suplementacja ekstraktem z korzenia Ashawagandhy bogatym w witanolidy i witanozydy odwraca deficyty behawioralne oraz zmniejsza akumulację  $\beta$ -amyloidu i oligomerów w mózgach myszy transgenicznych APP/PS1 stanowiących model choroby Alzheimera. Stosowanie wyciągu z korzenia WS jako terapii wspomagającej standardowe leczenie okazuje się skuteczne w przypadku wielu zaburzeń i chorób, także o podłożu neuropsychiatrycznym. Dowiedziono, że przyjmowanie ekstraktu z WS może łagodzić zaburzenia funkcji poznawczych w chorobie afektywnej dwubiegunowej, oraz korzystnie wpływać na stan osób z zaburzeniami obsesyjno-kompulsywnymi leczonych równolegle lekami z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny, SSRI (Paul i in. 2021). W randomizowanym badaniu nad skutecznością stosowania ekstraktu z korzenia WS u pacjentów cierpiących na bezsenność i zaburzenia związane z lękiem zaobserwowano, że taka suplementacja wpływa korzystnie na efektywność snu i obniża poziom lęku bez występowania negatywnych skutków ubocznych (Langade i in. 2019). Odnotowano także wydłużenie czasu snu indukowane przyjmowaniem WS, a chronomodulujące działanie Ashawagandy

najprawdopodobniej zachodzi poprzez zmiany w genach związanych z zegarem biologicznym i rytмами czuwania (Speers i in. 2021). Anksjolityczny efekt stosowania bioaktywnych glikowitanoidów zaobserwowano także w badaniu nad stabilizacją nastroju w stanach przypominających lęk i depresję u szczurów. Działanie tego związku porównano z efektami wywołanymi przez lorazepam - lek o udokumentowanym działaniu anksjolitycznym oraz imipraminę - trójcykliczny lek przeciwdepresyjny. Zaobserwowane efekty działania glikowitanoidów były porównywalne do aktywności testowanych komercyjnych terapeutyków (Bhattacharya i in. 2000). Ashwagandha może łagodzić stany depresyjne głównie poprzez modulację reaktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz szlaków GABAergicznym (kwas gammaaminomasłowy, GABA) i serotonergicznym. Ponadto, jak donosi wiele badań, stres oksydacyjny może przyczyniać się do powstawania stanów zapalnych w OUN, które mogą z kolei prowadzić do powstawania zaburzeń lękowych i depresyjnych. Ashwagandha poprzez wzmocnienie aktywności antyoksydacyjnej może łagodzić negatywne skutki zwiększonego stresu oksydacyjnego i markerów prozapalnych, co skutkuje obniżeniem poziomu lęku i zaburzeń depresyjnych. Wykazano, że stosowanie ekstraktu z liści Ashwagandhy prowadzi do redukcji stężenia cytokin prozapalnych i innych markerów stanu zapalnego w OUN (Speers i in. 2021). W badaniu z 2020 roku zaobserwowano, że suplementacja WS może chronić zwierzęta przed nawrotami uzależnienia alkoholowego, podobnie jak powszechnie wykorzystywany lek naltrekson, a także wywiera korzystny wpływ na poziom neuroprzekazników związanych z uzależnieniem od alkoholu. U zwierząt uzależnionych odnotowano podwyższony poziom dopaminy i obniżony poziom GABA, a podawanie szczurom tego suplementu częściowo odwraca te skutki i zmniejsza poziom lęku towarzyszącego odstawieniu. Wyniki tego badania dają nadzieję na możliwość wspomagania terapii osób zmagających się z problem nadużywania alkoholu (Marathe i in. 2020). Ashwagandha może także wywierać efekt neuroprotekcji w przypadku silnego stresu oksydacyjnego spowodowanego dużymi dawkami bisfenolu A (BPA) u myszy. Zatrucie BPA przyczynia się do upośledzenia pamięci roboczej i uczenia się przestrzennego u myszy poprzez obniżenie wytwarzania receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), do którego przylączyła się glutaminian – neuroprzekaznik o charakterze pobudzającym. Podawanie Ashwagandhy może łagodzić powstałe deficyty behawioralne i biochemiczne - zaobserwowano przywrócenie liczby receptorów NMDA w hipokampie związanych z uczeniem się i pamięcią oraz zmniejszenie poziomu stresu oksydacyjnego (Birla i in. 2019).

#### 4. Różeniec górski (*Rhodiola rosea*)

Różeniec górski (RG) jest byliną należącą do rodziny gruboszowatych (*Crassulaceae*), występującą głównie na terenach arktycznych i z tego powodu bywa również nazywana korzeniem arktycznym, jednak często można ją także znaleźć na terenach Azji oraz w górskich regionach Europy. Roślina składa się z korzenia i kłaczy o różnym zapachu. RG posiada liczne substancje aktywne, z których najważniejszymi pod względem oddziaływania adaptogennego są: rozawiny i salidrozyd. Związki te wykazują aktywność antyoksydacyjną, zwiększają tolerancję na stres oraz obniżają uczucie zmęczenia, poprawiają funkcje kognitywne i mogą wykazywać działanie przeciwdepresyjne, poprzez zwiększenie poziomu serotoniny - powszechnie znanej jako hormon szczęścia (Zięba i in. 2018). W badaniu oceniającym skuteczność i skutki uboczne stosowania RG w leczeniu zaburzeń depresyjnych w porównaniu z lekiem przeciwdepresyjnym – sertaliną, zaobserwowano, że RG wykazuje słabsze działanie przeciwdepresyjne, jednak terapia sertaliną wiąże się z większymi i częstszymi niepożądanymi efektami ubocznymi. Wyniki badania sugerują, że RG może stanowić alternatywę dla sertoliny w leczeniu łagodnych i umiarkowanych zaburzeń depresyjnych, gdyż wykazuje korzystniejszy stosunek pozytywnych skutków terapeutycznych względem ryzyka związanego ze stosowaniem danej substancji (Mao i in. 2015). W wielu badaniach potwierdzono, że przewlekły stres może istotnie wpływać na behavior, układ hormonalny, odpornościowy i nerwowy. Długotrwała suplementacja wodno-alkoholowym ekstraktem RG standaryzowanym do 3% rozawiny i 1% salidrozydu może chronić przed negatywnymi skutkami behawioralnymi i fizjologicznymi przewlekłego stresu u szczurów w stopniu porównywalnym z efektami działania fluoksetyny - zatwierdzonego leku przeciwdepresyjnego należącego do grupy SSRI (Mattioli i in. 2009). Co ciekawe, efekt terapeutyczny osiągnięto również w wyniku



jednorazowego podania myszom wodno-alkoholowego ekstraktu z RG o tej samej standaryzacji (Perfumi i Mattioli 2007). W badaniu klinicznym oceniającym skuteczność stosowania standaryzowanego ekstraktu z korzenia RG na zmęczenie związane ze stresem wykazano, że suplementacja może chronić przed negatywnymi skutkami przewlekłego stresu poprzez zmniejszenie uczucia zmęczenia i poprawienie sprawności poznawczej w porównaniu do zastosowania placebo. W eksperymencie tym wykazano także zmniejszony poziom kortyzolu w ślinie po przebudzeniu w grupie poddanej suplementacji (Olsson i in. 2009). Salidrozyd może mieć również istotne znaczenie dla funkcjonowania przewodu pokarmowego i mikrobioty jelitowej. Dowiedziono, że przyjmowanie tego związku może łagodzić oksydacyjne uszkodzenie wątroby wywołane ekspozycją na furan oraz pozytywnie modyfikować różnorodność mikroorganizmów jelitowych, chroniąc mikrobiom przed stanem dysbiozy – zaburzenia składu mikrobioty, zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym. Konsekwencje utrzymującej się dysbiozy obejmują wiele nieprawidłowości powstających obwodowo i ośrodkowo, m.in. przewlekły stan zapalny, zwiększenie przepuszczalności bariery jelita-krew, czy zaburzenia funkcjonowania OUN. Zaobserwowano także, że suplementacja salidrozydem hamuje ogólnoustrojowy stan zapalny o niskim nasileniu poprzez obniżenie poziomu cytokin prozapalnych – interleukiny 6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ) i zwiększenie stężenia przeciwapalnej interleukiny 10 (IL-10) w osoczu (Yuan i in. 2019).

## 5. Szafran uprawny (*Crocus sativus*)

Szafran to wieloletnia roślina z rodziny kosaćcowatych (*Iridaceae*). Do najistotniejszych związków biologicznie czynnych szafranu zaliczamy krocynę, krocetynę i safranól. Szafran wywiera wiele korzyści zdrowotnych - poprawia nastrój, reguluje gospodarkę hormonalną i usprawnia działanie układu nerwowego. Zaobserwowano, że 6-tygodniowa suplementacja ekstraktem z szafranu wpływa na polepszenie kilku parametrów związanych z jakością snu, m.in. ułatwia zasypianie, wydłuża sen, korzystnie oddziałuje na łatwość wybudzania się po całonocnym śnie, a także obniża subiektywnie oceniany poziom dysfunkcyjności doświadczanej w ciągu dnia przez uczestników badania (Pachikian i in. 2021). Ekstrakt szafranu w sposób zależny od dawki może zwiększać uwalnianie dopaminy i glutamianu w OUN szczurów. Zmiany w poziomie neuroprzekazników mogą prowadzić do złagodzenia objawów depresyjnych, a także poprawy pamięci (Khazdair i in. 2015). W badaniu klinicznym oceniającym skuteczność stosowania *C. sativum* w leczeniu depresji (postacie od łagodnej do umiarkowanej) wykazano, że 6-tygodniowa suplementacja istotnie poprawia stan pacjentów i wyniki osiągnięte przez nich w skali oceny depresji Hamiltona w porównaniu z grupą przyjmującą placebo (Akhondzadeh i in. 2005). Krocyna posiada właściwości antyoksydacyjne, m. in. poprzez zwiększenie aktywności enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD); przeciwwzapalne i antypoplotyczne, dzięki czemu może pełnić funkcję neuroprotektoryjną i ochraniać neurony kory mózgowej oraz hipokampa, co przejawia się poprawą funkcji poznawczych. Te właściwości mogą mieć także znaczenie terapeutyczne w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona (Khazdair i in. 2015). W mysim modelu choroby Parkinsona zaobserwowano, że krocyna prowadzi do wzrostu poziomu dopaminy w OUN, złagodzenia objawów behawioralnych i redukuje poziom neurodegeneracji komórek w istocie czarnej śródmózgowia (Ahmed i in. 2020). Ekstrakt z szafranu może wspomóc profilaktykę oraz złagodzenie objawów choroby Alzheimera poprzez hamowanie tworzenia włókien  $\beta$ -amyloidu, uniemożliwianie jego agregacji i odkładania się w OUN. Ponadto wykazano, że ekstrakt ten może hamować rozkład acetylocholino, neuroprzekaznika, którego poziom ulega silnemu obniżeniu w chorobie Alzheimera. Suplementacja szafranem istotnie poprawia wyniki w zakresie funkcji poznawczych w porównaniu z placebo u osób z łagodną do umiarkowanej postacią choroby Alzheimera (Akhondzadeh i in. 2010). Udowodniono, że związki bioaktywne szafranu mają zdolność do usuwania oraz ograniczenia powstawania wolnych rodników, zmniejszenia rozwoju uszkodzeń błony komórkowej związanych z peroksydacją lipidów (wskazuje na to obniżenie stężenia markera - dialdehydu malonowego, MDA), indukują również wzrost poziomu i aktywności peroksydazy glutationowej (GPx), jednego z ważnych enzymów antyoksydacyjnych (Ahmed i in. 2020). Kolejnym możliwym zastosowaniem szafranu jest tłumienie napadów padaczkowych. Badania na szczurach i myszach wykazały, że jego

bioaktywny składnik - safranal posiada działanie przeciwdrgawkowe, zmniejszając częstość i czas trwania napadów (Khazdair i in. 2015). Należy jednak zauważyć, że biodostępność krociny przyjmowanej doustnie jest bardzo niska, ponadto jest szybko eliminowana z organizmu. Z tego powodu preparat z tym związkiem aktywnym powinien być przyjmowany w specjalnych kapsułkach hydrożelowych lub dostarczany w nanocząstkach (Ahmed i in. 2020).

## 6. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, wiele bioaktywnych związków pochodzenia naturalnego może stanowić codzienną ochronę przed otaczającymi nas szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi. Wiele adaptogenów wykazuje podwójne działanie, gdyż oprócz dobroczynnych, charakterystycznych dla konkretnej rośliny związków, ich polisacharydowa budowa nieulegająca do końca trawieniu, a także niektóre związki bioaktywne wykazują działanie stymulujące mikrobiotę jelitową. Stymulacja mikrobioty niesie dodatkowe korzyści płynące z poprawy stanu jelit i lepszego funkcjonowania osi jelitowo-mózgowej. Wszystkie te czynniki przekładają się na zwiększenie wydajności lub łagodzenie zaburzeń OUN. Stosowanie adaptogenów w odpowiedniej dawce wydaje się być bezpieczne dla ludzi i nie powoduje poważnych niepożądanych skutków ubocznych. Warto jednak skonsultować wprowadzenie suplementu z lekarzem, biorąc pod uwagę stan zdrowia oraz przyjmowane leki. Potrzebne są dalsze badania nad możliwymi interakcjami farmakologicznymi adaptogenów z innymi lekami.

## 7. Literatura

- Ahmed S, Hasan MM, Heydari M, et al. (2020) Therapeutic potentials of crocin in medication of neurological disorders. *Food and Chemical Toxicology* 145: 111739.
- Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian MH, et al. (2010) Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacology and therapeutics* 35(5): 581-588.
- Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, et al. (2005) *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytotherapy research* 19(2): 148-151.
- Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Sairam K, et al. (2000) Anxiolytic-antidepressant activity of *Withania somnifera* glycowithanolides: an experimental study. *Phytomedicine* 7(6): 463-469.
- Birla H, Keswani C, Rai SN, et al. (2019) Neuroprotective effects of *Withania somnifera* in BPA induced-cognitive dysfunction and oxidative stress in mice. *Behavioral and Brain Functions* 15: 9.
- Choudhary D, Bhattacharyya S, Bose S (2017) Efficacy and Safety of Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) Root Extract in Improving Memory and Cognitive Functions. *Journal of dietary supplements* 14(6):599-612.
- Czajkowska A, Szponar B (2018) Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) jako produkty metabolizmu bakterii jelitowych oraz ich znaczenie dla organizmu gospodarza. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczelnej* 72: 131-142.
- Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, et al. (2015) The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 5(5): 376-391.
- Langade D, Kanchi S, Salve J, et al. (2019) Efficacy and Safety of Ashwagandha (*Withania somnifera*) Root Extract in Insomnia and Anxiety: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Study. *Cereus* 11(9): e5797.
- Mao JJ, Xie SX, Zee J (2015) *Rhodiola rosea* versus sertraline for major depressive disorder: A randomized placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 22(3): 394-399.
- Marathe PA, Satam SD, Raut SB et al. (2020) Effect of *Withania somnifera* (L.) Dunal aqueous root extract on reinstatement using conditioned place preference and brain GABA and dopamine levels in alcohol dependent animals. *Journal of Ethnopharmacology* 274: 113304.

- Mattioli L, Funari C, Perfumi M (2009) Effects of *Rhodiola rosea* L. extract on behavioural and physiological alterations induced by chronic mild stress in female rats. *Journal of Psychopharmacology* 23(2): 130-142.
- Olsson EM, von Schéele B, Panossian AG (2009) A randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study of the standardised extract shr-5 of the roots of *Rhodiola rosea* in the treatment of subjects with stress-related fatigue. *Planta medica* 75(2): 105-112.
- Pachikian BD, Copine S, Suchareau M, et al. (2021) Effects of Saffron Extract on Sleep Quality: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. *Nutrients* 13(5): 1473.
- Panossian AG, Efferth T, Shikov AN (2020) Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Medicinal Research Reviews* 41(1): 630-703.
- Paul S, Chakraborty S, Anand U, et al. (2021) *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha): A comprehensive review on ethnopharmacology, pharmacotherapeutics, biomedical and toxicological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 143: 112175.
- Perfumi M, Mattioli L (2007) Adaptogenic and central nervous system effects of single doses of 3% rosavin and 1% salidroside *Rhodiola rosea* L. extract in mice. *Phytotherapy research* 21(1): 37-43.
- Speers AB, Cabey KA, Soumyanath A, et al. (2021) Effects of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on Stress and the Stress-Related Neuropsychiatric Disorders Anxiety, Depression, and Insomnia. *Current Neuropharmacology* 19(9): 1468-1495.
- Yuan Y, Wu X, Zhang X, et al. (2019) Ameliorative effect of salidroside from *Rhodiola Rosea* L. on the gut microbiota subject to furan-induced liver injury in a mouse model. *Food and Chemical Toxicology* 125: 333-340.
- Zięba A, Kędzierska E, Gibuła E (2018) Analiza właściwości farmakologicznych przetworów z *Panax ginseng* C.A.Mey. oraz *Rhodiola rosea* L. ze szczególnym uwzględnieniem wpływu ich suplementacji na kondycję i wydolność fizyczną. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o. 7-18.

## 11. Modelowanie menopauzy u samic gryzoni

Modeling menopause in female rodents

Sandra Romanis, Ewelina Kurowska-Rucińska, Jan Ruciński

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

Opiekun naukowy: dr Irena Majkutewicz

Romanis Sandra: s.romanis.596@studms.ug.edu.pl

Słowa kluczowe: hormony płciowe, estrogeny, owariektomia, szczury, diepoksyd 4-winylocykloheksenu

### Streszczenie

Zmiany związane z naturalnym starzeniem się obejmują zasadniczo wszystkie aspekty funkcjonowania organizmu – od poziomu komórkowego aż po behavior i wyższe procesy poznawcze. Zmiany te obejmują także reaktywność osi podwzgórze-przysadka-gonady (*hypothalamus-pituitary-gonad*, HPG), wpływając na poziom hormonów płciowych. Menopauza następuje, gdy cykl menstruacyjny zostaje zahamowany ze względu na braku jajczkowania, a jej występowanie stwierdza się, gdy od ostatniej menstruacji minął rok. Samice gryzoni, podobnie jak kobiety, doświadczają regularnych cykli rozrodczych w dorosłym wieku oraz związanego z wiekiem rozregulowania tego cyklu, zmian w jajnikach i w poziomie hormonów płciowych. Mimo tych podobieństw, istnieje szereg różnic dotyczących stanu i funkcjonowania układu rozrodczego oraz hormonalnej osi HPG u samic gryzoni i kobiet. W związku z tym modelowanie menopauzy u gryzoni wraz z całym zakresem zmian towarzyszących temu procesowi, stanowi wyzwanie. Istnieje kilka użytecznych modeli zwierzęcych, które z powodzeniem wykorzystuje się w badaniach mających odzwierciedlać charakterystyczne zmiany występujące u kobiet przechodzących menopauzę, są to: 1) model naturalnego starzenia się samic z nienaruszonymi jajnikami, 2) owariektomia (chirurgiczne usunięcie jajników), 3) seria iniekcji dootrzewnowych lub podskórnych diepoksydu 4-winylocykloheksenu – substancji selektywnie toksycznej względem jajników i komórek rozrodczych.

### 1. Wstęp

U większości gatunków ssaków samice doświadczają naturalnego starzenia reprodukcyjnego w średnim i późnym okresie życia. Warto jednak podkreślić, że długość życia większości zwierząt nie przekracza znacznie okresu ich zdolności do rozrodu i tylko kobiety stanowią w tym przypadku wyraźny wyjątek. Podobnie jak kobiety, samice gryzoni doświadczają regularnych cykli rozrodczych w wieku dorosłym, a także związanych z wiekiem rozregulowań tego cyklu i funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-gonady (jajniki) (HPG), a także zmian w obrębie jajników i wahań poziomu hormonów płciowych (Koebele i in. 2017). Kobiety rodzą się z obfitą, ale skończoną pulą pęcherzyków jajnikowych, która naturalnie i stopniowo zmniejsza się w okresie rozrodczym. Stan całkowitego zatrzymania menstruacji spowodowanego brakiem jajczkowania z uwzględnieniem kryterium czasowego, tj. jeśli od ostatniej menstruacji minął rok, określamy menopauzą. Perimenopauza to okres przejściowy występujący pomiędzy etapem życia, w którym kobieta jest zdolna do reprodukcji, a etapem postreprodukcyjnym. Perimenopauza charakteryzuje się zwykle zmianami neuroendokrynnymi, metabolicznymi i behawioralnymi, które wynikają z wyczerpania pęcherzyków pierwotnych i zmniejszonej liczby pęcherzyków jajnikowych (Szlachcic i Konturek 2013). Systematyczna ocena biologicznych podstaw związanych z przejściem w stan menopauzy w populacji ludzkiej często stanowi wyzwanie. Z tego powodu zwierzęce modele tego zjawiska, a szczególnie modele wykorzystujące samice gryzoni, są nieocenionymi narzędziami do badania procesów związanych bezpośrednio i pośrednio z menopauzalną fluktuacją hormonów płciowych. Modele takie mogą być również wykorzystywane do badań mających na celu ustalenie mechanizmów leżących u podłoża wielu chorób związanych z wiekiem i sprzężonym z nim spadkiem wydajności osi HPG, w przypadku których zachorowalność dotyka przede wszystkim kobiet. Warto również zaznaczyć, że znacząca większość badań nad nowymi metodami terapeutycznymi, w kontekście chorób takich jak choroba Alzheimera czy depresja, prowadzona jest z wykorzystaniem samców

gryzoni, brakuje więc danych w jaki sposób samice reagują na testowane środki terapeutyczne i czy w ich przypadku zastosowane substancje osiągną ten sam poziom skuteczności.

## **2. Charakterystyka menopauzy u kobiet**

Około 45-50 roku życia kobiety wchodzi w okres menopauzy, co oznacza, że od ostatniej menstruacji minął rok, a rezerwa niedojrzałych (pierwotnych) pęcherzyków jajnikowych uległa wyczerpaniu. Szacuje się, że w momencie urodzenia kobieta posiada ok. 300 000 pęcherzyków pierwotnych w każdym jajniku, w okresie dojrzewania liczba ta jest mniej więcej o połowę mniejsza (ok. 180 000), zaś w okresie okołomenopauzalnym w każdym jajniku znajduje się tylko od 100 do 1000 niedojrzałych pęcherzyków. W okresie dojrzewania cykl owulacyjny inicjowany jest w wyniku osiągnięcia pełnej funkcjonalności pętli sprzężenia zwrotnego hormonalnej osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej (HPG). Od tego momentu kobiety doświadczają regularnej owulacji, a tym samym stałego cyklu menstruacyjnego, co trwa przez około 40 następnym lat życia. Co ciekawe, podczas reprodukcyjnego etapu życia kobiety tylko ok. 400 pęcherzyków przechodzi proces dojrzewania i uwalnia komórki jajową, co określamy owulacją, pozostałe pęcherzyki, które stanowią zdecydowaną większość całej puli, ulegają atrezji. Atrezja pęcherzyków jajnikowych jest procesem fizjologicznym, który zachodzi poprzez apoptozę i jest niezbędny dla normalnej czynności jajnika. Pęcherzyki atretyczne różnią się morfologicznie i funkcjonalnie od pęcherzyków prawidłowych, charakteryzują się także znacznie obniżoną zdolnością do produkcji hormonów płciowych (Wallace i Kelsey 2010).

Nadal nie ustalono jednoznacznie, czy przejście w stan menopauzy inicjowane jest przez wyczerpującą się pulę pęcherzyków, czy zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) powodujące rozregulowanie osi HPG, wiadomo jednak, że oba te czynniki są związane z procesem menopauzy. Szereg prac autorstwa Phyllis Wise zawierających wyniki badań prowadzonych na samicach gryzoni i naczelnym innych niż człowiek, dowodzą, że zmiany w OUN związane z procesem starzenia się mają kluczowe znaczenie dla utraty zdolności reprodukcyjnych. Wraz z wiekiem dochodzi do dysfunkcji komunikacji pomiędzy OUN a jajnikami, co skutkuje cyklami bezowulacyjnymi i ostatecznie ustaniem cyklu menstruacyjnego. Zmiany obejmują sygnalizację neuroendokrynną i neuroprzekaźnikową, przede wszystkim w obrębie transmisji glutaminergicznej, GABAergicznej (kwas gammaaminomasłowy, GABA) oraz monoaminergicznej i odgrywają istotną rolę we wczesnych stadiach przejścia do stanu postreprodukcyjnego zarówno u gryzoni, naczelnym, jak i u kobiet (Downs i Wise 2009).

Perimenopauza – okres przejściowy, poprzedzający menopauzę, charakteryzuje się początkiem zmian neuroendokrynnych i biochemicznych, a także objawami klinicznymi sugerującymi zbliżanie się menopauzy. Okres ten jest specyficzny tylko dla kobiet, nie występuje naturalnie u innych zwierząt, choć podejmowane są próby jego modelowania, szczególnie u gryzoni. W perimenopauzie u kobiet, u których cykl menstruacyjny pozostaje jeszcze regularny, można wyróżnić trzy główne zmiany hormonalne: 1) normalne lub nieregularnie wysokie stężenie estradiolu; 2) spadek stężenia progesteronu w osoczu, 3) zmiany na wszystkich poziomach funkcjonowania osi hormonalnej HPG (Prior i Hitchcock 2011). W okresie okołomenopauzalnym duży odsetek kobiet przejawia typowe objawy, do których należą: zmiany naczynioruchowe, wahania czasu trwania cyklu menstruacyjnego, zaburzenia snu, pogorszenie funkcji poznawczych, zmiany behawioralne i nastroju (drażliwość, nerwowość, lęk i depresja), a także zmiany metaboliczne i fizjologiczne, w tym nieprawidłowości ze strony układu moczowo-płciowego (Chalouhi 2017). Dodatkowo menopauza i proces starzenia się u kobiet jest związany ze wzrostem różnych czynników ryzyka rozwoju chorób, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, osteoporoza, nowotwory, cukrzyca, udar, zaburzenia neuropsychiatryczne, zaburzenia snu oraz choroby neurodegeneracyjne – przede wszystkim choroba Alzheimera (AD). W przypadku AD o późnym początku (objawy pojawiają się około 65 roku życia) starsze kobiety są bardziej narażone na rozwój tej choroby ponieważ średnia długość życia kobiet jest dłuższa w porównaniu do mężczyzn, a wiek jest najsilniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju AD; nagła utrata żeńskich hormonów płciowych w okresie peri- i menopauzy odpowiada za zwiększoną podatność kobiet na AD. Dodatkowo depresja jest kolejnym czynnikiem ryzyka związanym z AD, a kobiety cierpią na tę chorobę dwukrotnie częściej niż mężczyźni (Abd El-Fatah i in. 2021).

### 3. Charakterystyka starzenia się rozrodczego u gryzoni

Jedną z najważniejszych różnic dotyczących cykli związanych z hormonami płciowymi pomiędzy samicami gryzoni a kobietami jest występowanie cyklu rujowego (*estrous cycle*) u gryzoni w odróżnieniu od cyklu menstruacyjnego kobiet. Błona śluzowa macicy gryzoni jest wchłaniana, a nie wydalana, jak podczas menstruacji u kobiet. Cykl rujowy występuje co cztery do pięciu dni i składa się z czterech faz: 1) fazy przedrujowej, 2) rui właściwej, 3) fazy porujowej oraz 4) fazy lutealnej. Fazy te wiążą się z fluktuacjami hormonów płciowych, a podobne wahania stężenia tych hormonów występują także w cyklu menstruacyjnym. Około 9-12 miesiąca życia samice gryzoni zwykle doświadczają nieregularnych cykli rujowych, określanych jako estropauza. Występuje u nich wówczas stały i uporczywy stan rui, w którym druga faza cyklu (ruja właściwa) jest wydłużona, mogą się także pojawić cykle bezowulacyjne. Następnie zwierzęta mogą przejść w okres bezrujowy, w którym cykle owulacyjne ustają oraz dochodzi do obniżenia poziomu płciowych hormonów steroidowych. U samic gryzoni w średnim wieku również dochodzi do rozregulowania aktywności osi HPG w estropauzie, co przejawia się zmniejszonym uwalnianiem hormonu luteinizującego (LH) w odpowiedzi na sygnalizację estrogenową (Goldman i in. 2007). Kolejną zasadniczą różnicą związaną z reprodukcyjnym starzeniem się między kobietami a samicami gryzoni to obecność potencjalnie dojrzałych pęcherzyków jajnikowych u starszych gryzoni. Uważa się, że u gryzoni również dochodzi do naturalnego wyczerpywania się pęcherzyków jajnikowych, a ich pula jest ograniczona, ale istnieją dowody, że u dorosłych samic zachodzi proces neo-oogenezy – postnatalnego powstawania nowych pęcherzyków jajnikowych (Kermath i Gore 2012). W związku z przytoczonymi różnicami, modelowanie ludzkiego okresu okołomenopauzalnego u gryzoni wraz z całym zakresem zmian towarzyszących temu procesowi, stanowi duże wyzwanie. Jednak należy je podjąć, aby lepiej zrozumieć istotę fizjologicznego reprodukcyjnego starzenia się, a także ujawnić związek menopauzy i wzrostu ryzyka rozwoju wielu chorób, które u starszych kobiet występują zwykle częściej niż u mężczyzn w podobnym wieku.

### 4. Sposoby modelowania menopauzy u samic szczurów

Proces reprodukcyjnego starzenia się u gatunków ssaków jest złożony i słabo poznany, zwłaszcza u ludzi. Zwierzęce modele menopauzy i okresu okołomenopauzalnego mają umożliwić przynajmniej częściowy wgląd w złożone mechanizmy zmian reprodukcyjnych związanych z wiekiem na różnych poziomach (ogólnoustrojowym, komórkowym, molekularnym i genomowym), a których nie jesteśmy w stanie wymodelować lub badać u ludzi. Warto również zaznaczyć, że niektóre mechanizmy przejścia w stan okołomenopauzalny mogą się znacząco różnić pomiędzy gatunkami, co dodatkowo utrudnia translacyjność (przełożenie) wyników badań z zastosowaniem modeli zwierzęcych na człowieka, jednak niezaprzeczalną korzyścią ich stosowania jest fakt, że dają one badaczom możliwość uzyskania fundamentalnego zrozumienia kluczowych elementów leżących u podstaw tych różnic. Obecne, najpowszechniej wykorzystywane zwierzęce modele reprodukcyjnego starzenia się nie odtwarzają z powodzeniem ludzkiego okresu okołomenopauzalnego i stopniowych zmian zachodzących w tym etapie życia.

Tradycyjny, powszechnie stosowany szczurzy model menopauzy obejmuje chirurgiczne usunięcie jajników (owariektomię), co skutkuje całkowitą utratą wszystkich hormonów jajnikowych, podczas gdy fizjologiczna menopauza polega na selektywnej utracie pęcherzyków jajnikowych, a nie całych jajników. Z kolei model naturalnego starzenia się gryzoni polega na wykorzystaniu samic w wieku 18-24 miesięcy. Model ten nie charakteryzuje się jednak bardzo niskim stężeniem estrogenów i nakłada się na procesy starzenia somatycznego (Kermath i Gore 2012). Długotrwałe stosowanie diepoksydu 4-winylocykloheksenu (VCD) u młodych samic gryzoni jest dobrze udokumnetowanym modelem odzwierciedlającą występującą u ludzi perimenopauzę. VCD indukuje utratę pierwotnych pęcherzyków jajnikowych u myszy i szczurów poprzez przyspieszenie naturalnego procesu atrezji. Model VCD, inaczej określany modelem nienaruszonych jajników lub modelem przyspieszonej niewydolności jajników (*accelerated ovarian failure*, AOF) zdaje się najrzetelniej odwzorowywać naturalne, fizjologiczne przejście do stanu menopauzy, z uwzględnieniem zarówno zmian hormonalnych, jak i behawioralnych, które zwykle występują

u kobiet w okresie okołomenopauzalnym (Brooks i in. 2016; Hoyer i in. 2001; Pestana-Oliveira i in. 2018).

Model naturalnego starzenia się samic z nienaruszonymi jajnikami jest chętnie stosowany do oceny zmieniających się wraz z wiekiem interakcji pomiędzy mózgowiem, przysadką i jajnikami. Badania Phyllis Wise, wykazały, że wraz ze starzeniem się samic szczurów z nienaruszonymi jajnikami zachodzą zmiany w rytmie uwalniania gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórzu, która inicjuje wydzielanie LH. Zmiany te, inicjowane przez OUN, poprzedzają obserwowalne zaburzenia prawidłowych cykli rujowych u starzejących się gryzoni. Nieprawidłowości związane z GnRH są szczególnie widoczne w fazie przedrujowej, w której uwalnianie LH i hormonu folikulotropowego (FSH) poprzedza owulację. Wykazano, że zwierzęta w średnim wieku charakteryzował niższy poziom obwodowego estradiolu w okresie przedowulacyjnym, a przed wyrzutem LH występowało chwilowe opóźnienie wzrostu stężenia GnRH w wyniosłości pośrodkowej, która łączy podwzgórze z przysadką i ułatwia uwalnianie gonadotropin; a także obniżony poziom LH, estradiolu i progesteronu w osoczu co wskazuje na związane z wiekiem zaburzenie funkcji rytmu okołodobowego, które w konsekwencji zmienia normalne wzorce cyklu rujowego. Zmiany w funkcjonowaniu systemów neuroendokrynnych mogą wystąpić, zanim zwierzęta wykażą zewnętrzne nieprawidłowości behawioralne lub cyklu rujowego i prawdopodobnie będą trudne do translacji na badania kliniczne z udziałem kobiet. Dlatego wykorzystanie modelu gryzoni z nienaruszonymi jajnikami do oceny naturalnych, związanych z wiekiem zmian komórkowych i molekularnych w obszarach OUN zaangażowanych w fizjologiczne funkcjonowanie reprodukcyjne i mechanizm sprzężenia zwrotnego, ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia zmian neurologicznych zachodzących u kobiet oraz opracowania nowych środków terapeutycznych łagodzących negatywne objawy związane z wiekiem i starzeniem się układu rozrodczego (Downs i Wise 2009).

Owariektomia (OWT), czyli chirurgiczne usunięcie jajników stanowi w pewnym sensie złoty standard wśród modeli zwierzęcych w kontekście przedklinicznej oceny wpływu hormonów płciowych. Pod względem anatomicznym, układu rozrodczy gryzoni różni się od ludzkiego obecnością rozwidlanej macicy, określanej dwurożną, w której mogą rozwijać się duże mioty. Najczęściej podczas OWT dochodzi do obustronnego wycięcia jajników, jajowodów i czubków rogów macicy z jamy otrzewnej, z pozostawieniem nienaruszonych podwiązanych rogów macicy. Rekonwalescencja po zabiegu OWT trwa około tygodnia. OWT odzwierciedla w pełni menopauzę chirurgiczną u kobiet, stanowi więc idealny model służący ocenie wpływu deprywacji hormonów płciowych i następczej terapii hormonami egzogennymi na OUN i tkanki obwodowe. Zasadniczą wadą modelu OWT w kontekście badań translacyjnych jest to, że większość kobiet zachowuje nienaruszony układ rozrodczy przez cały okres menopauzy. Natomiast usunięcie jajników przed początkiem reprodukcyjnego starzenia się pozwala badaczom na ocenę wpływu poszczególnych hormonów bez uwzględnienia wieku (procesu somatycznego starzenia się), mogącego stanowić istotny czynnik zaburzający wyniki. Dodatkowo wiek zwierząt, które poddano OWT może również skutkować rozbieżnymi efektami, przede wszystkim w aspekcie funkcji poznawczych. Ponadto nagła utrata steroidowych hormonów jajnikowych nie jest charakterystyczna dla większości kobiet w okresie przejściowym menopauzy, a jajnik po menopauzie nadal wydziela androgeny i innych steroidy, choć ich stężenie jest niskie. W związku z tym, model OWT charakteryzuje się zupełnie odmiennym profilem hormonalnym, a także aktywnością osi HPG w porównaniu ze zwierzętami z nienaruszonym układem rozrodczym. Niemniej jednak model OWT jako klasyczna technika jest wciąż powszechnie stosowana i użyteczna w ocenie nowych zjawisk w kontekście badań nad starzeniem się i menopauzą (Bimonte-Nelson i in. 2021).

Model VCD (lub AOF) pozwala na odzwierciedlenie u gryzoni charakterystycznego zasadniczo tylko dla kobiet okresu okołomenopauzalnego i menopauzy. Diepoksyd 4-winylocykloheksenu powstaje podczas przetwarzania butadienu, który jest wykorzystywany do produkcji różnych wyrobów na bazie tworzyw sztucznych. VCD jest stosowany komercyjnie w celu zmniejszenia płodności i rozmnażania gryzoni będących szkodnikami np. na stacjach metra, bez konieczności stosowania niebezpiecznych substancji, które zagrażają środowisku. Na początku lat 2000. VCD został wprowadzony do badań biobehawioralnych z udziałem zwierząt jako model przejściowej menopauzy u gryzoni, ponieważ stwierdzono, że selektywnie oddziałuje na nierosnącą

pułę pęcherzyków jajnikowych i zubaża ją poprzez atrezię, powodując przyspieszoną deplecję pęcherzyków i ostateczną niewydolność jajników. Uważa się, że VCD działa poprzez przyspieszanie atrezji w pierwotnych komórkach jajnika (nie zaburzając jednak wzrostu pęcherzyków) poprzez zmianę wytwarzania i dystrybucji rodziny białek Bcl-2 regulujących apoptozę. Wprowadzenie VCD jako modelu przejściowej menopauzy stanowi integralny wkład do nauki. Model ten rzetelniej odwzorowuje proces przejścia menopauzy u kobiet w porównaniu z modelem naturalnego starzenia się samic z nienaruszonymi jajnikami lub modelem OWT. Lepsze odzwierciedlenie kobiecej perimenopauzy polega na tym, że VCD skutecznie wyczerpuje pułę spoczynkowych pęcherzyków, z jednoczesnym brakiem ingerencji w tkankę jajnikową pozbawioną pęcherzyków, która pozostaje w organizmie, co skutkuje profilem hormonów płciowych bardziej podobnym do występującego u większości kobiet przechodzących naturalną menopauzę (Brooks i in. 2016; Hoyer i in. 2001).

Model VCD obejmuje serię iniekcji dootrzewnowych lub podskórnych VCD w dawce od 80 mg do 160 mg na kilogram masy ciała. Procedurę podawania VCD powinno się wykonywać u bardzo młodych osobników, np. u 28-dniowych samic, ponieważ wówczas toksyczność VCD ogranicza się tylko do jajników, zaś u zwierząt 12-tygodniowych wykazano, że działanie toksyny obejmuje także inne narządy. Wysokie dawki VCD również są ogólnoustrojowo toksyczne, a dodatkowo należy zachować szczególną ostrożność podczas stosowania VCD, przede wszystkim w przypadku gdy eksperymentatorami są kobiety. Dodatkowo długotrwałość procedur związanych z iniekcjami może stanowić duże obciążenie stresowe dla zwierząt, które mogą reagować znacznym spadkiem masy ciała podczas podawania VCD. Niemniej jednak większość danych literaturowych wskazuje, że masa ciała gryzoni powraca do wartości wyjściowej po zakończeniu procedur iniekcyjnych. Równie istotne w przypadku stosowania modelu VCD jest konieczność weryfikacji czy iniekcje VCD faktycznie doprowadziły do niewydolności jajników. Można to osiągnąć na kilka sposobów: wykonując poperfuzyjną histologiczną ocenę jajników; mierząc stężenie estradiolu (jego poziom powinien oscylować w granicach normy lub być znacząco podwyższony) i progesteronu (powinien być znacząco obniżony) w osoczu; mierząc stężenie czynnika hamującego rozwój przewodów Müllera w osoczu (niewykrywalny lub niski poziom). Model VCD zyskuje na popularności w dziedzinie badań nad menopauzą i starzeniem się. Przy jego pomocy dowiedziono, że VCD prowadzący do niewydolności jajników w różny sposób wpływa na pamięć przestrzenną, a także na skuteczność hormonalnych terapii estrogenowych w odniesieniu do samic poddanych OWT. Wykazano również, że reprodukcyjne starzenie się wywołane przez VCD jest związane z opornością na insulinę, utratą masy kostnej, rozwojem zmian miażdżycowych i zmianami w zachowaniach lękowych, z których wszystkie mogą stanowić zagrożenia dla zdrowia związane ze starzeniem się i okresem okołomenopauzalnym u kobiet. Badania te wskazują na korzyści i użyteczność modelu VCD i sugerują, że należy go dalej wykorzystywać w kontekście badań nad menopauzą w celu wyjaśnienia mechanizmów leżących u podłoża tego procesu oraz opracowania nowych terapii (Brooks i in. 2016; Hoyer i in. 2001; Pestana-Oliveira i in. 2018; Pestana-Oliveira i in. 2021).

## **5. Podsumowanie**

Cechą charakterystyczną ludzkiej menopauzy jest całkowita niewydolność jajników, o czym należy pamiętać przy wyborze odpowiedniego zwierzęcego modelu menopauzy. Dodatkowo należy uwzględnić wpływ konstytutywnych elementów związanych ze starzeniem się i menopauzą, takich jak wiek, w którym kobieta zaczyna przechodzić menopauzę, ekspozycja zarówno na podawanie hormonów egzogennych (np. doustne środki antykoncepcyjne), jak i przejściowe zmiany endogenne w środowisku hormonów jajnikowych (np. ciąża), a także wywiad rodzinny dotyczący czasu trwania i objawów menopauzy oraz ginekologiczne interwencje chirurgiczne. To szerokie spektrum czynników jest często trudne do oceny u zdrowej starzejącej się kobiety. Nieodzowne są zatem zwierzęce modele peri- i menopauzy, aby systematycznie badać wpływ towarzyszących procesów na OUN i zachowanie. Modele te mogą nauczyć nas optymalnych parametrów czasu trwania, dawki, wyboru środków terapeutycznych i dróg ich podawania, umożliwiając bezpośrednią manipulację, a także umożliwiając kontrolę nad wymienionymi wyżej czynnikami.



## 6. Literatura

- Abd El-Fatah IM, Abdelrazek HMA, Ibrahim SM (2021) Dimethyl fumarate abridged tauo-amyloidopathy in a D-Galactose/ovariectomy-induced Alzheimer's-like disease: Modulation of AMPK/SIRT-1, AKT/CREB/BDNF, AKT/GSK-3 $\beta$ , adiponectin/Adipo1R, and NF- $\kappa$ B/IL-1 $\beta$ /ROS trajectories. *Neurochemistry International* 148: 105082.
- Bimonte-Nelson HA, Bernaud VE, Koebele SV (2021). Menopause, hormone therapy and cognition: maximizing translation from preclinical research. *Climacteric* 24(4): 373-381.
- Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB (2016) The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology (Bethesda)* 31(4): 250-257.
- Chalouhi S (2017) Menopause: A complex and controversial journey. *Post Reproductive Health* 23(3): 128-131.
- Downs JL, Wise PM (2009) The role of the brain in female reproductive aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299(1): 32-38.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 80(2): 84-97.
- Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, et al. (2001) Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic Pathology* 29(1): 91-99.
- Kermath BA, Gore AC (2012) Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinology* 96(1): 1-12.
- Koebele SV, Mennenga SE, Hiroi R, et al. (2017) Cognitive changes across the menopause transition: A longitudinal evaluation of the impact of age and ovarian status on spatial memory. *Hormones and Behavior* 87: 96-114.
- Pestana-Oliveira N, Carolino ROG, Kalil-Cutti B, et al. (2021) Development of a Chemical Reproductive Aging Model in Female Rats. *Bio-Protocols* 11(8): e3994.
- Pestana-Oliveira N, Kalil B, Leite CM (2018) Effects of Estrogen Therapy on the Serotonergic System in an Animal Model of Perimenopause Induced by 4-Vinylcyclohexen Diepoxide (VCD). *eNeuro* 5(1): ENEURO.0247-17.2017.
- Prior JC, Hitchcock CL (2011) The endocrinology of perimenopause: need for a paradigm shift. *Frontiers in Bioscience-Scholar Edition* 3(2): 474-486.
- Szlachcic A, Konturek S (2013) Fizjologia rozrodu [w:] Fizjologia człowieka. Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wrocław, Wydanie II 551-565.
- Wallace WH, Kelsey TW (2010) Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 5(1): e8772.

## 12. Metody wykrywania błędów w procesie Powder Bed Fusion

Error detection methods in the Powder Bed Fusion process

Piotr Sawicki<sup>(1, 2)</sup>, Bogdan Dybała<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Katedra Technologii Laserowych, Automatykacji i Organizacji Produkcji, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wroclawska

<sup>(2)</sup>Global Engineering & Technology Center – Poland, Collins Aerospace, Wrocław

Piotr Sawicki: p.sawicki@pwr.edu.pl

Słowa kluczowe: PBF, Powder Bed Fusion, monitorowanie in-situ, technologie przyrostowe

### Streszczenie

Jednym z procesów przyrostowych jest technologia Powder Bed Fusion, która jest stosowana do wytwarzania części wykonanych z tworzyw sztucznych lub metali, dzięki czemu może znaleźć szerokie zastosowanie w przemyśle. Wraz z rozwojem procesów PBF, wzrastają wymagania co do jakości wytwarzanych produktów za pomocą tego procesu. Z powodu braku stabilności procesów PBF coraz większy nacisk kładzie się na rozwój metod, które pozwalają na szybkie wykrycie wad, już podczas trwania procesu. Praca przedstawia przegląd metod ze szczególnym naciskiem na metody monitorowania in situ procesów PBF dla materiałów metalicznych.

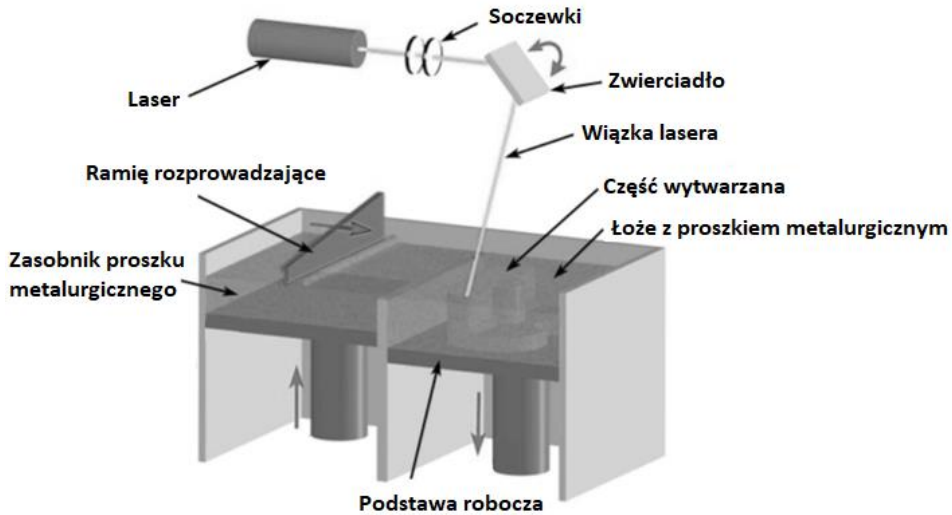
### 1. Wstęp

Technologie przyrostowe (ang. AM – Additive Manufacturing) polegają na dodawaniu materiału podczas procesu wytwarzania, odwrotnie do konwencjonalnych metod, gdzie materiał jest odcinany, np. skrawany. Zazwyczaj, materiał jest dodawany warstwa po warstwie, a ich kształty są obliczane z modelu CAD. Kluczowymi zaletami technologii przyrostowych jest wydajne wykorzystanie materiału, ponieważ proszek metalowy może zostać zastosowany ponownie, łatwość wytwarzania skomplikowanych struktur oraz szybkie prototypowanie bazując na modelu 3D. Technologie przyrostowe pozwalają na projektowanie geometrii tylko z kilkoma ograniczeniami (np. konieczne może być użycie struktur wsporczych), dzięki czemu produkt może wykazywać lepsze parametry funkcjonalne (np. stosunek masy do sztywności) niż produkt wykonany konwencjonalnie.

Przez długi czas technologie przyrostowe nie były kategoryzowane, co powodowało trudności w definiowaniu procesów. Obecnie można wyróżnić 7 kategorii bazując na maszynach użytych w procesie (ASTM International 2012). Jednym z tych procesów jest proces fuzji proszku w łożu (ang. PBF – Powder Bed Fusion). Technologia PBF wykorzystuje energię cieplną, która spaja warstwę proszku z warstwą poprzednią w miejscach zdefiniowanych w modelu CAD.

W kategorii PBF można wyróżnić trzy podkategorie ze względu na źródło ciepła do przetapiania lub spajania proszku – wyróżniamy przetapianie wiązką elektronów (ang. EBM – Electron Beam Melting), spiekanie laserem (ang. SLS – Selective Laser Sintering) oraz przetapianie laserem (ang. SLM – Selective Laser Melting). Dla wszystkich trzech podkategorii proces wytwarzania jest podobny: na podstawie modelu CAD oprogramowanie dzieli kształt na warstwy i przygotowuje ścieżki przejścia wiązki lasera dla każdej z warstw. Następnie po przygotowaniu maszyny (m. in. podgrzaniu) następuje proces spajania bądź stapiania materiału. Gdy wiązka lasera przejdzie przez zadaną ścieżkę dla danej warstwy, podstawa robocza obniża się o wartość grubości warstwy i kolejna warstwa proszku jest rozprowadzana za pomocą ramienia rozprowadzającego. Po rozprowadzeniu proszku proces powtarza się.

Brak jasno zdefiniowanej kontroli jakości oraz niestabilność procesu są głównymi czynnikami, które ograniczają PBF przed wykorzystaniem do produkcji kluczowych części. Zmienność oraz wąskie okna wartości dopuszczalnych parametrów powodują, że proces wymaga dodatkowych badań nad metodami monitoringu, tak żeby można było zareagować odpowiednio wcześniej na powstające błędy wytwórcze.



Rys. 2. Schemat działania procesu PBF (Marrey i in. 2019).

## 2. Opis zagadnienia

Obecna kontrola jakości elementów wykonanych metodą PBF skupiona jest przede wszystkim na tomografii komputerowej (ang. CT – Computed Tomography). Skan CT wykonywany jest po zakończeniu procesu, gdzie zaobserwowane mogą być błędy wykonawcze, tj. nieciągłości materiału czy pozostałości nieprzetopionego proszku metalurgicznego. Pomimo wielu zalet tomografii komputerowej, podstawową wadą jest brak możliwości przemysłowego jej zastosowania podczas procesu PBF. Trudności w kontroli procesu i monitorowania in situ są głównymi czynnikami ograniczonej niezawodności procesów addytywnych, w tym PBF (Quarshie i in. 2012), a co za tym idzie, rozwoju metod addytywnych. Przez to, że proces jest niestabilny, US National Institute of Standards and Technology również wskazuje, że brak monitoringu in situ wraz z pętlą zwrotną jest głównym ograniczeniem technologii addytywnych (Everton i in. 2016).

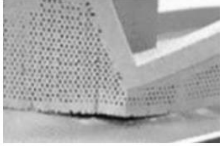
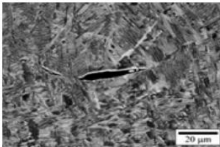
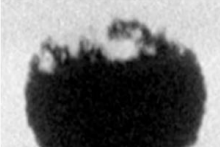
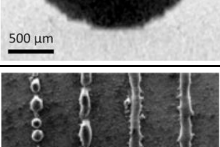
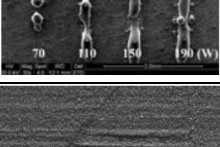
Mimo, że proces PBF jest prosty w swoich założeniach i rozwijany jest od lat 90-tych ubiegłego wieku (Raza i in. 2021), badacze borykają się ze stabilnością procesu, na który wpływa ponad 50 parametrów (Marrey i in. 2019). Parametry można podzielić na trzy grupy. Tab. 1 przedstawia po kilka parametrów z każdej z grup.

Tab. 1. Zbiór podstawowych parametrów procesu PBF.

Parametry stałe	Parametry zmienne	Parametry wyjściowe
- Gaz obojętny (N <sub>2</sub> , Ar, He)	- Moc lasera [W]	- Granica plastyczności [Pa]
- Ilość tlenu (<~20 ppm)	- Rozmiar plamki lasera [mm <sup>2</sup> ]	- Wytrzymałość na rozciąganie [Pa]
- Temperatura otoczenia (22-300°C)	- Strategia przejścia lasera	- Wydłużenie maksymalne [%]
- Charakterystyka proszku metalurgicznego (rozmiar ziarna: 20-100 μm)	- Dystans pomiędzy kolejnymi przejściami [mm]	- Wytrzymałość zmęczeniowa
- Obszar roboczy maszyny (mm × mm × mm)	- Prędkość skanowania [m/s]	- Chropowatość powierzchni [μm]
- Długość fali lasera [μm]	- Grubość warstwy [20-100 μm]	- Odporność na ścieranie

Do typowych błędów druku metodą PBF zaliczyć można: pękanie, porowatość, zbyt wysoką chropowatość, efekt bąbelkowania (ang. „balling effect”), podnoszenie się struktury ponad łożo proszku czy ponowne przetopienie materiału. Tab. 2 zawiera opis głównych błędów.

**Tab. 2.** Główne błędy powstające podczas procesu PBF (Everton i in. 2016).

Błąd	Fotografia	Opis
Pękanie		Pękanie występuje z powodu powstałych podczas procesu naprężeń cieplnych. Najczęściej występuje pomiędzy podstawą, a drukowanym elementem.
Porowatość		Porowatość wynika z dwóch powodów: zamkniętej objętości gazu lub braku spójności pomiędzy warstwami.
Chropowatość		Chropowatość sama w sobie nie jest błędem, natomiast jej zbyt wysoka wartość traktowana jest jako błąd wykonawczy (Klingaa i in. 2020).
Efekt bąbelkowania		Bąbelkowanie (ang. „balling effect”) występuje, gdy topiony materiał tworzy krople, zamiast płaskiej powierzchni. Efekt związany jest m. in. ze zbyt małą ilością dostarczonej energii.
Podnoszenie się struktury ponad powierzchnię druku		Błąd pojawia się, gdy naprężenia cieplne powodują odkształcenia materiału w taki sposób, że element zaczyna wystawać ponad łożo. Błąd może spowodować zniszczenia ramienia rozprowadzającego (Kleszczynski i in. 2016).

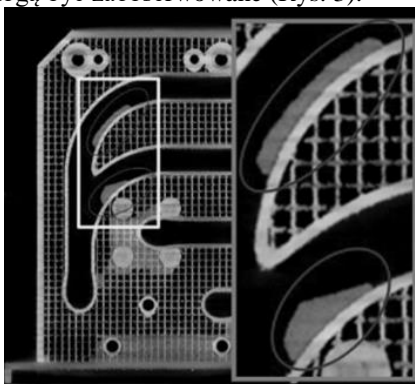
### 3. Przegląd literatury

Jak wspomniano, głównym ograniczeniem rozwoju metody PBF jest brak metod monitoringu in situ. Z tego też powodu skupiono się na przedstawieniu metod in situ oraz tomografii komputerowej, ponieważ w wielu badaniach wyniki skanu CT traktowane są jako wyniki referencyjne dla innych metod.

Pierwsze prace nad monitorowaniem procesu PBF skupione były na współliniowych systemach monitoringu obszaru przetopu. Systemy tego typu pozwoliły na sterowanie temperaturą obszaru przetopu z pętlą zwrotną na podstawie mierzonej temperatury. Z drugiej strony, rozwój nieosiowych metod szybkoklatkowej rejestracji obrazu pozwolił na głębsze zrozumienie efektu bąbelkowania. Natomiast dzięki rejestrowaniu większej powierzchni łoża, możliwe jest wykrycie błędów powstających w wyniku np. uszkodzonego ramienia rozprowadzającego. Analiza całej powierzchni łoża ciągle jest w dużej mierze procesem manualnym, gdzie badacze z wykorzystaniem wizji komputerowej rozwijają algorytmy pozwalające na automatyczną detekcję błędów (Everton i in. 2016).

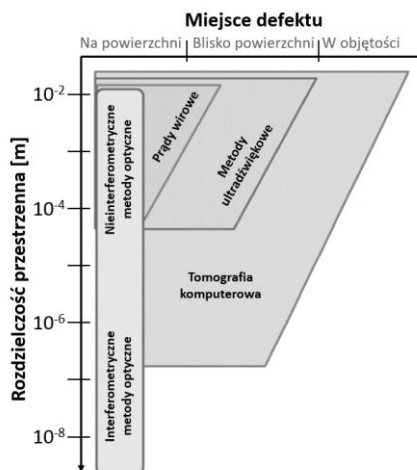
Pierwszą omawianą metodą wykrywania błędów jest tomografia komputerowa (skan CT). Tomografia komputerowa jest nieniszczącą metodą pomiarową, która pozwala na stworzenie modelu 3D mierzonego elementu. Skan CT pozwala na stworzenie cyfrowej reprezentacji zewnętrznej powierzchni i wewnętrznej struktury obiektu, co pozwala na skuteczną weryfikację wytworzonych elementów w miejscach, które są niedostępne innymi metodami. Dzięki tej metodzie można

zarejestrować porowatość bądź pęknięcia w materiale. Pozostałości proszku metalurgicznego, który nie został usunięty, również mogą być zaobserwowane (Rys. 3).



**Rys. 3.** Pozostałości proszku metalurgicznego zaobserwowane za pomocą skanu CT (Villarraga-Gómez 2017).

Tomografia komputerowa pozwala na obserwację defektów z rozdzielczością nawet poniżej  $10^{-6}$  m (Rys. 4). Taka rozdzielczość umożliwia zaobserwowanie porowatości o objętości  $10^{-18}$  m<sup>3</sup>. Dedykowane programy do analizy wyników CT pozwalają na automatyczne zliczanie porów i tworzenie histogramów, a tym samym na efektywną ocenę porowatości wytworzonego elementu (Farshidianfar i in. 2021).



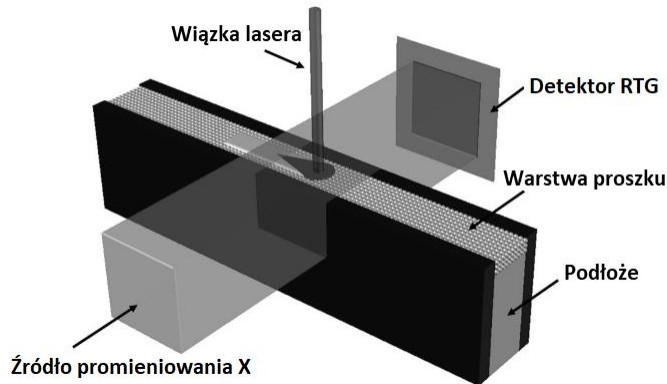
**Rys. 4.** Porównanie badań nieniszczących w odniesieniu do miejsca błędu oraz mierzonej rozdzielczości (Villarraga-Gómez i in. 2018).

Zastosowanie tomografii komputerowej podczas trwania procesu druku jest bardzo utrudnione, możliwe jest jednak wykorzystanie promieniowania rentgenowskiego do uzyskiwania płaskich obrazów RTG. Przykład rejestracji zmian zachodzących w obszarze przetopu przedstawiony został na Rys. 5. W tym przypadku badacze rejestrowali zmiany zachodzące w obszarze przetopu z częstotliwością 45000 Hz i rozdzielczością 2  $\mu$ m na piksel obrazu.

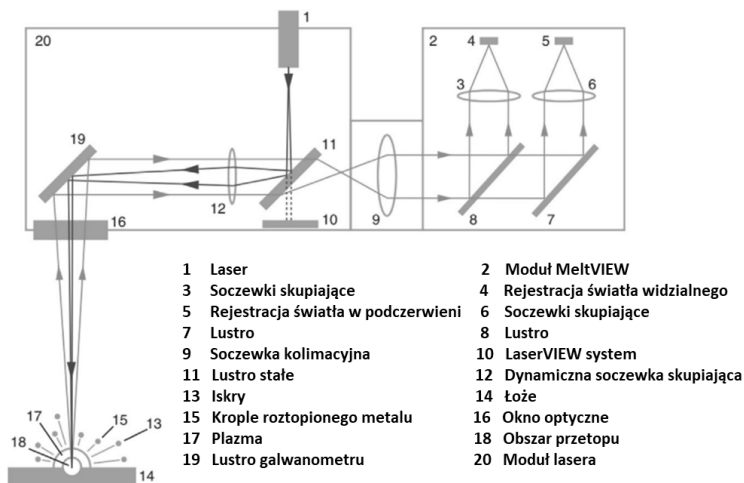
Rejestracja światła podczerwonego pozwala na monitoring rozkładu temperatury, na podstawie którego oszacować można m. in. ilość dostarczanego ciepła do poszczególnych części materiału. Jest to o tyle istotne, że przewodność cieplna proszku metalurgicznego jest z reguły trzy rzędy niższa niż przetopionego metalu. Jeśli pod spajającym obszarem nie ma wystarczającej struktury wsporczej, to wystarczająca ilość ciepła nie zostanie odprowadzona i może to doprowadzić do

podnoszenia się struktury ponad proszek metalurgiczny, bądź powodować efekt bąbelkowania (Kleszczyński i in. 2016).

Rys. 6 przedstawia współliniowy system monitoringu, który rejestruje światło widzialne oraz podczerwone z częstotliwością 100 000 Hz z pomocą dwóch fotodiod (nr 4 i 5 na Rys. 6). Dane te wykorzystywane są do późniejszej klasyfikacji druku. Skuteczność przedstawionego algorytmu wynosi 77%.



Rys. 5. System monitorowania obszaru przetopu in situ (Guo i in. 2019).



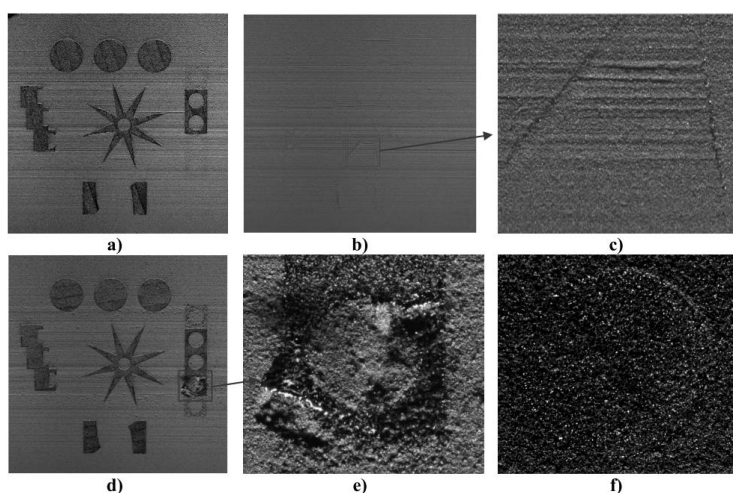
Rys. 6. Współliniowy system monitoringu dedykowany do maszyny Renishaw RenAM 500M L-PBF (Okaro i in. 2019).

Innym systemem wykorzystującym światło podczerwone jest nie współliniowy system z pętlą zwrotną dla technologii bezpośredniego osadzania materiału (ang. DED – Directed Energy Deposition). System wykorzystywany jest pomiarów prędkości chłodzenia i nagrzewania oraz temperatury obszaru przetopu z częstotliwością 30 Hz. Monitoring pozwala na skuteczne kontrolowanie szybkości chłodzenia materiału w czasie rzeczywistym, co pozwala na uniknięcie eutektoidalnej przemiany fazowej w S316-L i zachowanie struktury austenitycznej (Farshidianfar i in. 2021).

Rejestracja procesu PBF w świetle widzialnym jest bardzo popularną metodą pozyskiwania informacji z powodu prostoty oprzyrządowania. Wielu producentów oferuje urządzenia z wbudowanym oprzyrządowaniem do monitoringu, jak np. Renishaw (Rys. 6), czy SLM Solutions. Podobnie jak dla światła podczerwonego, systemy mogą być współliniowe i nie współliniowe. Każda warstwa może być rejestrowana przed i po przetopieniu. Następnie zdjęcia mogą zostać ocenione

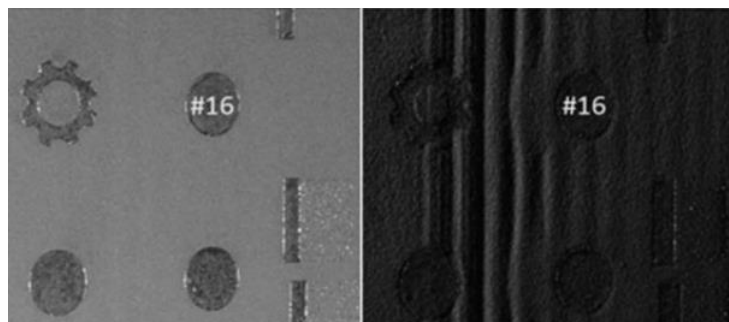
(manualnie bądź automatycznie) czy proces przebiega poprawnie. Problemy związane z uszkodzonym ramieniem rozpraszającym, podnoszącą się strukturą czy niepoprawnym rozproszaniem proszku metalurgicznego są względnie proste do zaobserwowania.

Rys. 7 przedstawia zdjęcia łoża podczas procesu. Rys. 7a przedstawia warstwę po przetopieniu proszku. Nie widać tutaj żadnych defektów, natomiast po nałożeniu warstwy proszku (Rys. 7b) zaobserwowano, że ramię zahaczyło o wystającą część wytwarzanego obiektu. Powiększenie obszaru widoczne jest na Rys. 7c. Rys. 7d przedstawia oderwaną część materiału, która została zahaczona przez ramię rozpraszające. Na Rys. 7f zaobserwować można wytwarzany cylinder z zanieczyszczeniami proszku metalurgicznego – powierzchnia jest zdecydowanie ciemniejsza i nieregularna. W taki sposób cały proces może być obserwowany warstwa po warstwie. Autorzy artykułu dokonali analizy obrazu w sposób manualny. W przemysłowych zastosowaniach manualna ocena zdjęć jest niepraktyczna i badacze pracują nad automatyczną klasyfikacją obszarów zdjęć z wykorzystaniem algorytmów sztucznej inteligencji (Caggiano i in. 2019; Scime i Beuth 2018; Tan i in. 2020; Wang i in. 2020).



**Rys. 7.** Różne typy błędów zaobserwowane podczas procesu PBF (Kleszczynski i in. 2016).

Podczas optycznej rejestracji warstwy bardzo ważna jest lokalizacja źródła światła. Przy różnym oświetleniu można zaobserwować różne defekty, co przedstawione zostało na Rys. 8 (Foster i in. b.d.). Nierówności są wyraźnie widoczne na zdjęciu po prawej stronie, natomiast po lewej widać naświetlone obszary proszku. Prezentowane zdjęcia są zdjęciami surowymi, nieobrabianymi.



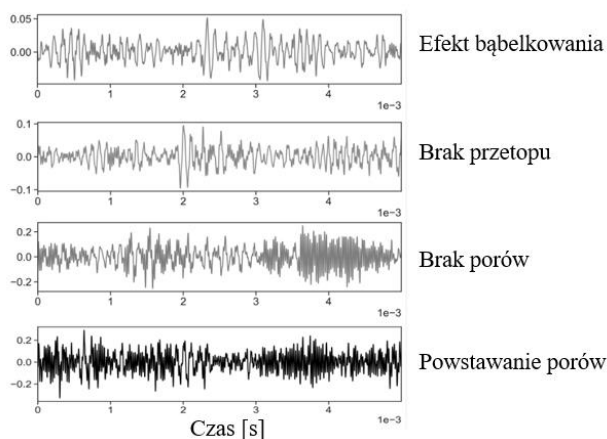
**Rys. 8.** Wpływ zmiany lokalizacji źródła światła na optyczny obraz warstwy.

Monitoring kamerą szybkoobrotową (4000 Hz) w systemie współosiowym może pozwolić na rejestrację i analizę zmiany rozmiaru obszaru przetopu. Zazwyczaj dąży się do tego, żeby

wariancja rozmiaru obszaru była jak najmniejsza. Dzięki analizie rozmiaru obszaru dla poprzedniej warstwy, można kontrolować gęstość mocy dla kolejnej warstwy zmniejszając wariację obszaru przetopu o 78%. Redukcja wariacji redukuje liczbę oraz objętość porów w drukowanym elemencie (Yeung, Yang, i Yan 2020).

Podczas procesu przyrostowego generowane są fale akustyczne, które mogą zostać zarejestrowane. Wykorzystując emisję akustyczną i przekształcając sygnał akustyczny na sygnał elektryczny możliwa jest analiza tego sygnału i wyodrębnienie momentów, kiedy powstawał defekt w materiale. Aparatura pomiarowa potrzebna do rejestrowania fal akustycznych zazwyczaj zawiera czujnik, przedwzmacniacz, przewody oraz system rejestracji sygnału. Początkowo emisja akustyczna wykorzystywana była do inspekcji rurociągów, spoin czy integralności struktury (Yassin 2020). Poniższe badania wskazują, że z sukcesem mogą być wykorzystane do monitoringu procesu PBF.

Rys. 9 przedstawia charakterystyki dla czterech cech zarejestrowanych podczas badań. Analiza statystyczna poszczególnych sygnałów i parametry takie jak skośność czy RMS wyraźnie pokazują, że odróżnienie tych sygnałów nie stanowi problemu i wykrycie powstawania porów czy efektu bąbelkowania jest możliwe z wykorzystaniem emisji akustycznej.



**Rys. 9.** Przebiegi czasowe sygnału dla poszczególnych wydarzeń podczas druku (Pandiyan i in. 2020).

#### 4. Podsumowanie

W pracy przedstawione zostały podstawowe metody wykrywania błędów w procesie PBF. Skupiono się na przedstawieniu metod, za pomocą których można już w trakcie trwania procesu określić czy przebiega on poprawnie. Jako referencyjne źródło informacji dla pozostałych metod obserwacyjnych przedstawiono tomografię komputerową, która obecnie jest głównie wykorzystywana do określenia błędów procesu pomimo wysokich kosztów. Przedstawione zostały argumenty dlaczego rozwój metod in situ jest krytyczny dla dalszego rozwoju druku 3D, a w szczególności metody PBF.

Przegląd literatury przedstawia zdaniem autorów główne metody, które są intensywnie rozwijane. Obserwacja światła podczerwonego pozwala na obserwację obszaru przetopu oraz określenie prędkości nagrzewania i chłodzenia, co pozwala na kontrolę m. in. przemian fazowych materiału, czy ilości dostarczanego ciepła do określonego obszaru aktualnej warstwy. Obszar przetopu może być również obserwowany w świetle widzialnym i za pomocą pewnych algorytmów powierzchnia obszaru przetopu może być również kontrolowana. Monitorowane są również poszczególne warstwy przed i po przetopieniu, gdzie fotografowana jest cała warstwa, przy różnych warunkach świetlnych. Różne położenia źródeł światła skutecznie przyczyniają się do uwidocznienia wad, które nie mogą być zaobserwowane z wykorzystaniem jednego źródła.



Wykorzystanie emisji akustycznej jako metody monitoringu pozwala na bardzo szybką analizę sygnału, ponieważ jest on względnie prosty w porównaniu do obrazu. Emisja akustyczna pozwala skutecznie wykryć efekt bąbelkowania czy brak spajania proszku.

Wspomniane wyżej metody można również podzielić z uwagi na wymiarowość zbieranych danych. Tomografia komputerowa może być traktowana jako dane 3D, zdjęcia w podczerwieni lub światło widzialnym jako 2D, emisja akustyczna lub sygnał zarejestrowany przez fotodiody jako sygnał 1D. Biorąc pod uwagę dalszy rozwój metod monitorowania, należy zdać sobie sprawę, że wyższy wymiar danych powoduje zdecydowanie większą ilość operacji przetwarzania. Autorzy publikacji, którzy opisują automatyczne metody klasyfikacji sygnałów (2D lub 1D), zwykle nie przedstawiają porównania jednego systemu monitoringu z innym. Okazać się może, że właśnie połączenie różnych systemów monitoringu pozwoliłoby na jeszcze skuteczniejszy monitoring procesu PBF.

## 5. Literatura

- ASTM International. 2012. F2792-12a: Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies.
- Caggiano A, Zhang J, Alfieri V i in. (2019) Machine learning-based image processing for on-line defect recognition in additive manufacturing. *CIRP Annals* 68(1): 451–454.
- Everton SK, Hirsch M, Stavroulakis PI i in. (2016) Review of in-situ process monitoring and in-situ metrology for metal additive manufacturing. *Materials and Design* 95: 431–445.
- Farshidianfar MH, Khodabakhshi F, Khajepour A i in. (2021) Closed-loop control of microstructure and mechanical properties in additive manufacturing by directed energy deposition. *Materials Science and Engineering A* 803.
- Foster BK, Reutzel EW, Nassar AR i in. (2015) Optical, layerwise monitoring of powder bed fusion.
- Guo Q, Zhao C, Qu M i in. (2019) In-situ characterization and quantification of melt pool variation under constant input energy density in laser powder bed fusion additive manufacturing process. *Additive Manufacturing* 28: 600–609.
- Kleszczynski S, Seht J, Witt G i in. (2012) Error Detection in Laser Beam Melting Systems by High Resolution Imaging. *Proceedings of the Twenty Third Annual International Solid Freeform Fabrication Symposium*
- Klingaa CG, Dahmen T, Baier S i in. (2020) X-ray CT and image analysis methodology for local roughness characterization in cooling channels made by metal additive manufacturing. *Additive Manufacturing* 32.
- Marrey M, Malekipour E, El-Mounayri H i in. (2019) A Framework for Optimizing Process Parameters in Powder Bed Fusion (PBF) Process Using Artificial Neural Network (ANN). 47th SME North American Manufacturing Research Conference, NAMRC 47, Pennsylvania, USA
- Okaro IA, Jayasinghe S, Sutcliffe C i in. (2019) Automatic fault detection for laser powder-bed fusion using semi-supervised machine learning. *Additive Manufacturing* 27: 42–53.
- Pandiyan V, Drissi-Daoudi R, Shevchik S i in. (2020) Analysis of time, frequency and time-frequency domain features from acoustic emissions during Laser Powder-Bed fusion process. *Procedia CIRP* 94: 392–397.
- Quarshie R, Stuart M, Reeves P i in. (2012) Shaping our National Competency in Additive Manufacturing Manufacturing Special Interest Group (AM SIG).
- Raza A, Pauzon C, Hryha E i in. (2021) Spatter oxidation during laser powder bed fusion of Alloy 718: Dependence on oxygen content in the process atmosphere. *Additive Manufacturing* 48: 102369.
- Scime L, Beuth J (2018) A multi-scale convolutional neural network for autonomous anomaly detection and classification in a laser powder bed fusion additive manufacturing process. *Additive Manufacturing* 24: 273–286.
- Tan Z, Fang Q, Li H i in. (2020) Neural network based image segmentation for spatter extraction during laser-based powder bed fusion processing. *Optics and Laser Technology* 130.

- Villarraga-Gómez H. (2017) Role of X-ray/CT Technologies in the „3D Printing Revolution”. ASNT Digital Imaging 2017
- Villarraga-Gómez H, Peitsch CM, Ramsey A i in. (2018) The Role of Computed Tomography in Additive Manufacturing. 2018 ASPE and euspen Summer Topical Meeting - Advancing Precision in Additive Manufacturing
- Wang C, Tan XP, Tor SB i in. (2020) Machine learning in additive manufacturing: State-of-the-art and perspectives. Additive Manufacturing 36: 101538
- Yassin A (2020) Acoustic Emission Testing (AET).
- Yeung H, Yang Z, Yan L (2020) A meltpool prediction based scan strategy for powder bed fusion additive manufacturing. Additive Manufacturing 35: 101383

### **13. Wizja komputerowa i przetwarzanie obrazu w monitorowaniu procesów PBF**

Computer Vision and Image Processing in monitoring Powder Bed Fusion processes

Piotr Sawicki<sup>(1, 2)</sup>, Bogdan Dybała<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Katedra Technologii Laserowych, Automatykacji i Organizacji Produkcji, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wrocławska

<sup>(2)</sup>Global Engineering & Technology Center – Poland, Collins Aerospace, Wrocław

Piotr Sawicki: p.sawicki@pwr.edu.pl

Słowa kluczowe: PBF, Powder Bed Fusion, wizja komputerowa, sztuczna inteligencja

#### **Streszczenie**

Dzięki technologii PBF możliwe jest wytwarzanie skomplikowanych struktur. Pomimo zainteresowania tą technologią, jej przemysłowe zastosowania borykają się z kontrolą jakości zarówno w trakcie, jaki i po procesie druku 3D. Prototypowe części czy małe serie produktów są kontrolowane w sposób manualny, jest to jednak rozwiązanie czasochłonne i kosztowne. Przedstawiony zbiór prac opisuje obszary, w jakich możliwe jest zastosowanie wizji komputerowej oraz przetwarzanie obrazu w celu monitorowania procesu. Opisanie rozwiązania pozwalają na wykrycie błędów oraz monitoring, m. in. obszaru przetopu proszku metalowego.

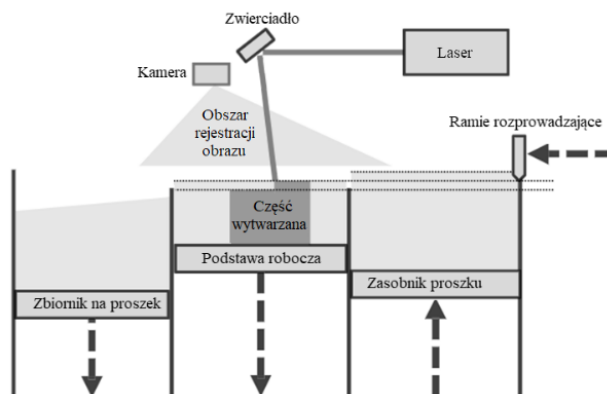
#### **1. Wstęp**

Technologia fuzji proszku w łożu (ang. PBF – Powder Bed Fusion) jest jedną z technologii przyrostowych, która pozwala na wyprodukowanie części z metalu bądź tworzyw sztucznych. Bazując na modelu 3D, produkt wytwarzany jest warstwa po warstwie, co pozwala na tworzenie skomplikowanych struktur, które są trudne bądź niemożliwe do wykonania metodami konwencjonalnymi. Dodatkowo, proces cechuje się niską ilością odpadów materiałowych – proszek może zostać ponownie wykorzystany w kolejnym procesie druku.

Proces PBF (Rys. 10) jest bardzo wrażliwy na zmianę parametrów i wykazuje się niestabilnością, co prowadzi do powstawania błędów. W wyniku m.in. nieodpowiedniej gęstości mocy dostarczonej do obszaru przetopu, zanieczyszczeń proszku, uszkodzenia ramienia rozpraszającego czy błędnie zaprojektowanych struktur wsporczych, powstają błędy takie jak, podniesienie się struktury ponad poziom proszku, pęknięcia, porowatości czy bąblenie (Kleszczynski i in. 2016).

Do wykrycia i ewentualnego zapobiegnięcia dalszego rozwoju błędów konieczne jest zapewnienie ciągłego monitoringu, który pozwoli na wykrycie defektów w czasie rzeczywistym. Manualna ocena zebranych danych jest często niemożliwa z powodu ilości zebranych danych. Z tego powodu badacze pracują nad autonomicznymi metodami monitoringu. Monitoring in-situ może obejmować m. in. pomiar rozkładu temperatur kamerą termowizyjną, wykonywanie zdjęć w świetle widzialnym, rejestrację poprzez czujniki takie jak fotodioda czy sensor AE. Zdjęcia w świetle widzialnym i podczerwieni wykonywane mogą być również kamerą szybkoobrotową (Wang i in. 2020).

Do analizy zebranych zdjęć coraz częściej wykorzystuje się wizję komputerową. Wizja komputerowa (ang. CV – Computer Vision) jest dziedziną nauki, która pozwala maszynie „zrozumieć” analizowany obraz, a nie tylko go przetworzyć. Interpretacja obrazu przez maszynę przedstawia się jako możliwość klasyfikacji obrazu, generowanie nowych obrazów na podstawie poprzednich, detekcja obiektu czy określenie pozycji i orientacji obiektu na obrazie. Wizja komputerowa różni się od przetwarzania obrazu tym, że przetwarzanie obejmuje zestaw operacji, które zwracają zmieniony obraz bez konieczności jego głębszego zrozumienia (np. wyostrenie krawędzi, zmiana kontrastu). Często obraz jest wstępnie przetwarzany, żeby mógł zostać np. sklasyfikowany metodami wizji komputerowej.



**Rys. 10.** Proces PBF z podstawowym systemem rejestracji obrazu (Scime i Beuth 2018a).

Wizja komputerowa i przetwarzanie obrazu zyskuje na popularności z powodu rozwoju oprogramowania jak i sprzętu komputerowego. Z powodu względnie dużych rozmiarów obrazu (dwuwymiarowego) w porównaniu do sygnałów jednowymiarowych, do przetwarzania i interpretacji obrazu wymagana jest większa moc obliczeniowa. Rozwój oraz dostępność m. in. procesorów graficznych pozwala obecnie na zdecydowanie szybszą analizę danych niż było to w przeszłości. Oprogramowania otwarte (ang. „open source”) czy zamknięte (ang. „closed source”) pozwalają na łatwą implementację podstawowych rozwiązań z dziedziny przetwarzania obrazów i wizji komputerowej. Do oprogramowań typu open source zaliczyć można język programistyczny Python wraz z bibliotekami do przetwarzania obrazu OpenCV czy uczenia maszynowego TensorFlow. Jednym z oprogramowań zamkniętych jest MATLAB, który wraz z komercyjnymi dodatkami zapewnia możliwości pracy z obrazami.

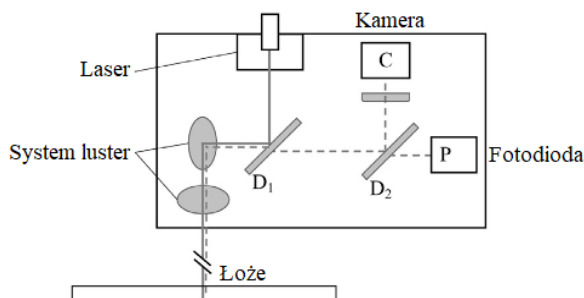
## 2. Opis zagadnienia

Fuzja proszku w łożu wykonywana jest warstwa po warstwie; na podstawie modelu 3D generowana jest ścieżka przejścia lasera lub wiązki elektronów dla każdej z warstw. Monitoring in-situ z wykorzystaniem rejestrowania obrazu obejmować może obserwację obszaru przetopu jak i całej warstwy po procesie spajania na danej warstwie oraz po przejściu ramienia rozpraszającego proszek dla kolejnej warstwy. Systemy monitoringu podzielić też można na systemy niewspółosiowe (Rys. 10) oraz systemy współosiowe (Rys. 11). Należy zwrócić uwagę na fakt, że pomimo iż proces PBF z laserem (L-PBF) i wiązką elektronów (E-PBF) jako źródłami ciepła jest co do zasady bardzo podobny, to wykorzystanie współosiowych systemów monitoringu z wiązką elektronów nie jest możliwe z powodu cewki odginającej wiązkę (Everton i in. 2016). Wykorzystywanie obrazów jako źródła informacji może wystąpić również po procesie PBF, gdzie przy wykorzystaniu tomografii komputerowej lub obrazowania ciemnego pola neutronowego można zaobserwować defekty (Klein i in. 2021) lub mikrostruktury materiału (Bacak i in. 2020) powstałe podczas procesu druku.

Wykorzystanie wizji komputerowej i przetwarzania obrazu przebiega w sposób przedstawiony na Rys. 12. Rejestracja obrazów może się odbywać na różnych etapach procesu, także po jego zakończeniu. Przetwarzanie obejmuje operacje takie jak transformacje perspektywy, redukcje szumów, wykrywanie krawędzi, progowanie (binaryzacja). Na podstawie przetworzonych obrazów można już wyciągnąć pewne wnioski, natomiast obrazy mogą być wykorzystane jako zbiór danych do przygotowania algorytmu klasyfikującego.

Podstawowymi algorytmami klasyfikującymi obrazy są konwolucyjne sieci neuronowe (ang. CNN – Convolutional Neural Network). Innymi metodami, które mogą być stosowane są: histogram zorientowanych gradientów (ang. HOG – Histogram of Oriented Gradients) lub model worka ze słowami (ang. BoW – bag-of-words model) (Caggiano i in. 2019; Scime i Beuth 2018b). Konwolucyjne sieci neuronowe są grupą modeli, które wykorzystywane są w uczeniu głębokim (ang.

Deep Learning) i pozwalają na zrozumienie interpretowanego obrazu i wyciągnięcie z niego cech charakterystycznych (ang. „feature extraction”) za pomocą warstw konwolucyjnych. Zależnie od architektury CNN, sygnałem wejścia może być obraz składający się z dowolnej ilości kanałów. Najbardziej popularnym rozwiązaniem jest użycie obrazu jednokanałowego (czarno-biały) lub trzykanałowego (obraz kolorowy z kanałem czerwonym, zielonym i niebieskim).



Rys. 11. Współosiowy system rejestracji obrazu (Gutknecht i in. 2021).



Rys. 12. Wykorzystanie przetwarzania obrazów i wizji komputerowej w procesie PBF.

Obraz wejściowy możemy opisać jako macierz  $\mathbf{x}$ . Operacja konwolucji może być zdefiniowana jako mnożenie filtra  $\mathbf{w}$ , gdzie  $\mathbf{w} \in \mathbf{R}^{F_{L1} \times F_{L2}}$ .  $\mathbf{R}^{F_{L1} \times F_{L2}}$  określa warstwę konwolucyjną o rozmiarze filtra  $L1 \times L2$ . Cecha, która jest uczona, obliczana jest następująco:

$$z = \varphi(\mathbf{w}^T \mathbf{x} + b)$$

gdzie  $\mathbf{b}$  jest stałą, a  $\varphi$  nieliniową funkcją aktywacji. Przykładową funkcją aktywacji może być funkcja ReLU (ang. Rectified Linear Activation):

$$\varphi(x) = \max(0, x)$$

Po przeliczeniu obrazu przez warstwę konwolucyjną, dochodzi do redukcji wymiarowości dzięki warstwie „pooling layer”. Warstwa ta wyciąga najważniejsze informacje, redukując wymiar dzięki operacjom uśredniania bądź wyciągania wartości maksymalnej. Składanie naprzemienne warstw konwolucyjnych i warstw „pooling layer” powoduje wielowarstwowość modelu. Na końcu modelu, kiedy zostały wyciągnięte cechy charakterystyczne, dodawana jest warstwa „fully-connected”, która przelicza z jaką pewnością obraz należy do danej kategorii. Wynik warstwy „fully-connected” normalizowany jest poprzez funkcję softmax, której wynik jest bezpośrednio wykorzystywany do kategoryzacji obrazu. Funkcja softmax zdefiniowana jest następująco:

$$\sigma(z_i) = \frac{e^{z_i}}{\sum_{j=1}^K e^{z_j}}$$

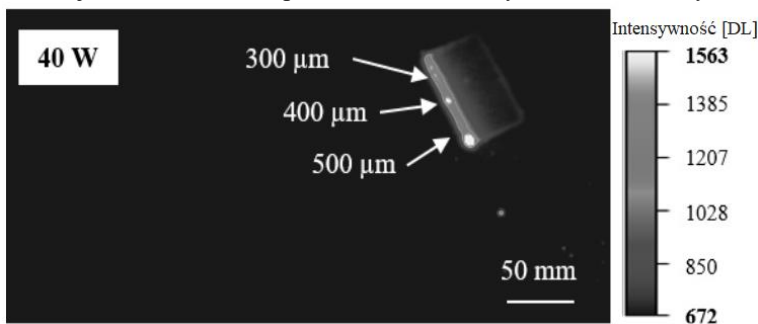
gdzie  $K$  jest ilością klas, które są klasyfikowane. Podczas procesu uczenia definiowana jest funkcja strat  $L_{opt}$ , która jest obiektem optymalizacji i dążymy do minimalizacji wartości tej funkcji (Li i in. 2020). Obecne sieci CNN, takie jak GoogLeNet pozwalają na klasyfikację nawet 1000 kategorii i mogą być wykorzystywane do douczenia się danych, które nas interesują (ang. „transfer learning”), co znacząco przyspiesza proces nauki sieci neuronowej oraz zwiększa jej dokładność.

### 3. Przegląd literatury

Jak przedstawiono w opisie problemu, rejestracja obrazu i jego analiza może zostać wykorzystana do podstawowych operacji przetwarzania obrazu, ale również i do klasyfikacji obrazu w celu jego oceny.

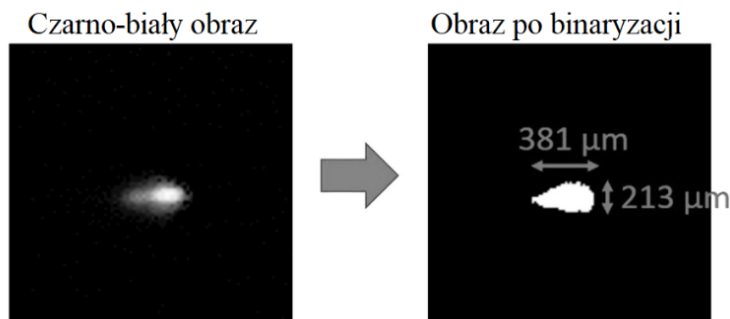
Przykładem przetwarzania obrazu może być wykorzystanie zdjęcia warstwy do porównania rzeczywistego konturu elementu z zaprojektowanym (Alhwarin i in. 2015). Badacze na podstawie zdjęcia łoża proszku przeprowadzają segmentację obrazu, określając rzeczywiste kontury. Na podstawie porównania rzeczywistego konturu z zaplanowanym, generowana jest ścieżka robota, który mógłby poprawić kontur. Na ten moment ścieżka przebiegu robota jest jedynie symulowana.

Wykorzystanie kamery termowizyjnej pozwala na analizę rozkładu temperatury i na tej podstawie określenie błędów w strukturze (Herzer i in. 2021). Przewodność cieplna spojonego i niespojonego materiału jest inna i dzięki temu, nawet po kilku warstwach, dalej widoczny jest defekt wynikający z braku ciągłości materiału. Analiza takiego zdjęcia (Rys. 13) z wykorzystaniem przetwarzania obrazu jest łatwa i w taki sposób defekt może być zaobserwowany.



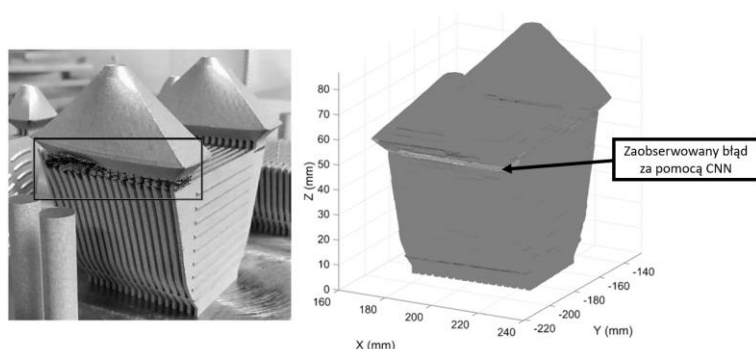
**Rys. 13.** Zdjęcie przedstawiające różnej długości defekty i ich wpływ na rozkład temperatury (Herzer i in. 2021).

Dzięki prostym operacjom przetwarzania obrazu możliwa jest również rejestracja obszaru przetopu (Le i in. 2021). Badacze wykorzystując niewspółliniowy system monitoringu z szybkołatkową kamerą i dzięki transformacji perspektywy i progowaniu obrazu są w stanie określić podstawowe parametry obszaru przetopu i porównać je do głównych parametrów druku, tj. prędkości skanowania czy mocy lasera.



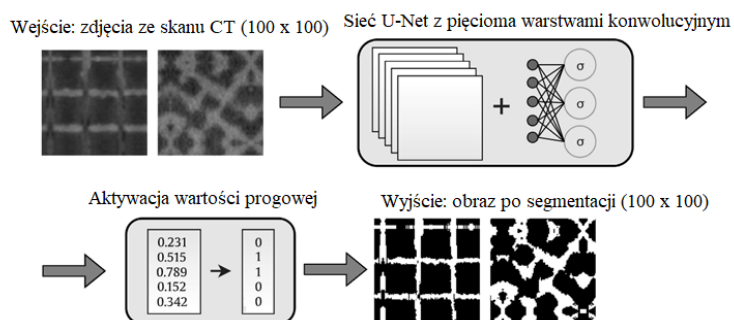
**Rys. 14.** Binaryzacja obrazu obszaru przetopu (Le i in. 2021).

Konwolucyjne sieci neuronowe zyskały na popularności z powodu wysokiej dokładności podczas klasyfikacji. Jednak z powodu dużej ilości wag, które muszą zostać zoptymalizowane, konieczna jest duża liczba danych wejściowych, rzędu  $10^5$ – $10^6$  obrazów. Zdobycie takiej ilości obrazów dla procesu PBF, nawet wykorzystując metody powiększania zbioru danych, jest bardzo czasochłonne. Rozwiązaniem takiego problemu może być wykorzystanie sieci wcześniej nauczonej na większym zbiorze, niekoniecznie takim jak nasze zagadnienie. Przykładową siecią może być: GoogLeNet lub AlexNet. Sieć GoogLeNet składa się z 22 warstw i przygotowana jest do klasyfikacji obiektów z bazy danych ImageNet, która zawiera 1000 klas i ponad  $10^6$  obrazów. Warunkiem użycia wstępnie przeszkolonej sieci jest wykorzystanie takiego samego rozmiaru danych wejściowych. W przypadku GoogLeNet jest to  $224 \times 224 \times 3$ , co oznacza, że daną wejściową musi być obraz o wymiarach  $224 \times 224$  pikseli z trzema kanałami (np. czerwonym, zielonym i niebieskim). Autorzy pracy (Scime i Beuth 2018a) wykorzystali sieć AlexNet, gdzie każdy z kanałów reprezentował inny obszar łoża. Dzięki analizie każdej z warstw wydruku, mogli stworzyć mapę obrazującą w której lokalizacji powstały błędy (Rys. 15).



**Rys. 15.** Zaobserwowany błąd druku za pomocą konwolucyjnej sieci neuronowej (Scime i Beuth 2018a).

Wizja komputerowa i przetwarzanie obrazu może być wykorzystywane nie tylko do wykrywania błędów w trakcie trwania procesu, ale również do charakteryzacji mikrostruktury (Rys. 16). W tym przypadku z powodu m. in. pozostałości proszku metalurgicznego, proste ustawienie wartości progowej, powyżej której piksel przyjmuje wartość 1, jest nieskuteczne. Konieczne jest zastosowanie sieci neuronowej, która wyznaczy prawdopodobieństwo do jakiego obszaru dany piksel należy. Segmentacja takiego typu pozwala później na stworzenie rzeczywistego modelu 3D, który może być użyty do analiz MES. Wykorzystana tutaj sieć neuronowa U-Net została wstępnie zaproponowana do segmentacji obrazów z dziedziny bioinżynierii.



**Rys. 16.** Proces segmentacji mikrostruktury części wytworzonej metodą PBF (Korshunova i in. 2020).

Pomimo tego, że przegląd ten dotyczy wykorzystania wizji komputerowej i pracy nad obrazami, należy wspomnieć, że sieci neuronowe mogą być wykorzystane również do analizy innych

sygnałów, takich jak spektrogramy, które z punktu widzenia wymiarowości i charakterystyki bardzo przypominają obraz. Podczas procesu PBF można rejestrować emisję akustyczną i na tej podstawie wygenerować spektrogram. Badania z wykorzystaniem CNN i sygnału z emisji akustycznej wykazują, że dokładność klasyfikacji jest bardzo wysoka i dla efektu bąblenia (ang. „balling effect”) dochodzi nawet do 98% (Pandiyani i in. 2022).

#### **4. Podsumowanie**

Monitoring oraz analiza zebranych danych podczas procesu PBF pozwala na wykrycie wielu błędów powstających podczas druku, jak również analizę np. mikrostruktury materiału. Manualna ocena zebranych danych jest niemożliwa z powodu zbyt dużej złożoności danych i czasu, jaki jest dopuszczalny na analizę (w przypadku metod in-situ), a także z powodu występowania błędów ludzkich. Kładziony jest więc nacisk na rozwój metod, które w sposób automatyczny oceniają zebrany materiał. Wykorzystanie metod przedstawionych powyżej może skutecznie przyczynić się do rozwiązania problemu monitoringu, co jest jednym z głównych powodów braku szerszego zastosowania procesu PBF.

Przedstawione zostały obszary procesu PBF, w których wykorzystywana jest wizja komputerowa oraz przetwarzanie obrazów. Okazuje się, że dzięki prostym metodom przetwarzania obrazu można wyznaczyć podstawowe charakterystyki obszaru przetopu, a konwolucyjne sieci neuronowe pozwalają warstwa po warstwie analizować wytwarzany element. Skuteczność konwolucyjnych sieci neuronowych została potwierdzona źródłami, które korzystały z rozwiązań typu „open source” oraz oprogramowania komercyjnego.

Z powodu coraz większego zainteresowania sieciami neuronowymi i ich zastosowaniu w klasyfikacji obrazów opisany został podstawowy schemat budowy typowej konwolucyjnej sieci neuronowej. Przyniesione prace wskazują na potrzebę rozwoju autonomicznych metod monitoringu oraz analizy danych zebranych podczas procesu PBF.

#### **5. Literatura**

- Alhwarin F, Ferrein A, Gebhardt A i in. (2015) Improving additive manufacturing by image processing and robotic milling. IEEE International Conference on Automation Science and Engineering, IEEE Computer Society, 924–929.
- Bacak M, Valsecchi J, Čapek J i in. (2020) Neutron dark-field imaging applied to porosity and deformation-induced phase transitions in additively manufactured steels. *Materials and Design* 195.
- Caggiano A, Zhang J, Alfieri V i in. (2019) Machine learning-based image processing for on-line defect recognition in additive manufacturing. *CIRP Annals* 68(1): 451–54.
- Everton, Sarah K. i in. 2016. „Review of in-situ process monitoring and in-situ metrology for metal additive manufacturing”. *Materials and Design* 95: 431–45.
- Gutknecht K, Cloots M, Sommerhuber R i in. (2021) Mutual comparison of acoustic, pyrometric and thermographic laser powder bed fusion monitoring. *Materials and Design* 210.
- Herzer F, Abraham F, Tammer C i in. (2021) Detection of Defects in Solidified Layers within Laser-based Powder Bed Fusion using Active Thermography. *Procedia CIRP*, 518–523.
- Klein J, Jaretzki M, Schwarzenberger M i in. (2021) Automated porosity assessment of parts produced by Laser Powder Bed Fusion using Convolutional Neural Networks. *Procedia CIRP*, 1434–1439.
- Kleszczynski S, Sehr J, Witt G i in. (2012) Error Detection in Laser Beam Melting Systems by High Resolution Imaging. *Proceedings of the Twenty Third Annual International Solid Freeform Fabrication Symposium*.
- Korshunova N, Jomo J, Lékó G i in. (2020) Image-based material characterization of complex microarchitected additively manufactured structures. *Computers and Mathematics with Applications* 80(11): 2462–2480.
- Le TN, Lee MH, Lin ZH i in. (2021) Vision-based in-situ monitoring system for melt-pool detection in laser powder bed fusion process. *Journal of Manufacturing Processes* 68: 1735–1745.



- Li X, Siahpour S, Lee J i in. (2020) Deep learning-based intelligent process monitoring of directed energy deposition in additive manufacturing with thermal images. *Procedia Manufacturing*, 643–649.
- Pandiyani V, Drissi-Daoudi R, Shevchik S i in. (2022) Deep transfer learning of additive manufacturing mechanisms across materials in metal-based laser powder bed fusion process. *Journal of Materials Processing Technology* 303.
- Scime L, Beuth J (2018a) A multi-scale convolutional neural network for autonomous anomaly detection and classification in a laser powder bed fusion additive manufacturing process. *Additive Manufacturing* 24: 273–286.
- Scime L, Beuth J (2018b) Anomaly detection and classification in a laser powder bed additive manufacturing process using a trained computer vision algorithm. *Additive Manufacturing* 19: 114–126.
- Wang C, Tan XP, Tor SB i in. (2020) Machine learning in additive manufacturing: State-of-the-art and perspectives. *Additive Manufacturing* 36: 101538

## 14. Woda plazmowana – jej właściwości i zastosowanie

Plasma water - its properties and application

Paulina Siedlecka<sup>(1)</sup>, Jolanta Małajowicz<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

<sup>(2)</sup> Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: dr inż. Jolanta Małajowicz

Słowa kluczowe: plazma niskotemperaturowa, drobnoustroje, konserwacja żywności

### Streszczenie

Trend na wykorzystywanie alternatywnych produktów opartych na plazmie (np. woda plazmowana - ang. plasma-activated water, PAW), wkroczył w wiele dziedzin nauki. W ciągu ostatnich kilkunastu lat woda plazmowana intryguje naukowców na całym świecie. Według danych z PubMed'u, w latach 2014-2021 obserwowana jest wyraźna tendencja rosnąca, jeśli chodzi o ilość publikacji związanych z tą tematyką. Cała rzesza pozytywow PAW, pozwoliła jej zyskać miano „świętej wody”. W związku z tym, intensywnie prowadzone są badania na temat jej potencjalnego wykorzystania w medycynie, biotechnologii, ogrodnictwie, rolnictwie i technologii żywności. Poniższy tekst jest przeglądem aktualnej literatury, opisującym właściwości wody plazmowanej oraz zwracającym uwagę na jej różnorodne potencjalne wykorzystanie m.in. biologiczne, a przede wszystkim ocenę oddziaływania na mikroorganizmy.

### 1. Wstęp

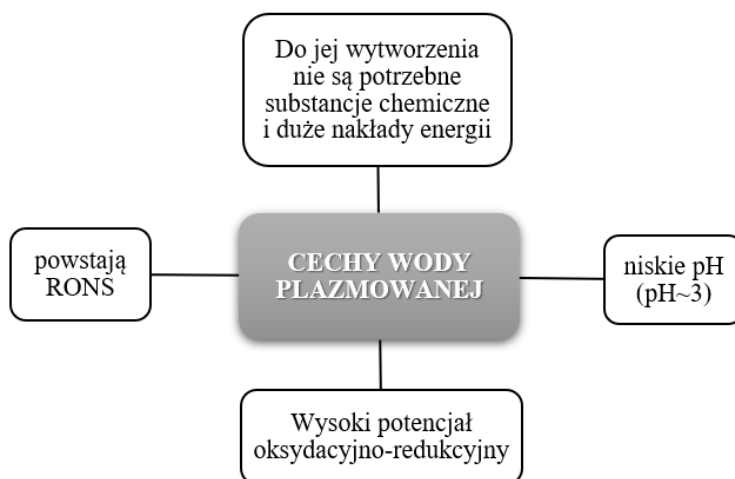
Woda aktywowana plazmą (ang. plasma-activated-water - PAW), określana także mianem wody plazmowanej, wody uzdatnianej plazmą, tworzona jest poprzez poddanie wody działaniu nietermicznej plazmy (czwarty stan skupienia materii). Aktualnie prowadzone badania dotyczą dwóch głównych metod otrzymywania wody uzdatnianej plazmą, w których wyładowania plazmy następują nad powierzchnią roztworów, bądź wytworzenie plazmy ma miejsce bezpośrednio w cieczy. Wyładowania plazmowe generowane w fazie gazowej, stykającej się z powierzchnią wody są najczęściej stosowaną metodą. Plazma wytwarzana jest w pewnej odległości od powierzchni roztworu i nie ma bezpośredniego kontaktu z cieczą. W przypadku drugiej metody, plazma generowana jest w roztworze, co wymaga silniejszego pola elektrycznego i skutkuje podwyższeniem temperatury roztworu, a zatem wymusza konieczność chłodzenia (Mai-Prochnow i in. 2021).

Aktywność biologiczna wody plazmowanej związana jest głównie ze stężeniem reaktywnych form tlenu i azotu, powstających głównie w fazie wodnej, rzadziej na granicy fazy ciekłej i gazowej. Wytwarzanie tych indukowanych plazmowo form reaktywnych zależne jest od szeregu parametrów, m.in. rodzaju gazu nośnego, konfiguracji elektrod, przyłożonego napięcia i jego polaryzacji, czasu działania plazmy, objętości roztworu i jego składu (Zhou i in. 2020).

Plazmowe uzdatnianie wody przyczynia się do jej zakwaszenia (pH~3), wzrostu potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, przewodności oraz powstawania reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS), wspólnie określanych mianem RONS (z ang. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*) (Rys.1). W rezultacie PAW ma inny skład i właściwości fizykochemiczne niż tradycyjna woda. Głównymi reaktywnymi formami w wodzie plazmowej są: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenuk wodoru, ozon, tlenek azotu czy nadtlenoazotyn (Chen i in. 2018; Kaushik i in. 2018; Zhou i in. 2020; Mai-Prochnow 2021). Zgodnie z danymi literaturowymi, przewodność elektryczna wody plazmowanej jest bezpośrednio związana z jej kwasowością. Im niższe jest pH roztworu, tym wyższa jest przewodność, co związane jest z większą ruchliwością jonów H<sup>+</sup> w porównaniu do jonów hydroksylowych. Ponadto wskazuje się również na zależność przewodności roztworu od mocy wyładowań plazmy – im większa jest moc wyładowań, tym niższe uzyskuje się wartości przewodności elektrycznej (Anderson i in. 2016).

Na terenie Polski woda plazmowana nie podlega sprzedaży w marketach, dyskontach ani innych rodzajach sklepów. Uregulowań prawnych dotyczących użytkowania wody plazmowanej w

Polsce na dzień dzisiejszy nie ma. Opisywaną wodę można na ten moment nabyć jedynie u producenta do celów naukowych lub prywatnych (Oszczęda 2022).



**Rys. 1.** Główne cechy wody aktywowanej plazmą.

## 2. Kierunki zastosowań wody plazmowanej

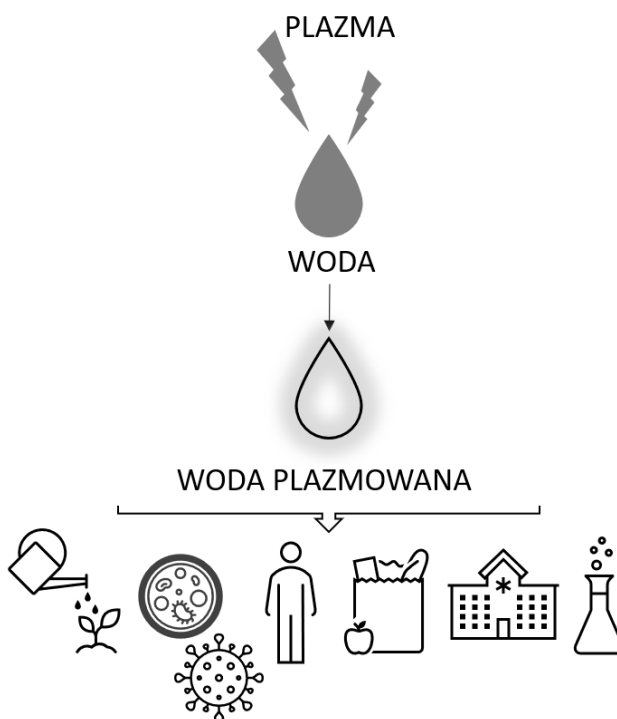
Z uwagi na posiadane unikatowe właściwości, woda plazmowana znajduje potencjalne zastosowanie w medycynie i wielu gałęziach przemysłu (Rys.2).

Badania naukowe wskazują na właściwości lecznicze i biobójcze PAW. Su i in. (2018) wykazali, iż woda plazmowana posiada zdolność inaktywacji m.in. wirusa pomoru drobiu (ang. *Newcastle disease, ND*) – zakaźnej choroby ptasiej. Obecne w wodzie reaktywne formy tlenu i azotu (RONS) mogą bowiem wchodzić w interakcje z węglowodanami, białkami, doprowadzać do peroksydacji lipidów, inicjować zmiany w wiązaniach chemicznych i strukturze molekularnej cząsteczek. Skutkuje to modyfikacjami w strukturze wirusa, dochodzi do uszkodzenia i/lub degradacji niektórych białek i mutacji kwasu rybonukleinowego. Przyjmuje się, że niskie pH wody, w której obecne są RONS, przyczynia się do synergii w działaniu, co skutkuje zwiększoną aktywnością biobójczą (Zhou i in. 2020).

Stosowanie plazmy niskotemperaturowej może stanowić również alternatywę dla konwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych. Efekt antykancerogeny przypisywany jest również obecności RONS, które wspomagają apoptozę komórek nowotworowych. Tanaka i in. (2015) oraz Zhou i in. (2020) donoszą, iż roztwory poddane działaniu plazmy są skuteczne w walce z nowotworami skóry (w tym czerniakiem), glejakiem, rakiem jajnika, guzem mózgu, rakiem żołądka, piersi czy płuc. PAW wykazuje także wysoką skuteczność w przypadku nowotworów rozsianych. Ponadto, obniża regulację licznych szlaków sygnałowych przeżycia i proliferacji komórek, np. szlaku sygnałowego PI3K/AKT oraz Ras/MAPK (Tanaka i in. 2015).

W literaturze pojawiają się także wzmianki o zastosowaniu wody plazmowanej w stomatologii. Jak podaje WHO, choroby przyzębia oraz próchnica zębów są jednym z najistotniejszych globalnych problemów zdrowia jamy ustnej, stanowiących główną przyczynę utraty zębów. Aktualne badania rekomendują stosowanie antybakteryjnych płynów do płukania jamy ustnej na bazie wody aktywowanej plazmą. Li i in. (2017) udowodnili skuteczność PAW w inaktywacji trzech patogenów jamy ustnej, powiązanych z chorobami przyzębia (*Porphyromonas gingivalis*) i próchnicą (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*). Naukowcy sugerują, iż reaktywne formy związków występujące w wodzie mogą powodować zmiany w błonach komórkowych bakterii, prowadząc do wycieku białka i wewnątrzkomórkowego DNA. Dodatkowo zasugerowano, że PAW może stać się obiecującym nowym składnikiem preparatów do wybielania zębów (Zhou i in. 2020).

Liczne wzmianki literaturowe dotyczą wykorzystania PAW w rolnictwie, ogrodnictwie, dziedzinach powiązanych w fizjologią roślin (stymulowanie kiełkowania nasion, poprawa wzrostu roślin) (Kaushik 2018; Bradu i in. 2020; Zhou i in. 2020). Ponownie, olbrzymią rolę odgrywają RONS powstające na skutek działania plazmy. Są one aktywne w szlakach sygnałowych roślin, regulujących procesy metaboliczne, reakcję na stres itp. (Bradu i in. 2020). Thirumdas i in. (2018) sygnalizują zdolność wody plazmowanej do hamowania hormonów odpowiedzialnych za spoczynek nasion. Autorzy wskazują, iż moczenie nasion roślinnych w wodzie uaktywnionej plazmą chroni je przed bakteriami patogennymi i jednocześnie intensyfikuje kiełkowanie. Ci sami autorzy wspominają, że obecne w roztworach jony azotanowe są wchłaniane przez korzenie roślin, stanowią źródło tego pierwiastka i przyczyniają się do intensyfikacji wzrostu roślin. Zhou i in. (2020) opisali pozytywny wpływ wody plazmowanej na kiełkowanie nasion i wzrost siewek fasoli złotej. Są również wzmianki o pozytywnym wpływie PAW na przyrost rozmiaru roślin takich jak pomidor (*Solanum lycopersicum*), rzodkiewka (*Raphanus sativus*), fasola wielokwiatowa (*Phaseolus coccineus*) czy arbuz (*Citrullus lanatus*) (Park i in. 2013). W 2015 roku grupa japońskich naukowców prowadziła szeroko zakrojone badania z udziałem wody plazmowanej na truskawkach (*Fragaria ananasa*). W trakcie trwającego 63 dni eksperymentu zauważono, iż sadzonki roślin podlewane wodą plazmowaną były o ok. 5 cm większe, w stosunku do równolegle prowadzonej hodowli kontrolnej. Dodatkowo, ocena części jadalnych wykazała, iż zawartość cukru w owocach z uprawy PAW była o ok. 40% wyższa (Takahata i in. 2015). Zauważono również możliwość stosowania PAW jako środka ochronnego upraw przed grzybami pojawiającymi się po zbiorach (Kaushik i in. 2018).



**Rys. 2.** Schemat obrazujący przykładowe zastosowanie wody plazmowanej (PAW).

Skażenie mikrobiologiczne produktów żywnościowych, zarówno świeżych, jak i paczkowanych to nadrzędny czynnik wpływający na bezpieczeństwo żywności. Z uwagi na bogaty skład oraz sposób produkcji, żywność jest wysoce podatna na zanieczyszczenia mikrobiologiczne na każdym etapie produkcji, magazynowania i obrotu handlowego. Powoduje to nie tylko straty ekonomiczne, ale przede wszystkim stwarza realne zagrożenie dla zdrowia. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) oszacowała, iż blisko 600 milionów ludzi rocznie doświadcza chorób związanych

ze zjedzeniem skażonej żywności (Internet 1). Rosnące zapotrzebowanie przemysłu na nowe technologie utrwalania żywności (szczególnie nietermiczne) sprawiły, iż metody z udziałem zimnej plazmy stały się interesującą alternatywą. Z racji swojego działania biobójczego, PAW może być stosowana do inaktywacji mikroorganizmów znajdujących się w żywności, czy utrzymywania właściwej jakości owoców po zbiorze (Zhou i in. 2020). Ma i in. (2015) wskazali na skuteczność wody utrwalanej plazmą niskotemperaturową w dekontaminacji *S. aureus* znajdującego się na truskawkach, bez wywołania znaczących zmian w kolorze, jędrności i pH owoców. Ponadto odnotowano, iż po zastosowaniu PAW nie obserwowano zmian grzybiczych w trakcie przechowywania truskawek. Zbliżone badania przeprowadzono również na pieczarkach, oceniając efekt działania wody plazmowanej na konserwację pozbiorną grzybów. Ustalono, iż traktowanie pieczarek PAW zmniejszyło liczbę drobnoustrojów, w okresie tygodniowego przechowywania. Ponadto odnotowano zahamowanie mięknięcia grzybów, względem próby kontrolnej (Xu i in. 2016). Najnowsze badania dotyczą wykorzystania PAW w utrwalaniu produktów mięsnych. Zhao i in. (2020) wykazali potencjał wody plazmowanej w niszczeniu drobnoustrojów w świeżym mięsie wołowym, bez wywoływania negatywnych zmian w jego kolorze, teksturze i kwasowości. Badania potwierdzają, że woda plazmowana może być alternatywą do nadmiernie stosowanych azotanów i azotynów w konserwacji mięs (Jung i in. 2017).

Cenną właściwością wody plazmowanej jest jej potencjalna zdolność do rozkładu pozostałości antybiotyków i pestycydów w wodzie i opakowaniach, o czym wspomina Sharma i in. (2021). PAW z powodzeniem stała się środkiem myjącym i dezynfekującym powierzchnię warzyw i owoców, bez negatywnego wpływu na ich jakość, teksturę, parametry sensoryczne, wartości odżywcze, ludzkie zdrowie jak również środowisko (Kaushik i in. 2018; Sharma i in. 2021).

### **3. Działanie wody plazmowanej na komórki mikroorganizmów**

Mikroorganizmy lokalizowane są we wszystkich możliwych środowiskach na świecie. Liczne drobnoustroje zaliczane są do patogenów, szkodzących roślinom, zwierzętom i przede wszystkim ludziom. Warto zwrócić uwagę na temat powszechnie występujących biofilmów. Biofilmy określane są jako zbiorowiska komórek drobnoustrojów, będących w bliskim sąsiedztwie i zawieszonych w strukturze składającej się z samodzielnie wytwarzanych zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych – EPS (ang. *Extracellular polymeric substances*) (Flemming i in. 2016). Dzięki tworzeniu zazwyczaj mieszanych pod kątem gatunkowym społeczności, biofilmy wykazują większą oporność na preparaty przeciwdrobnoustrojowe (Mai-Prochnow i in. 2021). Biofilmy bakteryjne zasiedlają różnorodne powierzchnie – występują w przyrodzie, jak i lokalizowane są na elementach codziennego użytku (np. dno psiej miski), na żywności czy wyrobach i sprzętach medycznych. Owe struktury są niepożądaną, a ich eliminacja z różnych powierzchni, szczególnie medycznych, jest nie lada wyzwaniem. Wielu autorów dowodzi, iż PAW posiadają działanie przeciwbakteryjne czy antibiofilmowe (Chen i in. 2017; Chen i in. 2018; Mai-Prochnow i in. 2021). Mai-Prochnow i inni twierdzą, że to różne RONS, wytwarzane podczas powstawania PAW wywierają głęboki wpływ na pojedyncze komórki mikroorganizmów - składowe biofilmu, przez co zaburzają jego strukturę np. rozrywając matrycę biofilmu. Skutkuje to uwolnieniem się bakterii w formie planktonicznej, co czyni je bardziej podatnymi na usmiercenie i usunięcie z powierzchni. Julák i in. (2012) wykazali możliwość stosowania wody aktywowanej plazmą, jako środka do zabijania bakterii m.in. *Staphylococcus epidermidis* w cieczech. Autorzy podkreślają przede wszystkim rolę kwasowego środowiska oraz wolnych rodników w działaniu mikrobiobójczym wody, powodującym uszkodzenia DNA, białek komórkowych (Julák i in. 2012; Traylor i in. 2011; Kaushik i in. 2018). Kamgang-Youbi i in. udowodnili, że około 80% bakterii Gram-ujemnych *H. alvei* zostało wyeliminowanych po zastosowaniu PAW, natomiast drożdże *Saccharomyces cerevisiae* charakteryzowały się wyższą opornością na PAW, najprawdopodobniej z powodu bardziej złożonej struktury komórkowej u eukariontów. We wcześniejszym rozdziale wspomniano także o innych pozytywnych aspektach stosowania wody plazmowanej, w kontekście zwalczania drobnoustrojów. W tabeli zbiorczej (Tab.1) zestawiono przykładowe odkrycia działania wody aktywowanej plazmą na mikroorganizmy.

**Tab. 1.** Zestawienie wyników badań naukowych dotyczących wpływu wody plazmowanej (PAW) na mikroorganizmy i biofilmy.

Wpływ wody plazmowanej na mikroorganizmy i biofilmy	Źródło
Zaburzenie struktury biofilmu, poprzez interakcję ze składnikami biofilmu	Mai-Prochow i in. 2021
Inaktywacja <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> i <i>Candida albicans</i>	Julák i in. 2012
Zmniejszenie żywotności komórek <i>E. coli</i> o blisko 5 jednostek logarytmicznych	Traylor i in. 2011
Redukcja populacji <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Hafnia alvei</i> i drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kamgang-Youbi i in. 2009
Ochrona przed mikroorganizmami patogenicznymi roślin i upraw	Thirumdas i in. 2018 Kaushik i in. 2018
Zwalczanie patogenów jamy ustnej tj. <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> i <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Li i in. 2017
Eliminacja szkodliwych bakterii na produktach spożywczych, owocach, warzywach czy mięsie	Jung i in. 2017 Kaushik i in. 2018 Zhou i in. 2020 Sharma i in. 2021

#### 4. Podsumowanie

Wyjątkowe właściwości fizykochemiczne, biochemiczne i biologiczne wody poddawanej działaniu plazmy niskotemperaturowej przykuwają uwagę coraz większej liczby badaczy i jednostek przemysłowych. Dotychczasowe badania prowadzone z użyciem wody aktywowanej plazmą dowodzą, że można uznać PAW za obiecujące rozwiązanie do wielu zastosowań, m.in. biomedycznych (dekontaminacja sprzętu i powierzchni medycznych), biologicznych czy biotechnologicznych. Sama produkcja wody uaktywnionej przy pomocy plazmy nie wykorzystuje substancji chemicznych, nie prowadzi do emitowania CO<sub>2</sub> czy substancji szkodliwych, jest zrównoważona i energooszczędna, zatem stanowi przykład metody przyjaznej środowisku. Pomimo licznych pozytywnych efektów omawianej wody, nie są dobrze poznane negatywne skutki jej wpływu na organizmy żywe, co powinno być przedmiotem przyszłych badań.

#### 5. Literatura

- Anderson CE, Cha NR, Lindsay AD i in. (2016) The role of interfacial reactions in determining plasma-liquid chemistry. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 36: 1393-1415.
- Bradu C, Kutasi K, Magureanu M i in. (2020) Reactive nitrogen species in plasma-activated water: generation, chemistry and application in agriculture. *Journal of Physics D* 53: 223001.
- Chen TP, Liang J, Su, TL (2018) Plasma-activated water: antibacterial activity and artifacts?. *Environmental science and pollution research international* 25(27): 26699–26706.
- Chen TP, Su TL, Liang JF (2017) Plasma-activated solutions for bacteria and biofilm inactivation. *Current Bioactive Compounds* 13(1): 59–65.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U i in. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews. Microbiology* 14(9): 563-75.
- Internet 1: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (dostęp 25.05.2022)
- Julák J, Scholtz V, Kotúčová S, Janoušková O (2012) The persistent microbicidal effect in water exposed to the corona discharge. *Phys Med* 28(3):230–239

- Jung S, Lim Y, Choe W i in. (2017) Direct infusion of nitrite into meat batter by atmospheric pressure plasma treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 39: 113-118.
- Kamgang-Youbi G, Herry JM, Meylheuc T i in. (2009) Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. *Letters in Applied Microbiology* 48(1): 13–18.
- Kaushik NK, Ghimire B, Li Y i in. (2018) Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biological chemistry* 400(1): 39-62.
- Li Y, Pan J, Ye G i in. (2017) In vitro studies of the antimicrobial effect of non-thermal plasma-activated water as a novel mouthwash. *European journal of oral sciences*, 125(6), 463–470.
- Ma R, Wang G, Tian Y i in. (2015) Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *Journal of Hazardous Materials* 30: 643-651.
- Mai-Prochnow A, Zhou R, Zhang T i in. (2021) Interactions of plasma-activated water with biofilms: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. *NPJ Biofilms Microbiomes* 7(1): 11.
- Oszczęda Z: Woda po obróbce plazmą – nanowoda, <https://www.nantespharma.pl/produkt/woda-plazmowana-z-podwyzszona-zawartoscia-tlenu-singletowego-5l/> (dostęp 05.05.2022)
- Park D, Davis K, Gilani S i in. (2013) Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. *Current Applied Physics* 13: 19–29.
- Sharma H, Patel A, Pal M (2021) Effect of Plasma Activated Water (PAW) on Fruits and Vegetables. *American Journal of Food and Nutrition* 9(2): 60-68.
- Su X, Tian Y, Zhou H i in. (2018) Inactivation Efficacy of Nonthermal Plasma-Activated Solutions against Newcastle Disease Virus. *Applied and environmental microbiology* 84(9): e02836-17.
- Takahata J, Takaki K, Satta N I in. (2015) Improvement of growth rate of plants by bubble discharge in water. *Japanese Journal of Applied Physics* 54(1S): 01AG07.
- Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K i in. (2015) Plasma with high electron density and plasma-activated medium for cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* 3(2): 72-76.
- Thirumdas R, Kothakota A, Annapure U i in. (2018) Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology* 77: 21-31.
- Traylor MJ, Pavlovich MJ, Karim S i in. (2011) Long-term antibacterial efficacy of air-plasma-activated water. *Journal of Physics D: Applied Physics* 44(47): 472001.
- Xu Y, Tian Y, Ma R i in. (2016) Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Food Chemistry* 197: 436-444.
- Zhou R, Zhou R, Wang P i in. (2020) Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of Physics D* 53: 303001.

## **15. Problematyka wyboru drukarki 3D dla metali na podstawie analizy literatury**

Selection of a 3D printer for metals on the basis of literature analysis

Skrzek Kinga<sup>(1)</sup>, Dybała Bogdan<sup>(1)</sup>, Emilia Mazgajczyk<sup>(1)</sup>, Mariusz Hetmańczyk<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Katedra Technologii Laserowych, Automatykacji i Organizacji Produkcji, Wydział mechaniczny, Politechnika Wrocławska

<sup>(2)</sup> Katedra Automatykacji Procesów Technologicznych i Zintegrowanych Systemów Wytwarzania, Wydział mechaniczny, Politechnika Śląska

Kinga Skrzek: kinga.skrzek@pwr.edu.pl

Słowa kluczowe: technologie przyrostowe, analiza, optymalizacja

### **Streszczenie**

W artykule opisane zostały problemy jakie są stawiane przed przedsiębiorcami zdecydowanymi na wdrożenie technologii przyrostowych w firmach produkcyjnych. Zwrócono uwagę na aspekty wdrożeniowe i ekonomiczne związane z wyborem odpowiedniej technologii przyrostowej, wymagania materiałowe oraz zastosowanie. Następnie opisane zostały najpopularniejsze technologie druku 3D (SLM i EBM). Przedstawiono rozwiązania stosowane na światowym rynku przemysłu produkcyjnego.

### **1. Wstęp**

Technologie przyrostowe zyskują coraz większą popularność oraz zastosowanie w polskim przemyśle produkcyjnym. Najpopularniejszą z nich jest FDM/FFF (ang. Fused Deposition Modelling/Fused Filament Fabrication), w której termoplastyczny materiał (filament) nakładany jest warstwa po warstwie na stół roboczy tworząc fizyczny obiekt na podstawie komputerowego modelu (Kießling et. al 2000). W przypadku wytwarzania przyrostowego z metali podobieństwo polega na nakładaniu materiału (proszku metalu) warstwa po warstwie do momentu wykonania całego elementu. Natomiast różnice polegają na rodzaju stosowanego materiału oraz sposobie jego łączenia. W zależności od technologii łączenie najczęściej przebiega za pomocą wiązki elektronów (np. EBM - Electron Beam Melting) lub lasera (np. SLM - Selective Laser Melting). Różnice dotyczą nie tylko sposobu łączenia ze sobą materiału, ale także budowy urządzeń drukujących oraz kosztów ich użytkowania.

Nieustanne zainteresowanie technologiami przyrostowymi wymusiło na producentach materiałów realizację kolejnych projektów badawczo-rozwojowych. Nowoczesne materiały zapewniają podobne do tradycyjnych technologii parametry wytrzymałościowe (Symes et. al 2012).

### **2. Potrzeby produktowe**

Wytwarzanie przyrostowe nie zastąpi tradycyjnej produkcji elementów, lecz będzie jej uzupełnieniem w uzasadnionych przypadkach. Najczęściej technologie druku 3D wykorzystuje się do:

- wytwarzania małych serii produktowych,
- wytwarzania części na zapas zastępując tradycyjny proces produkcji.

W zależności od przeznaczenia analizie należy poddać komputerowy model bryłowy oraz dobrać materiał i technologię wykonania. W każdej technologii występuje post-processing, czyli dodatkowa obróbka najczęściej mechaniczna polega na usunięciu struktur podporowych, zmiany właściwości mechanicznych lub wizualnych (4. Wittbrodt et. al 2013; Mazgajczyk et. al 2014). Elementy wykonane za pomocą drukarek 3D są użytkowane, a w ostatniej fazie powinny zostać poddane procesowi recyklingu.

Przedstawiony powyżej proces ze względów ekonomicznych jest opłacalny w następujących przypadkach:



- wykonaniu elementów o skomplikowanej geometrii (ażurowej),
- personalizacji produktu (np. implanty wykorzystywane w medycynie),
- wykonaniu elementów na indywidualne potrzeby/zamówienie klienta.

Najczęściej wykorzystuje się technologie przyrostowe do wykonywania części zamiennych, w celu zapewnienia np. ciągłości pracy linii produkcyjnej. Cechą charakterystyczną tego rodzaju zastosowań jest wykonywanie w warunkach produkcji jednostkowej lub małoseryjnej. Innym przykładem są elementy wykonane w celu produkcji elementów w szybki i elastyczny dla użytkownika sposób. Trzecim przykładem są produkty spersonalizowane, zwiększające kompleksowość konstrukcji lub funkcjonalność produktu. Ostatnim zastosowaniem są elementy produkowane masowo biorące pod uwagę upodobania klienta (Mazgajczyk et. al 2014; Shafiee and Atala 2016; Siemiński i Budzik 2015; Mandrycky et. al 2015; Ozbolat and Yu 2013).

Firma produkcyjna powinna przed rozpoczęciem procesu wdrożenia oraz przed zakupem urządzenia (drukarki 3D) określić jakie potrzeby produktowe będą zaspokajane. Każda z technologii posiada inną specyfikację techniczną, a także inne wymagania dotyczące wykorzystanych materiałów. Warto wspomnieć, że elementy wykonane za pomocą drukarki 3D mogą posiadać takie same bądź zbliżone własności wytrzymałościowe jak elementy wykonane z zastosowaniem tradycyjnych technologii wytwarzania niż części wykonane w tradycyjnej produkcji. Należy jednak wziąć pod uwagę ułożenie elementu na stole roboczym oraz wielkość cząstek materiału używanego w procesie druku 3D (Kordowska i in. 2015; Siemiński i Budzik 2015).

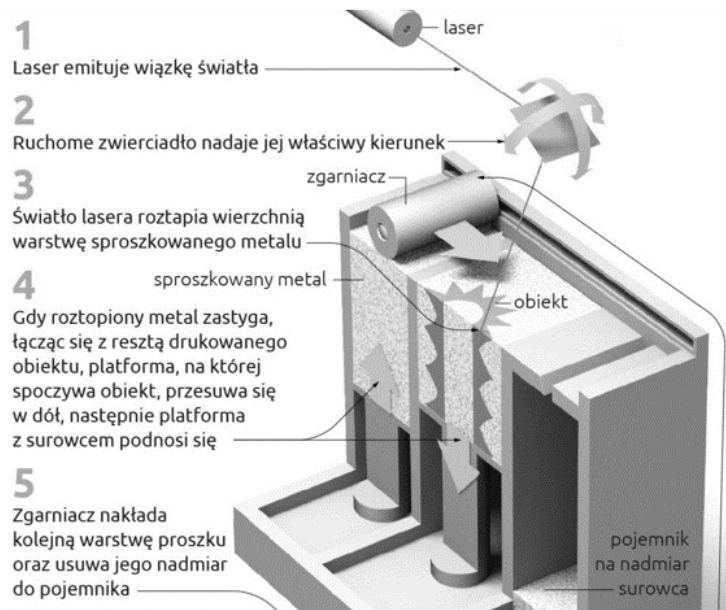
### **3. Wybór technologii**

Proces druku 3D zaczyna się od przygotowania komputerowego modelu 3D. Zmiana lub obsługa nowych programów niezbędnych do samodzielnego zamodelowania elementu może wymagać dodatkowego szkolenia dla pracowników. Warto przedyskutować z kadrą pracowniczą zmianę programów do modelowania. Innym sposobem pozyskania modelu komputerowego jest skanowanie 3D. Zakup skanera to duży wydatek (od kilku do nawet kilkuset tysięcy złotych). Do obsługi urządzenia niezbędna będzie wykwalifikowana kadra pracownicza oraz dodatkowe środki (np. preparaty matujące powierzchnię).

Po wykonaniu modelu bryłowego kolejnym ważnym krokiem jest nadanie parametrów dla urządzenia oraz wyznaczenie struktur podporowych (suportów). Zapobiegają one odkształceniu się elementu podczas procesu wytwórczego. To bardzo ważny krok często decydujący o pozytywnym zakończeniu procesu druku 3D.

Urządzenia pracujące w technologii FDM/FFF są stosunkowo tanie i często wykorzystywane przez hobbistów do wykonywania wydruków na użytek domowy, o tyle zakup drukarek 3D dla metali jest zarezerwowane jedynie dla wybranych firm lub uczelni wyższych. Koszty zakupu zaczynają się od kilkuset tysięcy złotych. Nie można zapomnieć o przystosowaniu pomieszczenia oraz zakupie urządzeń do post-processingu (obróbki cieplnej, mechanicznej, recyklingu niespieczonego proszku czy stacji do czyszczenia wydruku) (Murphy and Atala 2014; Muzalewska et. al 2014).

Do najpopularniejszych technologii przyrostowych zalicza się Selective Laser Melting, którą wykorzystuje się głównie w przemyśle lotniczym, samochodowym, centrach serwisowych, medycynie, stomatologii oraz uczelniach wyższych. Wiązka światła lasera odbijana jest przez ruchome zwierciadło. Następnie wiązka lasera spieka proszek metalu nasunięty przez zgarniacz tworząc fizyczny obiekt. Po zakończeniu spiekania warstwy platforma robocza jest opuszczana o wysokość odpowiadającą grubości warstwy, a następnie cały proces jest powtarzany. Proces druku 3D przebiega w zamkniętej komorze roboczej o osłonie gazu ochronnego, np. argonu (Kromka-Szydek i in. 2013). Po zakończeniu procesu elementy zostają oczyszczone z niespieczonego materiału, który zostaje poddany przesianiu i jest wykorzystywany ponownie do produkcji kolejnej części. Wykorzystane ponownie może zostać nawet 90% materiału. Należy pamiętać, że w tej technologii wykorzystywane są struktury podporowe, które zapobiegają deformacji elementu podczas procesu druku 3D.



**Rys. 1. Schemat technologii SLM** [źródło: <https://przemyslprzyszlosci.gov.pl/specjalistyczny-druk-3d-w-technologii-slm-z-uzyciem-stali-stopow-a-nawet-zlota-i-srebra/>].

Producenci maszyn opatentowali podobne technologie pod nazwami:

- Direct Metal Laser Melting (DMLM),
- Direct Metal Laser Sintering (DMLS).

Technologia DMLM to rodzaj stapiania łoża proszkowego, w którym wiązka lasera osiąga pełne stopienie sproszkowanego metalu, tworząc jednorodny element. W technologii DMLS spiekania (jak sugeruje nazwa) zachodzi topienie proszku metalu.

Po zakończeniu procesu druku 3D elementy podawane są obróbce cieplnej, a w niektórych przypadkach również mechanicznej. W kolejnym etapie elementy odcinane są od platformy roboczej drukarki 3D. Czynność ta nie powinna zostać wykonana wcześniej, ponieważ może spowodować deformacje wydrukowanego elementu. Post-processing może dotyczyć również poprawy właściwości wizualnych poprzez piaskowanie, szlifowanie, polerowanie lub dodawanie powłok. W celu uzyskania pożądanej dokładności wymiarowej wykorzystuje się obróbkę mechaniczną wykorzystując np. maszyny CNC.

W przypadku technologii SLM cząsteczki mają wielkość około 40µm. Przez restrykcyjne wymagania proszki metalu najczęściej wytwarzane są w procesie atomizacji gazowej lub plazmowej. Liczba dostępnych materiałów jest ograniczona. Najczęściej wykorzystywane to:

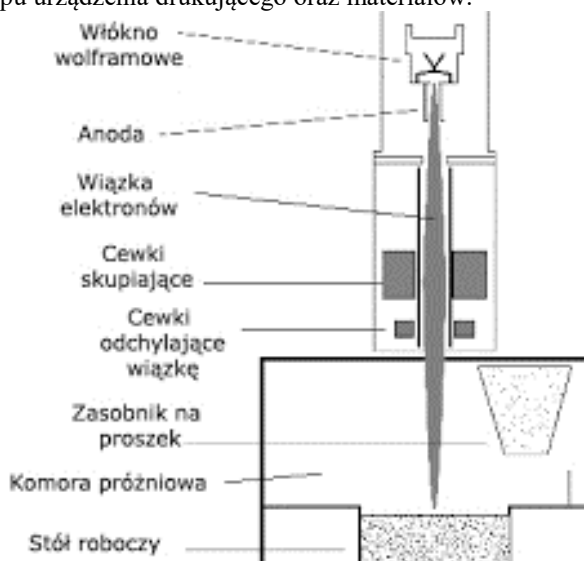
- stale narzędziowe,
- stale nierdzewne,
- stopy aluminium,
- stopy tytanu,
- stopy niklu,
- stopy kobaltu i chromu,
- stopy miedzi.

Innowacyjnym podejściem do procesu wytwarzania przyrostowego są urządzenia hybrydowe (łącznie w sobie technologię SLM oraz obrabiarkę CNC). Proces zaczyna się od druku 3D, gdzie następnie element jest obrabiany za pomocą narzędzi skrawających.

Równie popularną technologią przyrostową jest EBM (rys. 2), która wykorzystuje wiązkę elektronów do spajania ze sobą cząsteczek proszku metalu. Proces produkcyjny składa się z drukowania wstępnego oraz głównego.

Przed rozpoczęciem procesu drukowania 3D pojemnik, w którym znajduje się proszek metalu napełniany jest odpowiednim materiałem. Po wykonaniu tej czynności pojemnik zostaje umieszczony w drukarce 3D, a ciśnienie wewnętrzne jest ustawione do wartości około 0,0001 mBar. Kiedy w komorze roboczej osiągnięte jest odpowiednie ciśnienie, wiązka elektronów podgrzewa platformę roboczą do wysokich temperatur, np. wartość ta może wynosić nawet 600-700°C dla tytanu. Po podgrzaniu platformy roboczej można rozpocząć proces drukowania głównego. Rozpoczyna się on od ponownego powlekania proszkowego, które nakłada pojedynczą warstwę wstępnie ogrzanego proszku na platformę roboczą. Następnie wiązka elektronów spieka materiał. Jej kontrola przebiega przez zestaw cewek elektromagnetycznych, które precyzyjnie kierują wiązką w pożądane punkty platformy roboczej. Po ukończeniu platforma robocza jest opuszczana o jedną warstwę na wysokość. Ten proces jest powtarzany, aż do uzyskania gotowego elementu. Niewątpliwą przewagą tej technologii jest:

- szybkość wytwarzania nawet do 5 razy większa niż w przypadku technologii SLM,
- wysoka gęstość,
- recykling niespieczonego proszku metalu,
- mniejsza liczba struktur podporowych, niż w technologii SLM.
- Do wad technologii EBM można zaliczyć:
  - mniejszą precyzję drukowanych elementów w porównaniu do technologii SLM,
  - mały rozmiar platformy roboczej (maksymalnie średnica wynosi 350 mm, wysokość 380),
  - mała gama materiałowa,
  - duży koszt zakupu urządzenia drukującego oraz materiałów.



**Rys. 2.** Schemat technologii EBM [źródło: <http://www.swiatdruku3d.pl/ebm-electron-beam-melting/>].

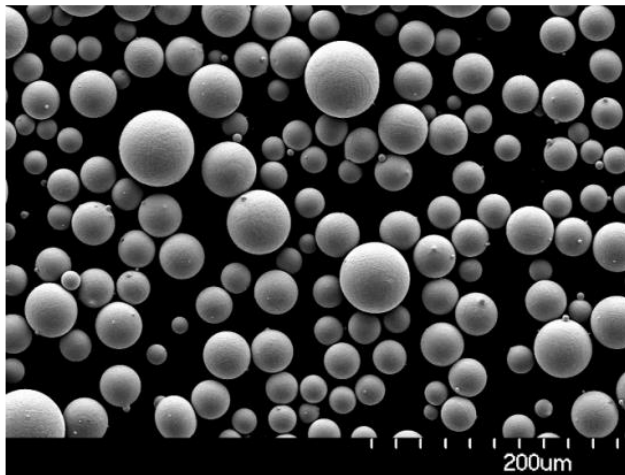
W technologii EBM wykorzystuje się materiały:

- stopy tytanu:
  - Ti Grade 2,
  - Ti6Al4V Grade 5,
  - Ti6Al4V Grade 23,
- Inconel 718,

- stop Co–Cr,
- czysta miedź.

#### 4. Weryfikacja wybranej technologii

Przed zakupem urządzenia pozwalającego na wytwarzanie elementów w technologii przyrostowej warto przeanalizować wdrożenie upewniając się, czy wszystko zostało przetestowane. Jak opisano wyżej proces druku 3D nie kończy się na wyjęciu elementu z urządzenia warto również rozważyć odpowiedni materiał oraz jego dostępność. W procesie produkcyjnym nie może zostać wykorzystany dowolny proszek metalu. Producenci zalecają jakie cechy (sferyczność, brak porowatości wewnętrznej, wielkość cząsteczek) (Kowalewski i Całka 2010).

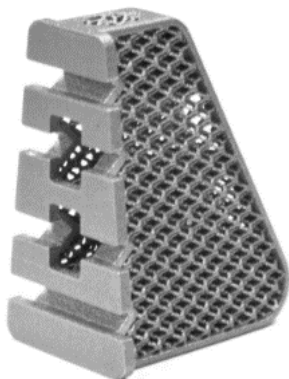


**Rys. 3.** Przykład sferycznego proszku Ni Alloy 625 15–45  $\mu\text{m}$  [źródło: <https://www.advancedpowders.com/powders/nickel/625>].

Ważnym aspektem jest geometria wytwarzanej części. W zależności od producenta dostępne są różne wymiary platform roboczych. Obecnie na rynku dostępne są urządzenia pozwalające wytwarzać elementy o maksymalnych wymiarach gabarytowych 800x400x500mm. Producenci oferują coraz dokładniejsze urządzenia, istnieje jednak zależność wraz ze wzrostem szybkości procesu wytwarzania wzrasta możliwość wykonania minimalnej grubości ścianki. Ta zależność jest związana, z szybkością druku 3D, która wymaga przetopienia większej ilości materiału w tym samym czasie (Dudek 2013). Z tego wynika, że im większa moc lasera tym większa grubość nakładanych warstw materiału. Dynamiczny rozwój technologii przyrostowych z wykorzystaniem proszków metali umożliwi wykonanie elementów z dokładnością do dziesiątych części milimetra.

Dla większości zakładów produkcyjnych zaporową barierą jest zakup urządzenia oraz przystosowanie pomieszczeń. Firmy sprzedające urządzenia nie podają na stronach internetowych cen swoich produktów oraz maszyn. Zazwyczaj cena drukarki 3D zależy od indywidualnych potrzeb klienta. Sam zakup urządzenia wiąże się z opowieścią na wiele pytań. Szacuje się, że profesjonalne drukarki 3D kosztują od około 50 000 do 1 miliona dolarów. To bardzo szeroki zakres, a ostateczna kwota zależy od technologii, rozmiaru i wydajności urządzenia drukującego. Koszty nie kończą się jedynie na zakupie drukarki 3D, to jedynie jedna część wdrożenia. Dodatkowe koszty obejmują koszty eksploatacji, konserwacji, materiałów i przetwarzania końcowego. Jeden kilogram proszku metalu kosztuje od 300 do 600 dolarów.

Należy pamiętać, że metalowe drukarki 3D nie są urządzeniami typu plug-and-play. Koszty personelu i szkolenia związane z obsługą tych maszyn są ważnymi kosztami operacyjnymi, które należy wziąć pod uwagę.



**Rys. 4.** Przykład elementu wykonanego z tytanu [źródło: <https://rcit.pl/implanty-weterynaryjne>]

## 5. Wnioski

Technologie przyrostowe nie są przeznaczone jedynie dla dużych firm produkcyjnych, jednak mają należy pamiętać o przystosowaniu zakładu produkcyjnego oraz kadry pracowniczej. Należy przed zakupem urządzenia przeanalizować zastosowanie, wybrać rodzaj materiału oraz ograniczenia związane z powierzchnią komory roboczej drukarki 3D.

Należy pamiętać o wykonaniu wydruków testowych pozwalających sprawdzić jakość wykonanej próbki, jej wytrzymałość mechaniczną oraz jakość powierzchni. Równie ważne są konsultacje z kadrą pracowniczą oraz rozmowy dotyczące jej pomysłów, a także obaw. Wdrożenie powinno zostać dokonane etapami.

## 6. Literatura

- Burleson S, Baker J, Ting Hsia A, Xu Z. (2015) Use of 3D printers to create a patient-specific 3D bolus for external beam therapy. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, 16: 166- 178
- Carlson A, Bowen AM ,Huang Y, Nuzzo RG, Rogers JA (2012) Transfer printing techniques for materials assembly and micro/nanodevice fabrication. *Adv. Mater* 24: 5284-5318.
- Dudek P (2013) FDM 3D printing technology in manufacturing composite elements. *Archives of Metallurgy and Materials*, 58 nr.4: 1415-1418.
- Kamrani A Nasr A (2010) *Engineering Design and Rapid Prototyping*. Springer-Verlag GmbH: 3-22.
- Kißling W, Renner R, Zaunseder B (2000) *Rapid Prototyping*. VDE Verlag GmbH. Berlin.
- Konopacki J (2012) Przydatność konsumenckich drukarek 3D w technologii FDM do tworzenia modeli architektonicznych. *Przestrzeń i forma*: 1865-80.
- Kordowska M, Choromańska M, Musiał W, Plichta J (2015) Druk 3D w przemyśle samochodowym. *Autobusy*: 6123-128.
- Kowalewski J, Całka R (2010) Użyteczność metody 3DP techniki szybkiego prototypowania w procesie dostosowywania broni małokalibrowej do oddawania strzałów symulowanych. *Wojskowy Instytut Techniczny Uzbrojenia*: 53-62.
- Kromka-Szydek M, Wrona M, Jędrusik-Pawłowska M (2013) Analiza wytrzymałościowa systemu Unilock 2,4 stosowanego w chirurgii szczękowo - twarzowej. *Modelowanie Inżynierskie*, nr.47: 111-122.
- Lukic´ M, Clarke J, Tuck C, Whittow W, Wells G (2016) Printability of elastomer latex for additive manufacturing or 3D printing. *J. Appl. Polym. Sci.*, 12931.
- Mandrycky C, Wang Z, Kimb K, Kima D-H (2015) 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv*, 34n.4.

- Mazgajczyk E, Szymczyk P, Chlebus E (2014) The use of rep-rap technology for the production of functional structures from PLA, *Current Problems of Biomechanics*, 8: 109-114.
- Mazgajczyk E, Szymczyk-Ziółkowska P, Chlebus E (2014) The use of the REP-RAP technology for the production of functional structures from PLA. *Current Problems of Biomechanics*, 2(8): 109-114.
- Murphy S, Atala A (2014) *Nature Biotech*, 32: 773.
- Muzalewska M, Szczodry B, Samolczyk-Wanyura D, Wyleżół M (2014) Komputerowe wspomaganie i technologie generatywne w planowaniu zabiegów rekonstrukcji twarzowej części czaszki. *Modelowanie Inżynierskie*, nr.52: 147-153.
- Ozbolat IT, Yu Y (2013) Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 60n.3: 691-699.
- Plichta J, Plichta S (1999) *Komputerowo zintegrowane wytwarzanie*. Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Koszalińskiej.
- Shafiee A, Atala A (2016) Printing technologies for medical applications. *Trends in Molecular Medicine*, March 22, n.3: 254-265.
- Siemiński P, Budzik G (2015) *Techniki przyrostowe*. Druk Drukarki 3D. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej.
- Symes MD, Kitson PJ, Yan J, Richmond CJ, Cooper GJT, Bowman R W, Vilbrandt T, Cronin L (2012) Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis. *Nature Chemistry*, 4: 349-354.
- Wittbrodt BT, Glover AG, Laureto J, Anzalone GC, Oppliger D, Irwin JL, Pearce JM (2013) Life-cycle economic analysis of distributed manufacturing with open-source 3-D printers. *Mechatronics*, 23: 713-726.