

POSTĘPY INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

Redakcja
Lucyna Leniowska
Zbigniew Nawrat

Rzeszów 2013

Publikacja wydrukowana została w ramach projektu „Internetowa Promocja Nauki” realizowanego przy udziale środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki – działanie 4.2 Rozwój kwalifikacji kadr systemu B+R i wzrost świadomości roli nauki w rozwoju gospodarczym.

Redakcja:

dr hab. inż. Lucyna Leniowska, prof. UR
dr hab. Zbigniew Nawrat

Recenzenci:

dr hab. inż. Jacek Cieślik, prof. AGH
dr hab. Sławomir Grzegorzczyn
dr hab. inż. Zbigniew Paszenda, prof. PŚ

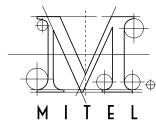
Wydawca publikacji:



Uniwersytet Rzeszowski
Al. T. Rejtana 16c
35-959 Rzeszów
Tel. (17) 872 13 43
www.inprona.pl

Rzeszów 2013
ISBN 978-83-63151-02-7
Nakład 250 egz.

Projekt graficzny, skład, łamanie, druk:



Wydawnictwo Mitel
Ul. Baczyńskiego 9
35-210 Rzeszów
Tel. (17) 852 13 62
www.mitel.com.pl

Copyright by Biuro Projektu Internetowa Promocja Nauki
All right reserved

Książka, ani żaden jej fragment nie może być przedrukowana bez pisemnej zgody Wydawcy.

Publikacja jest dystrybuowana bezpłatnie.

Dla osób, które zarejestrują się na stronie internetowej projektu www.inprona.pl
dostępna także w wersji elektronicznej

Spis treści

Przedmowa	7
1. Wojciech Bujok, Maciej Darłak, Leszek Wilczyński, Maciej Gawlikowski, Mirosław Czak, Roman Kustosz, Małgorzata Gonsior <i>Polskie wszczepialne pompy wspomaganie serca – rozwój w badaniach programu „Polskie Sztuczne Serce”</i>	9
2. Maciej Darłak, Ievgienii Altyntsev, Maciej Gawlikowski, Roman Kustosz, Małgorzata Gonsior <i>ReligaHeart-ROT: wirowa wszczepialna odśrodkowa pompa długoterminowego wspomaganie serca</i>	21
3. Maciej Gawlikowski, Roman Kustosz, Artur Kapis, Wojciech Bujok, Zbigniew Małota, Karolina Janiczak, Lech Czerwiński, Mirosław Czak, Maciej Głowacki, Małgorzata Gonsior <i>Nowej generacji system pozaustrojowego wspomaganie serca ReligaHeart EXT</i>	29
4. Agnieszka Szuber, Maciej Głowacki, Maciej Gawlikowski, Artur Kapis, Roman Kustosz, Małgorzata Gonsior, Tomasz Rusin, Tomasz Machoczek <i>Polska jednodyskowa mechaniczna zastawka typu Moll, przeznaczona do stosowania w pozaustrojowych komorach wspomaganie serca ReligaHeart EXT – Sposób wytwarzania i montażu oraz badania kwalifikacyjne zastawek</i>	47
5. Magdalena Kościelniak-Ziemniak, Karolina Janiczak, Roman Kustosz, Małgorzata Gonsior <i>Ocena wpływu oddziaływania polimerów konstrukcyjnych pompy ReligaHeart EXT na składniki czerwonej krwi</i>	57
6. Bogumił M. Konopka <i>A procedure for automated contact map-based reconstruction of protein structural models</i>	63
7. Grzegorz Ilewicz <i>Superrozdzielcza fotonooptyka fluorescencyjna sted w naukach biologicznych i fizyce</i>	75

8. Paweł P. Woźniak, Małgorzata Kotulska <i>Characteristics of contact sites with regard to protein topology</i>	81
9. Andrzej Jarynowski <i>Modelowanie epidemiologiczne przy wykorzystaniu analizy tymczasowych sieci społecznych</i>	91
10. Monika Kurczyńska <i>Structural, energy and functional changes in different conformations of the potassium channel KcsA</i>	101
11. Ryszard Leniowski, Marcin Kubasik <i>Avatar – moduł graficzny informatycznej metody diagnozowania chodu pacjenta</i>	113
12. Piotr Wodarski, Marek Gzik, Robert Michnik, Jacek Jurkojć, Andrzej Bieniek <i>Możliwości zastosowania wirtualnej technologii 3D w diagnostyce i rehabilitacji na przykładzie badań stabilograficznych</i>	127
13. Katarzyna Walicka-Cupryś, Justyna Drzał-Grabiec, Maciej Rachwał, Adrian Kuźdzał <i>Wybrane metody diagnostyki i wizualizacji postawy ciała człowieka</i>	133
14. Ewa Stachowiak, Marek Gzik, Wojciech Wolański, Dawid Larysz <i>Nieinwazyjna metoda korekcji wad kształtu głowy u dzieci</i>	149
15. Katarzyna Mitura, Iwona Gisterek, Przemysław Ceynowa, Artur Wachowicz, Grzegorz Pich, Renata Woś, Kinga Adach <i>Badania mikrobiologiczne bioaktywnych proszków nanodiamentowych modyfikowanych chemicznie</i>	157
16. Joanna Tolarczyk <i>Aminopeptydazy leucynowe z wybranych organizmów – znaczenie i zastosowania terapeutyczne</i>	169
17. Marcin Tomsia, Katarzyna Kopaczka, Piotr Czekaj <i>Transdukcja sygnałów mikrośrodowiskowych w komórkach macierzystych</i>	183
18. Adam Piórkowski, Aleksander Kempny, Paweł Piątek, Andrzej Gackowski, Kamil Szostek, Kamil Kipiel <i>Symulator echokardiografii przezprzełykowej CT2TEE – nowoczesna metoda edukacji</i>	209
19. Aleksandra Kuzan <i>Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej jako potencjalny marker w diagnostyce miażdżycy</i>	217

20. Tomasz Wandtke, Piotr Kopiński, Joanna Wielikdzień, Joanna Golińska, Karina Szablowska, Ewelina Wędrowska <i>Interleukina-27 nowym narzędziem w immunoterapii genowej raka płuca. Ocena ekspresji w układzie oddechowym człowieka</i>	227
21. Joanna Weźgowiec <i>Electroporation: theory and practice</i>	241
22. Sonia Loska, Zbigniew Paszenda, Marcin Basiaga, Wojciech Kajzer <i>Analiza numeryczna wkładu koronowo-korzeniowego z wykorzystaniem metody elementów skończonych</i>	251
23. Marta Kaczor-Kamińska <i>Rola siarki i związków zawierających jej atomy w organizmie człowieka</i>	261
24. Daria Matejek, Marek Langner, Sławomir Drobczyński <i>Szczypcy optyczne</i>	271
25. D. Pruska-Pich, M. Wachowicz, I. Gisterek, K. Mitura <i>Doświadczenia własne w ocenie jakości napromieniania przy pomocy zdjęć portalowych</i>	281
26. Damian Nakonieczny, Zbigniew Paszenda <i>Tlenek cyrkonu – Dedal czy Ikar współczesnej stomatologii?</i>	293
27. Sylwia Wałęsa <i>Zaawansowane metody prowadzenia hodowli Clostridium difficile i izolacji toksyn w badaniach nad poantybiotycznym rzekomobłoniastym zapaleniem jelita grubego</i>	305
28. Bartosz Woźniak, Paulina Jarosz <i>Naturalne i syntetyczne inhibitory metylotransferaz DNA (DNMTi) i deacetylaz histonów (HDACi) w walce z nowotworami</i>	311
29. Krystyna Szajnowska <i>Wpływ kanionu akustycznego na organizm człowieka</i>	321
30. Piotr Kroczek, Jacek Cieślak <i>Analiza układu kinematycznego robota RobIn Heart Vision</i>	331
31. Justyna Drzał-Grabiec, Maciej Rachwał, Katarzyna Walicka-Cupryś <i>Metoda fotogrametryczna z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej jako metoda oceny postawy ciała</i>	341

Przedmowa

*... bo to co naprawdę wielkie robimy z ciekawości
to co naprawdę ważne – z potrzeby pomocy drugiemu człowiekowi ...*

Jesteśmy świadkami ważkiej zmiany w systemie ochrony zdrowia. Służba zdrowia ze „służby”, czyli powinności, została przekształcona w usługę, czyli możliwość realizacji zadania po spełnieniu pewnych koniecznych warunków. Obecnie czas na technologię zdrowia. Coraz większe znaczenie dla oceny efektywności leczenia będzie miał dostęp do stosownych technologii.

W procesie leczenia, obok środków farmaceutycznych oddziałujących na stan chorego poprzez odpowiednie reakcje biochemiczne oraz obok interwencji chirurga zmieniającej fizyczne warunki układów biologicznych, coraz częściej stosuje się urządzenia wspomagające pracę organów człowieka lub ją zastępujące. Wiemy coraz więcej, możemy coraz więcej, ale do dziś nie do końca potrafimy tę wiedzę zaprząć do efektywnego leczenia. Dostęp do usług dobrej jakości nie jest powszechny. Wchodzimy w okres radykalnego przyspieszenia technologicznego, opartego o rozwój informatyki i elektroniki, biologii molekularnej i genetyki oraz nanotechnologii.

Rozbita na specjalizacje medycyna i obecna praktyka rozliczania kosztów leczenia prowadzi do konieczności standaryzowania usług z zastosowaniem metod komputerowej oceny i przesyłania informacji na odległość. To zaskakujące, ale to technologia podzieliła niegdyś medycynę, a dziś łączy ją w jedność. Ramię w ramię lekarz i inżynier walczą o większą skuteczność leczenia i szerszy dostęp do właściwych standardów leczenia dla każdego potrzebującego.

Oddajemy w Państwa ręce książkę szczególną – monografię poświęconą postępom bioinżynierii, lub szerzej – technologiom i technikom medycznym. Książka powstała, jako ślad ważnego spotkania fachowców wielu dziedzin nauki i techniki, młodych adeptów wiedzy medycznej i inżynierii, filozofów i bohaterów nowoczesnej medycyny – pacjentów. Gościliśmy na spotkaniach w Zabrze i w Rzeszowie wybitnych specjalistów, ale także hobbystów, uczniów, studentów, doktorantów i ... seniorów. Wybraliśmy do monografii najciekawsze tematy, najwartościowsze osiągnięcia – ich autorzy przygotowali odpowiednie rozdziały, które podlegały normalnej procedurze recenzji, by zachować odpowiedni poziom naukowy tego wspólnego dzieła.

Żyjemy nadzieję, że przez najbliższe lata monografia ta stanie się wartościowym źródłem aktualnej wiedzy akademickiej i informacji o stanie polskiej nauki w tym zakresie.

Lucyna Leniowska

Kierownik Zakładu Mechatroniki, Automatyki i Optoelektroniki
Instytut Techniki, Uniwersytet Rzeszowski

Zbigniew Nawrat

Dyrektor Instytutu Protez Serca, Fundacja Rozwoju Kardiologii
Katedra Kardiologii i Transplantologii, Śląski Uniwersytet Medyczny

Polskie wszczepialne pompy wspomaganie serca – rozwój w badaniach programu „Polskie Sztuczne Serce”

Wojciech Bujok*, Maciej Darlak*, Leszek Wilczyński**, Maciej Gawlikowski*, Mirosław Czak*, Roman Kustosz*, Małgorzata Gonsior*

Summary

Poland belongs to the leading group of countries, which introduced original heart prostheses to production and clinical practice – the research shows. The extracorporeal heart assist system POLCAS, clinically utilized since year 1999, has been used so far in treatment of more than 260 patients.

In the next stage, the research on Polish heart prostheses is aimed at developing and introducing the implantable devices, allowing to free treatment of the patients out of hospital: in rehab centers and at home. The goal is to develop constructions providing comfort and safety of heart assistance – dynamically spreading into clinical practice worldwide.

The new constructions of heart assist devices have been developed within the frame of the “Polish Artificial Heart” program, serving as a basis of modern family of Polish heart prostheses. The important area of the growth of Polish heart prostheses family is the implantable devices – dedicated for long term heart assistance. The group consists of implantable pulsatile pump ReligaHeart IMPL as well as two miniaturized continuous flow pumps: centrifugal ReligaHeart ROT and axial. At the top of the family is construction of totally implantable heart assist pump ReligaHeart TOTAL - developed for permanent heart support for patients with persistent heart insufficiency, disqualified from heart transplantation. The dominating role of III generation rotary pumps, with magnetically suspended rotor, has been considered, basing on analyses of recent direction of dynamic heart assistance device utilization in clinical practice. The possible miniaturization of these pumps, as well as definitely higher power efficiency and durability has caused rotary pumps to be the main devices utilized for long term or permanent heart support.

The progress in rotary pump development allows to use this construction to develop totally implantable heart support device.

Keywords: heart prosthesis, heart assist pumps, implantable, rotary pumps, mechanical heart support, VAD

Wprowadzenie

W roku 2008 rozpoczęte zostały badania nad technologiami i konstrukcją nowych polskich protez serca, zorganizowane w ramach programu wieloletniego „Polskie Sztuczne Serce”. Program ustanowiony został na kanwie doświadczeń i pozytywnych rezultatów klinicznych stosowania pierwszych polskich protez serca, opracowanych w zespole kie-

* Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze – Pracownia Sztucznego Serca.

** Centrum Techniki Okrętowej w Gdańsku.

rowanym przez prof. Zbigniewa Religę, a obejmujących: pozaustrojową pneumatyczną pompę wspomaganą serca i pneumatyczne sztuczne serce, opracowane w latach 90. XX w.

Pierwsza dekada nowego wieku zaowocowała na świecie postępowaniem technologicznym, pozwalającym na szerokie zastosowanie w leczeniu ostrej niewydolności serca pozaustrojowych pulsacyjnych pomp wspomaganą serca, które mogą zastąpić niewydolne serce w trakcie jego leczenia przez okres od kilku do kilkunastu miesięcy, oraz optymistyczne wprowadzenie do leczenia przewlekłej niewydolności serca zminiaturyzowanych pomp wspomaganą serca, wszczepianych do ciała pacjenta na kilka lat [1, 3].

Wykorzystanie mechanicznego wspomaganą niewydolnego serca, zarówno w leczeniu ostrej niewydolności serca, np. w zawale mięśnia sercowego lub niewydolności pooperacyjnej, a także jako terapia długoterminowa w zaawansowanym stadium przewlekłej niewydolności serca, wzrosło wraz z poprawą opieki medycznej i wydłużającym się wiekiem pacjentów. Urządzenia wspomaganą serca (VAD) są stałym elementem praktyki w ośrodkach kardiologicznych na całym świecie [2].

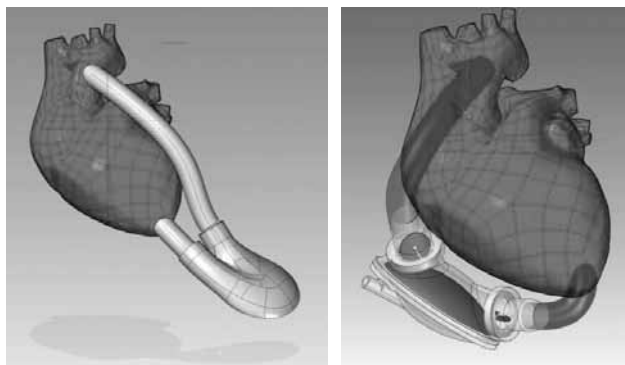
W ramach programu opracowane zostały innowacyjne konstrukcje, tworzące rodzinę polskich protez serca typu ReligaHeart. Do tej rodziny protez należą między innymi pneumatyczna implantowalna pompa ReligaHeart IMPL oraz dwie miniaturowe wirowe pompy przepływu ciągłego – odśrodkowa ReligaHeart ROT oraz osiowa ReligaHeart AXIAL. Rodzinę zamyka konstrukcja całkowicie wszczepianej pompy wspomaganą serca ReligaHeart TOTAL, przeznaczonej do długoterminowego wspomaganą serca w przypadku jego przewlekłej niewydolności. Na podstawie analizy aktualnych kierunków dynamicznego rozwoju wykorzystania urządzeń mechanicznego wspomaganą serca w praktyce klinicznej stwierdzono dominującą rolę pomp wirowych III generacji – z wirnikiem zawieszonym bez łożyskowania mechanicznego. Możliwa miniaturyzacja konstrukcji takich pomp oraz ich zdecydowanie wyższa efektywność i trwałość pracy sprawiają, iż są one aktualnie głównymi protezami wykorzystywanymi do wspomaganą serca, stosowanymi jako rozwiązanie ostateczne i bezterminowe. Postęp badań opracowanych pomp wirowych pozwolił na wykorzystanie takiej konstrukcji pompy do opracowania prototypu całkowicie wszczepialnej protezy. Taka propozycja została przedstawiona Radzie Programu „Polskie Sztuczne Serce”. Na podstawie pozytywnej opinii Rady przyjęto konstrukcję odśrodkowej pompy wirowej ReligaHeart ROT jako bazowej dla opracowania całkowicie wszczepialnej protezy serca [4].

Badania nad polskimi protezami serca zmierzają w kierunku opracowania i wdrożenia nowoczesnych protez serca, pozwalających na swobodne leczenie chorych z niewydolnością serca w warunkach pozaszpitalnych: w centrum rehabilitacji lub w domu chorego. Istotą opracowywanych konstrukcji jest zapewnienie wysokiego komfortu i bezpieczeństwa stosowania tej metody leczenia, bardzo dynamicznie rozwijającej się na świecie.

ReligaHeart IMPL

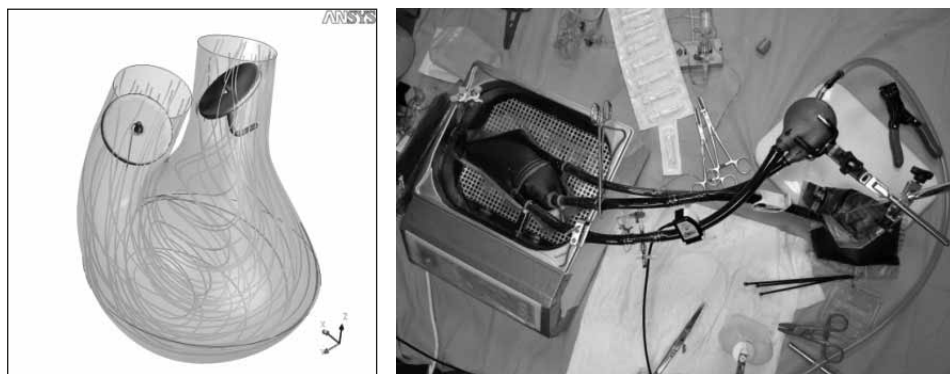
Pneumatyczna, implantowalna pompa wspomaganą serca opracowana w Zabrzu została zaprojektowana tak, by można ją było umieścić tuż koło serca, nad przeponą, z napływem do pompy umiejscowionym w koniuszku serca. Rozwiązanie to pozwoliło zminimalizować złożoność zabiegu potrzebnego do implantacji urządzenia, co jest bardzo

istotne z punktu widzenia szybkości implantacji samej protezy, jak również czasu powrotu pacjenta do zdrowia po zabiegu. Szczegółowe konsultacje kliniczne, włącznie z próbami anatomicznymi, pozwoliły na porównanie stworzonych modeli pomp.



Rys. 1. Ułożenie przykładowych modeli protezy względem serca

Przeprowadzone badania numeryczne, analizy przepływu przez protezę wspomagały proces projektowy ostatecznego kształtu protezy. Badania własności hydrodynamicznych modeli, badania fizyczne przepływu przez modele, wyznaczanie trajektorii przepływu za pomocą anemometrii laserowej i szereg innych badań przeprowadzonych podczas procesu projektowego finalnie doprowadziły do modelu prototypu protezy, wykonanego z tytanu, z nowo opracowanymi mechanicznymi zastawkami jednodyskowymi.



Rys. 2. Tory ruchu cząsteczek, uzyskane podczas analiz numerycznych przepływu oraz prototyp pompy podczas testów *in vitro*

Wynikiem realizacji zadania badawczego, polegającego na opracowaniu konstrukcji wszczepialnej, pneumatycznej pompy wspomaganie serca, jest prototyp pompy, wykonany z tytanu metodą szybkiego prototypowania SLM. Wykonane badania eksploatacyjne prototypu zakończone zostały pierwszym, pilotażowym eksperymentem *in vivo* na zwierzęciu, który wstępnie potwierdził poprawność opracowanej konstrukcji.



Rys. 3. Pompa ReligaHeart IMPL przed i po złożeniu

Zabieg implantacji protezy wykonano poprzez otwarcie klatki piersiowej i jamy osierdziejowej z dostępu bocznego (torakotomia boczna), z pełną ochroną przeciwkrzepliwą zwierzęcia i uruchomieniem krążenia pozaustrojowego, prowadzonego w układzie z pompą wirową i kapilarnym oksygenatorem niskooporowym. Kaniulę napływową protezy podłączono przez koniuszek do lewej komory serca, kaniulę wypływową do aorty zstępującej. Kolejnym krokiem było wszczęcie i podłączenie pompy wspomaganie serca, a następnie jej uruchomienie. Po uruchomieniu uzyskano natychmiastowo w pełni wydolną pracę pompy z częstotliwością 80 uderzeń na minutę, w trybie „pełny wyrzut – pełne napełnianie”, przy standardowym ciśnieniu tłoczenia krwi 180 mm Hg oraz niskim podciśnieniu napełniania pompy – 15 mm Hg. Po ustabilizowaniu wspomaganie zakończono krążenie pozaustrojowe. Serce zwierzęcia przejęło pracę z wydolną funkcją prawej komory serca.



Rys. 4. Zabieg implantacji pompy ReligaHeart IMPL

Wspomaganie serca pompą ReligaHeart IMPL prowadzono przez 2 godziny. W trakcie wspomaganie pompa pracowała w trybie pełnego napełniania i pełnego wyrzutu z częstotliwością 80 uderzeń na minutę. Pompa pracowała z rzutem 4 l/min, zapewniając ciśnienie tętniczej krwi zwierzęcia na poziomie 120/75/82 mm Hg. Okresowo obserwowano spadki napełniania pompy, związane z obniżeniem objętości końcoworozkurczowej w lewej komorze serca i przysysaniem ściany lewej komory serca do otworu kaniuli napływowej. Chwilowa korekta pracy pompy, polegająca na zmniejszeniu częstości pracy o 20 uderzeń na minutę,

powodowała powrót wydolnej pracy pompy. W niektórych przypadkach podobny efekt można było uzyskać przeprowadzając nieznaczną repozycję ułożenia kaniuli napływowej w koniuszku serca. Po 30 minutach stabilnego wspomaganie lewej komory serca zwierzęcia doszło do częstoskurczu komorowego z rytmem > 160 uderzeń na minutę. Przepływ pompy ReligaHeart IMPL spadł do 1 l/min. Wobec nieskutecznych prób defibrylacji serca i niewydolnej pracy prawej komory serca, włączono pozaustrojowe wspomaganie prawej komory serca, wykorzystując stosowany do wszczępienia układ krążenia pozaustrojowego, podłączony w konfiguracji prawy przedsionek – tętnica płucna. Po 20 minutach przywrócono stabilną pracę pompy ReligaHeart IMPL – 4 l/min i warunki hemodynamiczne zwierzęcia ABP 125/78/86 mm Hg. Podjęto decyzję o nie zamykaniu klatki piersiowej zwierzęcia. Po 2 godzinach stabilnego prowadzenia wspomaganie LVAD pompą ReligaHeart IMPL, ułożoną w lewej jamie opłucnowej klatki piersiowej zwierzęcia, podjęto decyzję o zakończeniu wspomaganie i całego doświadczenia. Decyzja podyktowana była brakiem powrotu akcji serca i bezcelowością kontynuowania krążenia pozaustrojowego. Po zakończeniu doświadczenia pompa ReligaHeart IMPL została zabezpieczona płynem utrwalającym materiał biologiczny i poddana oględzinom makroskopowym wg protokołu badania pompy po deplantacji.

W zastosowanej w eksperymencie *in vivo* pompie ReligaHeart IMPL nie stwierdzono istotnych skrępleni w obrębie czaszy krwistej. Zlokalizowano podciek krwi pomiędzy membranę krwistą i roboczą, który wynikał z niedokładności wykonania elementów składowych prototypu, wytworzonych z tytanu techniką szybkiego prototypowania SLM. Przeprowadzone badania nie wykazały własności trombogennych pompy. Nie stwierdzono również wpływu badanej protezy na wzmożony wzrost hemolizy erytrocytów.

Pomimo, można powiedzieć, pełnego sukcesu zadania opracowania i wytworzenia implantowalnej pneumatycznej pompy wspomaganie serca, ze względu na światowe doniesienia i tendencje świadczące o malejącym udziale pomp pneumatycznych w terapii wspomaganie serca, a rosnącym udziale w tym obszarze pomp rotacyjnych, podjęto decyzję o zakończeniu rozwoju konstrukcji protezy na prezentowanym etapie i zintensyfikowaniu prac w zadaniach związanych z opracowywanymi konstrukcjami pomp wirowych.

ReligaHeart ROT

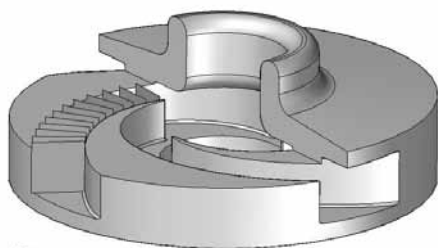
Na podstawie analizy aktualnych kierunków dynamicznego rozwoju wykorzystania urządzeń mechanicznego wspomaganie serca w praktyce klinicznej, stwierdzono dominującą rolę pomp wirowych III generacji – z wirnikiem zawieszonym bez łożyskowania mechanicznego (lewitujący). Możliwa miniaturyzacja konstrukcji takich pomp oraz ich



Rys. 5. Widok na podciek krwisty pod membrany roboczą i krwistą pompy

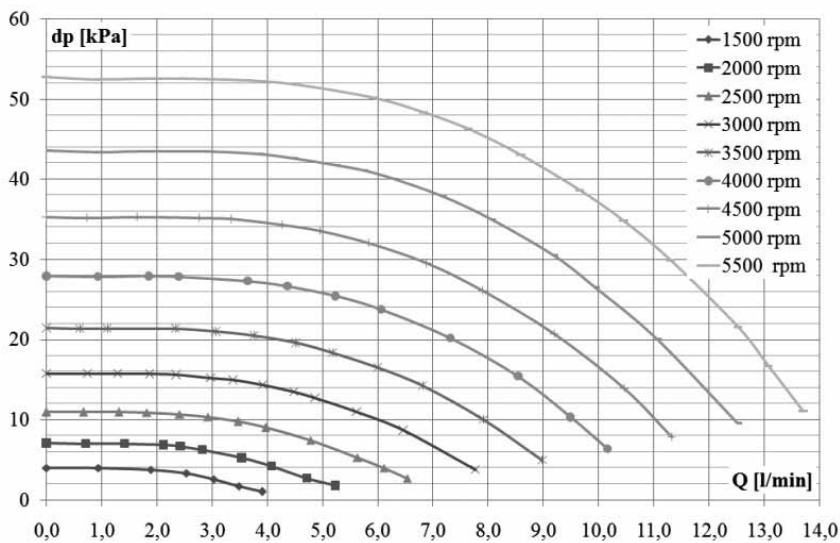
zdecydowanie wyższa efektywność i trwałość pracy sprawiają, iż są one aktualnie głównymi protezami wykorzystywanymi do wspomaganie serca, stosowanymi jako rozwiązanie ostateczne, bezterminowe.

Konstrukcja pompy odśrodkowej, o wyróżniku szybkoobrotowości zaliczanej do pomp wolnoobrotowych, charakteryzuje się wirnikiem zamkniętym o łopatkach przestrzennych, wyznaczonych metodą odwzorowania konforemnego, oraz rosnącym promieniu hydraulicznym kanału międzyłopatkowego. Tarcze wirnika mają stożkowe powierzchnie zewnętrzne, co pozwala uzyskać płynne przejścia ścianek bocznych kadłuba pompy w kanał spiralny kierownicy. Wirnik nie posiada piasty i ma otwór w tylnej tarczy. W rezultacie elementami wirującymi są łopatki wraz z tarczami. Tego typu rozwiązanie pozwoliło również na zmniejszenie dystansu pomiędzy magnesami wirnika i obudowy, co przekłada się na wyższą sprawność napędu magnetycznego.



Rys. 6. Wyznaczenie kształtu kanału międzyłopatkowego wirnika na drodze optymalizacji

Proteza serca ReligaHeart ROT jest miniaturową pompą odśrodkową o wymiarach: średnica = 58 mm (z dyfuzorem 82 mm), wysokość = 55 mm, masa = 165 g, objętość robocza = 15 ml, pobór mocy od 2 do 10 W, wszczepianą przez koniuszek bezpośrednio do lewej komory serca, co pozwala na jej ulokowanie w worku osierdziowym bezpośrednio w sąsiedztwie serca. Pompuje ona krew z lewej komory serca do aorty dzięki wirowaniu miniaturowego wirnika (o kanałach zamkniętych), zawie-



Rys. 7. Charakterystyka wydajności pompy

szonemu w statycznym polu magnetycznym oraz wirującego z prędkością obrotową od 2500 do 5500 obrotów na minutę, dzięki wykorzystaniu napędu zmiennym polem magnetycznym. Taka konstrukcja pompy zapewnia tłoczenie krwi przez kanały wirującego wirnika, który ze wszystkich stron omywany jest krążącą krwią, co zapewnia wyeliminowanie miejsc ryzyka wytwarzania się skrzepin. Dzięki zastosowaniu najnowocześniejszych technologii bioinżynierii można sprawić, że do wytworzenia przepływu krwi rzędu od 3 do 5 litrów na minutę, czyli przepływu potrzebnego do częściowego lub całkowitego wspomagania serca, potrzeba zaledwie kilku watów energii.

Ta najnowocześniejsza konstrukcja polskiej protezy serca wszczepiana była w badaniach doświadczalnych na zwierzętach, by w pierwszej fazie oceny przedklinicznej potwierdzić skuteczność jej działania. Przygotowanie badań doświadczalnych poprzedziły badania laboratoryjne, potwierdzające sprawność i efektywność działania zaprojektowanej protezy.



Rys. 8. Prototyp wirowej odśrodkowej pompy wspomagania serca ReligaHeart ROT

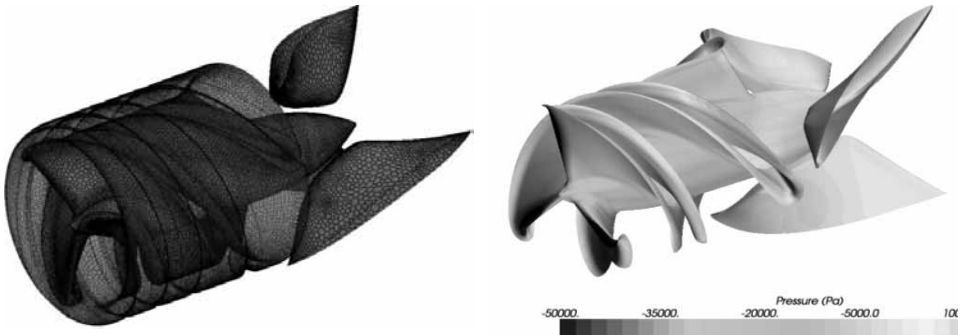


Rys. 9. Zabieg implantacji pompy ReligaHeart ROT

ReligaHeart AXIAL

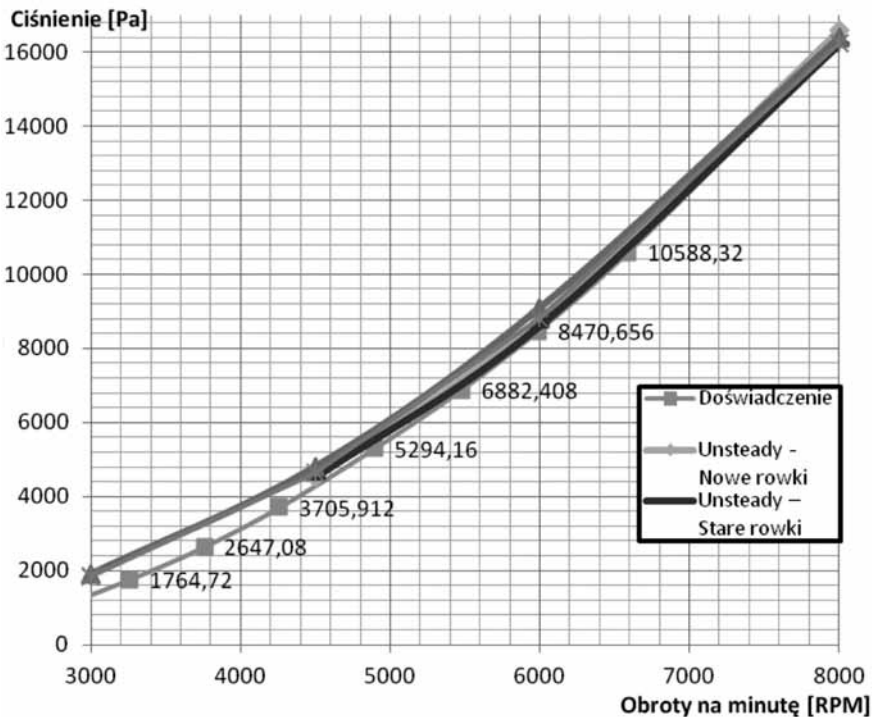
Konstrukcja pompy osiowej opracowana została przez Centrum Techniki Okrętowej z Gdańska w ramach zadania Fundacji Rozwoju Kardiologii, dotyczącego opracowania konstrukcji klinicznych systemów wspomagania serca. Pompa ta cechuje się większym przekrojem hydraulicznym od stosowanych obecnie konkurencyjnych rozwiązań i co za tym idzie mniejszą koncentracją naprężeń oraz wyższym wydatkiem przy mniejszej prędkości obrotowej wirnika. Istotną cechą konstrukcyjną jest koncepcja odwrócenia łopatek pompy ku osi obrotu wirnika, co skutkuje praktycznie brakiem wiru wierzchołkowego sphywającego z łopatek (mniejsze straty energii). Tego typu rozwiązanie pozwoliło również

na zmniejszenie dystansu pomiędzy magnesami wirnika i obudowy, co przekłada się na wyższą sprawność napędu magnetycznego.



Rys. 10. Siatka obliczeniowa na powierzchni wirnika i kierownic przepływu oraz wizualizacja ciśnień dla wirnika

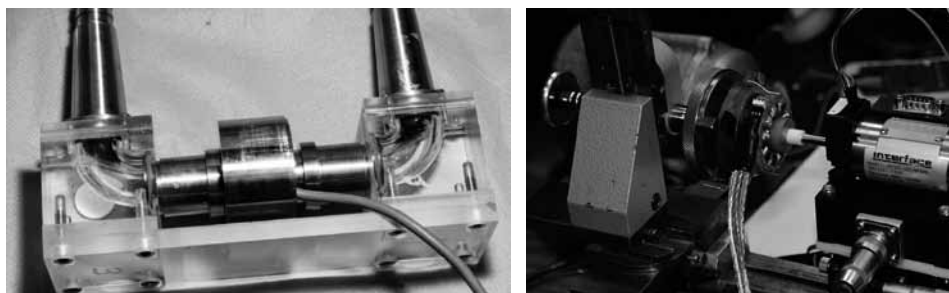
Obliczenia numeryczne pozwalają w stosunkowo szybki i precyzyjny sposób zaprojektować własności wysokości podnoszenia w funkcji prędkości obrotowej wirnika pompy. Zaprojektowano geometrię pompy, dla której przeprowadzone obliczenia numeryczne



Rys. 11. Zestawienie wyników symulacji numerycznych oraz pomiarów wysokości podnoszenia pompy w funkcji prędkości obrotowej wirnika

przepływu potwierdziły uzyskanie założonej nominalnej wydajności przy ok. 5500 obrotach na minutę. Dodatkowym kryterium determinującym geometrię elementów pompy były wymagania związane z rozmieszczeniem magnesów bezkontaktowego napędu i łożysk, zapewniających stabilną pozycję wirnika w osi pompy w zakładanym punkcie pracy.

Zaprojektowano i wykonano bezszczotkowy napęd magnetyczny oraz układ łożyskowania magnetycznego. Zaprojektowano i wykonano system sterowania aktywnymi łożyskami osiowymi i promieniowymi, wykonano badania precesji wirnika i zagrożenia występowaniem mechanicznego kontaktu wirnika z kanałem (wirnik lewituje), opracowano technologię wykonania modeli do badań oraz do testów *in vitro*. Przeprowadzono również próby anatomiczne w klatce piersiowej człowieka.



Rys. 12. Model pompy przygotowany do badań hydrodynamicznych i testów na krwi oraz widok stanowiska badawczego silnika pompy

Analiza możliwości ułożenia makiety pompy osiowej w skali 1:1 w klatce piersiowej prowadzi do wniosku, że wymiary gabarytowe pompy umożliwiają co najmniej dwa sposoby jej wszczępienia:

- polegający na zastosowaniu dwóch elastycznych kaniul, napływowej, łączącej lewą komorę z pompą, i wypływowej, łączącej pompę z aortą na odcinku wstępującym,
- polegający na zastosowaniu pojedynczego, elastycznego graftu wypływowego, łączącego sztywny króciec wylotowy pompy z aortą na odcinku piersiowym oraz wprowadzeniu sztywnego króćca wlotowego pompy do lewej komory przez koniuszek serca.

Proteza serca ReligaHeart AXIAL jest miniaturową pompą osiową o wymiarach: średnica bez silnika = 23 mm (z silnikiem = 44 mm),



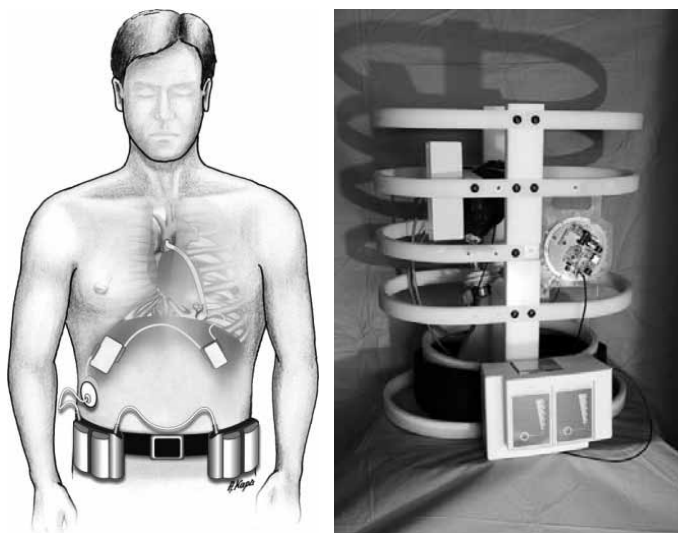
Rys. 13. W pełni funkcjonalny tytanowy model pompy

długość = od 50 do 80 mm (zależnie od konfiguracji), masa = od 185 do 240 g, pobór mocy od 5 do 10 W, podobnie jak pompa odśrodkowa wszczepianą przez koniuszek do lewej komory serca, co pozwala na jej ulokowanie w worku osierdziowym bezpośrednio w sąsiedztwie serca.

Uzyskane modele prototypów pomp potwierdzają możliwość wykorzystania każdej z badanych konfiguracji pompy jako urządzenia wspomagającego lewą komorę serca.

ReligaHeart TOTAL

Konstrukcja protezy całkowicie wszczepialnej oparta jest na konstrukcji częściowo wszczepialnej pompy rotacyjnej odśrodkowej. Dla pompy tej opracowano wszczepialny do ciała pacjenta sterownik oraz wszczepialny układ zasilania bateryjnego. Układy te komunikują się z zewnętrznym sterownikiem i układami baterii zasilających bezprzewodowo. System całkowicie wszczepialnej protezy serca ReligaHeart TOTAL do stosowania długotrwałego i permanentnego stanowi połączenie sterownika pompy wirowej z bezprzewodowym zasilaniem pacjenta przez system transmisji energii przez skórę.

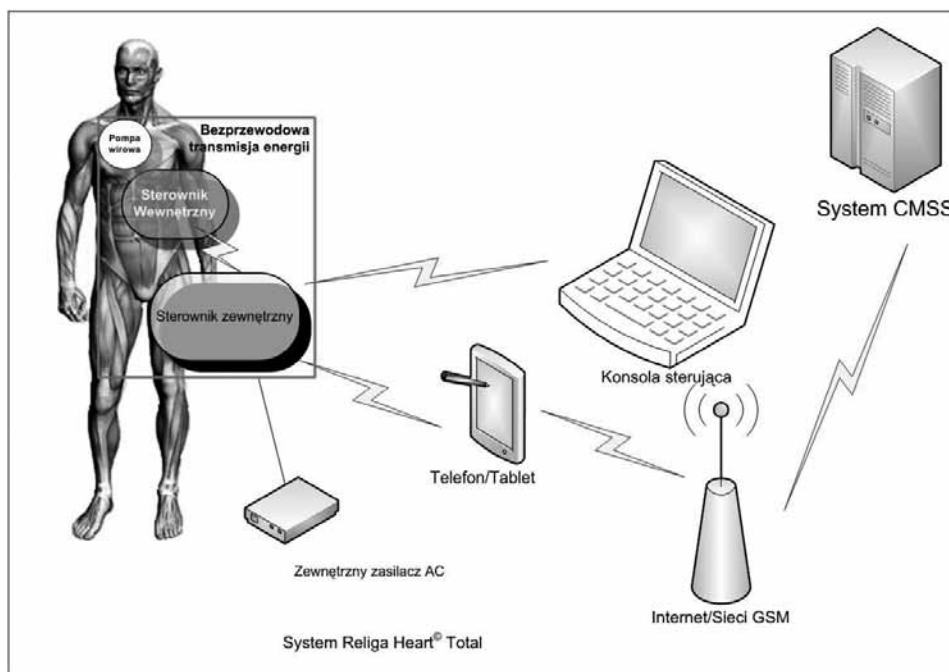


Rys. 14. Koncepcja oraz model układu protezy całkowicie wszczepialnej

Dla celów bezprzewodowego przekazywania energii pomiędzy częścią zewnętrzną i wewnętrzną oraz transmisji danych zaadoptowano opracowany system bezprzewodowej, elektromagnetycznej transmisji energii oraz komunikacji sygnałem podczerwieni. Na schemacie blokowym systemu ReligaHeart TOTAL wyszczególniono podstawowe podzespoły i elementy systemu:

- pompa wirowa,
- sterownik wewnętrzny wraz z baterią,
- sterownik zewnętrzny wraz z bateriami akumulatorów, ładowarką i zasilaczem wewnętrznym,

- konsola sterująca (oprogramowanie w komputerze przenośnym),
- podzespoły do komunikacji z Centrum Danych CMS².



Rys. 15. Schemat systemu ReligaHeart TOTAL

Prace badawcze nad modelem systemu dostosowano do postępu prac nad konstrukcją układu sterowania częściowo wszczepialnej, odśrodkowej wirowej pompy wspomaganie serca ReligaHeart ROT.

Powstała konstrukcja modelu wszczepialnego układu sterowania dla pompy wirowej oraz zewnętrznego, współpracującego z nią sterownika komunikacyjnego. Równolegle, w zadaniu zrealizowanym przez zespół Instytutu Automatyki i Robotyki Politechniki Warszawskiej, opracowane zostały urządzenia peryferyjne współpracujące ze sterownikami, a dedykowane do zdalnego monitorowania pracy protezy. W modelu wykorzystano bezprzewodową transmisję danych sygnałem promieniowania w podczerwieni, opracowaną przez Instytut Techniki i Aparatury Medycznej oraz Politechnikę Śląską w innym zadaniu przedsięwzięcia programu „Polskie Sztuczne Serce”, dedykowanym technologii transmisji bezprzewodowej. W wykonanych badaniach modelowych potwierdzono poprawność działania układu. Na bazie przyjętych rozwiązań została opracowana modelowa konstrukcja prototypu układu bezprzewodowej transmisji energii i sygnałów dla wszczepialnej pompy wirowej, podnosząca rozwiązanie konstrukcyjne tej pompy do poziomu pomp IV generacji – całkowicie wszczepialnych.

Streszczenie

Polska należy do wąskiej czołówki krajów, które wdrożyły do produkcji i praktyki klinicznej protezy serca – rezultaty prac badawczych. Stosowany klinicznie od 1999 roku pozaustrojowy system wspomaganie serca POLCAS został do chwili obecnej zastosowany w leczeniu ponad 260 pacjentów.

W kolejnym etapie badań, realizowanym w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce”, prace badawcze nad polskimi protezami serca zmierzają w kierunku opracowania i wdrożenia wszczepialnych protez serca, pozwalających na swobodne leczenie chorych z niewydolnością serca w warunkach pozaszpitalnych: w centrum rehabilitacji i w domu chorego. Istotą opracowywanych konstrukcji jest zapewnienie wysokiego komfortu i bezpieczeństwa mechanicznego wspomaganie serca, bardzo dynamicznie rozwijającego się na świecie.

W ramach programu opracowane zostały innowacyjne konstrukcje, stanowiące załączek rodziny polskich protez serca typu ReligaHeart. Istotnym kierunkiem rozwoju tej rodziny protez jest obszar protez wszczepialnych – dedykowanych do długoterminowego wspomaganie serca. Do tej grupy protez należą między innymi pneumatyczna implantowalna pompa ReligaHeart IMPL oraz dwie miniaturowe wirowe pompy przepływu ciągłego – odśrodkowa Religa HeartROT oraz osiowa. Rodzinę zamyka konstrukcja pompy wspomaganie serca ReligaHeart TOTAL, planowana do permanentnego wspomaganie serca w przypadku jego przewlekłej niewydolności u chorych zdyskwalifikowanych od przeszczepu serca. Na podstawie analizy aktualnych kierunków dynamicznego rozwoju wykorzystania urządzeń mechanicznego wspomaganie serca w praktyce klinicznej stwierdzono dominującą rolę pomp wirowych III generacji – z wirnikiem zawieszonym bez łożyskowania mechanicznego. Możliwa miniaturyzacja konstrukcji takich pomp oraz ich zdecydowanie wyższa efektywność i trwałość pracy sprawiają, iż są one aktualnie głównymi protezami wykorzystywanymi do wspomaganie serca, stosowanymi jako rozwiązanie ostateczne lub bezterminowe. Postęp badań opracowanych pomp wirowych pozwala na wykorzystanie takiej konstrukcji pompy do opracowania prototypu całkowicie wszczepialnej protezy.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pod nazwą: „Polskie Sztuczne Serce”

Literatura

- [1] Garatti A., Bruschi G. et al., Clinical outcome and bridge to transplant rate of left ventricular assist device recipient patients: comparison between continuous-flow and pulsatile-flow devices. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 34: 275–280, 2008.
- [2] Hetzer R., Stiller B., Technology Insight: use of ventricular assist devices in children. *Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine* Vol. 3 No. 7: 377–386, 2006.
- [3] Wilson S. R., Givertz M. M. et al., Ventricular Assist Devices: Outpatient Management. *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 54 No. 18: 1647–59, 2009.
- [4] Sprawozdania z realizacji programu wieloletniego „Polskie Sztuczne Serce”.

ReligaHeart-ROT: wirowa wszczepialna odśrodkowa pompa długoterminowego wspomaganie serca

Maciej Darlak*, Ievgienii Altyntsev*, Maciej Gawlikowski*, Roman Kustosz*, Małgorzata Gonsior*

Summary

The rapid technological progress has created a giant leap of medicine related to the mechanical heart support. It is observed as a significant increase in utilization of miniaturized implantable long term heart assist devices, generating continuous flow, produced by rotated impellers (centrifugal and axial pumps). Therefore, in the Foundation of Cardiac Surgery Development in Zabrze (Poland) there has begun work on the design of implantable centrifugal left ventricular assist device (LVAD) – ReligaHeart-ROT pump.

Keywords: LVAD, centrifugal blood pump

Wprowadzenie

Współczesny poziom technologii, rozumianej w jak najszerszym znaczeniu tego słowa, pozwala na realizację projektów, których celem jest opracowywanie konstrukcji wysoko wyspecjalizowanego sprzętu i urządzeń podtrzymujących i ratujących ludzkie życie. Wielopoziomowość zadań i problemów towarzyszących procesom konstrukcyjnym wyżej wymienionych urządzeń stawia wymóg zaangażowania i integralności wielu dziedzin nauki i przemysłu. Program „Polskie Sztuczne Serce”, realizowany w latach 2007–2012, umożliwił taką współpracę, dzięki której opracowano prototyp pierwszej polskiej wirowej wszczepialnej pompy wspomaganie serca ReligaHeart-ROT. Zadaniem pompy jest wspomaganie pracy lewej komory serca pacjentów z przewlekłą niewydolnością układu krążenia, stanem prowadzącym do niewydolności wielonarządowej i w konsekwencji do bezpośredniego zagrożenia życia. Zastosowanie pompy w takich przypadkach ma pozwolić na długoterminowe wspomaganie lewej komory serca, odciążające ją w pracy hemodynamicznej i przywracające fizjologiczne warunki hemodynamiczne w układzie krążenia pacjenta. Taka terapia ma na celu przygotowanie i bezpieczne doprowadzenie pacjenta do przeszczepu serca lub jego regeneracji. Może być również stosowana jako docelowa terapia zabezpieczająca pacjenta z nieodwracalną niewydolnością serca, zdyskwalifikowanego z leczenia transplantacją serca. Szczególną zaletą wszczepialnej pompy wirowej jest zapewnienie dużej mobilności i bezpieczeństwa prowadzenia wspomaganie

* Pracownia Sztucznego Serca, Fundacja Rozwoju Kardiologii im prof. Zbigniewa Religi w Zabrzu.

serca. Pozwala to na bezpieczne leczenie pacjentów z wszczepioną pompą w domu, szczególnie jeśli zastosowane będą systemy zdalnego nadzoru pracy pompy i stanu pacjenta.

Wirowa pompa krwi ReligaHeart-ROT implantowana będzie do ciała pacjenta, do klatki piersiowej, bezpośrednio do serca pacjenta. Wlot pompy podłączony zostanie przez koniuszek serca do jego lewej komory, skąd będzie pobierana krew napływająca przez lewy przedsionek z płuc. Wylot pompy, poprzez graft naczyniowy, połączony będzie z aortą. Układ taki zapewnia opróżnianie lewej komory serca z napływającej krwi i przepompowywanie jej do obiegu systemowego układu krążenia.

Konstrukcja ReligaHeart-ROT

Założenia konstrukcyjne pompy zostały opracowane na podstawie doświadczeń klinicznych w stosowaniu pozaustrojowego systemu wspomaganie serca POLCAS oraz w oparciu o studia literaturowe publikacji i artykułów opisujących konstrukcje pomp wirowych stosowanych na świecie. Prace nad konstrukcją prowadzone były w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce”, w zadaniu opracowania konstrukcji wirowej implantowalnej protezy serca. Rezultaty procesu konstrukcyjnego doprowadziły do wytworzenia partii prototypu laboratoryjnego pompy i przebadania go w eksperymentach na zwierzętach. Etap ten był jednym z ostatnich w procesie badawczo-konstrukcyjnym, poprzedzającym rozpoczęcie procesu opracowania konstrukcji klinicznej i wdrożenia pompy do zastosowania klinicznego.

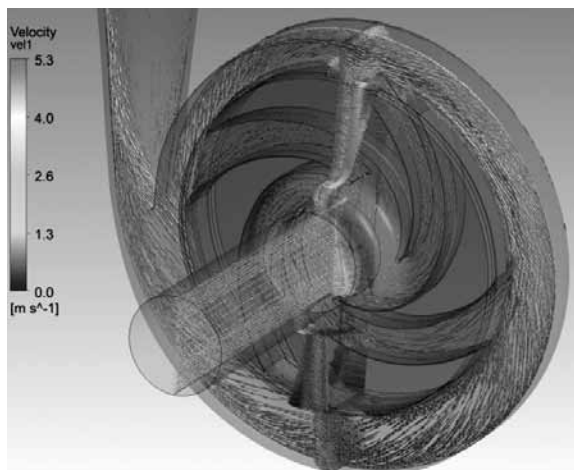
Konstrukcja pompy obejmuje kilka zespołów i elementów funkcjonalnych: układ przepływowy, napęd pompy, system łożyskowania wirnika, układ sterowania oraz układ zasilania. Istotny aspekt stanowi konstrukcja materiałowa poszczególnych elementów pompy, w szczególności dobór biomateriałów konstrukcyjnych elementów pompy, wszczepialnych do ciała pacjenta i kontaktujących się z przepływającą krwią, a z drugiej strony pracujących w polu magnetycznym zawieszenia i napędu wirnika pompy.

Układ hydrauliczny pompy

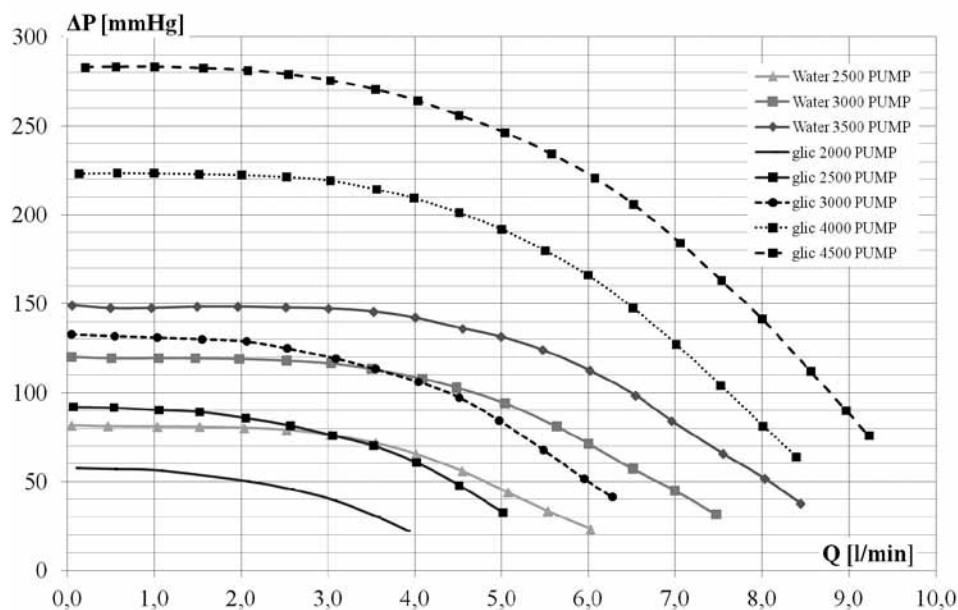
Opracowane założenia dla układu przepływowego oprócz wymagań dotyczących wydajności pompy stawiały wymagania odnoszące się do jakości przepływu, wynikające ze specyfiki płynu pompowanego przez pompę krwi. Jednym z podstawowych kryteriów przyjętych w procesie konstrukcyjnym była minimalizacja naprężeń ścinających w cieczy oraz eliminacja obszarów o wysokich wartościach naprężeń. Nominalny punkt pracy pompy przyjęto dla prędkości obrotowej 3000 obr/min. Wydajność przepływowa pompy w tym punkcie powinna wynieść $Q = 5$ l/min, przy różnicy ciśnień generowanych przez pompę $dp = 100$ mmHg.

System przepływowy pompy został zaprojektowany przy współpracy z Instytutem Maszyn i Urządzeń Energetycznych Politechniki Śląskiej. Układ przepływowy zbudowano jako konstrukcję pompy odśrodkowej z wirnikiem z zamkniętymi kanałami i ze spiralnym kanałem wylotowym umieszczonym w obudowie pompy [1]. W procesie opracowywania konstrukcji wykorzystano numeryczne techniki modelowania przepływu, w których sprawdzano uzyskane parametry wydajnościowe pompy, a przede wszystkim wyznaczano

krytyczne miejsca, w których mogło dochodzić do zaistnienia niepożądanych zjawisk z punktu widzenia bezpieczeństwa przepływu krwi – turbulencji, wysokich naprężeń ścinających lub miejsc stagnacji przepływu (rys. 1). Opracowany układ przepływowy charakteryzują lokalne prędkości przepływu w zakresie od 1,0 do 3,0 m/s.



Rys. 1. Przykładowe pola wektorów prędkości w przekrojach kanałów przepływowych pompy



Rys. 2. Charakterystyka wydajności pompy odśrodkkowej dla cieczy o różnej lepkości (woda, 30% roztwór gliceryny)

Badania numeryczne weryfikowano w eksperymentach fizycznych w laboratorium, na specjalnie do tych badań wytworzonych modelach pomp, wykonanych w technologiach szybkiego prototypowania. Badania przeprowadzono dla cieczy o różnej lepkości. Na podstawie wyników badań wyznaczano charakterystyki pompy i porównywano je z wynikami symulacji numerycznych (rys. 2). W taki sposób dokonywano walidacji procesu konstrukcyjnego oraz weryfikowano osiągnięcie zamierzonych rezultatów.

Otrzymane charakterystyki wydajnościowe finalnej konstrukcji układu przepływowego pompy pokrywały się z wynikami symulacji numerycznych, na podstawie których wyznaczono teoretycznie konstrukcję pompy. Na podstawie zweryfikowanych charakterystyk hydrodynamicznych pompy wyznaczono zakres nominalnych prędkości obrotowych pracy pompy: od 1500 obr/min do 4500 obr/min. Zakres ten pozwala na wydajność pracy pompy od 1,0 do 7,0 l/min przy ciśnieniach obciążenia pompy od 50 do 200 mm Hg.

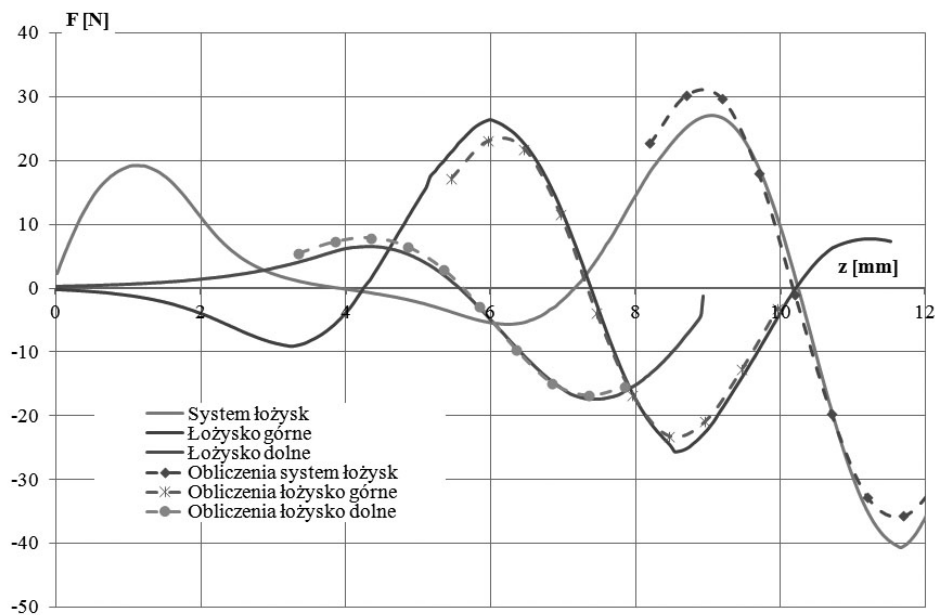
System zawieszenia i łożyskowania wirnika pompy

Jednym z głównych założeń konstrukcyjnych pompy było zawieszenie wirnika bez udziału łożysk mechanicznych, czyli zagwarantowanie bezkontaktowej pracy wirnika w obudowie pompy. Celem tego założenia było całkowite wyeliminowanie z obszaru pompy przestrzeni, w których mogłoby dochodzić do krytycznego zwolnienia przepływu krwi. Efekt taki ma zwykle miejsce w rejonie klasycznych łożysk mechanicznych, podpierających wirnik w jego osi obrotu. Po analizie konstrukcji układu przepływowego i mechaniki pompy – obudowy i wirnika zdecydowano się na wykorzystanie w pompie hybrydowego systemu łożyskowania. Opracowano system zbudowany z dwóch układów łożyskujących: magnetycznego i hydrodynamicznego. Zadaniem łożyska magnetycznego jest stabilizacja promieniowa wirnika, a łożyska hydrodynamicznego – stabilizacja osiowa. Na potrzeby badań konstrukcyjnych wykonano analizę bilansu sił oddziałujących na wirnik pompy i wyznaczono teoretyczne charakterystyki tych sił w funkcji przemieszczenia wirnika wewnątrz obudowy pompy w przyjętym zakresie prędkości obrotowych jego wirowania. Charakterystyki te posłużyły jako założenie konstrukcyjne zapewnienia funkcjonalności układu łożyskowania.

Dla łożyska magnetycznego zaproponowano konstrukcję składającą się z pierścieni magnetycznych umieszczonych w obudowie i wirniku pompy. W procesie konstruowania układu wykorzystano symulacje numeryczne, na podstawie których opracowano kilka modeli łożysk magnetycznych, które przebadano na stanowisku laboratoryjnym (rys. 3). Po przeanalizowaniu właściwości charakterystyk rozkładu sił poszczególnych modeli opracowano układ łożyska magnetycznego, wykorzystanego w prototypie pompy ReligaHeart-ROT. Układ ten zapewnia równowagę sił poosiowych w obszarze pozycji nominalnej wirnika.

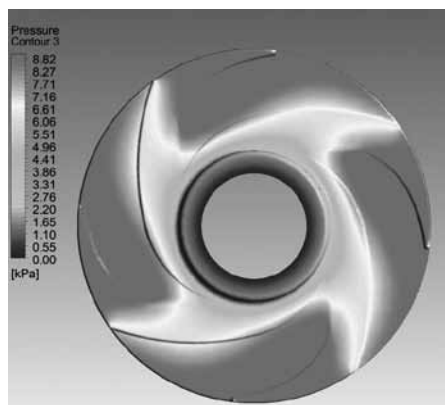
Konstrukcja pompy przewiduje istnienie kanałów w szczelinie pomiędzy tarczami wirnika a wewnętrzną powierzchnią obudowy. W przestrzeni tej dochodzi do zjawiska przecieku wstecznego wokół wirnika, na skutek różnicy ciśnień pomiędzy kanałem zbiorczym a wlotowym pompy, generowanej przez wirnik. Bardzo ważne jest, aby przestrzeń pomiędzy tarczami wirnika a obudową była stale obmywana i aby nie dochodziło do

mechanicznego kontaktu tarczy wirnika z obudową. Takie warunki ma zapewnić łożysko hydrodynamiczne.

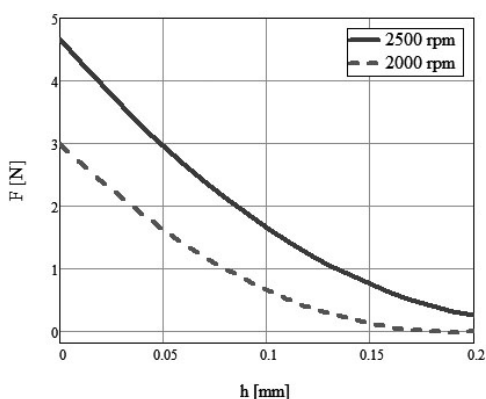


Rys. 3. Porównanie charakterystyk eksperymentalnych sił oddziaływań magnetycznych w funkcji wzajemnego przemieszczenia osiowego (Z) magnesów łożysk z wynikami obliczeń numerycznych.

Konstrukcja łożyska hydrodynamicznego wymagała opracowania systemu elementów umieszczonych na tarczach wirnika, które podczas pracy wirnika doprowadzą do wzrostu ciśnienia w przestrzeni pomiędzy wirnikiem a obudową i w konsekwencji do wygenerowania siły odpychającej wirnik od obudowy. Badania konstrukcyjne zespołu łożysk hydrodynamicznych przeprowadzono z wykorzystaniem symulacji numerycznych, w których wyznaczano rozkłady pól ciśnienia na tarczach wirnika z elementami łożyska hydrodynamicznego (rys. 4). Kolejnym etapem były badania fizyczne, w których na stanowisku laboratoryjnym wyznaczano charakterystyki sił oddziaływujących na tarczę wirnika w funkcji odległości tarczy od wewnętrznej płaskiej powierzchni obudowy pompy (rys. 5). Na podstawie wyników badań numerycznych i fizycznych opracowano finalną konstrukcję łożyska hydrodynamicznego. Zapewnia ona dla odległości 0,05 mm pomiędzy tarczą wirnika a obudową siłę odpychającą wirnik od obudowy na poziomie 4 N.



Rys. 4. Badania numeryczne – pola ciśnień generowane przez elementy łożyska hydrodynamicznego



Rys. 5. Zależności siły nośnej łożyska hydrodynamicznego od wysokości szczeliny roboczej dla różnych prędkości obrotowych, uzyskane w badaniach eksperymentalnych

System napędowy

W konstrukcji wszczepialnych pomp wspomaganie serca szczególnie wysokie wymagania stawiane są sprawności energetycznej pompy. Aspekt ten jest ważny ze względu na minimalizację zużycia energii z baterii zasilających układ sterowania pompy oraz ze względu na fakt, iż wszystkie straty energetyczne w pompie wszczepionej do ciała pacjenta przełożą się na energię cieplną wydzieloną do krwi i tkanek otaczających pompę. Dlatego główne kryteria konstrukcji układu napędowego pompy wiązały się przede wszystkim z osiągnięciem wysokiej sprawności i uzyskaniem momentu obrotowego potrzebnego do napędu wirnika w pełnym zakresie prędkości obrotowych i przy pełnym zakresie obciążeń hydrodynamicznych pompy. Załoženiami wejściowymi do opracowania konstrukcji były wyniki przeprowadzonych badań układu przepływowego oraz wymogi związane z charakterem pracy urządzenia. Do najważniejszych wymogów można zaliczyć: niezawodność w długoterminowej pracy pompy, niski pobór mocy elektrycznej dla wydłużenia czasu pracy pompy z ładunku zgromadzonego w baterii, niski poziom wibracji wirnika dla wyeliminowania hemolizy krwi i niski poziom hałasu pracy pompy dla zapewnienia większego komfortu pacjenta.

Rozwiązanie konstrukcyjne napędu pompy oparto na metodzie działania bezsensorowych silników typu BLDC. W konstrukcji napędu zastosowano dwa symetryczne silniki, których cewki umieszczono na rdzeniach magnetycznych w górnej i dolnej części obudowy pompy. W górnej i dolnej tarczy wirnika umiejscowiono magnesy stałe. Wirnik pompy jest jednocześnie rotorem silnika. Zastosowanie dwóch silników, z których każdy, w sytuacji awarii jednego z nich, samodzielnie może napędzać pompę, zapewnia redundancję pracy pompy. Konstrukcję silnika opracowano na bazie symulacji numerycznych, a następnie modele fizyczne przebadano na stanowisku laboratoryjnym, wyznaczając charakterystyki: momentu obrotowego, poboru mocy elektrycznej w funkcjach obrotów i obciążenia na wale (tabela 1). W nominalnym punkcie pracy pompy silnik pompy pobiera 6W mocy, a jego sprawność osiąga 63%. Maksymalny przewidywany pobór mocy wynosi 10W.

Tabela 1. Wyniki pomiarów parametrów silnika przy maksymalnym obciążeniu w czasie pracy pompy dla każdej z prędkości obrotowych.

Prędkość obrotowa [rpm]	Moment obrotowy [mNm]	Pobór mocy przez pompę [W]	Sprawność silnika [%]
2000	12	4	63
3000	12	6	63
4000	12	8	62

Konstrukcja materiałowa pompy

Materiał zastosowany do budowy pompy musi być materiałem zapewniającym biogodność i długoterminową odporność na biodegradację. Materiałami najczęściej stosowanymi w konstrukcji tego typu protez są związki tytanu. W konstrukcji pompy wykorzystano tytan do zastosowań medycznych dostępny w sprzedaży komercyjnej. Materiał ten może zostać permanentnie wszczepiony do ciała ludzkiego. Ponieważ materiał ten jest przewodnikiem elektrycznym, przeprowadzono badania wpływu zastosowanego materiału na rozkład pól magnetycznych i pracę silnika. W takim materiale pod wpływem zmiennego pola magnetycznego (pole pierwotne) dochodzi do generowania prądów wirowych, które indukują wtórne pole magnetyczne przeciwne do pierwotnego. W silnikach z magnesami stałymi umieszczonymi w rotorze zjawisko to jest powszechnie znane jako niekorzystne z punktu widzenia strat energetycznych. W układzie napędowym pompy ReligaHeart-ROT mamy do czynienia z wirnikiem z magnesami ułożonymi naprzemiennie biegunami i zatopionymi w jego tarczach. Pole magnetyczne magnesów podczas wirowania wirnika przenika do obudowy i rdzeni magnetycznych silnika, generując w tych elementach prądy wirowe, a w konsekwencji moment hamujący wirnik. Wpływ tego efektu przebadano stosując w konstrukcji obudowy pompy polimer zamiast tytanu. Wyniki badań potwierdziły korzyść zastosowania w przestrzeni szczeliny silnika materiału dielektrycznego. Momenty hamujące wytwarzane w pompie tytanowej mogą być dwa razy większe od momentów generowanych przez prądy wirowe w samym rdzeniu silnika (tabela 2). Jako akceptowalne dla konstrukcji prototypu pompy przyjęto układy materiałowe: wirnik i obudowa polimerowa – moment hamujący 3,40 mNm oraz wirnik tytanowy i obudowa polimerowa – moment hamujący 3,90 mNm.

Tabela 2. Dane porównawcze momentów hamujących dla różnych konstrukcji materiałowych

Lp.	Zestaw		1 silnik	2 silniki
	Wirnik	Obudowa	I_{wh} [mNm]	I_{wh} [mNm]
1	POLIMER	TYTAN	2,61	5,22
2	POLIMER	POLIMER	1,70	3,40
3	TYTAN	POLIMER	1,95	3,90
4	TYTAN	TYTAN	3,60	7,20

Podsumowanie

W finalnym etapie prac konstrukcyjnych pierwszej polskiej wszczepialnej wirowej pompy odśrodkowej, z wirnikiem zawieszonym i napędzanym w polu magnetycznym, opracowano konstrukcję i wytworzono partię prototypu pompy wspomagania serca ReligaHeart-ROT (rys. 6). W pełni funkcjonalną pompę, w której zastosowano wszystkie opracowane podzespoły, poddano badaniom laboratoryjnym mającym na celu sprawdzenie jej własności eksploatacyjnych. Wyniki badań potwierdzają osiągnięcie wysokiej globalnej sprawności pompy na poziomie 25%. Wydajność pompy pokrywa się z przyjętymi w badaniach numerycznych układu przepływowego warunkom eksploatacyjnym. W pompie nie zaobserwowano zjawisk wskazujących na wadliwą pracę systemu zawieszenia i łożyskowania. Badania przeprowadzono analizując drgania generowane przez pompę.



Rys. 6. Prototyp wirowej pompy wspomagania serca ReligaHeart-ROT

Badania pompy na krwi i pilotażowe badania na zwierzętach ujawniły możliwość wystąpienia nadmiernej hemolizy, której przyczyną może być struktura powierzchni elementów układu przepływowego pompy. Problem ten można wyeliminować wprowadzając do konstrukcji pompy zaawansowane technologie modyfikacji powierzchni kanałów przepływowych. Projekt w tym zakresie realizowany jest aktualnie przez zespół Pracowni Sztucznego Serca w Zabrze, we współpracy z Wydziałem Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej.

Streszczenie

Szybki rozwój technologiczny przyczynił się do dużego postępu medycyny w dziedzinie mechanicznego wspomagania serca. Można zauważyć znaczące zwiększenie poziomu wykorzystywania miniaturowych wszczepialnych pomp długoterminowego wspomagania serca, generujących przepływ ciągły, wytwarzany przez wirujące wirniki (osiowe i odśrodkowe pompy). W Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrze (Polska) podjęto prace nad konstrukcją odśrodkowej wszczepialnej pompy wspomagania lewej komory serca (LVAD) ReligaHeart-ROT.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pod nazwą: „Polskie Sztuczne Serce”

Literatura

- [1] Korczak A., Kustos R., Bujok W., Synowiec T., Altyntsev E., *Pompa odśrodkowa jednostrumieniowa*. Zgłoszenie patentowe nr P.390781 (2010–03–22).

Nowej generacji system pozaustrojowego wspomaganie serca ReligaHeart EXT

Maciej Gawlikowski*, Roman Kustosz*, Artur Kapis*, Wojciech Bujok*, Zbigniew Małota**, Karolina Janiczak*, Lech Czerwiński*, Mirosław Czak*, Maciej Głowacki*, Małgorzata Gonsior*

Summary

Due to persistently increasing number of patients with symptoms of heart failure it is necessary to ensure universal access to modern methods of cardiac treatment and cardiac surgery. Mechanical heart assistance has become commonly accepted method for heart insufficiency treatment in its different stages. There exist several different construction heart prostheses, utilized in order to temporary, long term, and permanent heart supporting. The Artificial Heart Lab of Foundation for Cardiac Surgery Development developed and introduced into clinical practice the first Polish extracorporeal heart assistance system - POCAS. This system, clinically utilized since year 1999, has been applied in treatment of more than 260 patients. The Foundation, within the frame of Polish Artificial Heart Program, has developed a new generation extracorporeal cardiac support system: ReligaHeart EXT

In the paper the results of ReligaHeart EXT system investigations have been presented. First of all, the results of physical and biological in-vitro tests of prosthesis and technical tests of driving unit have been pointed out. Next, the course of in-vivo animal experiments has been commented. It has been proved that the ReligaHeart EXT system meets the technical requirements of its introducing to the first phase of clinical trials.

Keywords: mechanical heart support, cardiac assist system, heart prosthesis, VAD

1. Wstęp

Zgodnie z przewidywaniami ekspertów, w najbliższej przyszłości w samych tylko Stanach Zjednoczonych około 100 000 pacjentów cierpiących na zaawansowaną niewydolność serca będzie potencjalnymi beneficjentami protez serca różnych typów [1]. Około 30% z nich stanowić będą pulsacyjne pompy krwi, stosowane krótko- lub średnioterminowo [2, 3].

W ciągu ostatnich 20 lat liczba stosowanych protez serca uległa istotnemu zwiększeniu. Pod koniec lat 90. XX wieku i na początku XXI wieku dominującym było wspomaganie pompami wytwarzającymi pulsacyjny przepływ krwi [4, 5]. Kamieniem milowymi było wprowadzenie do praktyki klinicznej pneumatycznych, pozaustrojowych systemów wspomaganie serca (m.in. Excor/Berlin Heart [6, 7] i Thoratec PVAD/Thoratec [8, 9, 10]), które w późniejszym czasie ewoluowały w kierunku systemów częściowo implantowalnych:

* Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze – Pracownia Sztucznego Serca.

** Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze – Pracownia Biocybernetyki.

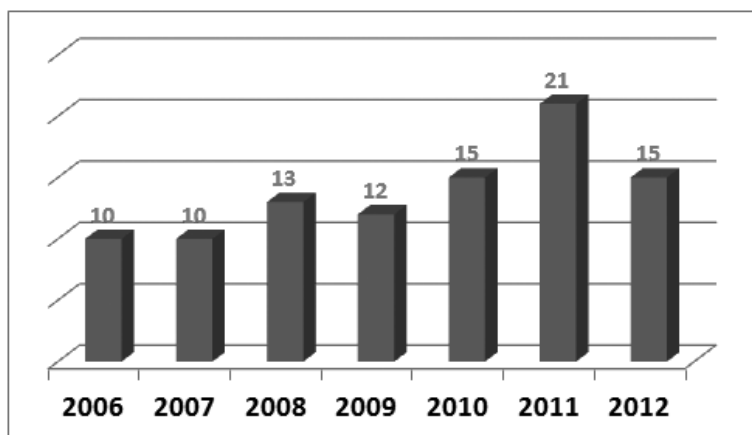
pneumatycznych (Thoratec PVAD/Thoratec [11, 12]) i elektromechanicznych (Heartmate XVE/Thoratec [13]). Równoległe z dynamicznym rozwojem protez pulsacyjnych prowadzone były badania nad wirowymi pompami krwi: osiowymi (m.in. HeartMate II/Thoratec [14], Jarvik 2000/JarvikHeart [15] INCOR/Berlin Heart) i ośrodkowymi (m.in. DuraHeart [16], VentrAssist [17], Levacor [18], HearWare [19, 20]).

Istotne osiągnięcia w dziedzinie mechanicznego wspomagania serca pulsacyjnymi pompami pozaustrojowymi posiada Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi. Opracowany przez Fundację pneumatyczny system wspomagania serca POLCAS (rys. 1) został wdrożony do stosowania klinicznego w 1996 roku [21, 22]. Do chwili obecnej wykonano ponad 265 zabiegów wszczępienia polskich protez serca POLVAD-MEV pacjentom z niewydolnością serca w IV grupie w skali NYHA [23], w przebiegu kardiomiopatii o różnej etiologii, w tym pozawałowej i pozapalnej. W 80% przypadków mechaniczne wspomaganie serca prowadzone było jako pomost do transplantacji, w 19,9% jako pomost do regeneracji serca, a w pozostałych 0,1% przypadków ze wskazań do retransplantacji. We wspomnianych przypadkach wspomagania jedno – lub dwukomorowego zostało zastosowanych łącznie 630 pomp krwi POLVADMEV. System wspomagania serca POLCAS został wdrożony w sześciu klinikach w Polsce.



Rys. 1. Główne elementy systemu wspomagania serca POLCAS: pozaustrojowa proteza serca POLVAD-MEV (po lewej) i sterownik pneumatyczny POLPDU-401-1 (po prawej)

Zgodnie z danymi Poltransplantu [24], w roku 2012 przeprowadzono w Polsce 79 zabiegów transplantacji serca, jednak każdego miesiąca na liście oczekujących do przeszczepu znajdowało się około 240 osób. Stały wzrost liczby pacjentów z ciężkimi schorzeniami serca kwalifikowanych do transplantacji oraz utrzymująca się od lat mała liczba dawców tego narządu skutkują wzrostem zainteresowania terapią mechanicznego wspomaganie serca. Obecnie w Polsce te wysokospecjalistyczne procedury wykonywane są w czterech ośrodkach, a liczba pacjentów wspomaganych systemem POLCAS rośnie sukcesywnie od 2006 roku (rys. 2).



Rys. 2. Liczba wspomagań serca systemem POLCAS

Wieloletnie doświadczenia w klinicznym stosowaniu systemu POLCAS oraz stałe udoskonalanie procedur medycznych i leczenia farmakologicznego zaowocowały bardzo dobrymi rezultatami tej formy terapii (tab. 1). W roku 2012 średni czas wspomaganie serca u jednego pacjenta wynosił 119 dni i wydłużył się aż sześciokrotnie w stosunku do lat poprzednich (20 dni w 2011 roku). Wydłużeniu uległ też średni (z 19 do 39 dni) i maksymalny (z 71 do 267 dni) czas pracy jednej protezy. Ustanowiony został również swoisty rekord w długości wspomaganie, które wynosi obecnie co najmniej 478 dni (pacjent wciąż poddawany jest terapii). Obecnie w Polsce wysokospecjalistyczne procedury mechanicznego wspomaganie serca wykonywane są w czterech ośrodkach.

Tabela 1. Rezultaty kliniczne systemu wspomaganie serca POLCAS

Efekt wspomaganie	Liczba przypadków
transplantacja	53%
regeneracja	7%
kontynuacja wspomaganie	27%
zgon (w tym zgon nie związany ze wspomaganie)	13%

2. System wspomaganie serca ReligaHeart EXT

Pomimo wprowadzenia w stosowanym klinicznie systemie POLCAS licznych udoskonaleń (dotyczących m.in. sposobu kwalifikacji pacjentów, monitorowania pracy pompy krwi, przebiegu leczenia farmakologicznego, wprowadzenia rehabilitacji i opieki psychologicznej), terapii mechanicznego wspomaganie serca towarzyszą pewne incydenty ograniczające jej skuteczność. Należą do nich:

- powikłania zakrzepowo-zatorowe, krwawienia, infekcje w obrębie miejsc wszczepienia kaniul,

- sporadyczne zdarzenia rozłączenia kaniul od protezy serca (0,4% przypadków na przestrzeni 16 lat stosowania systemu POLCAS),
- ograniczenie mobilności pacjenta, wynikające ze stacjonarnego charakteru sterownika pneumatycznego i jego przyłączenia do szpitalnej instalacji pneumatycznej,
- konieczność okresowej wymiany protezy serca, związana z powstawaniem drobnych skrzeplin i zmianami zmęczeniowymi polimeru konstrukcyjnego,
- niezadowalająca dostępność handlowa komercyjnych konstrukcji jednodyskowych zastawek mechanicznych, adaptowanych do zastosowania w protezach serca typu POLVAD.

Na bazie wniosków z wieloletniego, klinicznego stosowania systemu wspomaganie serca POLCAS podjęte zostały badania, których celem było ulepszenie urządzeń i sposobu prowadzenia mechanicznego wspomaganie serca. Prace prowadzone były w odniesieniu do protezy serca, jej sterownika pneumatycznego oraz zastawki mechanicznej.

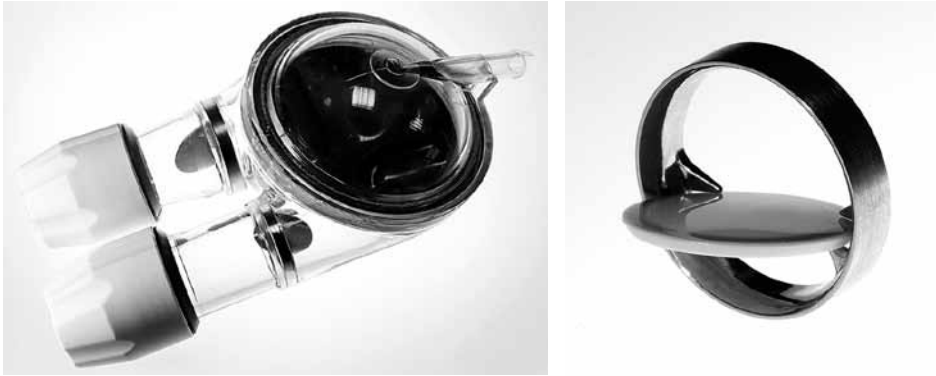
Proteza serca ReligaHeart EXT

Efektom prac prowadzonych w ramach programu wieloletniego „Polskie Sztuczne Serce” było między innymi opracowanie nowej konstrukcji pozaustrojowej, pulsacyjnej pompy wspomaganie serca ReligaHeart EXT, wyposażonej w pierwsze polskie dyskowe zastawki mechaniczne typu Moll (rys. 3). Konstrukcja tej protezy stanowi istotny postęp w stosunku do stosowanej dotychczas klinicznie polskiej protezy POLVAD-MEV. Kluczowe zmiany zostały wprowadzone w następujących obszarach:

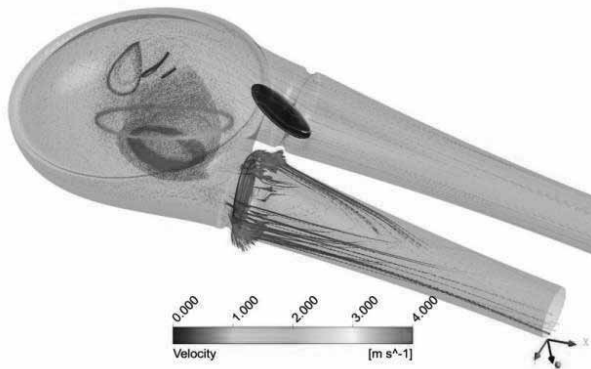
- zmieniono materiał konstrukcyjny protezy (zastosowany został polimer poliwęglanowy o co najmniej trzyletniej odporności na biodegradację),
- zmodyfikowano geometrię części krwistej pompy oraz drogi napływu i wypływu krwi z protezy, celem polepszenia warunków przepływowych protezy,
- wprowadzono rozwiązania istotnie zmniejszające ryzyko rozłączenia kaniul od konektorów pompy krwi,
- ulepszono konstrukcję zespołu membranowego, celem zapobiegania wykrzepianiu krwi w przestrzeniach sąsiadujących z pierścieniem membrany,
- udoskonalono geometrię obszaru łączenia kaniuli z konektorem dla ograniczenia ryzyka powstawania skrzeplin o strukturze nitkowatej,
- opracowano rodzinę jednodyskowych zastawek mechanicznych, dedykowanych protezie ReligaHeart EXT,
- wspólnie z partnerami przemysłowymi wdrożono całkowicie nowe technologie wytwarzania poliuretanowych elementów komór (metodami wtrysku i laminowania) i ich półautomatycznego montażu w dedykowanych stanowiskach wytwórczych.

Konstrukcja protezy ReligaHeart EXT została opracowana w specjalistycznym oprogramowaniu CAD (*Solid Edge*), a powstawanie geometrii jej części krwistej było wspomagane symulacjami CFD (*Ansys*). Dzięki numerycznej weryfikacji właściwości przepływowych poszczególnych wersji geometrii części krwistej protezy przyspieszono proces projektowania, ograniczono liczbę przejściowych modeli fizycznych wytwarzanych metodą szybkiego prototypowania oraz ograniczono koszty realizacji projektu. Zaawansowane symulacje

numeryczne (rys. 4) pozwoliły m.in. na optymalizację kształtu konektora napływowego pompy i wybór najkorzystniejszego z punktu widzenia mechaniki płynów ustawienia kątownego zastawek względem wnętrza komory krwistej.



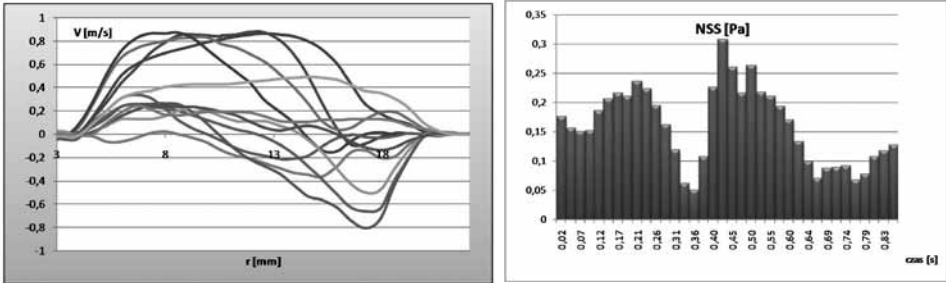
Rys. 3. Pozaustrojowa, pneumatyczna proteza serca ReligaHeart EXT (po lewej) i mechaniczna zastawka jednodyskowa typu Moll (po prawej)



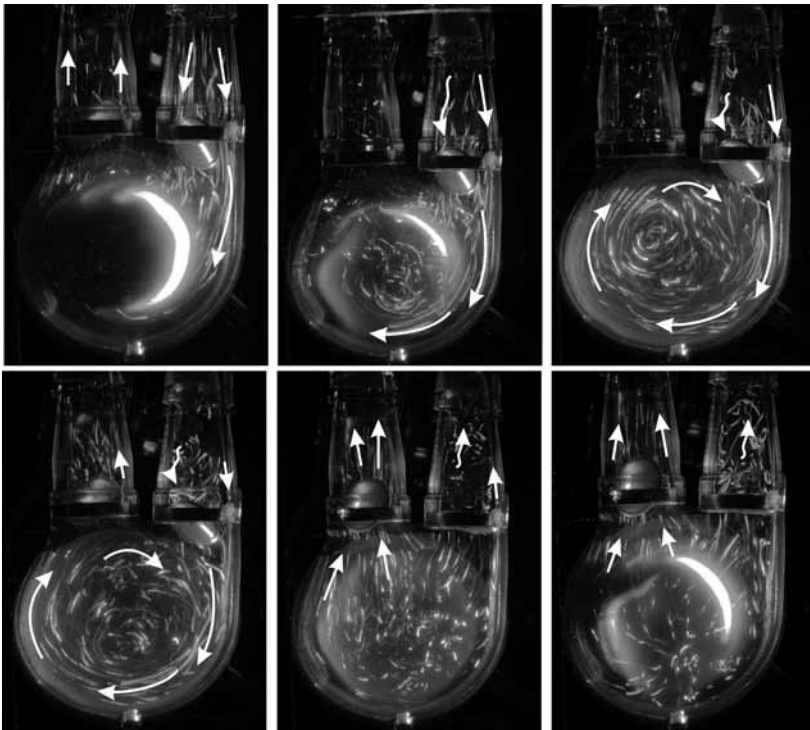
Rys. 4. Przykładowe wyniki symulacji CFD: rozkład wektorów prędkości na liniach prądu w domenie dla położenia zastawki w pozycji 19°

Oprócz symulacji numerycznych struktura przepływu krwi w protezie serca ReligaHeart EXT była badana metodami fizycznymi: dopplerowskim przepływomierzem wielobramkowym i laserową wizualizacją przepływu. Wyniki pomiaru prędkości przepływu „ v ” na poszczególnych głębokościach sondowania „ r ” zostały przedstawione na rysunku 5. Znajomość profilu prędkości przepływu umożliwiła obliczenie wartości naprężeń ścinających, istotnych z punktu widzenia bezpieczeństwa oddziaływania pompy na krew (rys. 5, po prawej). Wyniki laserowego obrazowania linii prądu płynu z powiewem o grubości ziarna 40–60 μm zostały przedstawione na rysunku 6. Badania te dostarczyły cennych danych o wartościach prędkości przepływu wewnątrz pompy, zakresach naprężeń ścinających oddziałujących na składniki morfotyczne krwi oraz stopniu turbulencji

przepływu. Analiza uzyskanych danych umożliwiła ocenę bezpieczeństwa oddziaływania protezy serca na krew jeszcze przed wytworzeniem przedprototypów pomp z biogodnego materiału docelowego.



Rys. 5. Przykładowe wyniki dopplerowskiego pomiaru profilu prędkości przepływu cieczy przez protezę ReligaHeart EXT (po lewej) i odpowiadające im wartości naprężeń ścinających (po prawej)

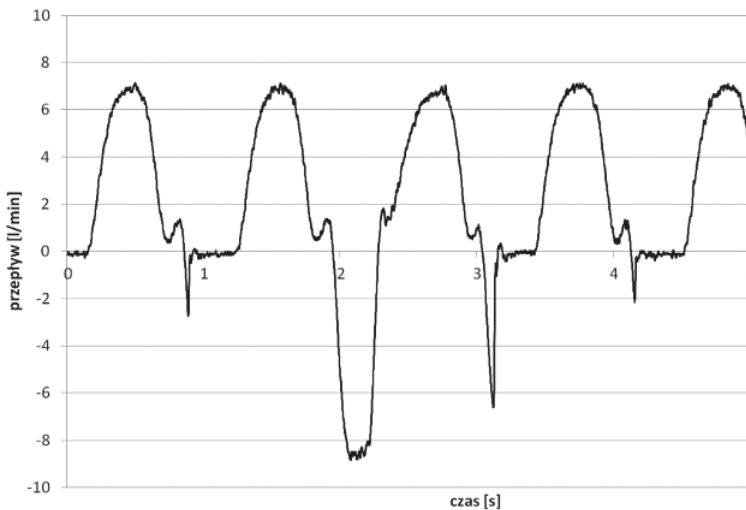


Rys. 6. Laserowa wizualizacja przepływu w protezie ReligaHeart EXT

Na podstawie symulacji numerycznych oraz walidacyjnych wyników badań fizycznych dokonano wyboru finalnej wersji geometrii prototypu protezy ReligaHeart EXT. W dalszej części prac skupiono się nad opanowaniem technologii wytwarzania detali i ich montażu

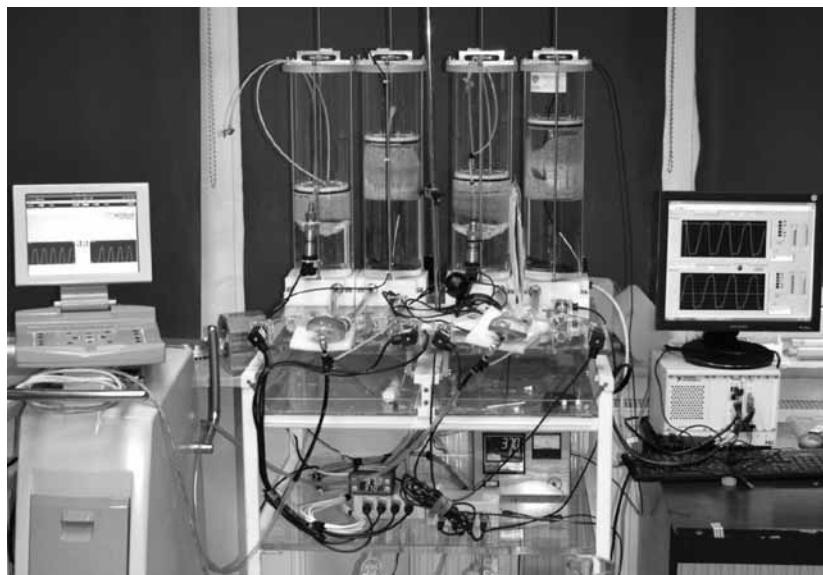
w półautomatycznych stanowiskach wytwórczych. Wytworzone z biogodnego polimeru prototypy pomp ReligaHeart EXT oraz ich zespoły konstrukcyjne zostały poddane szczegółowym badaniom w zakresie właściwości eksploatacyjnych, sposobu oddziaływania na krew oraz bezpieczeństwa podczas pracy długoterminowej w warunkach zmęczenia.

Eksploatacyjne badania hydrodynamiczne dotyczyły pomiaru tych wielkości fizycznych, które mają kluczowe znaczenie podczas stosowania protezy serca na obiekcie biologicznym. Przeprowadzono m.in. pomiary: zależności rzutu jednostkowego protezy od ciśnień sterujących, przepływów wstecznych przez zastawki (statycznych – związanych z istnieniem technologicznej nieszczelności pomiędzy dyskiem a pierścieniem zastawki, oraz dynamicznych – związanych bezpośrednio z procesem ruchu obrotowego dysku podczas zamykania. Rys. 7), strat ciśnienia na membranie oraz prędkości narastania ciśnienia w części hydraulicznej protezy (związanej bezpośrednio z bezpieczeństwem oddziaływania protezy na krew). Do ilościowego porównania wyników otrzymanych w różnych eksperymentach zaproponowano zastosowanie dedykowanych wskaźników matematycznych, m.in. wprowadzono parametr skuteczności hydrodynamicznej pompy krwi, pozwalający na ocenę wpływu pasożytniczych przepływów wstecznych przez zastawki na rzut minutowy protezy serca.



Rys. 7. Przykładowe wyniki badań hydrodynamicznych protezy: charakter przepływu przez zastawkę wypływową ze zdiagnozowanym, pojedynczym cyklem jej niedomykalności

Badania zmęczeniowe przeprowadzono w odniesieniu do zespołów membranowych oraz finalnych konstrukcji protez ReligaHeart EXT. Testy zmęczeniowe prowadzono na dedykowanych stanowiskach, symulujących stosowne obciążenia hydrodynamiczne (rys. 8).



Rys. 8. Stanowisko hydrodynamiczne do badań zmęczeniowych protez ReligaHeart EXT



Rys. 9. Stanowisko krążenia krwi stosowane w badaniach metodą ostrej trombogenności

Ostatnim etapem badań protez serca w warunkach *in vitro* była ocena ich właściwości trombogennych i hemolitycznych w bezpośrednim kontakcie z krwią. Badania przeprowadzono metodą ostrej trombogenności [25, 26]. Istotą tej unikalnej metody badawczej, wdrożonej do stosowania w laboratorium badawczym Fundacji, jest przeprowadzenie kontrolowanego wykrzepiania krążącej krwi w warunkach *in vitro* (rys. 9). Efektem takiego wykrzepiania jest powstanie w badanych urządzeniach (głównie pompach krwi)

skrzeplin, których budowa morfologiczna, lokalizacja i wielkość odpowiadają skrzeplinom powstającym w pompach krwi stosowanych długoterminowo w warunkach *in vivo* (rys. 10). Ze względu na analogie z ludzkim układem krzepnięcia [27], w badaniach stosowana była krew wieprzowa, pobierana podczas uboju zwierzęcia wg procedury opracowanej w Fundacji. Ponadto, podczas krążenia krwi wyznaczano wartość znormalizowanego indeksu wolnej hemoglobiny, co pozwoliło na ocenę właściwości hemolitycznych protezy ReligaHeart EXT.



Rys. 10. Wynik metody ostrej trombogenności – widoczna skrzepina przyklejona do krawędzi dysku i listka zastawki o wadliwym wykończeniu powierzchni

Pneumatyczne sterowniki protez serca

Podstawową wadą stosowanego obecnie w systemie POLCAS sterownika typu POLP-DU-401-1 (rys. 1) jest jego znacznie ograniczona mobilność, wynikająca z konieczności stałego przyłączenia do szpitalnej instalacji pneumatycznej. W programie wieloletnim „Polskie Sztuczne Serce” przeprowadzono intensywne prace nad modernizacją sterownika, zmierzającą ku:

- zwiększeniu jego mobilności poprzez zastosowanie wbudowanego źródła zasilania pneumatycznego, redukcję masy i gabarytów,
- poprawieniu bezpieczeństwa stosowania poprzez unowocześnienie konstrukcji kluczowych elementów sterownika i wprowadzeniu zaawansowanych rozwiązań ich redundancji,
- wprowadzeniu bardziej technologicznych procesów montażu poszczególnych podzespołów.



Rys. 11. Przewoźny, pneumatyczny sterownik protez serca ReligaHeart PDU-402

Efektorem przeprowadzonych prac było skonstruowanie prototypu i wytworzenie pilotażowej serii przewoźnych sterowników typu ReligaHeart PDU-402 (rys. 11). W stosunku do poprzedniego modelu zredukowano masę urządzenia (do około 100 kg), wprowadzono całkowicie autonomiczne źródło zasilania pneumatycznego (kompresor tłokowy pracujący w systemie zamkniętym), zmniejszono gabaryty sterownika, głównie poprzez redukcję objętości zbiorników pneumatycznych, wprowadzono liczne mechanizmy autokontroli urządzenia, rozbudowano system detekcji stanów wyjątkowych i awaryjnych oraz udoskonalono konstrukcję przetwornika elektropneumatycznego, wytwarzającego falę ciśnienia sterującego protezą serca. Urządzenia ReligaHeart PDU-402 przeznaczone były do stosowania wewnątrzszpitalnego, a zastosowane rozwiązania techniczne pozwoliły nie tylko na istotną poprawę mobilności i jakości pracy sterownika, ale również jednoznacznie wskazały kierunki jego dalszego rozwoju.

Kolejny etap prac poświęcony był opracowaniu całkowicie nowego rozwiązania sterownika przenośnego, oznaczonego symbolem ReligaHeart PDU-501 (rys. 12). Głównym założeniem konstrukcyjnym była dalsza redukcja masy i gabarytów sterownika oraz zwiększenie jego

mobilności, przy zachowaniu lub polepszeniu parametrów bezpieczeństwa eksploatacji. Cele te zostały w całości osiągnięte dzięki adaptacji komercyjnego rozwiązania miniaturowych kompresorów tłokowych, wprowadzeniu całkowicie nowej, autorskiej konstrukcji przetwornika elektropneumatycznego z silnikiem liniowym, zastosowaniu nowoczesnych źródeł energii elektrycznej o dużej pojemności oraz całkowitej zmianie koncepcji zasilacza pneumatycznego. W omawianych wcześniej konstrukcjach sterowników POLPDU-401-1 oraz ReligaHeart PDU-402 w zbiornikach pneumatycznych utrzymywane były stałe ciśnienia, które następnie były redukowane przez przetwornik elektropneumatyczny do nastawionych przez operatora wartości ciśnień tłoczenia i napełniania protezy serca. W przenośnym sterowniku ReligaHeart PDU-501 w zbiornikach pneumatycznych utrzymywane są znacznie niższe ciśnienia – równe co do wartości ciśnieniom napełniania i wyrzutu – a funkcję przetwornika elektropneumatycznego ograniczono do roli zaworu przełączającego o regulowanej dynamice pracy. Takie rozwiązanie diametralnie poprawiło właściwości eksploatacyjne sterownika: jego masę zredukowano około czterokrotnie (do 26 kg), ograniczono pobór energii elektrycznej z baterii (co umożliwiło trzykrotne wydłużenie czasu pracy zasilanego w ten sposób sterownika) i fizycznie rozdzielono tory pneumatyczne, sterujące prawą i lewą protezą serca. Jednocześnie w sterowniku serii 501 całkowicie zmodernizowano system elektroniczny i informatyczny, wprowadzono cyfrowe rozwiązania komunikacyjne, dotykowy panel operatora, możliwość zastosowania panelu zdalnego (w postaci komputera PC połączonego ze sterownikiem przewodową

lub bezprzewodową siecią Ethernet), rozbudowano mechanizmy zarządzania energią i wprowadzono zaawansowany system autodiagnostyki urządzenia.

Doświadczenia i wnioski z badań sterownika ReligaHeart PDU-501 stały się bazą do opracowania kolejnej, finalnej koncepcji urządzenia, oznaczonego symbolem DUO (rys. 13). Konstrukcja tego hybrydowego (stacjonarno-przenośnego) sterownika oparta jest o zmodernizowane rozwiązania, zastosowane w sterowniku serii 501, rozbudowane o całkowicie nowy element, którym jest stacja dokująca. Zadaniem stacji dokującej jest nieprzerwane zabezpieczenie zasilania pneumatycznego i elektrycznego dla sterownika przenośnego, jeśli ten znajduje się w stacji. Stacja dokująca ma

charakter stacjonarny, przyłóżkowy, co determinuje jej utrudnioną mobilność. Moduł ten również pełnił funkcje pomocnicze, związane z wygodą użytkownika całego systemu (schowki na przewody, uchwyty na dreny i inne podobne rozwiązania). Przenośna jednostka sterowania pneumatycznego ma charakter mobilny, umożliwiający jej łatwe przenoszenie lub przewożenie na ergonomicznym układzie jezdnym. Sterownik ten przewidziany jest do pracy całkowicie autonomicznej (wewnętrzne źródła zasilania pneumatycznego i elektrycznego) lub do integracji ze stacją dokującą, w przypadku długoterminowego używania przyłóżkowego. Sterownik typu DUO został wyposażony w unikalne rozwiązania zwiększające bezpieczeństwo realizowanego procesu mechanicznego wspomaganie serca. Jednym z nich jest potrójny system zasilania pneumatycznego: źródłem energii pneumatycznej może być autonomiczny kompresor, umieszczony w stacji dokującej, wewnętrzny kompresor jednostki mobilnej lub szpitalna instalacja pneumatyczna. W podobny sposób zapewniona została redundancja źródeł energii elektrycznej. Do wytwarzania ciśnień pneumatycznych w części stacjonarnej i mobilnej zastosowano nowoczesne



Rys. 12. Przenośny, pneumatyczny sterownik protez serca ReligaHeart PDU-501 (po lewej) oraz umieszczony na wózku sterownik wraz z komputerem zdalnego nadzoru (po prawej)



Rys. 13. Hybrydowy sterownik typu ReligaHeart PDU-DUO: widoczna jednostka przenośna umieszczona na stacji dokującej

kompresory spiralne, cechujące się długim czasem bezawaryjnej eksploatacji oraz niskim poziomem emitowanego hałasu.

Wszystkie z omówionych sterowników zostały poddane badaniom eksploatacyjnym, podczas których oceniano najistotniejsze cechy urządzeń: jakość wytwarzanej fali pneumatycznej, sposób współpracy sterownika z protezą serca dla różnych obciążeń hydrodynamicznych, sposób pracy z baterii oraz system zabezpieczeń i sygnalizacji stanów wyjątkowych i awaryjnych. Finalne prototypy sterowników poddano również badaniom bezpieczeństwa i kompatybilności elektromagnetycznej, zgodnie z obowiązującymi aktami normatywnymi.

Badania doświadczalne na zwierzętach

Złożoność zjawisk i procesów biologicznych oraz liczne sprzężenia pomiędzy nimi sprawiają, że w warunkach *in vitro* możliwe jest przeprowadzenie jedynie fragmentarycznych badań protez serca, dotyczących konkretnych efektów ich pracy. Powszechną jest opinia o braku możliwości całościowego zasymulowania obiektu biologicznego, szczególnie tak złożonego jak człowiek. Z tego względu finalną oceną właściwości pozaustrojowego, pneumatycznego systemu wspomagania serca ReligaHeart EXT było przeprowadzenie serii badań doświadczalnych na dużych ssakach. To właśnie badania tego typu pozwalają na wykazanie, czy system wspomagania serca jest wystarczająco bezpieczny i odpowiednio skuteczny, by rozważać jego zastosowanie u człowieka. Przeprowadzenie badań doświadczalnych na zwierzętach było zwięźczeniem opisanych we wcześniejszych rozdziałach doświadczeń fizycznych i testów *in vitro* przeprowadzonych na krwi.

Przystąpienie do badań na organizmach żywych poprzedzone było spełnieniem obowiązujących w Polsce wymogów prawnych (m.in. uzyskaniem stosownej zgody Komisji Bioetycznej).

Przedmiotem przeprowadzonych doświadczeń było wykonanie badań przedklinicznych prototypu pozaustrojowego pulsacyjnego systemu wspomagania serca, w skład którego wchodziła pozaustrojowa proteza wspomagania serca ReligaHeart EXT oraz odpowiedni dla niej sterownik ReligaHeart PDU-501. Celem doświadczenia była ocena przedkliniczna poprawności funkcjonowania prototypu protezy serca w krótko – i długoterminowych eksperymentach wspomagania lewokomorowego. Przeprowadzono 9 eksperymentów krótkoterminowych i 3 długoterminowe. W badaniach wykorzystano 12 samców świni rasy Wielka Biała Polska (*Sus scrofa f. domestica*) o masie ciała w zakresie 60–80 kg. Zwierzęta przed zabiegiem poddano kwarantannie i aklimatyzacji.

Zabiegi implantacji pozaustrojowej protezy wspomagania serca (rys. 14) przeprowadzono w pełnym znieczuleniu wziewnym i zabezpieczeniu przeciwbólowym. W trakcie zabiegu monitorowano sygnały życiowe zwierzęcia: EKG, saturację i ciśnienie tętnicze. Klatkę piersiową zwierzęcia otwarto z torakotomii bocznej lewostronnej w IV międzyżebżu. Drogę napływu krwi z układu krążenia do protezy przygotowano poprzez podłączenie kaniuli napływowej do uszka lewego przedsionka. Drogę wypływu krwi z protezy do układu krążenia przygotowano poprzez przyłączenie końca graftu kaniuli wypływowej protezy do boku aorty. Kaniule poprowadzono w poprzek lewego boku w tkance podskórnej i wyprowadzono je z lewej strony grzbietu zwierzęcia.

Po zakończeniu implantacji, uruchomieniu protezy i zamknięciu klatki piersiowej zwierzę przetransportowano na salę pooperacyjną do specjalnie przygotowanego kojca (rys. 14). Podłączono aparaturę monitorującą: ciśnienie krwi tętniczej, przepływ krwi w kaniuli wypływowej protezy, EKG, temperaturę ciała. Po ustabilizowaniu prawidłowego własnego oddechu i stabilizacji wymiany gazowej w płucach zwierzę ekstubowano. Pono i karmiono zwierzę według potrzeb, monitorowano bilans płynów oraz podawano osłonę antybiotykową i przeciwbólową. W określonym schemacie czasowym wykonywano panel oznaczeń diagnostycznych (hematologia, koagulologia, biochemia, gazometria, elektrolity oraz dodatkowe badania diagnostyczne, niezbędne dla prowadzenia leczenia pooperacyjnego). Prowadzono obserwację komory wspomagania serca pod kątem oceny ewentualnego gromadzenia się materiału zatorowego. Czas obserwacji w krótkoterminowych eksperymentach wynosił średnio 7 dni, w długoterminowych 33 dni. Każdorazowo po zakończeniu doświadczenia protezę serca zabezpieczono do oceny makroskopowej i mikroskopowej. Następnie wykonywano pełną autopsję zwierzęcia wraz z oceną stanu narządów pod kątem wystąpienia objawów ognisk zapalnych, niedokrwiennych, zatorowych lub krwotocznych. Próbkę pobrane z narządów wewnętrznych zwierzęcia zabezpieczono do analizy histopatologicznej.



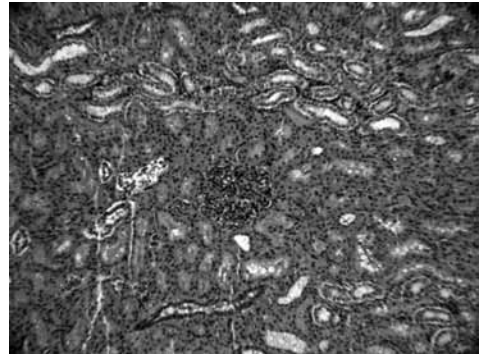
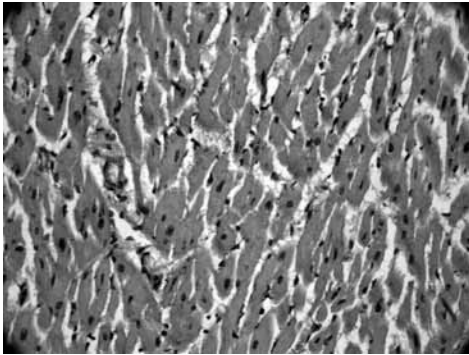
Rys. 14. Zabieg wszczęcia protezy serca ReligaHeart EXT (po lewej) oraz zwierzę prowadzone na sali pooperacyjnej (po prawej)

Ocena makroskopowa protez serca po zakończonych doświadczeniach długoterminowych wykazała jedynie drobne zmiany, w postaci punktowych, niewielkich skrzeplin w obrębie membrany i czaszy krwistej, białej, zorganizowanej skrzepliny na powierzchni membrany i niewielkiej zorganizowanej skrzepliny w obrębie naroża membrany (rys. 15). Ocena immunohistochemiczna powierzchni wewnętrznej badanych protez wykazała jedynie lokalne zjawiska adhezji wybranych elementów morfotycznych krwi. W badaniach histopatologicznych (rys. 16) i autopsyjnych stwierdzono prawidłowy obraz i strukturę



tkanek wątroby, trzustki i nerek oraz zidentyfikowano jeden przypadek zmian zawałowych w obrębie śledziony. Wykazano, że zmiany w postaci zrostów w obrębie śródpiersia i jamy opłucnowej są wynikiem przeprowadzonego zabiegu implantacji pozaustrojowej pompy wspomaganie serca. W nielicznych przypadkach obserwowano również zmiany zapalne tkanek wokół kaniul, spowodowane florą bakteryjną zwierząt.

Rys. 15. Proteza ReligaHeart EXT po 30 dniach stosowania w badaniach doświadczalnych na zwierzętach. Widoczne drobne, punktowe skrzeplinki, zadherowane do powierzchni czaszy krwistej w obszarze sąsiadującym z konektorem wypływowym



Rys. 16. Przykładowe wyniki badań histopatologicznych zwierzęcia po 30 dniach wspomaganie serca protezą ReligaHeart EXT: widoczna prawidłowa budowa tkanki mięśnia lewej komory serca (po lewej) i nerki (po prawej)

3. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone prace badawcze nad opracowaniem nowego, pozaustrojowego systemu wspomaganie serca ReligaHeart EXT objęły wszystkie istotne aspekty mające wpływ na bezpieczeństwo i skuteczność jego zastosowania na organizmie żywym.

- W zakresie protezy serca przeprowadzono liczne symulacje numeryczne, wspomagające wybór optymalnego pod względem hydrodynamicznym kształtu elementów przepływowych części krwistej. Wyniki symulacji zostały potwierdzone w eksperymentach fizycznych, przeprowadzonych na modelach wytworzonych metodą szybkiego prototypowania. W dalszej części przeprowadzono badania prototypów protez ReligaHeart EXT wykonanych z materiału docelowego. Testy te obejmowały zmęczeniowe aspekty pracy długoterminowej, pomiar właściwości eksploatacyjnych protezy oraz jej oddziaływania na składniki morfotyczne krwi.

- W odniesieniu do pneumatycznego sterownika protez serca dokonano istotnego rozwoju konstrukcji wyjściowej, zmniejszając jej masę, niezawodność pracy, polepszając właściwości mobilne i zwiększając czas pracy z baterijnego źródła zasilania. Sterownik wyposażono w rozwiązania techniczne pozwalające na jego zdalne monitorowanie i sterowanie. Przeprowadzono stosowane badania normatywne oraz uprawniające do zastosowania urządzenia w badaniach na organizmach żywych.

W badaniach doświadczalnych, prowadzonych na zwierzętach, potwierdzono wyniki uzyskane w badaniach laboratoryjnych, a także wykazano, że proteza serca ReligaHeart EXT cechuje się dobrymi właściwościami atrombogennymi i nie oddziałuje negatywnie na tkanki i narządy zwierzęcia, a sterownik ReligaHeart PDU-501 jest zdolny do prawidłowego i bezpiecznego napędzania protez w ujęciu długoterminowym.

Przedstawione w pracy wyniki, uzyskane na wszystkich etapach badań fizycznych i biologicznych, uprawniają do stwierdzenia, że nowa generacja pozaustrojowego, pneumatycznego systemu wspomaganie serca ReligaHeart EXT spełnia wszelkie wymogi techniczne do jego wprowadzenia do fazy badań klinicznych. Przedsięwzięcie takie planowane jest po spełnieniu obowiązujących w Polsce wymogów prawnych.

Streszczenie

Stale rosnąca liczba chorych z objawami niewydolności serca wymaga zapewnienia powszechnej dostępności do najnowocześniejszych metod leczenia kardiologicznego i kardiochirurgicznego. Mechaniczne wspomaganie serca stało się powszechnie uznaną metodą leczenia niewydolności serca w różnych jej stadiach. Na świecie istnieje kilkanaście różnych konstrukcji protez serca, stosowanych odpowiednio do czasowego, długoterminowego i permanentnego wspomaganie serca. Pracownia Sztucznego Serca Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii opracowała i wprowadziła do stosowania klinicznego pierwszy polski system pozaustrojowego wspomaganie serca – POLCAS. System ten stosowany klinicznie od roku 1999 był wszczepiony ponad 260 chorym. W ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” Fundacja opracowała pozaustrojowy system wspomaganie serca nowej generacji – ReligaHeart EXT.

W pracy zaprezentowane zostały wyniki badań systemu wspomaganie serca ReligaHeart EXT. Przedstawiono wyniki badań fizycznych i biologicznych protezy serca, prowadzonych w warunkach *in vitro*, oraz badań technicznych sterowników. W dalszej części zaprezentowano przebieg i rezultaty badań doświadczalnych na zwierzętach. Wykazano, że system ReligaHeart EXT spełnia wymogi techniczne niezbędne do jego wprowadzenia do fazy badań klinicznych.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pod nazwą: „Polskie Sztuczne Serce”

Literatura

- [1] online: <http://www.micromedcv.com/eu/>
- [2] Wiesentahler G., *Medical milestones and challenges in destination therapy*, XXXVIII Congress of European Society for Artificial Organs, Porto, 2011.
- [3] Schima H., *Cardiac assist devices: a long and winding road to a big success*, XXXVIII Congress of European Society for Artificial Organs, Porto, 2011.
- [4] Klein A., Lewis C., Madsen J. C., *Organ transplantation: a clinical guide*, Cambridge University Press, Cambridge, 2011.
- [5] Deng M. C., Yoshifumi N., *Mechanical circulatory support therapy in advanced heart failure*, Imperial College Press, London, 2007.
- [6] Drews T., Loebe M., Jurmann M., zu Dohna R., Erben M., Hetzer R., *Outpatients on mechanical circulatory support*, *Ann Thorac Surg*, 75, 2003.
- [7] Merkle F., Boettcher W., Stiller B., Hetzer R., *Pulsatile mechanical cardiac assistance in pediatric patients with the Berlin Heart ventricular assist device*, *J Extra Corpor Technol*. 35(2), 2003.
- [8] McBride L. R., Naumheim K. S., Fiore A. C. et al., *Clinical experience with 111 Thoratec ventricular assist devices*, *Ann Thorac Surg*, 67(5), 1999.
- [9] Körfer R., El-Banayosy A., Arusoglu L. et al., *Temporary pulsatile ventricular assist devices and biventricular assist devices*, *Ann Thorac Surg*, 68(2), 1999.
- [10] El-Banayosy A., Körfer R., Arusoglu L. et al., *Bridging to cardiac transplantation with the Thoratec Ventricular Assist Device*, *Thorac Cardiovasc Surg*, 47, 1999.
- [11] Slaughter M., Tsui S., El-Banayosy A. et al., *Results of a multicenter clinical trial with the Thoratec Implantable Ventricular Assist Device*, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133, 2007.
- [12] Tsukui H., Teuteberg J., Murali et al., *Biventricular assist device utilization for patients with morbid congestive heart failure*, *Circulation*, 112, 2005.
- [13] Pagani, F.D., Long J. W. et al., *Improved mechanical reliability of the HeartMate XVE left ventricular assist system*, *Ann Thorac Surg*. 82(4), 2006.
- [14] Griffith B. P., Kormos R. L. et al., *HeartMate II left ventricular assist system: from concept to first clinical use*, *Ann Thorac Surg*. 71, 2001.
- [15] Frazier O. H., Myers T. J., Jarvik R. K. et al., *Research and development of an implantable, axial-flow left ventricular assist device: the Jarvik 2000 heart*, *Ann Thorac Surg*. 71(3), 2001.
- [16] Komoda T., Weng Y., Hetzer R. et al., *Implantation technique for the DuraHeart left ventricular assist system*, *J Artif Organs*, 10, 2007.
- [17] Esmore D. et al., *VentrAssist left ventricular assist device: clinical trial results and Clinical Development Plan update*, *Eur Jour Cardio-Thorac Surg*, 32(5), 2007.
- [18] Harish Ramakrishnal H., Dawn E., Jaroszewski E. D., Arabia F. A., *Adult cardiac transplantation, A review of perioperative management*, *Ann Card Anaesth* 12(2), 2009.
- [19] *HeartWare Ventricular Assist Device System, Instruction for use*, HeartWare Inc, Miami USA. 2009.
- [20] Larose J. A., Tamez D., Ashenuga M., Reyes C., *Design concepts and principle of operation of the HeartWare ventricular assist system*, *ASAIO Journal* 56(4), 2010.
- [21] Nawrat Z., *Sztuczne serce, Badania sztucznego serca w Polsce* [w:] Darowski M., Orłowski T., Weryński A., Wójcicki J. M., *Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000. Tom 3. Sztuczne narządy*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa, 2001.

- [22] Pacholewicz J., Kucewicz E., Zakliczyński M., Niklewski T., Kubacki K., Kustosz R., Zembala M., *Regeneracja serca poprzez odbarczenie długoterminowym mechanicznym wspomaganie serca polską komorą typu POLVAD – opis przypadku*, *Kardiologia i Torakochirurgia Polska*, 5(3), 2008.
- [23] Litwiński P., Religa G., Pastuszek M., Parulski A., Religa Z. et al., *Zastosowanie mechanicznego wspomaganie krążenia sztucznymi komorami typu POLVAD w leczeniu wstrząsu kardiogenego na tle zapalenia mięśnia sercowego*, *Kardiologia i Torakochirurgia Polska*, 2(4), 2005.
- [24] online, www.poltransplant.com.pl
- [25] Paul R., Marseille O., Hintze E., Huber L., Schima H., Reul H., *In vitro thrombogenicity testing of artificial organs*, *Int Jour Artif Organs*, 21(9), 1998.
- [26] Gawlikowski M., Gorka K., Kapis A., Kustosz R., Bujok W., *Investigation of thrombogenesis and hemolysis in the polish pediatric ventricular assist device*, *Int J Artif Organs*, 33(7), 2010.
- [27] Mount L.E., Ingram D.L., *The pig as a laboratory animal*, Academic Press, London, 1971.

Polska jednodyskowa mechaniczna zastawka typu Moll, przeznaczona do stosowania w pozaustrojowych komorach wspomagania serca ReligaHeart EXT – Sposób wytwarzania i montażu oraz badania kwalifikacyjne zastawek

Agnieszka Szuber*, Maciej Głowacki*, Maciej Gawlikowski*, Artur Kapis*, Roman Kustosz*, Małgorzata Gonsior*, Tomasz Rusin**, Tomasz Machoczek**

Summary

Foundation for Cardiac Surgery Development has developed, within the frame of Polish Artificial Heart Program, a new extracorporeal cardiac support device: ReligaHeart EXT. The pump, due to the original for all pulsatile heart assist device develop in Artificial Heart Laboratory in Zabrze asymmetric blood house shape, has a very profitable path of blood flow stream, washing the edge of blood pumping membrane. The tilting disk valve has an important role in blood flow path creation. Properly oriented valve disks create entering and launching out blood flow path. The ReligaHeart pump is equipped with Polish, monodisc mechanical valve, designed by Fluid-Flow Machinery Department of Technical University Łódź, in collaboration with the Artificial Heart Laboratory for Cardiac Surgery Development Foundation. There have been developed constructions of valves of 6 different sizes, basing on the concept of prof. J.Moll. The valves are dedicated to work in ReligaHeart EXT device for adult patients and ReligaHeart PED pumps for children. A special procedure, which utilizes original mounting stands, has been developed for disc mounting in valve ring precision and quality of valve montage is a key factor for proper valve functioning. Each valve has to pass qualification test cycle before assembled to heart prosthesis. Test special procedure has been developed for hydrostatic and hydrodynamic valve properties examination. The positive results of all tests constitute the main criterion for assembling valve to extracorporeal heart support prosthesis, followed by final product application to target utilization.

Keywords: mechanical heart valve, artificial heart support, pulsatile heart prosthesis

1. Wprowadzenie

W ciągu ostatnich dziesięcioleci zwiększa się liczba chorych z objawami niewydolności serca. Stanowi to poważny problem i pociąga za sobą konieczność zapewnienia powszechnej dostępności do najnowocześniejszych metod leczenia kardiologicznego

* Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze – Pracownia Sztucznego Serca.

** Wydział Mechaniczny Technologiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

i kardiochirurgicznego. Trwające już ponad 20 lat prace w Pracowni Sztucznego Serca w Zabrzu zaowocowały powstaniem pozaustrojowej komory wspomaganie serca. Stosowana dotychczas w Polsce pozaustrojowa komora wspomaganie serca POLVAD-MEV wyposażona jest w jednodyskowe zastawki komercyjne, które obecnie zostały wycofane z produkcji, ze względu na coraz mniejsze ich wykorzystanie w zastosowaniach klinicznych. Zastawki te doskonale sprawdzały się w przypadku współpracy ze sztucznymi komorami, dlatego też w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” opracowano nie tylko nową pozaustrojową pompę wspomaganie serca ReligaHeart EXT dla pacjentów dorosłych, ale także podjęto próby wyposażenia jej w polskie, jednodyskowe zastawki o niskim profilu elementów prowadzących dysk – obniżającym turbulencje przepływu krwi przez zastawkę i ryzyko aktywacji wykrzepiania krwi w jej obszarze. Instytut Maszyn Przepływowych Politechniki Łódzkiej, we współpracy z Pracownią Sztucznego Serca Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii, opracował konstrukcję 6 rozmiarów zastawki typu Moll. Zastawki są przeznaczone do stosowania we wspomnianej pozaustrojowej komorze wspomaganie serca ReligaHeart EXT dla pacjentów dorosłych i w protezach ReligaHeart PED dla dzieci. Każda z zastawek wymaga odpowiedniego montażu w specjalnie przygotowanych narzędziach. Dobór właściwego sposobu montażu zastawki ma wielkie znaczenie dla poprawnej pracy zastawki. Równie ważny jest dobór odpowiedniej pary materiałowej „pierścienia – dysk” zastawki. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie genezy powstawania zastawki od momentu projektu, poprzez wytwarzanie pierścieni i dysków zastawki z odpowiednich materiałów, montaż dysku w pierścieniu zastawki, aż do wytworzenia gotowego produktu przekazywanego do hydrodynamicznych badań kwalifikacyjnych.

2. Materiały i metody

Sposób wytwarzania elementów zastawki, stosowane materiały



Zastawka typu Moll składa się z dwóch części: pierścienia i dysku zastawki (rysunek 1). Pierścienie zastawki wykonywane są z tytanu metodą frezowania, dyski zaś uzyskujemy na dwa sposoby: metodą frezowania lub metodą wtrysku wysokociśnieniowego z materiału polimerowego. Każdy z wyżej wymienionych detali poddawany jest obróbce wykańczającej, mającej na celu uzyskanie odpowiedniej gładkości powierzchni, odpowiedniej dla detali stosowanych na implanty długoterminowe.

Rys. 1. Od lewej: materiały do wytwarzania elementów zastawki, zastawka typu Moll

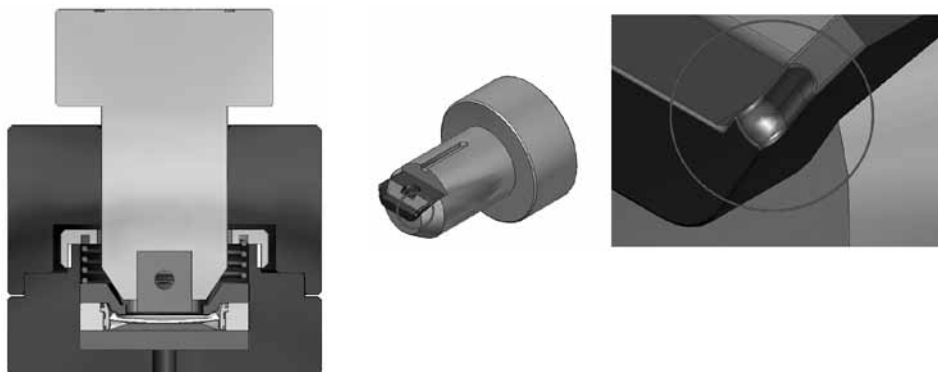
Montaż zastawek

Bardzo ważnym etapem powstawania mechanicznej zastawki serca typu Moll jest jej montaż. Właściwe uchwycenie dysku w pierścieniu decyduje o poprawności jej działania. Montaż zastawek polega na zamknięciu dysku w uchwytach pierścienia zastawki (rysunek 2) za pomocą odpowiedniego stempla.



Rys. 2. Mechaniczna zastawka jednopłatkowa typu Moll

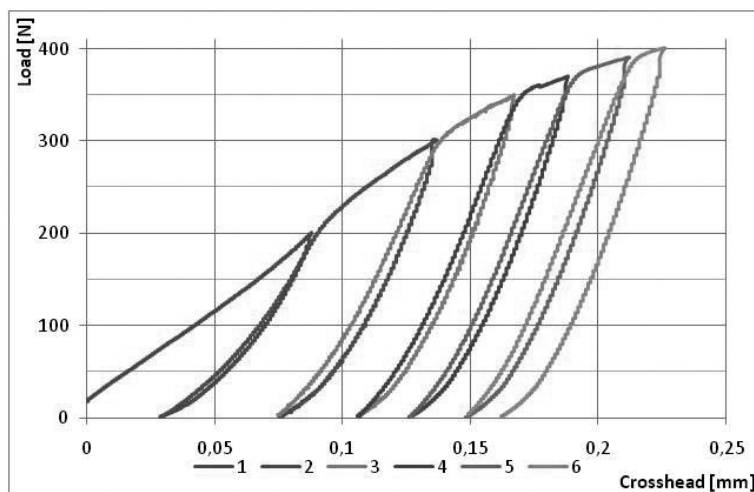
Na potrzeby metody montażu skonstruowano specjalne narzędzie do prowadzenia stempla (rysunek 3). W celu umożliwienia szybkiej wymiany stempla, w razie potrzeby zmiany konstrukcji lub w przypadku jego zużycia, stempel skonstruowano z dwóch części – rdzenia i wkładki. Geometria wkładki stempla jest odwzorowaniem kształtu pierścienia zastawki w pozycji dogiętej. Wkładki są wymienne – odpowiednie dla każdego rozmiaru zastawki (rysunek 3).



Rys. 3. Od lewej: model 3D narzędzia do montażu zastawki, dwuczęściowy stempel, rdzeń stempla i wkładka

Proces doginania „kolców” prowadzony jest pod kontrolą siły i przemieszczenia. Badania procesu doginania przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej MTS 10kN. Za każdym razem prędkość trawersy wynosiła 1 mm/min w trakcie doginania oraz 0,2 mm/min przy powrocie, aż do uzyskania poziomu siły 0 N. Częstotliwość zbierania danych wynosiła 10 Hz. Rejestrowano drogę, jaką przebyła trawersa, siłę i czas. Prędkość trawersy przy powrocie była pięciokrotnie mniejsza od prędkości trawersy w trakcie doginania „kolców”. Takie ustawienie parametrów zapewniało pełną relaksację próbki w trakcie pomiaru. Maszyna wytrzymałościowa precyzyjnie mierzyła siłę wywieraną na badany materiał i drogę trawersy (z rozdzielczością 1 mikrona). Jednak całkowita droga trawersy nie jest równa wartości dogięcia kolców pierścienia, ponieważ oprócz „kolców” pierścienia ugina się również cały układ pomiarowy, adaptory, czujnik siły itd. Dodatkowo trawersa w trakcie doginania mierzy zarówno odkształcenie plastyczne „kolców” jak i odkształcenie elastyczne „kolców”, pierścienia i całego układu pomiarowego. Aby dokonać pomiaru odkształcenia plastycznego „kolców” (trwałego odkształcenia) doginanie „kolców” każdego pierścienia do założonej wartości wykonywano poprzez kilka cykli obciążania i odciążania. Odkształcenie plastyczne odczytywano w momencie całkowitego odciążenia próbki. Na rysunku 4 przedstawiono przykładowe cykle obciążania „kolców” do wartości 400 N oraz odciążania do wartości 0 N. Maksymalna wartość przesuwu trawersy w punkcie obciążania 400 N wynosi 0,225 mm (odkształcenie plastyczne i el-

styczne kolców oraz całego układu pomiarowego). Przy powrocie w punkcie odciążenia próbki (0 N) pozostaje tylko trwałe odkształcenie kolców pierścienia, w tym wypadku wartość 0,162 mm. Cykle wykonywano aż do momentu uzyskania żądanego trwałego (plastycznego) odkształcenia kolców (rysunek 4 – wykresy od 1 do 6). W momencie uzyskania nominalnego przemieszczenia zastawka była wyciągana z narzędzia i sprawdzano poprawność zamontowania dysku w pierścieniu. Jeśli dysk nie był poprawnie zamocowany (wypadanie dysku z pierścienia), to proces był powtarzany.



Rys. 4. Przykładowy wykres prezentujący zależność siła/droga (Load/Crosshead) w trakcie doginania i odciążania kolców pierścienia

Badania kwalifikacyjne zastawek

Ze względu na charakter badań, czyli wykorzystanie badanego materiału w eksperymentach *in vivo* oraz zastosowaniu klinicznym, były one wykonane z zachowaniem należytych wymogów czystości. Metodologia badań została zaczerpnięta z normy PN-EN ISO 5840 „Implanty sercowo-naczyniowe – Protezy zastawek serca”.

Badania zostały przeprowadzone wedle procedury, dla której uzyskanie oceny pozytywnej było kryterium decydującym o montażu badanej zastawki do pozaustrojowej komory wspomaganie serca, a następnie aplikacji protezy do docelowego zastosowania. Procedura przebiega dwuetapowo: w pierwszym etapie zbierane są dane o zastawce, które pozwalają ją zakwalifikować (lub zdyskwalifikować) do montażu w protezie wspomaganie serca, w drugim natomiast zastawki montowano w komorze wspomaganie serca ReligaHeart, celem uzyskania weryfikacji wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań.

Etap kwalifikacyjny zastawek typu Moll do montażu w protezie ReligaHeart obejmował:

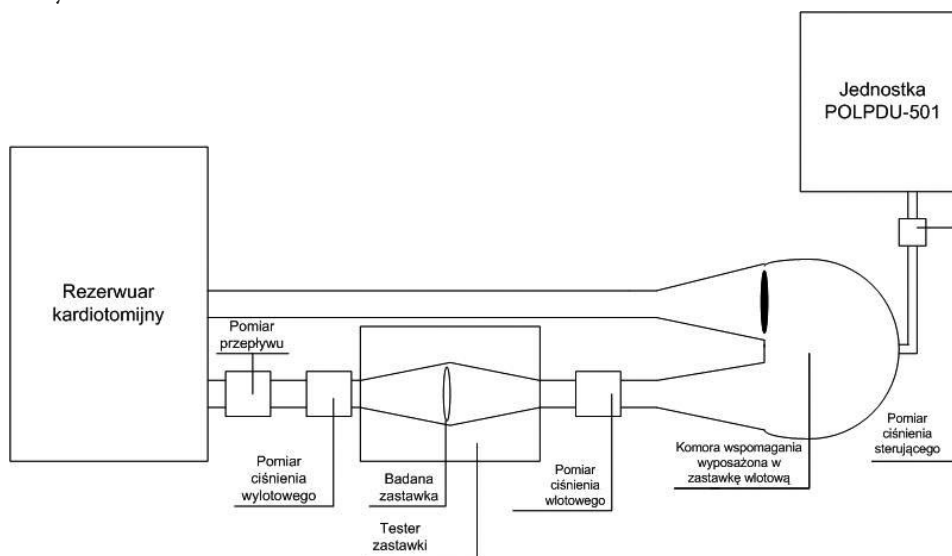
- pomiar przepływów wstecznych statycznych oraz dynamicznych zastawek typu Moll oraz porównanie otrzymanych wyników z wartościami otrzymanymi dla materiału referencyjnego,
- ocenę kinetyczną sposobu zamykania się zastawki na podstawie filmu szybkiego,
- pomiar kąta otwarcia dysku i pola powierzchni przepływu swobodnego.

Etap weryfikacji uzyskanych wyników dla komory ReligaHeart, wraz z zamontowanymi zastawkami typu Moll, obejmował:

- ocenę pracy zastawek na podstawie analizy poklatkowej materiału filmowego wykonanego kamerą szybką,
- pomiar przebiegów dynamicznych pracy komory, wraz z badaniem kontrolnym przepływu medium przez zastawki.

Pomiar przepływów wstecznych statycznych oraz dynamicznych zastawek typu Moll oraz porównanie otrzymanych wyników z wartościami otrzymanymi dla materiału referencyjnego

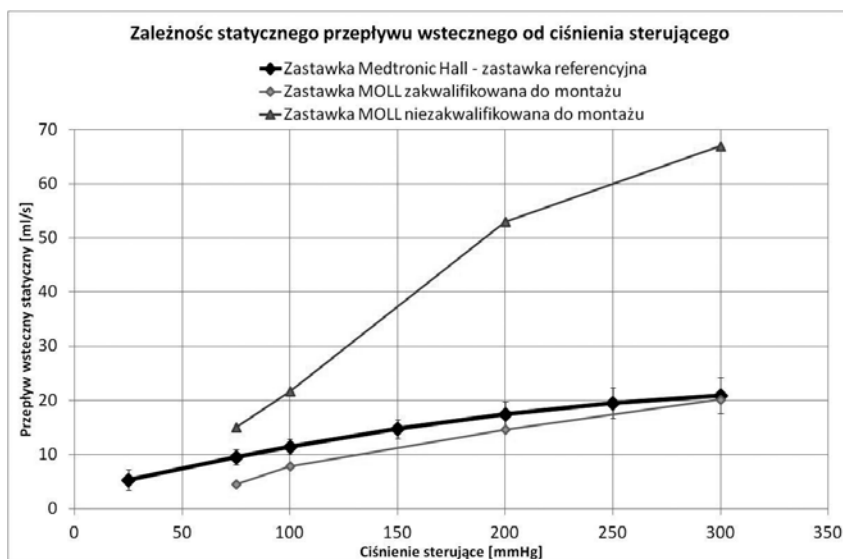
Stanowisko do badań przepływów wstecznych statycznych oraz dynamicznych składa się z testera, w którym montowana jest zastawka, podłączonego do zbiornika z wodą i do komory wspomagania, wymuszającej statyczny przepływ cieczy przez badaną zastawkę. W zależności od konfiguracji stanowiska umożliwia ono badanie przepływów wstecznych oraz przebiegów dynamicznych przez badane zastawki. Tester realizuje pomiar różnicy ciśnień występujących na zastawce, pomiar przepływu medium przez zastawkę, oraz z uwagi na wykonanie go z przezroczystych materiałów film poklatkowy nagrywany z prędkością 1200fps. Napęd pneumatyczny protezy realizowany jest za pomocą jednostki sterującej ReligaHeart PDU-501 (POLPDU-501). Schemat stanowiska został przedstawiony na rysunku 5.



Rys. 5. Schemat stanowiska do badań statycznych przepływów przez zastawkę typu Moll

Zastawka montowana jest w gnieździe dedykowanym do każdego rozmiaru zastawki z osobna. Gniazda zapewniają szczelne uchwycenie zastawki na obwodzie tytanowego pierścienia, tak by pomiar przepływu przez kanał zastawki był możliwie najpewniejszy.

Etapem procedury następującym po wykonaniu pełnego panelu badań przepływów jest analiza wyników i odniesienie ich do wartości referencyjnych. Bazę danych wartości referencyjnych stanowią wyniki badań uzyskane w badaniu komercyjnie dostępnych modeli mechanicznych zastawek jednodyskowych. Na rysunku 6 przedstawiono przykładowy wykres wyników badań przepływów wstecznych dla dwóch zastawek typu Moll, w odniesieniu do wartości referencyjnych z naniesionym przedziałem ufności. Procedura wymaga, aby uzyskane wyniki badań statycznych przepływów wstecznych nie były większe od wartości referencyjnych wraz z ich przedziałem ufności. Przedstawiona na czerwono seria pomiarowa przedstawia zastawkę, która nie spełnia wymogów kwalifikacyjnych ze względu na wystąpienie przepływów wstecznych większych od wartości referencyjnych. Dla porównania przedstawiono wyniki uzyskane przez zastawkę zaznaczoną na zielono, która uzyskała pozytywny wynik w badaniach kwalifikacyjnych. Jej wsteczne przepływy statyczne są mniejsze niż wymagane w procedurze kwalifikacji.

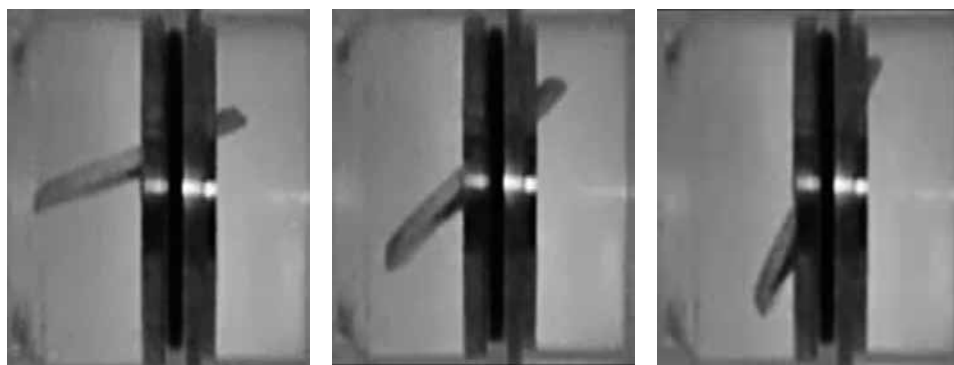


Rys. 6. Zależność statycznego przepływu wstecznego od ciśnienia sterującego

Ocena kinetyczna sposobu zamykania się zastawki na podstawie filmu szybkiego

Stanowisko pomiaru oceny kinematycznej sposobu zamykania się zastawki jest ściśle zintegrowane ze stanowiskiem pomiaru przepływów wstecznych statycznych oraz dynamicznych zastawek typu Moll. Rejestracja materiału filmowego dokonywana jest za pomocą kamery szybkiej z prędkością 1200 fps. Analiza materiału filmowego (fragment cyklu pracy zastawki został przedstawiony na rysunku 7) pozwala na wyznaczenie czasu trwania zamknięcia się zastawki oraz na uchwycenie dysfunkcyjności jej działania, które są informacją o mechanicznych defektach zastawki. Mechaniczne dysfunkcje, jakie mogą wystąpić, to: blokowanie się dysku w elementach prowadzących, niedomykalność dysku

lub opieranie się dysku o pierścień zastawki. Każda z wyżej wymienionych dysfunkcji jest okolicznością dyskwalifikującą zastawkę z montażu w komorze ReligaHeart.



Rys. 7. Etapy zamykania się zastawki

Pomiar kąta otwarcia dysku i pola powierzchni przepływu swobodnego

Zastawki podlegają dokumentacji fotograficznej o wysokiej rozdzielczości na dedykowanym stanowisku. Parametrami podlegającymi badaniu jest kąt otwarcia dysku (rysunek 8) oraz pole swobodnego przepływu (rysunek 9).



Rys. 8. Zastawka typu Moll sfotografowana z boku



Rys. 9. Widok zastawki od przodu

Ocena pracy zastawek zamontowanych w komorze ReligaHeart na podstawie analizy poklatkowej materiału filmowego, wykonanego kamerą szybką

W dalszej części badań, gdy zastawki uzyskały kwalifikację i zostały umieszczone w komorze, ich praca podlegała takiej samej ocenie, jak dla zastawek przed zamontowaniem (rysunek 10). Ocenie podlegały: stopień domknięcia zastawki, balotowanie dysku w płynącej strudze i przebieg procesu zamykania zastawki. Rejestracji obrazu dokonywano poklatkową kamerą cyfrową z prędkością 1200 fps. Powtórzenie badania

miało na celu wykrycie ewentualnych wad w pracy zastawki spowodowanych montażem w komorze.



Rys. 10. Fotografia zastawek typu Moll zamontowanych w komorze ReligaHeart

Pomiar przebiegów dynamicznych pracy komory wraz z badaniem kontrolnym przepływu medium przez zastawki

W celu wydania ostatecznej opinii o uzyskaniu pozytywnej oceny badań hydrodynamicznych komory, ostatnim etapem badań jest ponowny pomiar przebiegów dynamicznych pracy zastawek typu Moll zamontowanych w komorze. Badaniu podlegały ciśnienia hydrodynamiczne, mierzone na wlocie i wylocie do komory oraz przepływy. Ponowne badanie z etapu kwalifikacji zastawek typu Moll do montażu w komorze ReligaHeart ma na celu wychwycenie dysfunkcji w działaniu zastawki, spowodowanych mechanicznym uszkodzeniem w trakcie montażu zastawek w komorze.

Streszczenie

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” opracowała nową, pozaustrojową pompę wspomaganą serca ReligaHeart EXT. Pompa, dzięki oryginalnemu dla pomp wspomaganą serca opracowanych w Pracowni Sztucznego Serca w Zabrze asymetrycznemu kształtowi czaszy krwistej, posiada bardzo korzystne ukształtowanie przepływu strugi, omywające obrzeże membrany tłoczącej krew. We właściwym formowaniu strugi istotną rolę pełnią jednodyskowe zastawki, których odpowiednio rozmieszczone dyski kierują strugą napływającą i wypływającą z pompy. Pompa ReligaHeart EXT została wyposażona w polskie, jednodyskowe zastawki mechaniczne, skonstruowane przez Instytut Maszyn Przepływowych Politechniki Łódzkiej we współpracy z Pracownią Sztucznego Serca Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii. Opracowano konstrukcję 6 rozmiarów zastawki opartej na pionierskim pomysle prof. J. Molla, przeznaczonych do stosowania w pompie ReligaHeart EXT dla dorosłych i w protezach ReligaHeart PED dla dzieci. Dla montażu dysku w pierścieniu zastawki opracowano specjalną procedurę, prowadzoną w oryginalnie przygotowanych narzędziach. Precyzja i jakość montażu zastawki ma kluczowe znaczenia dla poprawnej pracy zastawki. Każda z zastawek przechodzi cykl badań kwalifikacyjnych. Testy są przeprowadzane według opracowanej procedury oceniającej jej własności hydrostatyczne i hydrodynamiczne

ne. Pozytywna ocena badań kwalifikacyjnych jest kryterium decydującym o montażu zastawki do pompy wspomaganie serca, a następnie aplikacji protezy do docelowego zastosowania.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pod nazwą: „Polskie Sztuczne Serce”.

Ocena wpływu oddziaływania polimerów konstrukcyjnych pompy ReligaHeart EXT na składniki czerwone krwi

Magdalena Kościelniak-Ziemniak*, Karolina Janiczak*, Roman Kustosz*, Małgorzata Gonsior*

Summary

The aim of this investigation was the assessment of the influence of construction polymers of an heart support prosthesis after processing on red blood cells. The investigated materials were polymers Bionate® 90A, 55D and ChronoFlex® AR/LT after processing. The examination was performed on representative samples in form of a disc of 0,8cm diameter, which underwent the same technological process as the finished medical device. The assessment was performed with the utilization of human whole blood. The effects of construction polymers on blood cells were elaborated in a special laboratory stand which consisted of a hematological roller mixer. The sample surface to blood volume ratio was calculated on the basis of the ASTM standard. Human blood was incubated with the biomaterials in temperature of 37°C, for 8 and 24 hours in a slow agitation system. After incubation, free hemoglobin concentrations in blood plasma were assessed utilizing HemoCue analyzer. The degree of hemolysis was obtained by calculation of hemolysis index. The blood cell morphology was examined in a standard blood smear, stained with May-Grunewald and Giemsa reagents. Red cell index, hemoglobin concentrations and the number of red blood cells were assessed utilizing hematology analyzer Mindray BC 2800. The obtained values of hemolysis level did not exceed normal values. The microscopic assessment revealed regular red blood cell morphology for all investigated groups. The values of red cell indices and plasma free hemoglobin concentrations were comparable and did not exceed normal values. The results indicate that the investigated construction polymers after processing Bionate® II 90A, 55D and ChronoFlex® AR/LT in contact with human whole blood did not affect the morphology and have no influence on the red cell index.

Keywords: Direct hemolysis, polycarbonate urethane PCU, pulsatile heart support prosthesis

Wprowadzenie

Podstawowe wymagania normatywne stawiane biomateriałom przed ich dopuszczeniem do zastosowania klinicznego są określone przez szereg wytycznych w zakresie obowiązujących zasad, m.in. przez PN-EN ISO 10993-1-18. Wymagania normatywne są zróżnicowane i zależą od przeznaczenia, rodzaju i czasu kontaktu biomateriału z organizmem pacjenta. Znaczącą uwagę poświęca się biomateriałom mającym kontakt z krwią, gdzie wymagania są bardzo restrykcyjne. Materiały takie muszą wykazywać się nie tylko biogodnością, ale również hemo- i trombozgodnością, co szczegółowo precyzuje 4. część polskiej normy PN-EN ISO 10993 [1]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku

* Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze – Pracownia Sztucznego Serca.

wyrobów medycznych, takich jak urządzenia mechanicznie wspomagające pracę serca, przeznaczone do długoterminowego kontaktu z krwią, gdyż na powierzchnię implantu oddziałuje krew zarówno ze składnikami morfotycznymi, jak i osocзовymi. Zaburzenie w interakcji biomateriał-gospodarz może doprowadzić do negatywnych reakcji ogólnoustrojowych organizmu, np. do uszkodzenia krwinek czerwonych, hemolizy krwi. Jednym z badań *in vitro*, oceniających właściwości biogodne materiałów, jest test hemolizy bezpośredniej, który definiuje i weryfikuje w sposób jednoznaczny reakcję erytrocytów w bezpośrednim kontakcie z badanym materiałem. W ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pn. „Polskie Sztuczne Serce” opracowano nowy model polskiej pozaustrojowej pulsacyjnej pompy wspomaganie serca ReligaHeart EXT [2]. Nowa konstrukcja pompy pulsacyjnej jest przeznaczona do wspomaganie serca przez okres kilku miesięcy. Elementy konstrukcyjne pompy zbudowano z nowoczesnych, biogodnych polimerów na bazie poliwęglanów uretanowych, które podczas wytwarzania pompy poddawano procesom przetwórstwa technologicznego metodą wtrysku wysokociśnieniowego oraz metodą laminowania. Ze względu na zastosowane procesy przetwórstwa polimery konstrukcyjne pompy poddano ocenie biologicznej *in vitro*, zgodnie z wytycznymi normatywnymi. Celem przeprowadzonych badań *in vitro* była ocena wpływu oddziaływania polimerów konstrukcyjnych Bionate® II 90A i 55D oraz ChronoFleks® AR/LT na składniki czerwono-krwinkowe krwi po przetwórstwie. Badania wykonano w oparciu o normy: PN-EN ISO 10993-4 (Ocena biologiczna wyrobów medycznych – część 4. Wybrane testy dla oceny interakcji z krwią), ASTM F 756–00 (Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials) [3].

Materiały i metody

Badania prowadzono na próbkach reprezentatywnych w postaci krążków o średnicy 0,8 cm, poddawanych tym samym procesom technologicznym, co gotowy wyrób medyczny. Próbki poddano procesowi sterylizacji tlenkiem etylenu (rys. 1). Badania wykonano z wykorzystaniem pełnej krwi ludzkiej, pozyskanej z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach (RCKiK). Krew w RCKiK poddano specjalnej preparatyce elementów morfologicznych, umożliwiającą przedłużenie terminu ważności przez konserwację jej w płynie CPDA-1. Przed eksperymentem w łaźni wodnej krew ogrzewano do temperatury pokojowej.

Oddziaływanie polimerów konstrukcyjnych na składniki morfotyczne krwi oceniano na specjalnym stanowisku badawczym, składającym się z mieszadła rolkowego hematologicznego (rys. 2). Celem nasilenia badanych zjawisk próbki krwi z badanymi materiałami inkubowano w cieplarni, w temperaturze 37°C. Proporcje między badaną powierzchnią materiałów a objętością krwi kontaktowanej przeliczono i zachowano zgodnie z normą ASTM F 756–00.

Eksperyment przeprowadzono na 3 grupach badanych:

- Próba ślepa – krew wolnostojąca w temperaturze pokojowej, niepoddawana warunkom eksperymentu.
- Kontrola ujemna – krew bez kontaktu z badanymi materiałami poddana warunkom eksperymentu (wolnemu mieszananiu).



Rys. 1. Sterylne krążki polimerów konstrukcyjnych



Rys. 2. Układ badawczy składający się z mieszadła rolkowego hematologicznego, umieszczony w ciepłarnie

- Grupa badana – polimery konstrukcyjne Bionate[®] II 90A, 55D oraz ChronoFlex[®] AR/LT.

Pełną krew ludzką poddano czasowemu kontaktowi z badanymi materiałami. Działanie hemolityczne określano poprzez oznaczanie stopnia hemolizy, stężenia wolnej hemoglobiny fHGB w osoczu i morfologiczną ocenę komórek. Zmiany ilościowe parametrów hematologicznych oceniano poprzez oznaczenie wskaźników czerwonekrwinkowych MCV (średnia objętość krwinki czerwonej), MCH (średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej) i MCHC (średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej), stężenia hemoglobiny HGB i liczby krwinek czerwonych RBC. Badania wykonano po 8 i 24 godzinach inkubacji krwi z materiałami badanymi oraz bez materiału – (kontrola) w temperaturze 37°C, w układzie wolnego mieszania.

Stopień hemolizy zdefiniowano przez obliczenie indeksu hemolitycznego. Stężenie wolnej hemoglobiny uzyskano mierząc poziom wolnej hemoglobiny w osoczu aparatem HemoCue. Morfologię komórek oceniano w standardowych rozmazach krwi barwionych odczynnikami: May-Grunwald i Giemsa. Wskaźniki czerwonekrwinkowe, stężenie hemoglobiny HGB oraz liczbę krwinek czerwonych RBC uzyskano wykonując morfologię krwi na analizatorze hematologicznym Mindray BC 2800.

Wyniki

W badaniach określających wpływ oddziaływania polimerów konstrukcyjnych na elementy morfotyczne krwi zbadano łącznie 30 próbek. Każdy układ badano w 5 powtórzeniach: krew z worka, próbę ślepa, kontrolę ujemną i grupę próbek badanych polimerów konstrukcyjnych. Wykonano 30 rozmazów krwi, każdy oceniając w mikroskopie optycznym, pod imersją.

Stopień hemolizy wyliczono na podstawie określenia indeksu hemolitycznego. Indeks hemolityczny zdefiniowano przez określenie przyrostu poziomu wolnej hemoglobiny ($\Delta fHGB$) w badanym układzie, wyciszając różnicę fHGB badanego biomateriału i fHGB kontroli ujemnej. Następnie z proporcji określono względny przyrost fHGB w badanym układzie. Stopień hemolizy określono na podstawie tabeli 1, zgodnie z wytycznymi normy ASTM F 756-00. Wyniki zestawiono w tabeli 2.

Tabela 1. Wytyczne normy ASTM F 756-00 określające przedziały stopnia hemolizy

Indeks hemolityczny	Stopień hemolizy
0-2%	Nie hemolizujący
2-5%	Nieznacznie hemolizujący
>5%	Hemolizujący

Tabela 2. Zestawienie indeksu hemolitycznego i stopnia hemolizy dla badanych biomateriałów

Materiał badany	Warunki eksperymentu	Indeks hemolityczny	Stopień hemolizy
Bionate® II 90A	8 godzin	0,08%	Niehemolityczny
Bionate® II 55D	8 godzin	0,11%	Niehemolityczny
ChronoFlex® AR/LT	8 godzin	0,20%	Niehemolityczny
Bionate® II 90A	24 godziny	0,16%	Niehemolityczny
Bionate® II 55D	24 godziny	0,04%	Niehemolityczny
ChronoFlex® AR/LT	24 godziny	0,03%	Niehemolityczny

Krew pozyskana z RCKiK posiadała prawidłowe wartości wskaźników czerwonekrwinkowych oraz niski stopień hemolizy. Na tej podstawie krew została zakwalifikowana do badań.

Wyniki uzyskane z próby ślepej, zarówno po 8, jak i po 24 godzinach inkubacji w temp. pokojowej, również cechowały się wartościami prawidłowymi, co wskazywało na brak samoistnej hemolizy badanego materiału biologicznego. Krew poddana warunkom eksperymentu, określana jako kontrola ujemna, również wykazywała niski poziom uwalnianej do osocza wolnej hemoglobiny oraz prawidłowe wartości wskaźników czerwonekrwinkowych.

W badaniach działania hemolitycznego z użyciem pełnej krwi ludzkiej stwierdzone wartości poziomu hemolizy nie przekroczyły wartości objętej normą. W obrazie mikroskopowym stwierdzono prawidłowy kształt erytrocytów dla wszystkich grup badanych. Wartości MCV, MCH, MCHC, RBC, HGB całkowitej i fHGB osoczowej były zbliżone do wartości kontrolnych oraz nie przekraczały wartości dopuszczonych w normie.

Dyskusja

W programie „Polskie Sztuczne Serce” realizowano badania weryfikujące biogodności (zgodnie z PN EN ISO 10993-4 i ASTM F 756-00) polimerów konstrukcyjnych pompy ReligaHeart EXT po przetwórstwie. W pracy badano biomateriały o potwierdzonej przez producenta biogodności w postaci surowca. Celem badania była ocena oddziaływania polimerów konstrukcyjnych na czerwone krwinki krwi ludzkiej. Dla zbadania wpływu badanych polimerów na krew zbudowano specjalne stanowisko badawcze, modelujące warunki zbliżone do fizjologicznych. Umieszczenie próbek krwi z krążkami biomateriałów na rolkach mieszała (rys. 2) pozwoliło na wytworzenie laminarnego przepływu krwi z powierzchnią próbek badanych polimerów. Dla nasilenia zjawiska oddziaływania biomateriału w krótkim czasie 8 i 24 godzin krew z krążkami inkubowano w podwyższonej temperaturze.

Wyniki MCV, MCH, MCHC, RBC, HGB całkowitej, fHGB osoczowej i obrazu mikroskopowego krwinek czerwonych próby ślepej i kontroli ujemnej po 8 i 24 godzinach inkubacji wskazały, iż modelowane warunki eksperymentu były poprawne. Nie obserwowano wzrostu osoczowej hemoglobiny, znaczącej zmiany parametrów czerwonekrwinkowych (zarówno między sobą, jak i w czasie eksperymentu) oraz zmian w obrazie mikroskopowym. Obserwowane zmiany wartości wskaźników czerwonekrwinkowych dla badanych polimerów konstrukcyjnych nie pochodziły zarówno od tła krwi badanej, jak i od zasymulowanych warunków dynamiczno-temperaturowych. Stwierdzono poprawność modelowanych warunków eksperymentu. Kolejno obliczono indeksy hemolityczne dla próby ślepej, kontroli ujemnej, badanych polimerów konstrukcyjnych, na podstawie których zdefiniowano stopień hemolizy badanych materiałów. Uzyskane wyniki porównano do wartości normatywnych i określono stopień hemolizy dla poszczególnych biomateriałów w danych czasach inkubacji (tabela 1 i 2). Wszystkie wyniki indeksu hemolitycznego dla badanych polimerów były poniżej 2%, co wskazywało na brak oddziaływania hemolitycznego na krwinki czerwone. Uzyskane wyniki indeksów hemolitycznych korelowały z wartościami parametrów czerwonekrwinkowych i obrazem morfologicznym krwinek czerwonych, dla których różnice w uzyskanych wartościach wskaźników były minimalne. To potwierdziło poprawność wyliczonych indeksów hemolitycznych polimerów konstrukcyjnych.

Wnioski

Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu pozwalają stwierdzić, iż badane polimery konstrukcyjne Bionate® II 90A, 55D i ChronoFlex® AR/LT po przetwórstwie w kontakcie z pełną krwią ludzką nie wywołują działania hemolitycznego, nie zmieniają obrazu morfologicznego erytrocytów oraz nie wpływają istotnie na wartości parametrów układu czerwonekrwinkowego.

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była ocena oddziaływania polimerów konstrukcyjnych protez serca na składniki czerwonekrwinkowe krwi.

Materiał do badań stanowiły polimery Bionate® 90A i 55D oraz ChronoFlex® AR/LT po przetwórstwie. Badania prowadzono na próbkach reprezentatywnych w postaci krążków o średnicy 0,8 cm, poddawanych tym samym procesom technologicznym, co gotowy wyrób medyczny. Badania wykonano z wykorzystaniem pełnej krwi ludzkiej. Oddziaływanie polimerów konstrukcyjnych na składniki morfologiczne krwi oceniano na specjalnym stanowisku badawczym, składającym się z mieszadła rolkowego hematologicznego. Proporcje między powierzchnią biomateriałów a objętością krwi kontaktowanej przeliczono zgodnie z normą ASTM F 756–00. Krew ludzką inkubowano z badanymi materiałami w temperaturze 37°C przez 8 i 24 godziny w układzie wolnego mieszania. Po zakończeniu inkubacji oznaczano stężenie wolnej hemoglobiny w osoczu aparatem HemoCue. Stopień hemolizy zdefiniowano przez obliczenie indeksu hemolitycznego. Morfologię komórek oceniano w standardowych rozmazach krwi, barwionych odczynnikami May-Grunwald i Giemsa. Wskaźniki czerwonekrwinkowe, stężenie hemoglobiny HGB oraz liczbę krwinek czerwonych RBC uzyskano wykonując morfologię krwi na analizatorze hematologicznym Mindray BC 2800.

Stwierdzone wartości poziomu hemolizy nie przekroczyły wartości objętych normą. W analizie mikroskopowej stwierdzono prawidłowy kształt erytrocytów dla wszystkich grup badanych. Wartości MCV, MCH, MCHC, RBC, HGB całkowitej i fHGB osoczowej były zbliżone do wartości kontrolnych oraz nie przekraczały wartości dopuszczonych w normie.

Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu pozwalają stwierdzić, iż badane polimery konstrukcyjne Bionate®II 90A, 55D i ChronoFlex® AR/LT po przetwórstwie w kontakcie z pełną krwią ludzką nie wywołują działania hemolitycznego, nie zmieniają obrazu morfologicznego erytrocytów oraz nie wpływają istotnie na wartości parametrów układu czerwonekrwinkowego.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu wieloletniego na lata 2007–2012 pod nazwą: „Polskie Sztuczne Serce”.

Literatura

- [1] ASTM F 756–00. *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*. 2005.
- [2] *Blood pump in particular a pneumatic ventricular assist device* EP 11183484.2 30.09.2011.
- [3] PN EN ISO 10993 – *Badania biozgodności wyrobów medycznych, część 1, 4–5, 13.*

A procedure for automated contact map-based reconstruction of protein structural models

Bogumil M. Konopka*

Streszczenie

Znajomość trójwymiarowych struktur białek ułatwia poznanie mechanizmów ich funkcjonowania oraz umożliwia opracowanie środków ich kontroli – projektowanie leków. Struktury białek mogą być pozyskiwane w czasochłonnych, kosztownych eksperymentach lub określane na podstawie przewidywań obliczeniowych. Przedstawiony w pracy protokół umożliwia rekonstrukcję trójwymiarowych modeli białek bazując na informacji o bliskości par aminokwasów w przestrzeni trójwymiarowej. Protokół wykorzystuje dostępne narzędzia bioinformatyczne do określenia położenia węgli alfa, rekonstrukcji łańcucha głównego, przeprowadzenia symetryzacji struktury, wstawienia łańcuchów bocznych aminokwasów oraz optymalizacji geometrii wynikowej struktury. Procedura została przetestowana na istotnym biologicznie białku – bakteryjnym potasowym kanale jonowym KcsA. Wykazano, że zaproponowane podejście pozwala na przewidywanie struktury trójwymiarowej białek, pod warunkiem spełnienia określonych wymagań, m.in. odpowiedniej ilości informacji o kontaktach aminokwasowych. Wewnętrznym ograniczeniem metody jest zależność pomiędzy prawidłowym umiejscowieniem aminokwasu w przestrzeni trójwymiarowej a liczbą kontaktów, które tworzy z innymi aminokwasami. Metoda ma potencjał do generowania bardzo dokładnych przewidywań, jednak konieczne jest kontynuowanie testów na szerszym zbiorze białek.

1. Background

Proteins are polymers built of amino acid sequences. They are among the most important biological molecules. They participate in all processes within living organisms. They are essential to sensing, metabolism, neural signaling and immunological response. Proteins are also crucial for functioning of viruses. The key to such a wide spectra of functions is protein structure. The shape a protein adopts – its three dimensional structure – depends on the combination of amino acids that form its polypeptide chain. The chemico-physical interactions between amino acids and between amino acids and the environment, stabilize the spatial arrangement of the chain and lead to stable and functional structures. However, not all amino acid sequences are productive, those that do not produce stable structures are eliminated in the course of evolution. Some proteins are built of several interacting amino acid chains. There are tasks that can only be performed by complexes of proteins, while biological processes always depend on dozens or hundreds of interacting proteins and protein complexes. Since all those

* Insitute of Biomedical Engineering and Instrumentation Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wroclaw University of Technology.

interactions and functions depend on the shapes proteins adopt, the knowledge of 3D structure of proteins can be used to address fundamental questions regarding life, such as: how our cells work, what the molecular mechanisms that lead to diseases are, which proteins could be best drug targets. The knowledge of 3D structures of protein is also used in rational drug design. Experimental determination of protein structures is costly, time consuming and in some cases, extremely hard (for instance membrane proteins). This is why computational techniques are developed to aid or even to substitute wet lab techniques. If structures of homologous proteins are known automated protein structure prediction servers can provide high quality template based predictions. In case of lack of close homologues, methods such as HHserach [14] can be applied to identify remote homologies. If a protein of interest is completely unknown, de novo methods can be used to provide rough approximations of its structure. Such predictions can be refined if additional constraints regarding the structure are supplied, for instance information on which amino acids interact. Until recently, experimental data were the main source of such constraints [9], [13]. However, Marks et al. [7] have showed that it is also possible to accurately, computationally predict pairs of amino acids that are in close spatial proximity (also regarded to as being in contact) based only on sequence information. If we are able to predict enough amino acid contacts it will be possible to reconstruct the whole protein structure. The question arises, how many protein contacts need to be predicted and what the quality of proteins built based on such amino acid – amino acid interactions is.

In this work a protein structure reconstruction pipeline is proposed and tested. The test case is the structure of the KcsA prokaryotic potassium channel of *Streptomyces Lividans*. This ionic channel was the first K⁺ channel to be discovered [4] and it is one of the best characterized ionic channels known. A functional unit of the channel is constituted of four identical polypeptide chains – homotetramer. Each chain has three alpha-helices two of which are transmembrane. The narrowest part of the channel – the selectivity filter is formed by an evolutionary well-conserved loop region. The filter is responsible for rapid and selective conductance of K⁺ ions. Although KcsA is a prokaryotic protein, many analogies to eukaryotic inwardly rectifying two-transmembrane K⁺ channel family were found [1]. KcsA is deemed to be an ancestor of this family of ionic channels in both Prokarya and Eukarya. The KcsA was chosen for this preliminary study for three reasons. First, it is a biologically important molecule, which is of interest to scientific society and pharmaceutical industry. Second, it is well characterized, which makes it a good test case. Third, it is a membrane molecule and experimental determination of 3D structures of membrane proteins is in general very hard, therefore computational modeling of those structures is of great importance.

In further sections of the article the methodology for handling protein structures is briefly described, i.e. the protein structure file format and the RMSD structure quality assessment measure. Then the reconstruction pipeline is introduced. Finally the performance of the pipeline is tested in four different schemes, providing amino acid contacts. The study investigates the potential of the approach to produce high quality protein model-structures. It also gives an overview of the method requirements and limitations.

2. Methods

The PDB file format. Protein three dimensional structures are stored in the PDB format files [11]. The most important part of each PDB file records the type and x,y,z coordinates of each atom that constitutes the molecule.

Assessment of model quality. If the native structure of a protein is known it is possible to objectively assess the quality of produced structural models. A structural model and the correct structure are aligned as rigid bodies. Then the differences between structures are quantified. There are many scores that can be used for example GDT [17] or TM-score [18], however here the Root Mean Square Deviation [5] (RMSD), which is one of the most widely used. It is defined as:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i (m_i - n_i)^2}$$

where: N – the number of atoms,

m – sets of atom coordinates of the model

n – sets of atom coordinates of the native structure.

RMSD is the mean distance calculated between equivalent atoms from both structures.

Protein Contact Map. In this study amino acid residues are defined as being in contact if the Euclidean distance between their C-alpha atoms falls below the cut-off threshold of 12 Å. As reported in [16] this is an optimal threshold value for contact-based structure reconstruction. A contact map is a symmetrical, binary matrix. An element of the matrix equals 1 if amino acid residues denoted by indexes of the element are in contact. An element equals 0 if a contact has not been detected. Therefore the contact map is a source of two types of knowledge, positive knowledge, when it is known that amino acids are in close proximity (ones in the matrix), and negative knowledge, when it is known that amino acids are far away. If there is no information regarding a pair of amino acids, -1 can be inserted into the contact map.

Local RMSD is calculated to evaluate the local quality of a structure. First RMSDs limited to atoms of particular amino acids are calculated. Then Local RMSD at i -th position in the sequence is calculated as the average RMSD of the i -th amino acid and neighboring amino acids i.e. $i+1$, i , $i-1$.

The proposed protein reconstruction pipeline is a five step protocol. A Contact Map (CMAP) is the input of the procedure. The output is a full-atom 3D structure of a protein. The protocol steps are:

- C-alpha trace reconstruction (FT-COMAR [16]) with dummy loop insertion
- Backbone reconstruction (SABBAC [8])
- Structure symetrization
- Side-chain prediction and structure optimization (SCWRL [6])

In this study CMAPs were build based on the experimental structure of the KcsA channel (PDB ID: 3fb8 [2]).

Reconstruction of the C-alpha trace. FT-COMAR is used to determine location of the C-alpha atoms [16]. It is based on spatial restraints imposed by residue-residue contacts and it treats atoms as geometrical points in three dimensional space. Information on the amino acid sequence of the protein is not used in the process. The algorithm can be divided into two separate phases. In the first phase a partially random structure is generated. In the second phase the structure is perturbed and refined in order to satisfy the restraints induced by the input contact matrix.

Dummy amino acid loops. FT-COMAR assumes that consecutive residues in the contact matrix are close together in the three dimensional space. This assumption is correct in case of monomeric proteins, where all residues belong to the same peptide chain. However in case of multimeric proteins, terminal amino acids of different chains may be described in consecutive rows of the contact matrix despite being quite distant from one another in 3D. In the previously mentioned example of a homodimer of two 100 residue long subunits, residue 100 is a C-terminus of chain A, and 101 is an N-terminus of chain B. The actual geometrical distance between the two amino acids can be long despite the residues are “neighbors” in the contact matrix. FT-COMAR applies the previously mentioned assumption and keeps the terminal amino acids close in 3D space. This results in a fall of the reconstruction quality. In order to improve the reconstruction quality for multidomain proteins, such as ionic channels, we insert artificial loops of dummy amino acids into the contact map matrix between chain terminals prior running FT-COMAR. These loops are trimmed from the structure after reconstruction. The authors of FT-COMAR showed that introducing non-existing contacts into the contact map has a strong negative effect on the reconstruction quality, thus they proposed to mark some inter-residue contacts as uncertain by -1 in the contact matrix. These contacts are not taken into account during structure reconstruction. We use this notation while inserting artificial loops. Each dummy atom that forms the inserted loop is an additional row and additional column of -1 in the contact matrix. The loop is neutral to the reconstruction process while moving the neighboring terminal residues of different chains away from each other, which improves the performance of FT-COMAR.

Reconstruction of the protein backbone. Atoms that form the main polypeptide chain, are rebuilt with the use of SABBAC, an application that allows for a rapid reconstruction of the main chain of a protein based on C-alpha coordinates. SABBAC allows for reconstruction of backbone of a single polypeptide chains, thus backbones are rebuilt separately for each subunit produced in the previous step. The method uses a library of four amino acid long structural fragments, the so called Structural Alphabet (SA) [3] which are assembled together. A ‘greedy algorithm’ is used to get an optimal, compatible with the input C-alpha trace, combination of fragments [15], [8]. The SA was built using Hidden Markov Model framework [3].

Symmetry-based assembly of ionic channels. As a results of the SABBAC step we acquire four backbones of channel subunits. Each of the backbones is then used to rebuild a whole ionic channel on the basis of its axis symmetry. First, the chains are reassembled to form an asymmetric channel. The structure is aligned onto a channel structure positioned in the OPM database [11], so that the axis of the pore is perpendicular to the

XY plane, then the center of mass in the XY plane is calculated. The protein is moved and translated to the beginning of the reference, so that the axis of the pore lies on the z axis. Each of the subunits is projected 4 times using the axis of symmetry to form a full tetrameric channel. This procedure produces 4 symmetric ionic channels. Additional ionic channel structure is produced by projecting the averaged subunit.

Addition of side-chains and structure optimization. Two final phases of the structure reconstruction – addition of amino acid side chains and rotamer optimization (choosing proper orientations of amino acid side chains) – are performed using SCWRL4 [6], which is a well established tool for solving the side chain prediction problem.

SCWRL solves the side-chain prediction problem by a number of steps. It uses a backbone dependent rotamer library to get a first approximation of the side-chain coordinates. Then it calculates energies and then constructs an interaction graph in which vertices denote amino acid residues and edges are interactions [6]. It optimizes the arrangement of particular rotamers by a graph decomposition and energy minimization methods. SCWRL outputs the coordinates of final, symmetric full-atom model structures of ionic channels.

Testing the reconstruction pipeline. Based on experimentally solved native structure of the KcsA channel – 3fb8 in the PDB database [2], a contact map was created. Several testing experiments were conducted. Structural models were reconstructed based on:

- the complete contact map, (complete-CMAP structures)
- the contact map with information regarding positive contacts (no information regarding non-contacts, positive-only-CMAP structures)
- contact maps with the numbers of contacts and non-contacts reduced to 90%, 70% 50% and 30%, (reduced-CMAP structures)
- erroneous contact maps with 90%, 70%, 50% and 30% of correct contacts and remaining ones changed to non-contacts (erroneous-CMAP structures).

Contact map reduction in point 3 was conducted by substitution of randomly chosen contacts (1 in the CMAP) and non-contacts (0 in the CMAP) with “ -1 ”. In point 4 random “ 1 ” were selected and changed to “ 0 ”. In both cases the reduction was repeated 10 times and 50 structural models were generated based on each randomized CMAP.

Assessing the quality of produced model-structures. For each model-structure a number of structural parameters were calculated

- Global full-atom RMSD, full-atom alignment
- Selectivity filter full-atom RMSD, selectivity filter alignment
- RMSD of particular residues at full-atom alignment (used for Local RMSD calculations)

Results and Discussion

Negative knowledge in contact maps is as important as positive knowledge. Reconstruction of KcsA structure based on the complete contact map produces high quality models. Since the FT-COMAR step of the proposed reconstruction pipeline involves randomization, all produced models differ. Over 400 structures were generated. The

average general RMSD value calculated for all complete-CMAP structures equaled 2.40 Å, which is in the resolution range of X-ray crystallography experimental structures. On the other hand the results acquired for model-structures generated with positive-only-CMAPs were much worse (Tab. 1).

Table 1. Quality assessment of structures generated based on complete knowledge and positive-only knowledge contact maps. The values were averaged over all produced models

	Complete-CMAP	Positive-only-CMAP
General RMSD [Å]	2.40 ± 0.14	6.43 ± 0.53
Filter residues RMSD [Å]	1.84 ± 0.39	3.95 ± 0.63
Structure diameter [Å]	41.92 ± 0.29	28.49 ± 4.57

In Fig. 1 an exemplary alignment of two KcsA structures was presented. Secondary structures and their arrangement were correctly reconstructed in all structures based on complete positive and negative contact knowledge, i.e. complete-CMAPs (Fig. 1, blue). The lack of non-contacts in the map during generation of the second ensemble of models caused the protocol to produce very densely packed structures. The diameter of positive-only-CMAP structures, which was measured as the distance between two ALA-50 residues from two opposite chains, was lower than the diameter of complete-CMAP structures by over 10 Å (Tab. 1).

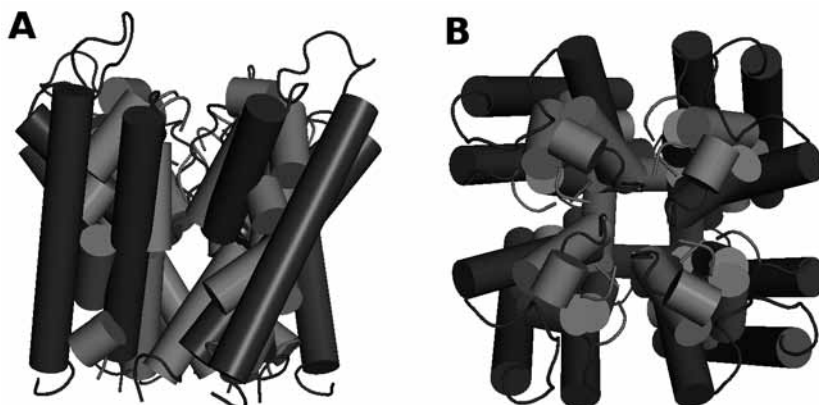


Fig. 1. Side view (A) and extracellular top view (B) of aligned exemplary structures of KcsA. Models were reconstructed based on complete-CMAPs (blue) and positive-only-CMAPs (red).

Although the general arrangement of alpha-helices is correct (Fig. 1B, red) the whole geometry of models is unnatural, the helices are teared into pieces. The only well reconstructed part of the channel is the selectivity filter, with average RMSD of 3.95 Å. Quite surprisingly in both groups of model-structures the selectivity filter has a higher quality than the remaining parts of the structure.

At least 30% of contact information is required to produce structural models at RMSD <5 Å. In order to find the minimum of information required for reasonable reconstruction of models, the complete CMAP was reduced to 90%, 70%, 50% and 30% of contacts and non-contacts(see Methods section). The quality of produced models in 90% and 70%-based model sets did not differ significantly from the ensemble of models reconstructed based on the complete CMAP (Fig.2A). At the level of 50% CMAP the RMSDs became higher, also the spread of model quality increased. Despite the fact that only a small fraction of models built based on 30% of contact information could be useful, if a good model quality assessment procedure was used, 30% of knowledge would be still enough to generate structural models.

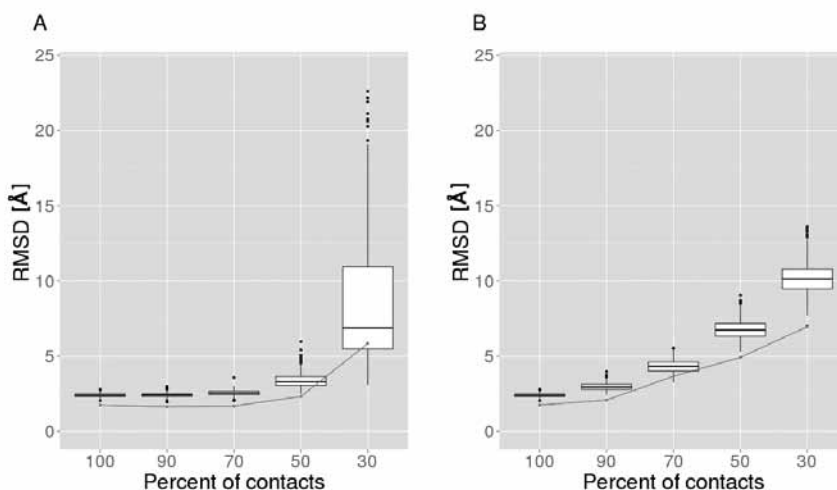


Fig. 2. Quality of structures reconstructed based on reduced error-free (A) and erroneous (B) CMAPs. Boxplot whiskers denote $1.5 \times \text{InterQuartileRange}$, box lines denote quantiles 0.25, 0.5 (median) and 0.75. The red line marks the median RMSD in the selectivity filter

Nevertheless the conducted experiment was an idealized situation, since an assumption was made that the contact maps used were error-free. In real-life situations this is never the case, since the specificity of top state-of-the-art contact predictors varies around 0.3 [10].

Four sets of erroneous-CMAP KcsA structures were generated i.e., 90%, 70%, 50%, 30% (see Methods). It was shown that the quality of models decays rapidly as the balance between correct and erroneous contacts lowers (Fig. 2B). In a real-life situation one needs to correctly predict at least 70% of contacts to produce RMSD <5 Å model-structures, which means that a significant improvement in the reliability of contact predictors is needed.

Local quality of structural models varies. In order to get an insight into the local quality of reconstructed models, the full-atom RMSDs of amino acid residues were calculated. Based on that, local RMSDs were calculated (see Methods). In the previous section it was shown that in 90% and 70% reduced-CMAP models the the quality is

almost exactly the same as in the complete-CMAP structures, while in the 50% CMAP-based set it is only slightly lower. Therefore local structure quality was investigated only in the complete-CMAP and 30% reduced-CMAP structures. The averaged local RMSD values in the complete-CMAP models are distributed uniformly along the whole amino acid sequence (Fig. 3, black), with the exception of terminal residues. There are only slight fluctuations and the structures are generally built correctly.

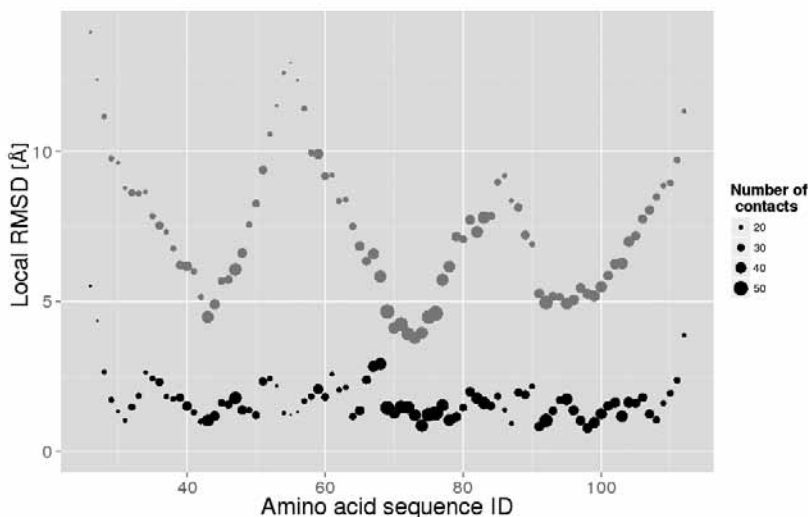


Fig. 3. The distribution of local RMSD values along the amino acid sequence in complete-CMAP (black) and 30% reduced-CMAP models (red). The number of contacts an amino acid at a given position creates is denoted by the point size

Local quality in 30% reduced-CMAP models varies significantly between different regions of the sequence. There are three clear segments of sequence where the local RMSDs are relatively low, i.e. 39–47, 67–78, 91–105 (Fig. 3, red). This segments are also associated with higher values of contacts created by amino acids. Calculated local RMSDs were mapped onto 3D structure of the KcsA (Fig. 4A,B). The regions associated with high local qualities are located centrally in the protein structure, while peripheral parts of the structure, such as extramembrane loops or helix endings are poorly modeled.

The number of contacts an amino acid is involved in, correlates with local RMSD.

RMSD and number of contacts mappings onto the KcsA structure in Fig. 5. clearly show that regions of low RMSD (Fig.4 A, B blue/light green) overlap regions occupied by amino acids with a high number of contacts (Fig 4 C, red).

The correlation observed between these two quantities (Fig. 5) is expected because contacts define constraints that need to be satisfied by the three dimensional arrangement of amino acids. If an amino acid is involved in a high number of contacts and some of them are removed by a CMAP reduction procedure or are missed by a contact prediction method, the amino acid will be still properly localized in the 3D structure. This is because the information regarding the 3D position will be retained in the remaining contacts.

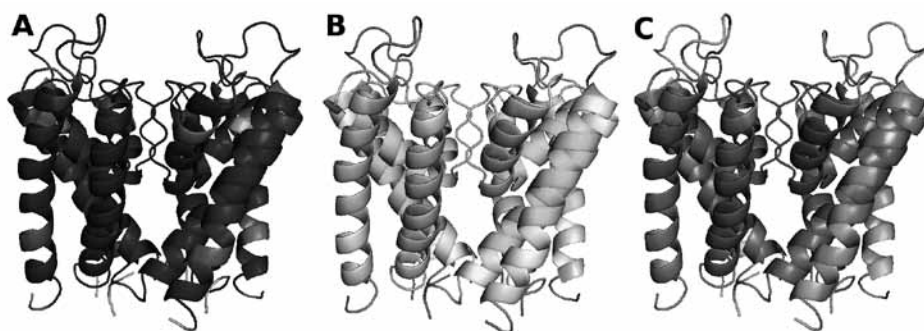


Fig. 4. Local RMSD of complete CMAP (A) and 30% CMAP-based structures (B) mapped onto KcsA structure, correlate well with the mapping of the number of each amino acid contacts (C)

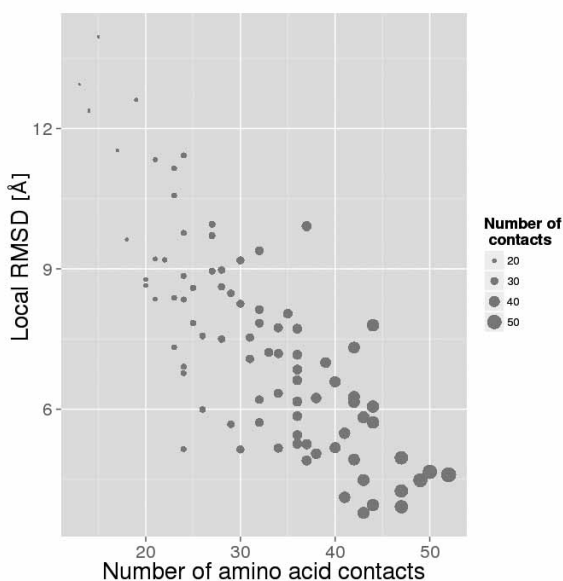


Fig. 5. Correlation between amino acid contact order and local RMSD in 30% CMAP-based structures

Conversely, the 3D position of an amino acid that is involved in just a few contacts may be ambiguous, since many positions may satisfy constraints that are put on the amino acid. Therefore any method of protein structure prediction based solely on the CMAP information, will be subject to this limitation.

Conclusions

In the study an automated protocol for reconstruction of protein structural models based on amino acid contact maps was proposed and tested. The case study was the structure of KcsA prokaryotic potassium channel. Several procedures were used to

generate contact maps containing different portions of information, i.e. complete and positive-only contact maps, reduced and erroneous contact maps. It was shown that for a proper reconstruction of models, both types of knowledge, positive (regarding contacting residues) and negative (related to non-contacting amino acids) are required. If this is satisfied, then even 30% of contact information is enough to produce structural models at RMSD below 5 Å. The study shows that introduction of errors in the contact map significantly lowers the quality of produced structures. Therefore if such a contact-based approach is to be applicable in real-life situations, it is of great importance to assure a low level of the false positive rate of provided contact predictions. Investigation of structures local quality revealed that some regions of models were predicted with higher accuracy. These regions overlapped with regions of high contact density. It was confirmed that the reconstruction quality is directly related to the number of contacts an amino acid is involved in. This dependence will affect all contact-based approaches to protein structure predictions. This preliminary study showed that the proposed approach has a potential to produce high quality protein model structures, however further validation on a more comprehensive protein data set is needed.

Acknowledgments

The author would like to thank Dr Małgorzata Kotulska for critical reading the manuscript. This work was in part supported by the grant N N519 643540 from National Science Center of Poland. Part of the calculations has been done in Wroclaw Centre for Networking and Supercomputing.

Summary

Proteins play central roles in all processes within living organisms, therefore the knowledge of their three dimensional structures can be used to address fundamental questions regarding life. Experimental determination of protein structures is costly, time consuming and in some cases, extremely hard (for instance membrane proteins). This is why computational techniques for structure prediction are developed. In this work a protein structure reconstruction pipeline, based on amino acid contact maps, is proposed. The pipeline is a five step procedure that uses state-of-the-art bioinformatics tools to perform: C-alpha coordinates estimation, backbone reconstruction, protein symmetrization, side-chain addition and structure optimization. The procedure is tested using four schemes providing amino acid contacts. The presented test case is the structure of the KcsA prokaryotic potassium channel. The results show that 30% of complete contact information is enough to produce models at RMSD below 5 Å. However, errors in the contact map have a strong negative impact on the quality of produced structural models. It is revealed that local quality of the reconstruction depends on the number of contacts in which amino acids are involved. The proposed approach has a potential to produce high quality protein model structures, however further validation on a more comprehensive protein data set is needed.

Keywords: protein structure prediction, contact maps, ionic channel

Literature

- [1] Ashcroft F. M., *From molecule to malady*, Nature, 440(23), 2006.
- [2] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E., *The Protein Data Bank*. Nucl. Acid Res. 28, 2000.
- [3] Camproux A. C., Gautier R., Tuffery P., *A Hidden Markov Model Derived Structural Alphabet for Proteins*, J. Mol. Biol. 339, 2004.
- [4] Doyle D. A., Morais C. J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R., *The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. Science 280, 1998.
- [5] Kabsch W., *A solution for the best rotation to relate two sets of vectors*. Acta Crystallographica 1976; A32:922.
- [6] Krivov G. G., Shapovalov M. V. , Dunbrack R. L. Jr., *Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4*, Proteins; 77, 2009.
- [7] Marks D. S., Colwell L. J., Sheridan R., Hopf T. A., Pagnani A., et al., *Protein 3D Structure Computed from Evolutionary Sequence Variation*. PloS ONE 6(12), 2011.
- [8] Maupetit J., Gautier R., Tuffery P., *SABBAC: online Structural Alphabet-based protein Backbone reconstruction from Alpha-Carbon trace*, Nucl. Acids Res., 34, Web Server issue, 2006.
- [9] Meiler J., Lindert S., Stewart P. L., *De Novo Atomic-Detail Structure Prediction for Proteins Guided by Medium Resolution Density Maps*, Microsc. Microanal. 17 (Suppl 2), 2011.
- [10] Monastyrskyy B., Fidelis K., Tramontano A., Kryshchuk A., *Evaluation of residue-residue contact predictions in CASP9*, Proteins 79 (Suppl 10), 2011.
- [11] Lomize M. A., Lomize A. L., Pogozheva I. D., Mosberg H. I. OPM: Orientations of Proteins in Membranes database. Bioinformatics 22, 2006.
- [12] Protein Data Bank Contents Guide: Atomic Coordinate Entry Format Description Version 3.30. 2012.
- [13] Raman S., Huang Y. J., Mao B., Rossi P., Aramini J. M., Liu G., Montelione G. T., Baker D., *Accurate Automated Protein NMR Structure Determination Using Unassigned NOESY Data*, J. Am. Chem. Soc. 132, 2010.
- [14] Söding J., *Protein homology detection by HMM-HMM comparison*, Bioinformatics 21 (7), 2005.
- [15] Tuffery P., Guyon F., Derreumaux P., *Improved Greedy Algorithm for Protein Structure Reconstruction*, J. Comp. Chem., 26, 2005.
- [16] Vassura M., Margara L., Di Lena P., Medri F., Fariselli P., Casadio R., *Reconstruction of 3D Structures from Protein Contact Maps*, IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf., 5, 2008.
- [17] Zemla A: LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures, Nucl. Acids Res 2003, 31(13):3370–3374.
- [18] Zhang Y., Skolnick J., *Scoring function for automated assessment of protein structure template quality*, Proteins, 57, 2004.

Superrozdzielcza fotonooptyka fluorescencyjna sted w naukach biologicznych i fizyce

Grzegorz Ilewicz*

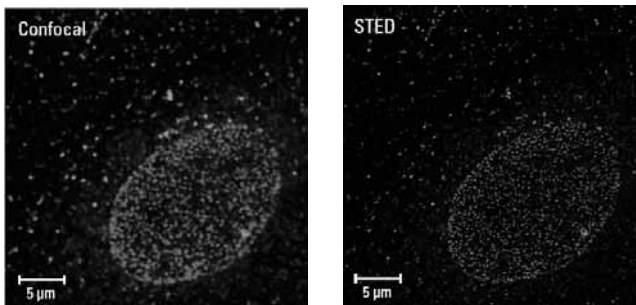
Summary

The use of the STED superresolution technique in order to brake the diffraction barrier and increase resolution in optical microscopy defined by the Abby and Rayleigh formula is presented in the article.

Keywords: superresolution microscopy, nanobionics, photonooptics, STED microscope

1. Wprowadzenie

Nieustanne nieregularne ruchy cząstek zawiesiny, wywołane nieregularnym bombardowaniem przez atomy, mogą być obserwowane przez doskonały mikroskop i nazywamy je ruchami Browna [1].



Ryc. 1. Próbką biologiczną obserwowaną mikroskopem konfokalnym i superrozdzielczym [4]

Obserwowanie mniejszych niż mikrometr cząstek z odpowiednią rozdzielczością wymaga przekroczenia limitu dyfrakcji, określonego przez rozmiar funkcji przenoszenia plamki obiektu na piksel obrazu obserwowanego przez mikroskop. Przekroczenie bariery dyfrakcji umożliwia obserwowanie żywych tkanek w biologii, np. obserwowanie tkanki żywego neuronu. Obserwowanie proteiny wymaga rozdzielczości mikroskopu rzędu 10 [nm]. Rozdzielczość wymagana przy obserwacji wirionu wirusa wynosi 100 [nm] natomiast organizmu bakterii ok. 1 [μm]. Rozdzielczość jest definiowana jako najmniejsza odległość pomiędzy dwoma punktami, które są oceniane przez obserwatora jako osobne elementy.

* International Association for Medical Robotics.

Limit dyfrakcyjny w płaszczyźnie planarnej jest określony wzorem Abby'ego:

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\alpha)}$$

gdzie:

λ – długość fali świetlnej,

d – określa nieprzekraczającą rozdzielczość 200 [nm] w płaszczyźnie planarnej x, y,

n – współczynnik załamania światła między obiektywem a próbką,

α – apertura kątowa obiektywu,

NA – apertura numeryczna obiektywu.

Zastosowanie techniki wygaszania emisją wymuszoną STED (Stimulated Emission Depletion) umożliwia przekroczenie limitu dyfrakcji w mikroskopie optycznym.

Rozdzielczość mikroskopu z zastosowaniem wygaszania emisją wymuszoną wynosi wg Hella [2]:

$$d \approx \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\alpha) \cdot \sqrt{1 + \frac{J}{J_s}}}$$

gdzie:

J – natężenie wiązki wzbudzającej fluorofor,

J_s – natężenie wiązki STED.

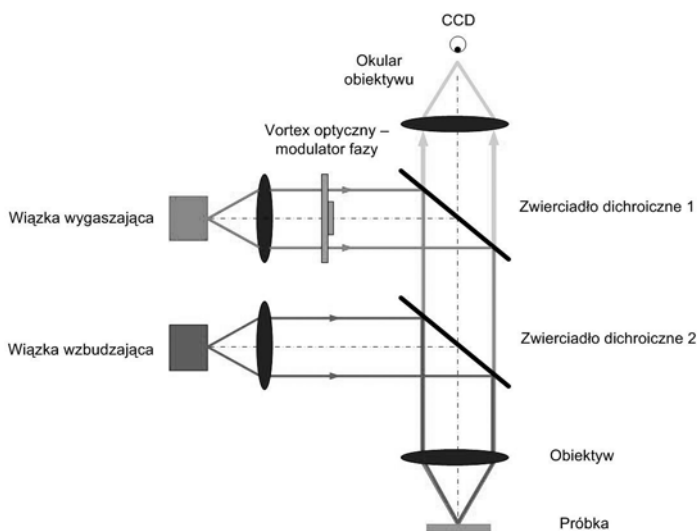
Zastosowanie techniki STED zwiększa zdolność mikroskopu do rozróżniania szczegółów, przez co rejestrowany przez detektor CCD obraz jest mniej rozmazany. Twórcą metody STED jest **Stefan Hell** z Katedry Biofotoniki Instytutu Maxa Plancka z Getyngi.

Zwiększenie rozdzielczości metodą STED odbywa się na drodze pozanumerycznej i nie wymaga matematycznego przetwarzania obrazu, czyli filtrowania obrazu z szumu, co często wymaga stosowania skomplikowanych procesów, np. dekonwolucji i matematycznego definiowania wzorca szumu zniekształcającego obraz.

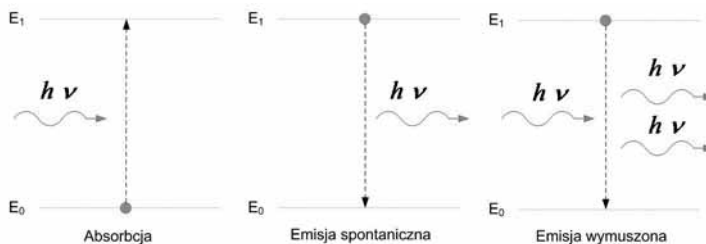
2. STED

Wiązka lasera mikroskopu konfokalnego (współogniskowego) skanuje próbkę i emitowany z fluorescencyjnej próbki foton (zjawisko emisji spontanicznej) może być rejestrowany przez kamerę CCD mikroskopu.

Mikroskop superrozdzielczy STED wymaga korelacji dwóch laserów. Pierwszy laser powoduje oświetlenie próbki światłem o określonej długości i wzbudzenie jej do emisji fotonu, czyli emisji światła o innej długości fali. Druga wiązka, skorelowana z pierwszą, ma w płaszczyźnie planarnej x, y kształt pierścienia o zerowym natężeniu światła w środku, wobec czego oświetlony nią fluorofort emituje światło (emisja wymuszona) i próbka fluorescencyjna nie jest już zdolna do wyemitowania światła w tym obszarze.



Ryc. 2. Mikroskop STED



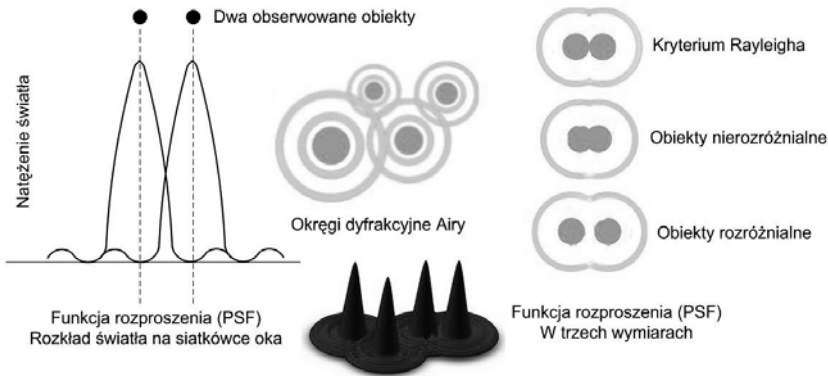
Ryc. 3. Oddziaływania atomu z fotonem

Ostatecznie obszar emisji fotonów z próbki fluorescencyjnej, który dochodzi do detektora, jest zmniejszony w stosunku do uzyskiwanego mikroskopem konfokalnym, więc uzyskiwana rozdzielczość wzrasta. Wewnętrzną średnicą wiązki wygaszającej można sterować, przez co można sterować rozdzielczością mikroskopu konfokalnego STED.



Ryc. 4. Mechanizm oświetlania fluorochloru w STED

Typowymi barwnikami używanymi w technice STED są: ATTO 425, 565, ATTO 663, Alexa Fluor 594, DyLight 594, RH 414 i barwniki proteinowe: EFGP, EYFP.



Ryc. 5. Funkcja rozproszenia (point spread function)

Zwiększenie rozdzielczości mikroskopu jest związane ze zmniejszeniem rozmiaru funkcji rozproszenia PSF (trójwymiarowy obraz okręgów dyfrakcyjnych Airy w płaszczyźnie planarnej, pokazany na rycinie 4), tzn. promień okręgu dyfrakcyjnego Airy ulega zmniejszeniu, wobec tego zwiększa się odległość pomiędzy maksimum funkcji PSF jednego obiektu i minimum funkcji PSF obiektu drugiego.

$$r_{\text{Airy}} = \frac{1,22 \cdot \lambda}{2 \cdot NA}$$

gdzie:

λ – długość fali świetlnej,

NA – apertura numeryczna obiektywu.

Ze względu na dwa sąsiadujące dyski Airy pokazane na rycinie 4, rozdzielczość przyrządu optycznego może być zdefiniowana wzorem Rayleigha:

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$$

Uzyskanie odpowiedniej rozdzielczości mikroskopu z zaimplementowaną techniką STED wymaga uzyskania wymaganego kształtu funkcji PSF. Zagadnienie to jest związane z doбором układu optycznego mikroskopu (mikroskop może być zbudowany od podstaw bądź na bazie mikroskopu konfokalnego) oraz dobraniem źródeł światła laserowego dla wiązki wzbudzającej i wygaszającej (długość fali wiązki wzbudzającej i wygaszającej oraz rodzaj światła pomiędzy impulsowym i ciągłym). Badania nad zastosowaniem laserów o wiązce ciągłej opisano w pracy [3].

Zastosowanie w budowie mikroskopu zwierciadeł skanujących pokazanych na rycinie 5 umożliwia obrazowanie dynamiczne np. wnętrza żywych tkanek neuronów [4].



Ryc. 6. Od góry. Zwierciadło skanujące [6], pozycjoner układu optycznego [5], zwierciadło dichroiczne [5], laser z wiązką wygaszającą [5] jako przykładowe elementy mikroskopu konfokalnego z techniką STED

3. Wnioski

Budowa mikroskopu superrozdzielczego STED nie jest wyzwaniem trudnym wobec posiadanej wiedzy (w Polsce zbudowano mikroskop STED na UW – mgr Joanna Oracz).

Trwają prace rozwojowe nad zastosowaniem do procesu wygaszania laserów o wiązce ciągłej CW STED, ze względu na ich prostą implementację techniczną. Laser o wiązce ciągłej wymaga większej mocy niż laser impulsowy.



Ryc. 7. Mikroskop STED Leica [4]

Wysoka moc wiązki może prowadzić do blechingu fluorosforu, czyli zjawiska blaknięcia obrazu. Ponadto zastosowanie techniki CW STED obniża rozdzielczość obrazu w stosunku do STED. W celu poprawy rozdzielczości uzyskiwanej z użyciem CW STED stosuje się technikę gate CW STED implementowaną elektronicznie lub przetwarzaniem numerycznym zmniejszając czas detekcji o stałą czasową T . Ostatecznie zastosowanie techniki STED umożliwia uzyskanie rozdzielczości nie większej niż 20 wymiaru w płaszczyźnie poprzecznej i 40 w płaszczyźnie podłużnej w stosunku do rzędu 200 i 500 uzyskiwanych bez użycia STED skaningowym mikroskopem konfokalnym.

Obecnie dostępne są również metody mikroskopii fluorescencyjnej, przy zastosowaniu których uzyskuje się większe rozdzielczości, tj. PALM, FPALM, STORM i NSOM oraz ich odmiany. Największe rozdzielczości są uzyskiwane przy użyciu mikroskopii elektronowej.

Streszczenie

W pracy opisano superrozdzielczą technikę STED (Stimulated Emission Depletion) aby przekroczyć limit dyfrakcji światła i zwiększyć rozdzielczości mikroskopu opisaną formułą Abby'ego i Rayleigha.

Literatura

- [1] Feynman R., Leighton R., Sands M., *Feynmana wykłady z Fizyki*. PWN Warszawa 1968.
- [2] Hell S., Wichmann J., *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy*. *Optical Letters* 19(11), 780–782, 1994.
- [3] Willig K., Harke B., Medda R., Hell S., *STED microscopy with continuous wave beams*. *Nature Methods* – 4, 915–918, 2007.
- [4] Lauterbach M., Keller J., Schönle A., Kamin D., Westphal V., Rizzoli S., Hell S., *Comparing video-rate STED nanoscopy and confocal microscopy of living neurons*. *J Biophotonics*, 417–24, 2010.
- [5] Leica TCS STED CW, *The Fast Track to Super-Resolution*, www.leica-microsystems.com.
- [6] www.newport.com.
- [7] www.sintecoptronics.com.

Characteristics of contact sites with regard to protein topology

Paweł P. Woźniak*, Małgorzata Kotulska**

Streszczenie

Miejsca kontaktowe w białkach dostarczają informacji o ich najważniejszych cechach strukturalnych. Głównym celem naszych badań była analiza zależności pomiędzy charakterystyką miejsc kontaktowych a przynależnością białek do odpowiednich grup, takich jak klasy czy topologie. Przeanalizowany został zbiór białek identycznie sklasyfikowanych przez bazy CATH i SCOP, podzielony na strukturalne klasy Alfa i Beta. W każdej z tych klas wyszczególnione zostało odpowiednio 13 i 12 topologii. Mapy kontaktów zostały uzyskane dla wybranych wartości parametrów odległości przestrzennych oraz separacji między aminokwasami w sekwencji białka. Analiza pokazała, że stopień kontaktu zależy od dobranych parametrów w sposób wykładniczy. Wskazane zostały aminokwasy, które najczęściej tworzą miejsca kontaktowe, takie jak leucyna czy cysteina, co jest związane z ich własnościami fizykochemicznymi i rolą w strukturze białka. Wybrane topologie zostały opisane pod kątem charakterystyki ich miejsc kontaktowych oraz podobieństwa w swojej klasie. Wyniki analizy pokazują, że możliwe jest wykorzystanie miejsc kontaktowych do klasyfikacji białek.

1. Introduction

Protein structure prediction is one of the most popular topics in contemporary bioinformatics. Information about protein 3D model is crucial, e.g. in drug design. After reconstruction of the protein structure correlated with a specific disease, using the latest bioinformatics tools, it is possible to examine how the molecule is functioning. This knowledge allows to lower the price and time consumed by pharmacological studies. Furthermore, another reason for protein structure prediction is low ratio of proteins with resolved structures, comparing to the total number of known protein sequences. Statistics of 12.11.2012 from protein databases like UniProt [6] and PDB [1] show that this ratio is c.a. 0.3%. Such a low ratio is due to the difficulties in obtaining crystallographic structures. One of the methods supporting protein structure prediction is application of contact sites prediction in the full structure prediction procedure. Two aminoacids are regarded as a contact site when two of their atoms (usually C_{α} or C_{β} from the main backbones of each of them) are not further from each other than a selected distance value. Nowadays, accuracy of contact sites prediction is around 35%, which is not enough for a full protein structure reconstruction. However, this value is still increasing due to increase of knowledge about contact sites and aminoacid interactions.

* Scientific Student Association „BioNanopore”, Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Technology.

** Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation, Faculty of Fundamental Problems of Technology, Wrocław University of Technology.

Next problem, which occurs in recent bioinformatics, is protein classification. Nowadays, many protein databases differently classify proteins, according to their structural or functional similarity, and organize them in different, hierarchized groups. One of the most popular databases are SCOP (Structural Classification of Proteins) [4] and CATH (an acronym of its groups names) [5]. The main difference between them is the procedure of protein classification. In SCOP this process is entirely expertised, so it depends on the investigation and personal assessment of a protein made by an expert. CATH database links the expertised system with automatic procedure [3]. Another difference between these two databases is related to names used for different protein groups and features of proteins classified as members of these groups. For example, CATH defines four levels, listing from the most general [5]:

- Class – includes proteins composed mainly of one secondary structure – alpha helix or beta structure, or both in similar quantity,
- Architecture – includes proteins in which secondary structures are placed in space similarly to each other but the way of their inter-connection is not important,
- Topology – similar to the Architecture, however it includes the inter-connection between secondary structures,
- Homologous Superfamily – includes homologues proteins.

It is impossible to simply determine which way of protein classification is proper and sometimes different scientists use different databases in their studies. A correct way of protein grouping is of great importance because it can be a source of additional knowledge about newly discovered proteins. Furthermore, it can unify the way of protein study. That is why the idea of searching new features, which can describe proteins in groups, is so relevant.

The objective of our study was to investigate if there is any relation between characteristics of contact sites in proteins and the protein class or topology. Knowledge gained that way may not only show some new aspects and possibilities of protein classification but also provides new data that could be used in contact sites prediction.

2. Methods

According to [2] we examined contact sites occurrence in 2088 proteins identically categorized by CATH [5] and SCOP [4] databases, grouped in Alpha and Beta classes according to their secondary structure, with 13 and 12 topologies, respectively. We used those topologies of which at least 20 proteins were available in this dataset. Table 1 presents a list of these topologies with their numbers later used in our analysis.

Information about atom coordinates for this dataset was obtained from the PDB database of molecular structures [1] and the nomenclature of groups was used according to the CATH database. All calculation procedures were implemented with MATLAB ver. R2011a. To analyze the occurrence pattern of contact sites in proteins we defined a contact site such that the space distance between C_{β} atoms of two different aminoacids was not greater than a specified distance value (cutoff value) and the contacting aminoacids were separated in a protein sequence by no more than a specified number of aminoacids

(separation value). We calculated contact sites using cutoff values of 6–12Å and separation values of 5–15 aminoacids.

Table 1. List of topologies of which at least 20 proteins were available in the analyzed dataset.

Number	Class	Topology
1	Alpha	Growth Hormone; Chain: A;
2	Alpha	Methane Monooxygenase Hydroxylase; Chain G, domain 1
3	Alpha	Glutathione S-transferase Yfyf (Class Pi); Chain A, domain 2
4	Alpha	Glycosyltransferase
5	Alpha	Globin-like
6	Alpha	Cytochrome Bc1 Complex; Chain D, domain 2
7	Alpha	Helix Hairpins
8	Alpha	Recoverin; domain 1
9	Alpha	Four Helix Bundle (Hemerythrin (Met), subunit A)
10	Alpha	DNA polymerase; domain 1
11	Alpha	Serine Threonine Protein Phosphatase 5, Tetratricopeptide repeat
12	Alpha	Single alpha-helices involved in coiled-coils or other helix-helix interfaces
13	Alpha	Arc Repressor Mutant, subunit A
14	Beta	Pectate Lyase C-like
15	Beta	Trefoil (Acidic Fibroblast Growth Factor, subunit A)
16	Beta	Laminin
17	Beta	Methylamine Dehydrogenase; Chain H
18	Beta	PH-domain like
19	Beta	Elongation Factor Tu (Ef-tu); domain 3
20	Beta	Lipocalin
21	Beta	Pdz3 Domain
22	Beta	SH3 type barrels
23	Beta	OB fold (Dihydrolipoamide Acetyltransferase, E2P)
24	Beta	Jelly Rolls
25	Beta	Immunoglobulin-like

The first step in the analysis was the examination if the appearance frequency of different aminoacids, in the studied proteins, is similar to the general frequency of their occurrence in proteins from UniProt database, which is necessary so that our dataset was representative of the protein world.

The term „contact degree” is understood as a number of contact sites for a specified residue, cutoff and separation values. In our analysis we calculated a value of „average

contact degree” which is an average of contact degrees of all aminoacids in analyzed proteins for specified cutoff and separation values. Introduced parameters are „aminoacids frequency-of-forming-contact-sites factors” for classes and topologies separately (W_c and W_t , respectively) and „standard deviation for topologies” (S_t) which are defined as follows:

$$W_{c,a,k} = \frac{I_{c,a,k}}{I_{w,a,k}} \quad (1)$$

where:

I_c – number of contact sites formed by aminoacid of type a in the class k

I_w – number of all aminoacids of type a in the class k

$$W_{t,a,t} = \frac{I_{c,a,t}}{I_{w,a,t}} \quad (2)$$

where:

I_c – number of contact sites formed by aminoacid of type a in the topology t

I_w – number of all aminoacids of type a in the topology t

$$S_{t_t} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1} \sum_{a=1}^n (W_{t,a,t} - W_{c,a,k(t)})^2 \right)} \quad (3)$$

where:

n – number of different types of aminoacids (here 21)

$k(t)$ – class k which contains the topology t

W_c and W_t factors show how often one aminoacid form a contact site comparing to the number of its occurrence in proteins from specified class or topology, respectively. Then, factor S_t shows how the characteristic of W_t factors for proteins from specified topology differs from the characteristic of W_c factors for proteins from a class of this topology.

3. Results

a. Dataset representativity

Fig. 1a shows a bar plot of appearance frequency of different aminoacids in the studied protein dataset. Bars positions are similar to the corresponding plot created for proteins from UniProt database, which is available on the UniProtKB/SwissProt website [7]. This plot is presented in Fig. 1b. Especially, 6 top frequent aminoacids are the same. This comparison shows that the dataset used for our study is representative enough of the protein world.

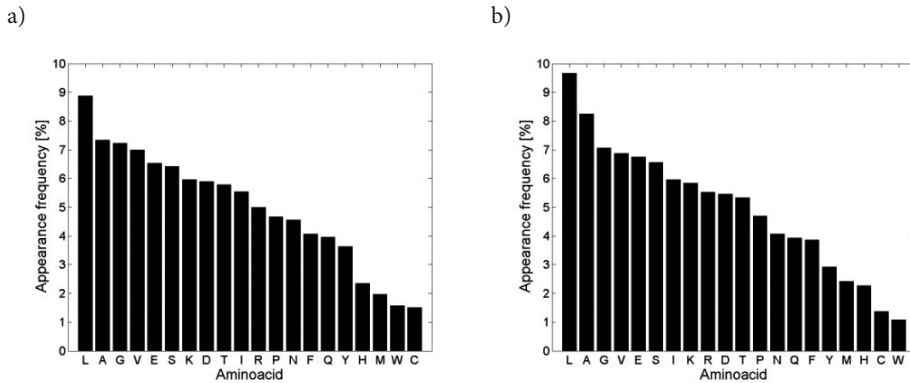


Fig. 1. Appearance frequency of different aminoacids: a) in the studied dataset; b) in UniProt database

b. Contact site degree

In the first step we examined the dependency between the average contact site degree and cutoff and separation values. We separated the results for Alpha and Beta classes (Fig. 2 and 3).

Fig. 2 and 3 clearly show that both dependencies can be described with formulas on a high level of correlation (R^2 value). In both cases the formula is described by exponential function and the values of average contact degree are always higher for proteins from class Beta than those from class Alpha. Different formulas for different classes allow determining the characteristics of contact sites before their prediction. Furthermore, this formula can be helpful in protein classification. The only information which is needed is a secondary structure of a protein, especially the ratio between alpha helix and beta structure occurrence. Fig. 2 and 3 show also that while the dependency between average contact degree and cutoff value is increasing, the dependency between average contact degree and separation value presents an opposite behaviour. Moreover, the slope of the second dependency is steeper than of the first one, which is expectable and can happen for a few reasons. Firstly, the change in the cutoff value, which was used in defining the contact site, should have a higher impact on contact site occurrence. Also, the atom size is on the level of 1\AA . Assuming that the average dimension of aminoacid is 3\AA (from amino to carboxyl group), it seems clear that, to make a change of separation parameter more important for occurrence of contact site, it should be less than 3 aminoacids for cutoff value of 6\AA and less than 5 aminoacids for cutoff value of 12\AA . In our study we analysed contact sites occurrence for separation parameter higher or equal 5 aminoacids to avoid counting contact sites typical for different secondary structures.

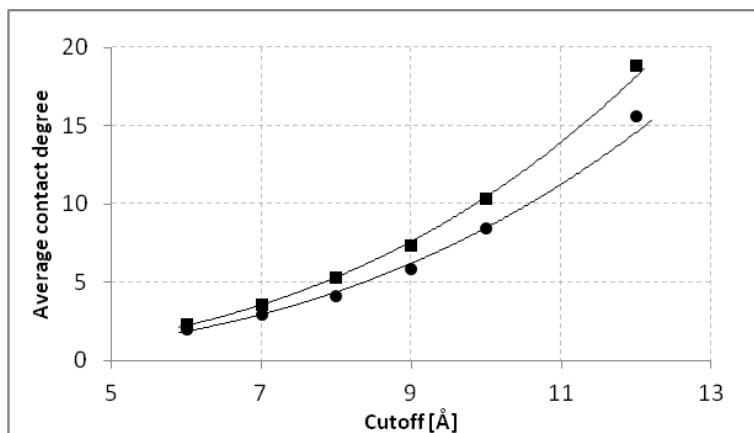


Fig. 2. Dependency between average contact degree and cutoff value for Alpha (●) and Beta (■) proteins at separation value of 10 aminoacids. Both dependencies can be described with exponential functions $y=0.0091x^{2.97}$ and $y=0.01x^{3.02}$, respectively on a high level of correlation $R^2=0.9937$ and $R^2=0.9986$, respectively.

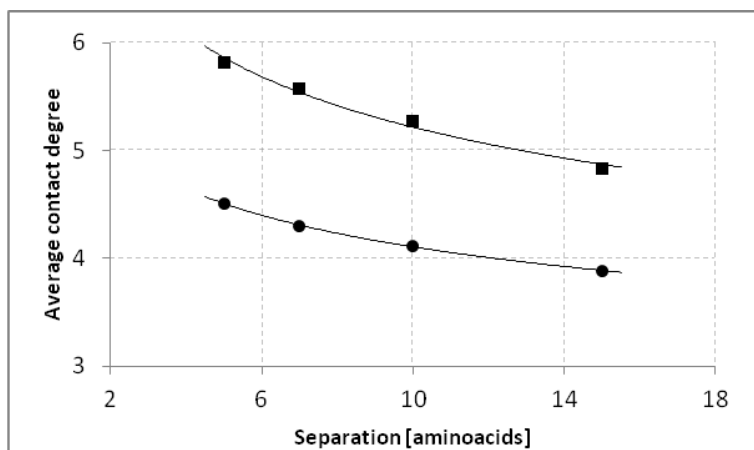


Fig. 3. Dependency between average contact degree and separation value for Alpha (●) and Beta (■) proteins at cutoff value of 8 Å. Both dependencies can be described with exponential functions $y=5.6x^{-0.135}$ and $y=7.7x^{-0.169}$, respectively on a high level of correlation $R^2=0.9997$ and $R^2=0.9858$, respectively.

c. Frequencies of forming contact sites

In the next step of our analysis we examined what is the frequency of forming contact sites for different aminoacids separating the results on two classes. Fig. 4 and 5 present bar plots of W_c (Eq. 1) for contact sites in different classes and for different values of cutoff and separation values tested.

Comparing Fig. 4a and 5a, it is clear that a shape of bar plots does not change depending on the class they describe and the relations between two next bars (for two next aminoacids on the x-axis) remain similar. The only differences are higher levels

reached by bars describing results for class Beta (Fig. 5a). It stems from the fact that the occurrence of contact sites in class Beta is higher than in class Alpha.

The influence of cutoff and separation parameters on factor W_c are easy noticeable. Fig. 5a and 5b show the results for differently chosen cutoff values. As it can be seen, this change affects bars for all aminoacids in the same way. Therefore, with the increase of the cutoff value, the values of W_c factors grow for all aminoacids and the relation between values for two next aminoacids on the x-axis remains the same. It is because the growth of the cutoff value increases the probability of contact site occurrence for every aminoacid in the same way. Fig. 4a and 4b show results depending on the value of separation parameter. Their comparison supports the observation that an increment of separation parameter has lower impact on contact sites occurrence than a change in the cutoff parameter. However, it is still noticeable that for higher value of separation, lower values of W_c factors occur.

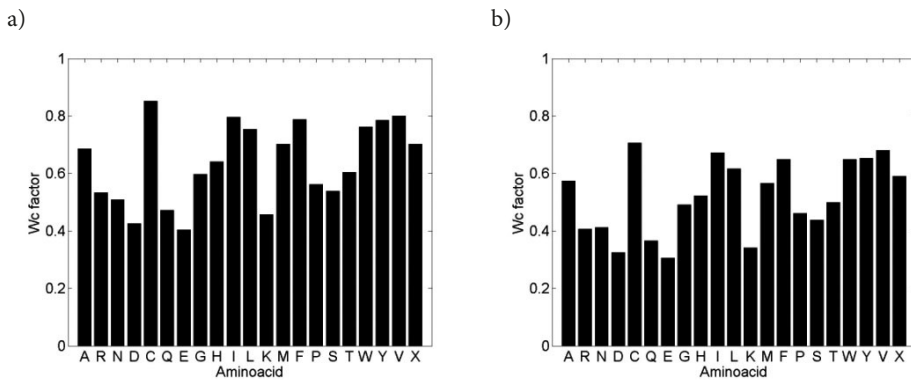


Fig. 4. Values of aminoacids frequency-of-forming-contact-sites factors (W_c) for proteins from class Alpha: a) cutoff = 6 Å, separation = 5 aa; b) cutoff = 6 Å, separation = 15 aa

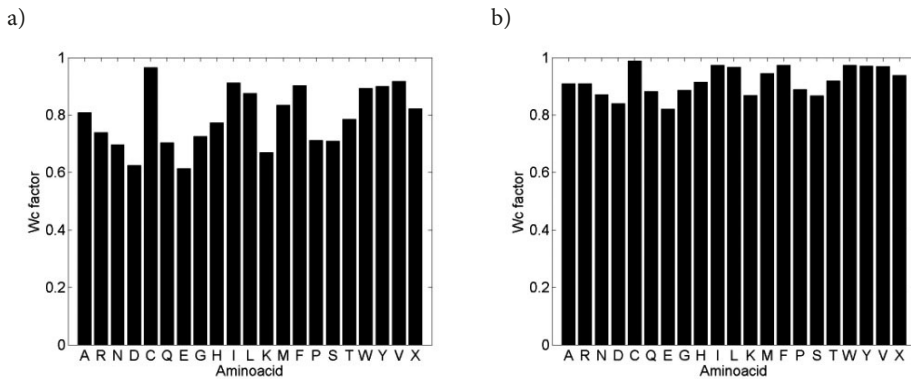


Fig. 5. Values of aminoacids frequency-of-forming-contact-sites factors (W_c) for proteins from class Beta: a) cutoff = 8 Å, separation = 5 aa; b) cutoff = 8 Å, separation = 5 aa

Fig. 4 and 5, show aminoacids with particularly high level of W_c factor. It means that these aminoacids create contact sites more often than the others. These aminoacids are similar for both Alpha and Beta classes. They are cysteine (C), isoleucine (I), leucine (L), methionine (M), phenylalanine (F), tryptophan (W), tyrosine (Y) and valine (V). The reason why these aminoacids create contact sites the most often lays in their physicochemical nature. All of them are hydrophobic and neutral. The lack of charge makes them more prone to make a contact site because they are not repelled by aminoacids with a positive or negative charge. Therefore, they can form contact sites with more aminoacids. The hydrophobicity increases the probability of creating contact site because in water environment these aminoacids are pushed away from water molecules to inside of the protein. Therefore, they have more close aminoacid neighbours, which makes them more favourable in forming contact site. Furthermore, from all aminoacids cysteine creates contact sites most often. This aminoacid has the ability of creating disulfide bonds which are very strong and take part in constructing the tertiary structure of a protein. Cysteines in such bonds, which are in the same time far from each other in the sequence, are counted as a contact site. Since most of the cysteines create this bond, their W_c factor value is high.

Similarly, we can indicate aminoacids whose W_c factors are the lowest (Fig. 4, 5). These are aspartic acid (D), glutamic acid (E) and lysine (K). They are all hydrophilic and charged. That is why it is absolutely understandable why they are creating contact sites least often.

d. Deviation of topologies

In the last step of the analysis we examined the frequency of forming contact sites for different aminoacids in different topologies. For this purpose we used the W_t factor (Eq. 2) and analyzed each of 25 topologies separately (Table 1). We also calculated standard deviation of the topologies S_t (Eq. 3). The smaller value of S_t , the better a topology represents its class. Fig. 6 presents values of S_t for all 25 topologies for the cutoff of 8Å and separation of 7 aminoacids.

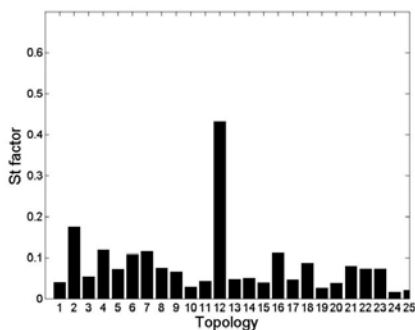


Fig. 6. Standard deviation for topologies (S_t) for cutoff of 8Å and separation of 7 aminoacids



Fig. 7. Representative domain 1mz9A00 of topology „Single alpha – helices involved in coiled-coils or other helix-helix interfaces” [5]

Fig. 6 shows that most of the topologies are good representatives of their classes, having S_i value lower than 0.1. However, topology 12 had S_i much higher than the other topologies, so its contact site characteristic differs very much from its class. This topology is called „Single alpha-helices involved in coiled-coils or other helix-helix interfaces” and belongs to class Alpha. The representative domain of this topology is shown in Fig. 7. It means that this topology gathers proteins of single alpha helices. That is why it is difficult to obtain any contact site in this kind of proteins, especially with the separation value of 7 aminoacids (Fig. 6). Some of the proteins in the 12th topology have contact sites however it is because of the bends of their alpha helices.

4. Conclusions

The results of our analysis show that a classification of proteins only by their contact sites distributions might be difficult. However this information can support the classification process. Despite the fact that relations between frequencies of forming contact sites by different aminoacids are similar in both classes Alpha and Beta, the values of these frequencies are higher for the second class. Furthermore, the dependency between the average contact degree and distance parameters can be described with two formulas, different for different classes. This information can support not only the protein classification process but also the prediction of contact sites. Then, the only information which is needed is the secondary structure occurrence in the analyzed protein. Finally, we showed that within different protein classes there might be topologies with totally different characteristics and frequencies of contact sites presence comparing to the characteristics of those classes.

Acknowledgements

This work was in part supported by the grant N N519 643540 from National Science Center of Poland. Wroclaw Centre for Networking and Supercomputing at Wroclaw University of Technology is greatly acknowledged.

Summary

Contact sites between aminoacids characterize the most relevant structural features of proteins. We investigated relations between characteristics of contact sites and protein class or topology. A set of proteins identically categorized by CATH and SCOP databases was tested. The proteins were grouped in Alpha and Beta classes, with 13 and 12 topologies, respectively. Contact maps of protein structures were obtained for a selected set of physical distances in the main backbone and separations in protein sequences. We showed that the contact degree depends on distance parameters exponentially. Residues forming contact sites most frequently were specified and their molecular features and role in the protein structure discussed. Specific topologies were described with regard to their contact site characteristics and compared to the whole protein class. This gives the possibility of using our results in protein classification.

Keywords: contact sites, protein classification

Literature

- [1] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E., *The Protein Data Bank*, *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:235–42.
- [2] Csaba G., Birzele F., Zimmer R., *Systematic comparison of SCOP and CATH: a new gold standard for protein structure analysis*, *BMC Structural Biology* 2009; 9:23.
- [3] Hadley C., Jones D. T., *A systematic comparison of protein structure classifications: SCOP, CATH and FSSP*, *Structure* 1999; 7:1099–1112.
- [4] Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C., *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*, *J.Mol.Biol.* 1995; 247, 536–540.
- [5] Orengo C. A., Michie A. D., Jones S., Jones D. T., Swindells M. B., Thornton J. M., *CATH – a hierarchic classification of protein domain structures*, *Structure* 1997; 5:1093–1108.
- [6] The UniProt Consortium, *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*, *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: D71-D75.
- [7] <http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html>; retrieved 12.02.2013

Modelowanie epidemiologiczne przy wykorzystaniu analizy tymczasowych sieci społecznych

Andrzej Jarynowski*

Summary

Characteristics of contacts in the form of time and the network structure (when and with whom) has an impact on the spread of infectious diseases. In connection with the development of computer methods, their methods have been applied in social networks analyze. On another level, the network structure of epidemiological models have been introduced. In this paper I present two types of infections: HIV and Chlamydia bacteria (ie, sexually transmitted infections: STI) and HA-MRSA (ie, hospital infection methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), which spread in different ways in different communities. In my study, I will focus mainly on secondary analysis of Swedish data of hospital infections and sexuality. Main, the general result of research is to restore the network of contacts in hospitals and to build sexual networks based on incomplete and highly sensitive data. The primary, a particular outcome for this study is to identify the most risky sexual behavior (for different groups of pathogens), their location in culture. I reconstructed, using an epidemiological model of q-MCMC (quasi-Monte Carlo Markov Chain), the outbreak of MRSA in a Stockholm hospital. I tried to locate and assess the potential role of 'super-spreaders' in a closed communities.

Keywords: Epidemiological modeling, complex networks, social networks analysies (SNA), sexual transmitted infections (STI), hospital aquaired infections (HAI)

1. Kontrola epidemiologiczna

Zgodnie z klasycznym trójkątem epidemiologicznym [1], choroba zakaźna może się rozprzestrzeniać tylko w obecności źródła, podatnych jednostek i odpowiedniego środowiska. Na elementy trójkąta (osobno lub w połączeniu) kierowane są działania prewencyjne oraz interwencyjne. Zazwyczaj najważniejszym etapem działania epidemiologicznego jest identyfikacja czynnika chorobotwórczego. Całą trudnością jest ustalenie źródła na podstawie posiadanych danych. Kiedyś praca epidemiologa była podobna do detektywistycznej. Przykładem jest spektakularne odkrycie przez dziewiętnastowiecznego londyńskiego burmistrza [1] źródła cholery na podstawie porównania dwóch baz danych. W tym przypadku została znaleziona korelacja między liczbą zachorowań a przedsiębiorstwami wodociągowymi, które dostarczały wodę do poszczególnych dzielnic. Po badaniach sanepidowych okazało się, że jedna z tych firm pobierała wodę ze studni

* Zakład Teorii Układów Złożonych, Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego, Uniwersytet Jagielloński, Instytut Socjologii, Uniwersytet w Sztokholmie, CIOP – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie.

głębinowej zainfekowanej pałeczkami cholery. W niniejszym artykule skupiono się na innym elemencie trójkąta epidemiologicznego – na łańcuchu zakażeń. W tym wypadku również istotna jest wiedzę o tym, kto kogo zaraził. Celem raportowania nowo wykrytych infekcji jest odtworzenie łańcucha kontaktów – co ma bardzo duże znaczenie w przypadku chorób nieendemicznych. Znając historię transmisji zarażeń, służby epidemiologiczne mają szansę znaleźć miejsca, obszary, ludzi lub inne istoty żywe – rezerwuary patogenu. Nie jest to zadanie łatwe i do tej pory mogło być realizowane tylko na skalę lokalną. Pojawiające się techniki komputerowe pozwoliły na automatyzację w procesie zbierania i analizy informacji. Jednak cały czas braki danych stanowią problem w procesach decyzyjnych. Zadaniem badacza właśnie odtwarzanie wiedzy o przebiegu epidemii na podstawie niepełnych informacji.

2. Modele matematyczne

Posiadając dane warto pokusić się o zbudowanie modelu matematycznego, który wyjaśniłby badane zjawisko i pozwoliłby przygotować skuteczne narzędzia w walce z chorobami zakaźnymi. Ponieważ problem wymaga wiedzy z różnych dziedzin, wymagana jest więc współpraca naukowców z różnych środowisk naukowych, nie tylko lekarzy, ale również: fizyków, matematyków, statystyków, informatyków i socjologów. Wszyscy z nich mają coś do dodania w różnych częściach: od matematycznego postulowania problemu, przez informatyczne symulacje oraz koncepcje zaczerpnięte z fizyki, a skończywszy na wyrafinowanych socjologicznych i statystycznych analizach.

Epidemiologiczne modele, które traktują o transmisji z człowieka na człowieka, od lat 20. XX w. opisywane są równaniami różniczkowymi. Jednak w nowszych opisach pojawiają się częściej modele agentowe (ang. *agent based models*). Symulacje komputerowe zaczęły grać znaczącą rolę, odkąd ilość i zróżnicowanie interakcji społecznych we współczesnym świecie skomplikowało się, a zachowanie jednostek nie jest homogeniczne. Mimo wszystko to dzięki rozwiązaniom równań różniczkowych nauczyliśmy się „rozumieć” procesy epidemiologiczne i dlatego, z edukacyjnego punktu widzenia, warto od nich zacząć.

3. Modelowanie SIS oraz SIR [2, 3]

Matematyczny opis zjawisk wymaga określenia założeń w celu zrozumienia rzeczywistej sytuacji. W pierwszej kolejności rozważony zostanie najprostszy przypadek rozprzestrzeniania się choroby bez zgonów i możliwości powrotu do zdrowia, na którą nikt nie jest naturalnie odporny. Założono, że populację można podzielić na dwie grupy, a ich liczebności w czasie to:

$$S(t) = \text{Liczba podatnych (Susceptible)}$$

$$I(t) = \text{Liczba zarażających (Infectives)}$$

gdzie $S(t)+I(t) = N$

Rozważmy jedną podatną osobę (S) w populacji homogenicznej (jednorodnie wymieszanej). Indywidualne kontakty z innymi członkami społeczeństwa oznaczmy C (z jednostką czas⁻¹) i proporcją I/N kontaktów z zarażonymi. Jeśli prawdopodobieństwo przeniesienia

zakażenia na jeden kontakt wynosi β , wtedy tempo przenoszenia patogenu na podatnych (S) wynosi $\beta CI/N$, a tempo stawanie się przez nich zarażającymi (I) – $\beta CSI/N$.

Częstość (C) może być funkcją gęstości zaludnienia, co odzwierciedla fakt, że zakładamy jednorodne cechy wszystkich jednostek w subpopulacji. Można wyobrazić sobie sytuacje, w których C mogłoby być proporcjonalne do N lub C może być po prostu stałą. Wyrażenia takie jak βSI i $\beta SI/N$ często pojawiają się w literaturze. Żeby zmniejszyć liczbę parametrów zapiszmy: $r = \beta C/N$. Wtedy zmiana liczebności subpopulacji zarażających (I) będzie określana przez:

$$\frac{dI}{dt} = rSI \quad (1)$$

Ten prosty model pokazuje, że epidemia rozprzestrzenia się szybko dzięki zamkniętości społeczności, gdy zasadne jest założenie, że nie można się wyleczyć (umrzeć) w okresie epidemii. Jednak nie jest to prawdziwe w większości przypadków. Tym samym można rozwinąć model przez dodanie wyleczenia (szybkość leczenia). Po odzyskaniu zdrowia jednostka jednak nie staje się odporna na chorobę i ponownie jest na nią podatna.

$$\frac{dI}{dt} = rSI - aI \quad (2)$$

W następnym kroku założono, że populacja jest podzielona na trzy klasy: podatni (S), którzy mogą zarazić, zarażający (I), którzy mogą przekazywać chorobę i usunięci (R), który przeżyli chorobę i są zdrowi (z odpornością na patogen) lub zostali wyłączeni ze społeczeństwa (zostali odizolowani lub po prostu zmarli). Schemat przejść może być reprezentowany przez:

$$S \rightarrow I \rightarrow R$$

Taki system może zostać zapisany w postaci układu równań różniczkowych:

$$\begin{aligned} \frac{dI}{dt} &= rSI - aI, \\ \frac{dS}{dt} &= -rSI, \\ \frac{dR}{dt} &= aI \end{aligned} \quad (3)$$

Wybór parametrów modelu oraz warunków początkowych r , a , S_0 , I_0 powoduje, że czasami mamy do czynienia z epidemią, a czasami ona nie wybucha. Dla warunku początkowego na S, że $S_0 < a/r$, wtedy $dI/dt < 0$ i w każdym momencie $I_0 > I(t)$ oraz I zmierza do 0 z t dążącym do nieskończoności. Z drugiej strony, jeśli $S_0 > a/r$, wtedy $I(t)$ wzrasta i epidemia wybucha. Mamy tu do czynienia z pewnym progiem.

Zdefiniujmy zatem:

$$R_0 = \frac{rS_0}{a} \quad (4)$$

gdzie R_0 jest stopą reprodukcji epidemii.

Ta stopa jest kluczowa w kontroli epidemiologicznej, np. w szczepieniu populacji. Akcja jest potrzebna dla $R_0 > 1$, ponieważ poniżej tej wartości epidemia naturalnie wygasa. Właśnie określenie wartości R_0 jest standardowym zadaniem epidemiologa. Znając tę wartość rysują się różne ścieżki zatrzymania epidemii. W obecnych czasach nie tylko zdrowie społeczeństwa jest ważne, ale również koszt, jaki musi zostać poniesiony przez służbę zdrowia. Przykładem ekonomicznego zastosowania różniczkowego modelu SIR jest ustalenie procentowego pokrycia społeczeństwa szczepieniami. Wystarczy w modelu wyznaczyć minimalną część populacji szczepionej, dla jakiej $R_0 < 1$ z odpowiednim zapasem, to otrzymamy wtedy informację, że nie trzeba kupować szczepionek dla wszystkich, tylko dla tej zoptymalizowanej subpopulacji. Na powyższym przykładzie pokazano, że równania różniczkowe cały czas dają nam wiele informacji i lepiej pozwalają zrozumieć zjawisko, ale w przypadku ogromnej ilości wiedzy, jaką posiadamy o społeczeństwie, nie dają się już tak łatwo stosować. Największym mankamentem jest potrzeba budowy kolejnego równania dla każdej wydzielonej podgrupy. Dlatego w moich rozważaniach będę stosował modele agentowe, dla których niejednorodność jednostek nie stanowi problemu.

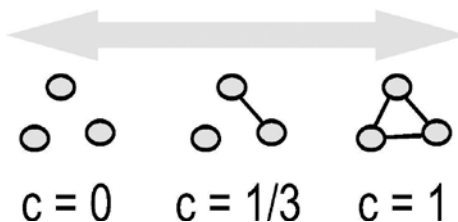
4. Sieciowe modele agentowe

Aby móc symulować epidemię na sieciach, najpierw wprowadzono SNA (ang. *social network analyse*), czyli prężnie rozwijającą się dziedzinę nauki. Dyscyplina ta czerpie z teorii grafów stosowanej na gruncie nauk społecznych. Jej przedmiotem są sieci tworzone przez różnego rodzaju „obiekty” społeczne – są nimi najczęściej ludzie, ale także grupy, firmy czy nawet państwa. Podstawowe terminy to:

- wierzchołki (węzły) = poszczególne elementy sieci, np. ludzie, ale w ogólności mogą to być elektronicznie, neurony, firmy itp.,
- krawędź (połączenie) = bezpośredni związek między elementami (w *social networkingu* jest to związek dwóch osób), który może być skierowany bądź nie,
- ścieżka = trasa łącząca dwa węzły (wierzchołki).

Opisując sieć używa się różnych współczynników oraz metod rozpoznawczych.

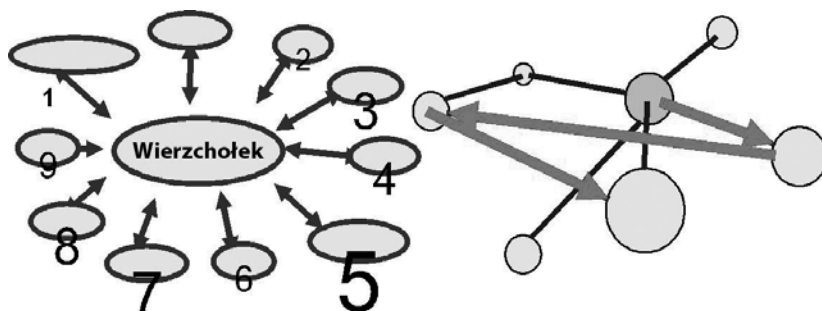
Klasteryzacja: sposób grupowania (ang. *clustering*), interpretowany jako rozmieszczenie blisko siebie obiektów w jakiś sposób ze sobą powiązanych, a powstała struktura fizyczna określana jest jako klastery lub grono. Współczynnik gronowania c (klasteryzacji) służy do szacowania, ilu sąsiadów danego wierzchołka jest połączonych każdy-z-każdym (rys. 1). Jest to iloraz liczby krawędzi pomiędzy sąsiadami danego wierzchołka oraz liczby krawędzi, jaki miałby graf pełny składający się z tych sąsiadów.



Rys. 1. Współczynnik gronowania (klasteryzacji) jest wyliczany na podstawie ilości trójkątów w sieci

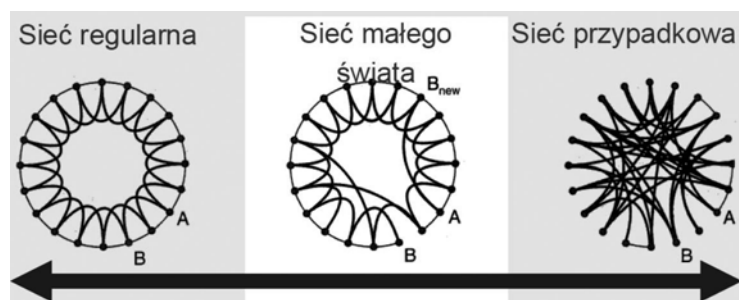
Średnia odległość między węzłami: średnia długość ścieżki w sieci mówi, przez ile wierzchołków należy średnio przejść, aby dojść od jednego wierzchołka do dowolnego innego (rys. 2 prawy).

Rozkład krotności wierzchołka (który będzie miał kluczową rolę w klasyfikacji sieci): rozkład ilości kontaktów posiadanych przez poszczególne jednostki (rys. 2 lewy) .



Rys. 2. Od lewej: przykładowy wierzchołek o krotności 10.; ścieżka między wierzchołkami

Losowość. Bardzo często sieci rzeczywiste są porównywane z teoretycznymi sieciami złożonymi, ponieważ ich własności są dobrze zbadane. Społeczeństwo, na które spojrzemy jak na zbiór osób powiązanych znajomościami, przyrównywane jest do znanej z przyrody struktury regularnej (jak w kryształach) lub do w pełni losowej (którą można wygenerować z procesu przypadkowego) (rys. 3). Jeśli nasza wygenerowana, w pełni losowa sieć będzie miała rozkład stopni wierzchołków spełniający określone prawo, to możemy ją odpowiednio sklasyfikować. Wyróżnia się 2 podstawowe typy sieci przypadkowych [4]:



Rys. 3. Graficzna ilustracja poziomu losowości od sieci regularnej po sieć przypadkową

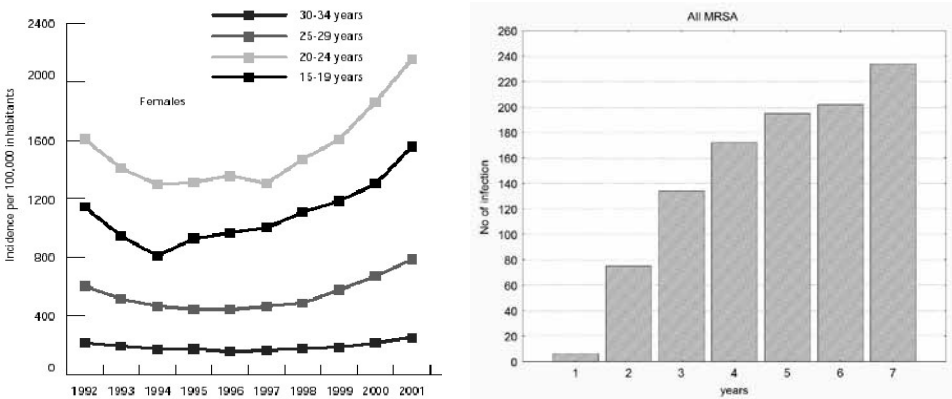
- rozkład krotności wierzchołków spełnia prawo potęgowe (oczekiwana ilość wierzchołków o stopniu k będzie proporcjonalna do $k^{-\alpha}$, gdzie α jest wykładnikiem w okolicach 1) wtedy klasyfikujemy tę sieć jako bezskalową lub inaczej Barabasi-Albert (BA);
- rozkład krotności wierzchołków spełnia prawo wykładnicze (oczekiwana ilość wierzchołków o stopniu k będzie proporcjonalna do $\exp(-k)$), wtedy klasyfikujemy tę sieć jako przypadkową prostą lub inaczej Erdosa-Renyiego (ER).

Pomiędzy skrajnymi przypadkami (regularnymi i losowymi) plasuje się sieć małego świata, często nazywana Wattsą i Strogatzem (WS), gdzie na sieć regularną nałożone są przypadkowe połączenia. Odzwierciedlać to ma zjawisko znane w socjologii już od 1967 roku, po eksperymentach Milgrama, jako proces sześciu uściśnień ręki. Wspomniany amerykański psycholog społeczny rozesłał do kilkuset losowo wybranych ludzi z Nebraski i Kansas przesyłki z prośbą, by przekazali je dalej komuś ze swych znajomych, tak by możliwie najszybciej dotarły do pewnej osoby mieszkającej w Bostonie. Milgram śledził los przesyłek. Okazało się, że łańcuch dzielący od celu osoby, które losowo wybrał, miał średnio sześć ogniw.

5. Epidemiologia HAI i STI

Największym problemem w budowaniu modeli w zakresie zdrowia publicznego jest brak indywidualnych informacji na poziomie pacjentów. Ludzka seksualność oraz leczenie szpitalne należą do zachowań intymnych, w związku z tym bardzo trudno o dostęp i administrację danych, w tym wypadku szczególnie wrażliwych. Badania oparto na danych szwedzkich, ze względu na wyjątkowo wysoki stopień ingerencji państwa w życie obywateli, co skutkuje ogromną wiedzą o społeczeństwie i daje możliwość pracy na informacjach, które nigdzie indziej nie są dostępne.

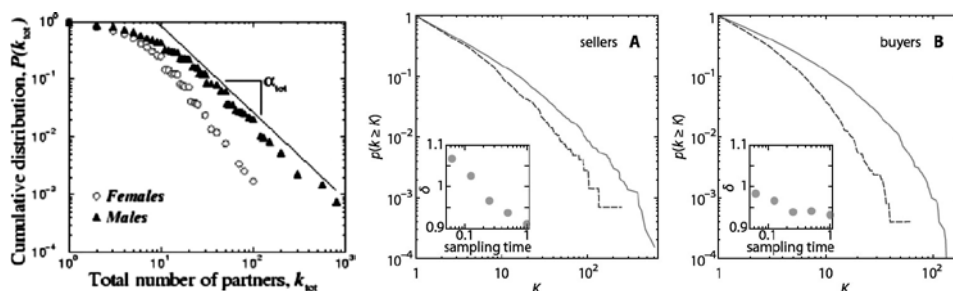
Tak więc podstawą do modelowania jest wiedza o kontaktach społecznych i liczbie zarażeń, co akurat w miarę precyzyjnie jest rejestrowane (rys. 4).



Rys. 4. Od lewej: przyrost zarażeń Chlamydią u młodych Szwedek w ostatnich latach [5]; przyrost zarażeń MRSA w sztokholmskich szpitalach w czasie epidemii (1999–2006)

Znacznie gorzej sytuacja ma się w przypadku wiedzy o kontaktach międzyludzkich. Do modelowania zakażeń szpitalnych wykorzystano rejestr wizyt w szpitalach hrabstwa sztokholmskiego wraz z bazą rejestrowanych przypadków testów pozytywnych na posiadanie MRSA. W przypadku stosunków seksualnych dostępne są jedynie opracowania statystyczne mieszkańców Gotlandii (rys. 5 lewy) oraz prostytutki brazylijskiej (rys. 5 prawy). W pierwszym przypadku, w ramach spisu powszechnego w Gotlandii, liczącej

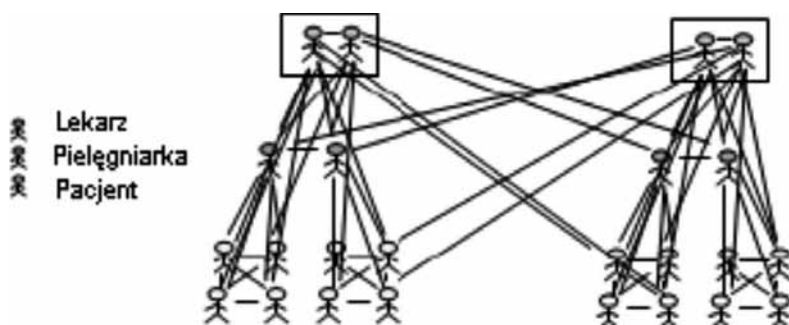
50 tysięcy mieszkańców, zostało zadane pytanie o ilość partnerów seksualnych. Sieci prostytutki zostały zbudowane na podstawie postów zamieszczonych przez Brazylijczyków na forum internetowym dotyczącym płatnego seksu. W celu zilustrowania sieci kontaktów zaprezentowano wykresy krotności wierzchołków, czyli ilości kontaktów przypadających na jednostkę.



Rys. 5. Od lewej: kontakty seksualne mieszkańców wyspy Gotlandii [6]; kontakty seksualne prostytutek (A) i ich klientów (B) [7]

6. Mechanizmy transmisji STI oraz HAI

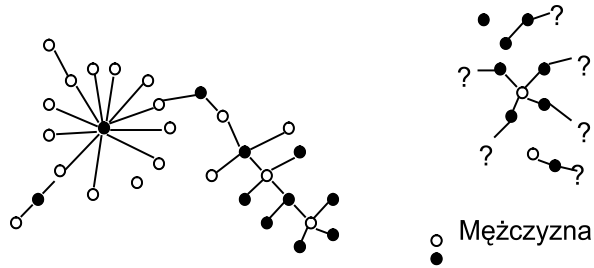
Istnienie kontaktu między jednostkami daje możliwość przekazania patogenu, ale tego nie gwarantuje. W celu określenia warunków zarażenia należy zbudować mechanizm transmisji. W przypadku HAI (rys. 6) wykorzystano dokładne dane dotyczące kontaktów między pacjentami (wyznaczonymi na podstawie przebywania w tej samej sali). Kontaktów z kadrą nie udało się uzyskać, ponieważ pracownicy szpitala ze względów prywatnych nie zgodzili się na rejestrację w systemie. Aby wprowadzić pośrednio rolę kadry dodano „wirtualne” kontakty na wyższym poziomie sąsiedztwa, czyli na poziomie klinik, w których zatrudniona jest kadra. Jeżeli chodzi o STI (rys. 7), to ciężko mówić w danych indywidualnych – nawet gdyby udało się je zebrać, byłyby niepełne (stąd znaki zapytania na rys. 7).



Rys. 6. Modelowe kontakty wewnątrzszpitalne, wskazujące na potencjalne ścieżki zarażeń

Jeżeli chodzi o choroby STI, to rodzaj patogenu będzie miał kluczowe znaczenie, np. w zarażeniu wirusem HIV (dla którego prawdopodobieństwo zarażenia w czasie pojedynczego stosunku jest małe: 0,08–1,2%) oraz bakteriami Chlamydii (gdzie to praw-

dopodobięństwo jest wysokie: 7–40%). Analiza sieciowa pozwala stwierdzić, że społeczeństwa zachodnie są bardziej podatne na zarażenia Chlamydią, ze względu na dużą liczbę kontaktów przygodnych, natomiast społeczeństwa z dopuszczalnymi poligamicznymi związkami, jak arabskie, są bardziej narażone na wirusy HIV, ze względu na intensywność współżycia seksualnego z wieloma partnerami.



Rys. 7. Modelowe kontakty seksualne. Znając topologię sieci można wnioskować o progę epidemiczną, szybkości rozprzestrzenia się epidemii. Położenie jednostek w sieci pomaga również w ocenie ryzyka zarażenia

7. Zastosowania i przyszłe analizy

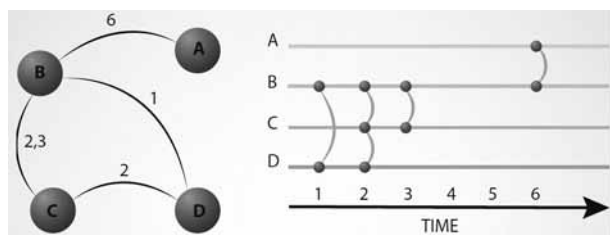
Problem zakażeń szpitalnych i kontaktów seksualnych można sprowadzić do jednej metodologii, ponieważ w obu przypadkach zakażenie może mieć miejsca praktycznie wyłącznie w określonych warunkach (w czasie stosunku przy STI czy przebywając w szpitalu – HAI). Na zasadzie analogii kadra szpitalna odpowiadałaby roli prostytutek (wektorów patogenu). Na zadane założenia [8] można nałożyć czasowo-przestrzenny model (rys. 8). Do zakażeń szpitalnych została zaimplementowana metodologia q-MCMC, dzięki której możemy symulować sztucznie epidemie na empirycznym zbiorze danych [9]. Jest to model typu SI, ponieważ większość typów MRSA była odporna na leczenie (w czasach, z których pochodzą dane). Prawdopodobieństwo przejścia ze stanu S do I jest dla agenta (reprezentującego pacjenta) i w chwili t opisywane funkcją:

$$p_i(t) = 1 - \exp\left(-\sum \sqrt{P_t(i,j)}s - \sum \sqrt{Q_t(i,j)}k - \sum \sqrt{P'_t(i,j')}m\right) \quad (5),$$

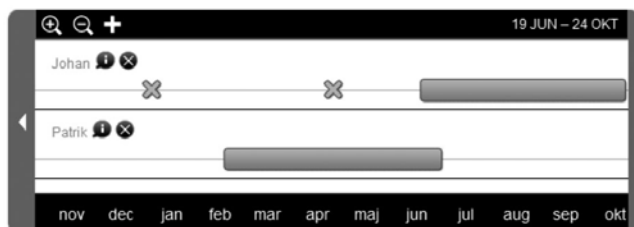
gdzie P jest macierzą kontaktów między zarażającymi na poziomie sal, Q na poziomie klinik, a P' uwzględnia wszystkich potencjalnych pacjentów.

Wynikiem takiej symulacji są nie tylko wirtualne epidemie, ale również ścieżki zakażeń (z wielu realizacji należy wybrać najczęściej powtarzające się).

Wspólnie z naukowcami ze Szwecji [10] opracowano projekt badania, dzięki któremu udałooby się odtworzyć sieć kontaktów seksualnych (która wymagałaby później stochastycznego uzupełnienia ze względu na braki danych wynikające z wrażliwości tematyki). Badanie zostało przygotowane w postaci anonimowej ankiety (rys. 9), w której każdy respondent miałby wylistować partnerów seksualnych (za pomocą aliasów, nie prawdziwych imion) i wskazać na osi czasu, kiedy dochodziło do zbliżeń.



Rys. 8. Model dynamicznej sieci kontaktów



Rys. 9. Layout ankiety do notowania kontaktów seksualnych, przeznaczony dla studentów szwedzkich miejscowości akademickich (ze względu na zamkniętość społeczności)

Streszczenie

Charakterystyka kontaktów społecznych w postaci czasowej i sieciowej struktury (kiedy i z kim) ma wpływ na rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych. W związku z rozwojem stosowanych metod komputerowych pojawiła się perspektywa wykorzystania ich w analizie sieci społecznych. Głównym celem wprowadzenia rozwiązań informatycznych w tym przypadku jest analiza kosztów i strat potencjalnych działań kontroli epidemiologicznej oraz wskazanie potencjalnych problemów, z którymi będzie musiała się zmagać służba zdrowia w przyszłości.

Modele epidemiologiczne zostały wprowadzone jakby na kolejnym poziomie struktury sieciowej. W pracy przedstawiono dwa typy zakażeń: wirusem HIV lub bakteriami Chlamydii (czyli choroby przenoszone drogą płciową: STI) oraz HA-MRSA (czyli szpitalne zainfekowanie gronkowcem złocistym, odpornym na metycylinę), rozprzestrzeniających się w odmienny sposób w różnych społecznościach. Zrozumienie wzorców kontaktów międzyludzkich oraz próba ich zamodelowania pomagają oszacować skalę zagrożenia oraz opracować metody kontroli epidemiologicznej. W badaniach skupiono się głównie na wtórnej analizie danych szwedzkich, dotyczących zakażeń szpitalnych oraz wynikających z kontaktów seksualnych. Głównym, ogólnym rezultatem badań jest odtworzenie sieci kontaktów w szpitalach oraz częściowo sieci stosunków seksualnych na podstawie niepełnych i bardzo wrażliwych danych. Porównanie sieci rzeczywistych z sieciami przypadkowymi o strukturze sieciowo-czasowej oraz konsekwencji dla epidemiologii różnych patogenów pomaga w ustaleniu znaczenia pozycji jednostek w procesie propagacji epidemii. Pierwszoplanowym, szczególnym wynikiem badań jest ustalenie najbardziej ryzykownych zachowań seksualnych (dla różnych grup patogenów) i umiejscowienie ich w kulturze.

Odtworzyłem za pomocą modelu epidemiologicznego q-MCMC (quasi-Monte Carlo Markov Chain) wybuch epidemii MRSA w sztokholmskich szpitalach. Już wstępna analiza, dotycząca wirusa HPV, pozwala wyciągnąć wnioski dotyczące optymalnej profilaktyki raka szyjki macicy w Polsce, dla różnych scenariuszy wzrostu poziomu seksualności. Podjęta została również próba odnalezienia i oszacowania roli potencjalnych „super-roznosicieli” w zastanej społeczności. Za to analiza czasowo-sieciowa kontaktów seksualnych czy szpitalnych byłaby z kolei pierwszym empirycznym uzupełnieniem rozważań teoretycznych z tej dziedziny, co z naukowego punktu widzenia, pozwoliłoby na późniejsze weryfikowanie hipotez na danych rzeczywistych. Potencjalnie również techniki rozwijane w celu dopasowania kontaktów seksualnych (szpitalnych) w badanej społeczności mogą mieć wiele innych zastosowań, wszędzie tam, gdzie badacze będą dysponować jedynie danymi niepełnymi. Zbudowany model, który opisywałby rozprzestrzenianie się patogenów i pozwoliłby przygotować skuteczne narzędzia w walce z chorobami zakaźnymi, mógłby pomóc w podejmowaniu skutecznych akcji przez nadzór epidemiologiczny.

Literatura

- [1] Jędrzychowski W., *Podstawy Epidemiologii. Metody badań oraz materiały ćwiczeniowe*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2002.
- [2] James G., Steele N., *Advanced Modern Engineering Mathematics (chapter 10: Epidemics and spread of diseases)*, Prentice Hall 1999.
- [3] Murray J., *An Introduction (chapter 10: Dynamics of Infectious Diseases: Epidemic Models and AIDS)*, Mathematical Biology I. Springer 2002.
- [4] Albert R., Barabási A. L., *Statistical mechanics of complex networks*, Rev. Mod. Phys. 74: 47–97 2002.
- [5] <http://www.smi.se> (Szwedzki Instytut Kontroli Chorób Zakaźnych).
- [6] Liljeros, F. et al, *The Web of Human Sexual Contacts*, Nature 411, 907–908, 2001.
- [7] Rocha L. E. C., Liljeros F. et al, *Information dynamics shape the sexual networks of Internet-mediated prostitution*, PNAS 107 (13), 5706–5711, 2010.
- [8] Rocha L. E. C., *Exporing patterns of empirical networks*, Luis Rocha, Umea University, PhD Thesis, 2011.
- [9] Jarynowski A., *Contact networks and the spread of MRSA in hospitals*, prezentacja konferencyjna, Zjazd Niemieckiego Towarzystwa Fizycznego (DPG), Ratyzbona 2010.
- [10] Camitz M., *Computer Aided Infectious Disease Epidemiology – Bridging to Public Health*, Karolinska Institutet, PhD Thesis, 2010.

Structural, energy and functional changes in different conformations of the potassium channel KcsA

Monika Kurczyńska*

Streszczenie

W pracy przeanalizowano struktury kanałów potasowych KcsA w różnych konformacjach: otwarte, zamknięte, przewodzące i nieprzewodzące. Analizie poddano zarówno parametry strukturalne jak i funkcjonalne. Określono zależności pomiędzy zmianami globalnymi a zmianami w filtrze selektywności i na bramce kanału. Przeanalizowano wpływ zmian strukturalnych na rozkład potencjałów elektrostatycznych i stwierdzono, że zmiany w filtrze selektywności są silnie widoczne w profilu potencjałów elektrostatycznych. Struktury nieprzewodzące miały zniekształcony profil potencjałów w stosunku do struktur przewodzących. Otwarcie lub zamknięcie bramki było natomiast mocniej zauważalne w zmianach RMSD struktury. Porównując charakterystykę funkcjonalną zamodelowaną metodą PNP z danymi eksperymentalnymi, pokazano, że jest to dobra metoda do określenia stanu konformacyjnego kanału potasowego.

1. Introduction

Proteins are located at different places of a cell, depending on their function. Transmembrane proteins that are responsible for ionic transport are called ionic channels. It is believed the ion channels constitute 25% of all proteins [23], but only 1,626 transmembrane protein structures is known, including 1,383 α -helix proteins and 232 β -barrels (data as of May 2012) [22]. The ratio is only 1.97% of all protein structures.

Ionic channels are interesting proteins for three reasons:

1. high speed of ion transport,
2. selectivity,
3. gating.

The potassium channel can transport 10^7 – 10^8 ions per second [17], which is comparable with diffusion in electrolyte. Due to these proteins the cell is equipped with ions all the time.

The second important feature is selectivity – privileged transport of one ion type. The selectivity filter (part of the channel) is responsible for ions selection. This part of the protein is very stable in genotype because it is the same amino acids sequence in different types of channels for the same type of ions. Selectivity is related to specific interaction between ions and residues of the channel wall. This interaction causes faster specific ions transport, which was confirmed by Brownian Dynamics simulation with and without the selectivity filter [4].

* Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation, Wrocław University of Technology.

Transport process is controlled by opening and closing of the gate. The protein conformation is changing and the pore at the entrance to the channel becomes wider. Control of the open-close states of the gate can be depend on different mechanisms and this defines the channel type [11]:

1. transmembrane potential,
2. interactions with a ligand,
3. mechanical stress,
4. interaction with electromagnetic radiation .

Ionic channels perform important roles in the human organism: regulation and control of ions transport from and to the cell. They participate in nerve and muscle impulse transfer, hormone regulation, blood pressure regulation and water regulation [20].

A wrong performance of an ion channel causes a lot of pathological processes, for example [2]:

- epilepsy (K_{Ca} , α -subunit of BK channel; $Na_v1.1$, neuronal α -subunit; Ca_v , neuronal β -subunit; Ca_v , neuronal $\beta4$ -subunit; CLC2, α -subunit of Cl – channel),
- myasthenia (AChR skeletal muscle, $\alpha1$ -subunit)
- cystic fibrosis (CFTR, epithelial Cl – channel)
- hyperinsulinism (Kir6.2, α -subunit of K_{ATP} channel; SUR1, β -subunit of β -cell K_{ATP} channel)
- catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (cardiac calcium channel SR, RYR2) [10,15].

As the first high-resolution (3.2 Å) a crystal structure of ionic channel potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans* was obtained [8]. Currently, there are about 30 KcsA structures deposited in Protein Data Bank (PDB) [23]. The structure was taken in different conformations: open, closed, conductive, and inactivated with two methods: NMR and X-ray crystallography. However, obtaining protein structure information is still a big challenge in proteomics. In UniProtKB/TrEMBL there are 22,669,469 amino acids sequences translated from DNA (as of 13 June 2012) [27], but in PDB database there are only 82,347 structures (as of 14 June 2012) [23]. Proteins move all the time (conformation is changing, thermal oscillations), but crystallization is the same as stopping of the life process. Hydrophobic amino acids of transmembrane proteins are the next obstacle in protein crystal preparation. Ionic channels are big proteins, so interpretation of the diffraction pattern is difficult.

One of the ways to solve the problem of protein structure is predicting the protein structure from amino acids sequences. Modeling methods can be divided into three types:

- a) ab-initio,
- b) comparative modeling (homology modeling/threading),
- c) modeling with constraints (contact maps).

A very important problem in modeling is good assessment of the protein structure model when there is no information about the structure. Function of ionic channels can be studied easily using the patch-clamp method [18] and compared to the computational characteristics for quality assessment of the protein structure model. Typical methods available for modeling of the transport in ion channels are:

- Molecular Dynamics (MD) [1,5,6],
- Brownian Dynamics (BD) [12,19],
- continuum theories of electrodiffusion, such as Poisson-Nernst-Planck model (PNP) [9].

2. Methodology

The potassium channel KcsA structures (PDB ID: 1k4c, 3f5w, 3f7v, 3f7y, 3fb5, 3fb6, 3fb8, 3eff, 3pjs) were downloaded from Protein Data Bank [23] and Orientations of Proteins in Membranes (OPM) database [16]; 3pjs [24] and 3eff [25] structures are full-length potassium channels in open and closed states, the others are only transmembrane parts. Transmembrane domains of 3eff and 3js were prepared cutting the long cytoplasmic domain to compare to the others. The structure 1k4c [26] is a closed-conductive structure, 3f5w [7] is an open-inactive conformation, 3fb8 is a open-conductive structure, and the rest of the structures are partially open-inactive or almost closed-conductive conformation, which are the intermediate states of the pathway between closed-conductive and open-inactivated conformation of C-type inactivation mechanism [7]. Information about the structure and resolutions are in Table 1.

Table 1. KcsA structure resolution and conformation [23]

PDB ID	Resolution [\AA]	Conformation
1k4c	2.0	closed-conductive
3f5w	3.3	open-inactivated
3f7v	3.2	open-inactivated
3f7y	3.4	partially open
3fb5	2.8	partially open
3fb6	3.0	partially open
3fb8	3.4	open-conductive
3eff	3.8	closed
3pjs	3.8	open

The gate and filter dimension was checked using Pymol [21]. The distance between C_{α} - C_{α} of Threonine 112 – gate and Glycine 77 – filter was calculated. The pore radius profiles were prepared for all structures and compared to the template, which was 1k4c structure, to calculate the root mean square error (RMSE). 1k4c was chosen as a template, because it is one of the oldest KcsA structure deposited in PDB, it has the best resolution and it is known to be a closed-conductive conformation. As a second parameter of the analysis, the electrostatic potential profiles of the channel were used. The RMSE of electrostatic potential profiles was calculated in this same way as RMSE of the pore radius. Electrostatic and exclusion grids were calculated with APBS with the resolution of 2 \AA [3] and analyzed with own application in MATLAB 2012. The root mean square deviation (RMSD) of the model structures were calculated with Pymol and with 1k4c

as a template. Functional parameters: ionic current and selectivity of the channel were calculated with 3D PNP solver [9] with a resolution of 2 Å. Calculation with 3D PNP solver of one structure takes about 2-3 Central Processing Unit minutes (CPU-minutes) on the Intel Xeon X5650 2.67 GHz (“Westmere-EP”, 32 nm).

3. Results

The potassium channel KcsA is built from [14]:

- transmembrane domain (TM), which has two segments: inner helix TM1 and outer helix TM2,
- P-loop is created by P-helix and selectivity filter (SF), which has the same motif in all potassium channels: TVGYG,
- cytoplasmic domain, which is rich in polar amino acids, because it is in the cell and can be used as a sensor for opening mechanism.

This subunit is repeated symmetrically four times. Full-length KcsA structures (3eff and 3pjs) do not have the four-symmetry but only two-symmetry. The gate dimension (Thr 112) is different in two planes: for 3eff there is 13 Å and 16 Å, for 3pjs 21 Å and 22 Å. The rest of the structures have four-symmetry and going from closed conformation to open conformation the distance between Thr 112 in four chains is wider for more open structures (Table 2).

The selectivity filter (Thr 75 – Gly 79) changed its minimal dimension depending on the degree of opening the gate from 5 Å (Gly 77 of 3f5w) to 10 Å (Gly 77 of 3fb5). The biggest change of distance between Gly 77 is observed for the widest open gate structure and the narrowest open gate structure excluding 1k4c.

The distances between C_α of selectivity filter residues of closed-conductive structure 1k4c are between 8 Å and 9 Å. When the gate is opening, the shape of the selectivity filter is changing (Table 1 and Figure 1). The change related to the gate opening is the most significant for Gly 77. First, when the distance between Thr 112 is about 15 Å, the selectivity filter at Gly 77 is wider – about 10 Å (3fb5). If this structure (3fb5) is excluded, the selectivity filter at Gly 77 dimension will be stable (about 8 Å) for all structures, which have the gate dimension at Thr 112, narrower than 20 Å. When the gate dimension is greater than 20 Å, the selectivity filter is narrower. This is related to the filter collapse, which is happening during channel inactivation channel. All TM structures (excluding 3fb8) are the conformations of the C-inactivation pathway of KcsA. Locations of the 3eff and 3pjs in Figure 1 suggest that the full-length crystal structures also come from this process, so 3eff is a closed-conductive and 3pjs is an open-inactive conformation. 3fb8 is about 19 Å open, but still conductive – the dimension of the selectivity filter at Gly 77 is 9 Å. This structure can be a good model for computing the functional analysis.

Table 2. Gate dimension (Thr 112 C_α – C_α) and filter dimension (Gly 77 C_α – C_α) of KcsA

PDB ID	Gate dimension (Thr 112 C _α – C _α) [Å]	Filter dimension (Gly 77 C _α – C _α) [Å]
1k4c	12	8
3fb5	15	10
3fb6	16	8
3f7y	17	8
3fb8	19	9
3f7v	24	6
3f5w	32	5
3eff	13, 16	8
3pjs	21, 22	7

The pore radius along the whole channel shows the differences between closed 1k4c and open 3f5w structures (Figure 2). The narrowest place in the selectivity filter (about 2 Å of diameter) is the same in both configurations, but in the other parts of the channel the pore radius is wider for 3f5w and the profile is shifted in comparison to 1k4c pore radius profile. In closed-conductive structure the pore in the selectivity filter assumes a zipper shape and the space between selectivity filter and gate is triangular. The selectivity filter of the open-inactive conformation is symmetrical and the niche has more elliptic shape.

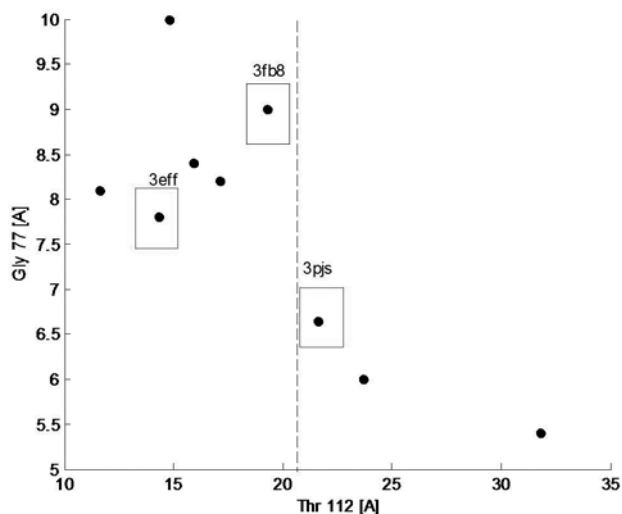


Fig. 1. Relationship between the filter dimension (Gly 77 C_α – C_α) and the gate dimension (Thr 112 C_α – C_α) for different KcsA potassium channels structures.

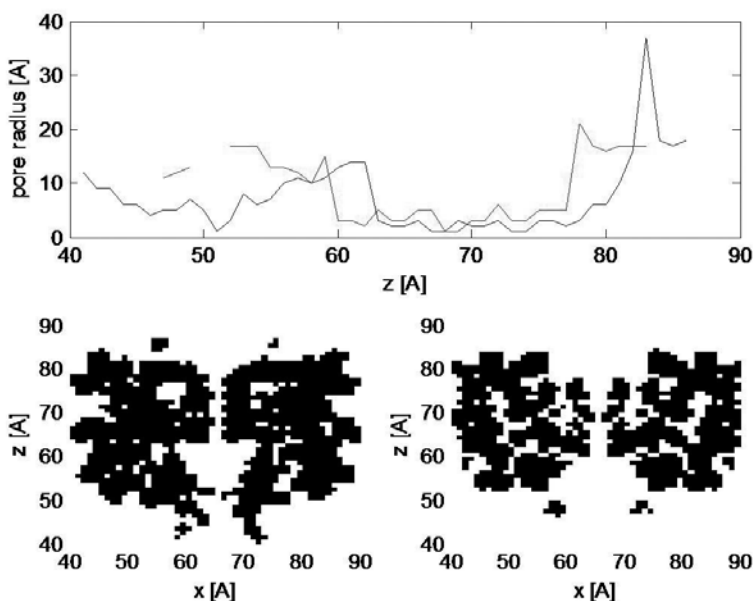


Fig. 2. The pore radius of PDB ID: 1k4c – black and PDB ID: 3f5w – red. The slices along the pore axis of 1k4c (left) and 3f5w (right)

The pore radius profile RMSE is calculated in comparison with the profiles of 1k4c. This measure is used as an indicator of the pore radius changing in the whole structure. Comparing RMSD of the structures (with 1k4c as a template) to the pore radius profile RMSE, the gate dimension (Thr 112) and the selectivity filter dimension (Gly 77), it is shown that the biggest conformational changes are in the gate and in the selectivity filter (Figure 3). Pearson and Kendall correlation of RMSD and distances Thr 112 (Pearson $r=0.86$, p -value $p=0.01$, Kendall $\tau=0.64$, $p=0.03$) and distances Gly 77 ($r=-0.90$, $p=0.00$, $\tau=-0.79$, $p=0.01$) are high and statistically significant (confidence level $\alpha=0.05$) as opposed to the correlation of RMSD and pore radius RMSE ($r=0.47$, $p=0.25$, $\tau=0.21$, $p=0.55$).

To describe the structures another measure was used: the electrostatic potential distribution along the pore axis (Figure 4). The electrostatic profile in the potassium channel has a big minimum at the selectivity filter – it is about -3 V for the closed-active conformation. It is related to close proximity of amino acids, which create the selectivity filter and should have an effect on positive charge of the potassium ions. The perturbation on the smooth electrostatic potential occurs also at the gate, but the level of changes is smaller than at the filter and amounts about -0.3 V. The distance between amino acids in closed structure at the gate is also small, so it is shown as a stronger electrostatic potential decrease.

The grade of the opening gate influences the electrostatic potential profile smoothing at the gate. The most significant changing in electrostatic potential profiles occur at the selectivity filter, where there is a shift of minimum potential (Figure 5) depending

on conformation changes. The open-conductive structure 3fb8 has almost the same minimum electrostatic potential as the closed-conductive conformation 1k4c. The others (excluding 3fb6) have smaller absolute value of the potential than 1k4c. The filter 3fb6, which has the biggest absolute value of the electrostatic potential, has similar shape to the 1k4c wider about 1 Å.

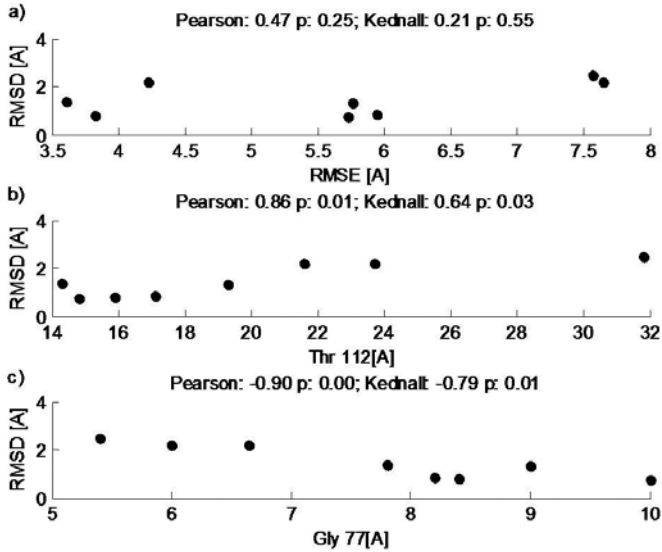


Fig. 3. Relationship between RMSD and a) RMSE of the por radius, b) the gate dimension (Thr 112 $C_{\alpha} - C_{\beta}$) and c) the filter dimension (Gly 77 $C_{\alpha} - C_{\beta}$)

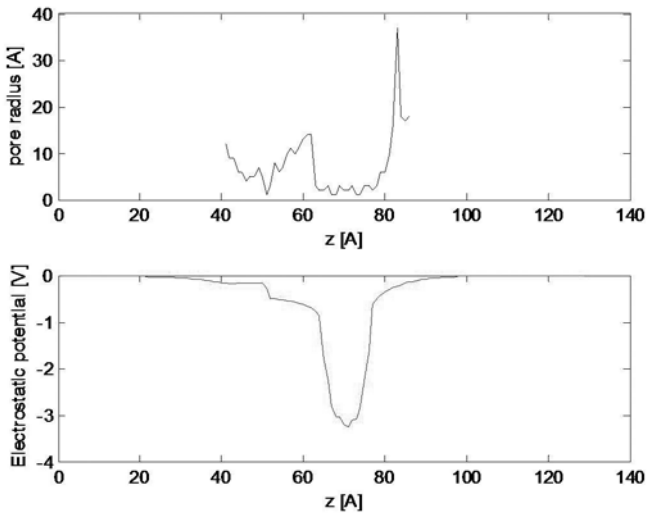


Fig. 4. The pore radius of PDB ID: 1k4c – black and electrostatic potential profiles for PDB ID: 1k4c – red

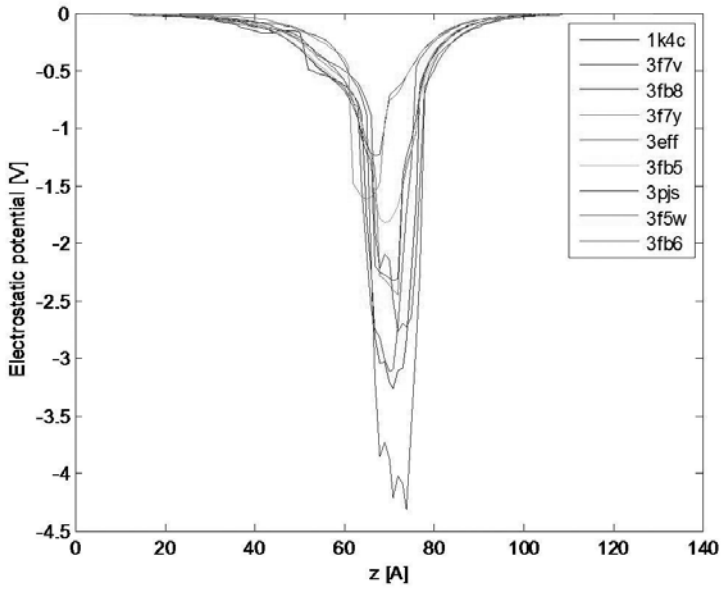


Fig. 5. Electrostatic potential profiles of different potassium channels KcsA

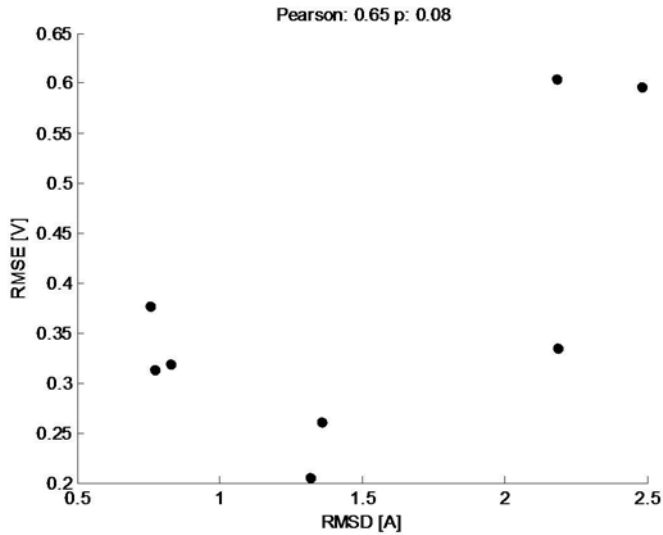


Fig. 6. Scatter plot of KcsA structures with RMSD and RMSE of the electrostatic potential as an axis

The correlation between the RMSD and the electrostatic potential profile RMSE is not statistically significant ($r=0.65$, $p=0.08$). It is possible to divide the potassium structure into groups using RMSD or electrostatic potential profiles RMSE (Figure 6).

The RMSD splits the structures into 3 groups. In the first group there are 3fb5, 3fb6 and 3f7y, which are the most similar to the 1k4c (the lowest RMSD). These structures are closed or slightly open. The second group is created by 3eff and 3fb8. These structures are hard to classify as more or less open than the structures from the first group. 3fb8 is 20 Å open at Thr 112, so more than the structures of the first group. 3eff does not match 3fb8, because it is only 13-16 Å open at Thr 112. 3eff is a full-length structure, where the change related with opening and closing process is in a different part of the channel. The narrowest place in truncated closed structure is at Val 115, but in the full-length it is at Thr 107 [25]. 14 amino acids of TM closed structure 1k4c (110-124) are more bended than the same amino acids in the full-length structure 3eff. The loss of four-symmetry in 3eff can also cause bigger differences in global assessment. The third group is created by 3pjs, 3f5w and 3f7v, which are the most open structures.

The electrostatic potential profiles RMSE can also show three classes of conformations. 3f5w and 3f7v have the biggest RMSE (to determine with 1k4c as a temple), so these structures have collapsed selectivity filters and they are inactive conformations. The most numerous group is the second one, in which there are 3pjs, 3fb5, 3fb6 and 3fb7. This result suggests that these structures are in the temporary state between conductive and inactive conformation. The last class has only two members: 3fb8 and 3eff, which are the most similar to the 1k4c, so they are conductive conformations.

The best results fitted to the experimental work [13] of the functional analyses are for full-length 3pjs (Table 3): ions current was $I_{U=-100\text{ mV}}=-6.2\text{ pA}$, $I_{U=100\text{ mV}}=-8.4\text{ pA}$ and rectification $I_{U=100\text{ mV}}/I_{U=-100\text{ mV}}=1.35$. This structure has a collapsed filter and it is seen as an incorrect level of selectivity: $I_{K^+}/I_{Cl^-}=2:1$ when in nature the selectivity is $I_{K^+}/I_{Cl^-}=\infty$. This result suggests that the ionic current is a sum of potassium and chloride current. The use of three functional parameters calculated with 3D PNP solver shows that the structure is open but the filter does not work correctly.

Table 3. Results of the functional analyses of KcsAs with 3D PNP

PDB ID	$I_{U=-100\text{ mV}}$ [pA]	$I_{U=100\text{ mV}}$ [pA]	selectivity U=-100 mV	selectivity U=100 mV	rectification
1k4c	-2.0	1.2	21:1	110:1	0.57
3fb5	-3.0	2.6	23:1	41:1	0.85
3fb6	-2.4	2.4	65:1	77:1	1.01
3f7y	-3.3	2.8	41:1	75:1	0.85
3f7v	-1.5	2.8	41:1	15:1	1.87
3f5w	0.0	0.0	0.8:1	0.9:1	0.11
3eff TM	-2.6	2.7	47:1	70:1	1.02
3pjs TM	0.0	0.0	1:1	1:1	0.89
3pjs FL	-6.2	8.4	2:1	2:1	1.35
Experimental [13]	-5.8	7.5	∞	∞	1.29

The partially open structures with filter in a halfway between conductive and inactive state: 3fb5, 3fb6, 3f7γ and 3eff TM have smaller conductance than in the experiment work. It is related to narrower gate dimension than in open conformation but the ions still can flow through the channel. Filters of these structures are not collapsed and it is shown as a good level of selectivity $I_{K^+}/I_{Cl^-} > 20:1$.

The TM open-inactive structures (3f5w and 3pjs TM) have all computational characteristics divergent from experimental: conductance, selectivity and rectification. The conformation changing in selectivity filter has a big influence on ion transport through the channel. The selectivity filter is the narrowest part of the channel but also the most important for ion flow in terms of energy.

4. Conclusions

The main conformational changes in the potassium channel take place in two regions: at the gate and the selectivity filter. The open-close process occurs as the deviation of the amino acids at the gate. The activation-inactivation process is related to the selectivity filter. Conductive state of the channel has the zipper shape of the selectivity filter. When the filter is collapsed, its shape is changing to symmetrical.

The structural measure like RMSD tells to which extent the channel is open, but does not tell how big the changes at the selectivity filter are. Information about quality of the filter can be obtained from the electrostatic potential profiles of the structure. Combination of structural and energy features is helpful to determine the conformation of the channel.

The functional properties, like conductance, selectivity and rectification obtained from the experiment, can be compared with the relevant computer characteristics. The information about the quality of computed functional features show in which conformation: open-inactive or closed-conductive is the structure. The big advantage of PNP analyses is short time which is needed for calculation – it is about 2-3 CPU-minutes.

Acknowledgments

The project was supported by the grants: Diamond Grants DG0021 and Wrocław Network and Supercomputer Center. I gratefully acknowledge Małgorzata Kotulska, Prof. for help, collaboration and many useful advices.

Summary

This work is about different conformations of the potassium channel KcsA: open, closed, conductive and inactive. The analyses were made using structural and functional parameters. The relationships between global structural changes and local changes of the selectivity filter or of the gate were shown. The electrostatic potential profiles along the pore axis was used as a second measure. The changes of the selectivity filter had big influence on the electrostatic potential distribution. The inactive conformation had different shape of the potential profiles and different shape of the pore radius of the selectivity

filter. The gate opening and closing process was shown in bigger changes in RMSD of the structures. The computational functional characteristic can be used as an indicator of the structure quality assessment. It was shown that the characteristic made with 3D PNP slover can be used to determine structure conformation.

Keywords: potassium channel, Poisson-Nernst-Planck model, quality assessment

Literature

- [1] Aksimentiev A., Schulten K., *Imaging α -Hemolysin with Molecular Dynamics: Ionic Conductance, Osmotic Permeability, and the Electrostatic Potential Map*, Biophysical Journal 2005; 88: 3745–3761.
- [2] Ashcroft F. M., *From molecule to malady*, Nature 2006; 440: 440–447.
- [3] Baker N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., McCammon J. A., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*, Proc. Natl. Acad. Sci. 2001; 98:10037–10041.
- [4] Boronovsky S. E., Nartsissov Y. R., *Brownian Dynamics De-scription of Transmembrane Ion Flow Exemplified with the Glycine Re-ceptor Chloride Channel*, Biophysics 2009; 54: 312–315.
- [5] Chung S-H., Kuyucak S., *Ion channels: recent progress and prospects*, Eur Biophys Journal 2002; 31: 283–293.
- [6] Corry B., Thomas M., *Mechanism of ion permeation and selectivity in a voltage gated sodium channel*, J Am Chem Soc. 2012; 134 (3): 1840–1846.
- [7] Cuello L. G., Jogini V., Cortes D. M., Perozo E., *Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels*, Nature 2010; 466(7303):203–8.
- [8] Doyle D. A., Morais Cabral J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*, Science 1998; 280 (5360): 69–77.
- [9] Dyrka W., Augousti A. T., Kotulska M., *Ion Flux Through Membrane Channels – An Enhanced Algorithm for the Poisson-Nernst-Planck*, Model. J Comput Chem 2008; 29: 1876–1888.
- [10] Hwang H. S., Hasdemir C., Laver D., Mehra D., Turhan K., Faggioni M., Yin H., Knollmann B. C., *Inhibition of Cardiac Ca²⁺ Release Channels (RyR2) Determines Efficacy of Class I Antiarrhythmic Drugs in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia*, Circ Arrhythm Electrophysiol 2011; 4: 128–135.
- [11] Kato H. E., Zhang F., Yizhar O., Ramakrishnan C., Nishizawa T., Hirata K., Ito J., Aita Y., Tsukazaki T., Hayashi S., Hegemann P., Maturana A. D., Ishitani R., Deisseroth K., Nureki O., *Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel*, Nature 2012; 482: 369–375.
- [12] Kuyucak S., Andersen O. S., Chung S-H., *Models of permeation in ion channels*, Rep. Prog. Phys. 2001; 64: 1427–1472.
- [13] Le Masurier M., Heginbotham L., Miller C., *KcsA: It's a Potassium Channel*, J Gen Physiol. 2001; 118(3):303–14.
- [14] Li Y., Barbault F., Delamar M., Zhang R., Hu R., *Targeted molecular dynamics (TMD) of the full-length KcsA potassium channel: on the role of the cytoplasmic domain in the opening process*, J Mol Model 2013; DOI 10.1007/s00894-012-1726-3.
- [15] Lobo P. A., Petegem F. V., *Crystal structures of the N-terminal domains of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors: insights into disease mutations*, Structure 2009; 17 (11): 1505–1514.

- [16] Lomize M. A., Pogozheva I. D., Joo H., Mosberg H. I., Lomize A. L., *OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes*, *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (Database issue): D370-6.
- [17] MacKinnon R., *Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion Conduction (Nobel Lecture)*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004; 43: 4265–4277.
- [18] Neher E., Sakmann B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*, *Nature* 1976; 260 (5554): 799–802.
- [19] Ranuez P., Aguilera-Arzo M., Alcaraz A., Cervera J., Aguilera V. M., *Theoretical Description of the Ion Transport Across Nanopores With Titratable Fixed Charges*, *Cell Biochemistry and Biophysics* 2006; 44: 287–312.
- [20] Restrepo-Angulo I., Vizcaya-Ruizb A., Camacho J., *Ion channels in toxicology*, *J. App. Toxicol.* 2010; 30: 497–512.
- [21] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- [22] Tusnády G. E., Dosztányi Z., Simon I., *PDB_TM: selection and membrane localization of transmembrane proteins in the protein data bank*, *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: D275-278.
- [23] Tusnády G. E., Dosztányi Z., Simon I., *Transmembrane proteins in the Protein Data Bank: identification and classification*, *Bioinformatics* 2004; 20 (17): 2964–2972: www.rcsb.org.
- [24] Uysal S., Cuello L. G., Cortes D. M., Koide S., Kossiakoff A. A., Perozo E., *Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel*, *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108(29): 11896–9.
- [25] Uysal S., Vásquez V., Tereshko V., Esaki K., Fellouse F. A., Sidhu S. S., Koide S., Perozo E., Kossiakoff A., *Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation*, *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(16): 6644–9.
- [26] Zhou Y., Morais-Cabral J. H., Kaufman A., MacKinnon R., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*, *Nature* 2001; 414(6859):43–8.
- [27] <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats/>.

Avatar – moduł graficzny informatycznej metody diagnozowania chodu pacjenta

Ryszard Leniowski*, Marcin Kubasik*

Abstract

The treatment process and rehabilitation of patients with symptoms of damage of the central nervous system is complex, long and begins with a medical diagnosis. It puts more and more often with the help of computerized systems for the diagnosis of movement, which is dedicated software. An important element of these programs is the visualization layer and 3D animation that makes it easy to take a decision and which affects on the selection methods of treatment. This paper presents a graphic module providing a three-dimensional model of Avatar which simulates a human behavior. This application enables to diagnose the posture defects and other health conditions affecting on the dynamics of the movements. Tracking of the speed of the various angles allows to find deviations manifested by the occurrence of higher / lower values than expected. Avatar is parameterized so that it is possible to create a large number of human figures, and choose how to display it. The results of analyzes carried out using the developed software (written in XML). The application is made in Visual Studio 2010 C++ framework with OpenGL and Qt support.

Keywords: Medical diagnostics, defect of postures, motion capture, computer graphics

1. Wprowadzenie

Medycyna jest dziedziną, w której zawsze wykorzystywano najnowsze technologie tworzone przez człowieka dla niesienia pomocy chorym. Jednym z działów medycyny jest diagnostyka, która coraz częściej wykorzystuje zaawansowane programy komputerowe, pozwalające otrzymać wyniki nie tylko precyzyjne ale i w takiej formie, która jeszcze niedawno była nieosiągalna [2]. Intuicyjne interfejsy tych programów sprawiają, iż praca z nimi jest przyjemna i nie wymaga przeprowadzania czasochłonnych szkoleń. Jest to trend współczesnej diagnostyki medycznej [1], [3].

Korzystając z grafiki komputerowej, programowania interfejsów oraz zagadnień związanych z geometrią przestrzenną opracowano aplikację – moduł graficzny informatycznej metody diagnozowania chodu pacjenta, która jest zgodna ze wspomnianym trendem. Moduł graficzny udostępnia Avatara naśladującego zachowanie osoby niepełnosprawnej w oparciu o informacje opisujące położenie poszczególnych części ciała (punktów przegubowych). Założono, że dane kinematyczne pochodzą z sensorów ruchu, nie określając ich typu lecz format. Na podstawie pozyskanych danych aplikacja przeprowadza obliczenia związane ze strukturą kinematyczną układu kostnego człowieka i obrazuje je na ekranie w postaci animacji sylwetki postaci, wykresów czasowych oraz formularzy porządkujących dane alfanumeryczne. Mając tak bogatą informację, aplikacja umożliwia zdiagnozowanie

* Rzeszów University of Technology, Department of Computer and Control Engineering.

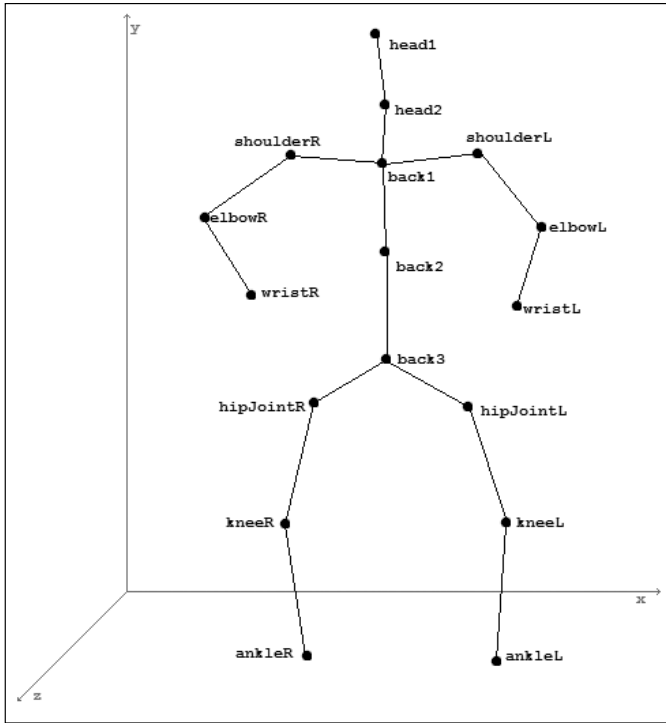
wad postawy i innych schorzeń zdrowotnych wpływających na dynamikę wykonywanych ruchów. Śledzenie prędkości poszczególnych kątów przegubowych umożliwia odnalezienie odchyżeń objawiających się wystąpieniem wartości wyższych/niższych niż oczekiwane. Dla przykładu spokojny marsz będzie się charakteryzował niewielkimi prędkościami kątowymi przegubów, natomiast ruch z wystąpienia utykania powoduje pojawienie się prędkości kątowych wyższych niż standardowe. Analizując ruch Avatara można dość dokładnie ocenić własności lokomocyjnych pacjenta a także zidentyfikować rodzaj schorzenia powiązanego z budową anatomiczną. Wyniki są zależne nie tylko od budowy ciała ale również od tak wydawałoby się odległych czynników jak samopoczucie. Okazuje się, że ze sposobu chodu badanej osoby, jesteśmy w stanie wywnioskować różne informacje, nawet takie jak jej chwilowy nastrój. Podobne oprogramowanie zostało opracowane przez kanadyjską grupę *Bio Motion Lab* i nosi nazwę *BMLwalker* [4]. Jest ono dobrą platformą porównawczą w zakresie udostępnianych usług i jakości prezentacji graficznej.

2. Sensory ruchu i struktura danych

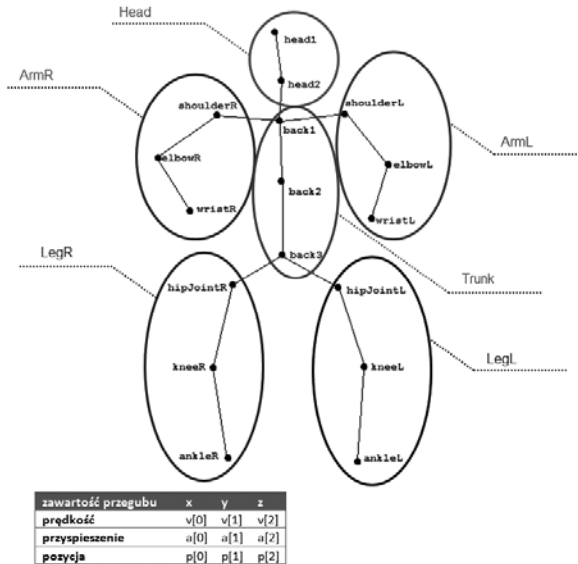
Avatara przygotowano do współpracy z danymi pochodzącymi z sensorów ruchu. Ich zadaniem jest dostarczenie aplikacji informacji na temat położenia przegubów badanej osoby w przestrzeni trójwymiarowej. Przewidziana liczba sensorów wynosi siedemnaście. Każdy z nich dostarcza dane o pozycji jednego miejsca znajdującego się na ciele człowieka. Te właśnie miejsca nazwano przegubami. Ich umiejscowienie pozwala na modelowanie postaci, natomiast ich ruch względem siebie na dokonanie obliczeń wskazujących na bieżącą konfigurację i dynamikę zmian. Rozmieszczenie sensorów wraz z ich nazwami wykorzystywanymi w aplikacji przedstawia rysunek 2.1.

Z każdym przegubem związane wektor danych składający się z trzech trójek liczb rzeczywistych będących składowymi (x , y , z) opisującymi ich parametry ruchu w przestrzeni kartezjańskiej. Za jednostkę przyjęto centymetry. W skład struktury tworzącej dane dla Avatara wchodzi prędkości, przyspieszenia i położenia poszczególnych przegubów w przestrzeni. Przeguby dodatkowo pogrupowano według ich umiejscowienia w szkielecie Avatara. Wyróżniono tu sześć grup: Head (głowa), Trunk (tułów), ArmL (ramie lewe), ArmR (ramie prawe), LegL (noga lewa), LegR (noga prawa). Koncepcję budowy struktury danych Avatara, o nazwie *Data* przedstawia rysunek 2.2.

Struktury danych Avatara znajdują się w plikach zapisanych binarnie. Statyczne modele stanowią pojedynczą strukturę, natomiast animacje zbudowano z tablicy struktur. Kolejne indeksy takiej tablicy oznaczają kolejne klatki animacji. Parametryzacja dokonywana przez użytkownika podczas animowania odbywa się w czasie rzeczywistym. Jako wzorzec parametrów wczytanego Avatara pobierane są dane z pierwszej klatki animacji. Podczas odtwarzania animacji, pobierane są dane do zmodyfikowania. Stanowią one kopię danych oryginalnych aktualnie odtwarzanej klatki i podlegają dostrajaniu się do parametrów podanych przez użytkownika, biorą udział w procesie obliczeniowym oraz są wykorzystywane do rysowania modelu graficznego. Wzorcowe dane umożliwiają powrót do stanu pierwotnego.

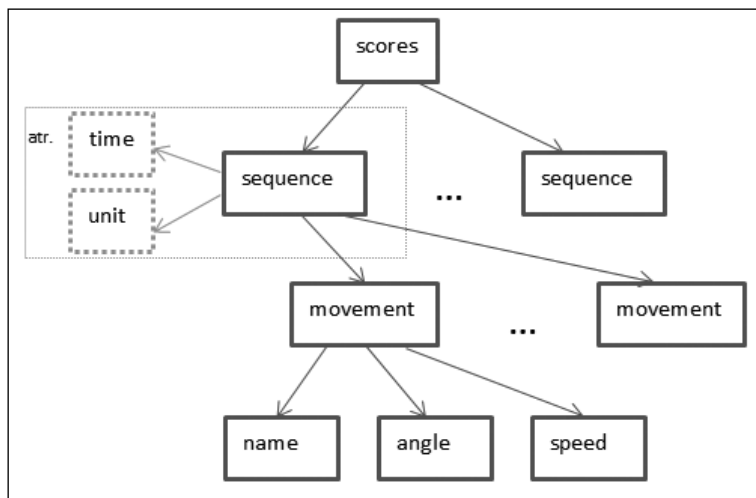


Rys. 2.1. Rozmieszczenie sensorów ruchu



Rys. 2.2. Budowa struktury danych Avatara

Strukturą wynikową zwracaną przez aplikację jest plik xml. Zawiera on posegregowane dane parametrów ruchu wraz z ich deskryptorami. Budowę pliku przedstawia rysunek 2.3.



Rys. 2.3. Drzewo XML danych zwracanych przez aplikację

Korzeniem drzewa w zwracanym pliku jest `scores`. Jego dzieci, sekwencje (`sequence`) posiadają atrybut `time`, zawierający czas wykonania obliczeń danej sekwencji i `unit`, wskazujący na użytą jednostkę miary kąta. Każda sekwencja posiada elementy `movement`, których ilość odpowiada ilości występujących w aplikacji kątów, czyli 26. Natomiast ich elementy to `name`, `angle` i `speed`, których zawartości to kolejno nazwa kąta, jego miara i prędkość kątowa. Zapisane dane zawsze rozpoczynają się od czasu zerowego.

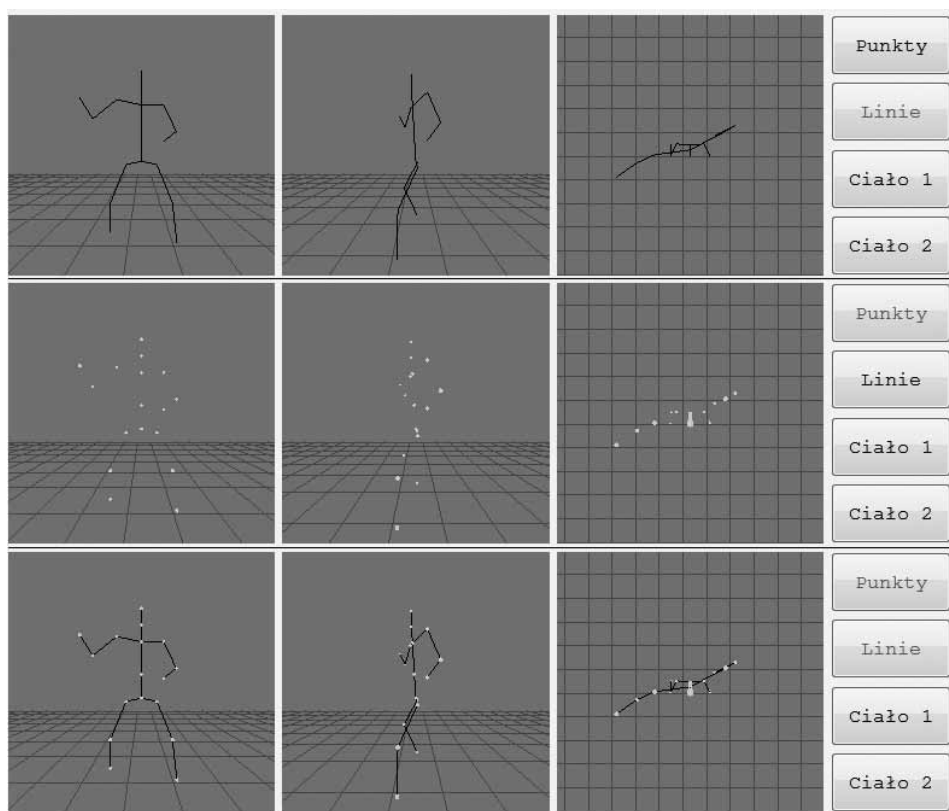
3. Avatar – model graficzny

Aplikacja składa się z komunikujących się między sobą obiektów. Jednym z najważniejszych jest obiekt klasy `Avatar`, odpowiedzialny za tworzenie modelu graficznego rysowanej postaci. Metody klasy `Avatar` korzystają z funkcji i modeli przestrzennych zawartych w bibliotece OpenGL. Aplikacja udostępnia kilka sposobów wyświetlania modelu. Są one aktywowane za pośrednictwem przycisków okna głównego aplikacji. Do wyboru są następujące opcje:

- Punkty – opcja ta wyświetla zielone sfery w punktach przegubowych.
- Linie – rysują szkielet Avatara łącząc ze sobą odpowiednie punkty przegubowe.
- Linie + Punkty.

Istnieje możliwość jednoczesnego wyświetlenia linii i punktów. Na rysunku 3.1 przedstawiono efekt użycia ich razem i osobno.

- Ciało 1 – elementy składowe: o głowa – walec zakończony sferami, sfery w przegubach, walce jako elementy łączące punkty, trójkątne ściany równoległe zakrywające tułów, dłonie i stopy – trójkątne ściany równoległe otoczone walcami.

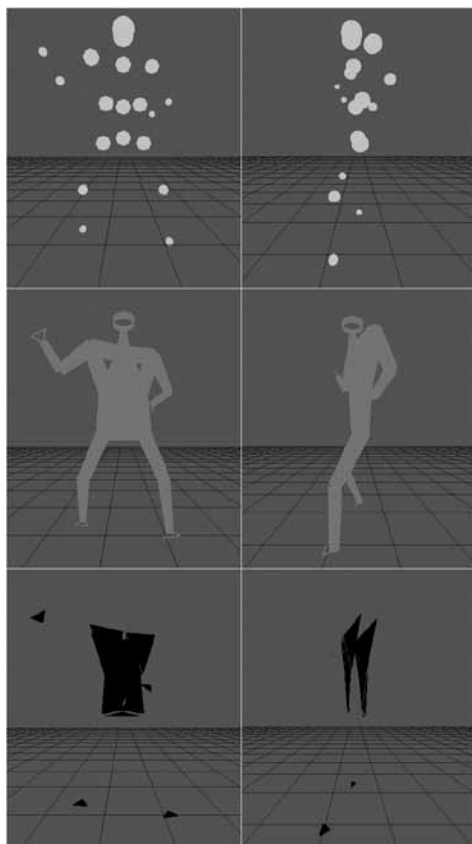


Rys. 3.1. Wyświetlanie linii, punktów jako wizualizacja Avatara

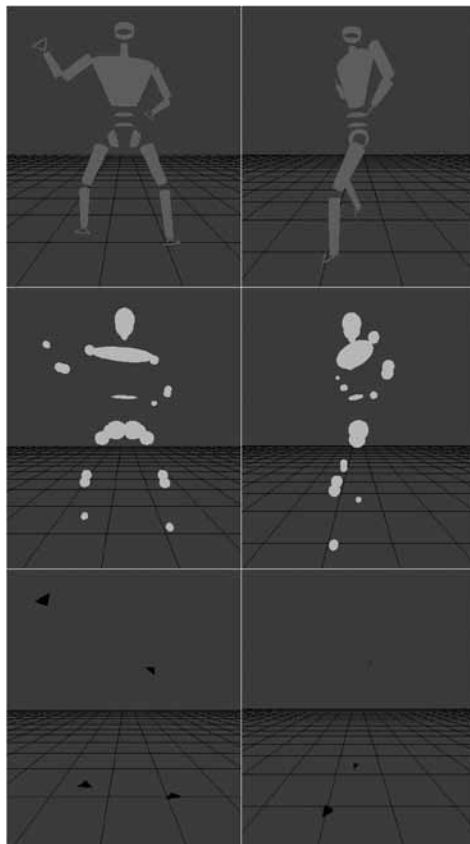
Ciało to posiada dwa dodatkowe punkty, których położenia liczone są na podstawie średniej pozycji z punktów przegubowych barku (`shoulderL` dla strony lewej i `shoulderR` dla prawej), pleców (`back2`) i stawu biodrowego (`hipJointL` dla strony lewej i `hipJointR` dla prawej). Na rysunku 3.2 przedstawiono osobno płaszczyzny (kolor niebieski), sfery (kolor zielony) i walce (kolor czerwony) wchodzące w skład ciała 1. Scaloną formę pokazuje rys. 3.3.

- Ciało 2 – elementy składowe: walce zakończone sferami jako elementy łączące przeguby, spłaszczony walec (klatka piersiowa), dwa odwrócone zmodyfikowane walce (brzuch), dłonie i stopy – trójkątne ściany równoległe otoczone walcami. Rysunek 3.4 przedstawia płaszczyzny (kolor niebieski), sfery (kolor zielony) i walce (kolor czerwony) składające się na ciało 2. Na rysunku 3.5 złożono te elementy razem.

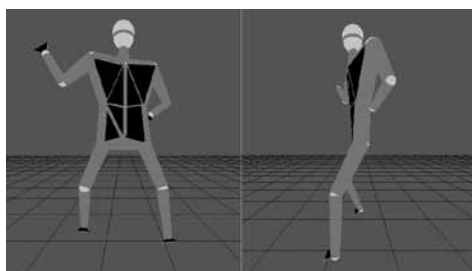
Zarówno w pierwszej jak i drugiej wersji ciała Avatara jego elementy dopasowane są do siebie w taki sposób, aby stanowić spójną całość. W ciele pierwszym wyeliminowano prześwity w modelu. W drugim elementy składowe mają zakończenia stworzone ze sfer, samoczynnie kasujące prześwity. Poszczególnym walcem wchodzącym w skład modeli poszerzono podstawy, aby nadać im bardziej naturalny kształt.



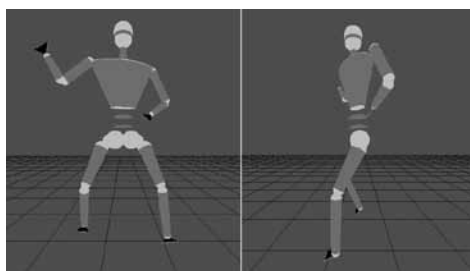
Rys. 3.2. Ciało 1 – elementy składowe



Rys. 3.4. Ciało 2 – elementy składowe



Rys. 3.3. Ciało 1 – forma scalona

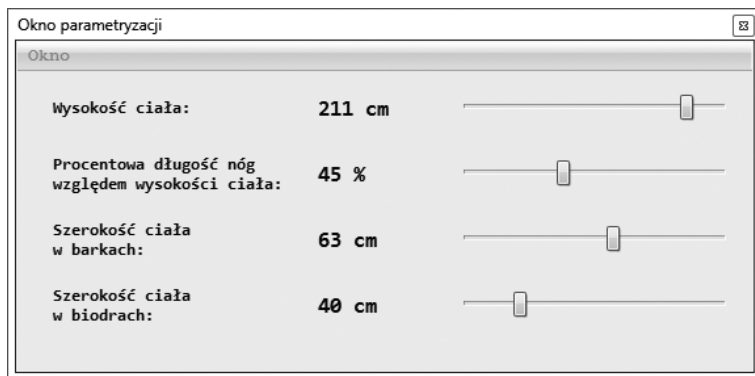


Rys. 3.5. Ciało 2 – forma scalona

4. Parametryzacja sylwetki i formy prezentacji wyników

Osobnicze własności lokomocyjne pacjenta są silnie uzależnione od budowy ciała określającej bezwzględny wymiar składowych ciała oraz ich wzajemne proporcje. Parametryzacja sylwetki, realizowana za pomocą okna parametryzacji, pozwala dane, które

są szczególnie ważne w postawie człowieka (rys. 4.1). Są to: wysokość ciała, procentowy stosunek długości nóg do całkowitej wysokości ciała, szerokość w barkach oraz szerokość w biodrach. Okno parametryzacji zawiera cztery suwaki, którymi konfigurujemy postać pacjenta.



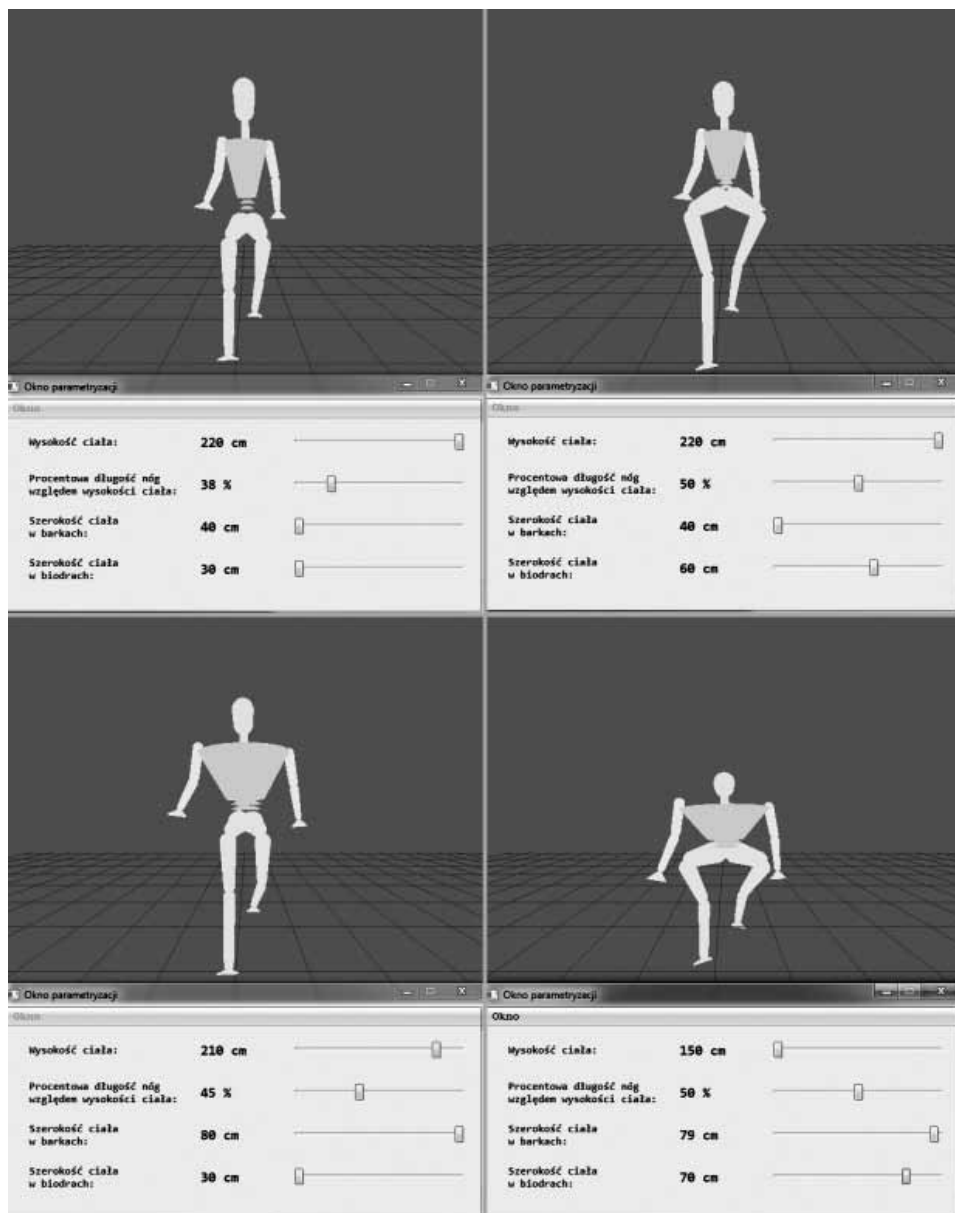
Rys. 4.1. Okno „Okno parametryzacji”

Wszystkie parametry mają swoje ustalone zakresy wartości. Przykładowe efekty parametryzacji pokazuje rysunek 4.2. Aplikacji zawiera trzy widgety graficzne wykorzystujące funkcje OpenGL, które rysują Avatara z różnej perspektywy. Są to rzuty kolejno z przodu, od lewej strony i z góry. Obok nich, z prawej strony zamieszczono przyciski, za pomocą których można zdecydować w jaki sposób wyświetlana jest jego postać, co pokazuje rys.4.3. Istnieje możliwość wyświetlenia strzałek wskazujących kierunki osi układów odniesienia związanych z przegubami, co przedstawia rysunek 4.4. Poprawia to orientację przestrzenną postaci, szczególnie podczas jej dynamicznego ruchu.

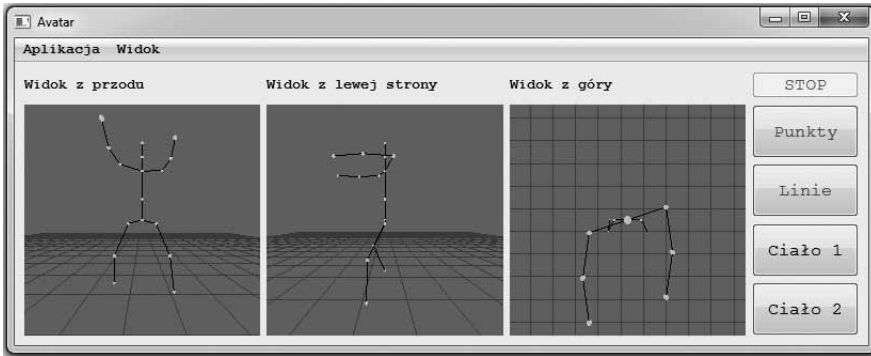
Wykresy stanowią wartościowe uzupełnienie animacji postaci. Opatrzone etykietami i ikonami adekwatnymi do zawartości okien pozwalają na szybką ocenę liczbowych wartości kątów i prędkości kątowych, wyrażonych w jednostkach preferowanych przez użytkownika. Okna z wykresami pokazano na rysunku 4.5.

Ponadto oprogramowanie wyświetla formularze z danymi alfanumerycznymi, co pokazuje rys. 4.6.

Ważny jest tutaj sposób wyświetlania zwracanych informacji. W miarę wzrostu prędkości kątowej barwa wypisywanych wyników zmienia się. Im wyższa jest prędkość tym kolor ten bardziej czerwienieje, to znaczy przechodzi z koloru zielonego poprzez żółty w czerwony. Początkowo składowe RGB wynoszą: czerwona = 0, zielona = 255, niebieska = 0. Jeśli zmienna range, która jest skalowaną prędkością kontową, jest większe od 255 i wypełni składową czerwoną do maksymalnej wartości, to różnica, która nie „zmieściła” się w składowej czerwonej (range minus 255) odejmowana jest od wypełnionej do maksimum (255) składowej zielonej. Zabieg ten zastosowano po to, aby wysokie wartości prędkości, świadczące o nagłej zmiany kąta (przy np. potknięciu) rzucały się w oczy i były od razu widoczne.

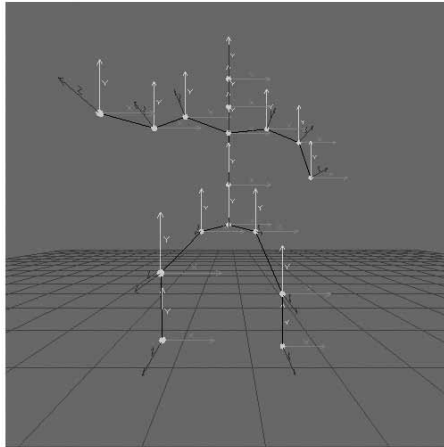


Rys. 4.2. Przykładowe efekty parametryzacji postaci



Rys. 4.3. Rzuty Avatara i zestaw przycisków

Widok z przodu



Rys. 4.4. Avatar z lokalnymi układami odniesienia



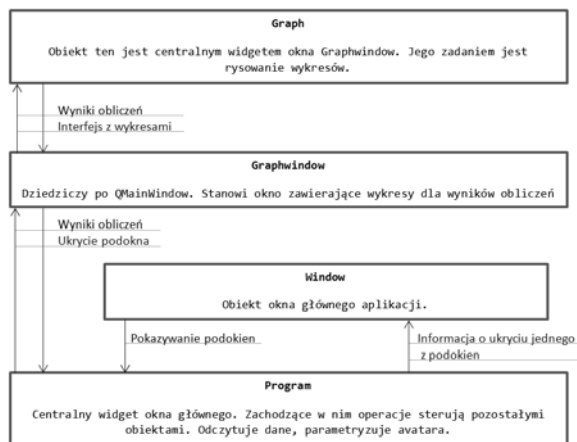
Rys. 4.5. Okno z wykresami

Okno Wyniki		
lewe ramię		
lewo-prawo		0.105 rad/s 0.866335 rad
przód-tył		0.225 rad/s 1.311739 rad
obrót		0.317 rad/s 1.168250 rad
łokieć		0.330 rad/s 0.509988 rad
górną-dół w barku		0.029 rad/s 1.437675 rad
ruch w tułowiu		
lewo-prawo		0.374 rad/s 1.549344 rad
przód-tył		0.000 rad/s 1.570796 rad
obrót		-0.093 rad/s 0.033666 rad
przód-tył w barkach		-0.706 rad/s 0.336130 rad
lewo-prawo w biodrach		0.160 rad/s 1.593451 rad
przód-tył w biodrach		1.353 rad/s 1.526793 rad
prawe ramię		
lewo-prawo		-0.684 rad/s 0.558317 rad
przód-tył		0.543 rad/s 1.633982 rad
obrót		-1.181 rad/s 1.604517 rad
łokieć		-0.676 rad/s 0.608082 rad
górną-dół w barku		0.771 rad/s 1.390183 rad
lewa noga		
lewo-prawo		0.155 rad/s 1.722734 rad
przód-tył		0.149 rad/s 1.654986 rad
obrót		-3.038 rad/s 2.033273 rad
kolano		0.615 rad/s 0.142506 rad
pochylenia głowy		
pochylenie głowy		0.006 rad/s 0.000000 rad
pochylenie szyi		-0.241 rad/s 0.028925 rad
prawa noga		
lewo-prawo		0.488 rad/s 1.590995 rad
przód-tył		1.909 rad/s 1.074811 rad
obrót		-1.396 rad/s 1.858785 rad
kolano		3.753 rad/s 0.791607 rad

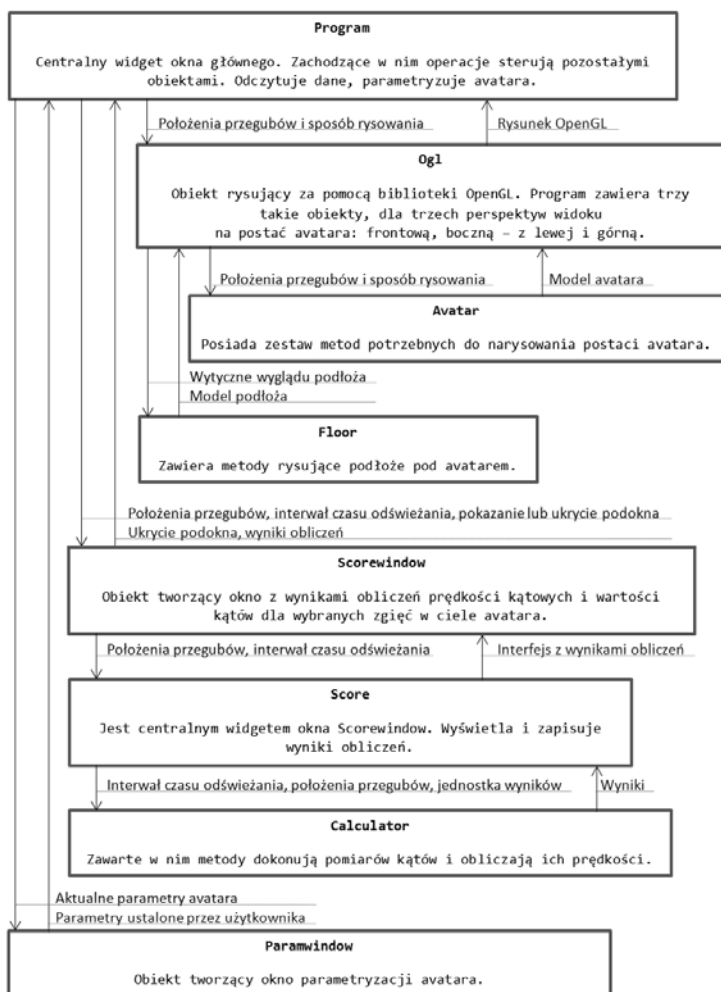
Rys. 4.6. Okno formularza

5. Architektura aplikacji

Aplikacja została opracowana w technologii obiektowej. Rysunki 5.1 i 5.2 przedstawiają opis połączeń między obiektami, zachodzącą między nimi wymianę danych i wynikowych treści, a także krótką charakterystykę spełnianych przez nie funkcji zawartych w jej ciele. Dla ułatwienia, na rysunkach przedstawiono nazwy klas tworzących dane obiekty.

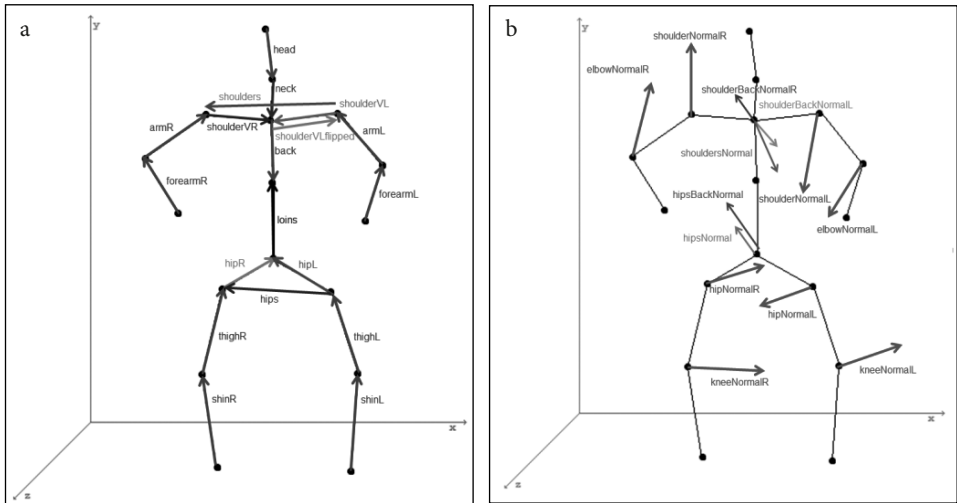


Rys. 5.1. Połączenia między obiektami w aplikacji (cz. 1)



Rys. 5.2. Połączenia między obiektami w aplikacji (cz. 2)

Obiekty mają precyzyjnie określone zadania do wypełnienia. Z uwagi na ograniczenia publikacji, szczegółowy opis klas nie jest tu zamieszczony. Bardzo ważną klasą jest **Calculator** odpowiedzialny za wykonywanie obliczeń kinematyki prostej i odwrotnej poszczególnych elementów ciała. Wykorzystywane są w tym celu macierze jednorodnie oraz jawne równania trygonometryczne. Z uwagi na ilość przegubów, redundantny charakter obiektu i drzewiastą strukturę, wykorzystano heurystyczne podejście do rozwiązania zagadnień kinematycznych, stosując algorytm CCD (Cyclic Coordinate Descent). Obliczane są nie tylko relacje pozycji, rys. 5.3a ale również relacji orientacji, wyrażone wektorami normalnymi i kątami przegubowymi, rys. 5.3b.



Rys. 5.3. Relacje w układzie szkieletowym: pozycji a), orientacji b)

W klasie `Calculator` zawarto również obliczenia korekcyjne poprawiające układ ciała w obrębie barków i bioder. Występujące rozgałęzienia struktury kinematycznej oraz ograniczenia narzucane przez podłoże, po którym stąpa Avatar powodują powstawanie nienaturalnie wyglądających ruchów. Szczegółowa analiza synchronizacji ruchu ciała będzie możliwa dopiero po włączeniu modelu dynamiki. Jest to kolejny etap prac nad Avatarem jako oprogramowaniem diagnostyki pacjenta o różnym stopniu niepełnosprawności lokomocyjnej.

6. Podsumowanie

Opracowany moduł graficzny udostępniający trójwymiarowy model Avatara pozwala zdiagnozowanie wad postawy i innych schorzeń zdrowotnych pacjenta. Śledzenie prędkości poszczególnych kątów przegubowych powoduje odnalezienie odchyłań będących objawem choroby. Postać jest parametryzowana, dzięki czemu można zawsze dobrać takie wartości sylwetki aby dokładnie odpowiadała badanej osobie. Oprogramowanie udostępnia różne sposoby wyświetlania informacji, w postaci trójwymiarowych animacji, formularzy i wykresów. Opracowana struktura danych wejściowych, opisująca Avatara może być skojarzona ze strumieniem danych pochodzących z sensorów ruchu, bądź dowolnego innego źródła. Aplikacja będzie rozbudowywana. Zostaną podłączone sensory MEMS aby sprawdzić jej działanie w trybie RT (w czasie rzeczywistym). Rozwijany będzie moduł obliczeniowy poprzez wprowadzenie uproszczonego modelu dynamiki z algorytmem ABA. Umożliwiłoby to generowanie ruchu w sposób automatyczny i płynny, eliminując tym samym tryb „stop klatka”. Do oprogramowania można również włączyć metody oceny procesu rehabilitacji ruchowej, po konsultacjach ze środowiskiem medycznym.

Streszczenie

Proces leczenia i rehabilitacji pacjentów z objawami uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego jest skomplikowany i długotrwały a zaczyna się od postawienia diagnozy lekarskiej. Stawia się ją coraz częściej z pomocą informatycznych systemów diagnozowania ruchu, czyli dedykowanego oprogramowania komputerowego. Istotnym elementem takich programów jest warstwa wizualizacji i animacji 3D, ułatwiająca podjęcie decyzji i mająca wpływ na wybrane metody leczenia. Niniejsza praca prezentuje moduł graficzny udostępniający trójwymiarowy model Avatara naśladujący zachowanie człowieka. Aplikacja umożliwia zdiagnozowanie wad postawy i innych schorzeń zdrowotnych wpływających na dynamikę wykonywanych ruchów. Śledzenie prędkości kątowych poszczególnych przegubów pozwala na odnalezienie odchyłeń objawiających się wystąpieniem wartości wyższych/ niższych niż oczekiwane. Avatar jest parametryzowany, dzięki czemu można utworzyć dużą ilość sylwetek ludzkich oraz wybrać sposobu jej wyświetlania. Wyniki analiz prowadzonych za pomocą opracowanego oprogramowania są zapisywane w formacie XML. Aplikację napisano w języku C++ z wykorzystaniem bibliotek OpenGL i Qt oraz środowiska Visual Studio 2010.

Literatura

- [1] Ilg W. et al., *On the representation, learning and transfer of spatio-temporal movement characteristic*, International Journal of Humanoid Robotics, June 2004, pp. 1–24.
- [2] Raisamo R., *Multimodal human-computer interaction*, A constructive and empirical study, ISBN 951-44-4702-6, December 1999, pp. 1–57.
- [3] Salerno A., *Design and development of robot control systems for biomedical applications*, PhD course in biomedical engineering, Università di Roma 2012.
- [4] <http://www.biomotionlab.ca>

Możliwości zastosowania wirtualnej technologii 3D w diagnostyce i rehabilitacji na przykładzie badań stabilograficznych

Piotr Wodarski*, Marek Gzik*, Robert Michnik*, Jacek Jurkojc*, Andrzej Bieniek*

Summary

Supporting rehabilitation and diagnostic methods with virtual reality is still developing in biomechanics and biocybernetics. The technology allows patients to cope in the real world by learning of overcoming obstacles in the virtual world [1]. The positive effects of rehabilitation with virtual technology were shown by documented studies [3, 5, 6]. Two applications developed for therapeutic purposes were presented in the article. The impact of virtual technology on the ability to maintain balance during a visual interference was examined with the participation of a select group of students. The results are presented in tabular form and in graphs.

Keywords: virtual reality, 3d technology, rehabilitation, diagnostics

1. Wprowadzenie

Częstość występowania oraz wciąż niejasna etiologia schorzeń neurologicznych u ludzi, obliguje do prowadzenia badań interdyscyplinarnych z zastosowaniem różnych metod badawczych. Wspomaganie rehabilitacji i diagnostyki metodami wirtualnej rzeczywistości jest obecnie bardzo dynamicznie rozwijane w dziedzinach biomechaniki i biocybernetyki [7]. Technologia ta pozwala pacjentom radzić sobie w realnym świecie poprzez naukę pokonywania przeszkód w świecie wirtualnym [1]. W Polsce odnotowujemy coraz większy współczynnik zachorowań dzieci na choroby neurologiczne, takie jak zaburzenia integracji sensorycznej, czy różnego rodzaju upośledzenia umysłowe. Według GUS w Polsce niepełnosprawnością obciążonych jest 103,4 tys. młodych osób w wieku 15–19 lat, w tym 32,5% stanowią osoby ze schorzeniami neurologicznymi.

Wykorzystanie grafiki trójwymiarowej jako procesu wspomagającego mechaniczne aspekty terapii, okazuje się być narzędziem umożliwiającym oddziaływanie na wiele zmysłów jednocześnie. We wcześniejszych badaniach udowodniono pozytywny wpływ technologii wykorzystującej polisensorykę na usprawnienie zdolności manipulacyjnych pacjentów z jednostronnym udarem i ostrym bólem podczas ruchów kończyny górnej [6]. Podobny rezultat związany z usprawnieniem zdolności ruchowych odnotowano podczas rehabilitacji osób cierpiących na chorobę Parkinsona [5], gdzie uzyskano skuteczność

* Katedra Biomechatroniki, Wydział Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Śląska.

we wszystkich stadiach rozwoju choroby. Z medycznego punktu widzenia wykorzystanie wirtualnych technologii stwarza nowe, ciekawe możliwości przeprowadzenia interaktywnej terapii ruchowej poprzez uprawianie sportu. Wzmacnia ducha rywalizacji, poprzez zabawę wprowadza elementy poznawcze i urozmaica obecnie często stosowane metody behawioralne bazujące na teorii poznania społecznego i ogólnych prawach uczenia się. Jako główną zaletę wirtualnych technologii w procesie rehabilitacji można wskazać możliwość dokonywania szybkich zmian aplikacyjnych w niezwykle łatwy sposób [4]. Można w ten sposób dopasować wirtualne urządzenia rehabilitacyjne dla każdego pacjenta indywidualnie. Efekty terapii z wykorzystaniem wirtualnych technologii mogą być porównywalne z leczeniem konwencjonalnym [3].

2. Przygotowanie aplikacji

Z wykorzystaniem najnowszych osiągnięć informatycznych, w tym wirtualnej, trójwymiarowej jaskini oraz systemów do analizy ruchu można oddziaływać na zmysły wzroku, słuchu i dotyku pacjenta poprzez specjalnie zaprojektowane i skonsultowane z lekarzami terapeutami bodźce wizualizacyjne w świecie grafiki 3D oraz z wykorzystaniem dźwięku przestrzennego. Konsultacja z lekarzami pozwala wyselekcjonować pewnej grupę schorzeń oraz przygotować odpowiedni program ćwiczeniowy. Następnie ćwiczenia te są implementowane w świecie wirtualnym i testowane w systemie do wielościanowej projekcji przestrzennego obrazu stereoskopowego w formie jaskini 3D. Po weryfikacji lekarskiej możliwe jest przeprowadzenie rehabilitacji. Do budowy trójwymiarowej sceny oraz modeli wykorzystano programy Quazar3D oraz 3ds Max. Do analizy ruchu można wykorzystać kombinezon MVN Biomech. Pomiar parametrów stabilograficznych wykonano z wykorzystaniem platformy Zebris FDM-S.

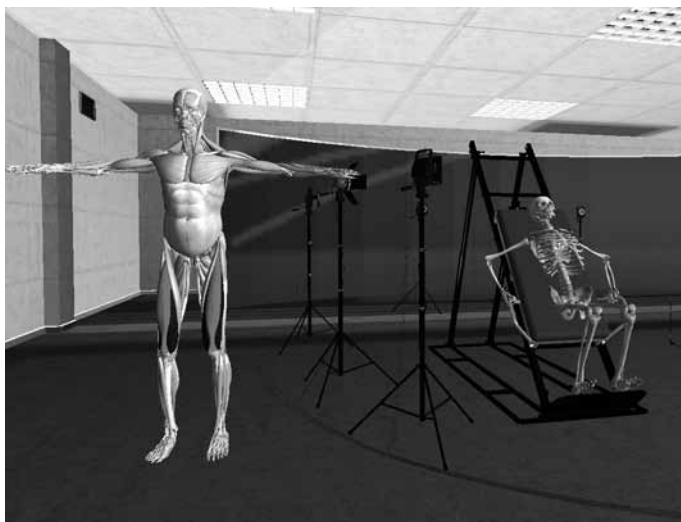
3. Aplikacje

Wykorzystując prezentowaną technologię zaprojektowano dwie interaktywne trójwymiarowe aplikacje. Pierwsza, której głównym odbiorcą są dzieci i młodzież, przedstawia plac zabaw dla dzieci umiejscowiony w przyjaznej okolicy parkowej (Rys. 1). Dominuje w niej zieleń wywołująca relaksujący nastrój. Bajkowy świat zachęci do wykonywania ćwiczeń będących niezbędnym aspektem czynnej rehabilitacji. Uwzględniona została również możliwość wirtualnego terapeuty w postaci pluszowego misia czy przyjaciela z kreskówki. Funkcjonalność ta może mieć niezwykle korzystny wpływ na podniesienie komfortu psychicznego i przełamanie lęków szczególnie dla najmłodszych pacjentów. Sceneria wzbudza zainteresowania, a przez interaktywną zabawę umożliwia korekcję poprawności wykonanych ćwiczeń. Terapeuta ma możliwość doboru intensywności oraz rodzaju ćwiczeń z opracowanych programów.

Druga aplikacja jest wirtualną salą ćwiczeniową gdzie prezentowane modele mogą służyć do celów dydaktycznych (Rys. 2). Mogą również wskazywać poprawność wykonywanych ćwiczeń.



Rys. 1. Sceneria aplikacji z wirtualnym placem zabaw [8]

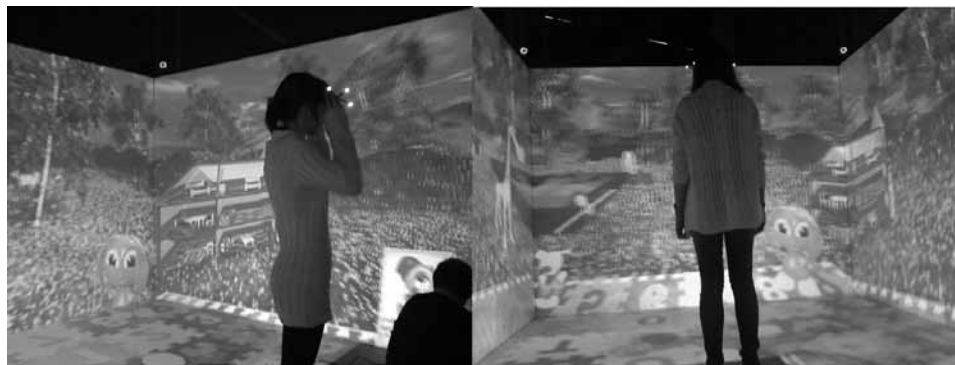


Rys. 2. Sceneria aplikacji z wirtualną salą ćwiczeniową

Wykorzystanie scenarii trójwymiarowej pozwala w dobrym stopniu odwzorować środowisko rzeczywiste oraz dostosować przygotowywany model ćwiczenia do cech pacjenta [2]. Zdecydowano się zaimplementować w obydwu sceneriach korekcję położenia obrazu w zależności od wzrostu osoby badanej.

4. Metodyka badań

Do określenia przydatności wykorzystania przygotowanych aplikacji i prezentowanej technologii w celach diagnostycznych i rehabilitacyjnych przeprowadzono z udziałem 39 studentów w tym 30 kobiet i 9 mężczyzn w wieku od 20 do 25 lat. Celem niniejszych badań było określenie wpływu wirtualnej technologii na zdolność utrzymywania równowagi w warunkach zakłóceń bodźcami wizualnymi. Studenci nie byli wcześniej poinformowani o formie i przebiegu badania. Osoby biorące udział w eksperymencie poproszono o ubranie okularów z polaryzatorem aktywnym i wprowadzono je do jaskini 3d (Rys. 3). Na czterech ścianach jednocześnie została im wyświetlona opisana wcześniej sceneria z placem zabaw dla dzieci. Wywołano wrażenie rzeczywistego przebywania w prezentowanym miejscu. Przeprowadzono test Romberga, podczas próby 30 sekundowej z oczami otwartymi, wyznaczając parametry stabilograficzne. Pomiar wykonano platformą Zebris FDM-S wyznaczając długość ścieżki podparcia oraz pole elipsy. Następnie w losowej chwili zadano bodźce wizualizacyjne symulujące zaburzenia przesunięcia i rotacji w płaszczyźnie strzałkowej i następnie w płaszczyźnie czołowej. Zaburzenia powtarzały się z częstotliwością 2Hz przez okres 30 sekund.



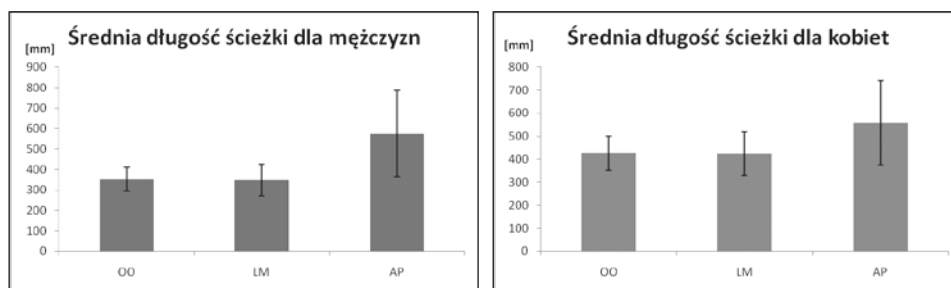
Rys. 3. Zdjęcie z przebiegu badań w jaskini 3d

5. Wyniki

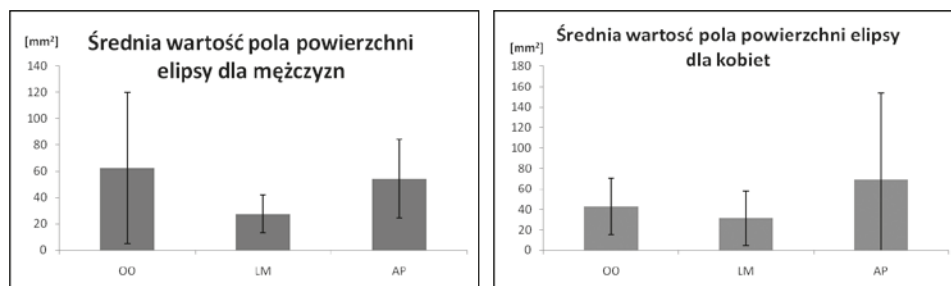
Dokonano analizy wyników z uwzględnieniem podziału badanej grupy względem płci. Obliczono średnie pole elipsy oraz długość ścieżki podparcia dla każdego z przeprowadzanych badań (OO – badanie z oczami otwartymi, LM – badanie z zaburzeniem w płaszczyźnie czołowej i AP – badanie z zaburzeniem w płaszczyźnie strzałkowej). Wyniki przedstawiono w tabeli 1 oraz na rysunkach 4 i 5.

Tabela 1. Wyniki badań stabilograficznych badanej grupy studentów

	Rodzaj badania	Średnia długość ścieżki [mm]	Odchylenie standardowe dla średniej długości ścieżki [mm]	Średnie pole elipsy [mm ²]	Odchylenie standardowe dla średniego pola elipsy [mm ²]
Kobiety	OO	426,58	74,25	43,03	27,47
	LM	425,19	95,14	31,23	26,56
	AP	558,70	182,34	69,31	84,47
Mężczyźni	OO	352,17	58,42	62,39	57,64
	LM	347,56	76,98	27,72	14,07
	AP	574,96	211,98	54,30	29,87



Rys. 4. Wykresy przedstawiające średnią długość ścieżki podparcia dla badanej grupy studentów



Rys. 5. Wykresy przedstawiające średnią wartość pola elipsy dla badanej grupy studentów

6. Wnioski

Zaobserwowano wydłużenie ścieżki podparcia jak i wzrost pola elipsy dla zaburzeń w płaszczyźnie strzałkowej zarówno dla badanej grupy kobiet jak i mężczyzn. Dla zaburzeń w płaszczyźnie czołowej długość ścieżki i pole elipsy mają wartości porównywalne z tymi jak dla badania z oczami otwartymi. Wzrosła jednak nieznacznie wartość odchylenia standardowego. Zmiana parametrów stabilograficznych przy zaburzeniach wywoływanych w środowisku wirtualnej rzeczywistości świadczy o możliwości wykorzystania

tej technologii w procesie diagnostycznym i rehabilitacyjnym. Udowodniono, iż zmiany parametrów w świecie wirtualnym mają bezpośredni wpływ na nasze subiektywne odczucia. Mogą wpływać na nasze zachowanie i jednocześnie motywować do określonych działań i reakcji. Streszczenie

Wspomaganie rehabilitacji i diagnostyki metodami trójwymiarowej komputerowej rzeczywistości jest obecnie bardzo dynamicznie rozwijane w dziedzinach biomechaniki i biocybernetyki [7]. Technologia ta pozwala pacjentom radzić sobie w realnym świecie poprzez naukę pokonywania przeszkód w świecie wirtualnym [1]. Udokumentowane badania wskazują na pozytywne skutki rehabilitacji z udziałem wirtualnych technologii [3, 5, 6]. W artykule przedstawiono dwie aplikacje przygotowane do celów terapeutycznych. Z udziałem wybranej grupy studentów zbadano wpływ wirtualnej technologii na zdolność utrzymywania równowagi w warunkach zakłóceń bodźcami wizualnymi. Wyniki zaprezentowano w formie tabeli i wykresów.

Literatura

- [1] Burstin A., Brown R., *Virtual environments for real treatments*, Pol. Ann. Med., 2010; 17(1): 101–111.
- [2] Cikajlo I., Matjačić Z., *Advantages of virtual reality technology in rehabilitation of people with neuromuscular disorders*, Institute for rehabilitation, Recent Advances in Biomedical Engineering, Ganesh R Naik (Ed.), ISBN: 978953–307–004–9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-biomedicalengineering/advantages-of-virtual-reality-technology-in-rehabilitation-of-people-with-neuromuscular-disorders>
- [3] Cikajlo I., Rudolf M., Goljar N., Matjačić Z., *Continuation of balance training for stroke subjects in home environment using virtual reality*, University Rehabilitation Institute, Linhartova 51, Ljubljana, SLOVENIA, Proc. 8th Intl Conf. Disability, Virtual Reality & Associated Technologies Viña del Mar/Valparaíso, Chile, 31 Aug. – 2 Sept. 2010 ICDVRAT; ISBN 978 07049 15022.
- [4] Hui-Ing Ma, Wen-Juh Hwang, Ching-Yi Wang, Jing-Jing Fang, Jat-Fai Leong, Tsui-Ying Wang, *Trunk–arm coordination in reaching for moving target in people with Parkinson's disease: Comparison between virtual and physical reality*, Human Movement Science 31(2012) 1340–1352.
- [5] Messier J., Adamovich S., Jack D., Hening W., Sage J., Poizner H., *Visuomotor learning in immersive 3D virtual reality in Parkinson's disease and in aging*, Exp Brain Res (2007) 179:457–474 DOI 10.1007/s00221–006–0802–2.
- [6] Regenbrecht H., Hoermann S., McGregor G., Dixon B., Franz E., Ott C., Hale L., Schubert T., Hoerman J., *Visual manipulations for motorre habilitation*, Computers & Graphics 36 (2012) 819–834.
- [7] Schwickert L., Klenk J., Stähler A., Robotic, Becker C., Lindemann U., *Robotic-assisted rehabilitation of proximal humerus fractures in virtual environments*, Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 6/2011, 387–392.
- [8] Wykorzystano modele trójwymiarowe pochodzące ze strony internetowej: <http://archive3d.net/?category=225>, stan na dzień 05.10.2012r.

Wybrane metody diagnostyki i wizualizacji postawy ciała człowieka

Katarzyna Walicka-Cupryś*, Justyna Drzał-Grabiec*,
Maciej Rachwał*, Adrian Kuźdzał**

Summary

In nowadays level of display techniques development there is a need for noninvasive possibility of body posture analysis which is characteristically for each analyzed. Modern methods introduced in this thesis fully make those conditions. The methods that were presented and described are the following: Metrecom System, Posturometr S, System Zebris and contactless methods like: Photogrammetric Method Of Projective Mora. Introduced methods make the most of set conditions. They give the opportunity to value the most important phenomena for the motor system and they picture chosen anthropometric points in a vivid way. Those achievements which are systems for measuring body posture are the prove for the effective work of specialists of photogrammetric, informatics and medicine.

Keywords: photogrammetric, body posture, scoliosis, Zebris System WinSpine, Posturometr S, Metrecom System

Wprowadzenie

Postawa ciała jest cechą charakterystyczną dla każdego człowieka. Od pierwszego spojrzenia można odróżnić jedną osobę od drugiej. Postawa ciała najczęściej określana jest jako sposób „trzymania się” człowieka, indywidualne ukształtowanie ciała i położenie poszczególnych odcinków tułowia oraz nóg w pozycji stojącej [6]. Jej biomechaniczno-dynamiczny charakter najlepiej oddaje definicja podana przez Nowotnego [9], jako „przestrzenny układ ciała w pozycji stojącej, funkcjonujący jako biomechanizm o wielu stopniach swobody, utrzymywany wbrew sile ciężenia i w warunkach równowagi chwiejnej”. Taki układ przestrzenny ciała należy rozpatrywać w ujęciu dynamicznym – tj. jako przyjmowanie i utrzymywanie określonej postawy. Przejawem jej jest wzajemny układ poszczególnych segmentów ciała, znajdujący odzwierciedlenie w sylwetce oraz ogólnym kształcie ciała. Ten specyficzny sposób „trzymania się” zależy od typu budowy ciała, sprawności fizycznej aparatu ruchu oraz wcześniej wykształconego nawyku postawy. Jednocześnie postawa ciała jest cechą indywidualną każdego człowieka, zmienną nie tylko w rozwoju osobniczym, ale także w ciągu dnia, w zależności od nastroju [5]. W związku z wieloma uwarunkowaniami postawy ciała, związanymi np. z płcią, wiekiem, rasą, somatotypem, porą dnia czy stanem psychicznym nie udało się opracować ogólnie przyjętych dokładnych co do wymiernych wartości, akceptowanych wzorców postawy prawidłowej [13], pomimo iż wielu autorów próbowało ją zdefiniować [6, 26, 29]. Jednak pomimo

* Katedra Rehabilitacji, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski.

** Katedra Neurochirurgii i Spondyliatrii, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski.

braku powszechnie uznanych normatywów dotyczących postawy ciała oraz uznawania postawy za cechę indywidualną mimo wszystko podlega ona ocenie zarówno w pojedynczych przypadkach, jak i w jednorodnych pod pewnymi względami grupach osób [4, 1]. W codziennej pracy, takiej oceny dokonują praktycy: lekarze pierwszego kontaktu, ortopedzi, pediatrzy ale i fizjoterapeuci oraz osoby, które w swej pracy muszą postawić diagnozę czy dana osoba jest zdrowa, czy nie. Wszystkie wyżej wymienione osoby, oceny sylwetki ciała mogą dokonać różnymi metodami – od najprostszych oględzin metodą wzrokową, do oceny postawy z użyciem RTG. W dobie powszechnie otaczającej nas nowoczesnych środków przekazu, naturalnym staje się potrzeba bezinwazyjnego poznania, zmierzenia, zatrzymania w czasie obrazu postawy ciała jaka jest charakterystyczna dla badanego. Takie możliwości dają szereg nowoczesnych metod badania i zobrazowania postawy ciała. Na uwagę zasługują często wykorzystywane w badaniach przesiewowych i opracowaniach naukowych zaawansowane metody komputerowe, takie jak: Metrecom System [15, 16, 17], Posturometr-S [18, 19, 20, 24, 31] Metoda fotogrametryczna [4, 21, 22, 25, 27, 32]. W ostatnim czasie dołączyła do nich skomputeryzowana metoda pomiaru statyki i ruchomości kręgosłupa, Zebris – WinSpine [12, 14, 28].

Z powyższego wynika cel niniejszej pracy, jakim jest przybliżenie wybranych bezinwazyjnych metod diagnostyki i obrazowania postawy ciała.

Wspólną cechą wszystkich metod badania postawy ciała jest przygotowanie pacjenta do badania oraz konieczność interpretacji otrzymanych wyników. Analizując dokładność pomiaru należy zwrócić uwagę na specyfikę badanego obiektu jakim jest ciało ludzkie. W praktyce nie jest możliwe pokazanie na skórze pacjenta punktów fizjologicznych z dokładnością większą niż 15 mm, ± 5 mm [3]. Z tego powodu nawet w przypadku, gdy techniczne możliwości urządzeń mają większą dokładność należy przyjąć, iż wartość 1cm w płaszczyźnie czołowej jest granicą dokładności metod z uwagi na cech fizjologiczne i należy je przyjąć jako postawy w granicy normy [22]. Przyjęcie prawidłowego wzorca postawy nie oznacza bezwzględnego kształtowania postawy według niego, ale porównanie z nim elementów postawy ciała badanej osoby [29]. W związku z powyższym, w wyborze danego normatywu najważniejszym jest odniesienie do innych opracowań tą samą metodą badawczą z uwzględnieniem wieku i płci, biorąc pod uwagę klasyfikację krzywizn kręgosłupa w płaszczyźnie strzałkowej (Tabela 1) i czołowej (Tabela 2) [22].

Niezależnie od wyboru metody badania każdy pacjent powinien być odpowiednio przygotowany do badania. W instrukcjach dotyczących danych metod, jedynie w metodzie fotogrametrycznej należy oznaczyć pewne punkty antropometryczne, które są niezbędne do analizy fotogramu. Z doświadczeń własnych wynika, iż w badaniu każdą z poniżej opisywanych metod należy oznaczyć odpowiednie punkty na ciele badanego i należy przestrzegać następującej procedury:

1. Oznaczyć na skórze pleców badanego punkty: szczytu wyrostka kolczystego kręgu szyjnego (C_7), krzyżowego (S_1) oraz pierwszego wyrostka kolczystego będącego szczytem kifozy piersiowej (KP), lordozy lędźwiowej (LL), miejsce przejścia kifozy piersiowej w lordozę lędźwiową (PL), dolnych kątów łopatek (ŁL i ŁP), kolców biodrowych tylnych górnych (ML i MP) (Rysunek 1, 2) w metodzie ZEBRIS dodatkowo oznacza się kolce biodrowe przednie górne.

Tabela 1. Klasyfikacja wielkości krzywizn przednio-tylnych kręgosłupa w zależności od parametrów kąta kifozy piersiowej KKP, kąta lordozy lędźwiowej KLL [22]

Wielkość krzywizn kręgosłupa	Wartość parametru
Kifoza piersiowa zwiększona	$KKP < (-1SD) KKP$
Kifoza piersiowa spłycona	$KKP > (+1SD) KKP$
Lordoza lędźwiowa zwiększona	$KLL < (-1SD) KLL$
Lordoza lędźwiowa spłycona	$KLL > (+1SD) KLL$
Zwiększona kifoza piersiowa i lordoza lędźwiowa	$KKP < (-1SD) KKP$ oraz $KLL < (-1SD) KLL$
Spłycona kifoza piersiowa i lordoza lędźwiowa	$KKP > (+1SD) KKP$ oraz $KLL > (+1SD) KLL$
Przeciętna wartość kifozy piersiowej i lordozy lędźwiowej	$KKP \pm (1SD)$, $KLL \pm (1SD)$

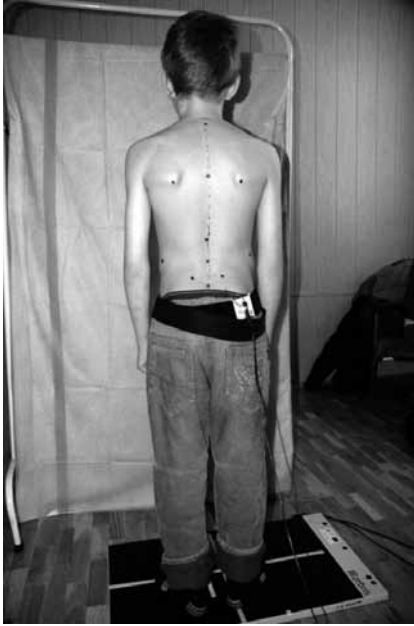
Tabela 2. Klasyfikacja asymetrii w płaszczyźnie czołowej [22]

Klasyfikacja	Wskaźniki liniowe
Brak asymetrii	Różnica > 10 mm
Asymetria umiarkowana	Różnica $> 10 \leq 15$ mm
Asymetria znaczna	Różnica > 15 mm



Rys. 1. Oznaczenie punktów antropometrycznych do badania postawy ciała

2. W czasie oznaczenia i właściwego badania pacjent powinien przyjąć postawę habitu-
alną jako postawę swobodną, niewymuszoną, ze stopami lekko rozstawionymi, stawami
kolanowymi i biodrowymi w wyproście, ramionami zwisającymi wzdłuż tułowia
i wzrokiem skierowanym prosto przed siebie (nigdy nie dawać komendy „stój prosto”).



Rys. 2. Przyjęcie postawy habitualnej

3. Przed pomiarami sprawdzić za pomocą poziomicy, czy aparaty są dobrze ustawione względem pionu i niezrotowane w płaszczyźnie poprzecznej.
4. Zadbać o prawidłowe ustawienie badanego względem bazy pomiarowej, czyli kamery/układu współrzędnych/odbiornika, ponieważ jeżeli badany nie będzie ustawiony równoległe do płaszczyzny czołowej, to można otrzymać obraz skoliozy, chociaż badany jej nie ma (podobnie jak przy zdjęciu RTG).
5. Starannie oznaczyć kursorem/dermatografem/pointerem, mierzone punkty (co ułatwia poprzedzające badanie oznaczenie tych punktów markerem),
6. Precyzyjnie przestrzegać zaleceń producenta metody, co do odległości badanych od urządzenia np. Metoda fotogrametryczna, System Zebris. W przypadku pewnych wizualnych odchyień już przed badaniem właściwym, opisać sposób wyznaczanie punktów pomiarowych, stabilizacji i ustawienia badanego.

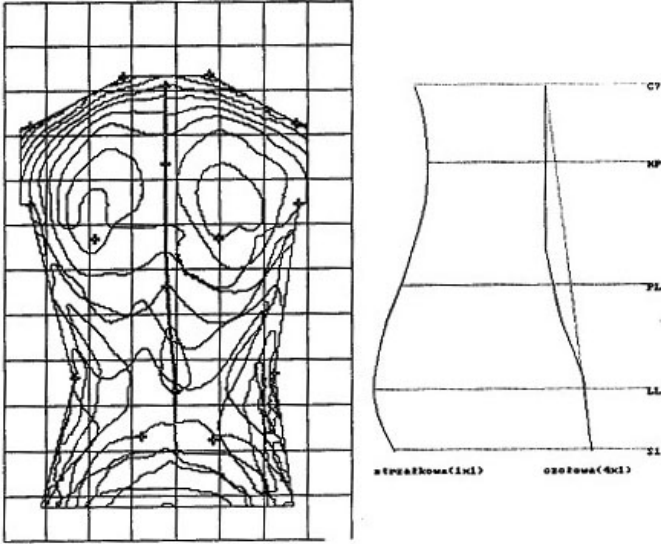
Powyższe jest niezbędne, aby pomiar wykonywany powtórnie lub przez inny zespół był porównywalny, obiektywny.

7. Do pomiarów dopuszczać tylko przeszkolony i doświadczony personel.

Metoda fotogrametryczna – z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej

Nowoczesną techniką badania i obrazowania postawy ciała jest fotogrametria przestrzenna, w której jednym ze sposobów oceny jest wykorzystanie zjawiska Moiré'a, a dodatkowo przy wykorzystaniu techniki komputerowej obrazowania układ mięśniowo-kostnego pleców [10, 21]. Do badań tą metodą niezbędne jest stanowisko pomiarowe, które składa się z komputera/laptopa oraz urządzenia projekcyjno – odbiorczego z kamerą do pomiaru pleców i stóp. Kamera może być ustawiana na specjalnym podnośniku, który ułatwia ustawienie jej odpowiednio do wysokości badanego. Uzyskanie przestrzennego obrazu możliwe jest dzięki wyświetleniu na plecach tzw. izolunii o ściśle określonych parametrach. W bardzo dobrze zaciemnionym pomieszczeniu, baz smugi światła z zewnątrz (podgumowane rolety na oknach, folia budowlana na okna) pacjent oświetlany jest z wykorzystaniem żarówki halogenowej małej mocy (50–150W). Odwzorowane na plecach linie ulegają zniekształceniom zależnie od konfiguracji powierzchni. Dzięki zastosowaniu obiektywu obraz badanego może być odebrany przez specjalny układ optyczny, a następnie przekazany na monitor komputera. Utrzymując stałą odległość pomiędzy źródłem światła, a rasterem (2,6 metra) oraz po wykonaniu przez raster fotografii badanego, komputer wylicza wysokość każdej warstwy. Tym samym można określić przestrzenne położenie

Producent aparatury do Komputerowego Badania Postawy Ciała, s. 69, ...
CS Elektronik System, wpr. inż. Artur Salerno, ul. Na Hłostach 19/2, Wrocław, tel. 0601 794152



Rys. 4. Wydruk komputerowej wizualizacji postawy ciała uzyskany metodą Mory projekcyjną

Do innej grupy metod badania postawy ciała zaliczamy tzw. metody dotykowe. Podczas badań mierzący stoi przy ciele badanego i ścisły nadzór nad pastwą pacjenta jednocześnie na ekranie komputera w trakcie pomiaru widoczne są zaznaczone punkty, dzięki czemu możliwa jest kontrola ich położenia w odniesieniu do układu współrzędnych. Jedne z tych metod mają dodatkową stabilizację postawy ciała jak Posturometr-S czy Metrecom System, a inne nie jak ultradźwiękowy System Zebris

Posturometr-S

Posturometr-S powstawał na przestrzeni lat w wyniku licznych badań i eksperymentów. Urządzenie w obecnym kształcie powstało w wyniku prac zespołu, którym kieruje dr Wincenty Śliwa i od jego nazwiska pochodzi nazwa Posturometru. Urządzenie stworzono do pomiaru krzywizn kręgosłupa i innych punktów antropometrycznych określających postawę ciała. Jest dosyć durze jednak możliwe do przeniesienia. Posiada dodatkową stabilizacją badanego pod brodą i na wysokości ud, tak aby podczas badania zminimalizować wy chwiecia podczas (Rysunek 5), [8, 31]. Urządzenie charakteryzuje się dużym zakres pomiarów (ok.2x1, 5x1m), umożliwia dokładną lokalizację i pomiar położenia wszystkich punktów na ciele człowieka oraz obliczenie dowolnych parametrów z tego wynikających. Pozwala na określenie położenia punktu w przestrzeni trójwymiarowej, w kartezjańskim układzie współrzędnych. Posturometr S składa się z dwóch sprzężonych ze sobą układów:

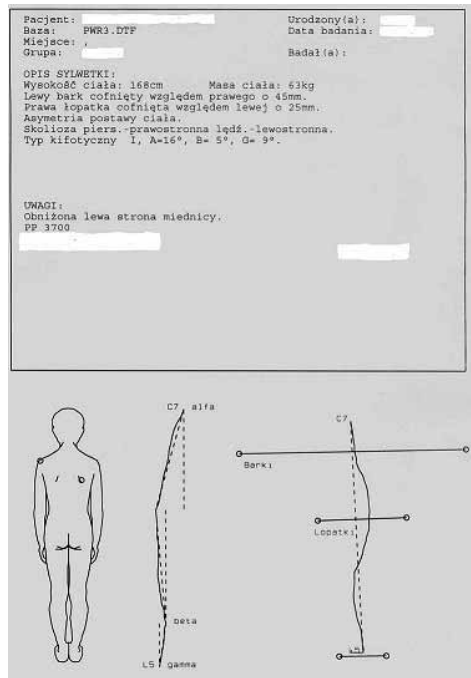
- mechanicznego, służącego do wskazania wodzikiem pomiarowym położenia mierzonego punktu,

- elektronicznego, obliczającego położenie wodzika pomiarowego w przestrzeni trójwymiarowej.

Aby dokonać pomiaru należy chwytając w dłoń wodzik naprowadzić go na mierzone punkty antropometryczne oraz po krzywiźnie kręgosłupa. Ruch wodzika jest przekazywany do komputera, który rejestruje, analizuje i przedstawia uzyskane pomiary w formie wydruku (Rysunek 6). W razie pomyłki w każdym momencie można przerwać pomiar i wykonać go od nowa. Aparat umożliwia pomiar dowolnej liczby punktów pomiarowych oraz krzywych pomiarowych np. pomiar ruchomości w stawach biodrowych, pomiar długość względnej i bezwzględnej kończyn, pomiary obwodowe, pomiar kąta pochylecia miednicy [18, 19, 20, 31].



Rys. 5. Urządzenie Posturometr S ze stabilizatorem w płaszczyźnie strzałkowej i czołowej



Rys. 6. Wydruk komputerowej wizualizacji postawy ciała, charakteryzujący liczbę postawy ciała uzyskany Posturometrem S [31]

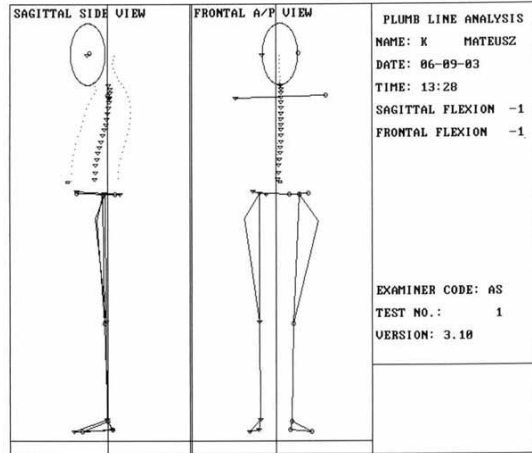
Metrecom System

Urządzenie Metrecom System umożliwia antropostereometryczne badanie narządu ruchu, oraz postawy ciała. Pozwala na dokładne określenie położenia przestrzennego dowolnego punktu na ciele badanego w stosunku do kolumny pomiarowej. Umożliwia badanie krzywizn kręgosłupa, zakresów ruchów i ruchomości kręgosłupa zarówno międzysegmentarnej, odcinkowej, jak i całościowej w płaszczyznach strzałkowej oraz czołowej, w pozycji stojącej. Metrecom System umożliwia ocenę czynnościową kręgosłupa w skłonach

bocznych oraz skłonie w przód i w tył, pomiar wielkości garbu żebrowego, specjalistyczną ocenę **miednicy i kończyn dolnych** (Rysunek 7) [7, 15, 16]. Położenie każdego z mierzonych punktów określa się za pomocą trzech współrzędnych prostopadłych do siebie. Jedna z tych współrzędnych podaje tzw. wysokość położenia danego punktu, tj. jego pionową odległość do płaszczyzny podstawy, na której stoi badany. Druga współrzędna określa tzw. szerokość położenia danego punktu, tj. jego poziomą odległość od płaszczyzny osiowej, czyli pionowej płaszczyzny przechodzącej pomiędzy stopami badanego. Trzecia współrzędna określa tzw. głębokość położenia danego punktu, tj. poziomą odległość od płaszczyzny tylnej, czyli pionowej płaszczyzny przechodzącej stycznie do pięt badanego, a prostopadle do płaszczyzny osiowej. Na podstawie tych punktów komputer tworzy wizerunek postawy ciała i kręgosłupa. Porównuje z wartościami prawidłowymi określonymi przez producenta zawierającymi się w pakiecie oprogramowania urządzenia Metrecom System. Normatyw stworzony został na podstawie badań populacji amerykańskiej [11], co jest mankamentem tych normatywów. Urządzenie składa się z części głównej, jaką stanowi kolumna wraz z odpowiednim czujnikiem, oraz z aparatury komputerowej, wyposażonej w specjalne do tych badań opracowany program komputerowy. Czujnik, trójwymiarowy konwerter analogowo-cyfrowy, który stanowi integralną część aparatury, połączony jest z kolumną urządzenia za pomocą przegubowego wysięgnika o długości 1,5 metra, który pozwala na pełną swobodę ruchów. Istota wykonywania badań opiera się na określaniu, a następnie skanowaniu za pomocą ruchomego elektrogoniometru specyficznych punktów antropometrycznych i linii na ciele badanego, w stosunku do kolumny stanowiącej kalibrowaną przy każdym uruchamianiu urządzenia, oś odniesienia dla dokonywanych pomiarów. W oparciu o te punkty komputer tworzy trójwymiarowy wizerunek postawy ciała i kręgosłupa, oceniając ponad 40 parametrów, podając jednocześnie ich wartości oraz wszelkie odchylenia w milimetrach lub stopniach w stosunku do zapisanych w oprogramowaniu parametrów normatywnych. Pod względem geometrycznym istotą określania kąta krzywizn kręgosłupa jest oznaczenie kąta pochylenia kręgów krańcowych krzywizn (kręgów o największym kącie pochylenia) w stosunku do osi pionowej, a następnie ich zsumowanie. Metoda ta jest zatem analogiczna do znanej i powszechnie przyjętej metody pomiaru wg Cobba [6, 7, 26]. W ten sposób wyznacza się wygięcia kręgosłupa w płaszczyznach strzałkowej i czołowej, jak również mierzona jest ruchomość kręgosłupa w skłonie w przód oraz w zgięciu kręgosłupa w prawo i lewo [7]. Zebrane dane dokumentowane są w formie plików w programie komputerowym oraz w formie wydruków komputerowych (Rysunek 8, 9, 10, 11). Metoda ta jest wykorzystywana do badań naukowych na AWF w Krakowie i nie jest powszechnie dostępna na rynku Polskim, tak jak System Zebris, czy Metoda fotogrametryczna z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej a nawet Posturometr S, które to znajdują się w gabinetach lekarskich i fizjoterapeutycznych.



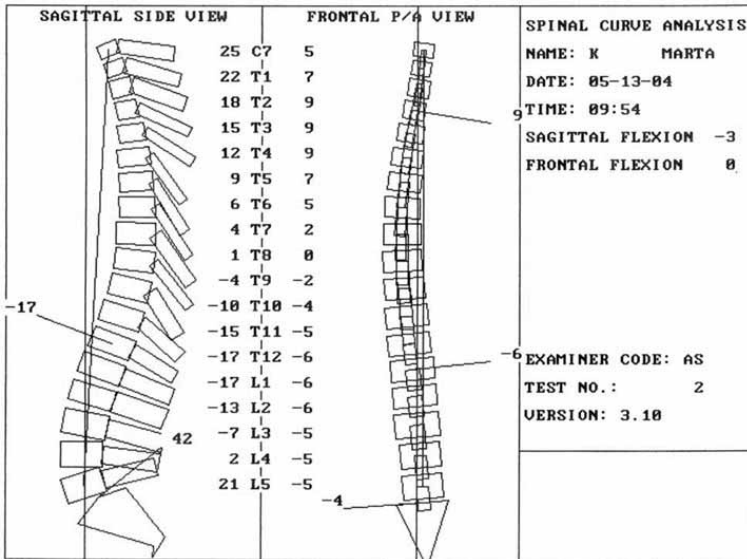
Rys. 7. Badanie postawy ciała metodą Metrycom System



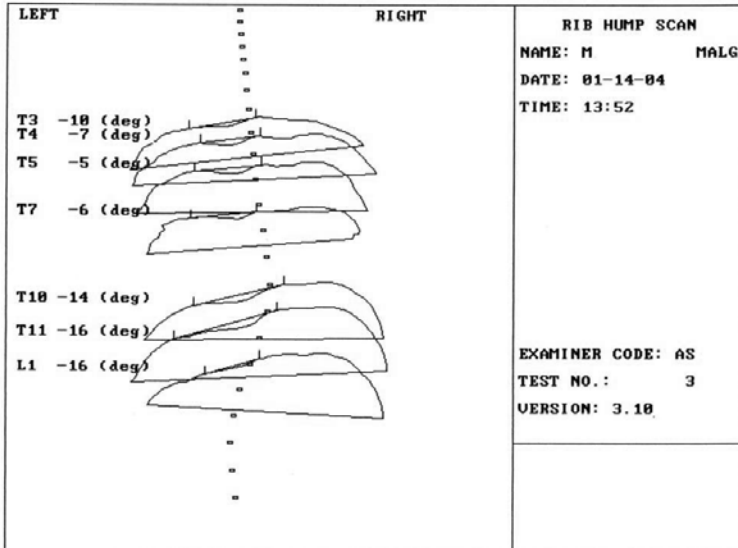
Rys. 8. Wydruk komputerowej wizualizacji postawy ciała uzyskany metodą Metrecom System

PAGE 1		PLUMB LINE ANALYSIS		TEST NO. 001	
DATE: 06-09-03	TIME: 15:11	EXAMINER CODE: AS			
NAME: G KAMIL	DATE OF BIRTH: 03-04-91	OCCUPATION: III			
SEX : M	WEIGHT: 55,	HEIGHT: 4-4	REFERRING PHYSICIAN: AS		
DESCRIPTION	PAT.	NORM.			
HEAD POSITION A/P (+)Ant./(-)Post.	mms	89	0(10)		
HEAD POSITION S/S (+)Lt./(-)Rt.	mms	7	0(5)		
SHOULDER A/P (+)Rt. Ant./(-)Lt. Ant.	mms	31	0(10)		
SHOULDER VERT. (+)Rt. High/(-)Lt. High	mms	7	0(10)		
TRUNK SAGITTAL (+)Flexion/(-)Extension	deg	1	0(5)		
TRUNK FRONTAL (-)Left/(+)Right	deg	-2	0(5)		
C.O.M. AT T1 A/P (+)Ant./(-)Post. to Pl	mms	35	n/a		
C.O.M. AT T12 A/P (+)Ant./(-)Post. to T1	mms	21	n/a		
PELVIS CNTR. A/P (+)Ant./(-)Post. to Pl	mms	3	n/a		
PELVIS CNTR. S/S (+)Lt./(-)Rt. of Pl	mms	-2	0(10)		
PELVIC OBLIQUITY (+)Rt High/(-)Lt. High	mms	2	0(10)		
		RIGHT	LEFT	R/L	NORM
PELVIS A/P (+)Ant./(-)Post. to Pl	mms	7	-1	8	n/a
PELVIS SAGIT. TILT. (-)Back/(+)Fwd	deg	11	9	2	17(5)
PELVIS TRANS. RTN. (-)Int./(+Ext.	deg	12	33	-21	n/a
FEMORAL RTN. (-)Int./(+Ext.	deg	-5	2	-7	-5(5)
KNEE V/V FEM. SHAFT (+)Val./(-)Var.	deg	9	10	-1	7(2)
KNEE V/V MECH. AXIS (+)Val./(-)Var.	deg	1	3	-2	0(3)
KNEE SAGITTAL (+)Flex./(-)Ext.	deg	5	9	-4	0(5)
KNEE CENTER A/P (+)Ant./(-)Post	mms	24	19	5	0(10)
PATELLAR HEIGHT above joint line	mms	40	36	4	n/a
PATELLAR Q-ANGLE (+)Val./(-)Var.	deg	18	19	-1	12(5)
PATELLAR I/S RTN. (+)Ext./(-)Int.	deg	-21	8	-29	n/a
ANKLE FRONT. RTN. (+)Evers./(-)Inv.	deg	20	3	17	5(3)
ANKLE SAGIT. RTN. (+)Plant./(-)Dorsi.	deg	4	6	-2	0(3)
FOOT TRANSV. RTN. (+)Ext./(-)Int.	deg	3	10	-7	5(5)
LEG LENGTH FUNCT. (pelvis to floor)	cms	76.7	76.5	.2	n/a
LEG LENGTH ANAT. (pelvis to knee)	cms	40.5	40.1	.4	n/a
LEG LENGTH ANAT. (knee to ankle)	cms	29.8	30.1	-.3	n/a
LEG LENGTH ANAT. (ankle to floor)	cms	6.2	6.0	.2	n/a

Rys. 9. Charakterystyka liczbowo poszczególnych parametrów postawy ciała w badaniu Metrecom System



Rys. 10. Wydruk komputerowej wizualizacji krzywizn kręgosłupa uzyskany metodą Metrecom System



Rys. 11. Wydruk komputerowej wizualizacji garbu żeberowego uzyskany metodą Metrecom System

Ultradźwiękowy System Zebris z oprogramowaniem WinSpine 2.3

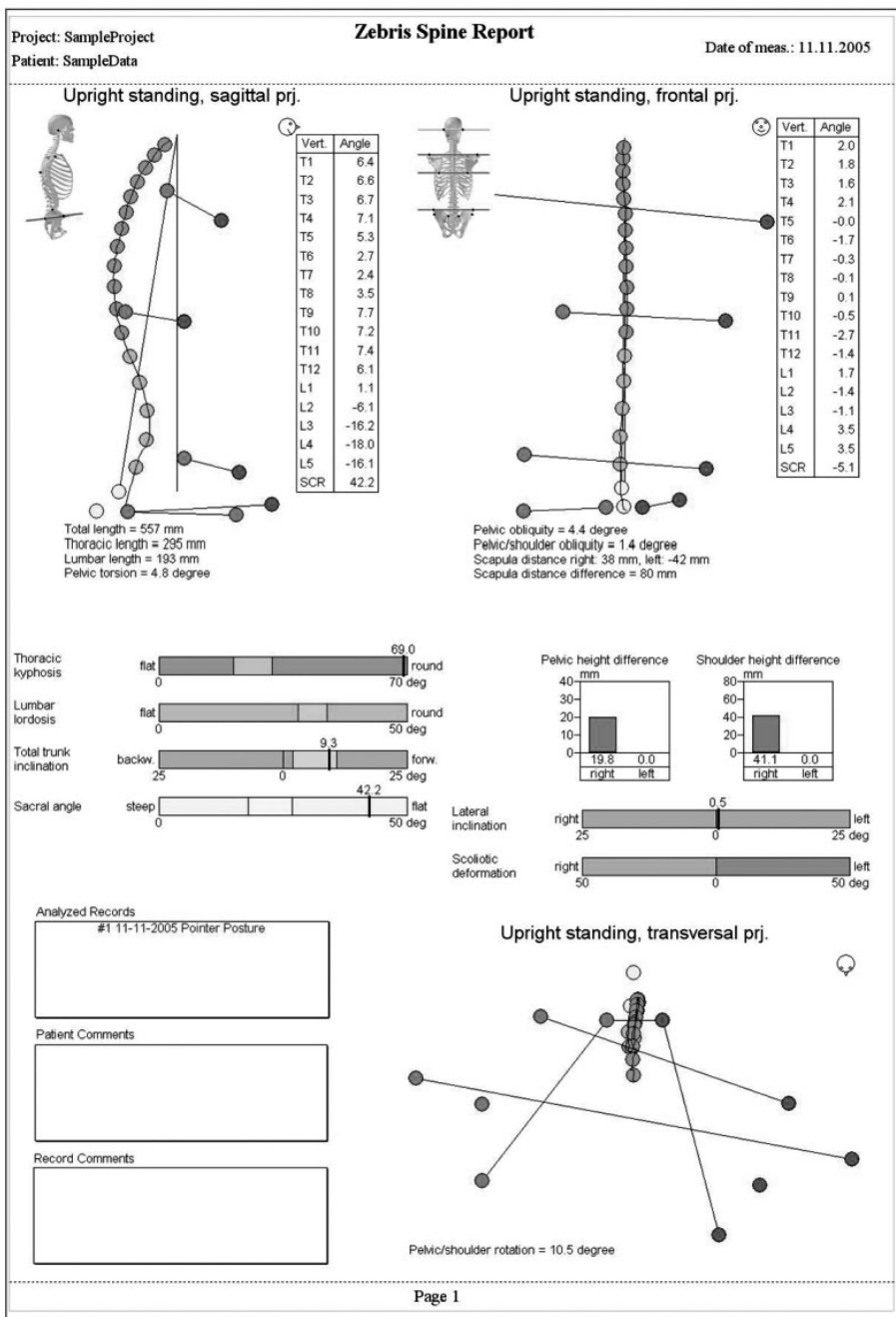
System do analizy postawy Zebris pozwala na badanie zakresu ruchu i kształtu krzywizn segmentów kręgosłupa podczas wykonywania określonych testów (np.: Schobera lub Otta) jak również na ocenę sylwetki w pozycji statycznej. Nie posiada dodatkowych

stabilizatorów postawy ciała. Ultradźwiękowy System Zebris z oprogramowaniem WinSpine 2.3. i nowszym, umożliwia obiektywną ocenę statyczną postawy wykonaną w przestrzeni trójwymiarowej. System pomiarowy składa się z wskaźnika, nadajnika pomiarowego pointera, nadajników z pasem do zamocowania na biodrach osoby badanej oraz podstawowej jednostki CMS-HS ze stojakiem jako odbiornika, który powinien być ustawiony pod kątem 70° (Rysunek 12). Wskaźnik ultradźwiękowy służy do wprowadzenia odpowiednich punktów antropometrycznych oznaczonych na ciele badanego (Rysunek 12), które będą wyświetlone na monitorze komputera. Punkty na pasie biodrowym są traktowane przez oprogramowanie jako punkty pasywne (w przeciwieństwie do punktów aktywnych, którymi są dwa markery wskaźnika punktowego), ich pozycja i ewentualny ruch (badanie statyczne bądź dynamiczne) są śledzone i rejestrowane w czasie rzeczywistym. Wszystkie ruchy mogą być przedstawiane w odniesieniu do punktów anatomicznych obręczy barkowej lub biodrowej. Miniaturowy nadajnik umieszczone na pacjencie za pomocą elastycznego paska – traktowany jest jako markery odniesienia, wyznaczają punkty, w odniesieniu do których urządzenie określa pozycje markerów wskaźnika punktowego, tzw. „pointera”. Przyłożenie wskaźnika punktowego do charakterystycznych punktów anatomicznych na ciele i uaktywnienie go powoduje odwzorowanie na ekranie komputera wprowadzanych punktów tworząc przestrzenny obraz sylwetki [28].



Rys. 12. Badanie postawy ciała systemem Zebris WinSpine 2.3

Kręgosłup prezentowany jest w trzech różnych projekcjach płaszczyźnie strzałkowej, czołowej i poprzecznej. Metoda pomiarowa oparta jest na określeniu współrzędnych w przestrzeni punktów referencyjnych oznaczonych na ciele pacjenta, poprzez pomiar opóźnienia między emisją impulsu ultradźwiękowego a jego odbiorem przez jego mikrofony czujnika pomiarowego. Dokładna pozycja znaczników w przestrzeni wyznaczana jest metodą triangulacji [23]. Jak wynika z doświadczeń własnych w czasie wykonywania



Rys. 13. Wydruk komputerowej wizualizacji postawy ciała, charakterystyki liczbowej postawy ciała uzyskany systemem Zebbris WinSpine 2.3

badania metodą ultradźwiękową ważne, jest aby wyeliminować zakłócenia fal ultradźwiękowych spowodowane np. włączonym telefonem komórkowym, wiatrakami z ciepłym lub zimnym powietrzem, czy dużym natężeniem dźwięku. Zakłócenia te mogą mieć wpływ na wyniki pomiaru, co jest również widoczne w wizualnym raporcie z badania postawy. Ważnym jest też, podczas całego badania utrzymanie odległości badanego od odbiornika w odległości 80 cm. Zwiększenie tej odległości powoduje zakłócenia w odbiorze fali. Jednocześnie należy przestrzegać, aby nadajniki miały cały czas wolną przestrzeń pomiędzy odbiornikiem, czyli badany nie może stać pomiędzy pointe-rem a odbiornikiem. Kolejność wprowadzania punktów antropometrycznych musi być przestrzegana. W przypadku błędu wizualizacja postawy będzie zaburzona, co widoczne będzie na wydruku raportu. Po spełnieniu wszystkich powyższych zleceń raport z badania (Rysunek 13), można wydrukować i poddać analizie do wartości normatywnych przedstawionych przez producenta.

Podsumowanie

Przedstawione powyżej urządzenia mają możliwość oceny najbardziej istotnych zjawisk dla oceny układu ruchu. W stosunkowo przejrzysty sposób obrazują wybrane punkty antropometryczne. Posiadają rozmiary, które przy przeciętnych warunkach lokalowych gabinetu lekarskiego, przychodni czy zakładu rehabilitacji mogą być zastosowane. Krótki czas wykonania pomiaru jest w szczególności korzystny przy w przypadku Metody fotogrametrycznej, jednak czas uzyskania wyników w przypadku tej metody jest dłuższy niż w przypadku metod dotykowych Metrecom System, Posturomet S czy Systemie Zebris. Opracowanie danych w przypadku metod dotykowych mieści się w ramach jednej wizyty lekarskiej, fizjoterapeutycznej. Metoda fotogrametryczna sprawdza się w badaniach masowych w szkołach, gdzie liczy się czas badania jednej osoby, a nie w danym momencie uzyskanie wyniku badania. Wyniki badania w określane są precyzyjnie i dla osób przeszkolonych w sposób zrozumiały przedstawiają charakterystykę mierzonych punktów antropometrycznych. Są przykładem efektywnej pracy specjalistów z zakresu fotogrametrii, informatyki i medycyny. Streszczenie

W dobie rozwoju technik obrazowania, konieczna jest możliwość bezinwazyjnej analizy postawy ciała, charakterystycznej dla badanego. Przybliżone w pracy wybrane nowoczesne metody badania, spełniają ten warunek. Zaprezentowano i omówiono między innymi metody dotykowe: Metrecom System, Posturometr S, System Zebris oraz metody bezdotykowe, jak Metoda fotogrametryczna. Metody te spełniają większość oczekiwań, stawianych przed nimi. Dają możliwość oceny najbardziej istotnych zjawisk dla oceny aparatu ruchu i w przejrzysty sposób obrazują wybrane punkty antropometryczne. Urządzenia te, w postaci systemów do oceny postawy ciała, są dowodem efektywnej pracy specjalistów z zakresu fotogrametrii, informatyki oraz medycyny.

Literatura

- [1] Barczyk-Pawelec K., Zawadzka D., Sidorowska M., Szadkowska A., Hawrylak A., Wójtowicz D., *Wpływ ćwiczeń w środowisku wodnym na zmianę ruchomości klatki piersiowej i kształtu*

- krzywizn kręgosłupa w płaszczyźnie strzałkowej dzieci ze skoliozą I stopnia Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna, 2012, 18(1) s. 9–14.
- [2] Borek R., Wereda M., Stec W., Walicka-Cupryś K., Wilk G., *Ocena wpływu niepewności danych pomiarowych na rezultat wnioskowania statystycznego o rozkładzie mierzonych cech antropometrycznych*. Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej 2006, 233(19) s. 81–88. 05, s. 8–9.
- [3] Cappozzo A., Catani F., Leardini A., Benedetti M. G., Della Croce U., *Position and orientation in space of bones during movement: experimental artefacts*. Clinical Biomechanics 1996 Volume 11, Issue 2, March 1996, s. 90–100.
- [4] Drzał-Grabiec J., Snela S., *The influence of rural environment on body posture*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2012; 19(4), s. 846–850.
- [5] Karwański A., *Postawa ciała – pytania, wątpliwości wokół tej właściwości* [w:] *Dysfunkcje kręgosłupa diagnostyka i terapia*, red. J. Nowotny, Sympozjum międzynarodowe Katowice 1999, s. 137–147.
- [6] Kasperczyk T., *Wady postawy ciała. Diagnostyka i leczenie*. FH-U „Kasper” Kraków 2004, s. 5, 20–50.
- [7] Kuźdzał A., *Stopień upośledzenia umysłowego a postawa ciała oraz wybrane cechy morfofunkcjonalne uczniów w wieku 11–13 lat krakowskich szkół specjalnych* AWF Kraków 2005, praca doktorska, s. 37–39.
- [8] Mrozkowiak M., *Uwarunkowania wybranych parametrów postawy ciała dzieci i młodzieży oraz ich zmienność w świetle mory projekcyjnej* Zamojski Wydział Kultury fizycznej, Gorzów Wielkopolski 2007, s. 67–69.
- [9] Nowotny J., *Neurofizjologiczne aspekty korekcji odchyłeń od prawidłowej postawy ciała*, [w:] *Dysfunkcje kręgosłupa – diagnostyka i terapia część I*, red. J. Nowotny, AWF Katowice 1993, s. 21–22.
- [10] Nowotny J., Zawieska D., Saulicz E., *Fototopografia z wykorzystaniem rastra optycznego i komputera jako sposób oceny postawy ciała*. Postępy Rehabilitacji, 1992, 1, s. 17–19.
- [11] Panjabi M.M., White A.A., *Clinical biomechanics of the spine*. Philadelphia J.B., Lippincott C.O 1978.
- [12] Przygoda Ł., Walicka-Cupryś K., Sadowska L., *Ocena postawy ciała u osób niesłyszących w wieku 8–16 lat* [w:] *Potencjał społeczny dzieci i młodzieży niepełnosprawnej*, red J. Patkiewicz, Typoscript Wrocław 2011; s. 87–113.
- [13] Puszczalska-Lizis E., Walicka-Cupryś K., *Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Wady postawy ciała u dzieci i młodzieży. Profilaktyka-Diagnostyka-Terapia*. Bielsko-Biała. 6–8 czerwca 2008. Przegląd Medyczny UR, 2008, 2 s. 201–202.
- [14] Roiha H. *Wirbelsäulenform und -beweglichkeit im Schulalter*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München 2004, s. 12–18.
- [15] Szczygieł A. *Ocena efektów terapii manualnej z zastosowaniem metody diagnostyczno-pomiarowej*. Postępy Rehabilitacji 1997b, 11(2) s. 99–106.
- [16] Szczygieł A., *Zawansowana ocena postawy ciała i funkcji kręgosłupa jako istotne aspekty skojarzonego leczenia fizjoterapeutycznego i manualnego w przypadkach pacjentów z „postawą skoliotyczną*, Medycyna Manualna 2000 IV(3–4) s. 18–22.
- [17] Szczygieł A., Janusz M., Marchewka A., *Ocena wybranych parametrów postawy ciała dzieci i młodzieży przy użyciu nowoczesnej techniki diagnostyczno-pomiarowej w aspekcie terapeutycznym*. Medycyna Sportowa 2001 (11) s. 419–423.

- [18] Śliwa W., Chlebika E., Śliwa K., *Wady rozwoju fizycznego dzieci*, Monografie AWF Poznań 1999, 330 s. 403–407.
- [19] Śliwa W., Mieszala W., *Ocena krzywizn kręgosłupa metodą elongacyjną z wykorzystaniem „Posturometru – S*. [w:] *Dysfunkcje kręgosłupa diagnostyka i terapia*, red. J. Nowotny Katowice 1993, 2, s. 25–30.
- [20] Śliwa W., *Posturometr S jako urządzenie diagnozująco-pomiarowe*. [w:] *Powstawanie wad postawy ciała ich ocena i postępowanie korekcyjne*, red. W Śliwa, Posmed, Wrocław 1993, s. 5–16. [21] Świerc A., *Komputerowa diagnostyka postawy ciała – instrukcja obsługi*, Czernica Wrocławska 2005, s. 8–9.
- [21] Walicka-Cupryś K., *Budowa somatyczna i postawa ciała młodzieży w wieku gimnazjalnym w zależności od aktywności ruchowej*, AWF Wrocław 2009, praca doktorska, s. 30–36.
- [22] Walicka-Cupryś K., Przygoda Ł., Sadowska L., Szeliga E., *Ocena krzywizn przednio-tylnych kręgosłupa dzieci w wieku 11–13 lat*. *Young sport Science of Ukraine*, 2010, 3, s. 38–45.
- [23] Walicka-Cupryś K., Ćwirlej A., Mrozkowiak M., Gregorowicz Cieślak H., *Ocena postawy ciała dzieci w wieku 7 lat na podstawie wybranych szkół miasta Rzeszowa*, *Young Sport Science of Ukraine*, Lwow 2007, 4, s. 4–13.
- [24] Walicka-Cupryś K., Stec M., Mrozkowiak M., *Porównanie parametrów krzywizn kręgosłupa w płaszczyźnie strzałkowej mierzonych metodą fotogrametryczną z wykorzystaniem zjawiska Moirè'a i inklinometryczną* *Rehabilitacja Medyczna* 2006, 10, s. 48–49.
- [25] Wilczyński J., *Korekcja wad postawy człowieka*. *Anthropos*, Starachowice 2005, s. 185–219.
- [26] Zawieska D. i wsp., *Fotogrametria – mity i rzeczywistość*. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja*, 2002; 4(4) s. 498–502.
- [27] Zebris Medical GmbH WinSpine 2.3, *Instrukcja obsługi. Badania postawy, kształtu kręgosłupa i jego ruchomości za pomocą wskaźnika z podwójnym czujnikiem 2009*.
- [28] Zeyland-Malawka E., Prętkiewicz-Abacjew E., *Idealny wzorzec postawy – irrealizm czy element strategii w batalii o zdrowie dziecka* [w:] *Korektywa i kompensacja zaburzeń w rozwoju fizycznym dzieci i młodzieży* red. K. Górniak, Biała Podlaska 2005, 2, s. 9–15. [31] www.posmed.com.pl/teksty.php?plik=post.plum&tytul=%20Posturometr-S data wejścia 20.02.2013.
- [29] www.cq.com.pl/n_pl_podstawy.html, data wejścia 20.02.2013.

Nieinwazyjna metoda korekcji wad kształtu głowy u dzieci

Ewa Stachowiak*, Marek Gzik*, Wojciech Wolański*, Dawid Larysz**

Summary

Positional plagiocephaly affects about 3% of the population, in more serious cases, possible is cranial pressure on the brain. Scientific studies have shown that it has negative impact on the psychomotor development. This paper describes the design process of the orthosis-helmet to correct the shape of the head. The methods of diagnosing are presented. Individual design of helmet and construction optimization are also described.

Keywords: helmet therapy, positional plagiocephaly, 3D scanner, 3D antropometric analysis

1. Wprowadzenie

W Polsce rodzi się rocznie średnio ok. 390 tys. dzieci, a blisko 3000 z nich dotyka problem plagiocefalii ułożeniowej. Schorzenie to charakteryzuje się nieprawidłowym zazwyczaj spłaszczonym z jednej ze stron kształtem głowy. W odróżnieniu od kraniosynostoz, w przypadku tej wady nie dochodzi do przedwczesnego zrośnięcia się szwów czaszkowych, a powstałe zniekształcenia są efektem powtarzalnego nacisku sił zewnętrznych na jedną ze stron głowy. Spłaszczenie głowy stanowi nie tylko problem estetyczny, ale też może być przyczyną zaburzeń rozwoju psycho-ruchowego, co stanowi bezwzględne wskazanie do podjęcia leczenia [1, 5, 6].

Obecny rozwój techniki oraz integracja środowiska medycznego i technicznego pozwoliły na opracowanie systemu wspomagania leczenia wad budowy główki dziecka obejmującego nowoczesną i kompleksową diagnostykę schorzenia, a także opracowanie innowacyjnej ortozy do korekcji kształtu głowy dziecka. Wyniki zrealizowanych badań mogą wspomagać lekarzy w podejmowaniu decyzji i planowaniu korekcji oraz stanowią cenne źródło informacji przy doborze i wytwarzaniu kasku do optymalnej korekcji wady kształtu czaszki i ochrony mózgu. Wykonane badania pozwoliły dokonać analizy zjawisk i procesów zachodzących w czasie w przypadku zastosowania hełmu korygującego. Zadaniem kasku jest umożliwienie wzrostu czaszki w obszarach spłaszczonych i zahamowanie wzrostu w obszarach zbyt wypukłych.

Realizacja projektu badań pozwoliła na sformułowanie modelu numerycznego 3D głowy dziecka i kasku, które umożliwiły przeprowadzenie nieinwazyjnych rozważań różnych aspektów leczenia nieprawidłowego kształtu czaszki u dzieci. Uzyskane wyniki z symula-

* Katedra Biomechatroniki, Wydział Inżynierii Biomedycznej Politechnika Śląska.

** Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka w Katowicach.

cji numerycznych przyczyniły się do opracowania systemu inżynierskiego wspomaganie planowania i doboru optymalnej metody leczenia dopasowanej do choroby pacjenta.

2. Diagnostyka wad kształtu głowy

W przypadku wad budowy czaszki niemowląt kluczowe znacznie ma odpowiednio wczesna diagnostyka warunkująca dobór odpowiedniej terapii i pozwalająca na uzyskanie optymalnych wyników leczenia. W zależności od rodzaju wady, wieku dziecka i stopnia zaawansowania choroby możliwe jest podjęcie leczenia w dwóch kierunkach – bądź poprzez operację neurochirurgiczną, bądź przez leczenie bezinwazyjne, za pomocą kasków korygujących.

W przypadku przedwczesnego zrośnięcia się szwów czaszkowych najczęściej konieczna jest interwencja chirurgiczna. Terapie kaskową stosuje się w przypadku wad złożeniowych lub jako leczenie uzupełniające do zabiegów chirurgicznych. Ze względu na różny sposób leczenia w zależności od etiologii wady, podczas diagnostyki na początku należy określić czy u dziecka doszło do przedwczesnego zrośnięcia się szwów czaszkowych [7]. Podstawową stosowaną tutaj procedurą diagnostyczną jest badanie tomografii komputerowej, narażające pacjenta na promieniowanie rentgenowskie.

Współcześnie dąży się do tego, aby w sposób jak najmniej inwazyjny ocenić stan zdrowia pacjenta. Zastosowanie metod nieinwazyjnych technik obrazowania jest zagadnieniem stosunkowo nowatorskim. Pozwalają one na ocenę stanu zdrowia przez określenie konkretnych parametrów liczbowych dających obiektywną informację



Rys. 1. Wzór świetlny rzutowany na pacjencie

Mając na uwadze powyższe spostrzeżenia opracowano bezinwazyjną metodę diagnozowania wad kształtu głowy niemowląt, z wykorzystaniem skanera 3D. W metodzie zastosowano trójwymiarowy skaner optyczny MEGACAPTUROR II™ firmy Creaform. Jest to system umożliwiający tworzenie cyfrowej postaci ludzkiego ciała, bądź jego części w celu uzyskania zindywidualizowanych danych antropometrycznych.

Skaner wykorzystuje światło białe będące nośnikiem informacji. Projektor wyświetla na obiekcie zestaw linii prostych (o zadanej gęstości i znanym kącie, (Rys. 1). Światło odbija się od powierzchni i ulega załamaniu. Sensor optyczny, którego położenie względem obiektu jest znane wychwytyje wiązkę odbitą. Informacja o zniekształceniu jest przekazywana do komputera,

gdzie następuje obliczenie miejsca odbicia światła na podstawie analizy kątów wiązki padającej i odbitej [2, 3].

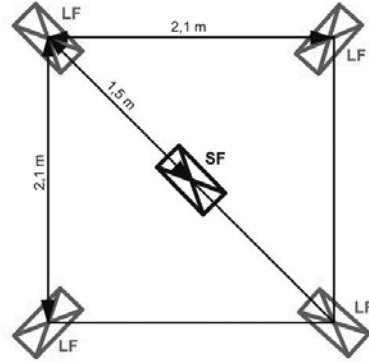
W skład stosowanego systemu wchodzi:

- 4 głowice skanujące głowę dookoła,
- głowica skanująca górną powierzchnię głowy,
- komputer wraz z oprogramowaniem.

Odpowiednie rozmieszczenie głowic skanujących pozwala na poprawną kalibrację urządzenia, co znacznie skraca czas badania oraz późniejszej obróbki danych i pozwala na eliminację błędów. Głowice boczne umieszczone są na statywach na wysokości 1 m, głowica górna została umieszczona na poziomej belce na wysokości 2,5 m. Na rysunku poniżej przedstawiono rozmieszczenie głowic skanujących.

W celu przeprowadzenia badania dziecko umieszcza się w centrum obszaru skanowania. By wyeliminować refleksy świetlne będące skutkiem odbicia światła od włosów na głowę dziecka wkłada się czepkę kosmetyczną. Założenie czepki pozwala również na dokładne odzwierciedlenie kształtu głowy, pomijając wpływ włosów.

Po przygotowaniu pacjenta rozpoczyna się badanie trwające około 10 s. Urządzenie dokonuje akwizycji z 5 kamer. Podczas trwania badania dziecko powinno być nieruchome, by nie dochodziło do powstawania artefaktów. Przy użyciu 5 głowic czas całkowitej akwizycji wynosi 10s. Bezpośrednio po akwizycji pacjent może opuścić stanowisko diagnostyczne.



Rys. 2. Rozmieszczenie głowic skanujących

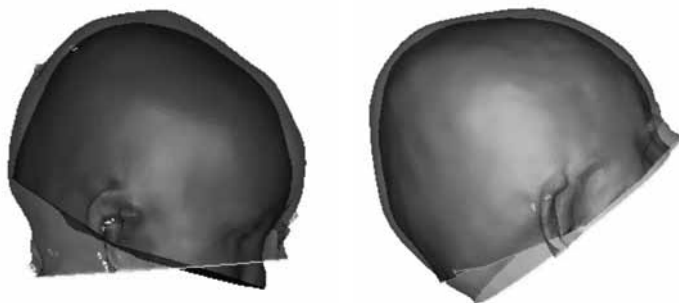


Rys. 3. Porównanie kształtu modeli i kształtu głowy dzieci

Skaner generuje dane w postaci wirtualnych powierzchni będących fragmentami modelu głowy. Każdy z fragmentów jest odwzorowaniem części powierzchni badanego obiektu widzianym przez jedną z kamer. Odpowiednie przetworzenie tych danych pozwala na utworzenie pełnego modelu głowy a także wykonanie jego pomiarów antropometrycznych.

Tak utworzone modele poddaje się weryfikacji jakościowej poprzez porównanie kształtu modelu z kształtem głowy dziecka (Rys. 2) oraz weryfikacji ilościowej poprzez porównanie obwodu głowy dziecka z obwodem wykonanego modelu. Podczas wykonanych badań otrzymano błąd procentowy wynoszący nie więcej niż 2%.

Opracowana metoda diagnozowania znalazła także zastosowanie przy monitorowaniu postępów leczenia. Umożliwia ona porównanie modeli głowy pacjenta wykonanych w odstępach czasowych, dzięki czemu uzyskuje się informację o kierunkach wzrostu głowy, oraz stanowi cenne wskazówki przy planowaniu dalszego leczenia.



Rys. 4. Porównanie kształtu modeli i kształtu głowy dzieci

3. Opracowanie konstrukcji kasku

Na podstawie badań wytrzymałościowych kości czaszki dzieci prowadzonych w Katedrze Biomechatroniki oraz po konsultacji z lekarzami dobrano optymalne cechy konstrukcyjne kasku. W programie Autodesk Inventor wykonano model konstrukcji kasku, który następnie poddano analizie numerycznej z wykorzystaniem metody elementów skończonych. Jako materiał do budowy kasku wykorzystano poliamid 66 i materiał ABS.

Po analizie wyników symulacji numerycznych zdecydowano się przeprowadzić optymalizację masy kasku. Warunki brzegowe zastosowano takie jak dla wcześniejszych analiz wytrzymałościowych. Wyniki symulacji zaprezentowano w postaci barwnych map przedstawiające nadmiar materiału konstrukcji korpusu. Całkowita masa korpusu przed optymalizacją wynosiła 0,381 kg, a 0,148 kg po optymalizacji. Stopień redukcji masy, jaki udało się uzyskać to 61% (0,233 kg nadmiaru masy). Wyniki te wskazują na błędne założenia projektowe, dlatego konstrukcję kształtu poddano modyfikacji.

Zmodyfikowaną konstrukcję kasku również poddano analizie numerycznej, w celu określenia własności wytrzymałościowych. Budowę kasku po optymalizacji przedstawiono na rysunku 6. W budowie ortezy wyróżnia się następujące elementy:

- korpus kasku – konstrukcja zasadnicza,
- materiał uzupełniający,
- otwór górny,
- nacięcie boczne,
- wycięcie na uszy,
- wyściółka-Pianka Plastazote®,
- otwory wentylacyjne,
- zapięcie.



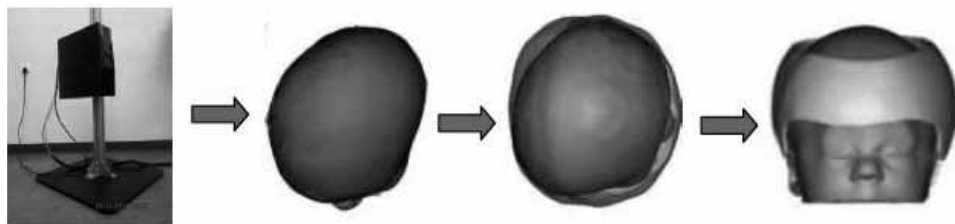
Rys. 5. Wynik optymalizacji masy kasku, kolor pomarańczowy ilustruje elementy, które można zredukować



Rys. 6. Koncepcja konstrukcji korpusu kasku przed i po optymalizacji

4. Produkcja kasku

W przypadku dzieci z wadami czaszki dużą rolę odgrywa dobór kształtu kasku dostosowany do wady pacjenta. W tym celu opracowano metodę wyznaczania poprawnego kształtu głowy dziecka na podstawie kształtu głowy zdeformowanej. Dane wejściowe dające pełną informację o kształcie głowy stanowią dane otrzymane podczas badania skanerem 3D. Na podstawie stworzonych w ten sposób modeli wyznacza się prawidłowy kształt głowy. Proces ten przeprowadzano w oprogramowaniu 3-matic firmy Materialise.



Rys. 7. Etapy projektowania kasku do korekcji kształtu czaszki

Model wzorcowy głowy otrzymuje się na podstawie przekroi wyznaczonych w odpowiednich płaszczyznach odbijając je symetrycznie. Na podstawie nowych, symetrycznych krzywych wyznacza się nową powierzchnię określającą prawidłowy kształt głowy. Otrzymany model można odpowiednio przeskalować uwzględniając prędkość wzrostu głowy dziecka w danym wieku. Konieczne jest porównanie obecnego modelu ze wzorcem głowy. Głowa i model wzorcowy powinny mieć przynajmniej dwie wspólne powierzchnie styku, jednak kask nie może uciskać głowy. Gwarantuje to stabilne osadzenie ortozy oraz zapewnienie komfortu pacjenta.



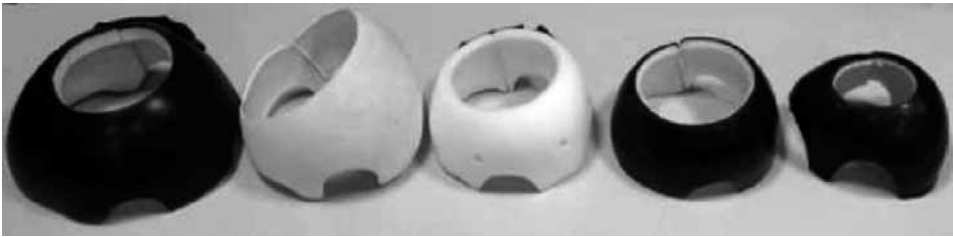
Rys. 8. Kolejne etapy wyznaczenia prawidłowego wzorca głowy

Opracowana konstrukcja kasku składająca się z dwóch warstw zewnętrznej twardej będącej konstrukcją nośną oraz wewnętrznej miękkiej, którą można modyfikować wraz ze wzrostem dziecka. Do wytworzenia korpusu kasku konieczne jest wcześniejsze wytworzenie modelu głowy dziecka odzwierciedlającego cechy antropometryczne. Model taki wykonuje się techniką CNC ze stopu aluminium.

Po wytworzeniu modelu wzorca głowy wykonuje się metodą termoformowania korpus kasku. Następnie wykonuje się termoformowanie korpusu kasku oraz warstwy piankowej, które są odpowiednio docinane tak aby uzyskać porządną kształt. Ostatni etap produkcji stanowi wykonanie otworów wentylacyjnych, dodanie zapięcia oraz dodanie warstwy wyścielającej z materiału technicznego.



Rys. 9. Schematyczne przedstawienie budowy kasku



Rys. 10. Wykonane prototypy kasku

Podsumowanie

W ramach pracy przeprowadzono kompleksowy proces projektowania kasku do korekcji kształtu głowy dziecka zakończony wykonaniem prototypu. Opracowana nieinwazyjna metoda korekcji wad kształtu głowy u dzieci jest odpowiedzią na potrzeby społeczeństwa zasygnalizowane przez lekarzy z Górnośląskiego Centrum Zdrowia Dziecka, mającą wypełnić lukę w zaopatrzeniu medycznym na rynku polskim.

Kluczowe znaczenie w procesie projektowania odegrał indywidualny dobór konstrukcji kasku dla konkretnego pacjenta. Ze względu na uniwersalną metodę określania planowanego poprawnego kształtu czaszki orteza może być stosowana do różnego rodzaju wad kształtu głowy.

Wykonane symulacje numeryczne pozwoliły na uzyskanie optymalnej konstrukcji kasku. Niska masa kasku oraz odpowiednia sztywność kasku stanowią o komforcie noszenia oraz jakości procesu leczenia. Na uwagę zasługuje również fakt zastosowania unikalnego w skali europejskiej systemu wentylacji oraz warstwy wyścielającej pozwalającej na odprowadzenie wilgoci.

Opracowana metoda wspomagająca korekcję wad kształtu czaszki u dzieci przy użyciu kasku kształtującego jest innowacyjnym rozwiązaniem mogącym przyczynić się do rozwoju kranioplastyki. Uzyskanie dalszych informacji o skuteczności leczenia wymaga czasu i rozważenia większej liczby przypadków klinicznych.



Rys. 11. Pacjenci w kaskach do korekcji kształtu głowy

Streszczenie

Plagiocefalia ułożeniowa dotyka około 3% populacji, w poważniejszych przypadkach dochodzi do ucisku czaszki na mózg. Badania naukowe dowiodły że wpływa to niekorzystnie na rozwój psycho-ruchowy. W pracy opisano przeprowadzony proces projektowania ortezy – kasku do korekcji kształtu głowy. Przedstawiono metody diagnozowania wad, określono sposoby wyznaczania kształtu kasku indywidualnie dopasowanego dla pacjenta oraz dokonano optymalizację konstrukcji kasku.

Literatura

- [1] Blecher Ch. *Nicht nur Ästhetik! Kopfdeformitäten bei Kindern*, 'Face'(30–33), 1/2009.
- [2] D'Apuzzo N., Mitchell H., *Advances in Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information*, rozdział 31 Medical application, ISPRS Congress Book – Li, Chen & Baltsavias, Sciences: 2008.
- [3] D'Apuzzo N., *Three-Dimensional Image Capture and Applications VI*, Proc. of SPIE-IS&T Electronic Imaging, SPIE Vol. 6056, San Jose (CA), USA.
- [4] Krabowski K., *Podstawy rekonstrukcji maszyn i innych obiektów w procesach wytwarzania*, Kraków 2008.
- [5] Lindsay K. W., Bone I., *Neurologia i Neurochirurgia*. Wyd. Elsevier Urban & Partner. Wrocław, 2003. ISBN 978–83–89581–29–7.
- [6] Speltz M. L. *Case-Control Study of Neurodevelopment in Deformational Plagiocephaly*, *Pediatrics* Vol. 125 No. 3 March 1, 2010.
- [7] Wolański W., Larysz D., Gzik M., Kawlewska E., *Komputerowe metody wspomagania leczenia kraniostenozji*, Modelowanie Inżynierskie, 2011.

Badania mikrobiologiczne bioaktywnych proszków nanodiamentowych modyfikowanych chemicznie

Katarzyna Mitura****, Iwona Gisterek****, Przemysław Ceynowa*, Artur Wachowicz*, Grzegorz Pich**, Renata Woś***, Kinga Adach***

Summary

Nanodiamond particles manufactured by detonation method has very high biological bioactivity in contact with living organism. The grain size of diamond nanoparticles are from 4 to 20 nm. The detonation nanodiamond contains sp^3 bonds, sp^2 bonds and another functional group on the nanoparticles surface. The big amount of sp^3 diamond phase in detonation nanodiamond are responsible for biological bioactivity of diamond nanoparticles. The free bonds on the nanodiamond surface can be modified by different chemical groups. In this way we can receive the nanodiamond particles with controlled activity of the area. In this work detonation nanodiamond particles was chemically modified by Fenton reaction. The hydroxylation of nanodiamond surface caused the changing of bioactivity of it and possibility to attach the ampicillin. The results of these functionalisations was measured by FT-IR spectroscopy which proved the presence of hydroxyl groups and ampicillin on the surface of nanodiamond particles. Microbiological tests with chemically modified nanodiamond particles with ampicillin and non-modified nanodiamond particles with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Candida albicans* ATCC 10231 did not prove the anti-bacterial properties modified nanodiamond particles with ampicillin. The phenomenon of the fluorescence (based on calcium stress) was observed in presence of modified by Fenton reaction nanodiamond particles with ampicillin and pathogenic tribe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Keywords: nanodiamond particles, Fenton reaction, chemical modification, microbiological test, ampicillin

Nanodiametowe cząstki, wytwarzane metodą detonacyjną, posiadają bardzo wysoką bioaktywność biologiczną w kontakcie z żywym organizmem. Rozmiar ziaren wynosi od 4 do 20 nm. Detonacyjny nanodiamet zawiera wiązania sp^3 , sp^2 oraz inne grupy funkcyjne na powierzchni. Duża ilość fazy diamentowej w detonacyjnym nanodiamencie jest odpowiedzialna za biologiczną bioaktywność nanocząstek diamentowych. Wolne wiązania na powierzchni nanodiamentu mogą być zmodyfikowane różnymi grupami chemicznymi.

* Instytut Technologii i Edukacji Politechniki Koszalińskiej

** Międzynarodowe Centrum Onkoterapii, Koszalin

*** Instytut Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej

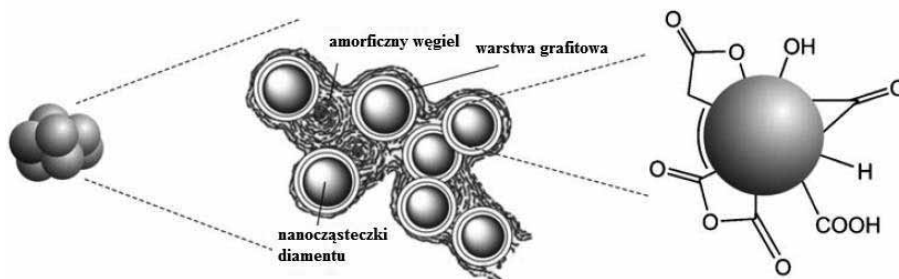
**** Instytut Technologii i Edukacji Politechniki Koszalińskiej, Międzynarodowe Centrum Onkoterapii, Koszalin.

***** Instytut Technologii i Edukacji Politechniki Koszalińskiej, Instytut Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej.

W ten sposób możemy otrzymać nanodiamentowe cząstki z kontrolowaną aktywnością powierzchni. W tej pracy detonacyjny nanoproszek diamentowy był chemicznie modyfikowany w reakcji Fentona. Hydroksylacja nanodiamentowej powierzchni spowodowała zmianę aktywności i możliwość przyłączenia ampicyliny. Rezultaty tych funkcjonalizacji były mierzone spektroskopią w podczerwieni – FT-IR, która potwierdziła obecność grup hydroksylowych i ampicyliny na powierzchni nanodiamentowych cząstek. Badania mikrobiologiczne z chemicznie modyfikowanymi nanodiamentowymi cząstkami z ampicyliną i niemodyfikowanymi nanocząstkami diamentu ze szczepami patogennymi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Candida albicans* ATCC 10231 nie potwierdziły antybakteryjnych właściwości zmodyfikowanych ampicyliną nanocząstek diamentowych. Zjawisko fluorescencji (oparte na stresie wapniowym) zaobserwowano w obecności zmodyfikowanych reakcją Fentona nanodiamentowych cząstek z przyłączoną ampicyliną, w obecności szczepu patogennego *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Wprowadzenie

Diament, oprócz grafitu i karbinów, jest jedną z odmian alotropowych węgla [2]. Nanocząstki diamentowe to cząsteczki pyłu mierzone w nanometrach i otrzymywane w dużej skali na drodze detonacji materiałów węglowych [2]. Technologie syntezy proszków węglowych, w tym diamentowych, różnią się między sobą wykorzystywanymi zjawiskami fizycznymi, rozwiązaniami technologicznymi, jak i możliwościami wdrożenia ich na skalę przemysłową [3, 4, 5]. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat nanodiamenty skupiają na sobie coraz większą uwagę, głównie ze względu na ich unikalne właściwości, dużą dostępność, a także możliwości licznych aplikacji, głównie biomedycznych. W chwili obecnej istnieje kilka koncepcji dotyczących metod syntezy proszków węglowych, które są wykorzystywane w postaci gotowych produktów komercyjnych. Obecnie w literaturze światowej znaleźć można kilkanaście metod ich syntezy [4, 6, 7, 8]. Największe znaczenie przemysłowe pośród metod syntezy proszków diamentowych mają zdecydowanie technologie detonacyjne. Proces otrzymywania nanodiamentów DND (ang. *detonation nanodiamond*), lub zamiennie UDD (ang. *ultradispersed diamond*), odbywa się w kilku etapach, a najczęściej stosowaną mieszaniną wybuchową jest układ trotyl/heksogen (TNT/RDX-1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazyna) w stosunku 60/40 lub 70/30. Jest to mieszanina o ujemnym bilansie tlenowym (zawartość tlenu niższa od wartości stechiometrycznej), dzięki czemu tlen całkowicie wiąże wodór do wody, a w procesie powstaje węgiel pierwiastkowy. Podczas detonacji powstają cząstki diamentu o średnicy kilku nanometrów. Materiał uzyskiwany w procesie detonacji to szary proszek o wielkości ziaren w zakresie od 4 do 20 nm. Rozmiar tych cząsteczek zależy od kilku czynników doświadczalnych oraz od warunków termodynamicznych. Nanodiamenty otrzymywane w procesie detonacji składają się z rdzenia diamentowego sp^3 , warstwy fazy węgla sp^2 oraz różnych grup funkcyjnych na powierzchni (Rys. 1). W związku z tym dowiedziono, że na powierzchni w wyniku różnych modyfikacji możliwe jest utworzenie wielu wiązań kowalencyjnych [9, 10, 11].



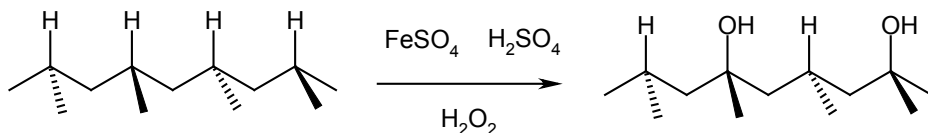
Rys. 1. Struktura detonacyjnego nanodiamentu i powierzchniowe grupy funkcyjne (według [9], zmodyfikowany)

Nanodiamenty posiadają rozwiniętą powierzchnię właściwą, którą można modyfikować przy zastosowaniu różnego typu reakcji chemicznych. Zdolność nanoproszków diamentowych do łączenia się z wieloma grupami organicznymi pozwala przede wszystkim na przyłączanie biomolekuł do ich powierzchni. Idealna cząsteczka nanodiamentu, oprócz wysokiej kompatybilności z układami biologicznymi, powinna charakteryzować się również niską toksycznością oraz zdolnością powierzchni do łączenia się z wieloma grupami organicznymi – biomolekułami (antybiotykami) – w celu uzyskania nowych właściwości. Oczyszczanie polega na usunięciu z badanego materiału różnego rodzaju zanieczyszczeń powstałych w detonacyjnym procesie ich otrzymywania. Oczyszczanie nanokrystalicznego diamentu oparte jest na fakcie, iż węgiel w postaci diamentu oraz inne jego odmiany mają różne odporności na działanie substancji utleniających. W procesie oczyszczania stosuje się utleniacze, aby usunąć metaliczne wtrącenia i węgiel o hybrydyzacji sp^2 . Wynikiem operacji oczyszczania jest uzyskanie na powierzchni wiązań węgiel-wodór (C-H), do których można przyłączać kolejne grupy organiczne. Reakcje te przeprowadzone są z użyciem mocnych kwasów mineralnych, m.in. kwasu siarkowego, kwasu azotowego oraz kwasu trifluorometanosulfonowego (użytego pierwszy raz w tego typu reakcjach). Utlenienie powierzchni nanodiamentu, czyli uzyskanie jak największej liczby grup hydroksylowych (-OH) na jego powierzchni, jest kolejnym etapem syntezy. Tak zmodyfikowany nanoproszek diamentowy pozwala na przyłączanie w kolejnych etapach syntezy do jego powierzchni różnych grup funkcyjnych, w tym również antybiotyków (antybiotyki przyłączone do powierzchni nanodiamentu poprzez łączniki alkilowe i aryłowe). Efektem końcowym jest taka funkcjonalizacja powierzchni, która umożliwi biologiczne aplikacje nanodiamentów (bioaktywny bionośnik). Należy podkreślić, że nanodiament w badaniach na poziomie molekularnym wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [1].

Materiały i metody

W literaturze omówionych jest szereg modyfikacji, prowadzących do utworzenia różnego rodzaju grup funkcyjnych. Przeprowadzono reakcję Fentona na proszku nanodiamentowym, sprawdzając reaktywność chemiczną nanoproszków i uzyskano pozytywny wynik funkcjonalizacji.

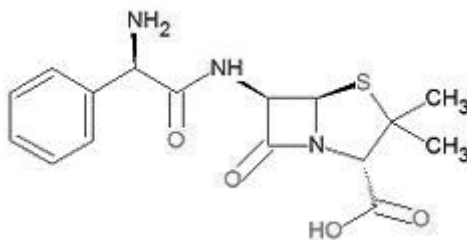
1. Reakcja Fentona to reakcja nadtlenu wodoru z jonem żelaza (II), będąca metodą wytwarzania rodnika hydroksylowego. W wyniku tej reakcji na powierzchni nanodiamentu zostają utworzone grupy hydroksylowe (-OH) (rys. 2). Mogą one następnie służyć jako miejsce nowych modyfikacji dla wiązań kowalencyjnych łańcuchów alkilowych lub pierścieni aromatycznych [12].



Rys. 2. Schemat reakcji Fentona

Do kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne, odważono 0,5 g nanoproszku diamentowego i zalano wodą destylowaną (25 ml), a następnie wymieszano z siarczanem żelaza (10 g). Po całkowitym rozpuszczeniu soli żelaza, do zawiesiny powoli wkraplano kwas siarkowy (15 ml) i wodę utlenioną (10 ml), chłodząc kolbę w łaźni lodowej. Jest to reakcja egzotermiczna, podczas której wydzielal się dwutlenek węgla. Tak otrzymaną zawiesinę mieszano w temperaturze 5°C, a następnie wprowadzano kilkakrotnie do wanny ultradźwiękowej. W ciągu 12-dniowego procesu zawiesinę mieszano i sonikowano. Po upływie 12 dni otrzymany osad odsączono (przy użyciu sączka karbowanego) i przemyto wodą destylowaną aż do uzyskania obojętnego odczynu oraz 5% roztworem EDTA w celu skompleksowania jonów Fe^{2+} . Otrzymany proszek wysuszono.

2. Przyłączenie ampicyliny do nanoproszku diamentowego, zmodyfikowanego reakcją Fentona.



Rys. 3. Struktura ampicyliny [13]

Ampicylina jest organicznym związkiem chemicznym z grupy aminopenicillin, zaliczanych do antybiotyków bakteriobójczych β -laktamowych. Aktywność antybakteryjna antybiotyków β -laktamowych jest wynikiem blokowania aktywności enzymów bakteryjnych – transpeptydaz (PBP) biorących udział w ostatnim etapie syntezy proteoglikanu ściany komórki bakteryjnej. Dzięki odpowiedniej strukturze chemicznej (rys. 3), w której obecny jest łańcuch D-alanylo-D-alaninopodobny, antybiotyki β -laktamowe dezaktywują

ją enzym transpeptydazę, hamując w ten sposób tworzenie muraminy (budulca ściany komórkowej) [14].

Antybiotyki β -laktamowe potrafią również unieczynniać inhibitory hydrolaz wytwarzane przez komórki bakteryjne, co nasila procesy autolityczne i osłabia inwazyjność bakterii. Znacznym problemem w terapii antybiotykami β -laktamowymi jest wykształcanie przez drobnoustroje oporności na te leki. Najczęściej przyczyną tej oporności jest wytwarzanie przez bakterie enzymów zwanych β -laktamazami (np. penicylinaz), które rozkładają antybiotyki należące do określonej grupy β -laktamów [13]. W porównaniu do penicylin naturalnych, ampicylina jest od dwóch do pięciu razy mniej skuteczna w stosunku do bakterii gramdodatnich, ale 10-krotnie bardziej w stosunku do gramujemnych (m.in. *Escherichia coli* i *Proteus species*). Ampicylina dobrze przenika do większości tkanek i płynów ustrojowych. Wysokie stężenia osiąga w moczu, żółci, w płynach jamy opłucnowej, jamy otrzewnowej, płynie osierdziowym i w płynie stawowym. Przenika również do wód płodowych i płodu. W niewielkich ilościach lek przenika również do mleka matki. W płynie mózgowo-rdzeniowym ampicylina osiąga stężenia terapeutyczne tylko w stanie zapalnym. W około 20% wiąże się z białkami osocza. Po podaniu parenteralnym (pozajelitowym) 60–80% dawki leku wydalane jest przez nerki w niezmienionej postaci. W niewielkim stopniu ampicylina wydalana jest z żółcią.

Do fiołki odważono 100 mg (0,28 mmol) ampicyliny w postaci soli sodowej, rozpuszczono w 1,5 ml DMF, a następnie dodano 50 mg (0,43 mmol) N-hydroksysuccinimidu. Do tak przygotowanego roztworu wdroplono 0,14 ml (0,80 mmol) N,N-diizopropylotyloaminy. Tak przygotowaną mieszaninę sonikowano przez kilka minut. Następnie do 50 mg nanoproszku diamentowego zmodyfikowanego w reakcji Fentona, zalanego DMF, dodano wcześniej przygotowany antybiotyk – ampicylinę. Mieszaninę sonikowano kilkakrotnie, a następnie umieszczono ją w mikrofali na 15 sek. Zawiesinę pozostawiono na 12 godzin, a następnie przesączono na lejku karbowanym i przemyto kilkakrotnie wodą.

3. Badanie FT-IR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) proszków nanodiamentowych.

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera FT-IR dostarcza informacji na temat budowy chemicznej analizowanych związków poprzez identyfikację grup funkcyjnych oraz analizę widm w zakresie „odcisku palca” (ang. *fingerprint*). W badaniu tym próbka jest naświetlana promieniowaniem w zakresie podczerwieni (1000–20 000 nm). Widma absorpcji w podczerwieni FT-IR zostały wykonane na spektrofotometrze NEXUS FT-IR, a położenie pasm absorpcji wyrażono w cm^{-1} . Pomiary prowadzono w zakresie 500–4000 cm^{-1} , każdorazowo wykonywano 16 skanów w rozdzielczości 4 cm^{-1} . Badania przeprowadzono w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Łódzkiego. Badanie to pozwoliło na określenie grup funkcyjnych, znajdujących się na powierzchni nanoproszków diamentowych.

4. Badania mikrobiologiczne nanoproszków diamentowych.

Badanie wykonano w Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badania wykonano na komórkach bakteryjnych i grzybiczych:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – pałeczka ropy błękitnej,
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – gronkowiec złocisty,
- *Escherichia coli* ATCC 8739 – pałeczka okrężnicy,
- *Candida albicans* ATCC 10231 – drożdżak.

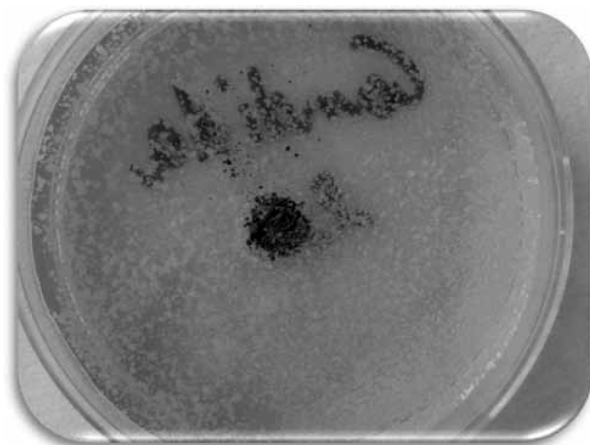
Czystość mikrobiologiczną proszków kontrolowano poprzez wysiew do bulionu Muellera Hintona po 0,01 g badanego proszku.

Hodowlę prowadzono w temp. 20°C, przez okres 72 godzin. Po tym czasie wysiano z bulionu na płytki z agarem odżywczym po 1 ml z hodowli nierozcieńczonej oraz z kolejnych rozcieńczeń: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Płytki inkubowano w temperaturze 20°C przez 72 godziny.

Badane proszki były mikrobiologicznie czyste.

Następnie sprawdzano wzrost szczepów wzorcowych w obecności nanoproszku diamentowego, nanoproszku diamentowego z grupami hydroksylowymi i proszku nanodiamentowego zmodyfikowanego reakcją Fentona, do którego następnie przyłączono ampicylinę. Szczepy wysiano tak, by uzyskać na powierzchni gęsty wzrost z widocznymi poszczególnymi koloniami. Na podłożu stałym, z podłożem agarowym Muellera Hintona, wysiano szczepy wzorcowe: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, natomiast na płytce z podłożem agarowym Saburouda wysiano szczep *Candida albicans*.

Na środek płytki naniesiono badane proszki. Inkubowano je 48 godzin w temperaturze 37°C.



Rys. 4. Zdjęcie próbki (płytki z wysianymi szczepami)

Na podłożu płynnym hodowlę bakterii wzorcowych prowadzono w bulionie Muellera Hintona, a szczepu *Candida albicans* w bulionie Saburouda. Badane proszki dodano w ilości 0,1% podłoża. Inkubację prowadzono 20 dni w temperaturze 37°C. Gęstość hodowli

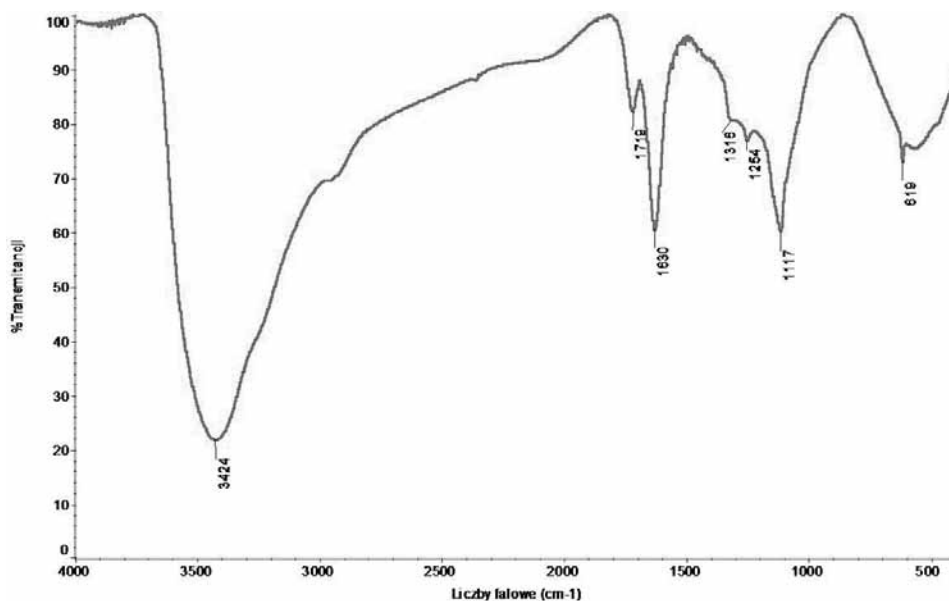
sprawdzano po 24 godzinach oraz po 5, 7 i 20 dniach inkubacji. W tym celu z każdej probówki z hodowlą drobnoustroju pobierano po 1 ml i przenoszono do probówek z 9 ml soli fizjologicznej. W ten sposób uzyskiwano rozcieńczenie 10^{-1} , z którego wysiewano po 1 ml na dwie płytki z agarem odżywczym. Przenosząc 1 ml z rozcieńczenia 10^{-1} do 9 ml soli otrzymywano kolejne rozcieńczenie 10^{-2} i tak kolejno do rozcieńczenia 10^{-6} . Z każdego rozcieńczenia wysiewano na dwie płytki agarowe, które inkubowano 48 godzin w temperaturze 37°C . Po tym czasie liczono wyrosłe na płytkach kolonie.

Wyniki

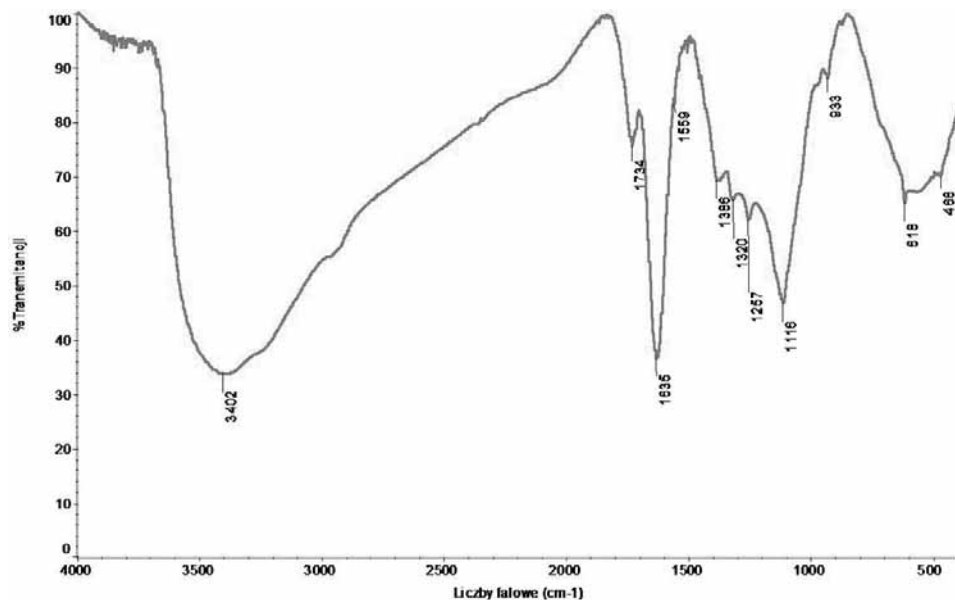
Wyniki modyfikacji chemicznej w badaniu FT-IR.

Za pomocą analizy widm w podczerwieni (metoda FT-IR) udowodniono obecność grup hydroksylowych na powierzchni proszku po modyfikacji chemicznej reakcją Fentona (rys. 6, 7), w porównaniu z nanoproszkiem diamentowym niemodyfikowanym chemicznie (rys. 5). Intensywność pików około 3423 cm^{-1} koresponduje z grupami hydroksylowymi na powierzchni proszku nanodiamentowego (hydroksylacja powierzchni proszku nanodiamentowego). Obserwuje się także pojedyncze wiązanie C-O, około $1124\text{--}1205\text{ cm}^{-1}$ intensywności pików. Jest to dowód obecności grup hydroksylowych na powierzchni nanoproszku diamentowego po reakcji Fentona (rys. 6, 7).

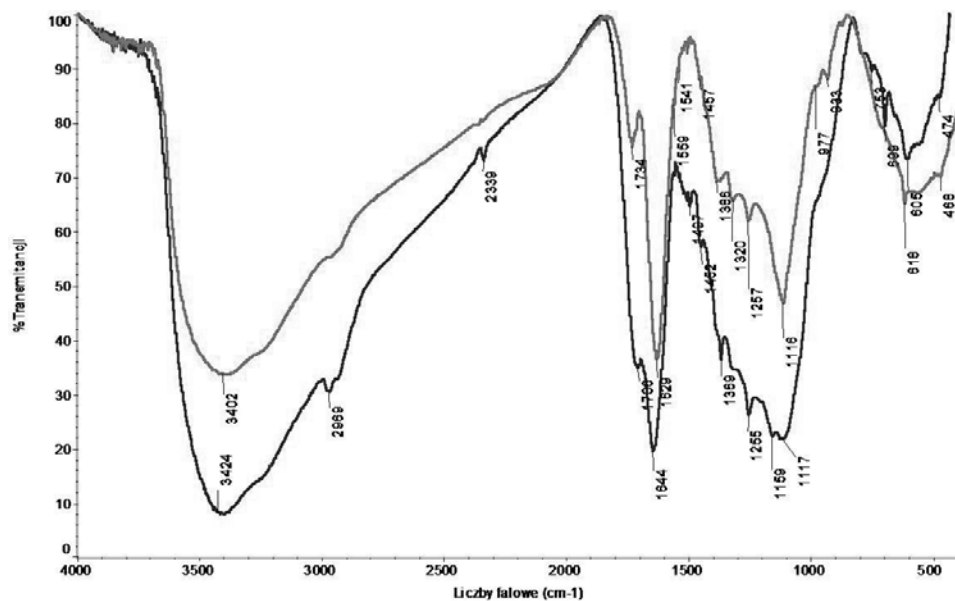
Analiza widma FT-IR na rysunku 7 pokazuje przyłączoną ampicilinę do powierzchni zmodyfikowanego chemicznie reakcją Fentona nanoproszku diamentowego.



Rys. 5. Widmo FT-IR nanoproszku diamentowego wytwarzanego metodą detonacyjną



Rys. 6. Widmo FT-IR proszku nanodiamentowego wytwarzanego metodą detonacyjną po reakcji Fentona (hydroksylacja powierzchni proszku nanodiamentowego)



Rys. 7. Porównawcze widma FT-IR proszku nanodiamentowego po modyfikacji w reakcji Fentona i proszku nanodiamentowego po modyfikacji w reakcji Fentona z przyłączoną ampicyliną

Wyniki badań mikrobiologicznych.

W żadnym przypadku nie zaobserwowano hamowania wzrostu ani kumulacji komórek drobnoustrojów. Proszki: nanodiamentowy, nanoproszek diamentowy po reakcji Fentona (grupy hydroksylowe na powierzchni) oraz nanoproszek diamentowy zmodyfikowany reakcją Fentona, do którego została przyłączona ampicylina, były obojętne wobec badanych mikroorganizmów (tab. 1, 2).

Nie zaobserwowano fluorescencji w obecności pozostałych badanych patogenów z nanoproszkami diamentowymi (rys. 8).

Zaobserwowano wyraźne wydzielanie fluoresceiny przez szczepy *Pseudomonas aeruginosa* w obecności nanoproszku diamentowego zmodyfikowanego reakcją Fentona z przyłączoną ampicyliną (rys. 9).

Tabela 1. Wzrost drobnoustrojów na bulionie czystym

Drobnoustroje testowe	Liczba drobnoustrojów jtk/ml				
	Początkowa liczba drobnoustrojów jtk/ml	24h	5 dni	7 dni	20 dni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC9027)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> (ATCC8739)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹
<i>Candida albicans</i> (ATCC10231)	10 ³	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸

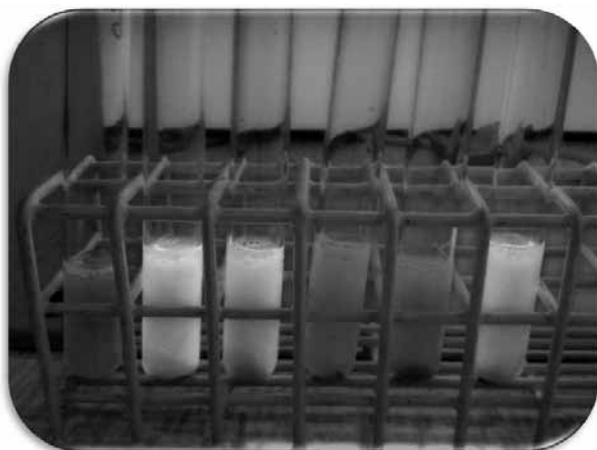
Tabela 2. Wzrost drobnoustrojów na bulionie z nanoproszkami diamentowymi niezmodyfikowanymi, zmodyfikowanymi chemicznie Fentonem i zmodyfikowanymi reakcją Fentona z przyłączoną ampicyliną.

Drobnoustroje testowe	Liczba drobnoustrojów jtk/ml				
	Początkowa liczba drobnoustrojów jtk/ml	24h	5 dni	7 dni	20 dni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC9027)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> (ATCC8739)	10 ³	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹
<i>Candida albicans</i> (ATCC10231)	10 ³	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸

W badaniu ze szczepem *Pseudomonas aeruginosa*, w bulionie w obecności nanoproszku diamentowego zmodyfikowanego reakcją Fentona z przyłączoną ampicyliną, widać zieloną fluoresceinę. Jest to barwnik prawdopodobnie wytwarzany przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* na skutek stresu wapniowego pod wpływem obecności proszku nanodiamentowego z ampicyliną. Barwnik ten świeci w świetle lampy UV. Z upływem czasu w podłożu gromadziło się coraz więcej fluoresceiny (Rys. 9).



Rys. 8. Zdjęcie proszków nanodiamentowych zmodyfikowanych chemicznie Fentonem oraz z przyłączoną ampicyliną po 20 dniach hodowli ze szczepem *Candida albicans*



Rys. 9. Zdjęcie proszku nanodiamentowego zmodyfikowanego reakcją Fentona z przyłączoną ampicyliną po 20 dniach hodowli ze szczepem *Pseudomonas aeruginosa*

Wnioski

1. Proszek diamentowy wytworzony metodą detonacyjną można poddać modyfikacji reakcją Fentona i uzyskać bioaktywny proszek do dalszych modyfikacji chemicznych.
2. Możliwe jest przyłączenie ampicyliny do proszku zaktywowanego reakcją Fentona (zmiana właściwości powierzchni proszku – hydroksylacja powierzchni).
3. Po przeprowadzeniu badań mikrobiologicznych w celu weryfikacji aktywności biologicznej zmodyfikowanych proszków nanodiamentowych antybiotykiem szerokowidmowym (ampicyliną), nie udowodniono hamowania wzrostu badanych

- szczepów drobnoustrojów patogennych *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – pałeczka ropy błękitnej, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – gronkowiec złocisty, *Escherichia coli* ATCC 8739 – pałeczka okrężnicy, *Candida albicans* ATCC 10231 – drożdżak, w porównaniu do proszków niezmodyfikowanych chemicznie.
4. Zaobserwowano zjawisko fluorescencji w obecności proszku nanodiamentowego zmodyfikowanego Fentonem z przyłączoną ampicyliną w obecności szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Literatura

- [1] Bakowicz-Mitura K., Bartosz G., Mitura S., *Influence of Diamond Powders Particles on human gene expression*, Surf.Coat.Tech., 201, 6131–6135, 2007.
- [2] Dolmatov V. Y., *Detonation synthesis ultradispersed diamonds: properties and applications*, Russian Chemical Reviews, 70, 607, 2001.
- [3] Shenderova O. A., Zhirnov V. V., Brenner D. W., *Carbon Nanostructures*, Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, 27, 227–356, 2002.
- [4] Shenderova O.A., Gruen D.M., *Ultrananocrystalline Diamond Synthesis, Properties, and Applications*, William Andrew Publishing Norwich, New York, U.S.A., 2006,
- [5] Ho D., Beyond the sparkle: *The impact of nanodiamonds as biolabeling and therapeutic agents*, ACS Nano, 3, 3825–3829, 2009.
- [6] Shenderova O. A., S. A. Ciftan Hens, *Detonation Nanodiamond Particles Processing, Modification and Bioapplications, NANODIAMONDS. Applications in Biology and Nanoscale Medicine*, D. Ho (red.), Springer, New York 2010.
- [7] Spitsyn B., Derjaguin B., *Patent SSSR No. 339134*, 1980.
- [8] Danilenko V. V., *Synthesizing and sintering of diamond by explosion*, Energomizdat, 2003.
- [9] Krueger A., *The structure and reactivity of nanoscale diamond*, Journal of Materials Chemistry, 18 1485–1792, 2008.
- [10] Kruger A., Kataoka F., Ozawa M., Fujino T., Suzuki Y., Aleksenskii A. E., Vul A. Y., Osawa E., *Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: Identification and disintegration*, Carbon 43 1722–1730, 2005.
- [11] Krueger A., Lang D., *Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond*, Adv. Funct. Mater., 1–17, 2012.
- [12] Martin R. i in., *Fenton – Treated Functionalized Diamond Nanoparticles as Gene Delivery System* J. Am. Chem. Soc. NANO., 4, 65–74, 2010.
- [13] <http://en.citizendium.org/wiki/Ampicillin>
- [14] Kostowski W., Herman Z. S., *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. PZWL, Warszawa 2010.

Aminopeptydazy leucynowe z wybranych organizmów – znaczenie i zastosowania terapeutyczne

Joanna Tolarczyk*

Summary

Leucine aminopeptidases are members of hydrolases, the group of enzymes that cleave N-terminal residues from peptide chain. Leucine aminopeptidases (LAP) remove preferably Leu from the peptide substrate, but also other hydrophobic amino acids. LAPs are widely distributed among many living organisms, and they play crucial role in several physiological processes such as protein turnover, maturation and degradation, antigen presentation and metabolism of important peptides. However, functions of these enzymes are in many ways different in different species. For example in parasites LAP is responsible for catabolism of host hemoglobin, which is the main source of nourishment. Other functions are performed by LAP in human organism; control of pregnancy homeostasis is one of them. Leucine aminopeptidases play a vital role in various biological processes such as aging, HIV infection, cataract and cancer. Here we present a comparison of chosen functions, applications and substrate specificity of these enzymes from selected species of living organisms.

Keywords: enzyme, leucine aminopeptidase, substrate specificity

1. Wprowadzenie

Aminopeptydazy leucynowe, w skrócie LAP, należą do grupy hydrolaz katalizujących hydrolizę wiązań peptydowego N-końcowego aminokwasu w łańcuchu peptydowym. Enzymy te zawdzięczają swoją nazwę temu, że preferencyjnie katalizują hydrolizę N-końcowej leucyny, jednak w większości przebadanych gatunków roślin i zwierząt LAP mogą odszczepiać większość hydrofobowych aminokwasów [20]. Funkcje biologiczne LAP wciąż są badane, a liczne doniesienia świadczą o dużym znaczeniu tej grupy enzymów w organizmach żywych. W przedstawionej pracy omówiono specyficzność substratową LAP z wybranych królestw i reprezentujących je gatunków oraz najistotniejsze funkcje aminopeptydaz leucynowych pochodzących z roślin, bakterii i pasożytów, a także z organizmu człowieka. Wraz z omówionymi funkcjami przybliżono związane z nimi zastosowania w medycynie, zarówno wdrożone, jak i te w trakcie badań. Omówiono także potencjalne zastosowania LAP.

* Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii.

2. Specyficzność substratowa aminopeptydaz leucynowych

Cechą charakterystyczną enzymów jest ich specyficzność substratowa. Właściwość ta często decyduje o użyciu danego enzymu w celach przemysłowych. Istotą specyficzności substratowej dla aminopeptydaz jest zdolność do katalizowania hydrolizy wybranych aminokwasów. W pracy przedstawiono wybrane wyniki badań dotyczących specyficzności substratowej aminopeptydaz leucynowych. Dokładne określenie aktywności enzymów w odszczepianiu aminokwasów jest kluczowe w późniejszym wykorzystaniu ich w biotechnologii.

2.1. Specyficzność substratowa bakteryjnych aminopeptydaz leucynowych

Modelowym organizmem bakteryjnym jest *Escherichia coli*, czyli pałeczka okrężnicy. Jest to najlepiej poznany gatunek bakterii pod względem budowy, genetyki i metabolizmu. *E. coli* jest wykorzystywana w badaniach genetycznych, a także służy do celów przemysłowych (np. produkcja ludzkiej insuliny). Gatunek ten został również przebadany pod kątem aminopeptydaz leucynowych. W 2000 roku zmierzono aktywność LAP z *E. coli* wobec wybranych di- i tripeptydów. Najwyższą aktywność LAP z *E. coli* przejawiała wobec dipeptydów: Ala-Leu, Phe-Leu, Arg-Leu, Val-Leu i Arg-Ile. Niemal zerową aktywność enzymy te wykazały wobec Asp-Gly, Gly-Gly, Arg-Asp i Gly-Asn. Na podstawie wyników uzyskanych przez Gu i Walling można zauważyć, że peptydy z *N*-końcową glicyną są hydrolizowane w bardzo małym stopniu przez LAP z *E. coli*. W przypadku tripeptydów najlepsze wyniki otrzymano dla Leu-Gly-Gly, najniższą aktywność wobec przebadanych tripeptydów uzyskano dla Arg-Gly-Arg [9]. O przydatności danego gatunku bakterii w przemyśle decyduje w dużym stopniu jego termostabilność. Wiele badań, również tych dotyczących LAP, dotyczy gatunków termofilnych. Dlatego w tabeli 1 zebrano dane na

Tabela 1. Specyficzność substratowa wybranych bakterii termofilnych wobec aminokwasowych pochodnych p-nitroanilidu [7, 15, 17, 34, 36]

Substrat	Relatywna aktywność [%]			
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus kaustophilus</i>	<i>Geobacillus thermoleovorans 47b</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Leu-p-NA	100	100	100	100
Ala-p-NA	15,2	1,7	2,0	27
Lys-p-NA	37,8	-	5,0	68
Pro-p-NA	-	1,4	1,2	7
Arg-p-NA	46,3	-	56,3	-
Phe-p-NA	-	12	9,2	-
Met-p-NA	-	90	4,6	-
Gly-p-NA	-	2	1,3	-
Cys-p-NA	-	9,7	-	-
Val-p-NA	-	8	-	-
Asp-p-NA	-	0	-	-

temat relatywnych aktywności aminopeptydaz leucynowych z czterech różnych gatunków termofilnych bakterii, wobec aminokwasowych pochodnych *p*-nitroanilidu. We wszystkich rozpatrywanych przypadkach *p*-nitroanilid leucyny (Leu-*p*-NA) był stosowany jako substrat modelowy [7, 15, 17, 34, 36].

2.2. Specyficzność substratowa pasożytniczych aminopeptydaz leucynowych

Istnieje wiele badań dotyczących aminopeptydaz leucynowych z organizmów pasożytniczych. Dużą część doniesień stanowią te traktujące o pasożytach z rodzaju *Plasmodium*. Cztery główne gatunki z rodzaju *Plasmodium*, wywołujące malarię u ludzi, to: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* i *P. ovale* [16].

Gatunek *Plasmodium falciparum* jest odpowiedzialny za największą zgonów, szczególnie u ciężarnych kobiet i dzieci poniżej piątego roku życia. Dla LAP z pasożyta *P. falciparum* najlepszymi substratami są aminokwasy leucyna i tryptofan, a w następnej kolejności metionina i fenyloalanina [30]. *Plasmodium vivax* jest gatunkiem mniej wirulentnym niż *P. falciparum*. Specyficzność substratowa LAP z tego pasożyta została określona wobec fluorogenicznych aminokwasowych, pochodnych wodorotlenku 7-amido-4-metyloku-maryny (NHMeC). Najwyższą aktywność uzyskano dla pochodnej leucyny, następnie dla pochodnej tyrozyny, najniższą aktywność LAP z *P. vivax* uzyskano dla Arg-NHMeC [16].

Aminopeptydazy leucynowe były też badane w organizmach gatunków odpowiedzialnych za inne niż malaria pasożytnicze choroby krwi. W tej części pracy przedstawiono wybrane trzy przykłady tych organizmów.

Setaria cervi jest pasożytem wywołującym filariozę u bydła. Badano LAP tego pasożyta pod kątem specyficzności substratowej. Najlepsze wyniki uzyskano dla Leu-*p*-NA, nieco mniej niż połowę tej aktywności uzyskano dla Ala-*p*-NA. Dla pozostałych aminokwasowych pochodnych nitroanilidu, takich jak Glu-*p*-NA, uzyskano bardzo niską aktywność [29].

Toxoplasma gondii pasożytuje głównie na zwierzętach domowych, ptakach i ludziach. Specyficzność substratową LAP z *T. gondii* badano za pomocą zsyntetyzowanych fulo-rogenicznych substratów, aminokwasowych pochodnych 4-metylo-kumarylo-7-amidu (MCA). W odniesieniu do Leu-MCA jako modelowego substratu, aktywność LAP wobec Ala-MCA wyniosła około 21,6%, dla Arg-MCA ~11,4%, dla Pro-MCA i Phe-MCA uzyskano bardzo niskie relatywne aktywności [13].

Schistosoma mansoni jest jednym z gatunków pasożytów wywołujących schistosomatozę. LAP z *S. mansoni* preferencyjnie katalizuje hydrolizę aminokwasu leucyny, następnie przejawia pewną aktywność wobec tyrozyny i bardzo małą wobec alaniny. Aminopeptydazy leucynowe *S. mansoni* nie wykazały żadnej aktywności wobec proliny [22].

2.3. Specyficzność substratowa roślinnych aminopeptydaz leucynowych

W 1974 roku opublikowano badania Sopenańa i Mikoli, w których oznaczono aktywność aminopeptydaz leucynowych z kielkujących nasion jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). Specyficzność substratową zaprezentowano jako szybkość reakcji hydrolizy (wyrażonej w $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ białka) wybranych di- i tri-peptydów do wolnych aminokwasów. Najwyższe wartości, odpowiednio 168 i 146, otrzymano dla tripeptydów Leu-Gly-Gly oraz Met-Leu-Gly. Spośród dipeptydów największą szybkość reakcji uzyskano

dla Leu-Tyr (104) i dla Leu-Gly (86) [42]. LAP-N (neutralna aminopeptydaz leucynowa) z korzeni, łądyg i dojrzałych oraz wędnących liści pomidora (*Lycopersicon esculentum* Peto 238R and VFNT cherry) badano pod kątem specyficzności substratowej dla dziewięciu aminokwasowych pochodnych β -naftyloamidu (β -NAP). Aktywność enzymu wobec substratów porównywano do Leu- β -NAP (100%). Najwyższą aktywność zaobserwowano dla Met- β -NAP (140%) i Phe- β -NAP (110%). Niskie wartości uzyskano dla pochodnych argininy (39%), waliny (27%), izoleucyny (25%) i glicyny (20%). Najniższą aktywność LAP z pomidora wykazywały wobec Ser- β -NAP (6,8) i Pro- β -NAP (1,6) [48].

2.4. Specyficzność substratowa ssaczych aminopeptydaz leucynowych

Do najlepiej scharakteryzowanych aminopeptydaz leucynowych kręgowców należą te pochodzące z nerki wieprzowej i soczewki oka wołowego. LAP z soczewek wołowych były badane pod kątem hydrolizy substratów zawierających prolinę. Zespół Wiedreandersa opublikował w 1973 roku badania, w których dowodzi, że obecność proliny w miejscu P1' (drugi aminokwas od N-końca) powoduje zatrzymanie katalizy hydrolizy peptydu przez LAP [52].

Podatność na hydrolizę katalizowaną przez LAP z nerki wieprzowej silnie zależy od natury łańcucha bocznego aminokwasu. Dla aminokwasów z grupami hydrofobowymi szybkość hydrolizy jest przede wszystkim funkcją rozmiaru grupy hydrofobowej. Szybciej jednak zachodzi hydroliza związków z łańcuchami alifatycznymi niż z aromatycznymi. Jednocześnie stwierdzono, że związki o konfiguracji D, takie jak: amid D-leucyny, D-Leu-Gly czy D-Leu-L-Tyr, nie są substratami dla aminopeptydaz leucynowych. Na aktywność LAP z nerki wieprzowej silnie wpływa obecność aktywujących jonów manganu [40].

W 1990 roku badano aminopeptydazę wyodrębnioną z mózgu szczura. Na podstawie specyficzności substratowej zidentyfikowano ten enzym jako aminopeptydazę leucynową. Aminopeptydaza ta wykazywała najwyższą aktywność specyficzną wobec dipeptydu Leu-Leu, a w następnej kolejności wobec Phe-Leu. Najmniejsze zaś aktywności enzym ten wykazywał wobec substratów z proliną, znajdującą się na N-końcu substratu [49]. W organizmie człowieka można wyróżnić P-LAP, czyli łożyskową aminopeptydazę leucynową. Enzym ten ma zdolność katalizowania hydrolizy małych peptydów, zawierających na N-końcu strukturę pierścieniową, takich jak oksytocyna czy wazopresyna. P-LAP nie hydrolizuje jednak wszystkich tego typu hormonów, jest to zapewne spowodowane specyficznością substratową tego enzymu. Aktywność P-LAP zależy od aminokwasu znajdującego się w pozycji P1' i od wielkości całego peptydu. P-LAP katalizuje uwolnienie neutralnych i zasadowych aminokwasów z małych peptydów, takich jak angiotensyna II, somatostatyna czy neurokinina A [26].

2.5. Podsumowanie specyficzności substratowej LAP

Wspólnym mianownikiem specyficzności substratowej LAP organizmów przedstawionych powyżej jest jej zdolność do efektywnego katalizowania reakcji odszczepienia L-leucyny z łańcucha peptydowego. W większości przypadków hydrolizie ulega też metionina i w mniejszym stopniu aminokwasy hydrofobowe, takie jak walina, alanina, fenyloalanina czy tyrozyna. W wielu z rozpatrywanych przypadkach N-końcowa prolina

nie jest hydrolizowana przez aminopeptydazy leucynowe lub aktywność LAP wobec tego aminokwasu jest bardzo niska, mimo iż należy ona do aminokwasów hydrofobowych.

3. Znaczenie aminopeptydazy leucynowej w różnych organizmach żywych i możliwe zastosowania medyczne

3.1. Aminopeptydazy leucynowe w sytuacji zagrożenia

Rośliny

Większość scharakteryzowanych aminopeptydaz leucynowych wyodrębniono z roślin, takich jak: groszek, jęczmień, kukurydza i pszenica. Enzym ten bierze udział w degradacji i dojrzewaniu bioaktywnych białek i peptydów. Oprócz ogólnej roli w przemianie białek, roślinne aminopeptydazy leucynowe wykazują wzmożoną aktywność w obecności czynników stresujących i w sytuacji zagrożenia [2, 4, 10].

Przykładowo aktywność LAP znacznie rośnie po zadziałaniu na liście ziemniaka kwasem jasmonowym [11]. Kwas jasmonowy jest inhibitorem wzrostu i różnicowania się komórek roślin. Ilość białka i aktywność LAP w pomidorze rośnie w odpowiedzi na systeminę (hormon roślinny zaangażowany w odpowiedź na zranienie), jasmonian metylu, kwas abscysynowy, etylen, brak wody i zasolenie, a także w odpowiedzi na działanie kadmu [2, 4]. Aktywność LAP rośnie w korze i liściach oleandra w odpowiedzi na niską temperaturę (-8°C). Prawdopodobnie enzym ten wraz z innymi proteazami pozwala roślinie na aklimatyzację w niskiej temperaturze i zapobiega zamarzaniu [45]. Ponadto obecność LAP ma wpływ na organizmy roślinożerne. Wyciszenie genu LAP w roślinie psiance czarnej (*Solanum americanum*) powoduje intensywniejsze zjadanie liści przez larwy ćmy *Manduca sexta* [10].

Ludzie

Badania wykazały, że poziom LAP w organizmie ludzkim podnosi się w odpowiedzi na czynniki zagrażające zdrowiu. Już w latach 60' ubiegłego wieku pojawiły się doniesienia o diagnostycznym i prognostycznym znaczeniu wzrostu aktywności aminopeptydazy leucynowej we krwi podczas różnych chorób. Aktywność LAP wzrastała nawet trzykrotnie u pacjentów z nowotworem różnych organów wewnętrznych w porównaniu z pacjentami cierpiącymi na marskość wątroby, zastoinową niewydolność serca i inne choroby niezłośliwe [12, 28]. Zaobserwowano wzrost stężenia aminopeptydazy leucynowej we krwi osób, u których zdiagnozowano choroby autoimmunologiczną toczeń rumieniowaty układowy [12].

Badania wykazują, że LAP to dobry wskaźnik dla nowotworu złośliwego wątroby. Dowiedziono, że aminopeptydaza leucynowa stanowi lepszy wskaźnik funkcjonowania wątroby niż bilirubina, aminotransferaza asparaginowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT), gamma-glutamylotranspeptydaza (GGT), fosfataza alkaliczna (ALP) oraz stosunek AST/ALT i GGT/AST [8]. Wzrost ekspresji łożyskowej aminopeptydazy leucynowej (P-LAP) obserwowany jest w tkance raka jajnika [26, 47].

A-LAP (aminopeptydaza leucynowa z adipocytów) bierze udział w odpowiedzi na atak patogenów. A-LAP przygotowuje antygeny do prezentacji komórkom MHC klasy I. Przygotowywanie antygenów polega przede wszystkim na odpowiednim dostosowaniu

długości prezentowanych peptydów. Aby peptydy mogły być zaprezentowane komórkom MHC I, muszą mieć odpowiednią długość, czyli ok. 8–11 aminokwasów. 70% produktów opuszczających proteosom jest za krótkich, 15% jest odpowiedniej długości, a kolejne 15% jest za długich. Właśnie te ostatnie 15% staje się substratami dla A-LAP [47]. Aktywność aminopeptydaz leucynowych rośnie w sytuacji zagrożenia zarówno u roślin, jak i w organizmie ludzkim. Ludzkie LAP biorą udział w odpowiedzi na atak patogenów, a aktywność LAP rośnie w przypadku wystąpienia zmian nowotworowych.

3.2. Aminopeptydazy leucynowe w regulacji hormonalnej i utrzymaniu homeostazy

Jak zostało wspomniane, LAP mają zdolność do katalizowania hydrolizy *N*-końcowych aminokwasów niektórych małych peptydów hormonalnych.

Utrzymanie homeostazy ciąży

Łożyskowa aminopeptydaza leucynowa (P-LAP) to jedyny enzym mający zdolność dezaktywacji oksytocyny i wazopresyny. P-LAP degraduje pierścieniową strukturę oksytocyny, katalizując hydrolizę wiązania peptydowego pomiędzy cysteiną i tyrozyną, a następnie odszczepia kolejne aminokwasy od *N*-końca [24]. Wzmoczone wydzielanie oksytocyny powoduje silny skurcz macicy i przyspieszoną akcję porodową. Natomiast duże dawki wazopresyny obkurczają błonę mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a także macicy i przewodu pokarmowego. P-LAP pełni zatem kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy ciąży. Enzym ten chroni przed przedwczesnym porodem [26, 47].

Poziom P-LAP zmienia się podczas trwania ciąży. W pierwszym trymestrze poziom LAP jest stosunkowo niski i niezmienny, natomiast w drugim i trzecim trymestrze stopniowo wzrasta, a następnie spada gwałtownie po porodzie. Enzym jest syntetyzowany jako integralne białko membranowe i uwalniany do krwi pod wpływem czynników fizjologicznych [26, 47].

Regulacja ciśnienia krwi

Wykazano, że A-LAP ma zdolność do katalizowania hydrolizy Angiotensyny II (Ang II), przez co wpływa na obniżenie ciśnienia krwi, a także pośrednio na angiogenezę. Ang II indukuje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). A-LAP konwertuje również kallidynę w bradykininę przez katalizowanie hydrolizy lizyny, znajdującej się na *N*-końcu kallidyny. Zarówno kallidyna, jak i bradykinina należą do kinin, hormonów tkankowych wpływających na ciśnienie krwi. Bradykinina powoduje rozszerzenie się naczyń krwionośnych, co w efekcie wpływa na zmniejszenie ciśnienia krwi [23, 50].

P-LAP posiada natomiast zdolność do katalizowania hydrolizy Angiotensyny III do Angiotensyny VI przez odłączenie argininy. Ang III posiada ok. 40% aktywności Ang II. Pomimo wcześniejszego przekonania, że działanie P-LAP ogranicza się jedynie do łożyska, udowodniono obecność tego enzymu także w innych tkankach. Prawdopodobnie P-LAP wpływa na kontrolę ciśnienia krwi nie tylko u ciężarnych kobiet [23].

Degradacja neuropeptydów

W 2001 roku wykryto obecność P-LAP w ludzkim mózgu. Aminopeptydazy te wykazały zdolność do katalizowania degradacji takich neuropeptydów, jak Met-enkefalina i dynorfina A. Wyniki badań sugerują, że P-LAP odgrywa ważną rolę w regulacji działania komórek neuronalnych [21].

3.3. Aminopeptydazy leucynowe w procesach zjadliwości *S. aureus* i w infekcji wirusa HIV

W mikroorganizmach LAP jest niezbędny dla przeżycia bakterii gram-ujemnych oraz uczestniczy w procesie patogenezы. W przypadku *Staphylococcus aureus* (bakteria gram-dodatnia), szczególnie niebezpiecznego w przypadku zakażeń wewnątrzszpitalnych, do czynników zjadliwości zaliczyć można duże rodziny egzotoksyn i proteaz wydzielanych na zewnątrz komórek bakterii. Egzotoksyny ułatwiają postęp choroby, natomiast proteazy pomagają w katabolizmie protein zewnątrzkomórkowych i wspomagają przetrwanie bakterii w niesprzyjających warunkach. Wewnątrzkomórkowa LAP, wspomaga zjadliwość tych bakterii i pozwala im na dłuższe przeżycie w komórkach ludzkich makrofagów. Mutant *S. aureus* z wyciszonym genem pepZ, kodującym wewnątrzkomórkową LAP, wykazywał się osłabioną infekcyjnością [3, 5, 35, 37].

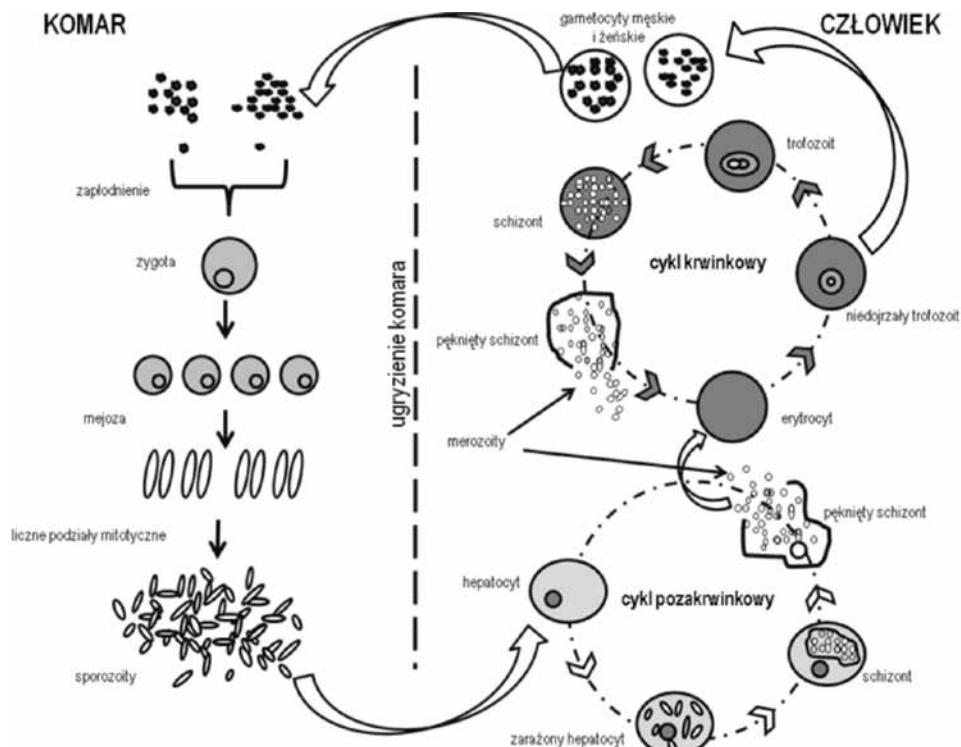
Zewnątrzkomórkowa LAP *S. aureus* bierze udział w tworzeniu się biofilmu, co z kolei wpływa na zwiększoną lekooporność tych mikroorganizmów. Dlatego też antybiotyki skierowane przeciwko temu enzymowi mogłyby przyczynić się do ograniczenia ilości zakażeń wewnątrzszpitalnych [3, 5, 35, 37].

Jak donoszą opublikowane w 1997 roku badania, zarówno wewnątrzkomórkowa, jak i zewnątrzkomórkowa aminopeptydaza leucynowa znacznie zwiększa infekcyjność wirusa HIV. Bestatyna, będąca popularnym inhibitorem metalopeptydaz, efektywnie inhibuje wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe LAP, przez co znacznie zmniejsza infekcyjność wirusa. Natomiast wysokie stężenie LAP w krwi pacjentów zarażonych wirusem HIV może stanowić marker diagnostyczny infekcji. Jak wynika z przeprowadzonych przez Pulido-Cejudo i współpracowników doświadczeń, aminopeptydaza leucynowa ma duże znaczenie w początkowych stadiach infekcji wirusem HIV [28].

3.4. Aminopeptydazy leucynowe – znaczenie w organizmach pasożytów

W organizmach pasożytów aminopeptydaza leucynowa bierze udział w trawieniu hemoglobiny gospodarza, dzięki czemu wolne aminokwasy dostarczane są pasożytowi jako źródło pożywienia, pozwalając mu na wzrost i rozwój [41].

W dzisiejszych czasach obserwuje się rozprzestrzenianie się pasożytów odpornych na popularne środki przeciw pasożytnicze, takie jak chlorochina (lek przeciw malarii). Dlatego też ważne jest opracowanie nowych leków przeciwko chorobom pasożytniczym. LAP pasożytów charakteryzuje się małym podobieństwem strukturalnym i biochemicznym w porównaniu do analogów tych enzymów w organizmie gospodarza, stanowi zatem dobry cel w terapii przeciw pasożytniczej. Ponadto enzym ten pełni istotną rolę w anabolizmie pasożyta. Inhibitory pasożytniczej LAP mogą w przyszłości posłużyć za leki na takie choroby pasożytnicze, jak malaria, filarioza limfatyczna (znana jako słońiowacizna), faszjozoza, schistosomatoza i toxoplasmoza [6, 38, 39]. Bestatyna, będąca inhibitorem aminopeptydaz, wykazuje działanie antymalaryczne w warunkach *in vitro*, szczególnie w stadium trofozoitu. Cykl życiowy pasożyta *Plasmodium falciparum*, wywołującego malarię, przedstawiono na rysunku 1. Używając bestatyny jako odniesienia wykazano, iż działanie inhibicyjne mają także fosfinowe analogi bestatyny. Wykazywały one lepsze powinowactwo do enzymu [6, 38, 39, 43].



Rys. 1. Cykl życiowy pasożyta wywołującego malarię [53, 54, 55]

4. Możliwe zastosowania LAP w biotechnologii

LAP z *Vibrio proteolyticus* (inaczej *Aeromonas proteolytica*) znalazła zastosowanie w usuwaniu N-końcowych aminokwasów rekombinowanych białek. Przykładem zastosowania enzymu z *V. proteolyticus* jest usuwanie metioniny z interferonu alpha-2b. Hydroliza metioniny zachodzi z różną szybkością, w zależności od sąsiadującego z nią aminokwasu. W przypadku interferonu alpha-2b, aminokwasami następującymi po metioninie są cysteina i kwas asparaginowy, które podobnie jak kwas glutaminowy są niezwykle trudne do usunięcia przez LAP z *V. proteolyticus* [27].

Aminopeptydazy leucynowe mają duży potencjał w przemyśle żywnościowym, do produkcji dodatków smakowych. Aminopeptydaza leucynowa odszczepia hydrofobowe, N-końcowe aminokwasy, odpowiedzialne za gorzki smak peptydu, dzięki czemu poprawia jego smak [25, 33]. Badania opublikowane w 2010 roku sugerują, że wyjątkowo obiecującym źródłem tego enzymu dla przemysłu żywnościowego może być szczep LL1 *Aspergillus oryzae* [18]. Badano także możliwość wykorzystania w tym celu LAP z *Streptomyces gedanensis*. LAP z *S. gedanensis* wykazała się dobrą termostabilnością i szeroką specyficznością substratową [32].

Ponadto LAP może być stosowana do produkcji metylowych estrów L-aspartylo-L-aminowych. Przykładem takiego związku, stosowanego w produkcji żywności jako słodzik, jest ester metylowy aspartylofenyloalaniny, znany jako aspartam. Badania opublikowane w 2012 roku donoszą, że termostabilna aminopeptydaza leucynowa z *Streptomyces cinnamoneus* może być wykorzystywana do efektywnej syntezy estrów metylowych L-aspartylo-L-aminowych. Chociaż aminopeptydazy leucynowe naturalnie katalizują reakcję hydrolizy, to przez zmianę warunków reakcji można przesunąć równowagę reakcji w stronę syntezy. W opisanych badaniach w tym celu zmienia się środowisko reakcji (jako rozpuszczalnika użyto się metanolu zamiast wody). Substratami dla enzymu są wolny kwas asparaginowy i metylowe estry aminokwasów. Najlepsze wyniki uzyskano dla metylowych estrów tryptofanu i tyrozyny, natomiast synteza nie powiodła się, gdy akceptorem grupy acylowej były metylowe estry proliny, histydyny czy cysteiny [1]. W chińskim przemyśle spożywczym anchois (przetwory z sardeli *Engraulis japonicus*) stanowią ogromne źródło białek, które mogą być dalej przetwarzane za pomocą hydrolizy enzymatycznej do cennych produktów. Rekombinowana LAP z mikroorganizmu *Bacillus stearothermophilus* razem z kombinacją enzymów, pod nazwą Flavourzyme, mogą być użyte w przemysłowej hydrolizie białek. LAP poprawia hydrolizę białek anchois i zwiększa udział wolnych aminokwasów w hydrolizacie [51].

5. Podsumowanie

Podsumowując, LAP mogą być celem projektowania leków przeciw pasożytniczych oraz leków przeciwnowotworowych. Enzym ten może być również wykorzystany jako marker nowotworowy, a także wskaźnik pozwalający monitorować prawidłowy przebieg ciąży. Wystarczy zrozumieć funkcje tego enzymu, by szybko znaleźć dla niego i jego inhibitorów zastosowania terapeutyczne. Odkrycie i zsyntetyzowanie takich inhibitorów aminopeptydazy leucynowej, które będą mogły być zastosowane w organizmach ludzkich, umożliwi pokonanie takich problemów ludzkości, jak malaria, rak, a może nawet wirus HIV.

Streszczenie

Aminopeptydazy leucynowe należą do grupy hydrolaz i są odpowiedzialne za katalizowanie odszczepienia N-końcowych aminokwasów z łańcucha peptydowego. Aminopeptydazy leucynowe (LAP) hydrolizują nie tylko leucynę, ale też inne hydrofobowe aminokwasy. LAP są szeroko rozpowszechnione w wielu organizmach żywych i odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak: przemiana, dojrzewanie i degradacja białek, prezentacja antygenów i metabolizm ważnych peptydów [14, 46]. Funkcje tych enzymów różnią się w zależności od gatunku. Przykładowo w organizmach pasożytów LAP są odpowiedzialne za katabolizm hemoglobiny gospodarza, która stanowi źródło pożywienia dla pasożyta [19, 40]. W organizmie ludzkim LAP pełnią różnorodne funkcje, jedną z nich jest kontrola prawidłowego przebiegu ciąży. Aminopeptydazy leucynowe są zaangażowane w wiele ważnych procesów biologicznych, takich jak starzenie, choroby, infekcja wirusa HIV [31], katarakta [44] czy nowotwory. W niniejszym komunikacie przedstawiono

porównanie funkcji i zastosowań aminopeptydaz leucynowych z różnych organizmów. Opisano także specyficzność substratową tych enzymów z wybranych gatunków.

Literatura

- [1] Arima J., Kono M., Kita M., Mori N., *A mutant leucine aminopeptidase from Streptomyces cinnamomeus with enhanced L-aspartyl L-amino acid methyl ester synthetic activity*; Biotechnol. Lett.; 2012; 34; s. 1093–1099.
- [2] Boulila-Zoghalmi L., Gallusci P., Holzer F., Basset G., Hjebali W., Chaibi W., Walling L., Brouquisse R., *Up-regulation of leucine aminopeptidase-A in cadmium-treated tomato roots*; Planta; 2011; 234; s. 857–863.
- [3] Carrlo R., Robison T., Rivera F., Davenport J., Jonsson I., Florczyk D., Tarkowski A., Potempa J., Koziel J., Shaw L., *Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in Staphylococcus aureus*; Microbes Infect.; 2012; 14; s. 989.
- [4] Chao W., Gu Y., Pautot V., Bray E., Walling L., *Leucine aminopeptidase mRNAs, proteins and activities increase in response to drought, salinity and the wound signals – Systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid*; Plant Physiol.; 1999; 120; s. 979–992.
- [5] Chu L., Lai Y., Xiaoping X., Eddy S., Yang S., Song L., Kolodrubetz D., *A 52-kDa Leucyl Aminopeptidase from Treponema denticola Is a Cysteinyglycinase That Mediates the Second Step of Glutathione Metabolism*; J. Biol. Chem.; 2008; 283; s. 19351–19358.
- [6] Cunningham E., Drag M., Kafarski P., Bell A., *Chemical target validation studies of aminopeptidase in malaria parasites using alpha-aminoalkylphosphonate and phosphonopeptide inhibitors*; Antimicrob. Agents. Chemother.; (2008); 52; s. 3221–3228.
- [7] Deejing S., Yoshimune K., Lumyong S., Moriguchi M., *Purification and characterization of hyperthermotolerant leucine aminopeptidase from Geobacillus thermoleovorans 47b* J Ind Microbiol Biotechnol; 2005; 32; s. 269–276.
- [8] Ghadge M., Sirsat A., Bahansali M., Desouza L., Jagannath P., *Leucine amino peptidase a better indicator of carcinoma of liver, biliary tract and pancreas*; Indian J. Clin. Biochem.; 2001; 16; s. 60–64.
- [9] Gu Y., Walling L., *Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato, activity on dipeptide and tripeptide substrates*; Eur. J. Biochem.; 2000; 267; s. 1178–1187.
- [10] Hartl M., Merker H., Schmidt D., Baldwin I., *Optimized virus-induced gene silencing in Solanum nigrum reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls*; New. Phytol.; 2008; 179; s. 356.
- [11] Herbers K., Prat S., Willmitzer L., *Functional analysis of a leucine aminopeptidase from Solanum tuberosum L.* Planta; 1994; 194; s. 230–240.
- [12] Inokuma S., Setoguchi K., Ohta T., Matsuzaki Y., Yoshida A., *Serum leucine aminopeptidase as an activity indicator in systemic lupus erythematosus: a study of 46 consecutive cases*; Rheumatology; 1999; 38; s. 705–708.
- [13] Jia H., Nishikawa Y., Luo Y., Yamagishi J., Sugimoto C., Xuan X., *Characterization of a leucine aminopeptidase from Toxoplasma gondii*; Molecular & Biochemical Parasitology; 2010; 170; s. 1–6.
- [14] Kale A., Pijning T., Sonke T., Dijkstra B., Thunnissen A., *Crystal structure of the leucine aminopeptidase from Pseudomonas putida reveals the molecular basis for its enantioselectivity and broad substrate specificity*; J. Mol. Biol.; 2010; 398; s. 703–714.

- [15] Kuo L., Hwang G., Lai Y., Yang S., Lin L., *Overexpression, Purification, and Characterization of the Recombinant Leucine Aminopeptidase II of Bacillus stearothermophilus*; Current Microbiology; 2003; 47; s. 40–45.
- [16] Lee J., Song S., Seok J., Jha B., Han E., Song H., Yu H., Hong Y., Kong H., Chung D., *M17 leucine aminopeptidase of the human malaria parasite Plasmodium vivax*; Molecular & Biochemical Parasitology; 2010; 170; s. 45–48.
- [17] Lin L. L., Hsu W. H., Wu C. P., Ch M. C., Chou W. M., Hu H. Y., *A thermostable leucine aminopeptidase from Bacillus kaustophilus CCRC 11223*. Extremophiles 2004, 8, s. 79–87.
- [18] Lin S., Chen L., Wen Ch., Chu W., *Extracellular leucine aminopeptidase produced by Aspergillus oryzae LL1 and LL2*; Afr. J. Microbiol. Res.; 2010; 4; s. 158–168.
- [19] Maric S., Donnelly S., Robinson M., Skinner-Adams T., Trenholme K., Gardiner D., Dalton J., Stack C., *The M17 leucine aminopeptidase of the malaria parasite Plasmodium falciparum: importance of active site metal ions in the binding of substrates and inhibitors*; Biochemistry; 2009; 48; s. 5435–5439.
- [20] Matsui M., Fowler J.H., Wallig L., *Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function*; Biological Chemistry; 2006; 387; s. 1535–1544.
- [21] Matsumoto H., Nagasaka T., Hattori A., Rogi T., Tsuruoka N., Mizutani S., Tsujimoto M., *Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal peptides*; Eur. J. Biochem.; 2001; 268; s. 3259–3266.
- [22] McCarthy E., Stack C., Donnelly S., Doyle S., Mann V., Brindley P., Stewart M., Day T., Maule A., Dalton J., *Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum*; International Journal for Parasitology; 2004; 34; s. 703–714.
- [23] Mitsu T., Nomura S., Itakura A., Mizutani S., *Role of Aminopeptidases In Blood Pressure Regulation*; Bioll. Pharm. Bull.; 2004; 27; s. 768.
- [24] Mizutani S., Wright J., Kobayashi H., *Placental Leucine Aminopeptidase – and Aminopeptidase A-Deficient Mice Offer Insight concerning the Mechanisms Underlying Preterm Labor and Preeclampsia*; J. Biomed. Biotechnol.; 2011; 2011; s. 1–12.
- [25] Ney K., Retzlaff G., *Proceedings of the 4th International Flavor Conference*. Amsterdam: Elsevier; 1985; s. 543–550.
- [26] Nomura S., Ito T., Yamamoto E., Sumigama S., Iwase A., Okada M., Shibata K., Ando H., Ino K., Kikkawa F., Mizutani S., *Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy*; Biochimica et Biophysica Acta.; 2005; 1751; s. 19–25.
- [27] Pérez-Sánchez G., Leal-Guadarrama L. I., Trelles I., Pérez N. O., Medina-Rivero E., *High-level production of a recombinant Vibrio proteolyticus leucine aminopeptidase and its use for N-terminal methionine excision from interferon alpha-2b*; Process Biochemistry; 2011; 46; s. 1825–1830.
- [28] Pineda E., Goldbarg J., Levitan R., Rutenburg A., *Leucine aminopeptidase and glucuronidase activity incancerous and noncancerous effusions*; Am. J. Dig. Dis.; 1962; 7; s. 797.
- [29] Pokharel D., Rathaur S., *Purification and characterization of a leucine aminopeptidase from the bovine filarial parasite Setaria cervi*; Acta Tropica; 2008; 106; s. 1–8.
- [30] Poreba M., McGowan S., Skinner-Adams T., Trenholme K., Gardiner D., Whisstock J., To J., Salvesen G., Dalton J., Drag M., *Fingerprinting the substrate specificity of M1 and M17 aminopeptidases of human malaria, Plasmodium falciparum*. PLoS One. 2012; 7; s. 1–8.
- [31] Pulido-Cejudo G., Conway B., Proulx P., Brown R., Izguirre C., *Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection*; Antiviral Res.; 1997; 36; s. 167–177.

- [32] Rahulan R., Dhar K., Nampoothiri K., Pandey A., *Characterization of leucine amino peptidase from Streptomyces gedanensis and its applications for protein hydrolysis*; Process Biochem.; 2012; 47; s. 234–242.
- [33] Rao M., Tanksale A., Ghatge M., Desphande W., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*; Microbiol. Mol. Biol. Rev.; 1998; 62; s. 597–635.
- [34] Ratnayake S., Selvarkumar P., Hayashi K., *A putative proline iminopeptidase of Thermotoga maritima is a leucineaminopeptidase with lysine-p-nitroanilide hydrolyzing activity*; Enzyme and Microbial Technology; 2003; 32; s. 414–421.
- [35] Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P., *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*; Appl. Microbiol. Biotechnol; 2006; 71; s. 394–406.
- [36] Shen Y., Wang F., Lan D., Liu Y., Yang B., Wang Y., *Biochemical Properties and Potential Applications of Recombinant Leucine Aminopeptidase from Bacillus kaustophilus CCRC 11223*; Int. J. Mol. Sci.; 2011; 12; s. 7609–7625.
- [37] Singh A., Singh R., Tomar D., Pandya C., Singh R., *The leucine aminopeptidase of Staphylococcus aureus is secreted and contributes to biofilm formation*; Int. J. Infect. Dis.; 2012; 16; s. 375–381.
- [38] Skinner-Adams T., Lowther J., Teuscher F., Stack C., Grembecka J., Mucha A., Kafarski P., Trenholme K., Dalton J., Gardiner D., *Identification of phosphinate dipeptide analog inhibitors directed against the Plasmodium falciparum M17 leucine aminopeptidase as lead antimalarial compounds*; J. Med. Chem.; 2007; 50; s. 6024–6031.
- [39] Skinner-Adams T., Peatey C., Anderson K., Trenholme K., Krige D., Brown C., Stack C., Nsangou D., Mthews R., Thivierge K., Dalton J., Gardiner D., *The aminopeptidase inhibitor CHR-2863 is an orally bioavailable inhibitor of murine malaria*; Antimicrob. Agents Chemother.; 2012; 56; s. 3244.
- [40] Smith E., Spackman D., *Leucine aminopeptidase. V. Activation, specificity, and mechanism of action*; Journal of Biological Chemistry; 1955; 212; s. 271–299.
- [41] Song S., Park J., Kim J., Kim S., Hong Y., Kong H., Chung D., *Identification and characterization of Paragonimus westermani leucine aminopeptidase*; Int. J. Parasitol.; 2008; 57; s. 334–341.
- [42] Sopanen T., Mikola J., *Purification and Partial Characterization of Barley Leucine Aminopeptidase*, Plant Physiol., 1975; 55; s. 809–814.
- [43] Stack C., Lowther J., Cunningham E., Donnelly S., Gardiner D., Trenholme K., Skinner-Adams T., Teuschne F., Grambecka J., Mucha A., Kafarski P., Lua L., Bell A., Dalton J., *Characterisation of the Plasmodium falciparum M17 leucyl aminopeptidase: A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development*; J. Biol. Chem.; 2007; 282; s. 2069.
- [44] Swanson A., Davis R., Meinhart N., Kuck K., Kuck J., *Proteases in the Emory mouse cataract*; Invest Ophthalmol Vis Sci; 1985; 26; s. 1035–1037.
- [45] Syros T., Yupsanis T., Petkou D., Economou A., *Protein, leucine aminopeptidase, esterase, acid phosphatase and photosynthetic responses of oleander (Nerium oleander L.) during cold acclimation and freezing treatments*; J. Plant Physiol.; 2005; 162; s. 886–894.
- [46] Taylor A. *Aminopeptidases: structure and function*; FASEB J.; 1993; 7; s. 290–298.
- [47] Tsujimoto M., Goto Y., Maruyama M., Hattori A., *Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure*; Heart Fail. Rev.; 2008; 13; s. 285–291.
- [48] Tu C., Park S., Walling L., *Isolation and Characterization of the Neutral Leucine Aminopeptidase (LapN) of Tomato*; Plant Physiology; 2003; 132; s. 243–255.

- [49] Turzynski A., Mentlein R., *Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase*; Eur. J. Biochem.; 1990; s. 509–515.
- [50] Watanabe Y., Shibata K., Kikkawa F., Kajiyama H., Ino K., Hattori A., Tsujimoto M., Mizutani S., *Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase Suppresses Angiogenesis in Human Endometrial Carcinoma via Renin-Angiotensin System*; Clinical Cancer Research; 2003; 9; s. 6497–6503.
- [51] Wang F., Ning Z., Lan D., Liu Y., Yang B., Wang Y., *Biochemical Properties of Recombinant Leucine Aminopeptidase II from Bacillus stearothermophilus and Potential Applications in the Hydrolysis of Chinese Anchovy (Engraulis japonicus) Proteins*; J. Am. Chem. Soc.; 2011; 60; s. 165–172.
- [52] Wiederanders B., Lasch J., Kirschke H., Bohley P., Ansorge S., Hanson H.; *The Suitability of Bovine-Lens Leucine Aminopeptidase for Sequence Analysis and Limited Hydrolysis of Polypeptides* Eur. J. Biochem.; 1973; 36; s. 504–508.
- [53] <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>, [17.01.2013].
- [54] <http://www.pasozyty.com.pl/Zarodziec-sierpowy-Plasmodium-falciparum.html>, [17.01.2013].
- [55] http://marcinek.poznan.pl/upload/node/308_cykle_rozwojowe_pasozytow_1_.pdf, [17.01.2013].

Transdukcja sygnałów mikrośrodowiskowych w komórkach macierzystych

Marcin Tomsia*, Katarzyna Kopaczka**, Piotr Czekał*

Summary

Extracellular matrix (ECM) is the main component of the stem cell environment *in vivo*. The knowledge about relationships between ECM and regulation of intracellular signal pathways may be crucial for embryonic stem cell (ESC) culture and for preparing them for regenerative medicine. The areas of specific concern are these pluripotent cells of low expression of HLA antigens and low ability of neoplastic transformation. Many of these features as well as lack of ethical and moral objections, indicate stem cells derived from perinatal tissues (placenta, amniotic fluid, or umbilical cord), as an attractive source of ESC for cell therapy. Basic condition for growing appropriate cells is their culture using media of clearly defined composition, related to ECM. Composition and proportions of the ECM components are responsible for maintenance of undifferentiated state or they induce a process of cell differentiation. In synthetic media, recombinant laminins, fibronectin, vitronectin or e-cadherin are used, among others. Binding surface cell receptors – integrins, components of ECM, activate particular signal pathways (e.g. FAK, MEK and ERK) and, as a result, they determine many biological functions. Transduction of signals from extracellular matrix into cells is provided through membrane receptors, protein components of the cytoskeleton and signal proteins. Some of signal pathways dependent on integrins promote stem cell proliferation and self-renewal, some others stimulate cell differentiation. Introduction of experimental models based on media mimicking ECM in the studies of ECM-cell interactions may help in explanation of the mechanism of stabilization of stem cell pluripotency, and it especially may help to indicate which ECM components support undifferentiating state and self-renewal of stem cells. **Keywords:** Extracellular matrix, Laminins, Integrins, Signal transduction, Signal pathways

1. Wprowadzenie

Nowa gałąź nauki i medycyny, jaką jest medycyna regeneracyjna pokłada szczególne nadzieje w badaniach nad komórkami macierzystymi. Największym potencjałem regeneracyjnym dysponują komórki totipotencjalne w początkowych stadiach bruzdkowania oraz pluripotencjalne embrionalne komórki macierzyste (ESC; *ang.* Embryonic Stem Cells). W okresie zarodkowym i płodowym, komórki te posiadają największą zdolność różnicowania się w inne typy komórek reprezentujących trzy listki zarodkowe, co wiąże się z rozwojem tkanek i narządów. Ludzkie ESC (hESC; *ang.* human Embryonic Stem Cells) charakteryzuje zdolność do różnicowania w około 200 różnych typów komórek.

* Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny.

** Studenckie Koło Naukowe, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny.

Potencjalnie najlepszym źródłem komórek pluripotencjalnych jest epiblast blastocysty. Jednak pozyskiwanie tych komórek obwarowane jest wieloma ograniczeniami natury moralno-etycznej [62]. Drugą, intensywnie badaną grupą komórek są pluripotencjalne komórki macierzyste o cechach komórek embrionalnych występujące w tkankach osobników dorosłych [51, 107]. Komórki te, wraz z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC; *ang.* Mesenchymal Stem Cells) stanowią potencjalnie najbardziej obiecującą, chociaż bardzo heterogenną populację, możliwą do pozyskania dla celów medycznych w sposób akceptowalny przez wszystkich. Szczególnie atrakcyjną grupą komórek ze względów praktycznych zastosowań wydają się komórki macierzyste występujące w strukturach tkankowych umożliwiających właściwy rozwój płodu, tj. w tkankach owodni, płynie owodniowym, czy pępowinie. Komórki macierzyste rezydują w niszach komórkowych, których głównym elementem mikrośrodowiska jest macierz zewnątrzkomórkowa (ECM). Nierozpuszczalne składniki ECM (*ang.* Extracellular Matrix) stanowią rodzaj makrocząsteczkowego sita dla komórek i czynników wzrostowych, ale również mogą wiązać się z receptorami komórek macierzystych [9]. Zrozumienie zależności pomiędzy niszą komórkową i regulacją określonych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych wydaje się być przełomowym punktem w hodowli i zastosowaniu komórek macierzystych dla potrzeb medycyny regeneracyjnej. Pozwoli ono kontrolować hodowlę komórek macierzystych w warunkach *in vitro* w celu osiągnięcia odpowiedniej liczby komórek w stanie nieodróżnicowania i prowadzenia początkowych etapów terapii komórkowej *ex vivo*. Umożliwi celowe sterowanie procesami proliferacji i różnicowania komórek macierzystych *in vivo*, w tym komórek iPSC (*ang.* induced Pluripotent Stem Cells), w terapiach chorób genetycznych i metabolicznych oraz w regeneracji uszkodzonych narządów. W onkologii, przyczyni się do wzbogacenia metod terapii przeciwnowotworowej, gdyż zmiany w składzie i funkcji ECM mogą być powodem istotnych zakłóceń w transdukcji sygnałowej w komórkach macierzystych i ich transformacji w kierunku rakowych komórek macierzystych (*ang.* Cancer Stem Cells) [63].

2. Macierz zewnątrzkomórkowa

Macierz zewnątrzkomórkowa tworzy mikrośrodowisko komórek, poprzez które docierają do nich sygnały istotne dla prawidłowego rozwoju, spójności i funkcji tkanek. A zatem, ECM jest nie tylko białkowym rusztowaniem podtrzymującym tkanki, ale także strukturą o znaczeniu regulatorowym, kontrolującą oddziaływania pomiędzy samymi komórkami, między macierzą a poszczególnymi komórkami, modulującą sygnały zewnątrzkomórkowe oraz będącą miejscem gromadzenia czynników wzrostu i cytokin [31]. ECM składa się z części upostaciowanej utworzonej z glikoprotein kolagenowych i niekolagenowych zanurzonej w nieupostaciowanym, uwodnionym żelu polisacharydowym. Jako substancja wielofunkcyjna ECM ma złożony skład obejmujący zwykle kolageny (I, III, IV, V i VI), glikoproteiny (laminina, fibronektyna A, entaktyna, undulina, elastyna i fibrylina) oraz glikoaminoglikany (siarczan heparanu) [136]. Integralną część nisz komórkowych tkanek nabłonkowych stanowi błona podstawna. Cztery główne składniki błon podstawnych to lamininy, fibronektyna, kolagen typu IV, nidogen i siarczanowe proteoglikany, które

biorą udział w procesach regulacji funkcji komórek macierzystych, komórek różnicujących się i dojrzających komórek somatycznych występujących w nabłonku [19].

Kolagen jest syntetyzowany głównie przez fibroblasty. Poszczególne typy kolagenów różnią się składem aminokwasów, strukturą i właściwościami fizycznymi. Kolagen, wraz z lamininami i fibronektyną pełni rolę podtrzymującą spójność ECM. Lamininy i fibronektyna, z jednej strony umożliwiają wiązanie komórek z włóknami kolagenu, z drugiej strony są ligandami receptorów integrynowych, które z kolei łączą się pośrednio z filamentami aktynowymi cytoszkieletu. To złożone oddziaływanie umożliwia adhezję komórek oraz kontrolę ich migracji. Ważnym składnikiem ECM są też metaloproteiny, które mają charakter peptydaz rozkładających składniki macierzy pozakomórkowej. Biorą one udział w zmianach architektoniki macierzy i w migracji komórek [6, 136]. Skład ECM jest specyficzny tkankowo, jednak nie jest stały i podlega dynamicznym zmianom [2, 80].

3. Macierz zewnątrzkomórkowa w tkankach okołopłodowych

Okołopłodowe komórki macierzyste występują w strukturach tkankowych umożliwiających właściwy rozwój płodu: w łożysku, płynie owodniowym wypełniającym jamę owodni oraz w pępowinie. Są atrakcyjnym obiektem zainteresowań naukowców i lekarzy, ponieważ ich pozyskiwanie nie budzi kontrowersji natury moralno-etycznej, są łatwo dostępne i wykazują szereg cech biologicznych pozwalających na skuteczne wykorzystanie w terapiach komórkowych.

Interesującym przykładem ECM, stwarzającej wyjątkowo korzystne warunki dla funkcjonowania komórek macierzystych jest macierz zewnątrzkomórkowa błony owodniowej. Ludzki nabłonek owodni leży na bardzo cienkiej błonie podstawnej, która składa się z kolagenu III, IV, V, VII i XVII [87] laminin, fibronektyny oraz nidogenu. Pod błoną podstawną, w tkance owodni występuje ubogokomórkowa warstwa zbita utworzona przez kolagen typu I, III, V i VI oraz fibronektyny. Następna warstwa składa się z komórek mezenchymalnych oraz kolagenu typu I, III i VI oraz nidogenu, laminin i fibronektyny. Ostatnią warstwą błony owodni, graniczącą z kosmówką jest warstwa przejściowa zwana gąbczastą, składająca się z kolagenu I, III i IV oraz proteoglikanów [82, 88]. W błonie owodni zidentyfikowano m.in. lamininę 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), lamininę 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$), a także kolagen VII i fibrynogen. Istotnym składnikiem ECM owodni są czynniki wzrostu takie, jak: NGF (*ang.* Neural Growth Factor), HGF (*ang.* Hepatocyte Growth Factor), KGF (*ang.* Keratinocyte Growth Factor), FGF (*ang.* Fibroblast Growth Factor), TGF β 1 (*ang.* Transforming Growth Factor) i EGF (*ang.* Epidermal Growth Factor) [15]. Niektóre z tych substancji zapobiegają zbyt wczesnemu kontaktowi komórek macierzystych z komponentami ECM (FGF2, NGF, TGF α , TGF β 1 i TGF β 2), inne zapewniają odpowiednie mikrośrodowisko wolne od stanu zapalnego (NGF, HGF, KGF, TGF α , TGF β 1, EGF, FGF). Z kolei, inhibitor tkankowy metaloproteinaz – trombospondyna-1, umożliwia pośrednio oddziaływanie cytokin na cykl komórkowy i promowanie przeżywalności komórek poprzez hamowanie działalności metaloproteinaz; kolagen IV i VII ułatwiają przyleganie komórek do składników ECM, a laminina 1 i 5 oraz fibronektyna uruchamiają szlaki sygnałowe zależne od integryn [31, 39]. Ze względu na korzystne warunki, jakie zapewnia błona

owodni po usunięciu własnych komórek macierzystych nabłonka jest wykorzystywana, jako podłoże (*ang.* scaffold) dla różnych typów komórek macierzystych pochodzących z innych źródeł, a przeznaczonych do wykonania przeszczepów, np. rogówki [31, 95, 132]. Hodowlę można prowadzić również na samych ludzkich komórkach nabłonka błony owodni, co wpływa korzystnie na utrzymanie stanu ich niezróżnicowania [14]. Komórki ludzkiej błony owodni można podzielić na dwa rodzaje: komórki nabłonka owodni (hAEC; *ang.* human Amniotic Epithelial Cells), leżące na błonie podstawnej oraz mezenchymalne komórki zrębowe owodni (hAMSC, *ang.* human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells). hAES pochodzą z embrionalnej ektodermy i posiadają szereg cech hESC. Wykazują ekspresję powierzchniowych markerów pluripotencji: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 i TRA-1-81, a także: białka transportowego z rodziny ABC (*ang.* ATP-binding Cassette superfamily) – ABCG2/BCRP oraz CD9, CD24, E-kadheryny, integryny $\alpha 6 \beta 1$ i receptora c-Met. hAES charakteryzują się również ekspresją czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla hESC: Oct4, Nanog, Sox2 oraz REX-1. hAES wykazują ekspresję antygenów zgodności tkankowej HLA na bardzo niskim poziomie, co z jednej strony związane jest z ochroną rozwijającego się płodu przed odpowiedzią immunologiczną ze strony matki, a z drugiej daje nadzieje terapeutyczne w aspekcie przyjęcia przeszczepu. Dodatkowym atutem tych komórek jest brak aktywności telomerazy i cech transformacji nowotworowej *in vivo*, co odróżnia je od wielu hESC oraz iPSC (*ang.* induced Pluripotent Stem Cells), które po transplantacji myszom z ciężkim niedoborem odporności – SCID (*ang.* Severe Combined Immunodeficiency Disease) są źródłem potworniaka składającego się z tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych [69, 86, 112]. hAMSC pochodzą z embrionalnej mezodermy i wykazują ekspresję licznych markerów pluripotencji, natomiast obecność markerów powierzchniowych SSEA-3 i SSEA-4 nie została potwierdzona [24, 82, 88].

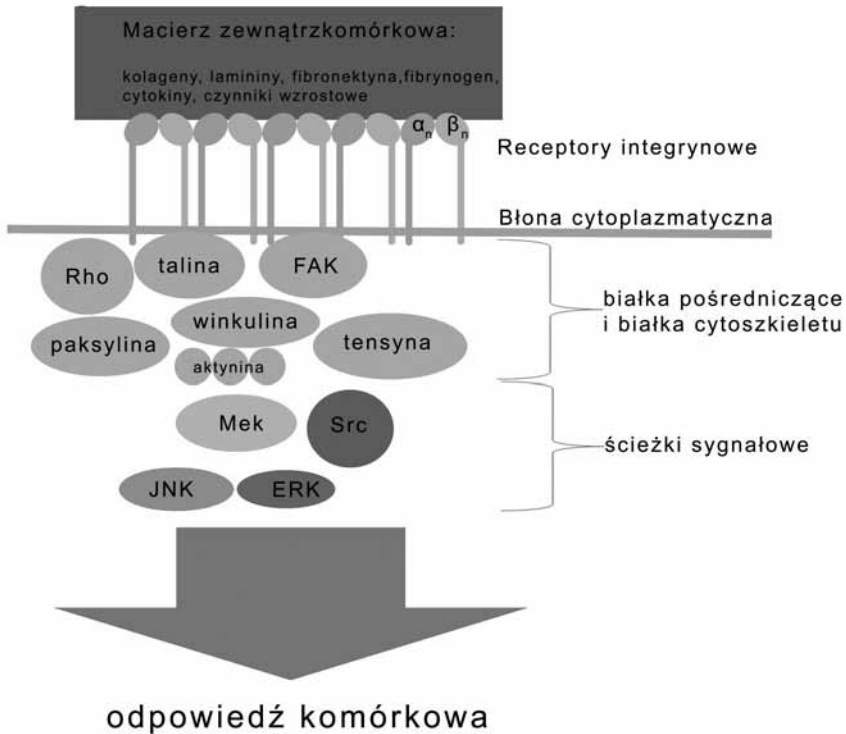
Dość szczególnie warunki niszowe występują w płynie owodniowym. Skład płynu owodniowego zależy od wieku, ale zawartość wody wynosi w nim 98–99% [73]. W pozostałej części płynu owodniowego znajdują się m.in. kwas hialuronowy, fibronektyna, tenascyna, kolagen I i IV oraz lamininy [20], a także EGF, TGF α , TGF $\beta 1$, IGF-I (*ang.* Insulin-like Growth Factor I), G-CSF (*ang.* Granulocyte Colony-stimulating Factor) i erytropoetyna [98]. Zawarty w płynie owodniowym drugiego trymestru kwas hialuronowy pełni rolę immunomodulującą. Odpowiada, bowiem za wiązanie prozapalnego czynnika TNF α , wydzielanego przez makrofagi/monocyty w odpowiedzi, m.in. na lipopolisacharyd (LPS) [104]. Jest to, więc swoisty i wczesny etap obrony płodu przed krytycznym stężeniem TNF α , które może wywołać przedwczesne skurcze błony mięśniowej macicy [101]. Komórki macierzyste płynu owodniowego AFDSC (*ang.* Amniotic Fluid Derived Stem Cells) stanowią nikły odsetek występujących w nim komórek. Analiza cytometryczna wykazała, że zaledwie 0,1 \pm 0,5% komórek płynu owodniowego wykazuje ekspresję Oct-4 [94]. Mogą one różnicować się do komórek trzech listków zarodkowych i posiadają na swojej powierzchni markery mezenchymalnych komórek macierzystych [43, 106, 117]. W ludzkiej tkance łącznej galaretowatej pępowiny (galareta Whartona), ECM składa się z glikozaminoglikanów (GAG) wśród, których najliczniejszy jest kwas hialuronowy. Natomiast siarczan keratanu, siarczan dermatanu, siarczan-4ondroityny, siarczan-6ondroityny

i siarczan heparanu stanowią tylko kilka procent. W galarecie Whartona znajdują się również różne typy kolagenów tj. I, III, V oraz VII, z czego kolagen I stanowi około 50% wszystkich form. Proteoglikany, to głównie dekoryna, biglikan i wersykan. Dwa pierwsze regulują średnicę i organizację włókien kolagenowych, natomiast wersykan destabilizuje połączenia komórka-ECM. Proteoglikany stanowią również rezerwar dla występujących tu czynników wzrostu (IGF-I, FGF, TGF- β 1, PDGF oraz EGF). Czynniki te regulują wzrost, proliferację i różnicowanie komórek, a także syntezę i degradację składników ECM, w tym kolagenu, elastyny, GAG oraz proteoglikanów [100,108,111]. W ludzkiej tkance łącznej galaretowatej pępowiny znajduje się populacja komórek macierzystych [124]. Komórki te wykazują ekspresję markerów komórek mezenchymalnych (CD44, CD73 (SH3) CD90 i CD105 (SH2)), ekspresję CD29 i CD51 (integryna α 5 β 1) oraz niektórych powierzchniowych markerów pluripotencji charakterystycznych dla ludzkich komórek embrionalnych: TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1 i SSEA-4, natomiast nie ekspresjonują markerów linii hematopoetycznej: CD34 i CD45 [3, 28, 78, 124].

4. Interakcje macierz zewnątrzkomórkowa-komórka

Macierz zewnątrzkomórkowa stwarza warunki dla przepływu informacji pomiędzy komórkami. Wiąże się to ze zmianą składu chemicznego macierzy, zmianą konformacji poszczególnych jej składników lub oddziaływań mechanicznych pomiędzy nimi. Jest to swoisty sposób komunikacji komórek w obrębie tkanki, w którym bodźce mechaniczne są przekształcane w sygnały biochemiczne. W efekcie, sygnały zewnątrzkomórkowe są odbierane w sposób celowany poprzez receptory komórkowe i aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Składniki nierozpuszczalne i rozpuszczalne ECM zawieszony w substancji zewnątrzkomórkowej mogą spełniać w tym systemie rolę ligandów rozpoznawanych przez receptory błonowe. Takie sygnały pochodzące z zewnątrz inicjują w komórkach reakcje na różnego typu bodźce (Rysunek 1) [35, 54].

Ligandami receptorów komórkowych mogą być czynniki wzrostowe (NGF, FGF, HGF), kolageny lamininy, fibronektyny oraz liczne inne komponenty macierzy pozakomórkowej. Receptory integrynowe cechują się różną specyficznością względem wyboru substratu. Wśród nich wyróżnia się te o większej i mniejszej swoistości. W wyniku przyłączenia różnych ligandów wywoływana jest zróżnicowana odpowiedź komórki. Przykładowo, po przyłączeniu czynnika EGF do podjednostki α integryny komórki dzielą się intensywnie, natomiast, gdy ligandem jest NGF następuje zahamowanie podziałów na wiele godzin. W obu przypadkach sygnalizacja odbywa się za pośrednictwem szlaku ERK. Fibronektyna natomiast wywołuje odpowiedź komórkową w postaci kaskady sygnału Src odpowiedzialną za modulację organizacji szkieletu i migrację komórek [92]. Ważnym składnikiem substancji międzykomórkowej, który może być odpowiedzialny za utrzymywanie się stanu nie zróżnicowania komórek pluripotencjalnych są lamininy [32].



Rys. 1. Interakcje ECM – komórka. Schemat przedstawia lokalizację pozakomórkową ligandów receptorów integrzynowych oraz wewnątrzkomórkową białek uczestniczących w transdukcji sygnałowej i aktywacji określonych ścieżek sygnałowych. W efekcie, następuje odpowiedź komórkowa związana często z regulacją ekspresji genów, którą mogą być: proliferacja, zwiększona przeżywalność, migracja, różnicowanie, bądź hamowanie różnicowania, śmierć apoptyczna

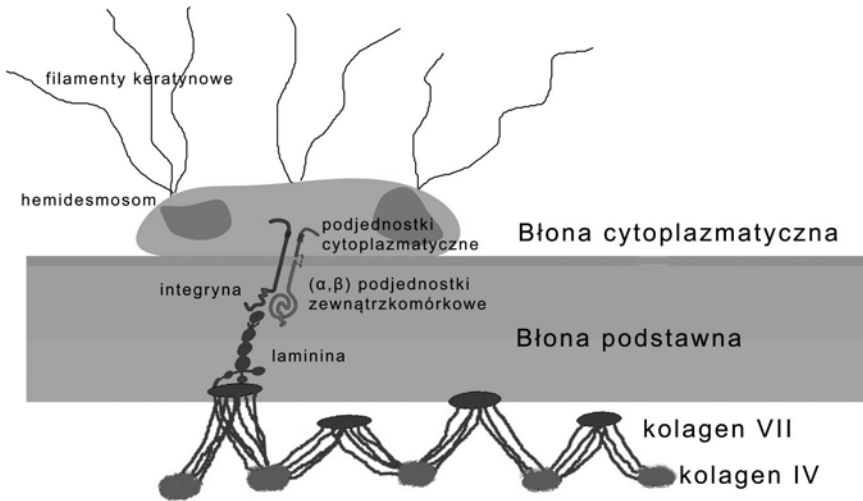
4.1. Lamininy jako ligandy receptorów komórkowych

Lamininy (LN) to heterotrimeryczne glikoproteiny, składające się z podjednostki α , β i γ . Znanych jest pięć podjednostek α , trzy podjednostki β i trzy γ , które w tkankach ludzkich tworzą 15 trójskładnikowych kombinacji [64,123]. Lamininy są pierwszymi białkami ECM produkowanymi przez zarodek, a ich synteza rozpoczyna się już na etapie dwukomórkowym. W zależności od lokalizacji tkankowej i stadium rozwoju komórek, lamininy wykazują różną ekspresję. LN-511 jest wszechobecna i utrzymuje stan niezróżnicowania komórek [26]. Wykazano, że hodowla ESC na podłożu rekombinowanej lamininy LN-511 skutkuje utrzymaniem stanu niezróżnicowania przez okres nie krótszy niż 20 pasażów. Laminina LN-211 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) ogranicza się w swoim występowaniu do błon podstawnych komórek mięśniowych i synaps neuronów motorycznych; LN-111 – do błon podstawnych niektórych komórek nabłonkowych i wczesnego stadium rozwoju embryonalnego; LN-332 – do subepitelialnych błon podstawnych; LN-411 – do błon subendothelialnych. Oprócz mysiej LN-111, laminin nie można wyizolować w stanie natywnym, dlatego pozyskuje się lamininy rekombinowane [99].

Ludzkie komórki nabłonka owodni – hAEC – mają zdolność do produkcji wszystkich podjednostek laminin z wyjątkiem $\alpha 1$ i $\alpha 4$. Szczególnie dużym stopniem ekspresji charakteryzują się łańcuchy: $\alpha 5$, $\alpha 3$, $\beta 3$, $\beta 1$, $\gamma 1, \gamma 2$, mniejszym – $\alpha 2$, a najmniejszym – $\beta 2$. W hAEC, w błonie podstawnej nabłonka owodni i w tkance owodni wykazano obecność LN-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), LN-4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$), LN-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$), LN-6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$), LN-7 ($\alpha 3\beta 2\gamma 1$), LN-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) i LN-11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$). Natomiast nie obserwuje się LN-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) i LN-3 ($\alpha 1\beta 2\gamma 1$) [113].

4.2. Transdukcja sygnału z udziałem integryn

Odpowiedź komórkowa na sygnały docierające z ECM jest możliwa dzięki kaskadzie szlaków sygnałowych zainicjowanych m.in. przez receptory integrynowe, znajdujące się na powierzchni komórek. Receptory te są skupione w złączach ogniskowych – hemidesmosomach, które łączą błony cytoplazmatyczne komórek z błoną podstawną i pośredniczą w przekazywaniu sygnałów pomiędzy tymi strukturami (Rysunek 2) [2,105].



Rys. 2. Oddziaływanie komórka-błona podstawna. Podjednostki wewnętrzkomórkowe receptorów integrynowych są umiejscowione w hemidesmosomach, zewnętrzkomórkowe w błonie podstawnej i są odpowiedzialne za wiązanie ligandów. Błona podstawna zawiera wielkocząsteczkowe białka (m.in. lamininy, proteoglikany i kolageny (IV i VII)) odpowiedzialne bezpośrednio lub pośrednio za interakcje z podjednostkami zewnętrzkomórkowymi integryn i/lub z tkanką łączną podścieliska

Integryny są to heterodimeryczne, transbłonowe białka receptorowe, składające się z połączonych niekowalencyjnie podjednostek α i β [75]. Zidentyfikowano 18 podjednostek α i 8 podjednostek β , które u człowieka tworzą 24 kombinacje. Wśród nich cztery ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$) są zdolne do wiązania laminin [35]. Transdukcja sygnału z udziałem integryn odbywa się poprzez przyłączenie ligandu do domen podjednostek α i β znajdujących się na zewnątrz komórki. Integryny różnią się swoistością względem substratu. Dlatego do domeny zewnętrzkomórkowej mogą przyłączać się różne ligandy zawieszane w ECM np. fibronektyna, kolagen, czy laminina, wywołując zróżnicowane

efekty. Przykładowo, hodowle ludzkich MSC (hMSC) pochodzących ze szpiku kostnego, na różnych typach podłoży udowodniły, że największy stopień adhezji komórki te wykazują na podłożu z fibronektyną, a potem odpowiednio – z kolagenem I, IV, LN-10/11 i lamininy 1. Odzwierciedleniem takiego stanu rzeczy jest specyficzny dla hMSC profil ekspresji integryn, tzn. silna ekspresja integryny $\alpha 5\beta 1$ (receptora dla fibronektyny) oraz integryny $\alpha 1\beta 1$ (receptora dla kolagenu I). Jednocześnie stwierdzono niższą ekspresję integryny $\alpha 3\beta 1$ (receptor dla lamininy 10/11) oraz integryny $\alpha 6\beta 1$ (receptor lamininy 1). Wykazano, że fragment E8 (LM-E8) lamininy 1 będący częścią trzech łańcuchów laminin w długości koniecznej do związania z integryną, wpływa na proces różnicowania izolowanych ze szpiku kostnego hMSC do neurytów, w medium wolnym od surowicy i czynników różnicujących. Zablockowanie receptora dla tej lamininy poprzez dodanie przeciwciał anti- $\alpha 6\beta 1$ lub specyficznych inhibitorów skutkowało unieczynnieniem ścieżek sygnałowych FAK, MEK, ERK na początkowym etapie i zahamowaniem procesu różnicowania [77]. Stwierdzono również, że związanie pewnych odcinków (LM511-E8/LM322-E8) otrzymanego drogą rekombinacji fragmentu E8, z integryną $\alpha 6\beta 1$, zwiększa istotnie zdolność komórek hESC oraz ludzkich iPSC do adhezji i utrzymuje je w stanie niezróżnicowania [72]. Z kolei fibronektyna i witronektyna po przyłączeniu się do swoich receptorów na powierzchni hESC, czyli odpowiednio do integryny $\alpha 5$ i αV wywołują różnicowanie do endodermy [8].

Wykazano, że integryna $\alpha 6\beta 1$ jest najliczniej syntetyzowaną integryną w ESC [68, 71]. Większość komórek macierzystych i progenitorowych posiada na swojej powierzchni podjednostkę integryny $\beta 1$. Uważa się, że ta grupa receptorów integrynowych kontroluje funkcje komórek systemu nerwowego, m.in. migrację [115]. Podjednostka $\beta 1$ jest także głównym markerem komórek macierzystych skóry [1]. Dla powierzchni macierzystych komórek błony owodni charakterystyczne są głównie integryny z grupy $\alpha 6\beta 4$. Na powierzchni bazalnej, zwróconej do błony podstawnej nabłonka owodni integryny $\alpha 6\beta 4$ są zlokalizowane centralnie, natomiast integryny $\alpha 1\beta 3$ i $\alpha 5\beta 1$ są ulokowane na obwodzie. Umieszczenie integryny $\alpha 6\beta 4$ wskazuje na ich rolę receptorową względem błony podstawnej. Pozostałe integryny najprawdopodobniej w większym stopniu biorą udział w interakcjach międzykomórkowych [92].

Komórki, których powierzchnia obfituje w integrynę $\alpha 6\beta 1$ mogą wiązać się z lamininą LN-111, LN-332 oraz LN-511 [34, 83, 89]. Oddziaływania takie prowadzą do związania się komórki z podłożem, co umożliwia podział komórki. Wśród trzech wymienionych laminin, to LN-511 wzbudza największe nadzieje związane z poznaniem mechanizmu samoodnowy komórek macierzystych, a w konsekwencji ich klinicznego zastosowania [56]. Wiedza o tym, które podjednostki odpowiadają za adhezję, a tym samym za proliferację i utrzymanie stanu niezróżnicowania pozwoliła na wyprodukowanie syntetycznych odpowiedników agonistów integryn, np. kombinacji peptydów AG-10 i C-16, oraz agonistów syndekanu (głównego transbłonowego proteoglikanu błony komórkowej), np. 12 aminokwasowego peptydu AG73, pozyskiwanego z globularnej domeny łańcucha $\alpha 1$ lamininy [81].

5. Wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnałów pochodzących z ECM

Po związaniu ligandu, podjednostki wewnątrzkomórkowe integrzyn współdziałają z taliną, aktyliną i winkuliną, które następnie wchodzą w kontakt z filamentami aktynowymi. Tak, więc integryny poprzez białka pośredniczące oddziałują z cytoszkieletem lub z białkami o charakterze GTPaz, które wpływają na ułożenie cytoszkieletu. Taki mechanizm transdukcji sygnału poprzez błonę komórkową skutkujące aktywacją wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych inicjujących odpowiedź komórki [6, 59].

5.1. Najważniejsze ścieżki sygnałowe w komórkach macierzystych

Prawie jedna piąta genów ulegających ekspresji w komórkach ESC jest związana z transdukcją sygnału i jego regulacją, co stanowi większy odsetek w porównaniu z komórkami zróżnicowanymi. W ESC funkcjonują m.in. ścieżki sygnałowe LIF, TGFbeta/BMP, FGF, Wnt/beta-*kat*enina, NOTCH i HEDGEHOG, MAPK/ERK, Jnk oraz Src [2, 4, 21, 45]. Aktywność tych szlaków sygnałowych oraz protoonkogenów takich, jak Bmi-1 determinuje zdolność ESC do utrzymania pluripotencji i samoodnowy lub różnicowania [25, 97, 134]. Potencjalnie wszystkie ścieżki sygnałowe komórek macierzystych mogą funkcjonować na drodze transdukcji sygnałów pochodzących z ECM. Jednak, nie wszystkie zostały pod tym kątem zbadane i opisane w literaturze naukowej. LIF (*ang.* Leukemia Inhibitory Factor) należy do rodziny cytokin IL-6 [30]. Znany jest jako inhibitor różnicowania, niezbędny do utrzymania stanu pluripotencji mysich ESC (mESC). *In vitro*, LIF jest skuteczny tylko w obecności surowicy, co wskazuje, że wymaga kooperacji dodatkowych czynników stymulujących. LIF oddziałuje z heterodimerycznym receptorem transbłonowym LIFR (*ang.* Leukemia Inhibitory Factor Receptor) posiadającym domenę gp130 (*ang.* glycoprotein 130), aktywując białko STAT-3 (*ang.* Signal Transducer and Activator of Transcription-3) [84]. STAT-3 wiąże się z ufosforylowaną resztą tyrozynową aktywowanego receptora LIFR i przechodzi kolejno fosforylację i dimeryzację. Jako dimer dostaje się do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. Oprócz ścieżki prowadzącej do jądrowej translokacji STAT-3 istnieje inna, w której domena cytoplazmatyczna heterodimeru z gp130, w odpowiedzi na związanie LIF rekrutuje niereceptorową kinazę tyrozynową JAK (*ang.* Janus Kinase) i antyfosfotyrozynową immunoreaktywną kinazę serynowo-treoninową TIK, aktywując inne ścieżki. Następuje również fosforylacja kinaz ERK1,2 (*ang.* Extracellular Signal-Regulated Kinases 1,2) i zwiększenie aktywności kinaz MAPK (*ang.* Mitogen-Activated Protein Kinases) dzięki aktywacji czynnika pomostowego – fosfatazy tyrozynowej SHP2 (Protein Tyrosine Phosphatase). W kolejnym modelu mechanizmu działania tej ścieżki sygnałowej, kinaza JAK wiąże się konstytutywnie do cytoplazmatycznych domen LIFR i gp130 w formie nieaktywnej [84]. W momencie przyłączenia się ligandu LIF, kinaza JAK fosforyluje reszty tyrozynowe w LIFR i gp130, a te z kolei wpływają na czynniki transkrypcyjne STAT-1 i STAT-3 przez ich domeny SH2. Następnie dochodzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych, które w formie homo- lub heterodimerów trafiają do jądra komórkowego, gdzie pełnią rolę transaktywacyjną. Oś LIF-STAT-3 nie stanowi wystarczającego zabezpieczenia przed różnicowaniem w przypadku komórek ludzkich, gdyż w porównaniu do mESC, komórki ludzkie wykazują mniejszą ekspresję

czynników LIF, JAK i STAT-3 oraz większą ekspresję inhibitorów tego szlaku tzw. SOCS (*ang.* Suppressor of Cytokine Signalling) [47, 127]. Wykazano również, że po podaniu tamoksyfenu zostaje zaktywowane białko fuzyjne STAT-3/receptor estrogenowy, które może utrzymać mESC w stanie niezróżnicowania w obecności FBS (*ang.* Fetal Bovine Serum) [66]. Jest to możliwe dzięki indukcji ekspresji genu *Myc* poprzez ścieżkę LIF-STAT-3 oraz dzięki kanonicznej ścieżce WNT, która stabilizuje i podtrzymuje ekspresję *Myc* [46].

W komórkach ludzkich kluczową rolę w zachowaniu pluripotencji wydaje się odgrywać równowaga pomiędzy BMP (*ang.* Bone Morphogenetic Protein) i TGFβ/Aktywiną oraz szlak zależny od FGF. FGF2, aktywina A, TGFβ1 oraz *Wnt1A* są częstszymi suplementami w mediach nieróżnicujących [29]. Białko TGFβ, aktywina, nodal (białko biorące udział w różnicowaniu do mezodermy), czynniki różnicowania i wzrostu (GDF) oraz BMP należą do nadrodziny TGFβ [103, 110]. Nodal i aktywina, będące ważnymi regulatorami w rozwoju embrionalnym działają poprzez ten sam receptor. W hodowlach *in vitro* stosuje się jednak aktywinę ze względu na większą dostępność w porównaniu z białkiem rekombinowanym nodal. Zastosowanie aktywiny, jako jedynego czynnika w warunkach hodowli hESC bez warstwy odżywczej (*ang.* feeder-free) skutkowało wzrostem ekspresji FGF2, co wskazuje na synergizm i kooperację w zachowaniu pluripotencji. Z kolei GDF biorą udział w zachowaniu stanu niezróżnicowania poprzez blokowanie ścieżki BMP [90]. Receptor białka morfogenetycznego kości BMP jest związany z aktywnością kinazy tyrozynowej i jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek typu I (ALK2, ALK3, ALK6) i typu II (BMPRII, ActRII, ActRIIB). Konsekwencją związania ligandu z receptorem jest fosforylacja białek Smad, które podzielić można na trzy kategorie: (1) R-Smad – biorące udział w przekazywaniu sygnału komórkowego do jądra komórkowego (Smad-1, -2, -3, -5, -8); (2) Co-Smad, które współpracują z R-Smad w przekazywaniu sygnału (Smad-4) oraz (3) anti-Smad (I-Smad), wykazujące działanie antagonistyczne w stosunku do R-Smad oraz Co-Smad (Smad-6, -7). Po związaniu ligandu z receptorem następuje fosforylacja dwóch reszt serynowych w R-Smad i połączenie z Smad-4. Taki kompleks trafia do jądra, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. Ponadto, jądrowe onkoproteiny *c-Ski* i *c-Sno* poprzez wiązanie się do R-Smad i Co-Smad uniemożliwiają dalsze przekazywanie sygnału [110, 126]. W utrzymaniu stanu pluripotencji hESC poprzez TGFβ podkreśla się swoistą dwutorowość. Z jednej strony, TGFβ (lub aktywina) doprowadzają pośrednio do fosforylacji czynników Smad2/3, które są syntetyzowane w stosunkowo dużej ilości. Ufosforylowane Smad2/3 wiążą się do proksymalnego regionu promotora genu czynnika transkrypcyjnego *Nanog* wpływając dodatnio na jego ekspresję. Zadziałanie inhibitorem SB431542 na receptor dla TGF/aktywina skutkowało obniżeniem stopnia fosforylacji Smad2/3 i rozpoczęciem procesu różnicowania. Z drugiej strony, Smad1/5/8, stymulowane przez BMP doprowadzało do utraty stanu niezróżnicowania. Hodowla hESC w obecności BMP4 powodowała wzrost ekspresji Smad1 i w konsekwencji różnicowanie do trofektodermy. Pozostaje jednak niejasne, czy Smad2/3 i Smad1/5/8 konkurują o to samo miejsce w proksymalnej części promotora genu *Nanog*. Zastosowanie inhibitorów dla BMP w ludzkich liniach ESC skutkowało zachowaniem stanu niezróżnicowania w przeciwieństwie do komórek mESC [22, 42, 131]. W zależności od czasu aktywacji ścieżki zależnej od BMP obserwowano różnicowanie do mezodermy lub trofektodermy. Natomiast aktywacji ścieżki

zależnej od aktywności nodal może towarzyszyć różnicowanie do endodermy. Zablokowanie tych dwóch ścieżek ukierunkowuje wzrost hESC do neuroektodermy. Właściwość tą wykorzystano do zastosowania czynnika C-dorsomorfina (*ang.* compound C-dorsomorphin), jako inhibitora kilku receptorów nadrodziny TGF β [135].

BMP4, podobnie jak LIF, jest czynnikiem kluczowym dla zablokowania neurogenezy. Wykazano, że podłoże hodowlane pozbawione surowicy, ale zawierające LIF stymulowało neurogenezę [133]. Po dodaniu BMP4 utrzymywał się natomiast stan niezróżnicowania komórek i zdolność do samoodnowy. W obecności BMP4 nasileniu ulegała kaskada LIF. Ponadto BMP4, poprzez aktywację Smad4, aktywował inhibitory różnicowania (Id_1 oraz Id_3) w wyniku, czego dochodziło do utrzymania stanu pluripotencji i samoodnowy komórek. Ta interakcja zachodziła łatwiej w obecności surowicy. Natomiast w przypadku braku czynnika LIF, BMP4 przeciwdziałał kaskadzie LIF, tzn. współdziałając np. z czynnikami transkrypcyjnymi Smad1, 5, 8, które mają inhibitory wpływ na geny *Id*, doprowadzał do różnicowania [33]. Kolejnym szlakiem, niezwykle istotnym w zachowaniu zdolności komórek macierzystych do samoodnowy jest szlak HEDGEHOG, którego celami działania są zarówno geny białek uczestniczących w szlaku, np. receptora Patched (*Ptch*) i czynników transkrypcyjnych z rodziny *Gli*, jak również czynniki zaangażowane w kontrolowanie podziałów komórkowych, np. cyklina D, cyklina E, a także protoonkogen *Myc* będący aktywatorem transkrypcji kinaz cyklino-zależnych CDK (*ang.* Cyclin-Dependent Kinases) oraz czynniki wzrostu takie, jak EGF i PDGF (*ang.* Platelet-Derived Growth Factor). Przy braku oddziaływania ligandu Hedgehog na przezłonowy receptor *Ptch*, receptor ten hamuje aktywność siedmiodomenowego białka przezłonowego *Smo* (*ang.* Smoothened). Z powodu braku aktywności *Smo* możliwa jest interakcja kompleksu Fused/Sufu z czynnikiem *Gli* w wyniku, czego *Gli* nie przechodzi do jądra komórkowego. Natomiast przyłączenie ligandu Hedgehog do *Ptch* powoduje derepresję *Smo*. Aktywowane białko *Smo* prowadzi do rozszczepienia cytoplazmatycznych białek z rodziny *Gli* (*Gli* 1, 2 i 3), przedostania się ich fragmentów do jądra komórkowego i aktywacji transkrypcji genów docelowych [25, 52, 58, 134].

Silnym bodźcem dla utrzymania stanu pluripotencji jest FGF2 działający jako czynnik wewnątrzkomórkowy. Z drugiej jednak strony FGF2 działający zewnątrzkomórkowo, np. znajdujący się w medium hodowlanym, stymuluje komórki do adhezji i przeżycia, a co więcej wzmacnia aktywność ścieżek zależnych od aktywności A i TGF β 1. Generalnie jednak, ligand FGF2 przyłącza się do receptora FGFR i działa poprzez regulację kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) [2]. W hESC ekspresji ulegają izoformy FGF2-11 i FGF2-13 oraz receptory, których powszechność występowania odpowiada kolejności: FGFR1>FGFR3>FGFR4>FGFR2. Stymulacja czynnikami FGF w warunkach *in vitro* moduluje procesy proliferacji i samoodnowy [129]. Przykładowo, FGF2 jest koniecznym dodatkiem do hodowli komórek hESC niezależnie od obecności komórkowej warstwy odżywczej, w celu utrzymania stanu niezróżnicowania. Częściowo można to wyjaśnić działaniem na ścieżkę Wnt poprzez PI3K. Z drugiej jednak strony nie należy zapominać o szeroko przyjmowanej teorii, która mówi, że kierunek działania ścieżki sygnałowej FGF zależy od aktualnego molekularnego stanu zróżnicowania komórki, obecności określonego zestawu receptorów FGFR na powierzchni komórki oraz interakcji z innymi czynnikami

różnicującymi, wzrostowymi i cytokinami [129]. Tak, więc zastosowanie samego FGF2 w pożywce skutkuje utrzymaniem ekspresji Nanog, a zastosowanie go wraz z BMP4 skutkuje ekspresją wczesnego markera różnicowania do mezodermy Brachyury, co wskazuje na współpracę czynników Nanog i BMP4 w ukierunkowaniu różnicowania do tego listka zarodkowego [61]. Ponadto ścieżka sygnałowa FGF zapobiega tworzeniu neuroektodermy poprzez represję PAX6 (*ang.* Paired box protein), a inaktywacja tej ścieżki np. poprzez wycofanie FGF2 z medium powoduje różnicowanie hESC w kierunku neuroektodermy. Wraz z inhibicją ścieżki FGF następuje wygaszenie sygnalizacji TGF β /Smad2, co skutkuje obniżeniem poziomu Oct4 i Nanog w komórce, a w konsekwencji aktywacją PAX6. Tym niemniej, obecność FGF2 w medium, inhibicja TGF β /SMAD2 i obniżenie poziomu Oct4 i Nanog nie są wystarczające do powstania neuroektodermy [122]. Aktywna ścieżka FGF dodatkowo stymuluje szlak kinaz MEK/ERK oraz PI3K/AKT w hESC, co utrzymuje stan niezróżnicowania. Jest to istotna różnica w porównaniu z mESC, gdzie FGF stymuluje wysoką aktywność ERK, co sprzyja rozpoczęciu procesu różnicowania [5]. Szlak sygnałowy WNT związany jest z regulacją ekspresji genów wpływających na podziały i wzrost komórek macierzystych. Glikoproteiny Wnt pełnią też funkcje w różnicowaniu tkanek i w organogenezie. Na skutek dołączenia reszty palmitynianowej do cysteiny i seryny, proteiny Wnt są nierozpuszczalne w wodzie. W czasie syntezy ulegają glikozylacji w siateczce śródplazmatycznej w wyniku, czego mają zdolność kotwiczenia w błonie cytoplazmatycznej i oddziaływania z siarczanem heparanu komórek znajdujących się w niszy. Przyczyniają się tym samym do utrzymania stanu niezróżnicowania komórek macierzystych [85]. U myszy, Wnt5a i Wnt11 ulegają ekspresji na etapie formowania się blastocysty z moruli. Natomiast nie ulegają lub ulegają w małym stopniu ekspresji na innych etapach rozwoju i w warunkach *in vitro*. W czwartym dniu po zapłodnieniu, podczas implantacji i pod wpływem matczynego estradiolu obserwuje się również czasowy wzrost ekspresji Wnt11. U człowieka obecność mRNA dla Wnt3, Wnt5A i Wnt10B wykryto w ESC; mRNA dla Wnt5A, Wnt8B w kulach embrionalnych; Wnt6, Wnt8B, Wnt10B w komórkach prekursorowych endodermy, natomiast mRNA dla Wnt4, Wnt5A, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B oraz Wnt10A w neuronalnych komórkach prekursorowych [46,74]. Szlak WNT funkcjonuje w ten sposób, że w warunkach prawidłowych, przy braku pobudzenia receptora błonowego zwanego Frizzled, czynniki APC (*ang.* Adenomatous Polyposis Coli), Dvl (*ang.* Dishevelled) oraz kinaza syntazy glikogenu-3 (GSK-3) występują w postaci kompleksu cytoplazmatycznego. W tym stanie GSK-3 przeprowadza fosforylację β -kateniny. Ufosforylowana β -katenina kierowana jest na szlak degradacji w cytoplazmie z udziałem ubikwityny. W przypadku braku β -kateniny, kompleks transkrypcyjny odpowiedzialny za ekspresję genów Wnt-zależnych pozostaje nieaktywny i nie dochodzi do ekspresji tych genów. Natomiast przyłączenie białka Wnt do receptora Frizzled powoduje aktywację białka Dvl, inaktywację GSK-3 oraz brak fosforylacji β -kateniny, która przez to staje się stabilna, ulega jądrowej akumulacji i aktywuje transkrypcję genów docelowych. Prowadzi to do transkrypcji genów Wnt-zależnych, do których należy m.in. cyklina D1 [57, 96, 134].

Wyróżnia się kanoniczną ścieżkę sygnałową Wnt, która odpowiedzialna jest za kierowanie różnicowaniem komórkowym oraz ścieżkę niekanoniczną odpowiedzialną za regulację polarności, adhezji i ruchliwości komórkowej [130]. W zależności od sytuacji ekspresji

ulegają geny ścieżki kanonicznej (MYC, CCND1, AXIN2, FGF20, WISP1, JAG1, DKK1) lub niekanonicznej (CD44, VIM, G3BP2, STX5 [46]). Szlak Notch jest wysoce konserwatywną ścieżką sygnałową zaangażowaną w kontrolę różnicowania komórek macierzystych oraz w rozwój embrionalny, m.in. mięśni, neuronów, układu odpornościowego oraz komórek rozrodczych i krwi [23]. Docelowymi dla tego szlaku są m.in. geny cykliny D1 i Notch 4 oraz geny represorów transkrypcji, np. HES (*ang.* Hairy Enhancer of Split) i HERP (*ang.* HES related Repressor Protein). Szlak ten rozpoczyna się od interakcji jednego z pięciu ligandów DSL (Delta-like1): Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1 lub Jagged2, z jednym z czterech silnie ewolucyjnie konserwatywnych receptorów transbłonowych Notch (Notch 1-4). Po aktywacji receptora, którą wywołuje przyłączenie ligandu, dochodzi do uwolnienia wewnątrzkomórkowej domeny ICN (*ang.* Intracellular Domain of Notch) receptora, dzięki proteolitycznej aktywności proteaz z rodziny ADAM (*ang.* A Disintegrin and Metalloprotease) i γ -sekretazie. ICN przechodzi do jądra komórkowego, w którym łączy się z czynnikami rodziny CSL i koaktywatorami transkrypcji MAML (*ang.* Mastermind-like transcriptional co-activators) prowadząc do ekspresji genów docelowych [3]. Szczególnie interesująca w tym szlaku jest rodzina czynników MAML, dzięki której możliwa jest interakcja szlaku Notch z innymi ścieżkami sygnałowymi, tj. p53, czy Wnt/beta-katenina [67, 76, 91, 114, 134]. Szlak ten ponadto uczestniczy w sterowaniu przeżyciem komórek dzięki kontroli apoptozy. Dzieje się to z jednej strony poprzez regulację fosforylacji kinazy Akt oraz czynnika transkrypcyjnego STAT-3, natomiast z drugiej strony poprzez wpływ na proapoptyczny szlak mitochondrialny. Okazało się bowiem, że wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch powoduje zahamowanie polimeryzacji czynnika Bax powodując inhibicję tego szlaku [91].

Kinaza ERK (*ang.* Extracellular Signal-Regulated Kinase) reprezentuje szlak sygnałowy zależny od MAPK [49]. Kinaza MAPK/ERK należy do rodziny kinaz, do których zalicza się także kinazę Raf (MAPKKK) i Mek (MAPKK). Aktywacja tych kinaz jest związana z białkiem Ras. Przekazywanie sygnału polega na fosforylacji kolejnych kinaz MAPK oraz białek regulujących ekspresję genów. Składową szlaku MAPK jest kinaza Jnk, która może brać udział w aktywnej fosforylacji kolejnych białek w szlaku inicjowanym przez kinazy MAPK. Aktywna kinaza ERK jest transportowana do jądra, gdzie aktywuje białka regulatorowe, które w następstwie aktywują białka transkrypcyjne genów wczesnych. Geny wczesne są odpowiedzialne za syntezę białek regulujących geny docelowe. Szlak kinaz MAPK może regulować proliferację komórek na drodze aktywacji genów cyklu komórkowego np. cyklin fazy G1 [37,128]. Powstała w ten sposób, np. cyklina D1 tworzy aktywny kompleks z Cdk4 (*ang.* Cyclin dependent kinase) lub Cdk6, zdolny do fosforylacji, czyli inaktywacji białka Rb (*ang.* Retinoblastoma) [119]. Szlak Src indukowany jest przyłączeniem do podjednostki α integryny fibrynogenu znajdującego się w ECM. W wyniku tego tworzy się kompleks integryny i Src oraz następuje autofosforylacja reszty tyrozynowej 418 i oddysocjowanie białka kinazy tyrozynowej CSK od kompleksu integryna-Src. W zamian, do kompleksu przyłącza się enzym fosfataza tyrozyny PTP-1B, co wywołuje defosforylację tyrozyny 529. Szlak ten odpowiedzialny jest za organizację cytoszkieletu, migrację komórek oraz ekspresję genów związanej z adhezją komórkową [105].

5.2. Przeniesienie sygnałów z receptorów integrynowych na ścieżki sygnałowe

Rodzaj szlaków sygnałowych w komórkach macierzystych, powiązanych z integrynami zależy od rodzaju przyłączającego się do nich ligandu i od konfiguracji poszczególnych typów podjednostek α i β . Do podjednostki α integryny mogą przyłączać się zarówno składniki nierozpuszczalne ECM, takie jak fibronektyna, kolagen, jak i substancje małocząsteczkowe jak czynniki wzrostu, czy cytokiny. W przypadku przyłączenia wielkocząsteczkowej fibronektyny do receptora integrynowego aktywowane zostaje białko RhoA, które powoduje formowanie tzw. włókien stresowych zbudowanych z nieregularnie ułożonych cząsteczek aktyny. Włókna te przyłączają się do systemu aktyno-miozynowego. Powoduje to grupowanie integryn oraz aktywację związanych z receptorami szlaków sygnałowych m.in. kaskady kinazy ERK. Szlak sygnałowy ERK bierze udział w różnicowaniu hMSC do osteoblastów. Transdukcja sygnału odbywa się w wyniku aktywacji integryny $\alpha 3\beta 1$ poprzez przyłączenie ligandu w postaci lamininy 5 i uruchomienia szlaku sygnałowego ERK. Dochodzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych runx2/CBFA-1 oraz ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie hMSC [38, 48].

Sygnały zależne od integryn są również odpowiedzialne za utrzymanie stałej puli neuronalnych komórek macierzystych. Integryny odgrywają też istotną rolę w rozwoju komórek układu nerwowego [13, 27]. Dzięki podjednostce $\beta 1$ integryn komórki naskórka silnie przylegają do podłoża, a także są utrzymywane w stanie nieodróżnicowania. W przypadku oderwania komórek macierzystych od błony podstawnej oraz braku ponownego kontaktu z nią następuje zmiana ekspresji niektórych genów, zahamowanie proliferacji oraz zmniejszenie syntezy białka Bcl-2, co aktywuje proces apoptozy [1]. Są to szlaki, w których ligandami są wielkocząsteczkowe substancje stanowiące część białkowego szkieletu dla ECM.

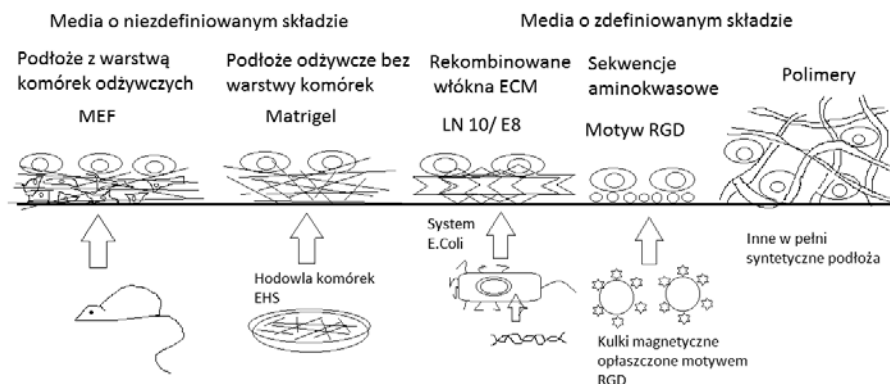
Integryny mogą także oddziaływać ze składnikami płynnej macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku szlaku Notch są to czynniki wzrostowe. Integryny współdziałają ze szlakiem Notch w macierzystych komórkach nerwowych, wpływając na ich rozwój i funkcjonowanie neurosfery. Ponadto, sygnalizacja Notch występuje podczas embriogenezy naskórka i odpowiada za jego wykształcenie oraz powstanie mieszków włosowych i gruczołów łojowych [10]. Czynniki wzrostowe powodują aktywację integryn, które powodują zwiększoną internalizację ICN do wnętrza jądra. W ten sposób regulują poziom tego białka w komórce oraz wewnątrz jądra komórkowego, co ma znaczenie w aktywacji receptora Notch [11].

Integryny, wraz z czynnikami wzrostu biorą udział w funkcjonalnej modulacji receptora kinazy tyrozynowej. Uczestniczą w utrzymywaniu funkcji komórkowych zależnych od receptora kinazy tyrozynowej, takich jak przeżywalność, proliferacja i migracja [59]. Przyłączenie ligandów do receptorów integrynowych dostarcza wewnątrzkomórkowego sygnału, wywołującego kaskadę fosforylacji tyrozyny. W tym procesie biorą udział także białka odpowiedzialne za organizację cytoszkieletu oraz czynniki transkrypcyjne niezbędne do syntezy białek biorących udział w neurogenezie. Szlak związany jest z kinazą FAK (*ang.* Focal Adhesion Kinase), która odgrywa ważną rolę w przewodzeniu sygnału z ECM do wnętrza komórki oraz w migracji komórek we wczesnym rozwoju embrional-

nym [60,116]. Wpływ kinazy FAK na proliferację i różnicowanie komórek jest związany z aktywacją szlaków kinazy MAPK oraz kinazy 3 fosfatydyloinozytolu PI3 (*ang.* Phosphoinositol-3-Kinase) [10]. Szlaki te są odpowiedzialne za aktywację sygnałów promujących przeżywalność ESC, które są prekursorami komórek neuronalnych [36].

6. Modele doświadczalne w badaniach transdukcji sygnałów mikrośrodowiskowych do komórek macierzystych

Jednym z podstawowych warunków w badaniach *in vitro* relacji między ECM a komórkami macierzystymi w kontekście długotrwałego utrzymania ich podstawowych właściwości biologicznych, jak samoodnawialność, proliferacja, zdolność do wielokierunkowego różnicowania, jest stworzenie komórkom macierzystym mikrośrodowiska zbliżonego do ich niszy *in vivo* (Rysunek 3).



Rys. 3. Modyfikacje podłoża stosowanych do komórek macierzystych. Rozwój badań nad podłożami dla ESC zmierza do uniknięcia ryzyka transmisji związków ksenogennych i określenia roli zdefiniowanych składników na utrzymanie stanu niezróżnicowania

Powszechnie stosuje się podłoża typu 'feeder layer', w których warstwą odżywczą są komórki określonego rodzaju. Przykładowo, w celu namnożenia hESC w stanie niezróżnicowania zastosowano mitotycznie nieaktywne mysie płodowe fibroblasty (MEF), jako źródło licznych czynników wzrostowych oraz składników ECM. Do tej pory wszystkie przyjęte do badań przez National Institutes of Health linie ESC były wyprowadzane na MEF lub na medium kondycjonowanym z mysich płodowych fibroblastów [109]. Wiązało się to jednak z ryzykiem transmisji czynników ksenogennych na komórki ludzkie, a poza tym ludzkie komórki macierzyste różnią się od mysich reakcją na niektóre cząsteczki sygnałowe, np. LIF. Przykładowo, kwas N-glikolilneuraminowy (Neu5Gc), mysy kwas sialowy wywoływał odpowiedź immunologiczną po transplantacji hESC hodowanych wcześniej na MEF [65]. Mitotyczną inaktywację MEF przeprowadza się albo poprzez dodanie mitomycyny c [44] albo gamma-irradiację, która osłabia zdolność komórek do proliferacji i indukuje apoptozę, przez co zaburza wydzielanie czynników wzrostowych i składników ECM hamujących proces różnicowania [121]. Aby uniknąć podobnych

problemów wprowadzono hodowlę na komórkach pochodzenia ludzkiego w obecności surowicy z krwi pępowinowej. Hodowla hESC na ludzkich nabłonkowych komórkach owodni (hAEC) w obecności 10% surowicy krwi pępowinowej skutkowałą 6–10-krotnie większą ekspresją FGF, Oct-4, Nanog, Sox-2, Rex i TERT w porównaniu z hodowlą hESC na MEF [53]. Używanie podłoża typu ‘feeder layer’ niesie jednak ze sobą ryzyko transmisji czynników bakteryjnych np. w przypadku MEF – *Mycoplasma sp.*, [17] oraz czynników wirusowych i prionów pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego [18].

Kolejnym etapem na drodze wytwarzania odpowiednich podłoży hodowlanych stwarzających optymalne warunki hodowli hESC było zastosowanie matrigelu składającego się z licznych czynników wzrostowych oraz składników macierzy. Jest to ekstrakt z hodowli komórek mysiego mięsaka Engelbreth–Holm–Swarm. Składa się ze składników błony podstawnej: laminin, kolagenu IV, siarczanu heparanu, proteoglikanów (głównie perlekanu), entaktyny, ale również z enzymów degradujących i ich inhibitorów oraz z licznych czynników wzrostowych, jak: EGF, FGF2, IGF-1, PDGF, NGF, TGF- β . Do głównych ograniczeń stosowania matrigelu zaliczyć można brak w powtarzalności cech ilościowych składników poszczególnych partii tego podłoża [50] oraz ryzyko transmisji wirusa LDEV (*ang.* Lactate Dehydrogenase Elevating Virus) [12]. Hodowle proliferujących hESC w stanie niezróżnicowania można prowadzić także na podłożach opłaszczonych określonym, pojedynczym typem rekombinowanego białka macierzy. Białkiem tym jest np. rekombinowana laminina 511 [99], witronektyna (*ang.* rh vitronectin) [7], czy E – kadheryna [79]. Witronektyna jest białkiem, którego obecności nie stwierdzono w matrigelu, a jego właściwości w hodowli komórek macierzystych wynikają z wiązania się do integryny $\alpha V\beta 1$ [7]. Medium hodowlanym dla wszystkich trzech hodowli był mTeSR1, czyli pożywka pozbawiona dodatku serum, co znacząco obniża ryzyko kontaminacji i niepowtarzalności wyników. Ponadto LA-511 oraz witronektyna i E – kadheryna wykazują takie same właściwości w hodowli mysich komórek, co jest asumptem do stwierdzenia, że mechanizm utrzymywania pluripotencji poprzez te białka jest ewolucyjnie konserwatywny.

Wykazano, że heterodimery integryn $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha 5\beta 1$ oraz $\alpha 8\beta 1$ rozpoznają i wiążą się do trójaminokwasowej sekwencji arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD), a sekwencja ta obecna jest w fibronektynie oraz witronektynie [35] oraz wielu innych składnikach ECM, fibrynogenie, protrombinie, tencynie, trombospondynie, w czynniku von Willebrand’a itd. Wydaje się, że tak jak opisany wcześniej fragment E8 jest w stanie zastąpić całe podjednostki LA-511, tak sekwencja RGD może zastąpić działanie fibronektyny i witronektyny. Motyw ten wykorzystuje się również w hodowlach 3D mESC. M.in. skonstruowano przestrzenny model niszy komórkowej składający się z glikolu polietylenowego (PEG) oraz ligandów funkcyjnych. Są to: fragment RGDSP pochodzący z fibronektyny, rozpoznawany przez integryny $\alpha 5\beta 1$ oraz $\alpha V\beta 1$, sekwencja pochodząca z induktora angiogenezy CCN1-TTWSQ specyficzna do $\alpha 6\beta 1$ oraz sekwencja 9-amino-kwasowa (AEIDGIEL) pochodząca z tenascyny, specyficzna do integryny $\alpha 9\beta 1$ [55, 120]. Te ligandy to sekwencje aminokwasów, do których wiążą się specyficzne podjednostki mysich integryn, co aktywuje ścieżkę kinazy Akt1, a w konsekwencji Smad-1/5/8 i utrzymuje stan pluripotencji bez dodatku LIF [56]. W hodowlach komórek macierzystych stosuje się również suplementację medium związkami drobnocząsteczkowymi oraz modulację

hodowli poprzez zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu. Przykładowo, utrzymanie mysich ESC linii D3ES (ATCC:CRL-1934) w stanie pluripotencji możliwe było w hodowli na medium z pochodnymi indolu. Po 30 dniach takiej hodowli, komórki zachowały ekspresję Oct3/4, Rex-1, Sox2 i Nanog, na prawie takim samym poziomie, jak mESC hodowane z LIF oraz zdolność do różnicowania w komórki trzech listków zarodkowych. Co ważne wzrosła ekspresja SSEA-1, czyli powierzchniowego markera mESC. Ocena wpływu testowanych związków drobnocząsteczkowych odbywała się poprzez analizę aktywności enzymu błonowego – fosfatazy alkalicznej (ALP). Aktywna ALP przekształca *para*-nitrofenylofosforan (pNPP) w *p*-nitrofenol, którego absorbancja mierzona jest przy długości fali 405 nm. Aktywność ALP ulega obniżeniu w czasie różnicowania komórek. Z 15 000 przetestowanych związków w systemie pomiaru aktywności ALP wyselekcjonowano 8 związków, m.in. pochodne indolu ID-1 oraz ID-8, które utrzymywały pluripotencję. Aktywność ALP zależna jest od dawki ID. Gęste, nieodróżnicowane kolonie mESC pod względem morfologicznym były podobne do kolonii wyhodowanych na medium z LIF. Wsunięto hipotezę, że ID-8 aktywuje Sox-2 i Oct-4, przez co podtrzymuje ekspresję Nanog, a tym samym umożliwia prowadzenie długoterminowej hodowli mESC na podłożu pozbawionym LIF [70]. Kolejnym związkiem, który testowano jako czynnik mogący utrzymać hodowane mESC w stanie nieodróżnicowania był kwas retinowy. Kwas retinowy jest aktywną pochodną witaminy A, która wywiera wpływ na procesy różnicowania i rozwoju. Endogenne cząsteczki tego kwasu są wykrywane w stadium niezaimplantowanej blastocysty. Konsekwencje tej fizjologicznej i tymczasowej ekspresji nie są jednak znane. Kierunek różnicowania zależny jest od stężenia i czasu podaży kwasu. Z drugiej, jednak strony wiadomym jest, że kwas retinowy zwiększa ekspresję LIF, Wnt3a, Wnt5a i Wnt6 przez, co jest w stanie cofnąć wczesne etapy różnicowania – do stanu pluripotencji. Takie swoiste „cofnięcie zegara” może nastąpić nawet po 8 dniowej hodowli na podłożu bez dodatku LIF i MEF [125]. Również witamina C dodana do podłoża może istotnie poprawiać warunki hodowli ESC. Jej dodanie do hodowli hESC w stężeniu 100 μM skutkowało podwyższeniem ekspresji Oct4 [40]. Witamina C jest naturalnym antyoksydantem i jako taka zapobiegała działaniu reaktywnych form tlenu, które obniżały ekspresję Oct-4, TRA-1-60, Nanog i Sox-2 przyczyniając się do różnicowania komórek macierzystych w kierunku mezodermy.

Zastosowanie kwasu asparaginowego w stężeniu 250 μM , jako suplementu w hodowli ludzkich MSC pobranych podskórnie skutkowało wzrostem proliferacji komórkowej oraz indukcją ekspresji markerów pluripotencji Oct-4 i Sox-2, przy jednoczesnym zachowaniu ekspresji markerów mezenchymalnych: CD105 oraz CD13 [93].

Środowisko nisz komórek macierzystych jest narażone na wahania stężenia tlenu. Dla rozwijającego się zarodka przed implantacją jedynym źródłem tlenu jest dyfuzja z płynów w obrębie jajowodów i macicy. Ciśnienie tlenu w drogach rodnych jest o ponad połowę niższe od ciśnienia atmosferycznego [16]. Dlatego po zaimplanowaniu, do etapu waskularyzacji zarodek rozwija się w środowisku hipoksji. Warunki tlenowe wydają się w istotny sposób determinować funkcjonowanie komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. Hodowla ludzkich komórek mezenchymalnych szpiku w warunkach hipoksji wpływała na ujednoczenie ich subpopulacji i zwiększenie tempa samoodnowy. Ponadto widoczny

był wzrost ekspresji podjednostek integryny $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 11$, αV , $\beta 1$ i $\beta 3$ w stosunku do hodowli z normatywnym stężeniem O_2 . W tym też upatruje się zwiększone tempo migracji komórek, którą testowano na 4 typach podłoży: polistyren, Col1, fibronektyna i laminina. Największy stopień migracji wykazano na podłożu z lamininą i kolagenem [102]. W hodowli hESC na ludzkich płodowych komórkach wątroby (hFLSC) transfekowanych w sposób umożliwiający stałą i wysoką ekspresję czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją HIF-1 α (*ang.* Hypoxia-inducible Factor-1 alpha). HIF-1 α indukuje ekspresję Nanog i Oct-4 oraz FGF2 i SDF-1 α [41], który jest ważnym czynnikiem wpływającym na migrację komórek macierzystych w zależności od jego stężenia i lokalizacji. Jest ligandem dla receptora CXCR4 obecnego na powierzchni komórek macierzystych. Jego niskie stężenie w niszach sprzyja utrzymaniu tych komórek w danej lokalizacji [118]. Dotychczasowe efekty badań *in vitro* nad relacjami ECM-komórki macierzyste ukazują na wieloczynnikowość regulacji pluripotencji. W celu doprowadzenia do udanych aplikacji klinicznych komórek macierzystych konieczne jest prowadzenie dalszych badań przy zastosowaniu podłoży imitujących naturalny skład ECM, z uwzględnieniem monitorowania zmian ścieżek sygnałowych w odpowiedzi na określony bodziec. 7.

Streszczenie

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) jest głównym składnikiem mikrośrodowiska komórek macierzystych *in vivo*. W kształtowaniu fenotypu komórek nabłonkowych, w warunkach naturalnych uczestniczy również błona podstawna. Poznanie zależności pomiędzy ECM a regulacją określonych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych może być przełomowym punktem w hodowli i zastosowaniu embrionalnych komórek macierzystych (ESC) w medycynie regeneracyjnej. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się komórki pluripotencjalne zachowujące niską ekspresję antygenów zgodności tkankowej HLA oraz brak zdolności do transformacji nowotworowej. Wiele z tych cech, a także brak wątpliwości natury etyczno-moralnej, wskazuje na komórki macierzyste pochodzące z tkanek okołopłodowych (z łożyska, płynu owodniowego, czy pępowiny), jako atrakcyjne źródło ESC dla terapii komórkowej. Istotne dla uzyskania odpowiednich komórek jest prowadzenie hodowli na podłożach o ściśle określonym składzie, nawiązującym do charakterystyki półpłynnej ECM. Skład i proporcje składników ECM wpływają na utrzymanie stanu niezróżnicowania lub indukują proces różnicowania komórek. W podłożach syntetycznych stosuje się m.in. rekombinowane lamininy, fibronektynę, witronektynę lub e-kadherynę. Oddziałując z receptorami błonowymi komórek – integrynami, składowe ECM aktywują określone ścieżki sygnałowe (np. FAK, MEK i ERK) i determinują wiele funkcji biologicznych. Transdukcja sygnału odbywa się poprzez białka cytoszkieletu oraz białka sygnalizacyjne. Niektóre spośród szlaków zależnych od integryn promują proliferację i przeżywalność komórek, natomiast inne wywołują różnicowanie. Zastosowanie modeli badawczych opartych na podłożach imitujących ECM w badaniach interakcji ECM-komórka może pomóc w wyjaśnieniu mechanizmu stabilizującego stan pluripotencji komórek macierzystych, a w szczególności przyczynić się do określenia, czy i które składniki ECM wspierają stan niezróżnicowania i samoodnowy komórek macierzystych.

Pozwoli to na prowadzenie skutecznej kontroli namnażania i hodowli hESC w warunkach *in vitro* w celu osiągnięcia odpowiedniej liczby komórek w stanie niezróżnicowania oraz przygotowania *ex vivo* terapii komórkowej. Umożliwi celowe sterowanie losami komórek macierzystych *in vivo*, w tym komórek iPSC, w terapiach chorób genetycznych i metabolicznych oraz w regeneracji uszkodzonych narządów. W onkologii, przyczyni się do wzbogacenia metod terapii przeciwnowotworowej, gdyż zmiany w składzie i funkcji ECM mogą być czynnikiem istotnym dla transformacji w kierunku rakowych komórek macierzystych (*ang.* Cancer Stem Cells).

Literatura

- [1] Barthel R., Aberdam D., *Epidermal stem cells*, JEADV, 2005, 19, 405–413.
- [2] Berrier A., Yamada M., *Cell–Matrix Adhesion*, J. Cell. Physiol., 2007, 213, 65–573.
- [3] Blanpain C., Fuchs E., *Epidermal stem cells of the skin*, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 2006, 22, 339–73.
- [4] Boiani M., Sholer H., *Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells*. Nat. Rev. Mol. Cell. Mol., 2005, 6, 872–884.
- [5] Boldrin L., Morgan J., *Human satellite cells: identification on human muscle fibres*. PLoS Curr., 2012, Jan. 19; 3:RRN1294. doi: 10.1371/currents.RRN1294. 19 (8–9) 604–604.
- [6] Borowska K., Jędrych B., Czerny K. i in., *Udział integrzyn w procesach fizjo- i patologicznych*, Pol. Merk. Lek. XXI, 2006, 124, 362–366.
- [7] Braam S., Zeinstra L., Litjens S. i in., *Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin*. Stem Cells, 2008; 26, 2257–65.
- [8] Brafman D., Phung C., Kumar N. i in., *Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions.*, Cell Death Differ., 2012, 16. doi: 10.1038/cdd.2012.138.
- [9] Brizzi M., Tarone G., Defilippi P., *Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche*, Curr. Opin. Cell Biol., 2012, 24, 645–51.
- [10] Campos L., Leone D., Relvas J., i wsp., *$\beta 1$ integrins activate a MAPK signaling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance*, Development, 2004, 131, 3433–3444.
- [11] Campos L., Decker L., Taylor V. i in., *Notch, Epidermal Growth Factor Receptor, and $\beta 1$ -Integrin Pathways Are Coordinated in Neural Stem Cells*, J. Biol. Chem., 2006, 281, 5300–5309.
- [12] Carlson J., Garg R., Compton S., Zeiss C., Uchio E., *Poliomyelitis in SCID Mice Following Injection of Basement Membrane Matrix Contaminated with Lactate Dehydrogenase-elevating Virus.*, Proceedings of the 59th AALAS National Meeting, 2008, Indianapolis.
- [13] Chen S., Fitzgerald W., Zimmerberg J. i in., *Cell-cell and cell-extracellular matrix interaction regulate embryonic stem cell differentiation*, Stem Cells, 2007, 25, 553–561.
- [14] Chen Y., Dong Z., Jiang L. i in., *Mouse primed embryonic stem cells could be maintained and reprogrammed on human amnion epithelial cells.*, Stem Cells Dev. 2013, 22, 320–9.
- [15] Chi C., Wang S., Prenter A., i wsp., *Basement membrane zone and dermal extracellular matrix of the vulva, vagina and amnion: An immunohistochemical study with comparison with non-reproductive epithelium*, Australas. J. Dermatol., 2010, 51, 243–247.

- [16] Chul-Ho J., Hyu-Jong L., Jong-Ho C. i in., *Hypoxia-inducible Factor-1 α Inhibits Self-renewal of Mouse Embryonic Stem Cells in Vitro via Negative Regulation of the Leukemia Inhibitory Factor-STAT3 Pathway*, J. Biol. Chem., 2007, 282, 13672–9.
- [17] Cobo F., Cortés J., Cabrera C. i in., *Microbiological contamination in stem cell cultures*, Cell Biol. Int., 2007, 31, 991–5.
- [18] Cobo F., Talavera P., Concha A., *Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks*, Virology, 2006, 347, 1–10.
- [19] Colognato H., Yurchenco P., *Form and function: the laminin family of heterotrimers*, Dev. Dyn., 2000, 218, 213–34.
- [20] Crouch E., Balian G., Holbrook K. i in., *Amniotic fluid fibronectin. Characterization and synthesis by cells in culture*, J. Cell Biol., 1978, 78, 701–15.
- [21] Dahéron L., Opitz S., Zaehres H. i in., *LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells.*, Stem Cells., 2004, 22, 770–8.
- [22] Daylon J., Levine A., Besser D. i in., *TGF β /activin/ nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells.*, Development, 2005, 132, 1273–1282.
- [23] de la Pompa J., Wakeham A., Correia K., *Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis*, Development, 1997, 124, 1139–1148.
- [24] Díaz-Prado S., Muiños-López E., Hermida-Gómez T. i in., *Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine*, Differentiation, 2011, 81, 162–71.
- [25] di Maglian M., Hebrok M., *Hedgehog Signalling in Cancer Formation and Maintenance*, Nature, 2003, 3, 903–911.
- [26] Domogatskaya A., Rodin S., Boutaud A. i in., *Stem Cells, Laminin-511 but not - 332, - 111, or - 411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro*, 2008, 26, 2800–9.
- [27] Flanagan F., Rebaza L., Derzic S. i in., *Regulation of human precursor cells by laminin and integrins*, J. Neurosci. Res., 2006, 83, 45–856.
- [28] Fong C., Richards M., Manasi N. i in., *Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly*, Reprod. Biomed. Online, 2007, 15, 708–18.
- [29] Frank S., Zhang M., Schöler H. i in., *Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions*. PLoS One. 2012, 7(7):e41958. Epub 2012 Jul 30.
- [30] Graf U., Casanova E., Cinelli P., *The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells*, Genes, 2011, 2, 280–297.
- [31] Grueterich M., Espana E., Tseng S., *Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche*, Surv. Ophthalmol., 2003, 48, 631–46.
- [32] Hall P., Lathia J., Caldwell M. i in., *Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media*, BMC. Neurosci., 2008, 9, 71–81.
- [33] Hirai H., Karian P., Kikyo N., *Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor*, Biochem. J., 2011, 438, 11–23.
- [34] Hongisto H., Vuoristo S., Mikhailova A. i in., *Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture*, Stem Cell Res., 2012, 8, 97–108.
- [35] Hynes R., *Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines*, Cell, 2002, 110, 673–687.

- [36] Ishii S., Okada Y., Kadoya T. i in., *Stromal cell-secreted factors promote the survival of embryonic stem/progenitor cells via the activation of MAPK and PI3K-Akt pathway*, J. Neurosci. Res., 2010, 88, 722–734.
- [37] Jadowiec J., Koch H., Zhang X. i in., *Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway*, J. Biol. Chem., 2004, 279, 53323–30.
- [38] Jaiswal R., Jaiswal N., Bruder S. i in., *Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase*, J. Biol. Chem., 2000, 275, 9645–9652.
- [39] Ji S., Xiao S., Luo P. i in., *An epidermal stem cells niche microenvironment created by engineered human amniotic membrane*, Biomaterials, 2011, 32, 7801–7811.
- [40] Ji A., Ku S., Cho M. i in., *Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesodermal lineage*, Exp. Mol. Med., 2010, 42, 175–86.
- [41] Ji L., Liu Y., Yang C. i in., *Self-renewal and pluripotency is maintained in human embryonic stem cells by co-culture with human fetal liver stromal cells expressing hypoxia inducible factor 1alpha*, J. Cell Physiol., 2009, 221, 54–66.
- [42] Jiang J., Ng H., *TGFbeta and SMADs talk to NANOG in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2008, 3, 127–8.
- [43] Joo S., Ko I., Atala A. i in., *Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research*, Arch. Pharm. Res., 2012, 35, 271–80.
- [44] Jozefczuk J., Drews K., Adjaye J., *Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells*, J. Vis. Exp., 2012, 21, 64 doi:pri:3854. 10.3791/3854.
- [45] Katoh M., *Network of WNT and other regulatory signaling cascades in pluripotent stem cells and cancer stem cells*, Curr. Pharm. Biotechnol., 2011, 12, 160–70.
- [46] Katoh M., *WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine*, Curr. Drug. Targets., 2008, 9, 565–70.
- [47] Keisuke O., Shinya Y., *Intracellular Signaling Pathways Regulating Pluripotency of Embryonic Stem Cells*, Curr. Stem Cell Res. Ther., 2006, 1, 103–111.
- [48] Klees R., Salaszyk R., Kingsley K. i in., *Laminin-5 Induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells through an ERK-dependent Pathway Molecular*, Biol. Cell., 2005, 16, 881–890.
- [49] Klimaszewska-Wiśniewska A., Nowak J., Żuryń A. i in., *Involvement of Rho proteins in G1 phase cell cycle progression*, Postępy Hig. Med. Dośw., 2013, 67, 15–25.
- [50] Kohen N., Little L., Healy K., *Characterization of Matrigel interfaces during defined human embryonic stem cell culture*, Biointerphases, 2009, 4, 69–79.
- [51] Kuçi S., Kuçi Z., Latifi-Pupovci H., *Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine*, Curr. Stem Cell Res. Ther., 2009, 4, 107–17.
- [52] Kumar V., Cotran R., Robbins S., Patologia humana, Vinay Kumar, Jon. C. Aster, Nelson Fausto, Abul K. Abbas eds., Elsevier Health Sciences, 2008, 204–205.
- [53] Lai D., Cheng W., Liu T. i wsp., *Optimization of Culture Conditions to Support Undifferentiated Growth of Human Embryonic Stem Cells*. Cell. Reprogram., 2010, 12, 305–314.

- [54] Larsen M., Artym V., Green J. i in., *The matrix reorganized: Extracellular matrix remodeling and integrin signaling*, Curr. Opin. Cell. Biol., 2006, 18, 463–71.
- [55] Lee S., Yun J., Jo Y. i in., *Engineering integrin signaling for promoting embryonic stem cell self-renewal in a precisely defined niche*, Biomaterials, 2010, 31, 1219–26.
- [56] Lee S., Yun J., van der Vlies A. i in., *Long-term maintenance of mouse embryonic stem cell pluripotency by manipulating integrin signaling within 3D scaffolds without active Stat3*, Biomaterials, 2012, 33, 8934–42.
- [57] Lenart K., Szyda A., Kiełbasiński M., *Kliniczne skutki oporności wielolekowej w nowotworach*, Onkologia w praktyce klinicznej, 2005, 1, 18–26.
- [58] Lesiak A., Sysa-Jędrzejowska A., Narbutt J., *Rola ścieżki przekazywania sygnału Sonic Hedgehog w procesie skórnej kancerogenezy*, Pol. Merk. Lek., 2010, 29, 141–143.
- [59] Li B., Ma W., Zhang L. i in., *Activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) and extracellular regulated kinases (Erk1/2) is involved in muscarinic receptor-mediated DNA synthesis in neural progenitor cells*, J. Neurosci., 2001, 21, 1569–79.
- [60] Lim Y., Han I., Jeon J. i in., *Oh ES Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts*, J. Biol. Chem., 2004, 9, 29060–5.
- [61] Liu W., Wen Y., Bi P. i in., *Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation*, Development, 2012, 139, 2857–65.
- [62] Lo B., Parham L., *Ethical Issues in Stem Cell Research*, Endocr Rev., 2009, 30, 204–213.
- [63] Lu P., Weaver V., Werb Z., *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression*, J. Cell Biol., 2012, 196, 395–406.
- [64] Mahoney Z., Stappenbeck T., Miner J., *Laminin $\alpha 5$ influences the architecture of the mouse small intestinal mucosa*, J. Cell Sci., 2008, 1, 2493–502.
- [65] Martin M., Muotri A., Gage F. i in., *Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid*, Nat. Med., 2005, 11, 1–5.
- [66] Matsuda T., Nakamura T., Nakao K. i in., *STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells*, EMBO. J., 1999, 18, 4261–9.
- [67] McElhinny A., Li J., Wu L., *Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways*, Oncogene, 2008, 27, 5138–5147.
- [68] Meng Y., Eshghi S., Li Y. i in., *Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture*, FASEB. J., 2010, 24, 1056–1065.
- [69] Mitjavila-Garcia M., Simonin C., Peschanski M., *Embryonic stem cells: meeting the needs for cell therapy*, Adv. Drug. Deliv. Rev., 2005, 57, 1935–43.
- [70] Miyabayashi T., Yamamoto M., Sato A. i in., *Indole Derivatives Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Long-Term Culture*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2008, 72, 1242–1248.
- [71] Miyazaki T., Futaki S., Hasegawa K. i in., *Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, 375, 27–32.
- [72] Miyazaki T., Futaki S., Suemori H. i in., *Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expression of dissociated human pluripotent stem cells*, Nat. Commun., 2012, doi: 10.1038/ncomms2231.
- [73] Modena A., Fieni S., *Amniotic fluid dynamics*, Acta Biomed., 2004, 75, 11–3.

- [74] Mohamed O., Dufort D., Clarke H. i in., *Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation*, Biol. Reprod., 2004, 71, 417–24.
- [75] Mould P., Askari J., Humphrie M., *Molecular Basis of Ligand Recognition by Integrin $\alpha 5\beta 1$. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH₂-terminal repeats of the α subunit*, JBC. Papers in Press., 2000, 275, 20324–3.
- [76] Möhle R., Bautz F., Rafii S., *The Chemokine Receptor CXCR-4 Is Expressed on CD34+Hematopoietic Progenitors and Leukemic Cells and Mediates Transendothelial Migration Induced by Stromal Cell-Derived Factor-1*, Blood, 1998, 91, 4523–4530.
- [77] Mruthyunjaya S., Manchanda R., Godbole R. i in., *Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010, 391, 43–8.
- [78] Nagano K., Yoshida Y., Isobe T., *Cell surface biomarkers of embryonic stem cells*, Proteomics, 2008, 8, 4025–35.
- [79] Nagaoka M., Si-Tayeb K., Akaike T. i in., *Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum*, BMC. Dev. Biol., 2010, 10–60.
- [80] Nagase H., Visse R., Murphy G., *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*, Cardiovasc. Res., 2006, 69, 562–573.
- [81] Negishi Y., Omata D., Iijima H., *Preparation and characterization of laminin-derived peptide AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool*, Biol. Pharm. Bull., 2010, 33, 1766–9.
- [82] Niknejad H., Peirovi H., Jorjani M. i in., *Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering*, Eur. Cell. Mater., 2008, 15, 88–99.
- [83] Nishiuchi R., Takagi J., Hayashi M. i in., *Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins*, Matrix Biol., 2006, 25, 189–197.
- [84] Niwa H., Ogawa K., Shimosato D. i in., *A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells*, Nature, 2009, 460, 118–22.
- [85] Nusse R., *Wnt signaling and stem cell control*, Cell Research, 2008, 18, 523–527.
- [86] Okita K., Yamanaka S., *Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 2011, 366, 2198–207.
- [87] Oyama N., Bhogal B., Carrington P. i in., *Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immunoblotting*, Br. J. Dermatol., 2003, 148, 939–44.
- [88] Parry S., Strauss J., *3rd. Premature rupture of the fetal membranes.*, N. Engl. J. Med., 1998, 338, 663–70.
- [89] Patarroyo M., Tryggvason K., Virtanen I., *Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis*, Cancer Biology, 2002, 12, 197–207.
- [90] Pera M., Tam P., *Extrinsic regulation of pluripotent stem cells*. Nature, 2010, 465, 713–720.
- [91] Perumalsamy L., Nagala M., Sarin A., *Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival*, PNAS U S A, 2010, 107, 6882–7.
- [92] Pfarrer C., Hirsch P., Guillomot M. i in., *Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes*, Placenta, 2003, 24, 588–97.

- [93] Potdar P., D'Souza S., *Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and Sox-2*, Heman Cell., 2010, 23, 152–155.
- [94] Prusa A., Marton E., Rosner M. i in., *Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?*, Hu. Reprod., 2003, 18, 1489–93.
- [95] Rendal-Vázquez M., San-Luis-Verdes A., Yebra-Pimentel-Vilar M. i in., *Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane*, Cell Tissue Bank., 2012, 13, 513–9.
- [96] Reya T., Clevers H., *Wnt signalling in stem cells and cancer*, Nature, 2005, 434, 843–850.
- [97] Reya T., Duncan A., Ailles L., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*, Nature, 2003, 423, 409–414.
- [98] Risteli L., von Koskull H., Autio-Harmanen H. i in., *Amniotic fluid laminin and type IV collagen in normal and pathological pregnancies*, Clin. Chim. Acta, 1985, 147, 283–90.
- [99] Rodin S., Tryggvason K., Domogatskaya A. i in., *Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511*, Nat. Biotechnol., 2010, 28, 611–615.
- [100] Chan R., Rodriguez M., McFetridge P., *The human umbilical vein with Wharton's jelly as an allogeneic, acellular construct for vocal fold restoration*, Tissue Eng. Part A, 2009, 15, 3537–46.
- [101] Sadowsky D., Adams K., Gravett M. i in., *Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model*, Am. J. Obstet. Gynecol., 2006, 195, 1578–1589.
- [102] Saller M., Prall W., Docheva D. i in., *Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2012, 423, 379–85.
- [103] Santibañez J., Quintanilla M., Bernabeu C., *TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions*, Clin. Sci. (Lond.), 2011, 121, 233–51.
- [104] Sezen D., Perni U., Herway C. i in., *Hyaluronan modulates pro-inflammatory immune activity in the mid-trimester amniotic cavity*, J. Reprod. Immunol., 2009, 82, 89–93.
- [105] Shattil J., *Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling*, Trends in Cell Biol., 2005, 15, 399–403.
- [106] Siegel N., Rosner M., Hanneder M., *Human amniotic fluid stem cells: a new perspective*, Amino Acids, 2008, 35, 291–3.
- [107] Sikora M., Olszewski W., *Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne*, Postępy Hig. Med. Dośw., 2004, 58, 202–208.
- [108] Sobolewski K., Bańkowski E., Chyczewski L. i in., *Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly*, Biol. Neonate, 1997, 71, 11–21.
- [109] Stacey G., Cobo F., Nieta A., *The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: Challenges and solution.*, J. Biotechnol., 2006, 125, 583–588.
- [110] Stepień-Wyrobiec O., Hrycek A., Wyrobiec G., *Transforming growth factor beta (TGF-beta): Its structure, function, and role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Postępy Hig. Med. Dośw., 2008, 62, 688–693.
- [111] Taghizadeh R., Cetrulo K., Cetrulo C., *Wharton's Jelly stem cells: future clinical application.*, Placenta, 2011, 32, 311–5.
- [112] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. i in., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell, 2007, 131, 861–872.

- [113] Takashima S., Yasuo M., Sanzen N. i in., *Characterisation of laminin isoforms in human amnion*, Tissue Cell., 2008, 40, 75–81.
- [114] Tan B., Visan I., Guidos J. i in., *Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T-cell development*, Nature immunology, 2005, 6, 671–679.
- [115] Tate M., Garcia A., Keselowsky B. i in., *Specific beta1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum*, Mol. Cell Neurosci., 2004, 27, 22–31.
- [116] Totoń E., Rybczyńska M., *The characteristics of focal adhesion kinase (FAK) and its role in carcinogenesis*, Postępy Hig. Med. Dośw., 2007, 61, 303–309.
- [117] Trovato L., De Fazio R., Annunziata M. i in., *Pluripotent stem cells isolated from human amniotic fluid and differentiation into pancreatic β -cells*, J. Endocrinol. Invest., 2009, 32, 873–876.
- [118] Vagima Y., Lapid K., Kollet O., *Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis*, Methods Mol. Biol., 2011, 750, 277–89.
- [119] Vermeulen K., Van Bockstaele D., Berneman Z., *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*, Cell Prolif., 2003, 36, 131–149.
- [120] Villa-Diaz L., Nandivada H., Ding J. i in., *Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells*, Nat. Biotechnol., 2010, 28, 581–3.
- [121] Villa-Diaz L., Pacut C., Slawny L. i in., *Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells*.
- [122] Voronova A., Coyne E., Madhoun A. i in., *Hedgehog Signaling Regulates MyoD Expression and Activity*, J. Biol. Chem., 2012, 288, 4389–4404.
- [123] Vuoristo S., Virtanen I., Takkunen M. i in., *Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support*, J. Cell. Mol. Med., 2009, 13, 2622–33.
- [124] Wang H., Hung S., Peng S. i in., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*, Stem Cells, 2004, 22, 1330–7.
- [125] Wang R., Liang J., Yu H. i in., *Retinoic acid maintains self-renewal of murine embryonic stem cells via a feedback mechanism*, Differentiation, 2008, 76, 931–945.
- [126] Watabe T., Takaoka K., Miyazono K. i in., *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads*, Mol. Biol. Cell, 2003, 14, 2809–17.
- [127] Wei C., Miura T., Robson P. i in., *Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state*, Stem Cells, 2005, 23, 166–85.
- [128] Welsh C., Roovers K., Villanueva J. i in., *Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho*, Nat. Cell Biol., 2001, 3, 950–957.
- [129] Wen Y., Bi P., Liu W., *Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells*, Mol. Cell Biol., 2012, 32, 2300–11.
- [130] Widelitz R., *Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress*, Growth Factors, 2005, 23, 111–6.
- [131] Xu R., Barron T., Gu F. i in., *NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs*, Cell Stem Cell, 2008, 3, 196–206.
- [132] Yang L., Shirakata Y., Tokumaru S., i wsp., *Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix*, J. Dermatol. Sci., 2009, 56, 188–195.
- [133] Ying Q., Nichols J., Chambers I. i in., *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*, Cell, 2003, 115, 281–92.

- [134] Zardawi S., O`Toole S., Sutherland R., *Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signaling pathway in breast cancer*, *Histol. Histopathol.*, 2009, 24, 385–398.
- [135] Zhou J., Su P., Li D. i in., *High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF- β Superfamily Receptors*, *Stem Cells*, 2010, 28, 1741–1750.
- [136] Żebrowska A., Bogańska M., Waszczykowska E., *Matrix metalloproteinases and adamalisyms in pathomechanism of pemphigoid*, *PDiA*, 2005, 22, 283–287.

Symulator echokardiografii przezprzelykowej CT2TEE – nowoczesna metoda edukacji

Adam Piórkowski*, Aleksander Kempny**, Paweł Piątek***,
Andrzej Gackowski****, Kamil Szostek*, Kamil Kipiel*****

Summary

Medical simulation is a new way of education. There are many new fields it offers significant benefits. Using a simulation of transesophageal echocardiography facilitates spatial orientation and helps in case studies. This article shows a concept and conditions of CT2TEE – an Internet-based or standalone transesophageal echocardiography simulator.

Keywords: echocardiography, medical simulation

1. Wprowadzenie

Edukacja lekarzy w XXI wieku opiera się nie tylko o wiedzę teoretyczną i zajęcia z pacjentami, ale także o trening w systemach symulujących proces wybranych badań i wybranych operacji, w endoskopii [10], anestezji [15], chirurgii [7, 9] i ultrasonografii [2, 3, 12, 14]. Celem symulacji jest zaznajomienie z problematyką danego badania/zabiegu, poznanie szczegółów wybranych jednostek chorobowych, oswojenie się z problematyką. Jednym z badań, jakie warto jest symulować, jest echokardiografia przezprzelykowa.

Badanie echokardiografii przezprzelykowej (TEE), w odróżnieniu od powszechnej echokardiografii przezklatkowej (TTE), nie jest obarczone ograniczeniami związanymi z oknami akustycznymi i zakłóceniami charakterystycznymi dla pacjenta. Możliwe jest dokładne poznanie szczegółów anatomicznych serca pacjenta. Badanie to towarzyszy także skomplikowanym operacjom na tymże organie. Niestety, jego przebieg jest nieprzyjemny dla pacjenta, gdyż wymagane jest umieszczenie w przelyku grubego przewodu sondy (rys. 1). Z tego też powodu istotne jest ograniczenie czasu przeprowadzania badania.

* Katedra Geoinformatyki i Informatyki Stosowanej, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Polska.

** Adult Congenital and Valvular Heart Disease Center, University of Muenster, Muenster, Niemcy.

*** Katedra Automatyki i Inżynierii Biomedycznej, Wydział Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Inżynierii Biomedycznej, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Polska.

**** Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Klinika Choroby Wieńcowej, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II.

***** Centrum Transferu Technologii, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II.

Sam proces umieszczania jest dla pacjentów wielce nieprzyjemny, a do tego dochodzą możliwe zranienia przełyku. Dla szkolących się lekarzy głównym problemem jest trudna sztuka orientacji przestrzennej i nawigacja sondą. Ocenia się, że do wyszkolenia echokardiografisty potrzeba ok. 150–160 badań przy udziale pacjentów, co jest dla nich dużym dyskomfortem, a nieumiejętna technika może prowadzić do uszkodzeń przełyku. Doświadczony echokardiografista wykonuje badanie w ciągu 5 minut, podczas gdy stażyszcę znalezienie wszystkich kluczowych projekcji może zająć nawet godzinę. Z pomocą przychodzi tu symulacja badania, która, oprócz zaznajomienia z widokiem badań, pozwala na trening manualny.



Rys. 1. Aspekty fizyczne badania przezprzełykowego [8]

2. Symulacja echokardiografii przezprzełykowej

Pomysł na tworzenie symulatorów badań medycznych nie jest pomysłem nowym, także w dziedzinie echokardiografii przezprzełykowej istnieją już rozwiązania naukowe i komercyjne. Przykładowo, od roku 2007 w Lipsku dostępny jest zestaw z manekinem do tegoż badania [14]. Dostępne są inne komercyjne produkty, takie jak Vimedix, Blue Phantom czy Heart Works. Niestety, urządzenia te są stacjonarne, związane z jednym stanowiskiem, a dodatkowo drogie.

Powyższe rozważania pozwoliły na zaproponowanie nowego rozwiązania, które wykorzystuje sporządzony w celach naukowych symulator CT2TEE [4], dotychczas w wersji internetowej, wymieniany w prasie medycznej jako warty uwagi (cytowany zarówno przez naukowców z Harvardu, jak i w Oxford Press [1, 6, 11, 13]). Symulator ten wykorzystuje wyniki badań tomograficznych (CT) do konstrukcji modelu 3D serca [8]. Jako materiał badawczy wykorzystuje się oczywiście wykonane wcześniej badania, nie narażając nikogo na niepotrzebne promieniowanie. Najużyteczniejsze w symulacji są badania obrazowania naczyń wieńcowych – odpowiedni kontrast pozwala na dokładne zróżnicowanie istotnych tkanek. Technika tomografii wielofazowej serca dostarcza zaś modelu 4D, co pozwala na obrazowanie serca w ruchu. Dane wejściowe podlegają transformacji przy pomocy tzw. funkcji przejścia, odwzorowującej absorpcję promieni X w procent odbicia fal dźwiękowych, charakterystycznych dla USG. Kluczowe w symulacji jest sporządzenie projekcji 2D, adekwatnej dla pozycji głowicy i zasymulowanie podstawowych zjawisk falowych, takich jak transmisja, osłabianie czy cień akustyczny. W pracy [8] dowiedziono, że dla

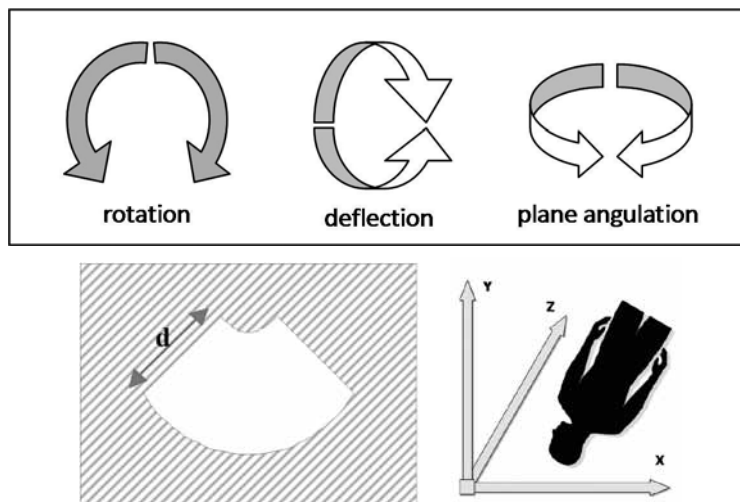
echokardiografii pominięcie zjawisk ugięcia i załamania jest akceptowalne ze względu na porównywalne parametry akustyczne tkanek.

3. Symulator CT2TEE

Symulator CT2TEE akceptuje jako dane wejściowe dane z tomografii w standardzie DICOM. Daje to dużą możliwość konstrukcji zestawów dla zebranych rzadkich przypadków badań CT. Efektem tego jest znaczna wartość dydaktyczna, która pozwalałaby przedstawiać studentom i stażystom rzadkie jednostki chorobowe. Możliwe jest również równoległe porównywanie obrazów dla różnych jednostek chorobowych, co w przypadku badań z pacjentami byłoby raczej niemożliwe. Obecnie przygotowano trzy zestawy danych statycznych i jeden zestaw danych pozwalających na uwzględnienie ruchu. Program CT2TEE posiada wbudowany edytor zestawów, co pozwala użytkownikom na dostosowanie własnych danych do potrzeb symulacji.

3.1. Idea symulatora

Symulator ów opiera się o model trójwymiarowy pacjenta, dostarczony z badań tomografii komputerowej (CT), i pozwala generować dowolne projekcje w badaniu echokardiografii przezprzełykowej (TEE). Projekcje te symulują badanie echokardiograficzne, transformując dane tomografii (zależne od gęstości tkanek) do danych odpowiadających ultrasonografii (zależne od sprężystości i granic ośrodków). Uwzględniane są wybrane efekty spotykane w ultrasonografii, takie jak cień akustyczny, osłabienie fali i szum.



Rys. 2. Stopnie swobody symulatora CT2TEE

Interfejs aplikacji pozwala na podstawowe działania na głowicy, takie jak (rys. 2):

- pozycja głowicy (x , y , z) w stosunku do pacjenta na podstawie głębokości włożenia sondy,

- obrót głowicy (rotation),
- wygięcie głowicy (deflection),
- skrzywienie głowicy (plane angulation),
- powiększenie obrazu (d – depth).

Aplikacja CT2TEE zrealizowana w dwóch wersjach:

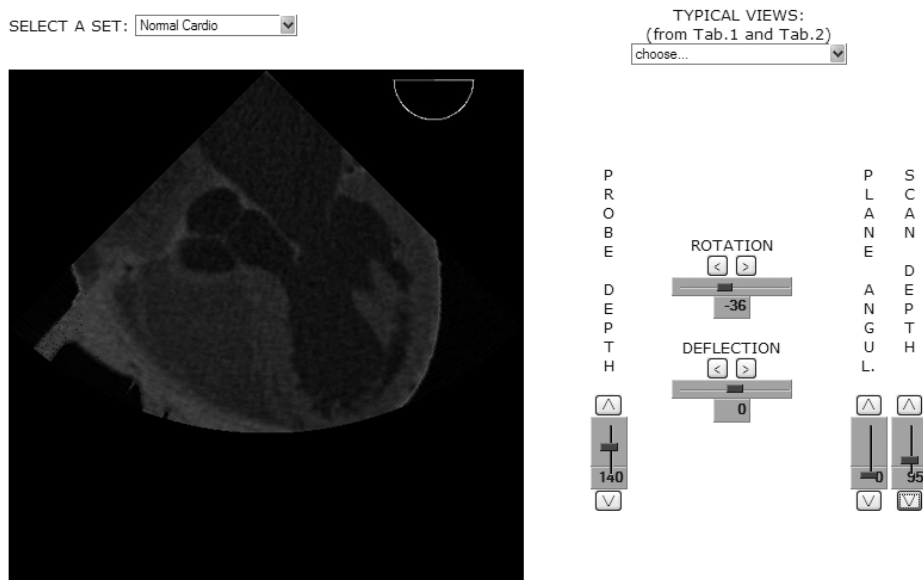
- wersja samodzielna – program, który działa samodzielnie w danej stacji roboczej i pozwala na trening echokardiograficzny (rys. 3),



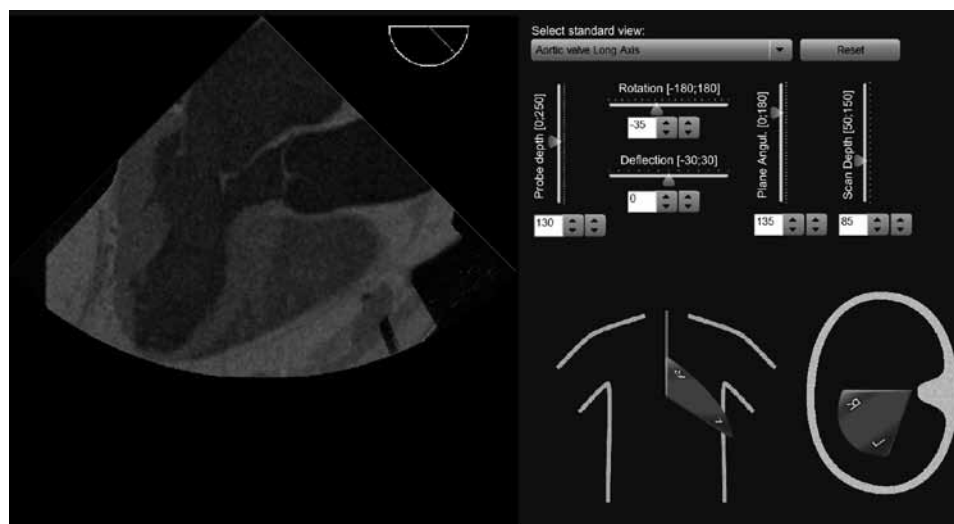
Rys. 3. Samodzielna wersja symulatora CT2TEE

- wersja internetowa – opierająca się o internetowy serwer obliczający projekcje oraz aplikację kliencką (uruchamianą w przeglądarce), działającą opcjonalnie w jednej z dwóch technologii – JavaScript (rys. 4) i Flash (rys. 5). Aplikacja CT2TEE jest obecna od roku 2009 w wersji webowej w Internecie pod adresem:

www.ct2tee.agh.edu.pl



Rys. 4. Internetowa wersja symulatora CT2TEE



Rys. 5. Internetowa wersja symulatora CT2TEE – flash

3.2. Urządzenie symulatora

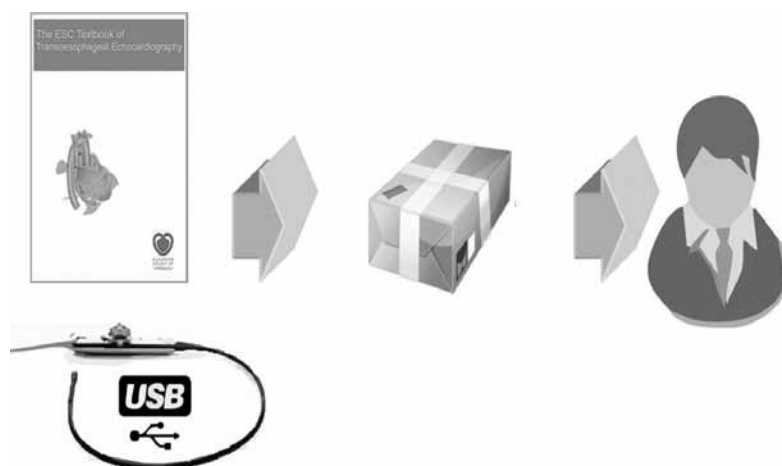
Symulator CT2TEE może być połączony z przenośnym urządzeniem symulującym wkładanie sondy oraz manipulowanie standardowym uchwytem zestawu do TEE. Projekt został stworzony w środowisku .NET, wybrana platforma pozwala uruchamiać program

pod kontrolą różnych systemów operacyjnych i różnych architektur sprzętowych. Współczesne laptopy cechuje wystarczająca wydajność do uruchomienia symulatora (konkurencyjne symulatory opierają się o wybrane architektury kart graficznych (GPU), dlatego niekoniecznie muszą być uniwersalne). Taka konstrukcja oprogramowania sugeruje łatwe połączenie sprzętu poprzez złącze USB (rys. 6.). Proponowane wykorzystanie standardu HID zwalnia z instalowania jakichkolwiek sterowników.



Rys. 6. Połączenie urządzenia symulatora z programem CT2TEE

Istotną zaletą proponowanego urządzenia jest jego rozmiar. Niewielki rozmiar, możliwość podłączenia do własnego komputera PC/laptopa stanowi dość duże udogodnienie. Biorąc pod uwagę niski koszt produkcji, zestaw zdaje się być bardzo atrakcyjną formą edukacji, która, oprócz sprzedaży bezpośredniej, może być użyta jako np. dodatek do książek/zestawów czy być dołączana do zakresu weekendowych kursów echokardiografii (rys. 7).



Rys. 7. Idea wersji handlowej symulatora

Podstawowe elementy zestawu to plastikowa kształtka imitująca głowę pacjenta (ze szczególnym uwzględnieniem ust), uchwyt sterujący sporządzony na wzór rzeczywistych uchwytów TEE i przewód sondy. Całość podłączona jest do komputera poprzez złącze USB. Szczegóły budowy omówione zostały w [5].

4. Wdrożenie

Realizacja oprogramowania symulatora została już zakończona. W chwili obecnej trwają prace nad prototypem urządzenia. Zapotrzebowanie na tego typu sprzęt jest wysokie, począwszy od uczelni medycznych w Polsce i Europie (a także na świecie), poprzez indywidualne inicjatywy lekarzy, włączając w to wydawnictwa czy kursy doskonalenia zawodowego, kończąc na jednostkach docelowych, takich jak np. Centrum Symulacji Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu lub Centrum Dydaktyki i Symulacji Medycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Istniejące rozwiązania są bardzo drogie – najtańsze pełne rozwiązanie kosztuje ok. 22 000 USD za stanowisko, inne rozwiązania to kwoty rzędu 60 000 euro. Stąd niewątpliwie dużą zaletą projektu jest szacowany niski koszt końcowy urządzeń. Także przewidywany rozmiar daje możliwość wysłania produktu paczką pocztową lub przekazanie go np. uczestnikowi kursu doskonalenia zawodowego, co wyróżnia proponowane rozwiązanie.

Należy podjąć rozważania pod kątem ryzyka, jakie może się pojawić przy wdrożeniu. Aspekty prawne zabezpiecza patent, jaki został złożony do Europejskiego Urzędu Patentowego [5]. Konstrukcja zaproponowanego rozwiązania powoduje, że do wytwarzania seryjnego urządzeń nie będą wymagane specjalistyczne urządzenia.

Streszczenie

Symulacja medyczna jest nowym sposobem kształcenia lekarzy. Istnieje wiele dziedzin, w których znajduje ona zastosowanie. Korzystanie z symulacji echokardiografii przezprzełykowej ułatwia orientację przestrzenną i pomaga w studiach przypadków. W tym artykule przedstawiono koncepcję i otoczenie symulatora echokardiografii przezprzełykowej CT2TEE – w wersji internetowej i samodzielnej.

Literatura

- [1] Blum T., Rieger A., Navab N., Friess H., Martignoni M., *A Review of Computer-Based Simulators for Ultrasound Training*. *Simulation in Healthcare* [in press], 2013.
- [2] Borzęcki M., Skurski A., Kamiński M., Balcerzak B., Chłapiński J., Napieralski A., Lipiec P., *Computed tomography image processing for diagnostic and training applications in medicine*, *Journal of Medical Informatics*, 2012, 19: 67–73.
- [3] Bose R., Matyal R., Panzica P. et al. *Transesophageal echocardiography simulator: a new learning tool*. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23: 544–8.
- [4] Kempny A., Piórkowski A., *CT2TEE—A novel, internet-based simulator of transoesophageal echocardiography in congenital heart disease*. *Kardiol. Pol.*, vol. 68, pp. 374–379, 2010.

- [5] Kempny A., Piórkowski A., Piątek P., Gackowski A., *System and method for transesophageal echocardiography simulations*. European Patent Application, EP 2 538 398 A1, Application number: 11461521.4, Date of filing: 19.06.2011.
- [6] Maus T. M., *Simulation: The importance of 'hands-on' learning*. J. Cardiothorac. Vasc. Anesth., vol. 25, no. 2, pp. 209–211, Apr. 2011.
- [7] McCloy R., Stone R., *Science, medicine, and the future*. Virtual reality in surgery. BMJ 2001; 323: 912–5.
- [8] Piórkowski A., Kempny A., *The Transesophageal Echocardiography Simulator Based on Computed Tomography Images*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol 60, no 2, pp 292–299, 2013.
- [9] Schijven M., Jakimowicz J. *Construct validity: experts and novices performing on the Xitact LS500 laparoscopy simulator*. Surg Endosc 2003; 17: 803–10.
- [10] Sedlack R. E., Kolars J. C., *Computer simulator training enhances the competency of gastroenterology fellows at colonoscopy: results of a pilot study*. Am J Gastroenterol 2004; 99: 33–7.
- [11] Shakil O., Mahmood F., Matyal R., *Simulation in echocardiography: An ever-expanding frontier*, J. Cardiothorac. Vasc. Anesth., vol. 26, no. 3, pp. 476–485, 2012.
- [12] Skurski A., Borzecki M., Balcerzak B., Kamiński M., Napieralski A., Kasprzak J. D., Lipiec P., *Image Processing Methods for Diagnostic and Simulation Applications in Cardiology*. International Journal of Microelectronics and Computer Science, vol. 3, no. 4, 2012, 146–151.
- [13] Robertson H. J. F., Paige J. T., Bok L. R., *Simulation in Radiology*. Section: *Simulation in Cardiothoracic Radiology*. London, U.K.: Oxford Univ. Press, 2012, pp. 226–236.
- [14] Weidenbach M., Drachsler H., Wild F. et al. *EchoComTEE – a simulator for transoesophageal echocardiography*. Anaesthesia 2007; 62: 347–53.
- [15] Wong A. K., *Full scale computer simulators in anesthesia training and evaluation*. Can J Anaesth 2004; 51: 455–64.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej jako potencjalny marker w diagnostyce miażdżycy

Aleksandra Kuzan*

Summary

Matrix metalloproteinases are enzymes decomposing collagen, elastin and other structural components of the arteries, which have an effect on pathology of the blood vessels. These proteins participate in the formation of atherosclerotic plaques, promoting the formation of unstable type of the structures. It was proven that the concentration of these proteins increases within the atherosclerotic tissue. It turns out that metalloproteinases released from the plaques, circulate in the blood, so that in a relatively simple way we can determine the content of the patient's blood. There was a correlation between serum MMP levels and the stage of disease and the probability of death from heart attack or stroke. It was also noted the relationship between the content of protein and plaque stability. The information allows to hope that MMP are good markers of disease states associated with atherosclerosis. Particular diagnostic value appear to have a gelatinase (MMP-2 and MMP-9), neutrophil collagenase (MMP-8) and stromelysin 1 (MMP-3). In addition, to the estimation of the risk for cardiovascular disease might be helpful genetic diagnostics by using the fact that many of these proteins are characterized by the presence of polymorphisms, where one allele is associated with increased morbidity or complications of atherosclerosis, as for MMP-3, -8, -9, -13.

Keywords: atherosclerosis, matrix metalloproteinases, diagnostics

Wprowadzenie

Do klasycznych, wykonywanych rutynowo badań w diagnostyce miażdżycy należy oznaczanie: cholesterolu, triglicerydów, apolipoprotein, białka reaktywnego (CRP, ang. *C-Reactive protein*). Oprócz tych pomocniczo wykonuje się czasami oznaczanie poziomu białek związanych ze stanem zapalnym, np. adiponektyny, homocysteiny, białek szoku cieplnego Hsp27 i Hsp60 (ang. *Heat shock protein*) [10, 15, 25, 36, 48, 50]. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o kolejnych związkach, które występują we krwi w stężeniu proporcjonalnym do stopnia zaawansowania miażdżycy, np. osteoprotegeryna, osteopontyna, RANKL (ligand receptorowego aktywatora czynnika jądrowego κ B, ang. *receptor activator for nuclear factor- κ B ligand*), TRAIL (zależny od TNF czynnik indukujący apoptozę, ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) i inne [45]. W ostatnim dziesięcioleciu intensywnie badany jest też potencjał diagnostyczny panelu białek zwanych metaloproteinazami białek macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*). Jest to duża rodzina enzymów, głównie endopeptydaz, tnących białka takie jak kolagen,

* Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

elastyna, laminina, fibronektyna i inne białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). Ich nazwa nawiązuje do jonu metalu występującego w centrum katalitycznym, którym jest zazwyczaj jon cynku; niektóre enzymy zamiast niego zawierają kobalt, mangan lub nikiel [4]. Ze względu na budowę oraz specyficzność substratową dzieli się te białka na kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, matrylizyny, MMP związane z błoną komórkową (MT-MMPs, ang. *membrane type MMPs*) oraz niesklasyfikowane [4, 11]. Według obecnego stanu wiedzy u kręgowców występuje 28 typów metaloproteinaz macierzy międzykomórkowej, z czego 22 typy występują u człowieka, a aż 11 z nich jest związane z miażdżycą [4].

Metaloproteinazy są ekspresjonowane w wielu typach komórek, m.in. w fibroblastach, mastocytach, osteoblastach, komórkach dendrytycznych, komórkach mikrogleju, keratynocytach, komórkach mięśnia serowego oraz komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cells*), komórkach śródbłonna oraz komórkach układu odpornościowego – makrofagach, limfocytach T, monocytach, neutrofilach i eozynofilach [27]. Przynajmniej 4 typy wyżej wymienionych komórek są zaangażowane w patologię miażdżycową.

Miażdżycą jest powszechną chorobą degeneracyjną tętnic i polega na przebudowywaniu struktury ścian naczyń krwionośnych. Powstają tzw. blaszki miażdżycowe, które rozrastając się mogą spowodować zamknięcie światła naczynia (stenozę). Może też dojść do pęknięcia jej ściany. Takie zdarzenia pociągają za sobą konsekwencje, takie jak udary i zawały. Głównym budulcem owych blaszek jest kolagen oraz cząsteczki budujące tłuszczowy rdzeń, a także elementy komórkowe, głównie migrujące z medii komórki mięśni gładkich i makrofagi. Kolagen i inne białka macierzy zewnątrzkomórkowej tworzą łącznotkankowe spoiwo pomiędzy wszystkimi elementami blaszki oraz włóknistą czapkę, która ma zapewniać integralność ściany tętnicy i zabezpieczać zawartość blaszki przed przedostaniem się do światła tętnicy. Gdy kolagenu i towarzyszących mu białek jest zbyt dużo, tętnica jest sztywna, mniej elastyczna, ale ma też mniejszą podatność na przerwanie. Taka sytuacja ma miejsce, gdy przeważa produkcja kolagenu nad jego degradacją, którą przeprowadzają głównie MMP. Aktywność MMP jest regulowana na poziomie transkrypcji genów, aktywacji proenzymów pod wpływem enzymów proteolitycznych oraz przez endogenne inhibitory z rodziny tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP, ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [27]. Zbyt duża aktywność MMP, co przekłada się na mniejszą zawartość kolagenu w tkance, prowadzi do powstawania tzw. niestabilnej blaszki miażdżycowej, czyli takiej, która jest podatna na przerwanie [37]. Degradacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwia też i ułatwia migrację komórek i rozrost intymy, co jest kolejnym promiażdżycowym mechanizmem [4].

MMP są białkami o stosunkowo małej specyficzności substratowej, przez co tną również białka inne niż należące do ECM, tj. cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu. Odgrywają w ten sposób również przeciwmiażdżycową rolę, gdyż hamowany jest w ten sposób proces zapalny [4].

1. Kolagenazy

Kolagenazy są białkami zbudowanymi z peptydu sygnałowego, propeptydu, domeny katalitycznej, regionu zawiasowego i domeny o budowie podobnej do hemopeksyny [12]. W skłd tej grupy wchodzą trzy białka: MMP-1, MMP-8, MMP-13.

1.1. MMP-1

Białko to tnie preferencyjnie kolagen III, w mniejszym stopniu inne kolageny, a także żelatynę, agrekan, kazeinę i perlekan [4]. Choć nie ma tego białka w zdrowych tętnicach, a występuje w blaszce miadzykowej, przy czym przechodzi do krwi, nie ma niestety jasności co do wartości diagnostycznej oznaczania tego białka u pacjentów. Wg Wu i współpracowników u osób ze zwężeniem tętnicy szyjnej obserwuje się znacząco wyższy poziom MMP-1w osoczu [47]. Z kolei wg innych zespołów we krwi obwodowej ani we krwi z aorty nie ma zmian w stężeniu MMP-1 w zależności od tego, czy pacjent jest chory na choroby sercowo-naczyniowe, czy jest zdrowy [23, 31, 39].

1.2. MMP-8

MMP-8 jest głównym białkiem tnącym kolagen występujący w największej ilości w tętnicy, tj. kolagen typu I – tnie go ok. 3 razy wydajniej niż inne kolagenazy. Przecina cząsteczki tego białka w miejscu Gly(775)-Ile(776), generując dwie części, degradowane następnie przez inne proteazy [29]. Jego rola w przebudowywaniu struktury tętnicy wydaje się bardzo znacząca. Nie tylko samo degraduje w znacznym stopniu białka macierzy międzykomórkowej, ale też aktywuje inne metaloproteinyzy (np. MMP-2, MMP-3, MMP-9) i inaktywuje inhibitor metaloproteinyzyny TIMP-1. MMP-8 tnie również angiotensynę I, która przekształca się w angiotensynę II, indukującą ekspresję cząsteczek adhezyjnych, np. VCAM-1, co zwiększa adhezję leukocytów, przyczyniając się dodatkowo do rozwoju choroby [43].

Co istotne, zawartość tej metaloproteinyzy jest 3–8 razy większa w ścianach naczyń objętych miadzyc ni w fragmentach kontrolnych [29]. Różnice obserwuje się też w poziomie tego białka we krwi – stwierdzono, że poziom MMP-8 jest wyższy u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi [23]. Co więcej, poziom MMP-8 koreluje ze śmiertelnością na choroby sercowo-naczyniowe, przynajmniej u męzczyzn [42]. Stabilność blaszki jest mniejsza przy podwyższonym stężeniu MMP-8 [16], co świadczy o tym, że ta metaloproteinyza odgrywa ważną rolę w przekształcaniu blaszki ze stabilnej w niestabilną [32].

Wydaje się, że można też wnioskowac o podatności na choroby sercowo-naczyniowe na podstawie nie tylko poziomu aktywnego enzymu we krwi, ale też w związku z polimorfizmem genu MMP-8 [28]. Badania wstępne wykazują, że np. występowanie allelu – 381G w ramach polimorfizmu promotora rs1320632 (-381 A/G) wiąże się z występowaniem blaszek miadzykowych w tętnicy szyjnej u kobiet [9].

1.3. MMP-13

Metaloproteinaza ta tnie głównie kolagen typu II, a także żelatynę, agrekan, fibronektynę, lamininę i perlekan [4]. MMP-13 jest praktycznie niewykrywalna we krwi pacjentów chorych i u osób kontrolnych [31], ale wykrywana jest w blaszce miażdżycowej [44].

Badaczami, których obiektem zainteresowania było to białko, byli Vaškú i wsp., którzy przeprowadzili badania z udziałem ponad tysiąca pacjentów, wykonali serię testów genetycznych i koronarografii. Okazało się, że polimorfizm genu rs640198 tego białka jest związany z wyższym zaawansowaniem choroby, przejawiającym się w tym, że większa ilość tętnic jest zmieniona miażdżycowo i więcej jest obszarów stenozy w tych naczyniach [44].

2. Żelatynazy

Żelatynazy charakteryzują się specyficzną budową – składają się z peptydu sygnałowego, propeptydu, domeny katalitycznej, domeny o budowie podobnej do fibronektyny i domeny o budowie podobnej do hemopeksyny [12]. Nazwa nawiązuje do substratu, jaki wydajnie tną – żelatynę (denaturowany kolagen). Dużą aktywność wykazują też w stosunku do kolagenu błony podstawnej, innych kolagenów i składników macierzy, a także cytokin i czynników wzrostu. Białka te mają też zdolność do proteolitycznego cięcia prekursorów metaloproteinaz MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 [4].

Liczne badania wykazały, że u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego, dławicą piersiową czy zwężeniem tętnicy szyjnej obserwuje się wyższe stężenia MMP-2 i MMP-9 w surowicy niż u grupy kontrolnej. Również po udarze niedokrwiennym mózgu stężenie obu białek wzrasta. Co ciekawe, poziom MMP-9 jest wyższy u pacjentów z niestabilnymi blaszkami miażdżycowymi niż u tych ze stabilnymi, stąd sugestia, że żelatynazy mogą być dobrym markerem nie tylko stopnia zaawansowania choroby, ale i stabilności blaszki [2, 21, 30, 41, 49]. Z dużego badania *ADVANCE study* wynika wręcz, że spośród wszystkich badanych MMP (MMP-1, -2, -3, -9 i -10) tylko żelatynazy mają wartość prognostyczną w kontekście zawału serca [26]. Stężenie MMP-9 wzrasta również w związku z ryzykiem restenozy (ponownym zwężeniem tętnicy po angioplastyce) [14]. Oznaczanie tego enzymu we krwi pozwala też na oszacowanie ryzyka śmierci ze względu na choroby serowo-naczyniowe [6].

Stężenie MMP-9 koreluje z markerami nekrozy, które są charakterystyczne dla bardzo zaawansowanej blaszki miażdżycowej [26], jednak w małym stopniu koreluje ze stężeniem IL-18, którą uważa się za najważniejszy marker stanu zapalnego, mający ścisły związek z występowaniem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. MMP-9 wydaje się więc niezależnym od stanu zapalnego markerem, a stwierdzenie u pacjenta podwyższenia obu wskaźników, MMP-9 i IL-18, pozwala na stwierdzenie bardzo dużego ryzyka wystąpienia zawału lub udaru [6]. Co ciekawe, poziom MMP-9 podwyższony jest nie tylko w surowicy, ale i w moczu chorych na choroby sercowo-naczyniowe [13].

Często rozpatruje się obie żelatynazy razem. Okazuje się, że jest jednak pewna różnica w ich właściwościach. Dowiedziono, że aktywność MMP-9 jest większa w blaszkach z dużą ilością makrofażów, a MMP-2 w tych z dużą ilością mięśni gładkich [40]. Jest też

różnica we wpływie lipidów na ekspresję tych białek – HDL hamuje ekspresję MMP-2, podczas gdy wzrost oxLDL koreluje ze wzrostem ekspresji MMP-9 [22].

Można przypuszczać, że w diagnostyce miażdżycy można również wykorzystać występowanie polimorfizmu genu MMP-9. Polimorfizm C-1562T wpływa na ekspresję białka, co przejawia się jego większym stężeniem w osoczu. Inny – R279Q – nie ma bezpośredniego wpływu na poziom MMP-9 we krwi, ale jest związany z występowaniem większego ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych u osób ze stabilnymi blaszkami [6].

Mimo tak wielu doniesień, potwierdzających ścisły związek między MMP-2 i MMP-9 a chorobami sercowo-naczyniowymi, pozostają jednak pewne wątpliwości. Pierwszą z nich jest to, że ten enzym jest uwalniany do krwi z wielu źródeł, z różnego rodzaju ognisk zapalnych, np. z guza nowotworowego czy też z wrzodu żołądka, tak więc jego wysokie stężenie może wskazywać na inny niż miażdżycy problem zdrowotny pacjenta. Nawet jeśli większość cząsteczek enzymu pochodzi z komórek układu odpornościowego rezydujących w naczyniach krwionośnych biorących udział w patologii sercowo-naczyniowych, to nie można stwierdzić na podstawie danych o ilości tego enzymu, w której części naczyń krwionośnych występują jakie blaszki – czy jest ich dużo małych, czy jest jedno duże ognisko choroby w konkretnym miejscu organizmu [6]. Ponadto statyny, stosowane powszechnie jako leki w chorobach sercowo-naczyniowych, obniżają poziom MMP-9 [17], stąd mogą wynikać artefakty w diagnostyce miażdżycy.

3. Stromielizyny

Stromielizyny mają plan budowy podobny do kolagenaz [12]. Degradują głównie kolageny typu II, IV, IX; przecinają także pro-MMP-1, -7, -8, -9, doprowadzając do aktywacji tych enzymów [4, 34], co dodatkowo stymuluje rozkładanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Przynajmniej 2 białka tej grupy są zaangażowane w rozwój miażdżycy: MMP-3 i -10.

MMP-3, podobnie jak żelatynazy, wspiera migrację komórek mięśni gładkich tętnic, o czym świadczy to, że u myszy z wyciętym genem stwierdza się mniejszą akumulację tych komórek w intymie. Jest to proces stabilizujący blaszkę, ale też zagrażający powstaniem stenozy [20].

Wiele doniesień naukowych przemawia za tym, że stężenie MMP-3 koreluje z różnymi aspektami chorób sercowo-naczyniowych [46]. Zwiększenie ilości tego białka stwierdza się np. w przypadku występowania blaszek miażdżycowych w tętnicy szyjnej [5]. Co ciekawe, obserwuje się jednak mniejsze stężenie tego enzymu u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego niż u zdrowych osób [38], a wzrost zawartości tego białka był obserwowany w czasie 0–96 godzin po zawale [24]. Kelly i współpracownicy wysnuli na podstawie swoich badań wnioski, że wysoki poziom MMP-3 u pacjentów może prognozować zbliżające się zdarzenie, związane z chorobami sercowo-naczyniowymi [24].

Znany jest też polimorfizm genu MMP-3, który być może ma wartość diagnostyczną – genotyp MMP-3 6A6A jest związany z występowaniem miażdżycy [1].

Stwierdzono również, że wzrost stężenia MMP-10 w surowicy jest związany ze zwężaniem się światła tętnicy szyjnej. Jest to też skorelowane z poziomem CRP, który

jest złotym standardem w diagnostyce chorób związanych ze stanem zapalnym, w tym miażdżycy [35].

4. Matrylizyny

Z dwóch znanych matrylizyn tylko jedna jest zaangażowana w patologię tętnic – MMP-7. Jest to stosunkowo małe białko, złożone tylko z peptydu sygnałowego, propeptydu i domeny katalitycznej [12]. Enzym ten katalizuje cięcie kolagenu błon podstawnych oraz innych składników ECM, a także tnie pro-MMP-1, -2 i -9, przez co aktywuje te białka [4].

Stwierdzono, że poziom MMP-7 jest podwyższony (o ok. 50–60%) u pacjentów z niestabilnymi blaszkami. Jako że stężenie tego białka nie jest skorelowane z CRP, IL-6 ani z liczbą leukocytów, postuluje się, że jest to potencjalny marker chorób sercowo-naczyniowych, nie związany ze stanem zapalnym [33].

5. Metaloelastyazy

MMP-12 nie klasyfikuje się do głównych grup MMP, dlatego zaliczono ją do grupy tzw. niesklasyfikowanych MMP. Jak nazwa wskazuje, odpowiada za degradację elastyny, ale także kolagenu typu IV, fibrynogenu, plazminogenu, antytrypsyny i innych licznych białek. Plan budowy tego enzymu jest klasyczny, jak u kolagenaz [4, 12].

Stężenie MMP-12 we krwi jest podwyższone u ludzi z chorobami sercowo-naczyniowymi [18]. Wydaje się też, że MMP-12 jest kolejnym białkiem, które ma wpływ na stabilność blaszki, gdyż okazuje się, że poziom tego enzymu jest znacząco podwyższony w niestabilnych blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych w porównaniu z blaszkami stabilnymi [3]. Oprócz tego mechanizmu, powodującego komplikacje kliniczne w miażdżycy, to samo białko ma też właściwości przeciwdziałające tej chorobie: wykazano, że inaktywuje ona niektóre chemokiny i białka chemotaktyczne monocytów, np. CCL-2, -7, -8, -13 (CCL, *chemokine (C-C) motif ligand*) [8]. Okazuje się też, że statyny, podobnie jak w przypadku MMP-9, obniżają poziom tej metaloproteiny we krwi. Choćby dla tych względów trudno wnioskować o stopniu zaawansowania choroby na podstawie zawartości MMP-12 w surowicy [18].

Podsumowanie

W literaturze przedmiotu pojawia się dużo doniesień o związku stężenia metaloproteinaz białek macierzy zewnątrzkomórkowej ze stopniem rozwoju miażdżycy, a także występowaniem konkretnych aspektów chorób sercowo-naczyniowych, np. z niestabilnością blaszek, która przekłada się na śmiertelność pacjentów. Z opisanych w niniejszej pracy danych wynika, że wartościowe informacje lekarzowi zajmującemu się pacjentem zagrożonym wieloma czynnikami ryzyka miażdżycy dostarczy oznaczenie żelatynaz, MMP-3 oraz MMP-8. Pomiar MMP został już zarekomendowany jako nieinwazyjne narzędzie w diagnozowaniu i monitorowaniu rozwoju chorób związanych ze stanem zapalnym już pod koniec XX wieku [51], jednak ciągle brak jasności co do wartości diagnostycznej tych parametrów. Wątpliwości pojawiają się w związku ze sprzecznymi doniesieniami dotyczą-

cymi omawianej kwestii [23, 31, 39, 47], możliwością wystąpienia artefaktów w związku z tym, że wysokie stężenie MMP nie jest specyficzne dla chorób sercowo-naczyniowych oraz w związku z wplywem lekww antymiadzycowych, modyfikujących aktywnoc MMP [26] oraz endogennych inhibitorów tych enzymów – TIMP [7]. Interesujące są tez doniesienia o polimorfizmach niektórych genów MMP, co rwnież można potencjalnie wykorzystac w strategiach leczenia. Czy w niedalekiej przyszlsci MMP bd rutowo oznaczane w diagnostyce miadzicy? Czy laboratoria genetyczne poszerzą swoją oferte o badanie polimorfizmów MMP? Liczymy, że dynamicznie prowadzone prace nad tymi enzymami pozwol na rozwianie wątpliwości w najbliższym czasie.

Streszczenie

Metaloproteinyzyny macierzy zewnątrzkomórkowej są enzymami rozkladajcymi kolagen, elastyn i inne składniki strukturalne tętnic, przez co mają wplyw na patologie w obrębie tych naczyń krwionośnych. Białka te partycypują m.in. w powstawaniu blaszek miadzycowych, sprzyjając powstawaniu niestabilnych typów tych struktur. Dowiedziono, że stężenie tych enzymów wzrasta w obrębie zmienionej miadzycowo tkanki. Okazuje sie, że metaloproteinyzyny uwalniane sie z blaszki miadzycowej do krwi, dzieki czemu w stosunkowo prosty sposób można ich zawartoc oznaczyc we krwi pacjenta. Zaobserwowano korelacj między stężeniem MMP w osoczu a stopniem zaawansowania choroby oraz prawdopodobieństwem śmierci z powodu zawału czy udaru. Zauwżono tez zależnośc między zawartością tych białek a stabilnością blaszki. Te informacje pozwalają miec nadziej, że MMP są dobrymi markerami stanów chorobowych związanych z miadzic. Szczególną wartośc diagnostyczną wydają sie miec elatynazy (MMP-2 i MMP-9), kolagenazy neutrofilowa (MMP-8) oraz stromielizyna 1 (MMP-3). Dodatkowo w szacowaniu ryzyka zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe może pomóc diagnostyka genetyczna poprzez wykorzystanie faktu, że wiele z omawianych białek charakteryzuje sie występowaniem polimorfizmów, gdzie jeden z alleli jest związany z wyższą zachorowalnością lub komplikacjami miadzycowymi, jak w przypadku MMP-3, -8, -9, -13.

Literatura

- [1] Abilleira S., Bevan S., Markus H. S., *The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis*. Journal of Medical Genetics, 2006; 43(12):897–901.
- [2] Alvarez B., Ruiz C., Chacon P., *Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis*. J Vasc Surg 2004;40:469–475.
- [3] Arakaki P. A., Marques M. R., Santos M. C., *MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes*. J. Biosci., 2009; 34: 313–320.
- [4] Back M., Ketelhuth D. F., Agewall S., *Matrix metalloproteinases in atherothrombosis*. Prog Cardiovasc Dis. 2010;52(5):410–28.
- [5] Beaudoux J. L., Giral P., Bruckert E., *Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia*. Atherosclerosis 2003;169:139–146.

- [6] Blankenberg S, Rupprecht H. J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., Meyer J., Cambien F., Tiret L., *AtheroGene Investigators*. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 107(12):1579–85.
- [7] Blankenberg S, Rupprecht H. J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., Meyer J., Cambien F., Tiret L., *AtheroGene Investigators*: Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 2003; 107: 1579–1585.
- [8] Dean R. A., Cox J. H., Bellac C. L., Doucet A., Starr A. E., Overall C. M., *Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL-2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx*. *Blood*, 2008; 112: 3455–3464.
- [9] Djurić T., Stanković A., Končar I., *Association of MMP – 8 promoter gene polymorphisms with carotid atherosclerosis: preliminary study*. *Atherosclerosis*. 2011; 219: 673–678.
- [10] Esbah O., Gürsoy G., Kirnap N. G., Cetiner H., Demirbaş B., Acar Y., Bayram M., *Relation of resistin levels with C-reactive protein, homocysteine and uric acid in smokers and non-smokers*. *J Res Med Sci*. 2011; 16(10):1273–1279.
- [11] Fanjul-Fernandez M., Folgueras A. R., Cabrera S., Lopez-Otin C., *Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models*. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803(1):3–19.
- [12] Fic P, Zakrocka I, Kurzepa J, Stepulak A., *Matrix metalloproteinases and atherosclerosis*. *Postępy Hig Med Dośw*. 2011; 25; 65:16–27.
- [13] Fitzsimmons P. J., Forough R., Lawrence M. E., *Urinary levels of matrix metalloproteinase 9 and 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease*. *Atherosclerosis* 2007; 194:196–203.
- [14] Ge J., Shen C., Liang C., Chen L., Qian J., Chen H., *Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis*. *Int J Cardiol* 2006; 112:85–90.
- [15] Ghayour-Mobarhan M., Saber H., Ferns G. A., *The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease*. *Clin Chim Acta*. 2012; 18; 413(1–2):15–24.
- [16] Herman M. P., Sukhova G. K., Libby P., *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling*. *Circulation*. 2001; 104:1899–1904.
- [17] Inoue T., Kato T., Takayanagi K., Uchida T., Yaguchi I., Kamshirado H., Morooka S., Yoshimoto N., *Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome*. *Am J Cardiol* 2003; 92:1461–1464.
- [18] Jguirim-Souissi I., Jelassi A., Addad F., Hassine M., Najah M., Ben Hamda K., Maatouk F., Ben Farhat M., Bouslema A., Rouis M., Slimane M. N., *Plasma metalloproteinase-12 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels and presence, severity, and outcome of coronary artery disease*. *Am J Cardiol*. 2007; 100(1):23–7.
- [19] Johnson J. L., Dwivedi A., Somerville M., George S. J., Newby A. C., *Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(9):e35–44.

- [20] Johnson J.L., George S.J., Newby A.C., Jackson C.L., *Divergent effects of matrix metalloproteinases-3, -7, -9 and -12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries.* Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102:15575–15580.
- [21] Kai H., Ikeda H., Yasukawa H., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and-9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.* J Am Coll Cardiol 1998; 32:368–372.
- [22] Kalela A., Koivu T. A., Hoyhty M., *Association of serum MMP-9 with autoantibodies against oxidized LDL.* Atherosclerosis, 2002; 160: 161–165.
- [23] Kato R., Momiyama Y., Ohmori R., *Levels of matrix metalloproteinase-1 in patients with and without coronary artery disease and relation to complex and noncomplex coronary plaques.* Am J Cardiol 2005; 95:90–92.
- [24] Kelly D., Khan S., Cockerill G., *Circulating stromelysin-1 (MMP-3): a novel predictor of LV dysfunction, remodelling and allcause mortality after acute myocardial infarction.* Eur J Heart Fail 2008; 10:133–139.
- [25] Kokocinska D., Cierpka L., Chmiel B., Duraj M., Partyka R., Cierpka S., Kocot J., Wieczorek P. *The usefulness of assessing the serum levels of homocysteine in diagnosis of atherosclerosis.* Acta Angiol. (2005); 11(2): 114–120.
- [26] Kulach A., Dbek J., Gogowska-Ligus J., Garczorz W., Gsior Z., *Effects of standard treatment on the dynamics of matrix metalloproteinases gene expression in patients with acute coronary syndromes.* Pharmacol Rep. 2010; 62(6):1108–16.
- [27] Kwiatkowski P., Godlewski J., Sliwinska-Jewsiewicka A., Kmiec Z., *Rola metaloproteinyz macierzy zewntrzkomrkowej w procesie inwazji nowotworu.* Pol. Ann. Med., 2008; 15(1): 43–50.
- [28] Laxton R. C., Hu Y., Duchene J., *A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis.* Circulation Research. 2009; 105(9): 921–929.
- [29] Lenglet S., Mach F., Montecucco F., *Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis.* Mediators Inflamm. 2013; 2013:659282.
- [30] Lucivero V., Prontera M., Mezzapesa D. M. *Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke.* Neurol. Sci. 2007; 28:165e70.
- [31] Momiyama Y., Ohmori R., Tanaka N. Kato R., Taniguchi H., Adachi T., Nakamura H., Ohsuzu F., *High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina.* Atherosclerosis. 2010; 209(1):206–10.
- [32] Naruko T., Ueda M., Haze K., *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes.* Circulation. 2002; 106(23):2894–2900.
- [33] Nilsson L., Jonasson L., Nijm J., *Increased plasma concentration of matrix metalloproteinase-7 in patients with coronary artery disease.* Clin Chem 2006; 52:1522–1527.
- [34] Ogata Y., Enghild J. J., Nagase H., *Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor of the human matrix metalloproteinase 9.* J Biol Chem. 1992; 267:3581–3584.
- [35] Orbe J., Montero I., Rodriguez J. A., *Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis.* J Thromb Haemost 2007; 5:91–97.
- [36] Qujeq D., Omran T. S., Hosini L., *Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction.* Clin Biochem. (2001); 34(2):97–101.
- [37] Rekhter M. D., *Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough.* Cardiovasc Res. 1999; 41(2):376–84.

- [38] Samnegård A., Silveira A., Tornvall P., Hamsten A., Ericsson C. G., Eriksson P., *Lower serum concentration of matrix metalloproteinase-3 in the acute stage of myocardial infarction*. J Intern Med. 2006; 259(5):530–6.
- [39] Samnegård A., Hulthe J., Silveira A., Ericsson C. G., Hamsten A., Eriksson P., *Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients*. Atherosclerosis. 2009 Feb; 202(2):550–6.
- [40] Sluijter J. P., Pulskens W. P., Schoneveld A. H., *Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms*. Stroke 2006; 37:235e9.
- [41] Taurino M., Raffa S., Mastroddi M., *Metalloproteinase expression in carotid plaque and its correlation with plasma levels before and after carotid endarterectomy*. Vasc Endovascular Surg. 2007; 41: 516–521.
- [42] Tuomainen A. M., Nyyssönen K., Laukkanen J. A., Tervahartiala T., Tuomainen T. P., Salonen J. T., Sorsa T., Pussinen P. J., *Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27(12):2722–8.
- [43] Van Lint P., Libert C., *Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive*. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2006; 17(4): 217–223.
- [44] Vašků A., Meluzín J., Blahák J., Kincl V., Goldbergová M. P., Sitar J., Zlámál F., Bienertová-Vašků J., Vítovec J., *Matrix metalloproteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease*. Dis Markers. 2012; 33(1):43–9.
- [45] Venuraju S. M., Yerramasu A., Corder R., Lahiri A., *Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity*. J Am Coll Cardiol. 2010; 55(19):2049–61.
- [46] Wu T. C., Leu H. B., Lin W. T., *Plasma matrix metalloproteinase-3 level is an independent prognostic factor in stable coronary artery disease*. Eur J Clin Invest 2005; 35:537–545.
- [47] Wu Y. W., Yang W. S., Chen M. F., Lee B. C., Hung C. S., Liu Y. C., Jeng J. S., Huang P. J., Kao H. L., *High serum level of matrix metalloproteinase-1 and its rapid surge after intervention in patients with significant carotid atherosclerosis*. J Formos Med Assoc. 2008; 107(1):93–8.
- [48] Yoshida T., Kaneshi T., Shimabukuro T., Sunagawa M., Ohta T., *Serum C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors and adipocytokines in Japanese children*. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(6):2133–2137.
- [49] Zeng B., Prasan A., Fung K. C., *Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease*. Intern Med J. 2005; 35:331–335.
- [50] Zhu J., Quyyumi A. A., Rott D., *Antibodies to HSP60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: Evidence for an autoimmune component of atherogenesis*. Circulation 2001; 103:1071–1075.
- [51] Zucker S., Hymowitz M., Conner C., Zarrabi H. M., Hurewitz A. N., Matrisian L., Boyd D., Nicolson G., Montana S., *Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues*. Clinical and experimental applications. Ann N Y Acad Sci. 1999; 878:212–27.

Interleukina-27 nowym narzędziem w immunoterapii genowej raka płuca. Ocena ekspresji w układzie oddechowym człowieka

Tomasz Wandtke*, Piotr Kopiński*, Joanna Wielikdzień*, Joanna Golińska*, Karina Szabłowska*, Ewelina Wędrowska*

Summary

Introduction. IL-27 is secreted by antigen presenting cells (APCs). This cytokine is responsible for the Th1 differentiation and antiviral response. IL 27 could possibly be a clinical tool for lung cancer immunotherapy.

Purpose. The aim of the research was to construct a plasmid encoding IL-27, evaluation of plasmid expression in small (NCI-H82) and non-small (A549) cell lung cancer lines and determine the source of IL-27 in lower airways.

Materials and Methods. This study was performed using cell lines (A549 and NCI-H92), bronchoalveolar lavage (BAL). pXMs-IL27 plasmid was used to transfect cell lines and make an expression of IL-27. RT-PCR was used to examine its expression. Direct immunofluorescence was used to analyze the expression of CD80, CD83, CD86, CD120a, CD120b, CD178. Expression of intracellular IL-27 was tested by indirect immunofluorescence. ELISA test was used to analyze the excretion of IL-27 to extracellular environment.

Results. The expression of IL-27 in transfected cells was observed after RT-PCR. Its primary expression was found in small and non-small cell lung cancer lines. The increase of CD83 on the surface was slightly higher after transfection. A significant expression of the IL-27 was seen in macrophages and lymphocytes. Furthermore, it was also observed in BAL supernatants from patients with Th1 disease – sarcoidosis.

Conclusions. Cell lines was successfully transfected with pXMs-IL27. Therefore, it could be a method of the lung cancer treatment. Expression of CD83 could be a mechanism of the tumor escape from immune system surveillance. Expression of IL-27 seems to be significant in BAL cells from patients with ILD. Finally, IL-27 was released into the extracellular environment only in patients with sarcoidosis, so IL-27 may be a diagnostic marker of Th1 disease.

Keywords: interleukin-27, bronchoalveolar lavage, sarcoidosis, plasmid

Wprowadzenie

Interleukina-27 (IL-27) to cytokina stosunkowo nowo odkryta i wciąż mało poznana. Po raz pierwszy jej gen w roku 2002 zidentyfikowali Pflanz i jego współpracownicy. Produkt białkowy nowo zidentyfikowanego genu nazwano Interleukiną-30, a następnie

* Katedra Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy.

przemianowano ją na białko p28, kiedy okazało się, że składnik ten jest częścią większego kompleksu. Opisujący kompleks składał się z podjednostki p28 oraz białka EBI3 (ang. Epstein-Barr virus induced gene 3), a został nazwany Interleukiną-27. W toku późniejszych badań, okazało się, że asocjacja obu składowych niezbędna jest do uzyskania aktywności biologicznej białka związanej z jego pozakomórkową sekrecją [12, 13].

IL-27 zaliczana jest do podgrupy cytokin reprezentowanej przez IL-12 [8]. Podobnie jak pozostałe cytokiny tej rodziny, IL-27 jest dimerem (posiada dwie opisane wyżej podjednostki), który po uzyskaniu swojej przestrzennej konformacji zawiera cztery helisy typu alfa [5, 13]. Jednak nie tylko podobieństwa strukturalne decydują o jej przynależności do wspomnianej rodziny cytokin, ale także jej pochodzenie oraz pełnione przez nią funkcje. Podobnie jak (w przeważającej części) pozostałe cytokiny tej rodziny (IL-12, IL-23, IL-35) produkowana jest przez komórki prezentujące antygeny – komórki dendrytyczne i makrofagi – w odpowiedzi na pobudzenie odpowiednich receptorów TLR, wyspecjalizowanych w rozpoznawaniu obcych wzorców molekularnych [13, 14, 17]. Główną funkcją cytokin tej rodziny jest regulacja polaryzacji immunologicznej pomiędzy profilem czynnościowym Th1 a Th2 [5, 6]. IL-27 odpowiedzialna jest za ukierunkowanie procesu odpornościowego w stronę przewagi profilu Th1. Wśród innych, wcale nie mniej ważnych, funkcji pełnionych przez cytokinę należy wymienić: zdolność do regulacji procesu prezentacji antygenów oraz jej działanie antyangiogenne [3, 4, 5].

Ukierunkowanie odpowiedzi immunologicznej możliwe jest po związaniu IL-27 z jej receptorem, WSX-1. Jest on zbudowany z dwóch podjednostek. Pierwsza z nich przypomina strukturę receptor dla cytokin komórek T (ang. T Cell Cytokine Receptor, TCCR), druga – gp130 – pełni funkcję przekaźnika sygnału [12]. Przewodzenie sygnału z powierzchni komórki do jej wnętrza zachodzi przy udziale układu kinaz i białek JAK/STAT (dochodzi do znacznego pobudzenia głównie białek STAT-1 oraz STAT-3) [10, 11, 16]. Białko STAT-1, to element głównego mechanizmu, niezwykle istotnego dla indukcji i podtrzymania polaryzacji immunologicznej Th1. Odpowiada ono za pobudzanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego T-bet. Czynnikiem ten z kolei odpowiedzialny jest za następczą aktywację ekspresji IL-12 β , która posiada potencjał do długotrwałego podtrzymywania polaryzacji tego typu [5, 6].

W przeprowadzonych dotąd badaniach wykazano, że IL-27 w sposób znaczący reguluje zjawisko prezentacji antygenów, szczególnie z udziałem cząsteczek MHC klasy I (ang. major histocompatibility complex class I, MHC I). Ekspresja genów kodujących te białka, zależna jest od czynnika transkrypcyjnego CIITA (ang. the class II, major histocompatibility complex, transactivator). Ekspresja tego czynnika skorelowana jest bezpośrednio z poziomem białek STAT-1 i IL-27 [3, 6]. Pod wpływem IL-27 w doświadczeniach *in vitro* obserwowano wzrost ilości cząsteczek MHC I oraz kostymulatorów prezentacji antygenów (CD80 i CD86) na powierzchni ustalonych linii komórkowych THP-1 (linia komórkowa ostrej ludzkiej białaczki monocytarnej) oraz TBJ (mysia linia komórkowa nerwiaka płodowego) [4, 5].

Nie bez znaczenia wydaje się także aktywność antyangiogenna IL-27. Białko to indukuje syntezę inhibitorów tworzenia nowych naczyń krwionośnych – chemokin CXCL9 (ang. Chemokine C-X-C motif ligand 9) oraz CXCL10 (ang. Chemokine C-X-C motif

ligand 10). Jej antyangiogeny wpływ obserwowano u myszy z wszczepionymi doświadczalnie guzami nowotworowymi oraz *in vitro* w ustalonej linii komórkowej śródbłonka żyły pępowinowej (ang. human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) [3, 5, 15].

Ze względu na wykazywane właściwości uważa się, że IL-27 może znaleźć zastosowanie w leczeniu niektórych ciężkich chorób człowieka. Jej zdolność do wzmagania prezentacji antygenów w restrykcji MHC I, ograniczania wzrostu naczyń krwionośnych a szczególnie ukierunkowywania aktywności układu immunologicznego w stronę profilu czynnościowego Th1, a w konsekwencji wyindukowania odpowiedzi cytotoksycznej z udziałem limfocytów Tc, może mieć istotne znaczenie, szczególnie w zwalczaniu chorób nowotworowych.

W prezentowanej pracy skonstruowano i wykorzystano plazmid ekspresyjny, kodujący IL-27. Przeprowadzone doświadczenia miały na celu ocenić wpływ oraz poprawność funkcjonowania tego plazmidu, który wprowadzano metodą transfekcji do ludzkich ustalonych linii komórkowych drobno – (NCI-H82) oraz niedrobnokomórkowego (A549) raka płuca. Po transfekcji plazmidem ekspresyjnym i kontrolnym z wykorzystaniem odczynników immunofluorescencyjnych połączonych z odczytem cytometrycznym oznaczano zmiany fenotypu komórek. Dodatkowo, podjęto próby ustalenia źródeł IL-27 w dolnych drogach oddechowych człowieka. W tym celu wykorzystano materiał pochodzący z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (ang. broncho-alveolar lavage, BAL) od chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc (ang. interstitial lung diseases, ILD), który poddano analogicznej ocenie jak linie komórkowe.

Materiał i Metody

Hodowla ustalonych ludzkich linii komórkowych

W pracy wykorzystano dwie ludzkie ustalone nowotworowe linie komórkowe, niedrobnokomórkowego (A549) oraz drobnokomórkowego (NCI-H82) raka płuca. Linia komórkowa A549 jest linią adherentną, natomiast NCI-H82 rosnącą w zawieszynie.

Obie linie hodowano w sterylnych warunkach w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Linię komórkową A549 hodowano w medium DMEM (Gibco BRL, nr kat. 4225), zaś NCI-H82 w medium RPMI1640 (Biochrom AG, nr kat. F1295). Oba media hodowlane suplementowano płodową surowicą bydlęcą (Gibco BRL, nr kat. 0596) do stężenia 10% oraz mieszaniną antybiotyków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych (ATB, Gibco BRL, nr kat. 0967) do stężenia 1%. Dodatkowo w przypadku linii komórkowej A549, medium hodowlane suplementowano mieszaniną insuliny, selenianu i transferynianu (Gibco BRL, nr kat. 51300-044) do stężenia 1%. Po uzyskaniu przez hodowle stanu semikonfluencji, przeprowadzono ich pasaż według standardowych procedur laboratoryjnych. W celu odklejenia komórek linii adherentnej od podłoża hodowlanego stosowano roztwór trypsyny.

Transfekcja linii komórkowych plazmidami

W toku doświadczeń wykorzystano trzy plazmidy: pMXs-IL27, kodujący rekombinowaną Interleukinę-27; pMXs-IG, który pełnił funkcję pustego plazmidu kontrolnego

oraz pCMV-βgal (Clontech, nr kat. 631719), który wykorzystano w celu późniejszego oszacowania wydajności procesu transfekcji.

Wszystkie plazmidy wprowadzono do hodowanych linii komórkowych metodą transfekcji lipidowej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego preparatu pod nazwą handlową TransFectin™ Lipid Reagent (Bio-Rad, nr kat. 170-3351). Procedurę transfekcji przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Kontrola wydajności procesu transfekcji

W celu oceny średniej ilości komórek stransfekowanych posłużono się plazmidem pCMV-βgal. Plazmid ten zawiera sekwencję genu β-galaktozydazy, który znajduje się pod kontrolą silnego, konstytutywnie aktywnego promotora wirusa CMV. Komórki linii A549 oraz NCI-H82 nie produkują β-galaktozydazy, dlatego wykrycie barwnego produktu reakcji katalizowanej przez ten enzym, świadczy o obecności we wnętrzu komórki wprowadzonego do niej metodą transfekcji plazmidu. Reakcja katalizowana przez enzym opiera się na przemianie bezbarwnego substratu reakcji (X-gal) w produkt o zielono-niebieskim zabarwieniu [9].

W celu wykonania odczynu medium usuwano z hodowli komórkowej, a na każdą studzienkę 6-dołkowej płytki hodowlanej (Test Plate 6-wells, TPP, nr kat. 92006) podawano po 2ml buforu utrwalającego [PBS (Gibco BRL, nr kat. 1420), formaldehyd do stężenia 2% (Odczynniki sp. z o.o., nr kat.77/6193-79), MgCl₂ do stężenia 2mM (POCH S.A, nr kat. 612050110)] i inkubowano przez 15min w temperaturze pokojowej (RT). Następnie, bufor utrwalający usuwano, a komórki dwukrotnie umieszczano w 2ml buforu płuczającego (PBS, MgCl₂ do stężenia 2mM), za każdym razem przeprowadzając inkubację 5min w RT. Po płukaniu bufor usuwano i przeprowadzano 24-godzinną inkubację w 37°C w buforze barwiącym [PBS, MgCl₂ do stężenia 2mM, K₄Fe(CN)₆·3H₂O do stężenia 5mM (Reko), K₃Fe(CN)₆ do stężenia 5mM (Reko), X-gal 1mg/ml (Thermo Scientific, nr kat. R0401)]. Po inkubacji bufor barwiący usuwano, a studzienki przemywano kilkoma mililitrami buforu płuczającego. Komórki oglądano pod mikroskopem, a wydajność transfekcji szacowano według wzoru:

$$\text{wydajność} = \frac{\text{ilość wybarwionych komórek w polu widzenia}}{\text{ilość wszystkich komórek w polu widzenia}} \times 100\%$$

Reakcja RT-PCR

Transfekowane komórki zbierano i izolowano z nich całkowity, komórkowy RNA. W tym celu użyto zestawu firmy Roche – High Pure RNA Isolation Kit (nr kat. 11828665001). Izolację przeprowadzono z obu linii komórkowych zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Obie reakcje – odwrotnej transkrypcji (RT) i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) – przeprowadzono przy użyciu termocyklera GeneAmp 2700 firmy Perkin Elmer.

Wyizolowany całkowity, komórkowy RNA poddawano reakcji RT, w celu uzyskania komplementarnego cDNA. Użyto zestawu oferowanego przez firmę Promega – Reverse

Transcription System (nr kat. A3500). Odczyn przeprowadzano zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta zestawu.

Uzyskany w reakcji RT-cDNA poddawano reakcji PCR, również z użyciem zestawu dostarczonego przez firmę Promega (nr kat. M8301). W reakcji PCR użyto starterów typu „reverse” i „forward” specyficznych wobec rekombinowanej formy IL-27, zsyntetyzowanych na zamówienie w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN. Użyte startery wykazywały następujące sekwencje: F (5' – CTCCAGTCAGG-GCTGGGGGCTCAATG – 3'); R (5' – GAATTCATGAACCCGCAGCTCCTCCT – 3'). Reakcję PCR wykonywano w 35 cyklach, przeprowadzanych według następującego profilu temperaturowego: 2min 94°C (inkubacja wstępna); 45s 94°C; 30s 56°C; 90s 72°C; 10min 72°C (inkubacja końcowa); i dalej 4°C.

Rozdział elektroforetyczny

Produkty reakcji RT-PCR poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 0,7% żelu agarozowym [agaroz – 0,7% (Promega, nr kat. V3121); bufor TAE (APPLICHEM, nr kat. A4227)] w buforze TAE (ang. Tris-Acetate-EDTA buffer). Żel po sporządzeniu suplementowano 3µl bromku etydyny (Sigma Aldrich, nr kat. E1510) w celu łatwiejszej detekcji produktów w świetle UV po dokonanych rozdzielaniu. Rozdział prowadzono przez 60min przy napięciu 125V. Użyto markera wielkości Lambda HindIII/EcoRI firmy Fermentas (nr kat. SM0191).

Po rozdzielaniu żel fotografowano, a wielkość produktów określano względem wykorzystanego markera wielkości z użyciem programu GelAnalyzer firmy Sequentix.

Analizy immunofluorescencyjne

W celu oceny poprawności funkcjonowania plazmidu pMXs-IL27 odczynem immunofluorescencyjnym z następczym odczytem w cytometrze przepływowym poddano ustalone linie komórkowe (A549 oraz NCI-H82) transfekowane plazmidem ekspresyjnym (pMXs-IL27) oraz kontrolnym (pMXs-IG). Po transfekcji w liniach tych, techniką znakowania bezpośredniego z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, wyznakowanych barwnikami oceniano zewnątrzkomórkową ekspresję cząsteczek CD80 (Anti-Human B7.1, BD Pharmingen, nr kat. 557226), CD83 (Anti-Human CD83, BD Pharmingen, nr kat. 551058), CD86 (Anti-Human B7.2, BD Pharmingen, nr kat. 555657), CD120A (Anti-Human TNFR type I, AbD Serotec, nr kat. 0709), CD120B (Anti-Human TNFR type II, BD Pharmingen, nr kat. 552418) oraz CD178 (Anti-Human FasL, AbD Serotec, nr kat. 0705). Natomiast w celu oceny wewnątrzkomórkowej ekspresji IL-27 wykorzystano nieznakowane przeciwciało (technika znakowania pośredniego) monoklonalne Anti-Human IL-27 firmy Sigma Aldrich (nr kat. WH0246778M1).

Znakowaniu immunofluorescencyjnemu poddano także materiał BAL od pacjentów zILD. Materiał diagnostyczny obejmował: 4 przypadki sarkoidozy (PS), 1 przypadek zwykłego śródmiąższowego zapalenia płuc (UIP), 1 przypadek zewnątrzpo pochodnego alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych (AZPP), 1 przypadek reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) oraz 1 przypadek *cor pulmonale* (Cor). W materiale BAL techniką znakowania pośredniego badano ekspresję IL-27 wewnątrz komórek.

Znakowanie determinant powierzchniowych w badanych liniach komórkowych przeprowadzano według następującej procedury:

Do każdej z prób podawano po 150000 komórek. Następnie dodawano do nich po 2,5µl odpowiedniego przeciwciała monoklonalnego, wyznakowanego barwnikiem, krótko worteksowano i poddawano 30min inkubacji w ciemności i RT. Po inkubacji komórki przemywano 2ml 0,1% roztworu PBS z azydkiem sodu (NaN_3 , ACROS, nr kat. ACRS19038) i wirowano (300G, 8min). Supernatant usuwano, a osad komórek zawieszano w 250µl 2% roztworu PBS z formaldehydem i analizowano w cytometrze przepływowym. Równolegle według analogicznego schematu sporządzano izotypowe próby kontrolne (BD Pharmingen, IgG1 FITC nr kat. 555748, IgG1 Pe nr kat. 555749).

Znakowanie determinant wewnątrzkomórkowych (IL-27) w badanych liniach oraz materiale BAL przeprowadzano według procedury:

Do każdej z prób badanych podawano po 300000 komórek. Następnie dodawano do nich po 500µl 1x płynu do permabilizacji błony komórkowej FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences, nr kat. 340973) i ponownie inkubowano przez 10min w RT. Po inkubacji komórki przemywano 2ml 0,1% roztworu PBS z NaN_3 i wirowano (300G, 8min). Uzyskany supernatant zlewano, a do osadu komórek podawano po 5µl przeciwciała anty-IL27. Próby worteksowano i poddawano 30min inkubacji w ciemności i RT. Po inkubacji ponownie komórki przemywano 2ml 0,1% roztworu PBS z NaN_3 i wirowano (300G, 8min). Supernatant ponownie usuwano, a do prób podawano po 9µl roztworu przeciwciała wtórnego (królicza surowica anty-mysia) skoniugowanego z FITC (Dako, nr kat. F0185) (1µl przeciwciała wtórnego, 9µl roztworu PBS) i inkubowano je przez 10min w ciemności i RT. Następnie próby przemywano 2ml roztworu PBS i wirowano (300G, 8min). Supernatant usuwano, a osad komórek zawieszano w 250µl 2% roztworu PBS z formaldehydem i poddawano analizie w cytometrze przepływowym. Równolegle sporządzano próbę kontrolną według analogicznego schematu, z wyłączeniem podania przeciwciała anty-IL27.

Immunoenzymatyczny test ELISA

Przy pomocy immunoenzymatycznego testu ELISA (Elisa IL-27 Kit, Diaclone, nr kat. 1027-01) sprawdzano czy produkowana wewnątrzkomórkowo IL-27 wydzielana jest do środowiska pozakomórkowego.

W teście oceniano supernatanty materiału BAL pochodzące od: 18 pacjentów z PS, 13 pacjentów z samoistnych włóknieniem płuc (ang. idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) oraz od 3 pacjentów z RZS, a także nadsącze pochodzące z hodowli linii komórkowych A549 oraz NCI-H82.

Supernatanty materiału BAL uzyskiwano w następujący sposób: popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe przesączano przez jałową gazę i poddawano wirowaniu (240G, 15min, 4°C). Uzyskany supernatant porcjonowano po 500µl i wykorzystywano w teście ELISA.

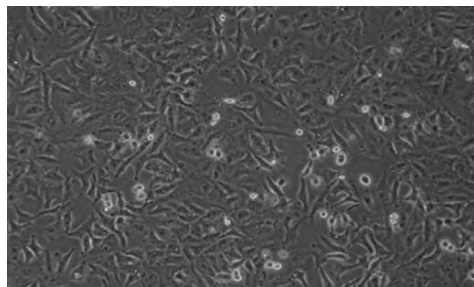
Test ELISA wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta zestawu.

Wyniki

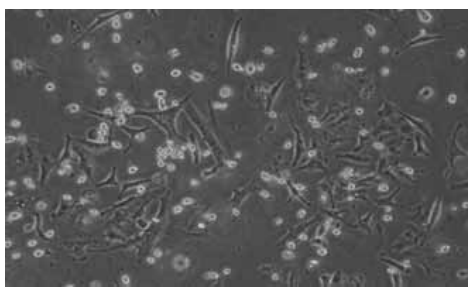
Wpływ transfekcji na komórki linii A549

Po transfekcji linii A549 plazmidem ekspresyjnym pMXs-IL27 zauważono zmiany zarówno w żywotności komórek, jak i w ich fenotypie. Zaobserwowano wyraźne obumieranie komórek w kulturze *in vitro*. Ponadto, dotychczasowe charakterystyczne, rozplaszczone i „gwieździste” komórki przybierały kształt okrągły. Należy podkreślić, że transfekcja plazmidem kontrolnym pMXs-IG nie przynosiła tego efektu.

Poniżej zamieszczono fotografie mikroskopowego obrazu komórek linii A549, przedstawiające zmiany w ich morfologii po transfekcji plazmidem ekspresyjnym, w porównaniu do hodowli transfekowanej plazmidem kontrolnym.



Rys. 1. Obraz mikroskopowy komórek linii A549, transfekowanej plazmidem kontrolnym pMXs-IG

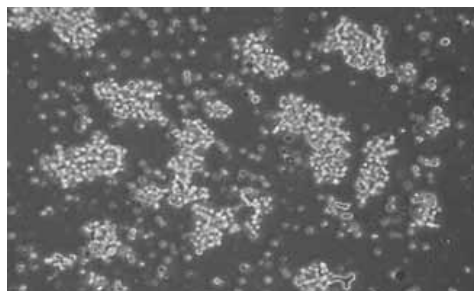


Rys. 2. Obraz mikroskopowy komórek linii A549, transfekowanej plazmidem ekspresyjnym pMXs-IL27

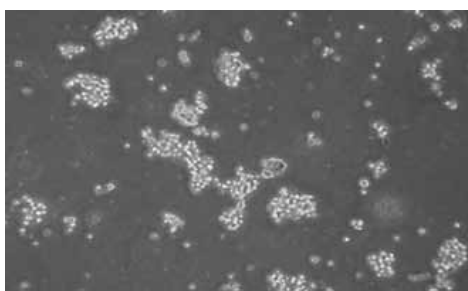
Wpływ transfekcji na komórki linii NCI-H82

Transfekcja komórek linii NCI-H82 plazmidem pMXs-IL27 wpłynęła jedynie na żywotność komórek transfekowanych plazmidem ekspresyjnym. W przypadku transfekcji plazmidem kontrolnym, nie zauważono zmian liczebności komórek.

Zdjęcia, przedstawiające transfekcję komórek linii NCI-H82, przedstawiono poniżej.



Rys. 3. Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H82, transfekowanej plazmidem kontrolnym pMXs-IG



Rys. 4. Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H82, transfekowanej plazmidem ekspresyjnym pMXs-IL27

Wydajność transfekcji

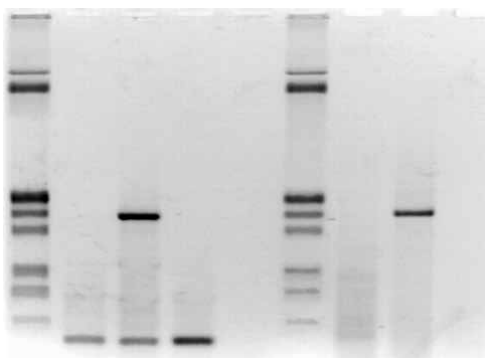
Inkubacja komórek transfekowanych plazmidem pCMV- β gal z bromo-chloro-indo-lilo-galaktopiranozydem (X-gal) spowodowała wybarwienie komórek stransfekowanych na kolor zielono-niebieski, podczas gdy komórki niestransfekowane pozostały bezbarwne.

Wydajność procesu transfekcji, obliczoną na podstawie wzoru podanego powyżej, oceniono w jednym z powtórzeń doświadczenia aż na 90 %.

Ekspresja IL-27 w komórkach linii A549 oraz NCI-H82

Rozdział elektroforetyczny produktów uzyskanych po reakcji RT-PCR doprowadził do uwidocznienia produktu specyficznego, o długości ok 1400 par zasad, co odpowiada wielkością cDNA kodującego IL-27.

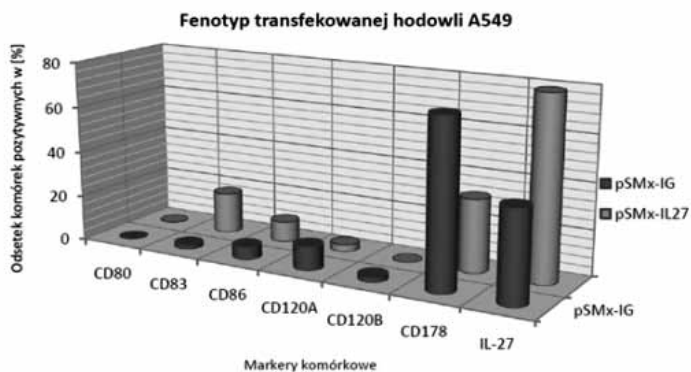
Poniżej przedstawiono fotografię wyniku rozdziału elektroforetycznego.



Rys. 5. Wynik rozdziału elektroforetycznego (od lewej: A549: niestransfekowane, transfekowane pMXs-IL27, transfekowane pMXs-IG marker, NCI-H82: niestransfekowane, transfekowane pMXs-IL27, transfekowane pMXs-IG)

Analizy immunofluorescencyjne

Uzyskane wyniki dla linii A549 prezentuje rysunek poniżej.

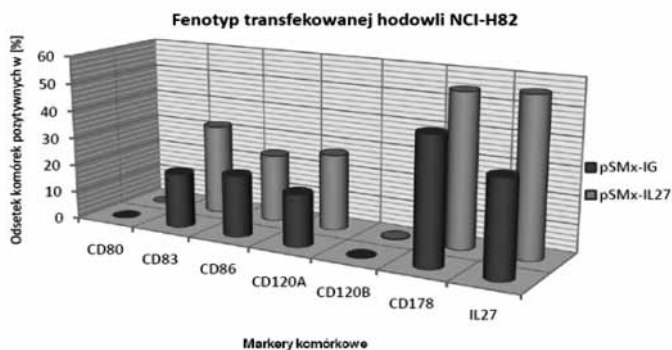


Rys. 6. Wynik barwienia immunofluorescencyjnego linii A549 transfekowanej plazmidem kontrolnym (pSMx-IG) oraz ekspresyjnym (pSMx-IL27)

W przypadku linii A549 zwraca uwagę ekspresja IL-27 zarówno w komórkach kontrolnych jak i hodowlach transfekowanych plazmidem ekspresyjnym. Odnotowano jednak wzrost odsetka komórek, produkujących omawianą cytokinę po transfekcji plazmidem ekspresyjnym.

Badanie cytometryczne wykazało również obecność cząsteczek CD83 na powierzchni badanej linii komórkowej. Ich poziom na powierzchni wzrastał po transfekcji plazmidem ekspresyjnym.

Rysunek poniżej prezentuje wyniki dla linii NCI-H82.



Rys. 7. Wynik barwienia immunofluorescencyjnego linii NCI-H82 transfekowanej plazmidem kontrolnym (pSMx-IG) oraz ekspresyjnym (pSMx-IL27)

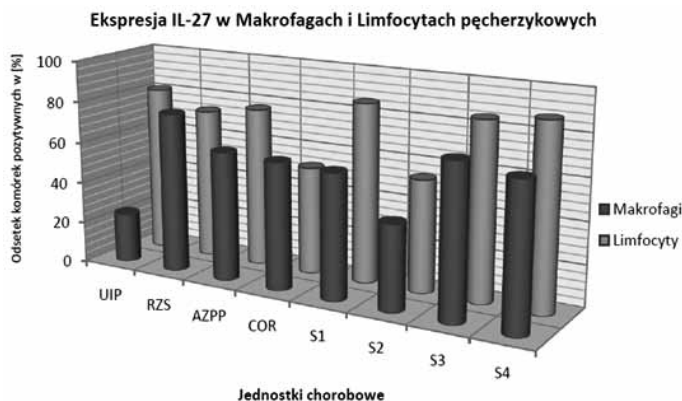
W przypadku komórek linii NCI-H82 uzyskano wyniki analogiczne jak w linii A549. Zauważono zarówno pierwotną ekspresję IL-27, jak i obecność markera dojrzałych komórek dendrytycznych na powierzchni komórek raka.

Podobnie jak w przypadku linii A549 odnotowano wzrost ekspresji zarówno omawianego białka, jak i cząsteczek CD83 po transfekcji plazmidem ekspresyjnym.

Przeprowadzono także analizy w materiale BAL. Znakowanie zewnątrzkomórkowe IL-27 w materiale BAL przy pomocy przeciwciała skierowanego przeciw badanej cytokinie przyniosło wynik ujemny – nie zaobserwowano ekspresji IL-27 na powierzchni komórek, pochodzących z dolnych dróg oddechowych.

Dodatnie wyniki w przypadku komórek BAL uzyskano natomiast w przypadku znakowania wewnątrzkomórkowego. Odnotowano jej obecność w makrofagach pęcherzykowych (25–80%). Dodatkowo, uzyskano stosunkowo wysoki wynik w przypadku limfocytów (50–90%).

Uzyskane wyniki prezentuje poniższy rysunek.



Rys. 8. Odsetki IL-27+ makrofagów i limfocytów pęcherzykowych analizowanych w przypadkach chorobowych (UIP – zwykłe śródmiąższowe zapalenie płuc; RZS – śródmiąższowe włóknienie płuc związane z reumatoidalnym zapaleniem stawów; AZPP – alergiczne zewnątrzopłucne zapalenie pęcherzyków płucnych; COR – cor pulmonale; S1-S4 – sarkoidoza)

Dla wszystkich pomiarów makrofagów mediana kształtowała się na poziomie 61,5%, zaś w przypadku limfocytów pęcherzykowych wynosiła 79%.

W przypadku sarkoidozy (S1-S4) mediana kształtowała się na poziomie 64% dla makrofagów oraz 85,5% dla limfocytów pęcherzykowych.

Immunoenzymatyczny test ELISA

Immunoenzymatyczny test ELISA wykonano, w celu sprawdzenia, czy produkowana wewnątrzkomórkowo IL-27 wydzielana jest do środowiska pozakomórkowego. W tym celu zbadano nadsącze, uzyskane po odwirowaniu komórek BAL u pacjentów, u których zdiagnozowano ILD.

Sekrecję IL-27 odnotowano w 7 z 40 badanych przypadków (16%). Pozytywne wyniki uzyskano tylko w przypadkach PS. Stężenia badanej cytokiny mieściły się w przedziale 4–25 pg/ml.

Uzyskane wyniki prezentuje tabela poniżej.

Tabela 1. Stężenia IL-27 [pg/ml] uzyskane metodą ELISA w materiale BAL pochodzącym od pacjentów z ILD (S1-S7 – sarkoidoza).

Jednostka chorobowa	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Stężenie IL-27 [pg/ml]	4,316	4,596	6,963	11,202	12,088	15,491	24,651

Wnioski

W hodowlach komórkowych ustalonych ludzkich nowotworowych linii komórkowych po transfekcji plazmidem ekspresyjnym wyraźnie (w obserwacji mikroskopowej) zwiększała się ilość komórek apoptotycznych (linia A549) oraz zmniejszała ich potencjał proliferacyjny (linia A549 i NCI-H82). W przypadku hodowli kontrolnej, transfekowanej plazmidem pustym podobny efekt nie był obserwowany. Znaczna wydajność procesu transfekcji została potwierdzona w linii adherentnej raka (A549) przy pomocy barwienia techniką X-GAL. Trzeba jednak podkreślić, że w toku dalszych analiz niezbędne jest potwierdzenie apoptozy komórek innymi wiarygodnymi technikami, np. w cytometrii przepływowej.

Prawidłowe działanie plazmidu ekspresyjnego we wnętrzu komórek zostało potwierdzone przy pomocy rozdziału elektroforetycznego, który uwidoczniał produkt odpowiadający wielkością cDNA, produkowanej wewnątrzkomórkowo IL-27. Dodatkowo w komórkach transfekowanych plazmidem ekspresyjnym występował wyraźny wzrost odsetka dodatnich cytometrycznie komórek IL-27+ w porównaniu z komórkami transfekowanymi plazmidem kontrolnym, co dodatkowo potwierdza prawidłowe funkcjonowanie plazmidu ekspresyjnego.

W analizach fluorescencyjnych obie linie komórkowe okazały się w sposób pierwotny produkować IL-27, co było wynikiem nieoczekiwanym, który stawia przeciwnowotworową funkcję tej cytokiny pod znakiem zapytania. Z drugiej strony próbuje się to tłumaczyć epithelialnym pochodzeniem tych komórek oraz ich egzystencją na styku środowisk – zewnętrznego i wewnętrznego – gdzie prezentacja antygenów musi przebiegać w sposób szczególnie wydajny. Przypuszczenia te znajdują swoje źródło w badaniach Larousserie i jego współpracowników [7].

Należy wyjaśnić, że wynik rozdziału elektroforetycznego (brak IL-27 w komórkach transfekowanych plazmidem kontrolnym) nie korelował z odczytem cytometrycznym komórek dla obu linii (pierwotna ekspresja IL-27 w komórkach transfekowanych plazmidem kontrolnym) z powodu użycia w reakcji PCR starterów swoistych tylko wobec rekombinowanej, a nie fizjologicznej, formy IL-27, będącej produktem plazmidu ekspresyjnego.

Interującym wynikiem w oczach autorów jest także zaobserwowanie na powierzchni komórek raka obu linii cząsteczek CD83 – markera który występuje na powierzchni dojrzałych komórek dendrytycznych. Przypuszcza się zgodnie z danymi literaturowymi, że może to stanowić jeden z mechanizmów ucieczki tych nowotworów spod nadzoru immunologicznego organizmu gospodarza [1, 2]. Jednak w celu sformułowania ostatecznych wniosków w tej kwestii, niezbędne są dalsze, bardziej szczegółowe badania.

W obu użytych liniach komórkowych badano metodą odczynów immunofluorescencyjnych także inne cząsteczki (CD80, CD86, CD120A, CD120B, CD178). Jednak zmian w ich ekspresji po transfekcji plazmidem ekspresyjnym i kontrolnym nie analizowano pod względem statystycznym z powodu zbyt małej ilości dokonanych powtórzeń doświadczenia. Dokładniejsze analizy zostaną dokonane w najbliższej przyszłości.

W obliczu uzyskanych wyników (obecność IL-27 we wnętrzu komórek nowotworowych) podjęto próbę ustalenia źródeł IL-27 w dolnych drogach oddechowych człowieka. W tym celu wykorzystano materiał BAL od chorych zILD. Także i w tych analizach dokonano ciekawego odkrycia. Okazało się, że źródłem IL-27, cytokiny produkowanej

z definicji tylko przez komórki dendrytyczne i makrofagi, są także limfocyty pęcherzykowe. Detekcji omawianej cytokiny dokonano we wnętrzu komórek. Uzyskanych danych nie interpretowano pod względem statystycznym ze względu na zbyt małą ilość przypadków i brak grupy kontrolnej. Prowadzone są dalsze badania.

W następnym kroku podjęto próbę ustalenia czy, w jakich ilościach i w jakich jednostkach chorobowych z grupy ILD, IL-27 wydzielana jest do otoczenia pozakomórkowego. W przeprowadzonym teście ELISA wyniki dodatnie uzyskano tylko w przypadkach sarkoidozy, co może świadczyć o tym iż jest to marker biologiczny, użyteczny w prognozowaniu przebiegu chorób z polaryzacją Th1.

Podsumowując, wszystkie wyniki uzyskane w prezentowanej pracy mają charakter analiz wstępnych. Plazmid ekspresyjny, kodujący IL-27 wydaje się być użytecznym narzędziem terapii genowej raka drobno – i niedrobnokomórkowego płuca – obserwowano wzmożoną apoptozę i obniżenie potencjału proliferacyjnego w hodowlach komórkowych wspomnianych nowotworów – z drugiej strony, pierwotna ekspresja tej cytokiny w komórkach raka stawia pod znakiem zapytania jej aktywność przeciwnowotworową. Niezwykle zaskakujący okazał się także fakt produkcji IL-27 przez komórki niezaliczane do populacji APC – limfocyty pęcherzykowe. Obie kwestie wymagają dalszych badań.

Streszczenie

Wprowadzenie. Interleukina 27 jest cytokiną zbudowaną z dwóch podjednostek – p28 oraz EBI3. Na komórki docelowe działa przez swoisty receptor, WSX1. Według danych literaturowych produkowana i wydzielana jest do otoczenia przez komórki prezentujące antygen (APC), w tym komórki dendrytyczne, endotelialne i makrofagi. Profil działania IL-27 jest wszechstronny: odpowiada ona za polaryzację immunologiczną w kierunku limfocytów Th1 z jednoczesnym ograniczeniem odpowiedzi humoralnej. IL-27 wykazuje też silne działanie przeciwnowotworowe: pobudza odpowiedź cytotoksyczną przeciw komórkom nowotworowym, wzmacnia prezentację antygenów guza z udziałem cząsteczek MHC klasy I i kostymulujących. Wzrost nowotworów hamuje także poprzez swe działanie antyangiogenne.

Cel pracy. Konstrukcja i ewaluacja prawidłowego funkcjonowania plazmidu ekspresyjnego kodującego Interleukinę 27 w ustalonych ludzkich liniach drobno – (NCI-H82) i niedrobnokomórkowego (A549) raka płuca. Dodatkowo, ocena ekspresji IL-27 w drogach oddechowych.

Metody. Funkcjonowanie plazmidu pXMs-IL27 oceniono transfekując dwie linie nowotworowe raka płuca: A549 oraz NCI-H82. Efektywność procesu oceniono wykonując RT-PCR i rozdział elektroforetyczny. Mikroskopowo oceniono zmiany morfologiczne. Dodatkowo zbadano metodami immunofluorescencji bezpośrednio powierzchnię ekspresję molekuł CD80, CD83, CD86, CD120a, CD120b oraz CD178 na obu liniach komórkowych; metodą pośrednią zbadano wewnątrzkomórkową ekspresję IL-27 w liniach nowotworowych oraz w popłuczynach BAL od chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc. Jej uwalnianie do środowiska pozakomórkowego oceniono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA.

Wyniki. Uwidoczniono produkt specyficzny na elektroforegramie. Analiza cytometryczna wykazała pierwotną ekspresję IL-27 w obu liniach raka płuca. Dodatkowo stwierdza się ekspresję CD83 na powierzchni badanych linii, która nieznamienicie nasiliła się po transfekcji plazmidem ekspresyjnym. Zaobserwowano również wewnątrzkomórkową ekspresję IL-27 w komórkach BAL – makrofagach i limfocytach pęcherzykowych. Jej uwalnianie do środowiska pozakomórkowego potwierdzono w przypadkach sarkoidozy.

Wnioski. Skonstruowano plazmid ekspresyjny pMXs-IL27. Technika RT-PCR udowodniła obecność swoistego transkryptu w komórkach transfekowanych. Pierwotna wewnątrzkomórkowa ekspresja IL-27 w liniach raka płuca warunkowana jest być może ich epitelianym pochodzeniem oraz funkcjonowaniem na styku środowiska zewnętrznego i wewnętrznego, gdzie fizjologicznie przebiega prezentacja antygenów. Można przypuszczać, że obecność markera dojrzałych komórek dendrytycznych – CD83 – na powierzchni komórek A549 i NCI-H82 to mechanizm obronny, umożliwiający ucieczkę komórek raka spod nadzoru immunologicznego. Obserwuje się ekspresję IL-27 w komórkach BAL. Jej uwalnianie do środowiska pozakomórkowego dolnych dróg oddechowych może okazać się swoiste dla sarkoidozy. Natomiast ekspresji IL-27 w limfocytach dotąd nie obserwowano i dane te powinny zostać zweryfikowane w dalszych badaniach.

Literatura

- [1] Baleeiro R., Barbuto J., *Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism*, Molecular Immunology 2008, 45:3504–3520.
- [2] Baleeiro R., Bergami-Santos P., Tomiyoshi K., at al., *Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it?*, Cancer Immunol Immunother 2008, 57:265–270.
- [3] Feng X. M., Chen X. L., Liu N., Chen Z., Zhou Y. L., Han Z. B., Zhang L., Han Z. C., *Interleukin-27 upregulates major histocompatibility complex class II expression in primary human endothelial cells through induction of major histocompatibility complex class II transactivator*, Hum Immunol 2007, 68:965–972.
- [4] Feng X. M., Liu N., Yang S. G., Hu L. Y., Chen X. L., Fang Z. H., Ren Q., Lu S. H., Liu B., Han Z. C., *Regulation of the class II and class I MHC pathways in human THP-1 monocytic cells by interleukin-27*, Biochem Biophys Res Commun 2008, 367:553–559.
- [5] Jankowski M., Kopiński P., Goc A., *Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application*, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2010, 58(6):417–425.
- [6] Kamiya S., Owaki T., Morishima N., Fukai F., Mizuguchi J., Yoshimoto T., *An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells*, J Immunol 2004, 173:3871–3877.
- [7] Larousserie F., Pflanz S., Brousse N., at al., *Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatus diseases*, J Pathol 2004, 202:164–171.
- [8] Lucas S., Ghilardi N., Li J., Sauvage FJ., *IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and - independent mechanisms*, Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100:15047–15052.
- [9] MacGregor G. R., Caskey C. T., *Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells*, Nucleic Acids Res 1989, 17:2365.

- [10] Neufert C., Becker C., Wirtz S., Fantini M. C., Weigmann B., Galle P. R., Neurath M. F., *IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1*, Eur J Immunol 2007, 37:1809–1816.
- [11] Owaki T., Asakawa M., Fukai F., Mizuguchi J., Yoshimoto T., *IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet – and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways*, J Immunol 2006, 177:7579–7587.
- [12] Pflanz S., Hibbert L., Mattson J., Rosales R., Vaisberg E., Bazan J. F., *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*, J Immunol 2004, 172:2225–2231.
- [13] Pflanz S., Timans J. C., Cheung J., Rosales R., Kastelein R. A., *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*, Immunity 2002, 16:755–758.
- [14] Pirhonen J., Siren J., Julkunen I., Matikainen S., *IFN- α regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages*, J Leukoc Biol 2007, 82:1185–1192.
- [15] Shimizu M., Shimamura M., Owaki T., Asakawa M., Fujita K., Kudo M., Iwakura Y., Takeda Y., Luster A. D., Mizuguchi J., Yoshimoto T., *Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27*, J Immunol 2006, 176:7317–7324.
- [16] Villarino A. V., Stumhofer J. S., Saris C., Kastelein R., Hunter C. A., *IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation*, J Immunol 2006, 176:237–247.
- [17] Wirtz S., Becker C., Fantini M. C., *EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation*, J Immunol 2005, 174:2814–2824.

Electroporation: theory and practice

Joanna Weźgowiec*

Streszczenie

Elektroporacja jest dynamicznie rozwijaną techniką, jednakże jej szczegółowe mechanizmy nie zostały dotychczas poznane. Ze względu na potencjał licznych zastosowań medycznych, biologicznych i biotechnologicznych, przyciąga uwagę wielu interdyscyplinarnych grup badawczych. W niniejszym artykule przedstawiony został wszechstronny przegląd literatury dotyczącej podstaw teoretycznych oraz zastosowania elektroporacji. Omówiono podstawy teoretyczne opisywanej metody oraz badania eksperymentalne i symulacje komputerowe wykonane przez różne grupy badawcze. Zaprezentowano przekrój obecnych i potencjalnych zastosowań, ze szczególnym uwzględnieniem medycyny. Praca zawiera również przegląd najnowszych kierunków badań oraz postępów technologicznych w dziedzinie elektroporacji.

1. Introduction

Electroporation is a phenomenon of increased permeability of biological cell membranes exposed to external electric field. Attracting attention of a number of interdisciplinary research groups, electroporation is rapidly developing method, which offers many medical, biological and biotechnological applications. However, lack of understanding of detailed mechanism limits its potential. In this paper a comprehensive literature review of theoretical background and potential applications of electroporation is presented.

2. Basics

2.1. Theoretical background: a single-cell model

The most commonly used description for the study of basic mechanisms of electroporation is a single-cell model. From electrical point of view, biological cell can be considered as rich in ions, highly conductive cell inside, insulated from the highly conductive outside with a non-conductive plasma membrane. In the electric field, charges present inside and outside the cell will be moved electrophoretically and will accumulate at the plasma membrane, inducing transmembrane potential. Under simplifying assumptions, induced transmembrane potential difference ΔV_m follows Schwan's equation [16, 17]:

$$\Delta V_m = \frac{3}{2} E_{ext} r \cos \theta$$

where:

E_{ext} – external electric field strength

r – radius of the cell

θ – angle between the direction of the external electric field and the normal vector to the membrane in the selected point on the cell surface

* Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation, Wrocław University of Technology.

If ΔV_m surpasses a threshold value, membrane structural changes occur. The threshold membrane potential, which needs to be reached in the cell membrane to trigger formation of pores, is between 500 mV and 1 V. This value corresponds to the intensity of the electric field in the membrane between 50×10^6 V/m and V/m [35, 41].

The mechanism of structural changes of membrane is still under investigation. The most widely accepted theoretical model describing electroporation is a nano-scale pores model. Pores are formed as a consequence of structural rearrangements of membrane phospholipids. Structural changes of plasma membrane result in the increase of its permeability, not only during the pulses but also several minutes after its removal [3]. Recently, another hypothesis concerning the mechanism of electroporation has been proposed. It is based on the dipole character of the molecule of water and formation of “water defects”. In the electric field dipoles reorientation occurs and water molecules start to penetrate into the membrane [15, 43]. Under the electric field, the charged molecules will cross cell membrane pushed by electrophoretic force. For a transport of small uncharged molecules across the electropermeabilized membrane accounts diffusion.

Providing appropriate electric pulses parameters, we can reach temporal permeabilization followed by the membrane recovery. Then cells survive and the process is known as “reversible electroporation”. Other parameters can cause permanent membrane permeabilization and cell death in a process of “irreversible electroporation”.

In brief, a complete process of electroporation can be described in following steps [3]:

1. Application of electric pulses
2. Induced transmembrane potential
3. Ion flow
4. Charging of the membrane
5. Rearrangement of the molecular structure of the membrane
6. Formation of hydrophilic pores (Fig.1)
7. Increased ionic and molecular transport through the cell membrane
8. Removal of the field
9. Membrane recovery (reversible electroporation) or rupture (irreversible electroporation).

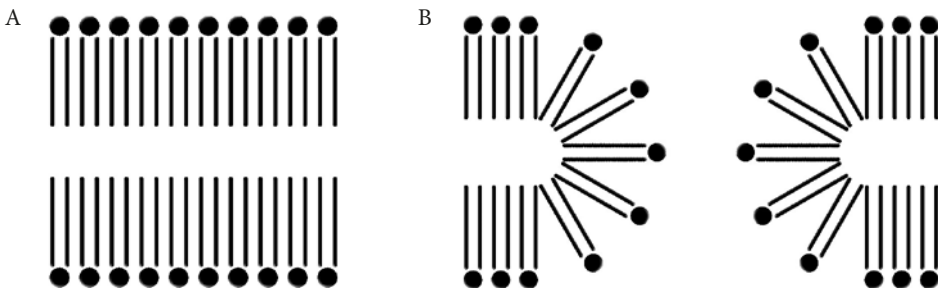


Fig. 1. Schematic representation of the intact lipid bilayer (A) and the hydrophilic pore formed in the bilayer exposed to electric field (B) [10]

2.2. Experimental studies

The simplest model of biological membrane used in studies on fundamental mechanisms of electroporation is a planar lipid bilayer. This artificial membrane is advantageous because of low costs of experiments and geometry allowing access to both sides of the membrane. Different techniques have been developed to form the planar bilayer, to perform electroporation and to measure results [18, 19, 20].

In vitro cell culture is a more complex model offering conditions more comparable to living organisms than the planar lipid bilayer. Despite many attempts, creation of pores has not been directly observed so far [32]. Indirect evidences have been obtained, such as measurements of transmembrane potential changes using potentiometric dyes [11, 13], measurements of conductivity changes and observations of molecular transport [28, 46].

2.3. Computer simulations

Numerical approach has been also proposed to investigate the nature of pores formation process. Molecular dynamics is used to calculate the trajectories of molecules and to simulate pores formation under application of ultrashort very intense electric field [40, 42].

Mathematical models are also valuable tools for prediction of electric field distribution and tissue electroporation since tissue is a very complex structure, composed of different cell types which are in close contact and have different electrical properties, so single cell model is not sufficient [12].

3. Potential applications

Electroporation can be used for different purposes, depending on the applied pulses parameters. If external electric field exceeds the threshold value, cell membrane is electroporated, which allows different molecules being introduced into the cell or two cells membranes fusion may occur. When external electric field exceeds critical value, electroporation is irreversible and cell dies after membrane disintegration. In this section I will focus on medical applications of electroporation, while other areas will be only mentioned.

3.1. Electroporation for medicine

3.1.1. Reversible electroporation

Reversible electroporation can be used for anti-cancer therapies enhancement.

Electrochemotherapy is a combination of chemotherapy and application of electric pulses used in clinical practice. This treatment is based on enhancement of the uptake of normally impermeable or low permeable chemo drug molecules by electroporation [29]. The drug is injected locally or systematically before pulses application.

Different factors affect ECT effectiveness: appropriate choice of a drug, time interval between administration of drug and pulses application, amplitude, number, duration and frequency of electric pulses, electric field distribution in the tissue, controlled by the electrode geometry. Most common pulses parameters used in electrochemotherapy are the following: 8 rectangular pulses of duration of 100 μ s and amplitude in the range

between 1000–1500 V/cm delivered at 1 Hz pulse repetition frequency. Two chemotherapeutic drugs were identified as potential candidates for electrochemotherapy: bleomycin and cisplatin [27, 36]. Cell electropermeabilization increases bleomycin toxicity several thousands fold *in vitro* and about one thousand fold *in vivo* [26]. Cisplatin cytotoxicity increases several tens fold [10].

In vivo response to electrochemotherapy involves several mechanisms including increased drug uptake, induction of immune response and antivasular effects. Transient reduction of blood flow caused by electric field results in drug entrapment in the tissue for several hours [36]. Vascular disrupting effect is related to tumor cell death due to long-lasting hypoxia [9, 37].

The procedure of electrochemotherapy has been approved in several UE countries and is used successfully for both cutaneous and subcutaneous tumors (melanoma, Kaposi's sarcoma, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma). Electrochemotherapy is indicated when the patient is not responding to standard therapy and is not suitable for surgery [10].

Electro-gene therapy is currently at the stage of preclinical trials. It is an electrically-assisted non-viral method of nucleic acids delivery. DNA electrotransfer is described as a multi-step-process: negatively charged DNA migrates electrophoretically towards the plasma membrane on the cathode side where it accumulates. After entry into the cytoplasm it is transferred through nuclear envelope [33]. Researchers are still looking for a method to improve unsatisfactory efficiency of DNA electrotransfer and to enhance DNA uptake into cells. A combination of electroporation and sonoporation has been proposed for this purpose [6]. Another strategy involves nanosecond pulsed electric fields, which affect mainly intracellular structures instead of plasma membrane [12, 45].

Another potential application of electroporation is facilitating a transport of photosensitizers – photoactive drugs used in photodynamic therapy [21, 34, 48]. Electropermeabilization could allow to apply new, more effective drugs and reduce side-effects of therapy.

3.1.2. Irreversible electroporation

Irreversible electroporation is often an unwanted phenomenon, however it can also be desirable. Recently, a new surgical concept based on molecular selective surgery with non-thermal irreversible electroporation has been proposed. It is a minimally invasive ablation therapy, which affects only cell membrane and has an advantage over thermal ablation, sparing connective tissues and structures such as blood vessels, ducts and nerve conduits. For this reason it is a specially promising technique for surgery of liver, kidney or pancreas. In comparison with thermal ablation, in non-thermal irreversible electroporation healing is much faster process and no scar tissue is produced [5]. The Nano Knife (AngioDynamics, USA) system for irreversible electroporation has been approved for surgical ablation of soft tissue.

3.2. Other applications

Electroporation is a very useful tool for biology, biotechnology and food industry. It can be used for loading cells with dyes, nucleic acids or electrofusion of cells [41]. In food industry irreversible electroporation is applied for water sterilization and food preservation [12].

4. Engineering aspects

4.1. Pulses parameters

The choice of electric pulse parameters depends on the application. For introduction of small molecules short pulses are used (up to hundreds of microseconds), while for introduction of macromolecules, such as DNA, longer pulses (from 5 to 10 milliseconds) give better results [12, 22]. To achieve the most efficient DNA transport, the combination of high-voltage and low-voltage pulses was suggested [14, 39, 47]. The influence of pulses parameters on the electroporation efficiency has been investigated. It was explained that an increase of the pulse amplitude results in larger area of electroporation while increasing the pulse duration or number increases the degree of electroporation (extent of perturbations) [8, 32]. Experiments revealed that repetition frequency also affect electroporation; optimal value is in the range from 0.5 Hz to 10 Hz [30, 31, 44].

4.2. Devices (generators, electrodes)

Two electroporators have been approved for clinical use: Cliniporator by IGEA (Italy) and Medpulsar by INOVIO (USA). Cliniporator was introduced to the market in 2006 and now 100 units are installed throughout Europe.

In general, for clinical application two types of electrodes were designed: surface electrodes (parallel plate electrodes) and electrodes that can penetrate into the tissue (needle electrodes). Position of the electrodes and amplitudes of pulses can be calculated by using treatment planning software and imaging guiding techniques [23].

Recently, flexible electrode arrays were developed, which may be used with endoscopic and laparoscopic devices for electroporation of internal tumors [38]. Excellent description of technological advances that widen application of electrochemotherapy is given in [25]. Developed systems of electrodes allow treatment of new organs and tissue, such as: brain and colorectal tumors, liver and bone metastases and soft tissue sarcomas.

5. State-of-the-art

The most up-to-date research on electroporation are focused on a new technique, called nano-electroporation. It is proposed to use extremely short pulses (nanosecond) at very high voltages to permeabilize intracellular organelles [1]. Another rapidly developing area is electro-gene therapy, because we still lack knowledge necessary to use it efficiently [2, 4]. Interesting concept of “calcium electroporation” has been proposed last year. This low-cost anti-cancer treatment uses electroporation to load cancer cells with calcium, which will cause cell death [7].

6. Conclusions and perspectives

Undoubtedly, electroporation is a very useful research tool and clinical technique. Providing proper conditions, it can be efficiently used in medicine, biology and food technology. It can be expected that many future applications are still undiscovered, because detailed fundamental mechanism of this process still needs investigation. Close cooperation between different research groups consisting of specialists in various fields, such as biology, biophysics, engineering and medicine, is essential for this purpose. This need has been noticed and the European network for development of electroporation-based technologies and treatments has been established within COST TD1104 [24, 49]. Hopefully, a consistent theoretical explanation of electroporation and its experimental verification will significantly improve its efficiency and broaden its applications.

Acknowledgements

I would like to thank my supervisors: Prof. Małgorzata Kotulska, Dr. Julita Kulbacka and Dr. Jolanta Saczko for the guidance in the development of this paper. This work was supported by National Science Centre, grant No. 2011/01/D/NZ4/01255.

Abstract

Electroporation is rapidly developing method, attracting attention of a number of interdisciplinary research groups because of huge potential in many medical, biological and biotechnological applications. However, the detailed mechanism of this phenomenon is still under investigation. In this paper a comprehensive literature review of theoretical background and potential applications of electroporation is presented. Theoretical description of electroporation is supported with experimental studies and computer simulations. A comprehensive review of potential applications, focused on medicine, is also given. Some state-of-the-art research topics and technological advances are mentioned.

Key words: Electroporation, electrochemotherapy, anti-cancer therapies

1. Literature

- [1] Breton M., Delemotte L., Silve A., Mir L. M., Tarek M., *Transport of siRNA through Lipid Membranes Driven by Nanosecond Electric Pulses: An Experimental and Computational Study*, J Am Chem Soc, 2012, 134, 13938–13941.
- [2] Chabot S., Orio J., Schmeer M., Schleef M., Golzio M., Teissie J., *Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery*, Gene Therapy, 2013, 20, 62–68.
- [3] Chen C., Smye S. W., Robinson M. P., Evans J. A., *Membrane electroporation theories: a review*, Med Biol Eng Comput, 2006, 44, 5–14.
- [4] Chopinet L., Wasungu L., Rols M. P., *First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model*, International Journal of Pharmaceutics, 2012, 423, 7–15.
- [5] Davalos R., Mir L., Rubinsky B., *Tissue ablation with irreversible electroporation*, Annals Bio-med Eng, 2005, 33, 223–231.

- [6] Escoffre J. M., Kaddur K., Rols M. P., Bouakaz A., *In vitro gene transfer by electrosonoporation*, *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36, 1746–55.
- [7] Frandsen S. K., Gissel H., Hojman P., Tramm T., Eriksen J., Gehl J., *Direct Therapeutic Applications of Calcium Electroporation to Effectively Induce Tumor Necrosis*, *Cancer Res*, 2012, 72, 1–6.
- [8] Gabriel B., Teissie J., *Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilised cell membrane*, *Biophysical Journal*, 1997, 73, 2630–2637.
- [9] Gehl J., Skovsgaard T., Mir L. M., *Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery*, *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1569, 51–8.
- [10] Gehl J., *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*, *Acta Physiol Scand*, 2003, 177, 437–447.
- [11] Gross D., Loew L. M., Webb W. W., *Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields*, *Biophysical Journal*, 1986, 50, 339–348.
- [12] Kanduser M., Miklavcic D., *Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview* [in:] *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*, Vorobiev E., Lebovka N., Springer Science+Business Media, LLC, 2008.
- [13] Kinoshita K., Ashikawa I., Saita N., Yoshimura H., Itoh H., Nagayama K., Ikegami A., *Electroporation of cell membrane visualized under pulsed-laser fluorescence microscope*, *Biophysical Journal*, 1988, 53, 1015–1019.
- [14] Klenchin V. A., Sukharev S. I., Serov S. M., Chernomordik L. V., Chizmadzhev Y. A., *Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis*, *Biophysical Journal*, 1991, 60, 804–811.
- [15] Kohler S., Ho M. C., Levine Z. A., Leveque P., Arnaud-Cormos D., Vernier P. T., *Nanosopic Cell Membrane and Pore Profiles Combining Molecular Dynamics and a 3D Electromagnetic Tool*, *Biophysical Journal*, 2013, 104(2).
- [16] Kotnik T., Miklavcic D., *Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells*, *Biophys J*, 2000, 79, 670–9.
- [17] Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavčič D., Tarek M., *Cell membrane electroporation – Part 1: The phenomenon*, *IEEE Electr Insul M*, 2012, 28(5): 14–23.
- [18] Kotulska M., Basalyga J., Derylo M. B., Sadowski P., *Metastable Pores at the Onset of Constant-Current Electroporation*, *The Journal of Membrane Biology*, 2010, 236, 37–41.
- [19] Kramar P., Miklavčič D., Kotulska M., Maček Lebar A., *Chapter two – Voltage – and Current-Clamp Methods for Determination of Planar Lipid Bilayer Properties*, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2010, 11, 29–69.
- [20] Kramar P., Delemotte L., Macek Lebar A., Kotulska M., Tarek M., Miklavčič D., *Molecular-Level Characterization of Lipid Membrane Electroporation using Linearly Rising Current*, *The Journal of Membrane Biology*, 2012, 245, 651–659.
- [21] Labanauskienė J., Gehl J., Didziapetriene J., *Evaluation of cytotoxic effect of photodynamic therapy in combination with electroporation in vitro*, *Bioelectrochemistry*, 2007, 70, 78–82.
- [22] Lucas M. L., Heller R., *Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle*, *Molecular Therapy*, 2001, 3, 47–53.
- [23] Miklavčič D., Snoj M., Zupanic A. et al., *Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy*, *Biomed Eng Online* 2010, 9, 10.

- [24] Miklavčič D., *Network for Development of Electroporation-Based Technologies and Treatments: COST D1104*, J Membrane Biol 2012.
- [25] Miklavcic D., Sersa G., Breclj E. et al., *Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors*, Med Biol Eng Comput, 2012, 50, 1213–1225.
- [26] Mir L. M., Orlowski S., Belehradek J., Paoletti C., *Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses*, Eur J Cancer, 1991, 27, 68–72.
- [27] Mir L. M., *Bases and rationale of the electrochemotherapy*, Eur J Cancer Suppl, 2006, 38–44.
- [28] Neumann E., Sowers A. E., Jordan C. A., *Electroporation and electrofusion in cell biology*, Plenum press, 1988.
- [29] Orlowski S., Belehradek J., Paoletti C., Mir L. M., *Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs*, Biochem Pharmacol, 1988, 37, 4727–33.
- [30] Pavlin M., Kanduser M., Rebersek M., Pucihar G., Hart F. X., Madjarevic R., Miklavcic D., *Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension*, Biophysical Journal, 2005, 88, 4378–4390.
- [31] Pucihar G., Mir L. M., Miklavcic D., *The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy*, Bioelectrochemistry, 2002, 57, 167–172.
- [32] Rols M. P., *Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells*, Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1758, 423–428.
- [33] Rols M. P., *Gene transfer by electrical fields*, Curr Gene Ther, 2010, 10, 255.
- [34] Saczko J., Nowak M., Skolucka N., Kulbacka J., Kotulska M., *The effects of the electro-photo-dynamic in vitro treatment on human lung adenocarcinoma cells*, Bioelectrochemistry, 2010, 79, 90–94.
- [35] Saulis G., Saule R., *Comparison of Electroporation Threshold for Different Cell Lines in vitro*, Acta Physica Polonica A, 2009, 115, 1056–1058.
- [36] Serša G., Miklavčič D., Cemazar M., Rudolf Z., Pucihar G., Snoj M., *Electrochemotherapy in treatment of tumours*, Eur J Surg Oncol, 2008, 34, 232–40.
- [37] Serša G., Jarm T., Kotnik T. et al., *Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma*, Br J Cancer, 2008, 98, 388–98.
- [38] Soden D. M., Larkin J. O., Collins C. G. et al., *Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours*, Cancer Letters, 2006, 232, 300–310.
- [39] Sukharev S. I., Klenchin V. A., Serov S. M., Chernomordik L. V., Chizmadzhev Y. A., *Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores*, Biophysical Journal, 1992, 63, 1320–1327.
- [40] Tarek M., *Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation*, Biophys J, 2005, 88, 4045–53.
- [41] Teissie J., Rols M. P., *An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization*, Biophysical Journal, 1993, 65, 409–413.
- [42] Tieleman D. P., Leontiadou H., Mark A. E., Marrink S. J., *Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields*, J Am Chem Soc, 2003, 125, 6382–3.
- [43] Tieleman P., *The molecular basis of electroporation*, BMC Biochemistry, 2004, 5:10.

- [44] Vernhes M. C., Cabanes P. A., Teissie J., *Chinese hamster ovary cell sensitivity to localized electrical stresses*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1999, 48, 17–25.
- [45] Vernier P. T., Sun Y., Gundersen M. A., *Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization*, BMC Cell Biol, 2006, 7, 37.
- [46] Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A., *Theory of electroporation*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1996, 41, 135–160.
- [47] Zaharoff D. A., Barr R. C., Li C. Y., Yuan F., *Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery*, Gene Therapy, 2002, 9, 1286–1290.
- [48] Zhoua A., Liu M., Baciu C., Gluck B., Berg H., *Membrane electroporation increases photodynamic effects*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 2000, 486, 220–224.
- [49] www.electroporation.net

Analiza numeryczna wkładu koronowo-korzeniowego z wykorzystaniem metody elementów skończonych

Sonia Loska*, Zbigniew Paszenda*, Marcin Basiaga*, Wojciech Kajzer*

Summary

The main aim of the present study was numerical analysis of the dental post – tooth system, with the use of finite element method (FEM). The scope of the analysis included the determination of displacements, strains and stresses in the elements of analyzed system. The analysis carried out is a basis for optimizing of the post geometry and for the choice of the mechanical properties of the material for its production.

Keywords: endodontic restorations, finite element analysis, prefabricated posts

1. Wprowadzenie

Zagadnienie ochrony zdrowia stanowi obecnie główny problem społeczny w Europie z uwagi na dążenie do poprawy jakości życia. Korzystne wyniki zdrowotne, w tym w protetyce stomatologicznej, są osiągane w przypadku wprowadzania w skali masowej metod zapobiegania chorobom oraz harmonijnego wspierania tych działań poprzez stosowanie odpowiednich procedur leczniczych. Obecne sukcesy medycyny, w tym w protetyce stomatologicznej, bazują na harmonijnym uzupełnianiu się profilaktyki, leczenia i rehabilitacji. Leczenie protetyczne polega głównie na usuwaniu zaburzeń w czynności układu stomatognatycznego, jak również na przywracaniu jego czynności. W tym zakresie leczenie protetyczne łączy się z rehabilitacją, gdyż stosowanym lekiem jest w większości przypadków proteza stomatologiczna [3, 6].

Poważne destrukcje koron zębów, będące wynikiem złamań lub zaawansowanej próchnicy z towarzyszącym im stanem zapalnym miazgi, stanowią szczególny problem stomatologii zachowawczej. W praktyce klinicznej takie zęby leczone są endodontycznie, czyli kanałowo. Wynikiem takiego leczenia jest ząb martwy, bez miazgi, przygotowany do odbudowy. Jedną z metod stosowanych w procesie rekonstrukcji takich koron zębów jest stosowanie metalowych wkładów koronowo-korzeniowych, które należą do grupy protez stałych jednoczłonowych i stanowią podbudowę pod uzupełnienie protetyczne, zwiększając retencję wypełnienia oraz wytrzymałość uszkodzonego zęba, a jednocześnie powinny zachować fizjologiczną drogę przenoszenia sił wywieranych w trakcie żucia

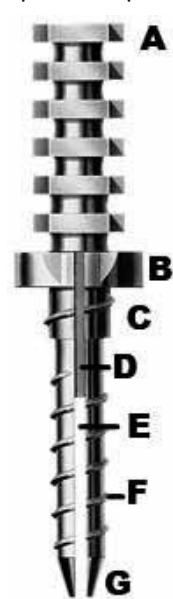
* Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wytrobów Medycznych, Wydział Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Śląska.

[4]. Wkłady koronowo-korzeniowe składają się z części koronowej, będącej substytutem zniszczonych tkanek zęba, oraz korzeniowej, osadzonej w kanale zęba. Część koronowa wkładu tworzy podbudowę pod przyszłe uzupełnienie protetyczne, zaś część korzeniowa ma pełnić funkcję elementu retencyjnego. Ze względu na sposób fabrykacji wkłady koronowo-korzeniowe można podzielić na wkłady indywidualne odlewane oraz wkłady prefabrykowane. Wkłady odlewane wykonywane są ze stopów metali (Co-Cr, Au, Cr-Ni, Ag-Pd). Natomiast wkłady koronowo-korzeniowe prefabrykowane wykonywane są z tworzyw metalowych (stopy metali szlachetnych, stal kwasoodporna, tytan oraz jego stopy), ceramiki (tlenek cyrkonu) oraz kompozytu wzmocnianego włóknem szklanym lub węglowym [8].

Skuteczność rehabilitacji protetycznej jest w równym stopniu zależna od postaci konstrukcyjnej wkładu koronowo-korzeniowego oraz materiału, z którego został on wykonany, jak i jego dostosowania do środowiska ustrojowego. Bardzo często w praktyce klinicznej istnieje problem wyboru odpowiedniego wkładu koronowo-korzeniowego. Celem przeprowadzonej analizy numerycznej układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb było wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. Tego rodzaju analiza jest podstawą do optymalizacji zarówno cech geometrycznych implantu, jak i własności mechanicznych biomateriału. Niniejsza praca stanowi fragment badań prowadzonych przez autorów, dotyczących poprawy własności użytkowych wkładów koronowo-korzeniowych stosowanych w protetyce stomatologicznej.

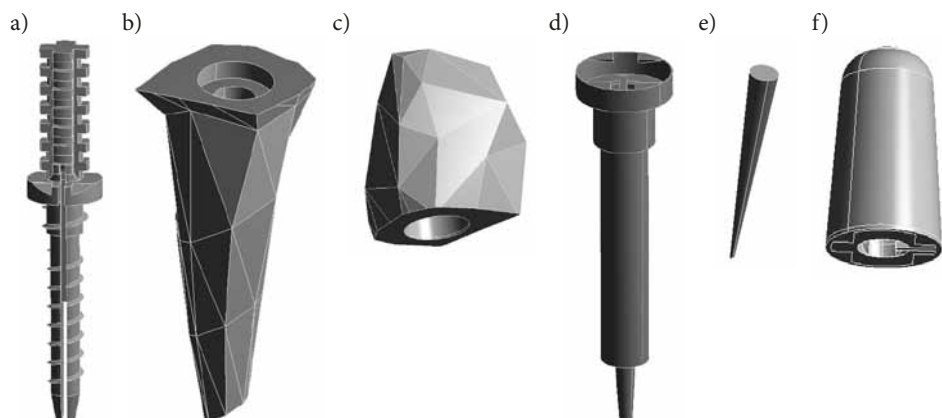
2. Metodyka badań

Analizie poddano wkład koronowo-korzeniowy Flexi-Flange firmy Essential Dental Systems, wykonany ze stopu tytanu – rys. 1.



W pierwszym etapie pracy wykonano modele geometryczne wkładu koronowo-korzeniowego oraz zęba, zachowując ich rzeczywiste wymiary – rys 2. Analizie poddano model kła dolnego z koroną odbudowaną z uszkodzeń III klasy Kurera (całkowity brak korony). W dalszej kolejności opracowano model układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb. Opracowanie kanału wykonano według ogólnie przyjętych zasad. W kanale korzenia zęba zasymulowano otwór wypełniony cementem kompozytowym Flexi-Flow zawierającym tytan, łączącym wkład z korzeniem zęba, natomiast przy wierzchołku korzenia zęba zasymulowano około 5 mm wypełnienia gutaperką. W tak przygotowany kanał wprowadzono wkład. Podobna sytuacja miała miejsce w koronie, gdzie również zasymulowano otwór wypełniony materiałem kompozytowym Ti-Core Natural do odbudowy kikuta, a następnie wprowadzono górną część wkładu koronowo-korzeniowego.

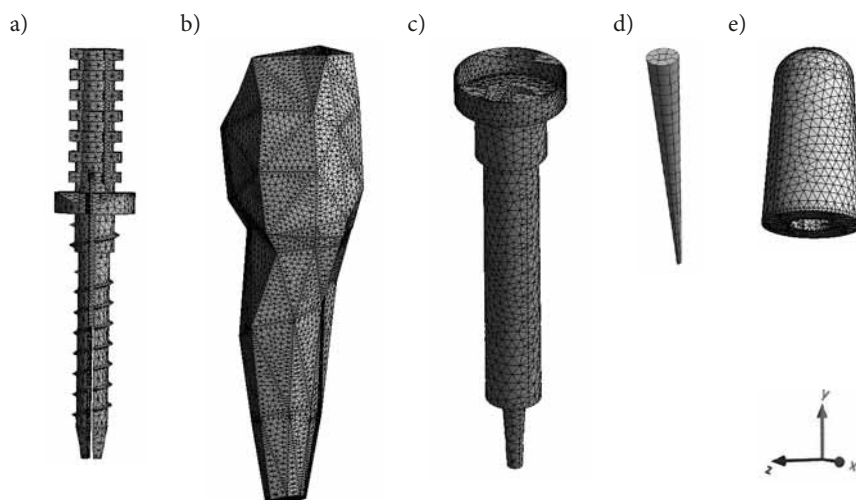
Rys. 1. Postać konstrukcyjna wkładu koronowo-korzeniowego Flexi-Flange [9]: A – część koronowa, B – kołnierz (III stopień trzonu), C – II stopień trzonu, D – kanał wentylacyjny wkładu, E – unikalna konstrukcja rozciętego trzonu wkładu, F – równoległościenny ostry gwint, G – stożkowane zakończenie ramion wkładu



Rys. 2. Model geometryczny: a) wkładu koronowo-korzeniowego, b) korzenia, c) korony, d) cementu, e) gutaperki, f) odbudowy kikuta

Dla tak opracowanych modeli geometrycznych wygenerowano siatkę do obliczeń metodą elementów skończonych. Modele geometryczne wkładu koronowo-korzeniowego, cementu, gutaperki oraz odbudowy kikuta wykonano w programie Inventor. Do dyskretyzacji elementów analizowanego układu wykorzystano oprogramowanie ANSYS Workbench v13 – rys. 3. Dla przeprowadzenia obliczeń niezbędne było określenie i nadanie warunków początkowych oraz brzegowych, które z odpowiednią dokładnością odwzorowywały zjawiska zachodzące w układzie rzeczywistym. Przyjęto następujące założenia [1]:

- koronę obciążono siłą okluzyjną $F = 300 \text{ N}$,
- umiejscowienie podpory uniemożliwiało ruch korzenia zęba w kierunku osi X, Y i Z.



Rys. 3. Model zdyskretyzowany: a) wkładu koronowo-korzeniowego, b) zęba, c) cementu, d) gutaperki, e) odbudowy kikuta

Zakres przeprowadzonej analizy obejmował wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. W obliczeniach numerycznych uwzględniono dane materiałowe składowych modelu dostępne w piśmiennictwie fachowym oraz w materiałach producentów (tab. 1). Przyjęto, że model był jednorodny i izotropowy, a analiza dotyczyła zakresu liniowego.

Tabela 1. Dane materiałowe wykorzystane w obliczeniach

	Moduł Younga [GPa]	Współczynnik Poissona	Literatura
Wkład koronowo-korzeniowy (stop tytanu)	110	0,31	3
Zębina	18,6	0,31	2, 5, 7
Korona porcelanowa	69	0,28	2
Cement Flexi-Flow	18,6	0,31	9
Kompozyt Ti-Core Natural	22,2	0,30	2
Gutaperka	0,00069	0,45	2, 7

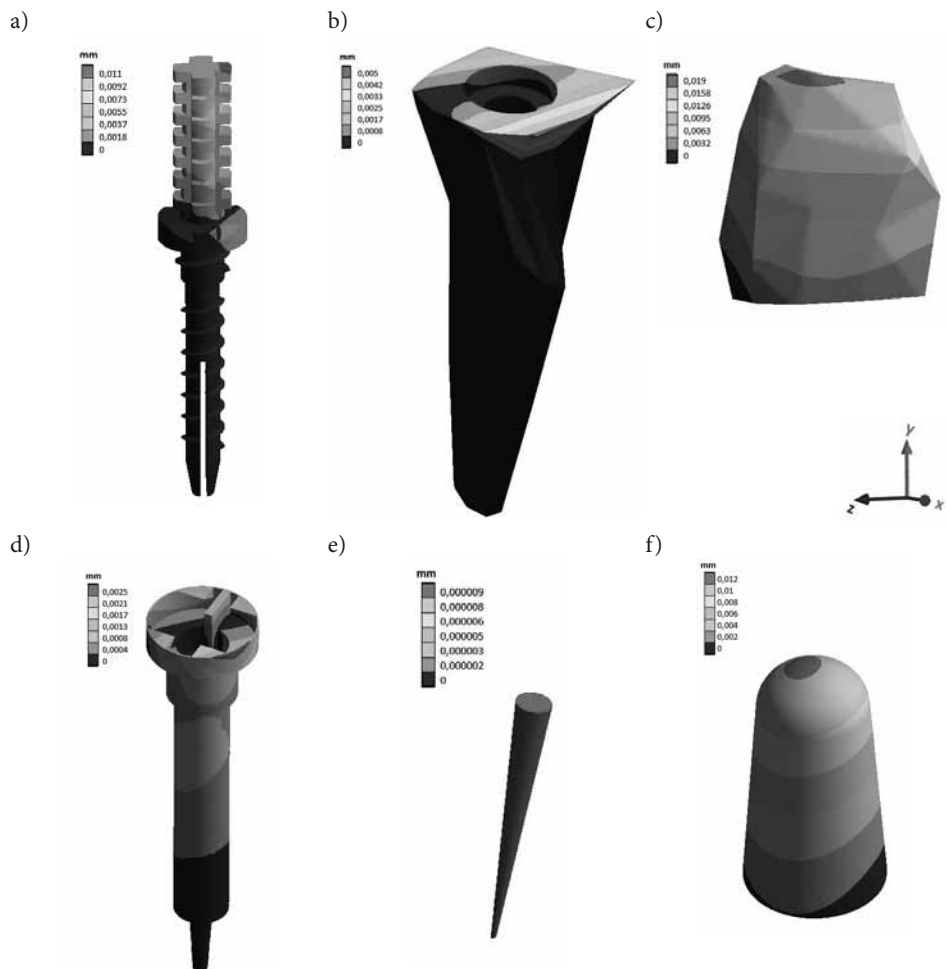
3. Wyniki badań

Wyniki analizy stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb przedstawiono w tabeli 2 i na rys. 4–6.

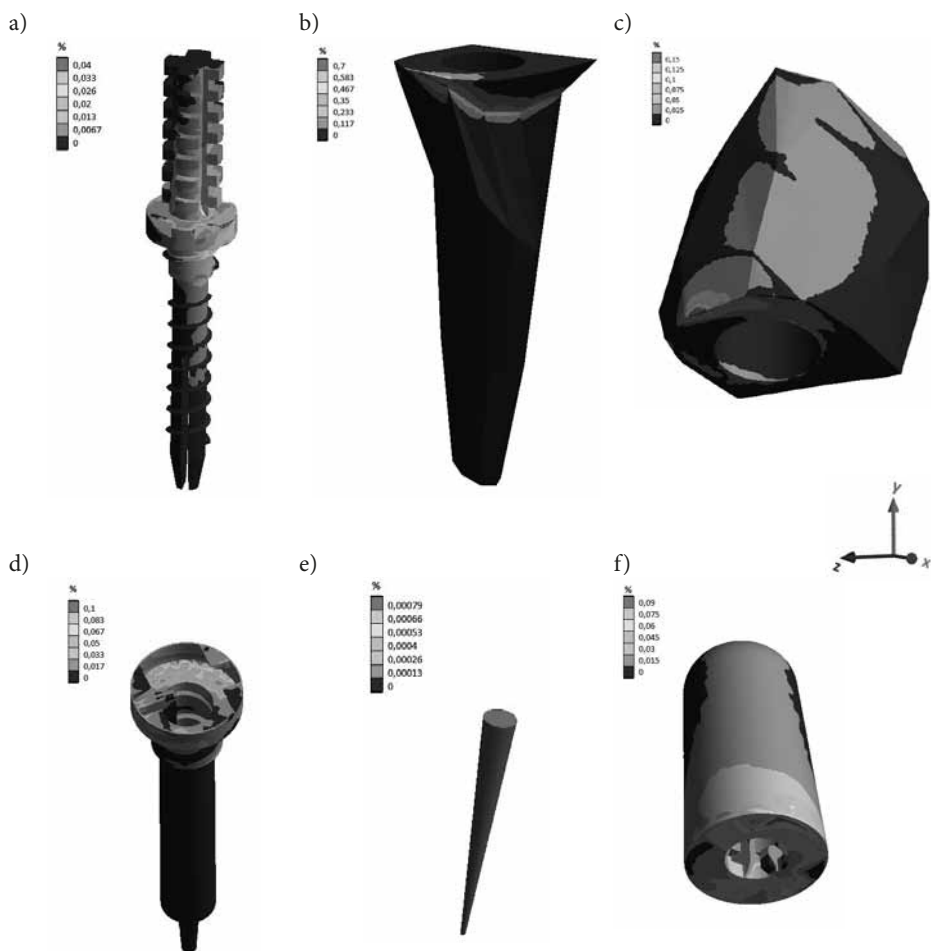
Tabela 2. Wyniki analizy numerycznej

	Elementy układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb					
	Wkład k-k	Korzeń	Korona	Cement	Gutaperka	Odbudowa kikuta
Przemieszczenia całkowite, mm	0,011	0,005	0,019	0,0025	0,000009	0,012
Odkształcenia zredukowane ϵ_{\max} , %	0,04	0,7	0,15	0,09	0,00079	0,1
Naprężenia zredukowane σ_{\max} , MPa	50	150	100	18	0,14	20

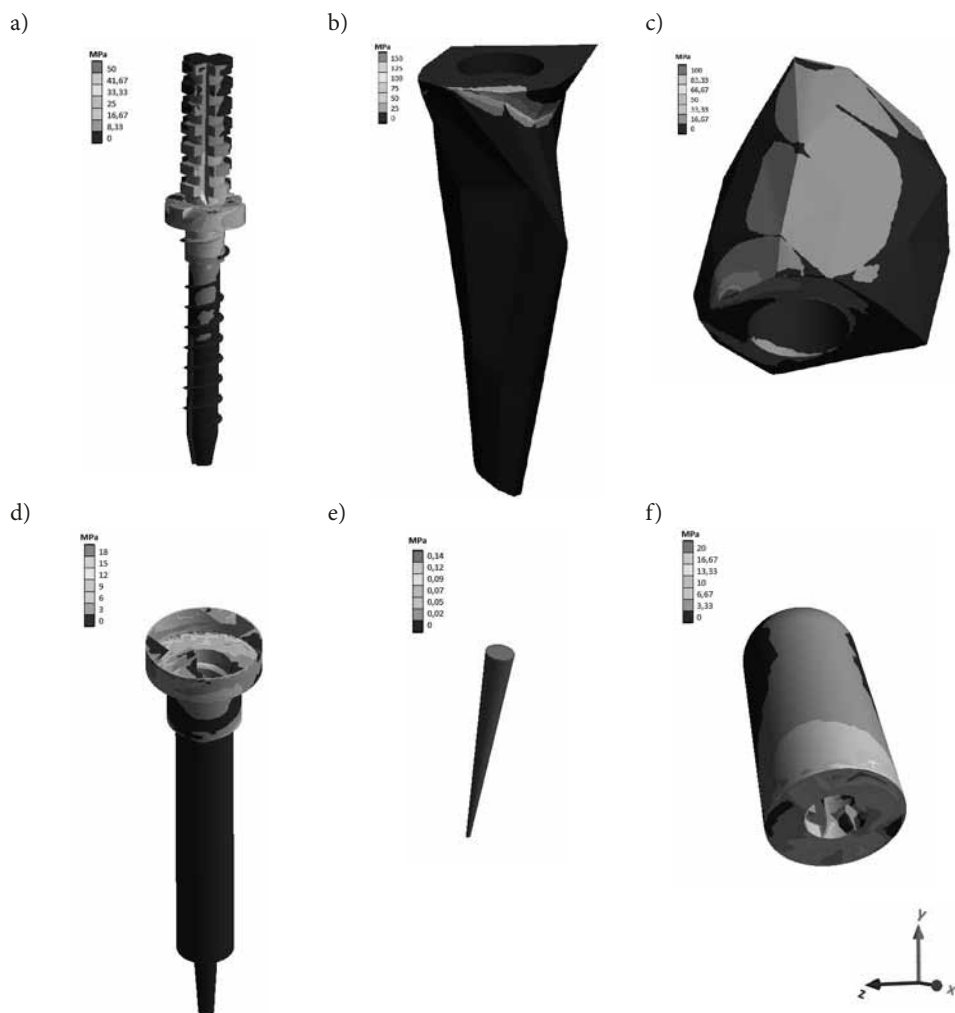
Analiza uzyskanych wyników wskazuje na zróżnicowany rozkład wartości przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że największe przemieszczenia występują w koronie i zlokalizowane były na powierzchni siecznej zęba, gdzie ich wartość maksymalna wynosiła 0,019 mm – rys. 4. Z kolei największe wartości odkształceń i naprężeń występowały w korzeniu i wynosiły odpowiednio $\epsilon_{\max} = 0,7$ % i $\sigma_{\max} = 150$ MPa. Uzyskane wartości zlokalizowane były po stronie językowej w obszarze kontaktu korony z korzeniem zęba – rys. 5 i 6.



Rys. 4. Wyniki stanu przemieszczeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb: a) wkład k-k, b) korzeń, c) korona, d) cement, e) gutaperka, f) odbudowa kikuta



Rys. 5. Wyniki stanu odkształceń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb: a) wkład k-k, b) korzeń, c) korona, d) cement, e) gutaperka, f) odbudowa kikuta



Rys. 6. Wyniki stanu naprężeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb: a) wkład k-k, b) korzeń, c) korona, d) cement, e) gutaperka, f) odbudowa kikuta

4. Podsumowanie

W pracy zaprezentowano analizę numeryczną układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb z zastosowaniem metody elementów skończonych. Do przeprowadzenia analizy niezbędne było wykonanie modeli geometrycznych układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb. W skład analizowanego układu wchodziły następujące elementy: wkład koronowo-korzeniowy Flexi-Flange firmy Essential Dental Systems, ząb (kieł dolny), cement, gutaperka oraz odbudowa kikuta. Analizie poddano model kła dolnego z koroną odbudowaną z uszkodzeń III klasy Kurera (całkowity brak korony). Następnie opracowano

model numeryczny układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb. Kanał korzeniowy został opracowany według ogólnie przyjętych zasad. Tak przygotowany model numeryczny obciążono siłą okluzyjną $F = 300 \text{ N}$. Uzyskane w analizie wartości naprężeń zredukowanych dla wkładu koronowo-korzeniowego nie przekroczyły wartości granicy plastyczności biomateriału metalowego, co gwarantuje odkształcenie wkładu w zakresie sprężystym. Dodatkowo na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono również, że uzyskane wartości naprężeń w korzeniu, koronie, cemencie oraz odbudowie kikuta nie przekraczają wartości ich wytrzymałości na ściskanie.

Niniejsza praca stanowi fragment badań prowadzonych przez autorów, dotyczących wkładów koronowo-korzeniowych stosowanych w protetyce stomatologicznej. Kolejne etapy badań obejmować będą analizę numeryczną badanego wkładu koronowo-korzeniowego z uwzględnieniem zjawisk zachodzących w układzie stomatognatycznym (np. bruksizm). W dalszej kolejności dla tak opracowanego wkładu przeprowadzone będą badania doświadczalne. Tak kompleksowe opracowanie będzie stanowić cenne źródło informacji dla stomatologów.

Podziękowania

Współautorka Sonia Loska jest stypendystką w projekcie „SWIFT (Stypendia Wspomagające Innowacyjne Forum Technologii)” POKL.08.02.01–24–005/10, współfinansowanym ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Streszczenie

Zasadniczym celem prezentowanej pracy była analiza numeryczna układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb z zastosowaniem metody elementów skończonych. Zakres przeprowadzonej analizy obejmował wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. Przeprowadzona analiza stanowi podstawę do optymalizacji geometrii wkładu koronowo-korzeniowego oraz doboru własności mechanicznych materiału do jego wytwarzania.

Literatura

- [1] Chladek W., *Biomechanika inżynierska narządu żucia. Zagadnienia wybrane*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.
- [2] de Castro Albuquerque R., Polleto L. T., Fontana R. H., Cimini C. A., *Stress analysis of an upper central incisor restored with different posts*, Journal of Oral Rehabilitation, 2003, Sep; 30(9), pp. 936–943.
- [3] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A., *Biomateriały w stomatologii*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008.
- [4] Milewski G., *Wytrzymałościowe aspekty interakcji biomechanicznej tkanka twarda – implant w stomatologii*, Zeszyty Naukowe Politechniki Krakowskiej, Mechanika nr 89, Kraków 2002.
- [5] Sorrentino R., Aversa R., Ferro V., Auriemma T., Zarone F., Ferrari M., Apicella A., *Three-dimensional finite element analysis of strain and stress distributions in endodontically treated*

maxillary central incisors restored with diferent post, core and crown materials, Dental Materials 23(8):11 (2007), pp. 983–993.

- [6] Spiechowicz E., *Protetyka stomatologiczna. Podręcznik dla studentów*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.
- [7] Tańska M., Wyciśłok P., Mierzwińska-Nastalska E., *Porównanie poziomów naprężeń w wybranych wkładach standardowych osadzonych w modelach zębów w zależności od sprężystości zastosowanego cementu – badania symulacyjne*, Protetyka Stomatologiczna, 2010, LX, 4, s. 260–266.
- [8] Zielińska R., Dejak B., Suchorzewski A., *Porównanie własności zębów odbudowanych wkładami koronowo-korzeniowymi lanymi i standardowymi kompozytowymi wzmocnionymi włóknami szklanymi na podstawie piśmiennictwa*, Protetyka Stomatologiczna, 2010, LX, 1, s. 37–43.
- [9] www.edsdental.com.

Rola siarki i związków zawierających jej atomy w organizmie człowieka

Marta Kaczor-Kamińska*

Summary

The human body in the 0,25% consist of sulfur and any deficiency of that element leads to serious metabolic disorder. Every living cell is contain this element. It is included in all tissues of the human body and is a base for many biological active compounds such as methionine, cysteine, glutathione, sulfates and the products of their transformations such as: taurine, homocysteine and hydrogen sulfide gas. Sulfur is also a component of compounds, which plays key role in the body (thioredoxin, insulin, heparin, lipoic acid, biotin, vitamin B1 and coenzyme A). In animal tissues sulfur is occurring on several oxidation states, mainly - 2 and +6 because they are the most stable at all. In addition in living organism we can also find labile atoms of that element so-called sulfane-sulfur atoms. These atoms can be easily removed from compounds in the form of hydrogen sulfide gas. The inorganic sulfur is occurring in the iron-sulfur centers, which are enable to electron transport in the respiratory chain by changing the oxidation state of iron ions. Endogenous sulfhydryl compounds play a major role in the detoxification of the body and can act as an antioxidants neutralizing free radicals. Sulfur is involved in supporting the production of bile acids, helps in the elimination of cholesterol, steroids and phenol compounds. The compounds of this element is used in heavy metal poisoning because it is able to be bound by the metals in complexes and then excreting them from the body. Sulfur is used for treating many diseases and have revitalizing effect on the whole body.

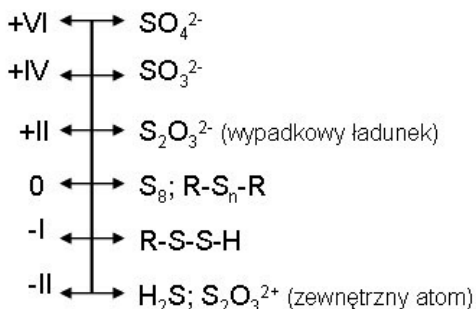
Keywords: sulphur, sulfane sulphur, methionine, cysteine

1. Wprowadzenie

Siarka – niemetal leżący w 16 grupie i 3 okresie układu okresowego, w bloku konfiguracyjnym p. Posiada na ostatniej powłoce charakterystyczną konfigurację elektronów walencyjnych $3s^2p^4$, wykazując tym samym tendencję do przyjęcia dalszych dwóch elektronów walencyjnych i uzyskanie konfiguracji najbliższego w układzie okresowym gazu szlachetnego – argonu. Stopień utlenienia siarki wynosi wówczas – II. Uzyskiwanie trwałej konfiguracji elektronowej może zachodzić na kilka sposobów: 1) gdy istnieje wystarczająco duża różnica elektroujemności obu łączących się pierwiastków, atom siarki może zyskać dwa elektrony i utworzyć anion S^{2-} , 2) atom siarki może przyjąć jeden elektron, wytwarzając równocześnie 1 wiązanie kowalencyjne, jak ma to miejsce np. w jonie wodorosiarczkowym SH^- , 3) atom siarki może wytworzyć dwa wiązania kowalencyjne, jak np. w wodorkach H_2S i H_2S_2 , przy czym charakterystyczna jest dla siarki tendencja do tworzenia wieloatomowych łańcuchów (katenacja).

* Katedra Biochemii Lekarskiej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński.

Siarka może tworzyć maksymalnie sześć wiązań kowalencyjnych, ponieważ wtedy oprócz orbitali s i p zostają wykorzystane również orbitale d powłoki walencyjnej, a stopień utlenienia siarki osiąga wówczas wartość IV lub VI (rys. 1). Warto zaznaczyć, iż można zaobserwować znaczne różnice pomiędzy zachowaniem się połączeń siarki w roztworach kwaśnych i zasadowych. W roztworach kwaśnych najtrwalszy jest stopień utlenienia – II oraz siarka elementarna, natomiast w roztworach zasadowych dochodzi do dysproporcjonowania siarki elementarnej na jon S^{2-} – oraz anion zawierający siarkę na jednym z dodatnich stopni utlenienia, preferowany jest stopień VI jako trwalszy.



Rys. 1. Stopnie utlenienia atomów siarki w niektórych układach biologicznych [zmodyfikowany wg 40]

(H_2S). Jako przykłady związków nisko- i wielkocząsteczkowych zawierających siarkę sulfanową można wymienić: siarkę elementarną (S_8), polisiarczki ($R-S_n-R$; $n \geq 3$), nad-siarczany ($R-SS-$), nadsiarczki ($R-S_2H$), politioniany ($^-\text{O}_3S-S_n-SO_3^-$; $n \geq 1$), tiosiarczany ($S=SO_3^{2-}$), białkowe polisiarczki czy siarkę elementarną przyłączoną do hydrofobowego miejsca w albuminie [39].

Zawartość siarki w skorupie ziemskiej to 0,026% wagowych. W przyrodzie występuje w postaci rodzimej, związanej jako składnik wielu minerałów m.in. galena (PbS), blenda cynkowa (ZnS), piryt (FeS_2), gips ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), anhydryt ($CaSO_4$), baryt ($BaSO_4$). Rozpuszczalne siarczany Na_2SO_4 i Mg_2SO_4 powszechnie występują w wodzie morskiej, a siarkowódór (H_2S) pojawia się jako składnik gazów wulkanicznych.

Siarka występuje również w przyrodzie żywej i stanowi ona niezbędny w funkcjonowaniu organizmu pierwiastek. Dorosły człowiek w 0,25% zbudowany jest z siarki, a wszelki jej niedobór w organizmie prowadzi do poważnych zaburzeń przemiany materii.

2. Metabolizm aminokwasów siarkowych

Siarka stanowi składnik każdej żywej komórki, wchodzi w skład wszystkich tkanek ludzkiego organizmu [35], szczególnie tych bogatych w białko, jak erytrocyty, mięśnie, skóra, włosy. Wchodzi w skład licznych związków utrzymujących kluczowe funkcję w organizmie, charakteryzując się znaczną aktywnością chemiczną i biologiczną [13]. Jest ona m.in. składnikiem podstawowych aminokwasów: metioniny i cysteiny, która ulegać

może spontanicznemu utlenianiu do cystyny, a także produktów ich przemian, takich jak tauryna, homocysteina czy gazowy siarkowodor [35, 37].

Coraz więcej dowodów wskazuje, że aminokwasy siarkowe, oprócz ich roli w syntezie białek, odpowiedzialne są również za inne funkcje biologiczne i choroby [4, 32].

Metionina jest aminokwasem niezbędnym dla człowieka i musi być dostarczana z pożywieniem, ponieważ organizm człowieka nie jest w stanie samodzielnie jej zsyntetyzować. W ustroju podlega ona wewnątrzkomórkowej transmetylacji do homocysteiny przez S-adenylometioninę (SAM) – główny biologiczny donator grupy metylowej w komórkach ssaków i prekursor w syntezie poliamin [19] (rys. 2). Obniżenie stężenia SAM, będącego bezpośrednim wynikiem niskiego spożycia metioniny lub niedoboru kwasu foliowego, prowadzi do zaburzenia procesów metylacji w DNA, a to w konsekwencji może być przyczyną różnych nowotworów, np. raka jelita grubego [11, 14]. Homocysteina jest aminokwasem siarkowym obecnym we krwi i tkankach, ale nie stanowi elementu budulcowego białek [18]. Liczne badania kliniczne pokazują powiązanie pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny w osoczu, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia wielu chorób, w tym choroby Alzheimera, chorób układu krążenia, udaru i osteoporozy [12, 30, 42]. Homocysteina może być następnie przekształcana do cysteiny poprzez cystationinę w szlaku transsulfuracyjnym (przeniesienie atomu siarki) – jest to proces nieodwracalny [32] – lub też z udziałem syntazy metioninowej ulegać ponownej metylacji do metioniny (rys. 2). Inna droga prowadząca do remetylacji homocysteiny wiedzie przez reakcję katalizowaną przez metylotransferazę betaina:homocysteina (BHMT), w wyniku której powstającymi produktami jest N,N-dimetyloglicyna (DMG) i metionina. Połączenie ścieżek transmetylacji i remetylacji tworzy cykl metioninowy, który zachodzi w wielu komórkach.

Cysteina nie stanowi aminokwasu niezbędnego w diecie, gdy ta bogata jest w produkty zawierające metioninę [32], lecz przyjmuje się, że ilość cysteiny pobieranej z pokarmem powinna zaspokajać część zapotrzebowania na aminokwasy siarkowe, jest to tzw. efekt wspomagania cysteiną pokarmowego zapotrzebowania na metioninę [1]. Cysteina metabolizowana może być na wiele sposobów, których intensywność zależna jest od rodzaju oraz wymagań życiowych komórek, tkanek i całego organizmu. Katabolizm cysteiny biegnie dwoma szlakami. Są to przemiany tlenowe, uzależnione od działania i aktywności dioksygenazy cysteinowej (CDO), prowadzące do powstania kwasu cysteinosulfonowego, przekształcanego dalej do hipotauryny, tauryny i siarczanów [33], oraz przemiany beztlenowe, które prowadzą do powstania w komórkach metabolicznie aktywnej, zredukowanej siarki sulfanowej.

W beztlenowym metabolizmie L-cysteiny, w wyniku jej spontanicznego utleniania, powstaje cystyna. γ -Liaza cystationinowa bierze udział w asymetrycznym rozszczepieniu cystyny do tiocysteiny, która jest następnie przekształcana w bardziej stabilną tiocystynę (trisiarczkowy analog cystyny). Oba te związki, tiocystyna i tiocysteina, zawierają atomy siarki sulfanowej, stanowiąc jej źródło w organizmach żywych. Reakcje przemian oraz tworzenia z cysteiny związków zawierających tę formę siarki nie są procesami samodzielnymi, lecz katalizowanymi enzymatycznie przez siarkotransferazy: rodanazę, transferazę siarkową 3-merkaptopirogronianu (MPST), γ -liazę cystationinową (CST) (rys. 2) [37].

w reakcjach antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych [41]. Jego właściwości antyoksydacyjne przejawiają się w możliwości odtwarzania grup tiolowych w białkach [41], w których uległy one utlenieniu do grup sulfonowych – SO_3H lub wiązań disiarczkowych – S-S-. Dzięki odwracalnej reakcji odrywania lub przyłączania elektronów, zredukowany glutation utrzymuje prawidłową równowagę tiolowo-disulfidową i związany z nią potencjał oksydacyjno-redukcyjny komórek. Spełnia ważną biologicznie rolę: chroni grupy – SH białek przed utlenieniem, przez co zapobiega efektom reakcji utleniających, inaktywujących enzymy i białka. Częsteczką glutationu jest też jednym ze sposobów magazynowania i transportowania cysteiny w organizmie. Jednak cysteina w porównaniu z glutationem jest mniej skutecznym antyoksydantem i o wiele bardziej niebezpiecznym peroksydantem. Jako związek tiolowy posiada możliwość kompleksowania jonów metali i zwiększa ochronę przez niebezpieczną reakcją Fentona, w wyniku której powstaje najbardziej niebezpieczny dla ludzkiego organizmu rodnik hydroksylowy (OH). Roberts (1992) [29] pokazał, że cysteina może działać również radioprotekcyjnie oraz chronić limfocyty przed aberracją chromosomów [38]. Tioredoksyna jest niewielkim białkiem (ok. 12 kDa), które w swojej strukturze zawiera reszty cysteiny, wykazujące podobną aktywność biologiczną do opisanej dla glutationu.

Reszty cysteinowe wchodzące w skład niektórych białek stabilizują ich strukturę i regulują ich funkcje. Zjawisko to zaobserwować możemy na przykładzie budowy cząsteczki insuliny wołu, która składa się z 2 łańcuchów polipeptydowych A (21 aminokwasów) i B (30 aminokwasów), połączonych ze sobą dwoma mostkami disiarczkowymi: Cys-A7 z Cys-B7 i Cys-A20 z Cys-B19. W obrębie łańcucha A znajdujemy jeszcze jeden mostek disiarczkowy, pomiędzy Cys-A6 i Cys-A11 [31]. Główną funkcją insuliny jest kontrola gospodarki węglowodanowej w organizmie.

Biodegradacja endobiotyków, takich jak hormon tarczycy, sterydowy, katecholaminy i kwasy żółciowe, związana jest z powstawaniem estrów siarczanowych [9]. Siarczany są konieczne w biosyntezie glikoaminoglikanów (dawniej określanych mianem mukopolisacharydów), zawierających grupę siarkową w postaci O-estrowej (R-O-SO_3^-) lub N-siarczanowej (R-NH-SO_3^-), jak ma to miejsce w heparynie i siarczanie heparanu. Grupę czynną heparyny stanowi aktywny pentasacharyd $\text{GlcNAc/NS(6S)-GlcA-GlcN-S(3S,6S)-IdoA(2S)-GlcNS(6S)}$, który w swojej strukturze zawiera reszty kwasu siarkowego, przyłączone do merów glukozowych i glukozaminowych, a to umożliwia oddziaływanie z antytrombiną i wzmacnianie jej antykoagulacyjnego działania [5]. Heparyna, oprócz działania na układ krzepnięcia, wywiera działanie na lipazę lipoproteinową, prowadząc do obniżenia poziomu cholesterolu (obniżenie frakcji LDL). Tiole również hamują utlenianie lipoprotein niskiej gęstości (LDL) osocza ludzkiego [17].

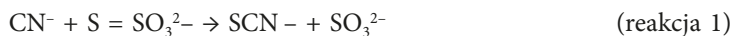
Kwas liponowy (nazwa systematyczna: kwas 6,8-ditiooktanowy) to nasycony kwas tłuszczowy, w którym atomy węgla 6, 7 i 8 wraz z dwoma atomami siarki tworzą pierścień ditiolowy. Po redukcji pierścienia powstaje kwas dihydroliponowy [27]. Utleniona forma amidu kwasu liponowego, jako kofaktor acylotransferazy dihydroliponianowej, bierze udział w reakcji dekarboksylacji oksydacyjnej α -ketokwasów (pirogonianu, α -ketoglutaranu, α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach). Zarówno utleniona, jak i zredukowana forma tego kwasu, może brać udział w unieszkodliwianiu wolnych rodników i regeneracji

zredukowanych postaci innych przeciwutleniaczy, jak witamina C i E [20]. Początkowo myślano, że kwas liponowy jest witaminą [28] i musi być dostarczany z pożywieniem, ale jak się później okazało jest on syntezowany w organizmie człowieka.

Siarka sulfanowa posiada zdolność redukcji związków, przez co odgrywa znaczącą rolę w regulacji metabolizmu i cyklu życiowego komórek [25]. Aktywna forma tego pierwiastka pełni w organizmie funkcję regulacyjną dla licznych szlaków biochemicznych [39], poprzez zdolność aktywowania lub inaktywowania enzymów. Jej właściwości regulatorowe związane są ze zdolnością doprowadzania do przesunięć elektronowych w cząsteczce, a tym samym do modyfikacji grup tiolowych (-SH), prowadząc do utworzenia nadsiarczków i polisiarczków w białkach lub miejscach aktywnych enzymów, co bezpośrednio wpływa na zmianę ich aktywności biologicznej [21, 25]. Enzymami aktywowanymi przez siarkę sulfanową są m.in. oksydaza aldehydowa, dehydrogenaza jabłczanowa i syntetaza aminolewulinowa. Inaktywacji ulegają np. dehydrogenaza alkoholowa, aminotransferaza tyrozynowa, dehydrogenaza serynowa i fosfofruktokinaza [23]. Hamowanie aktywności tych enzymów, wynikające z utworzenia w ich cząsteczce wodorodisiarczków (R-S-S-H), ulega odwróceniu w obecności tioli, np. glutationu czy ditiotreitolu [36].

Ze względu na swoje właściwości siarka sulfanowa posiada szereg ciekawych funkcji, do których należą m.in. procesy zobrazowane poniższymi reakcjami 1–3:

- Detoksykacja cyjanków [39]:



- Tworzenie klastrów żelazowo-siarkowych $(\text{Fe} - \text{S})_n$, (proces katalizowany przez rodanazę) [37, 39]:



- Posiada właściwości antyoksydacyjne [24]:



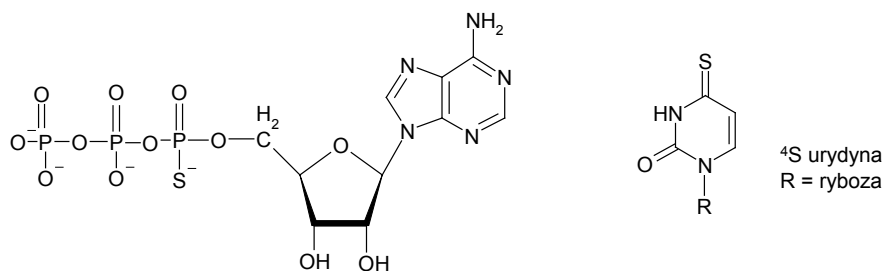
- Bierze udział w regulacji aktywności enzymatycznej (reakcja katalizowana przez transferazy siarkowe):



- Bierze udział w sulfurylacji tRNA [39].

Wiele aspektów metabolizmu siarki sulfanowej w dalszym ciągu pozostaje niewyjaśnionych, jak np. dokładny przebieg potraskrypcyjnej modyfikacji, polegający na przyłączeniu atomu siarki do zmodyfikowanych zasad w tRNA. Tiopirymidyny i tiopuryny są częścią składową tRNA wszystkich organizmów i prawdopodobnie odgrywają istotną rolę regulatorową w procesie translacji [39]. Np. atom siarki w 4-tiourydynie (rys. 3), pirymidynie stanowiącej naturalny składnik niektórych cząsteczek tRNA, jest bardzo dobrym miejscem wiążącym jony metalu, zwłaszcza jony metali miękkich, takich jak Hg^{2+} czy Pt^{2+} . Wiązanie to wykazuje niemalże absolutną specyficzność, ze względu na fakt, iż żaden inny donorowy atom DNA lub RNA nie ulega, z miękkim centrum metalicznym, tak łatwemu skoordynowaniu. Podobną specyficzność wykazują włączane trifosforanonu-

kleozydy w DNA lub RNA, które jak np. ATP- α S bardzo chętnie przyjmowane są przez wiele enzymów na miejsce ich normalnych odpowiedników (rys. 3) [16].



adenozynotrifosforan - alfaS (ATP - alfaS)

Rys. 3. Dwa składniki kwasu nukleinowego zawierające siarkę [wg 3]

Niezmiernie istotne jest również potencjalne działanie antyuleniające siarki sulfanowej, ponieważ podawanie związków, w których byłaby ona zawarta, umożliwiałoby ochronę komórek przed toksycznym działaniem ksenobiotyków lub niektórych leków.

4. Niedobór siarki

Niedobory siarki występują przy niedostatecznym spożyciu białka, a wraz z nim aminokwasów zawierających atomy siarki w swoim składzie. Niedobór siarki wywołuje różnorodne, niekiedy bardzo ciężkie zaburzenia – negatywnie wpływa na gospodarkę hormonalną, układ odpornościowy, ukrwienie, oddychanie komórkowe i przemianę węglowodanową. Objawy, które jesteśmy w stanie zaobserwować sami, to: wypadanie włosów, bladłość i utrata jędrności skóry, łamliwość paznokci.

W przypadku zaistnienia niedoboru siarki organizm traci również minerały, takie jak magnez, krzem, sód, mangan, wapń, żelazo, chlor, jod i potas, co ma związek z osłabionym metabolizmem białek, tłuszczu i cukru. Zawartość cysteiny w organizmie ulega obniżeniu, na skutek chronicznego stresu lub dużego obciążenia organizmu metalami ciężkimi. Toksyczne metale, takie jak ołów, kadm i rtęć mają zdolność wchodzenia w reakcje z grupami sulfhydrylowymi, a uszkadzając strukturę oraz funkcje ważnych białek, powodują upośledzenie układów biochemicznych. To właśnie cysteina jest decydującym czynnikiem podtrzymującym detoksykację i wpływającym na wzrost produkcji glutationu czy metalotioneiny (białko, w którym ok. 30% struktury to reszty cysteinowe) [26]. Niedobór siarczanów to również upośledzony metabolizm endobiotyków, takich jak sterydy, kwasy żółciowe i katecholaminy. Upośledzone powstawanie siarczanów kwasów żółciowych prowadzi do powstania marskości wątroby [7], a glikozyloaminoglikanów do reumatoidalnego zapalenia stawów [8]. Poziom grup – SH w organizmie obniża się przy uszkodzeniu toksycznym i wirusowym wątroby, w gorączce reumatycznej, w procesach nowotworowych oraz po napromieniowaniu jonizującym. Zaobserwowano również spadek ilości zredukowanych grup – SH w przebiegu choroby wieńcowej i zawale mięśnia sercowego.

Właściwości biochemiczne siarki wspomagają leczenie wielu chorób i działają rewitalizująco na organizm.

Streszczenie

Człowiek w 0,25% zbudowany jest z siarki, a wszelki jej niedobór w organizmie prowadzi do poważnych zaburzeń przemiany materii. Stanowi ona składnik każdej żywej komórki, wchodzi w skład wszystkich tkanek ludzkiego organizmu, jest podstawą wielu związków biologicznie czynnych, jak metionina, cysteina, glutation, siarczany, produktów ich przemian, takich jak tauryna, homocysteina czy gazowy siarkowodor, oraz związków utrzymujących kluczowe funkcje w organizmie, jak insulina, heparyna, kwas liponowy, tioredoksyna, biotyna, witamina B1 oraz koenzym A. Atomy siarki w związkach obecnych w tkankach zwierzęcych występują na różnych stopniach utlenienia, najczęściej przybierając dwa skrajne stopnie utlenienia: -2 i $+6$, charakteryzujące się największą stabilnością. Oprócz związków zawierających stabilne atomy tego pierwiastka, w organizmach występują jeszcze inne, labilne atomy siarki, np. atomy siarki sulfanowej, która ze związków ją zawierających łatwo zostaje wydzielona pod postacią siarkowodoru. Nieorganiczna siarka wchodzi w skład centrów żelazowo-siarkowych, które przez zmianę stopnia utlenienia jonów żelaza umożliwiają transport elektronów w łańcuchu oddechowym. Endogenne sulfhydryłowe związki odgrywają zasadniczą rolę w detoksykacji organizmu i mogą zostać włączone, obok witaminy E i seleniu, do grupy antyoksydantów neutralizujących wolne rodniki. Siarka bierze udział we wspomaganiu produkcji kwasów żółciowych, pomaga również w eliminacji cholesterolu, związków fenolu i sterydów. Związki tego pierwiastka stosuje się przy zatruciach metalami ciężkimi (rtęć, ołów, arsen, srebro), ponieważ ich działanie kompleksujące umożliwia związanie metalu i wydalenie go z organizmu. Właściwości siarki wspomagają leczenie wielu chorób i działają rewitalizująco na organizm.

Literatura

- [1] Ball R. O., Courtney-Martin G., Pencharz P. B., *The in vivo sparing of metionine by cysteine in sulfur amino acid requirements in animal models and adult humans*, J Nutr 136, 1682S-1693S, 2006.
- [2] Bauchart-Thevret C., Stoll B., Burrin D. G., *Intestinal metabolism of sulfur amino acids*, Nutrition Research Reviews, 22, 175-187, 2009.
- [3] Berzin T. M., Zipser B. D., Rafli M. S., Kuo-Leblac V., Joncopoulos G. D., Glass D. J., Fallon J. R., Stopa E. G., *Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease*, Neurobiol. Aging. 21, 349-355, 2000.
- [4] Brosnan J. T., Brosnan M. E., *The Sulfur-containing amino acids: an overview*, J. Nutr 136, 1636S-1640S, 2006.
- [5] Cox M., Nelson D., Lehninger, *Principles of Biochemistry*, Freeman, p. 1100. ISBN 0-7167-4339-6, 2004.
- [6] David G., Wassely P., de Waal R. M., *Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain*, Amer. J. Pathol. 155, 2115-2125, 1999.
- [7] Elias E., Waring R. H., *Impaired sulfoxidation in primary biliary cirrhosis*, Hematology 10, 1027, 1989.

- [8] Emery P., Salmon M., Bradley H., Wordworth P., Tunn E., Bacon P. A. Waring R., *Genetically determined factors as predictors of a radiological change in patients with early symmetrical arthritis*, Br. Med. J. 305, 1387–1389, 1992.
- [9] Fadden S. A., *Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways*, Toxicology 111, 43–65, 1996.
- [10] Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti E., Rizzo G. i in., *Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury cause by antiinflammatory non-steridal drugs*, Gastroenterology 129, 1210–1224, 2005.
- [11] Giovannucci E., Rimm E. B., Ascherio A. i in., *Alkohol, low-methionine-low-folate diets, and risk od colon cancer in men*, J Natl Cancer Inst 87, 265–273, 1995.
- [12] Hermann M., Peter S. J., Umanskaya N. i in., *The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review*, Clin Chem Lab Med 45, 1621–1632, 2007.
- [13] Kessler D., *Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules on prokaryotes*, Microbiol. Rev. 30, 825–840, 2006.
- [14] Kim Y. I., *Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA metylathion and colon cancer susceptibility*, J Nutr 135, 2703–2709, 2005.
- [15] Kimura Y., Kimura H., *Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress*, FASEB J 18: 1165–1168, 2004.
- [16] Lippard S. J., Berg J. M., *Podstawy chemii bionieorganicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
- [17] Lynch S. M., Campione A. L., Moore M. K., *Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein*, Biochim. Biophys. Acta. 1485, 11–22, 2000.
- [18] MacCoss M. J., Fukagawa N. K., Matthews D. E., *Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans*, Am. J Physiol Endocrinol Metab 280, E947-E955, 2001.
- [19] Mato J. M., Corrales F. J., Lu S. C. i in., *S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function*, FASEB J 16, 15–26, 2002.
- [20] Mottley C., Mason R. P., *Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid*, J Biol. Chem., 16, 276, 42677–42683, 2001.
- [21] Nagahara N., *Catalytic site cysteine of thiol enzyme sulfurtransferase*, J. Amino Acids, 2011, 1–7, 2011.
- [22] Ogasawara Y., Ishii K., Togawa T., Tanabe S., *Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography*, Anal. Biochem. 215: 73–81, 1993.
- [23] Ogasawara Y., Suzuki T., Ishii K., Tanabe S., *Modification of liver cytosol enzyme activities promoted in vitro by reduced sulfur species generated from cystine with gamma-cystathionase*, Biochem. Biophys. Acta 1334, 33–43, 1997.
- [24] Ogasawara Y., Isoda S., Tanebe S., *Antioxidant effects of albumin-bound sulfur in lipid peroxidation of rat liver microsomes*, Biol. Pharm. Bull. 22: 441–445, 1999.
- [25] Pinto J. T., Krasnikov B. F., Cooper A. J. L., *Redox-sensitive proteins are potential targer of garlic-derived mercaptocysteine derivatives*, J. Nutr. 136, 835S-841S, 2006.
- [26] Quig D., *Cysteine Metabolism and Metal Toxicity*, Alternative Medicine Review. 3 (4), 262–269, 1998.

- [27] Raddatz G., Bisswanger H., *Receptor site and stereospecificity of dihydrolipoamide dehydrogenase for R- and S-lipoamide: a molecular modeling study*, Journal of Biotechnology 58, 89–100, 1997.
- [28] Reed L. J., *From lipoic acid to multi-enzyme complexes*, Prot. Sci., 7, 220–224, 1998.
- [29] Roberts J. C., *Amino acids and their derivatives as radioprotective agents*, Amino Acid 3, 25–52, 1992.
- [30] Schulz R. J., *Homocysteine as a biomarker for cognitive dysfunction in the elderly*, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 10, 719–723, 2007.
- [31] Shiraishi J-I., Yanagita K., Nishikawa F., Tahara Y., Fujita M., McMurty J. P., Bungo T., *A comparison of the Anorexic effect of chicken, porcine, human and bovine insulin on the central nervous system of chicks*, Journal of Poultry Science 46, 144–148, 2009.
- [32] Stipanuk M. H., *Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine*, Annu Rev Nutr 24, 539–577, 2004.
- [33] Stipanuk M. H., Dominy J. E., Lee Jr. J-J., Coloso R. M., *Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism*, J Nutr 136, 1652S-1659S, 2006.
- [34] Sun Q., Collins R., Huang S., Holmberg-Schiavone L. i in., *Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S*, J. Biol. Chrm. 284, 3076–3085, 2008.
- [35] Tanabe S., *Development of assay methods for endogenous inorganic sulfur compounds and sulfurtransferases as evaluation of the physiological functions of bound sulfur*, Yakugaku Zasshi 128, 881–900, 2008.
- [36] Toohey J. L., *Sulphane sulfur in biological systems: a possible regulatory role*, Biochemistry 264, 625–632, 1989.
- [37] Ubuka J. L., *Assay methods and biological systems: a possible regulatory role*, Biochem. J. 264: 625–632, 2002.
- [38] Virsik R. P., Harder D., *Effect on the dose-effect relationship for chromosome alterations in irradiation human lymphocytes*, Int. J. Radial. Biol. 53, 272–281, 1982.
- [39] Wróbel M., *Comparative study on physiological roles of enzymes that participate in sulfane sulfur production and metabolism in animal tissues*, Jagiellonian University Press, Kraków 2000.
- [40] Wróbel M., Jurkowska H., Kaczor M., Uchacz T., *Rodanaza i transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu – enzymy pokrewne ewolucyjnie*, KOSMOS 295, 233–244, 2012.
- [41] Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D., *Glutathione metabolism and its implications for health*, J. Nutr. 134, 489–492, 2004.
- [42] Zhou J., Austin R. C., *Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: casual relationship and potential mechanism*, Biofactors, 35, 120–129, 2009.

Szczypce optyczne

Daria Matejek*, Marek Langner*, Sławomir Drobczyński**

Summary

Optical tweezers is an experimental technique which has been developed for over last 30 years. Optical tweezers allows to manipulate micron – or even nano-size objects with high precision. The technique relies on the controlled interaction between coherent focused laser beam and suspended dielectric objects. Due to the combination of the optical tweezers with the optical microscopy it is possible to control the positioning of a particle, measuring the micro-rheological properties of a sample or study mechanical properties of a single molecule. Application of a laser beam with appropriate intensity distribution profile can produce a stable trap exerting pico-newton force on an object. Optical tweezers has been also successfully applied to study life cells by detecting molecules on their surface and measuring properties of their interior. Due to the generated force (pN) and capability of manipulating the probing particle in three dimensions the optical tweezers became a valuable addition to existing experimental techniques such as atomic force microscopy.

Keywords: Micromanipulation, optical tweezers, optical trap

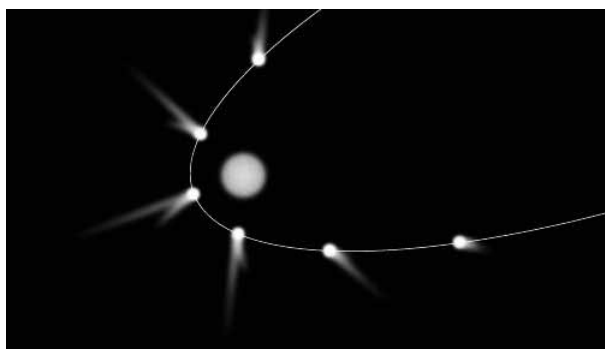
1. Wprowadzenie

Pierwsze hipotezy o tym, że światło może wywierać nacisk na materię, przedstawił Johannes Kepler. Swoją teorię opierał na obserwacjach ogona komety, który zawsze był skierowany w kierunku przeciwnym do Słońca. Wytłumaczeniem takiego stanu rzeczy miało być ciśnienie promieniowania słonecznego, które działając na cząsteczki komety odpychało je w kierunku przeciwnym do swojego centrum (rysunek 1). Dwa wieki później James Clerk Maxwell opisał matematycznie zachowanie światła w kontakcie z materią. Przez następne 100 lat nikomu nie udało się przeprowadzić eksperymentu potwierdzającego teorie Keplera i Maxwella. Przyczyną, dla której wykazanie istnienia siły pochodzącej od promieniowania elektromagnetycznego działającej na cząstki materii było niemożliwe aż do połowy XX wieku, jest niezwykle mała wartość ciśnienia, jakie generowane jest przez promieniowanie elektromagnetyczne. Fotony pochodzące z wiązki o dużej intensywności zderzają się z materią, powodując siły reakcji rzędu zaledwie pikoniutonów. Dopiero wynalezienie lasera umożliwiło obserwację oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z materią. Arthur Ashkin pokazał, że małe obiekty, jak polistyrenowe nanokulki, mogą być przemieszczane, a nawet unoszone (działając przeciwko sile grawitacji), wykorzystując zogniskowane promienie lasera. Wiązka o odpowiednim gradiencie intensywności może stać się trójwymiarową pułapką dla dielektrycznych obiektów. Pułapka tego typu może

* Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska.

** Instytut Fizyki, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska.

służyć do „chwytania” i przemieszczania molekuł o wielkości od kilku nanometrów do dziesiątek mikrometrów [13].



Rys. 1. Schemat rozkładu ogona komety znajdującej się w pobliżu Słońca [16]

2. Podstawy fizyczne

Do zrozumienia zasady działania szczypiec laserowych konieczne jest rozważenie zachowania się światła w kontakcie z materią. Wiązka promieni napotykać na swojej drodze przezroczysty obiekt, którym dla przykładu niech będzie kula, ulega częściowemu odbiciu i załamaniu. Część promieni załamanych ulega ponownej refrakcji przy wyjściu z obiektu.

Biorąc pod uwagę korpuskularną naturę światła, fotony padające na kulkę obdarzone są pędem P_{wej} o wartości, którą można opisać zależnością:

$$\vec{P}_{wej} = \frac{h}{\lambda}$$

gdzie:

h – stała Plancka,

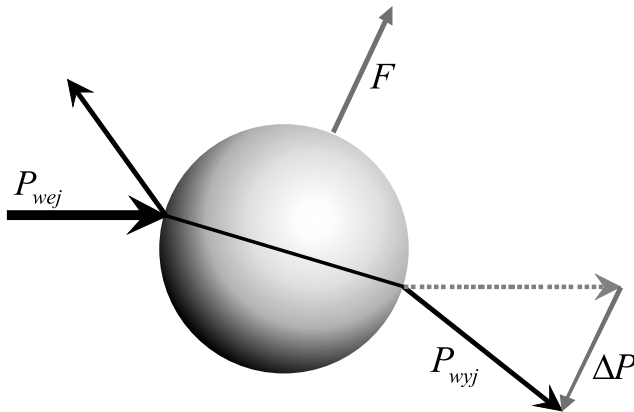
λ – długość fali padającej wiązki.

Wiązka załamując się na pierwszej i drugiej powierzchni kuli zmienia kierunek propagacji, a zatem również wektor jej pędu P_{wyj} ulega zmianie (rysunek 2). Fotony przekazują część swojej energii i pędu obiektowi, z którym się zderzają, zgodnie z zasadą zachowania energii i pędu. Siła reakcji kulki F skierowana jest przeciwnie do wektora zmiany pędu fotonów ΔP , a jej wartość wynosi:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{P}}{dt}$$

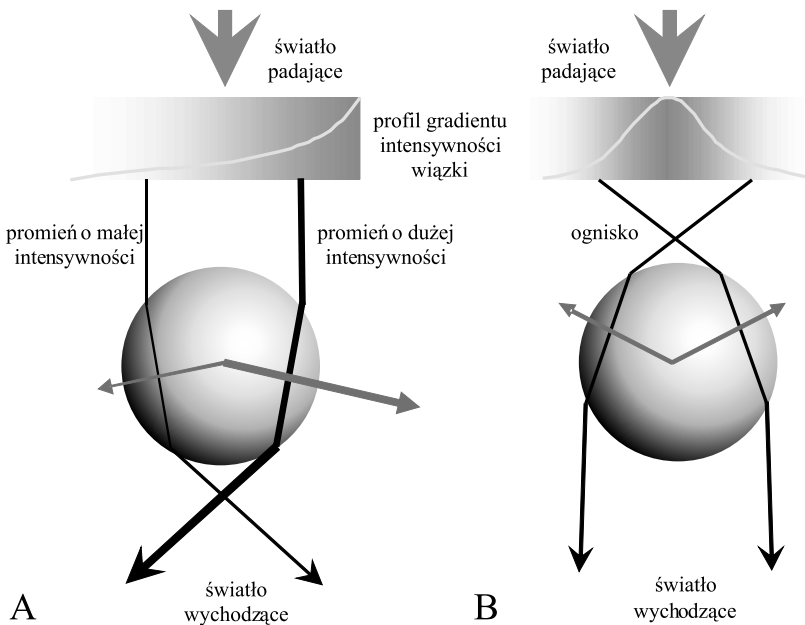
gdzie:

$d\vec{P}$ – zmiana pędu w przedziale czasu dt ,
 dt – czas, w którym następuje zmiana pędu o $d\vec{P}$ [10, 13].



Rys. 2. Schemat zachowania fotonów w kontakcie z przezroczystą kulą

Rozważany przypadek jest tylko modelem służącym opisaniu zjawisk zachodzących w wyniku oddziaływania światła z materią. W rzeczywistości rozmiary obiektów są często zbliżone do rozmiaru pułapki, w związku z czym wiązka lasera pada na znaczącą część powierzchni materii. Siły reakcji wynikające z przekazania pędu fotonów są skierowane w różnych kierunkach. Jak zatem jest możliwe, że wiązka światła stanowi stabilną pułapkę? Na rysunku 3A przedstawiony jest przypadek, w którym kulka znajduje się w obszarze



Rys. 3. Schemat biegu promieni i sił reakcji wynikających z przekazania energii przez wiązkę o szerokim rozkładzie gradientu intensywności (A) i wiązkę o stromym gradientie intensywności (B)

propagacji wiązki lasera o gradientowym rozkładzie intensywności. Promienie pochodzące z obszaru o niskiej intensywności, a więc o mniejszej liczbie fotonów niosących sumarycznie mniejszy pęd, są przyczyną siły reakcji skierowanej w kierunku przeciwnym do najintensywniejszego obszaru wiązki (cienka zielona strzałka). Analogicznie promienie z obszaru o wysokiej intensywności światła, niosące większy pęd, powodują reakcję kulki w kierunku najintensywniejszego obszaru wiązki (gruba zielona strzałka). Siła wypadkowa działająca na obiekt skierowana jest więc w kierunku najbardziej intensywnego rejonu. Taki układ nie będzie jednak stanowił wystarczająco stabilnej pułapki, ponieważ kulka będzie cały czas przemieszczała się w kierunku wzrostu intensywności wiązki, aż wypadnie z jej biegu.

Na rysunku 3B przedstawiona jest sytuacja, w której zastosowano wiązkę o bardzo stromym gradiencie intensywności, co ma miejsce podczas zogniskowania światła lasera. Symetryczny rozkład intensywności wiązki będzie powodował symetryczny rozkład sił reakcji kulki na przekazanie pędu. Wartość wypadkowa tych sił będzie kierować obiekt w stronę ogniska i stabilnie go utrzymywać.

„Chwycenie” kulki za pomocą szczyptic optycznych nie oznacza jej całkowitego unieruchomienia. Dynamika wynikająca ze zderzeń kulki z cząsteczkami medium, w którym się znajduje, wymusza jej oscylacje w obszarze przewężenia wiązki lasera. Kulka zachowuje się, jakby była przymocowana do sprężyny. Wartość siły F działającej na nią można opisać prawem Hooke’a:

$$F = k_p x$$

gdzie:

k_p – współczynnik sprężystości pułapki,

x – wychylenie obiektu od osi pułapki.

Znajomość parametru k_p umożliwia wykorzystanie szczyptic laserowych do pomiaru oddziaływań obiektów przyczepionych do kulki znajdującej się w pułapce [13].

3. Rozwiązania techniczne

Uzyskanie stabilnej pułapki jest możliwe w przypadku, kiedy siła działająca w kierunku poprzecznym do kierunku propagacji światła jest większa od siły działającej w kierunku równoległym do kierunku propagacji lasera. Warunek ten jest spełniony przy zastosowaniu odpowiednio stromego gradientu intensywności światła. Istnieją dwa sposoby spełnienia tego kryterium:

- pojedyncza wiązka lasera jest silnie zogniskowana,
- dwie wiązki lasera biegnące w przeciwnych kierunkach są zogniskowane w tym samym miejscu.

Spełnienie pierwszego warunku możliwe jest przy zastosowaniu obiektywu o wysokiej aperturze numerycznej NA . Aperturę numeryczną definiuje się jako:

$$NA = n \sin (\theta_{\max})$$

gdzie:

n – współczynnik załamania szkła, z którego wykonany jest obiektyw,

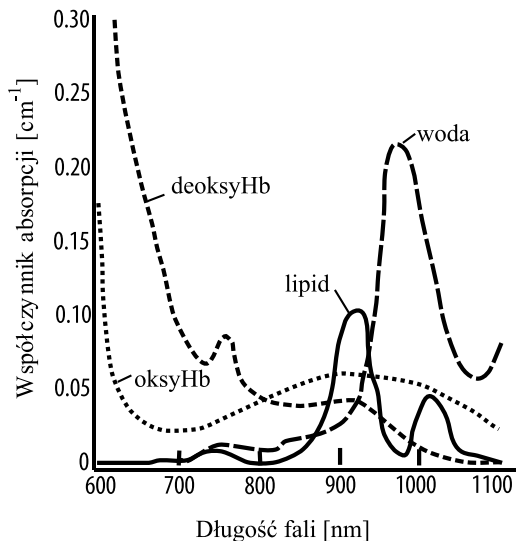
θ_{max} – połowa kąta wierzchołkowego stożka skrajnych promieni świetlnych wychodzących z osiowego punktu przedmiotowego do obiektywu.

Drugi z rozważanych przypadków narzuca konieczność zastosowania dwóch laserów w zamian za możliwość zmniejszenia wymagań stawianych obiektywom skupiającym wiązkę. Taki rodzaj pułapki jest bardziej stabilny niż wcześniej omawiany, ponieważ pozwala zniwelować wpływ sił wynikających z odbicia fotonów od powierzchni więzionego obiektu – fotony pochodzące od laserów emitujących falę elektromagnetyczną w przeciwnych kierunkach równoważą przekazywane przez siebie pędy.

Kluczowym elementem szczyptic optycznych jest źródło promieniowania. Wybór lasera jest uzasadniony wieloma argumentami, takimi jak:

- monochromatyczność,
- energetycznie wydajne źródło promieniowania.

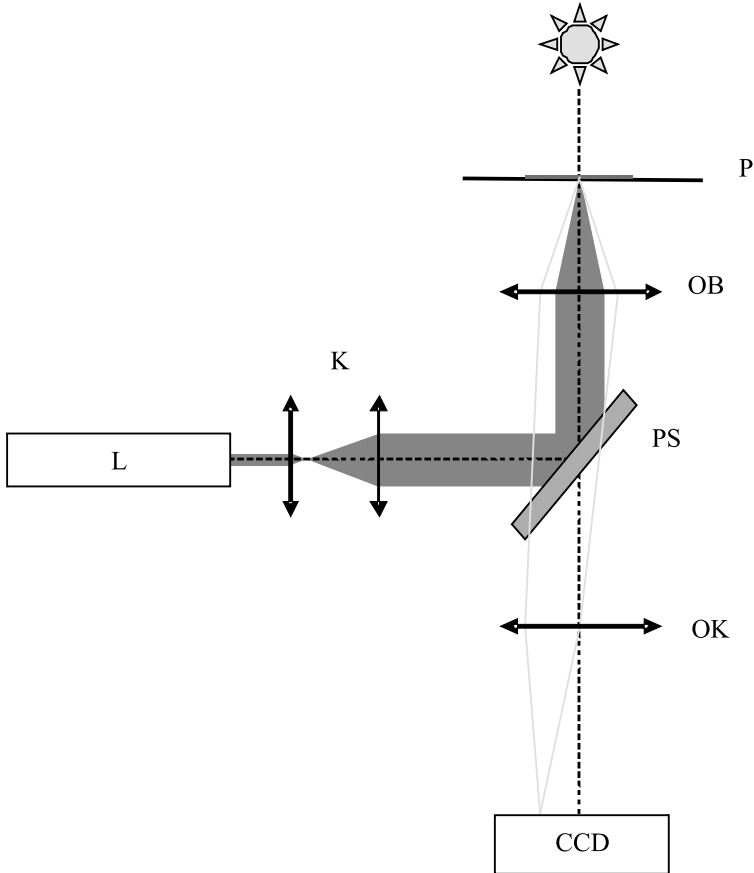
Nie bez znaczenia jest wybór długości fali emitowanej przez laser, w zależności od jego zastosowania. Chcąc zastosować szczypce optyczne do unieruchamiania obiektów biologicznych, konieczne jest uwzględnienie widm absorpcyjnych składników badanych próbek. Na rysunku 4 przedstawiono widma absorpcyjne kilku związków chemicznych, występujących w dużych ilościach w materiale biologicznym. Aby nie uszkodzić próbki, należy wybrać laser emitujący długość fali możliwie najmniej absorbowanej przez badany obiekt. Z tego powodu zakres bliskiej podczerwieni (NIR), obejmujący długości fal od 700 do 5000 nm, jest najbardziej adekwatnym do wszelkiego rodzaju nieinwazyjnych manipulacji materiałem biologicznym. Źródłem emitującym promieniowanie z zakresu NIR jest laser neodymowo-yagowy – 1064 nm [10].



Rys. 4. Widma absorpcyjne wybranych substancji [17]

4. Budowa szczypiec optycznych

Szczypce laserowe są już komercyjnie dostępne, jednakże, z racji stosunkowo prostych rozwiązań technicznych, wiele laboratoriów podejmuje się samodzielnej konstrukcji tego urządzenia, uzyskując dodatkowo możliwość optymalizacji do wymaganych warunków doświadczalnych. Urządzenie to ma wiele elementów analogicznych do mikroskopu optycznego. Związane jest to z wielkością obiektów, na które skupiona wiązka lasera oddziałuje, oraz z konstrukcją optyczną szczypiec. Elementami dodatkowymi (w porównaniu z układem mikroskopu optycznego) są kolimator i płytkę światłodzielną.



Rys. 5. Schemat układu szczypiec optycznych

Na rysunku 5 przedstawiono schemat układu optycznego szczypiec optycznych. Promienie wychodzące z lasera (L) przechodzą przez układ kolimatora (K), który poszerza wiązkę, padają na płytkę światłodzielną (PS), umieszczaną pomiędzy obiektywem (OB) a okularzem (OK) mikroskopu. Jej zadaniem jest odbicie promieni lasera i jednocześnie przepuszczenie promieni oświetlacza przechodzących przez próbkę (P). Promienie lasera

odbite od badanego preparatu nie są przez nią przepuszczane. Aby możliwe było uzyskanie odpowiednio stromego gradientu intensywności, konieczne jest poszerzenie wiązki wchodzącej do obiektywu. Obraz próbki można rejestrować za pomocą kamery CCD, znajdującej się za soczewką okularu.

W zastosowaniach biologicznych próbka zanurzana jest w cieczy i umieszczana pomiędzy dwoma cienkimi szkiełkami. Przy wykorzystaniu pułapki o gaussowskim rozkładzie intensywności współczynnik załamania więzionych obiektów musi być większy od otaczającego medium. Wtedy możliwe jest manipulowanie elementami o rozmiarach od kilki nanometrów (np. polistyrenowe kulki) do dziesiątek mikrometrów (np. komórki). Wykorzystanie obiektywu o dużej aperturze numerycznej wymusza użycie olejku immersyjnego. Jego zadaniem jest zmaksymalizowanie ilości światła docierającego do preparatu. Dostępne soczewki o aperturze numerycznej 1,3, w połączeniu z olejkim immersyjnym o współczynniku załamania 1,56, pozwalają na uzyskanie kąta stożka o rozwartości 110° . Ogniskowanie na tym poziomie nie tylko daje zwiększenie zdolności rozdzielczej mikroskopu, ale także zapewnia zminimalizowanie obszaru skupiania wiązki lasera.

W takich warunkach możliwe jest otrzymanie mocno zogniskowanej wiązki światła w centrum pola widzenia mikroskopu. W wielu zastosowaniach pożądana jest możliwość sterowania wiązką, a tym samym uwięzionym w niej obiektem. Przemieszczanie pułapki w płaszczyźnie próbki możliwe jest dzięki obracaniu płytki światłodzielącej. Zmiana kąta nachylenia płytki powoduje przesunięcie miejsca ogniskowania wiązki w płaszczyźnie próbki. Inną możliwością przemieszczania pułapki jest poruszanie stolikiem mikroskopu, na którym znajduje się próbka. Wymaga to jednak wprowadzenia dodatkowego układu sterującego.

Istnieje możliwość konstruowania układów wykorzystujących więcej niż jedną pułapkę. Stosowanych jest kilka sposobów wygenerowania większej ilości pułapek:

- czasowy podział wiązki,
- podział drogi wiązki,
- metody holograficzne.

Czasowy podział wiązki polega na manipulowaniu promieniowaniem w taki sposób, że przez określony czas wiązka kierowana jest w jedno miejsce, a następnie w inne. Czas, po którym następuje zmiana miejsca skupienia, jest na tyle krótki, aby więziony obiekt nie przemieszczał się. Dzięki temu można utworzyć ilość pułapek ograniczoną jedynie bezwładnością pułapkowanych elementów.

Drugi ze sposobów wymaga podziału promieniowania lasera na dwie części. Każda z dwóch wiązek kierowana jest na osobny układ sterowania. Uzyskanie stabilności jest o wiele trudniejsze niż w przypadku czasowego podziału wiązki, ze względu na konieczność zastosowania dwóch układów kierowania wiązkami. Przewagą nad metodą czasowego podziału wiązki jest możliwość zastosowania do takich eksperymentów, jak rozciąganie pojedynczych molekuł polimeru.

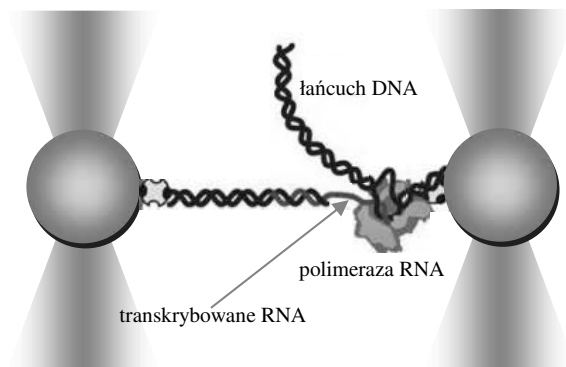
Generowane komputerowo hologramy są powszechnie stosowane do zamiany położenia pułapki w obrębie badanego preparatu. Metoda ta polega na ugięciu wiązki laserowej na komputerowo wygenerowanej strukturze dyfrakcyjnej. Technika ta umożliwia tworzenie wielu niezależnych pułapek oraz zmianę ich położenia zarówno w płaszczyźnie ogniska

obiektywu, jak i poza nią. Zastosowanie hologramu do uzyskania większej ilości pułapek optycznych jest metodą najczęściej stosowaną we współczesnych urządzeniach [10].

5. Zastosowania biologiczne szczypiec optycznych

Biolodzy bardzo szybko zaczęli wykorzystywać zalety szczypiec optycznych do badania różnego rodzaju mikro – i nanostruktur. Pierwszymi obiektami, które poddano optycznemu pułapkowaniu, były bakterie. Obserwowano ich ruchliwość [9], zmiany kształtu [3], manipulowano ich organellami [5] oraz badano zmiany aktywności bakterii pod wpływem różnych czynników [2].

Ze względów praktycznych najchętniej badany element komórki jest cząsteczka DNA [4, 8, 12, 14, 15]. Ze względu na rozmiar nici kwasu deoksyrybonukleinowego (średnica wynosi ok. 2 nm, a długość jest praktycznie nieograniczona), manipulacje nimi odbywają się na drodze pośredniej, poprzez przyłączenie do końców DNA kulek polistyrenowych, których wielkość umożliwia wykorzystanie szczypiec optycznych. W literaturze znaleźć można wiele badań poświęconych motorom molekularnym, takim jak polimeraza RNA, która jest enzymem biorącym udział w procesie transkrypcji [1]. Na rysunku 6 przedstawiono schemat takiego pomiaru. Dwie kulki polistyrenowe pułapkuje się za pomocą szczypiec. Polimeraza RNA jest przyłączona do jednej ze sfer, a powstający transkrypt RNA do drugiej. Pomimo tego, że mikroskop optyczny nie pozwala na obserwację molekuł biorących udział w transkrypcji, to wykorzystanie szczypiec umożliwiło bezpośrednie zbadanie mechanicznych i kinetycznych uwarunkowań tego procesu. Efektem powstawania nowego transkryptu RNA jest powolne oddalanie się kulek od siebie.



Rys. 6. Schemat pomiaru siły za pomocą szczypiec optycznych [18]

Szczypce optyczne, poza pułapkowaniem i manipulacją małymi elementami, mogą służyć do pomiaru oddziaływań. Maksymalna siła, z jaką pułapka może działać na materię, jest rzędu setek pikoniutonów. Z tego powodu szczypce optyczne są odpowiednim narzędziem do pomiaru oddziaływań pomiędzy mikrometrowymi organizmami żywymi. Siła wywierana na obserwowaną molekułę jest proporcjonalna do jej przemieszczenia względem środka pułapki. Pomiar oddziaływań wymaga zastosowania dodatkowego

układu rejestrującego zmianę położenia badanego obiektu oraz kalibrację całego układu szczypiec w celu wyznaczenia współczynnika sprężystości pułapki [6]. Znajomość parametrów układu optycznego umożliwia także pomiar lokalnej reologii substancji, poprzez analizę drgań kulki o znanym rozmiarze lub badanie dynamiki wymuszonego ruchu takiej kulki w badanym środowisku [7, 11, 19].

6. Podsumowanie

Szczypce optyczne są dynamicznie rozwijającą się metodą badania różnego rodzaju mikro – i nanometrowych struktur lub procesów zachodzących w skali pojedynczych molekuł. Dalszy rozwój tej techniki z pewnością poszerzy zakres jej zastosowań, a prosta konstrukcja oraz niewymagająca złożonych modeli interpretacja uzyskanych wyników sprawią, że stanie się powszechnie stosowaną metodą. W ośrodkach badawczych na całym świecie stosuje się je do nieinwazyjnej manipulacji mikroorganizmami. Na Politechnice Wrocławskiej w Instytucie Fizyki znajduje się jedyne w Polsce laboratorium zajmujące się rozwojem techniki holograficznych pułapek optycznych.

Streszczenie

Szczypce optyczne są techniką badawczą, która rozwinęła się w przeciągu ostatnich 30 lat. Umożliwia manipulowanie obiektami o rozmiarach rzędu mikrometrów, a przy odpowiednim przygotowaniu próbki nawet strukturami nanometrowymi. Zasada działania szczypiec optycznych opiera się na oddziaływaniu koherentnej wiązki promieniowania elektromagnetycznego z materią. Zastosowanie wiązki o odpowiednim profilu rozkładu intensywności umożliwia wytworzenie stabilnej pułapki, oddziałującej na więziony obiekt z siłą rzędu pikoniutonów. Szczypce optyczne, dzięki niskiemu poziomowi inwazyjności, z powodzeniem są stosowane do badania całych komórek i znajdujących się w nich organelli, a nawet pojedynczych molekuł. Ich zastosowanie umożliwia obserwację procesów niemożliwych do zbadania z wykorzystaniem technik obrazowania optycznego, jak i mikroskopii sił atomowych.

Literatura

- [1] Baumann H. G., Cross S. J., *Probing the Mechanics of the Complete DNA Transcription Cycle in Real-Time Using Optical Tweezers*, *Methods in Molecular Biology*, 778, 175–191, 2011.
- [2] Bhattacharya S., Rabinal M. K., Ananthamurthy S., *An optical tweezer-based study of anti-microbial activity of silver nanoparticles*, *Bulletin of Materials Science*, 35, 4, 529–532, 2012.
- [3] Block S. M., Blair D. F., Berg H. C., *Compliance of bacterial polyhooks measured with optical tweezers*, *Cytometry*, 12, 6, 492–6, 1991.
- [4] Bockelmann U., Thomen P., Essevez-Roulet B., Viasnoff V., Heslot F., *Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips*, *Biophysical journal*, 82, 3, 1537–53, 2002.
- [5] Dorman C. J., *Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers*, *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 29, 3, 212–6, 2007.
- [6] Fallman E., Schedin S., Janas J., Andersson M., Uhlin B. E., Axner O., *Optical tweezers based force measurement system for quantitating binding interactions: system design and applica-*

- tion for the study of bacterial adhesion, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 11, 1429–1437, 2004.
- [7] Keen S., Yao A., Leach J., Leonardo R. D., Saunter C., Love G., Cooper J., Padgett M., *Multipoint viscosity measurements in microfluidic channels using optical tweezers*, *Lab on a chip*, 9, 14, 2059–62, 2009.
- [8] Mangeol P., Côte D., Bizebard T., Legrand O., Bockelmann U., *Probing DNA and RNA single molecules with a double optical tweezer*, *The European physical journal. E, Soft matter*, 19, 3, 311–7, 2006.
- [9] Min T. L., Mears P. J., Chubiz L. M., Rao C. V., Golding I., Chemla Y. R., *High-resolution, long-term characterization of bacterial motility using optical tweezers*, *Nature methods*, 6, 11, 831–5, 2009.
- [10] Molloy J. E., Padgett M. J., *Lights, action: optical tweezers*, *Contemporary Physics*, 43, 4, 241–258, 2002.
- [11] Pesce G., Sasso A., Fusco S., *Viscosity measurements on micron-size scale using optical tweezers*, *Review of Scientific Instruments*, 76, 11, 2059–2062, 2005.
- [12] Steinbock L. J., Otto O., Skarstam D. R., Jahn S., Chimereel C., Gornall J. L., Keyser U. F., *Probing DNA with micro- and nanocapillaries and optical tweezers*, *Journal of physics. Condensed matter*, 22, 45, 454113, 2010.
- [13] Svoboda K., Block S. M., *Biological applications of optical forces*, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23, 247–85, 1994.
- [14] Wang M. D., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S. M., *Stretching DNA with Optical Tweezers*, *Biophysical Journal*, 72, 1335–1346, 1997.
- [15] Zhuang X., *Unraveling DNA Condensation with Optical Tweezers*, *Science*, 305, 188–190, 2004.
- [16] <http://www.physics.hku.hk/~nature/notes/lectures/chap10.html>
- [17] <http://www.vision-systems.com/content/dam/VSD/print-articles/2012/11/news21211vsd.jpg>
- [18] <http://phys.org/news/2012-10-optical-tweezers-sub-nanoscale-precision-processand.html>
- [19] <http://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/williams.pdf>

Doświadczenia własne w ocenie jakości napromieniania przy pomocy zdjęć portalowych

Dorota Pruska-Pich*, Artur Wachowicz*, Iwona Gisterek**, Katarzyna Mitura***

Summary

Nanodiamond particles manufactured by detonation method has very high biological bioactivity in contact with living organism. The grain size of diamond nanoparticles are from 4 to 20 nm. The detonation nanodiamond contains sp^3 bonds, sp^2 bonds and another functional group on the nanoparticles surface. The big amount of sp^3 diamond phase in detonation nanodiamond are responsible for biological bioactivity of diamond nanoparticles. The free bonds on the nanodiamond surface can be modified by different chemical groups. In this way we can receive the nanodiamond particles with controlled activity of the area. In this work detonation nanodiamond particles was chemically modified by Fenton reaction. The hydroxylation of nanodiamond surface caused the changing of bioactivity of it and possibility to attach the ampicillin. The results of these functionalisations was measured by FT-IR spectroscopy which proved the presence of hydroxyl groups and ampicillin on the surface of nanodiamond particles. Microbiological tests with chemically modified nanodiamond particles with ampicillin and non-modified nanodiamond particles with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Candida albicans* ATCC 10231 did not prove the anti-bacterial properties modified nanodiamond particles with ampicillin. The phenomenon of the fluorescence (based on calcium stress) was observed in presence of modified by Fenton reaction nanodiamond particles with ampicillin and pathogenic tribe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Keywords: nanodiamond particles, Fenton reaction, chemical modification, microbiological test, ampicillin

Wprowadzenie

Od sierpnia 2011 r. w Międzynarodowym Centrum Onkoterapii w Koszalinie weryfikujemy poprawność napromieniania pacjentów m.in. za pomocą zdjęć portalowych. Każdy pacjent zakwalifikowany do radioterapii, kierowany jest na badanie tomograficzne, celem przygotowania elektronicznych przekrojów (skanów) obszaru ciała pacjenta, w którym znajduje się guz nowotworowy [1].

Zbieranie danych topograficznych pacjenta niezbędne jest do określenia położenia zmiany nowotworowej i organów szczególnie wrażliwych na promieniowanie. Ilość skanów, które należy wykonać uzależniona jest od rozmiarów zmiany nowotworowej oraz

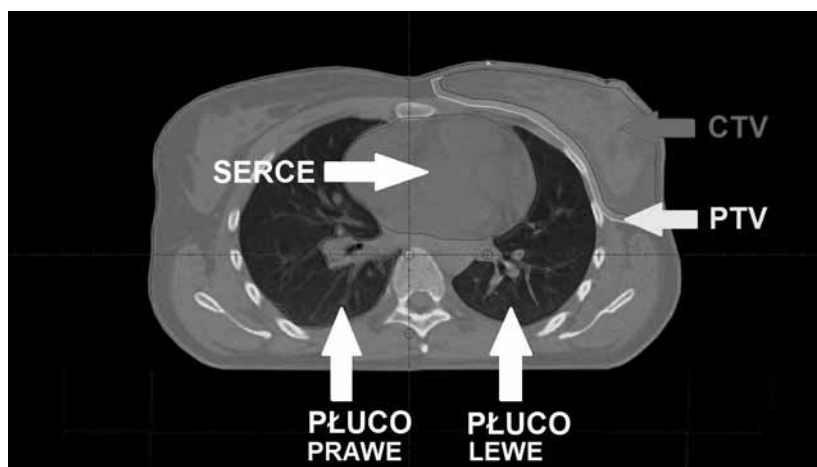
* Międzynarodowe Centrum Onkoterapii, Koszalin.

** Międzynarodowe Centrum Onkoterapii, Koszalin, Instytut Technologii i Edukacji Politechniki Koszalińskiej.

*** Instytut Technologii i Edukacji Politechniki Koszalińskiej.

od ustalonej odległości międzyskanowej. Odległość pomiędzy skanami dobiera się tak aby w trakcie dalszej wizualizacji pacjenta na systemach planowania leczenia możliwa była jak najlepsza rekonstrukcja trójwymiarowa obszaru napromieniania oraz narządów krytycznych [1].

Na zrekonstruowanym obszarze 3D lekarz radioterapeuta określa obszar napromieniania oraz narządy krytyczne. Posiadając pakiet skanów oraz dane dotyczące obszaru napromieniania oraz narządów krytycznych rozpoczyna się kolejny etap przygotowania pacjenta do radioterapii. Odbywa się on w pracowni planowania leczenia na komputerowych systemach do planowania leczenia. W systemach komputerowych wykorzystuje się skany z tomografii komputerowej wraz z wrysowanymi obszarami napromieniania zwanymi CTV (clinical target volume); PTV (planning target volume) (Rys. 1) oraz narządami krytycznymi i opracowuje się plan leczenia z uwzględnieniem rozkładu dawki i czasu napromieniania.



Rys. 1. Skan tomograficzny klatki piersiowej pacjentki z wrysowanymi przez lekarza obszarami napromieniania (PTV, CTV) oraz narządami krytycznymi (serce, płuco prawe, płuco lewe)

Obszar napromieniania określa się trójstopniowo jako [1]: GTV (Gross target volume) – lity guz nowotworowy; CTV (clinical target volume), gdy nie można określić litej zmiany nowotworowej tylko pewien obszar nacieku nowotworowego lub jako GTV z marginesem obejmującym mikrorozsiewy wokół guza oraz PTV (planning target volume) – obszar CTV z marginesem uwzględniającym ruchomość napromienianego obszaru oraz potencjalny błąd ułożenia pacjenta podczas napromieniania.

Planowanie leczenia polega na wypracowaniu takich metod i technik napromieniania, aby podać dostatecznie wysoką dawkę promieniowania jonizującego w obszar tkanek objętych chorobą nowotworową i równocześnie maksymalnie ograniczyć ją w stosunku do zdrowych tkanek. Przygotowanie oraz realizacja leczenia z użyciem wiązek zewnętrznych promieniowania jonizującego wymaga szczególnej dokładności [2], [3]. Nawet niewielkie zmiany dawki pochłoniętej przez guz nowotworowy mogą prowadzić do obniżenia

prawdopodobieństwa miejscowego wyleczenia, gdy zostanie podana dawka niższa niż zalecona przez lekarza radioterapeutę. Ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek bądź narządów krytycznych wzrasta gdy podana dawka jest wyższa od zalecanej. Inne położenie wiązki terapeutycznej względem napromienianej objętości tarczowej niż określone na etapie planowania leczenia prowadzi nieuchronnie do podania niższej dawki w objętości tarczowej i zwykle do podania wyższej dawki w narządach krytycznych [4].

Zasadniczo wyróżnia się dwie grupy przyczyn powodujących podanie innej dawki niż zlecona. Należą do nich błędy dozymetryczne i geometryczne. Odkryte błędy dozymetryczne mogą być w pewnym zakresie naprawione zaś konsekwencje błędów geometrycznych są nieodwracalne. Błędy geometryczne, powstają na etapie przygotowywania leczenia lub w trakcie jego trwania [2], [3], [4]. Błędy geometryczne wynikają przeważnie ze złego ułożenia pacjenta w czasie realizacji leczenia (rys. 2).



Rys. 2. Geometria napromieniania pacjentki z rakiem piersi lewej. Wskutek zmiany położenia izocentrum realizowanego względem izocentrum zaplanowanego otrzymano „gruby” błąd geometryczny

Ocena jakości napromieniania przy pomocy zdjęć portalowych ma na celu wykrycie błędów geometrycznych podczas realizacji leczenia i ewentualnie wprowadzenie takich zmian aby geometria napromieniania była jak najbliższa zaplanowanej. Dodatkowo weryfikacja geometrii ułożenia ma na celu m.in. wykrycie błędów systematycznych (np. w sposób stały w trakcie leczenia izocentrum wiązek jest przesunięte w tym samym kierunku – w tym przypadku miarą błędu systematycznego będzie stała średnia wartość wektora przesunięcia) jak i przypadkowych (wahania przesunięcia wektora izocentrum w poszczególnych seansach – miarą błędu będzie odchylenie standardowe) [2], [3].

Zdjęcia portalowe, to zdjęcia weryfikacyjne wykonywane podczas napromieniania pacjenta na aparacie terapeutycznym, za pomocą wiązki terapeutycznej, pozwalają one wizualizować i określić ilościowo pozycję anatomicznych struktur w polu napromieniania.

Kontrola ułożenia przy pomocy zdjęć portalowych, w ogromnej większości jest realizowana poprzez porównanie dwóch zazwyczaj ortogonalnych zdjęć z odpowiednimi

obrazami (DRR) pól terapeutycznych uzyskanymi z planowania leczenia na bazie CT. W idealnej sytuacji gdy pacjent jest ułożony prawidłowo, położenie układu wiązki wyznaczone w układzie pacjenta (układ współrzędnych pacjenta określają dobrze widoczne struktury anatomiczne) powinno być takie samo jak określone w planie leczenia (układ współrzędnych w planie leczenia definiuje geometria wiązek – środek stanowi izocentrum, jedna z wiązek stanowi oś centralną). Wzajemne położenie granic pola i struktur anatomicznych powinno się pokrywać. Porównanie rekonstrukcji radiograficznej i zdjęcia wykonanego na aparacie terapeutycznym polega na nałożeniu widocznych na obydwu zdjęciach tych samych struktur anatomicznych i określeniu wektora o jaki należy przesunąć pole zarejestrowane na zdjęciu terapeutycznym aby pokryły się granice pól zaplanowanego i terapeutycznego[2]. W wielu przypadkach niezbędne jest wykonanie obrotu jednego pola względem osi centralnej, tak aby precyzyjnie nałożyć obraz odniesienia i obraz pola terapeutycznego.

Kontrola z użyciem płaskich obrazów pozwala na weryfikację geometrii tylko w dwóch kierunkach i pozwala na określenie rotacji tylko wokół jednej osi. Jeżeli wykonane zostanie dodatkowo zdjęcie prostopadłe do pierwszego pola to uzyskana zostanie informacja o trzeciej współrzędnej tj. rotacji względem drugiej osi.

Metody korekcji ułożenia możemy podzielić na metody: off-line i on-line. Zasadnicza różnica pomiędzy tymi dwoma metodami prowadzi do zmniejszenia zarówno błędów przypadkowych jak i systematycznych w korekcji on-line. W schemacie of-line redukujemy jedynie błędy systematyczne.

Celem pracy była ocena jakości radioterapii przy pomocy systematycznie wykonywanych zdjęć portalowych w okresie od VIII 2011 do II 2013 r.

Materiał i metody

Ocenię poddano 34 kolejnych pacjentek w wieku od 31 do 73 lat (mediana 56) z rakiem piersi leczonych w Międzynarodowym Centrum Onkoterapii, Euromedic w Koszalinie. Raka piersi rozpoznano w I stopniu zaawansowania u 6 pacjentek (18%), w II stopniu u 13 – (38%), a w III stopniu u 15 chorych (44%). Przerzuty do węzłów chłonnych pachowych stwierdzono u 19 pacjentek (56%). Zabieg oszczędzający wykonano u 17 chorych, co stanowi 50% ocenianej grupy a u pozostałych przeprowadzono radykalną mammektomię z limfadenektomią.. Pacjentki kwalifikowano do radioterapii po leczeniu oszczędzającym zgodnie ze standardami postępowania podając na obszar gruczołu piersiowego 50Gy w 25 frakcjach i podwyższając dawkę na łożę po guzie o 10–16Gy w 5–8 frakcjach w zależności od sytuacji klinicznej u chorej. U czterech pacjentek z tej grupy przeprowadzono również napromienianie lokoregionalnych węzłów chłonnych ze względu na obecność przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. U pozostałej połowy pacjentek po radykalnym zabiegu mammektomii z limfadenektomią prowadzono napromienianie ściany klatki piersiowej oraz lokoregionalnych węzłów chłonnych dawką 50Gy w 25 frakcjach. Leczenie planowano w technice 3D przy pomocy tomografii komputerowej. Pozycja terapeutyczna była taka sama niezależnie od techniki planowania. Chore leżały na plecach na podstawce typu Modar, z rękami uniesionymi nad głowę, głowa zwrócona na wprost lub w przypadku napromieniania obszarów węzłowych – w stronę przeciwną

do napromienianej pachy. Stosowano także podpórkę pod kolanami dla uzyskania większej stabilności bioder. Napromienianie realizowano techniką izocentryczną z dwóch pól tangencjalnych, gdy leczeniem objęty był sam gruczoł piersiowy lub techniką wspólnego izocentrum przy napromienianiu pola nadobojczykowego i ściany klatki piersiowej. Radioterapię przeprowadzono na dwóch bliźniaczych przyspieszaczach liniowych firmy SIEMENS: Artiste 1 (#5786) oraz Artiste 2 (#5785), wiązkami fotonowymi o energii 6 MV lub 15 MV. Zdjęcia portalowe wykonywano przez kolejne 3 dni od chwili rozpoczęcia radioterapii, w celu wyznaczenia średniej wartości odchyień po pierwszych trzech frakcjach. Średnia arytmetyczna obliczona w pierwszych dniach leczenia służy do określenia przesunięć, które należy wykonać względem punktu izocentrycznego w kolejnych dniach leczenia. W każdym tygodniu do końca radioterapii wykonywano jednorazowo sprawdzające zdjęcia portalowe. Dla każdej z pacjentek wykonano od jednego do dwunastu zdjęć portalowych dla każdego pola. Liczba wykonanych kontroli portalowych zależała od odtwarzalności ułożenia geometrii napromieniania.

Zdjęcia portalowe oceniano na stacji roboczej Syngo RT Therapist zawsze tego samego dnia. Wyznaczone przesunięcia poddano akceptacji lekarza prowadzącego. W pierwszym etapie oceniano zgodności zdjęcia symulacyjnego z wygenerowanym, dla każdego pola, w systemie planowania leczenia DRR. Następnie w aplikacji Review zaznaczano na zdjęciu symulacyjnym widoczne struktury kostne, np.: łuki żeber, kręgosłup, obojczyk. Kolejnym etapem to automatyczne lub ręczne dopasowanie zaznaczonych struktur względem zdjęć portalowych tak, aby zaznaczone struktury pokryły się. Aplikacja Syngo RT Therapist pozwala na ocenę zdjęć portalowych przedstawiając po nałożeniu struktur, jakie jest przesunięcie w osi X (Lateral), Y (Longitudinal) oraz Z (Vertical).



Rys. 3. Zdjęcie wygenerowane z systemu planowania leczenia z zaznaczonymi strukturami kostnymi

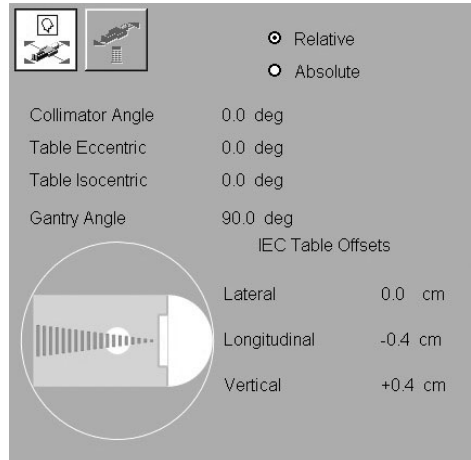


Rys. 4. Zdjęcie portalowe z zaznaczonymi strukturami kostnymi

Dodatkowo oceniano położenie izocentrum. Przyjęte dopuszczalne odchylenie w osi X i Y oraz Z wynosiło ± 4 mm. Jeżeli różnica była większa niż 4 mm wówczas podejmowano działania wyjaśniające zaistniałe niezgodności. Przy odchyleniach położenia izocentrum

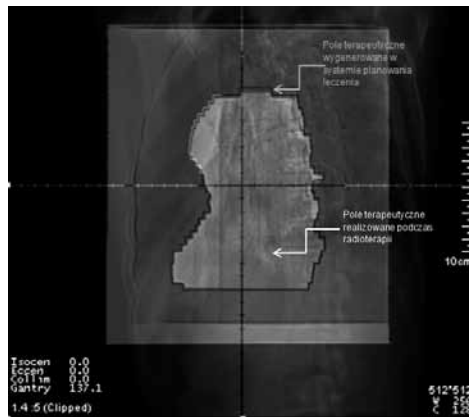


Rys. 5. Nałożenie zdjęć z systemu planowania leczenia i portalu



Rys. 6. Przesunięcia w osi X (Lateral), Y (Longitudinal) oraz Z (Vertical)

mniejszych niż 4 mm realizowano proces napromieniania. Na zdjęciach portalowych wykonanych dla pacjentek, w przypadku których kontrola izocentrum wykazała zgodność względem przyjętej tolerancji nie obserwowano niezgodności w geometrii napromieniania.



Rys. 7. Nałożenie zdjęć pól terapeutycznych z systemu planowania leczenia oraz realizowanych podczas radioterapii

W przypadku gdy różnica przekraczała przyjęte odchylenie lub gdy po pierwszym sprawdzeniu odchylenie było większe niż 7 mm obserwowano różnice w ocenianych obrazach. W takich sytuacjach dokładnemu sprawdzaniu poddano geometrię napromieniania (ułożenia pacjenta) względem planu leczenia, resymulowano cały plan. Tym sposobem wyjaśniono niezgodności dla wszystkich napromienianych pacjentek.

Wyniki

Ocenie poddano 312 wyników kontroli ułożenia 34 pacjentek z rakiem piersi. Obliczono błąd systematyczny i przypadkowy dla każdej pacjentki jak również błąd systematyczny i przypadkowy dla jednorodnej grupy pacjentek.

Błędy oceniano w trzech prostopadłych do siebie osiach. Osi X – Lateral, osi Y – Longitudinal dla kąta głowicy aparatu terapeutycznego 0° oraz 90° a także w osi Z – Vertical.

Rozrzut wartości błędów systematycznych w osi X – Lateral dla każdej z pacjentek oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,01 cm do maksymalnej wartości 0,43 cm; a rozrzut błędów przypadkowych oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,08 cm do do maksymalnej wartości 0,40 cm. W osi Y – Longitudinal dla kąta głowicy aparatu terapeutycznego 0° rozrzut wartości błędów systematycznych dla każdej z pacjentek oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,00 cm do maksymalnej wartości 0,55 cm; a rozrzut błędów przypadkowych oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,13 cm do do maksymalnej wartości 0,51 cm. W osi Y – Longitudinal dla kąta głowicy aparatu terapeutycznego 90° rozrzut wartości błędów systematycznych dla każdej z pacjentek oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,00 cm do maksymalnej wartości 0,37 cm; a rozrzut błędów przypadkowych oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,04 cm do do maksymalnej wartości 0,39 cm. W osi Z – Vertical dla każdej z pacjentek oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,00 cm do maksymalnej wartości 0,73 cm; a rozrzut błędów przypadkowych oscyluje w granicach od wartości minimalnej 0,00 cm do do maksymalnej wartości 0,78 cm.

Wartość błędu systematycznego w jednorodnej grupie pacjentek w osi X – Lateral wyniosła 0,45 cm, a wartość błędu przypadkowego 0,18 cm. W osi Y – Longitudinal wartość błędu systematycznego wyniosła 0,47 cm dla kąta ramienia akceleratora 0° oraz 0,35 cm dla kąta ramienia akceleratora 90°, wartości błędów przypadkowych wyniosły odpowiednio dla kąta ramienia akceleratora 0° 0,26 cm, a dla kąta ramienia akceleratora 90° 0,20 cm.

W osi Z – Vertical wartość błędu systematycznego wyniosła 0,10 cm, a wartość błędu przypadkowego wyniosła 0,38 cm.

Błąd systematyczny dla każdego pacjenta został obliczony ze wzoru:

$$z_{\text{sys}} = \frac{\sum_{i=1}^K z_i}{K},$$

gdzie:

- z_i – przesunięcie izocentrum w i – tej sesji terapeutycznej względem izocentrum zaplanowanego,
- K – liczba frakcji, w czasie których wykonano kontrolę portalową i określono położenie izocentrum

Błąd przypadkowy dla każdego pacjenta został obliczony ze wzoru:

$$z_{przyp} = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^K (z_i - z_{syst})^2}{K - 1}},$$

gdzie:

s – błąd przypadkowy,

z_i – przesunięcie izocentrum w i -tej sesji terapeutycznej względem izocentrum zaplanowanego,

K – liczba frakcji, w czasie których wykonano kontrolę portalową i określono położenie izocentrum,

z_{syst} – błąd systematyczny

Błąd systematyczny dla jednorodnej grupy pacjentek został obliczony ze wzoru:

$$Z_{syst} = \Sigma = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (z_{syst} - Z_{sr})^2}{N - 1}},$$

gdzie:

z_{syst} – błąd systematyczny,

Z_{sr} – wartość średnia po błędach systematycznych,

N – liczba pacjentów

Błąd przypadkowy dla jednorodnej grupy pacjentek został obliczony ze wzoru:

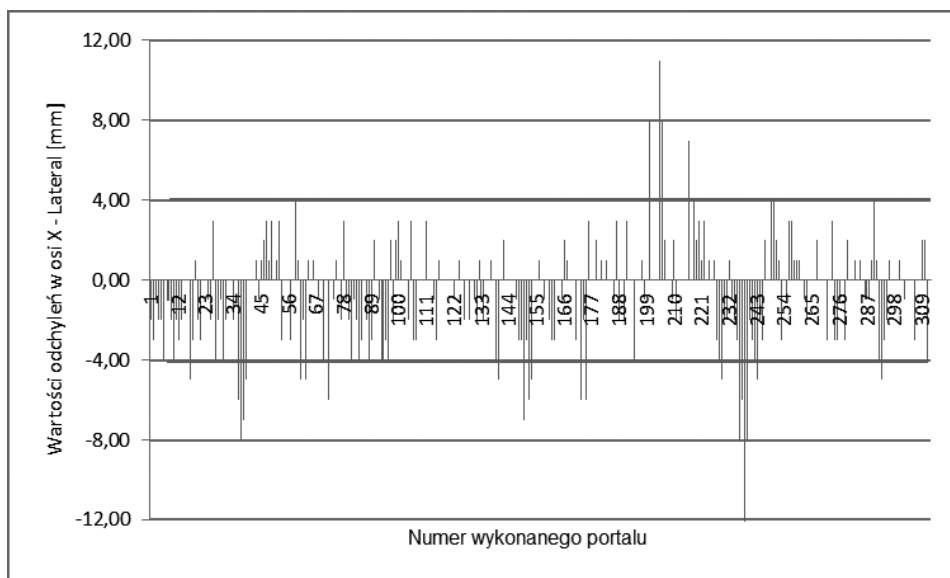
$$Z_{przyp} = \frac{\sum_{j=1}^N z_{przyp}}{N},$$

gdzie:

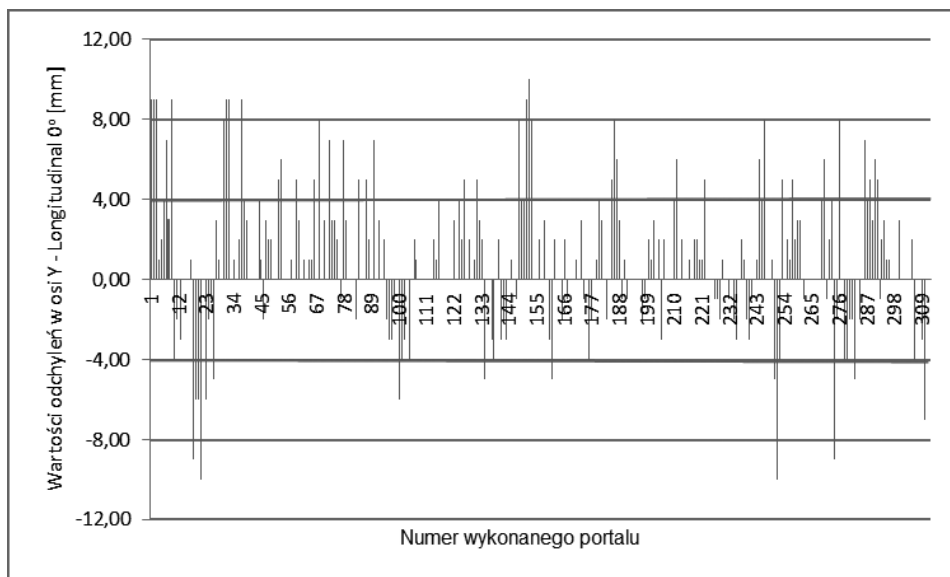
Z_{przyp} – błąd przypadkowy,

N – liczba pacjentów.

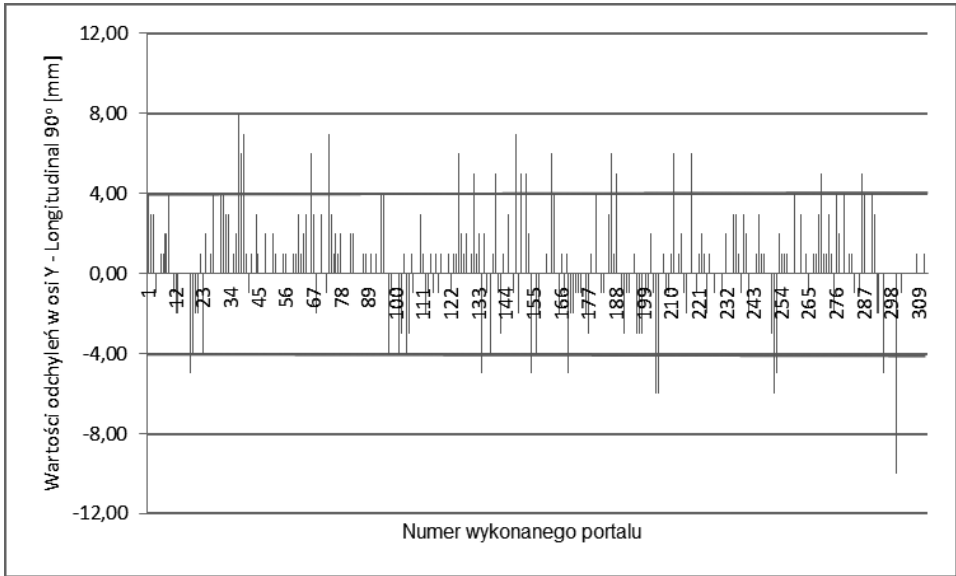
W wykonanych portalach u 61% pacjentek odchylenie w osiach X, Y, Z nie przekraczało ± 4 mm. U 39% pacjentek, u których przekroczony był dopuszczalny błąd podjęto opisane wyżej działania wyjaśniające i skorygowano błąd. Wykryte nieprawidłowości wynikały przede wszystkim z innego ułożenia pacjentek przy ekspozycji i dużej ruchomości oddechowej u niektórych chorych.



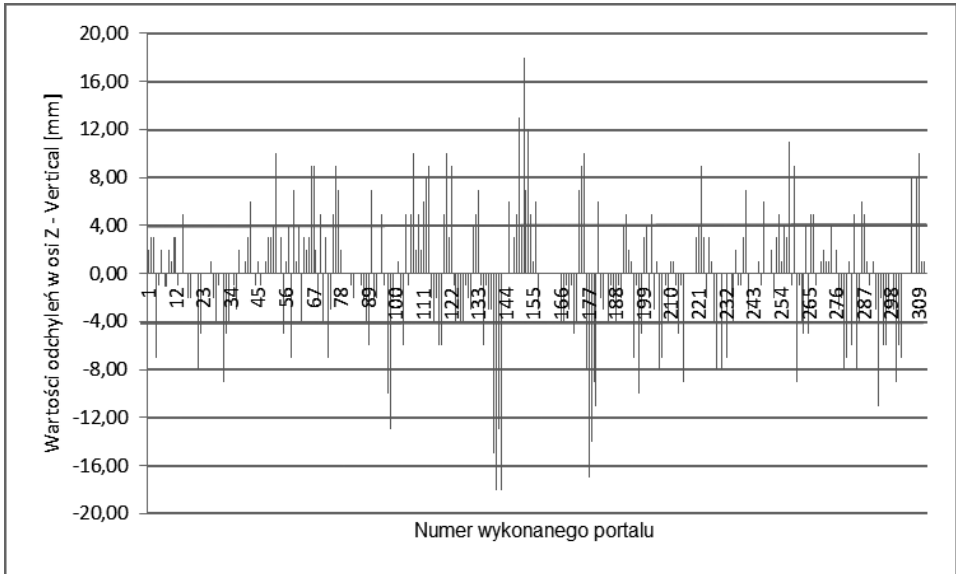
Rys. 12. Histogram różnic wartości odchyleń pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR) a portalowym w osi X – Lateral [mm]



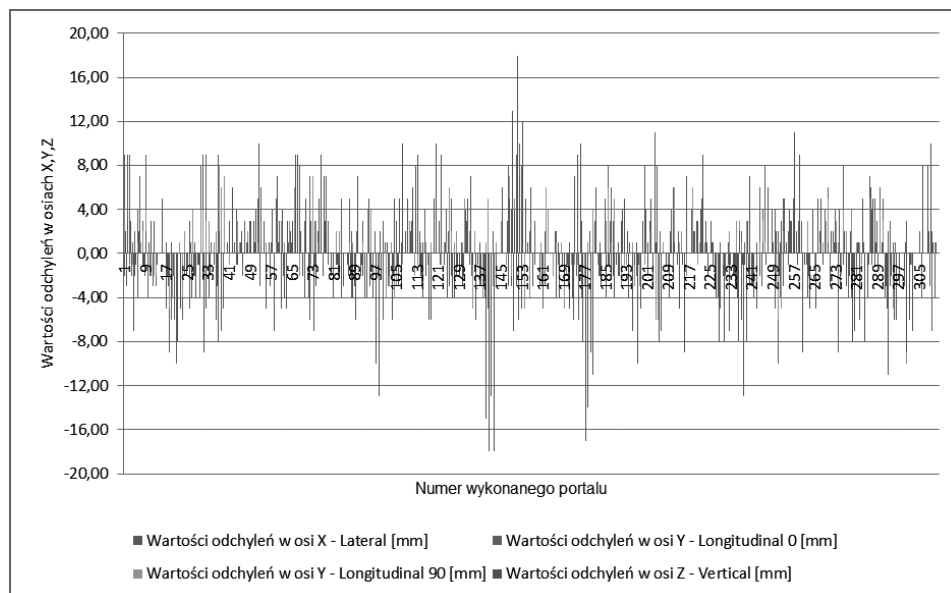
Rys. 13. Histogram różnic wartości odchyleń pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR) a portalowym w osi Y – Longitudinal 0° [mm]



Rys. 14. Histogram różnic wartości odchyleń pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR) a portalowym w osi Y – Longitudinal 90° [mm]



Rys. 15. Histogram różnic wartości odchyleń pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR) a portalowym w osi Z – Vertical [mm]



Rys. 16. Histogram różnic wartości odchyień pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR) a portalowym w osiach X, Y, Z [mm]

Wnioski

Planowanie leczenia polega na wypracowaniu takich metod i technik napromieniania aby podać dostatecznie wysoką dawkę promieniowania jonizującego w obszar tkanek objętych chorobą nowotworową. Równocześnie należy pamiętać o maksymalnym ograniczeniu ekspozycji w zdrowych tkankach. Inne położenie wiązki terapeutycznej względem napromienianej objętości tarczowej niż określone na etapie planowania leczenia prowadzi nieuchronnie do zmniejszenia prawdopodobieństwa miejscowego wyleczenia nowotworu.

W pracy przedstawiono metodę weryfikacji ułożenia pacjenta poprzez ocenę zdjęć portalowych na podstawie wybranych przypadków klinicznych raka piersi. Jako miarę zgodności przyjęto położenie środka oraz brzegów pola napromieniania względem wybranych struktur anatomicznych. Elektroniczny sposób uzyskania zdjęć, ich przechowywania oraz cyfrowej obróbki pozwalają na precyzyjne porównanie poprawności napromieniania.

Zbrane wyniki wskazują na dobrą powtarzalność geometrii napromieniania w analizowanej grupie pacjentek. W większości przypadków stwierdzono zgodność prowadzonego leczenia z przyjętym planem (dla 61% pacjentek odchylenie położenia izocentrum w osiach X, Y, Z nie przekraczało ± 4 mm). U 39% pacjentek, dla których różnica położenia izocentrum przekroczyła dopuszczalny błąd podjęto postępowanie wyjaśniające celem skorygowania geometrii ułożenia i napromieniania.

Analiza zebranych wyników wskazuje, że największe różnice wartości odchyień pomiędzy zdjęciem wygenerowanym w systemie planowania leczenia (DRR), a zdjęciem portalowym obserwuje się dla osi Z – Vertical [mm]. Przyczyną obserwowanych różnic jest

zdecydowane nasilenie oddychania i napięcia mięśni klatki piersiowej wywołane stresem, który towarzyszy pacjentkom podczas pierwszych frakcji leczenia i jest nie do uniknięcia.

Streszczenie

Nanodiamentowe cząstki wytwarzane metodą detonacyjną posiadają bardzo wysoką bioaktywność biologiczną w kontakcie z żywym organizmem. Rozmiar ziaren jest od 4 do 20 nm. Detonacyjny nanodiament zawiera wiązania sp^3 , sp^2 oraz inne grupy funkcyjne na powierzchni. Duża ilość fazy diamentowej w detonacyjnym nanodiamencie jest odpowiedzialna za biologiczną bioaktywność nanocząstek diamentowych. Wolne wiązania na powierzchni nanodiamentu mogą być zmodyfikowane różnymi grupami chemicznymi. W ten sposób możemy otrzymać nanodiamentowe cząstki z kontrolowaną aktywnością powierzchni. W tej pracy detonacyjny nanoproszek diamentowy był chemicznie modyfikowany w reakcji Fentona. Hydroksylacja nanodiamentowej powierzchni spowodowała zmianę aktywności i możliwość przyłączenia ampicyliny. Rezultaty tych funkcjonalizacji były mierzone spektroskopią w podczerwieni – FT-IR, która potwierdziła obecność grup hydroksylowych i ampicyliny na powierzchni nanodiamentowych cząstek. Badania mikrobiologiczne z chemicznie modyfikowanymi nanodiamentowymi cząstkami z ampicyliną i niemodyfikowanymi nanocząstkami diamentu ze szczepami patogennymi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Candida albicans* ATCC 10231 nie potwierdziły antybakteryjnych właściwości zmodyfikowanych ampicyliną nanocząstek diamentowych. Zjawisko fluorescencji (oparte na stresie wapniowym) zaobserwowano w obecności zmodyfikowanych reakcją Fentona nanodiamentowych cząstek z przyłączoną ampicyliną w obecności szczepu patogennego *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Literatura

- [1] Piotrowski T., *Wybrane zagadnienia dotyczące planowania leczenia w radioterapii*, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Zakład Fizyki Medycznej, Pracownia Planowania Leczenia.
- [2] Kukołowicz P., Czuchraniuk P., Kamiński P., Zych M., *Kontrola ułożenia pacjenta*.
- [3] Hurkmans C. W., Remeijer P., Lebesque J. V. et al., *Set up verification portal imaging; review of current clinical practice*, *Rad and Onc* 2001; 58: 105–120.
- [4] Bogusz D., Miszczyk L., *Porównanie weryfikacji portalowej I ultrasonograficznej z zastosowaniem systemu PortalVision i SonArray u chorych na raka stercza poddanych radioterapii*, *Współczesna Onkologia* (2010) vol. 14; 5 (297–301).

Tlenek cyrkonu – Dedal czy Ikar współczesnej stomatologii?

Damian Nakonieczny*, Zbigniew Paszenda*

Abstract

OBJECTIVE: The increased interest of researchers involved in dental prosthetics for improving the appearance and well-being of patients treated prosthetically resulted in the introduction of full ceramic restorations fixed on teeth and on implants. The use of oxide ceramics such as Al_2O_3 , MgO and especially Y_2O_3 doped ZrO_2 make possible to obtain very good mechanical properties of fixed prosthetic, whose appearance is more similar to natural tooth in compare with metal-ceramic restorations. An important factor contributing to the growing popularity of all-ceramic restorations and Implantology is the development and availability of numerical machine tools working in CAD/CAM technology and three-dimensional scanners, allowing reproduce the anatomical terms prevailing in the patient's mouth and perform functional prosthetic restorations. The aim of this article is to present the current state of knowledge on the most popular material used to perform the full ceramic restorations – ZrO_2 .

MATERIALS: A literature overview was performed on the basis of publications published in journals dealing with the materials engineering as well as clinical and practical aspects of dental prosthetics.

RESULTS: Under review of the available theoretical and experimental data, it was found that zirconium oxide is a material which can be made fixed full ceramic restorations with very good mechanical properties and the desired aesthetic effect. However, there are few reasons and experimental data, from which it can be concluded that the stability of ZrO_2 used in an environment of body fluids is not sufficient. The phenomena occurring in the mouth associated with the so-called. Low Thermal Degradation (LTD) and Transformation Toughening ZrO_2 , which can be caused by improper laboratory procedure, moisture in saliva and forces exerted during chewing. In extreme cases occurring processes may contribute to the damage restorations and need to replace them, which is involve with high economic costs. However, the use of zirconium oxide in dental prosthetics is promising idea. Elimination of these drawbacks will benefit patients in the form of aesthetic full ceramic restorations.

Keywords: Ceramic biomaterials, ZrO_2 , prosthetic dentistry, CAD/CAM

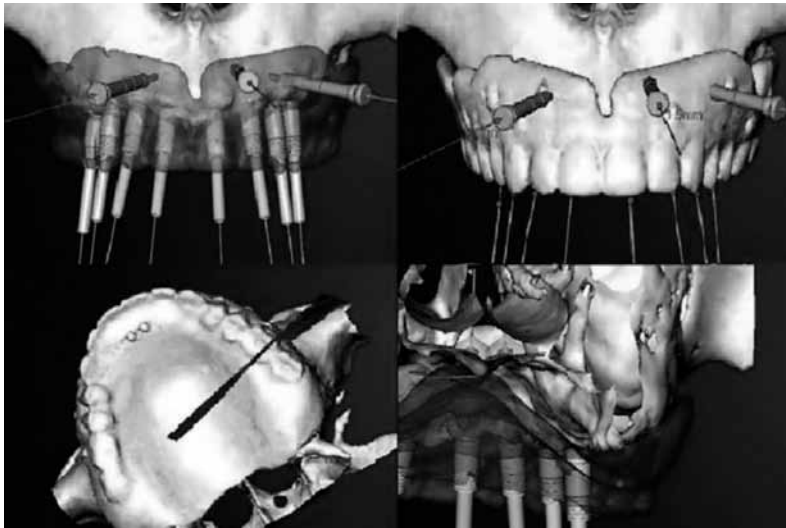
1. Wprowadzenie

Stałe uzupełnienia protetyczne stanowią próbę odtworzenia utraconych funkcji zębów własnych pacjenta, przy zachowaniu fizjologicznej drogi przenoszenia sił (pomijając wszczepy stomatologiczne) wywieranych w trakcie żucia [20, 27]. Skuteczność rehabilitacji protetycznej jest w równym stopniu zależna od postaci konstrukcyjnej protezy oraz materiału, z którego została wykonana, jak i jej dostosowania do środowiska ustrojowego. Problem doboru materiału i postaci konstrukcyjnej jest o tyle istotny, że źle wykonane protezy stałe – jako grupa – są przyczyną powikłań jatrogennych (dysfunkcje stawowe,

* Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych, Wydział Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Śląska.

nadmierne ścieranie zębów antagonistycznych) [7, 20, 27]. Właściwie dobrany materiał, staranne wykonanie laboratoryjne oraz wybór metod leczenia stosownych do danego przypadku mogą zaowocować kilkudziesięcioletnią, bezawaryjną eksploatacją protez stałych [20]. W chwili obecnej, ze względu na możliwość uzyskania bardzo dobrego efektu estetycznego protez, coraz szersze wykorzystanie znajdują protezy stałe, wykonane w całości z ceramiki (*full ceramic restorations*). Dzięki wykorzystaniu frezarek numerycznych w połączeniu z cyfrową rejestracją i analizą obrazu (*Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing*) można uzyskać powtarzalny produkt w doskonały sposób naśladujący uzębienie naturalne. W technologii CAD/CAM wykonuje się ceramiczne [6, 7, 11, 22, 29, 30]:

- podbudowy pod korony licowane,
- korony,
- implanto-korony,
- korony częściowe (*inlay, onlay*),
- mosty (pojedyncze braki, mosty okrężne),
- implanto-mosty,
- łączniki implantologiczne (*abutment*).



Rys. 1. Planowanie przedzabiegowe, środowisko CAD [25]

Protezy stałe wykonane w pełni z ceramiki, w porównaniu do uzupełnień metalowo-ceramicznych, posiadają następujące zalety [7, 20, 27]:

- nie powodują metalozy,
- nie dają odczynów alergicznych związanych z dyfuzją jonów metali,
- umożliwiają uzyskanie korzystnego efektu estetycznego (brak tzw. efektu siniego dżiasła wokół strefy przyszyjkowej uzupełnienia).

W początkowym okresie stosowania uzupełnienia pełnoceramiczne cechowały się znaczną kruchością, która ograniczała ich zastosowanie zasadniczo do odcinka przedniego łuku zębowego, w którym wywierane siły zwarciowe w niewielkim stopniu oddziaływały destruktywnie na protezy [7, 20, 31]. Wprowadzenie do użytku ceramik tlenkowych pozwoliło poszerzyć zasięg możliwości odtwórczych o odcinek boczny, a z czasem wykonywać pełne łuki zębowe zamocowane na implantach [7]. Gwałtowny rozwój protez stałych był możliwy dzięki wykorzystaniu ceramiki złożonej z tlenku cyrkonu domieszkowanego tlenkiem itru (*Yttrium Stabilized Zirconia* – YSZ) w ilości 3–5% (molowo) [3, 9, 13, 14, 19, 26]. Czysty chemicznie tlenek cyrkonu jest trudnotopliwą ceramiką (3000 K) o niskim współczynniku przewodzenia ciepła i bardzo dobrej odporności chemicznej (właściwości antykorozyjne). Wykazuje właściwości amfoteryczne [8]. Może występować w trzech odmianach alotropowych [6, 8, 26]:

- jednoskośnej (*monoclinic*) – stabilnej w warunkach pokojowych,
- tetragonalnej (*tetragonal*) – występującej powyżej temperatury 1443 K,
- regularnej (*cubic*) – występującej powyżej temperatury 2913 K.

Przejście fazowe pomiędzy odmianą tetragonalną a jednoskośną ma charakter przemiany martenzytycznej, która generuje wzrost objętości cząsteczek, a w konsekwencji powstanie naprężeń mogących oddziaływać destrukcyjnie na materiał w trakcie obróbki termicznej. Występowanie przemian fazowych pomiędzy odmianami alotropowymi tlenku cyrkonu jest również źródłem innych procesów: utwardzenia przeobrażeniowego (*Transformation Toughening*) oraz degradacji niskotemperaturowej (LTD – *Low Thermal Degradation*). Biorąc pod uwagę zastosowania stomatologiczne, najbardziej pożądaną odmianą ZrO_2 jest odmiana tetragonalna.

2. Tlenek cyrkonu – charakterystyka

2.1. Przemiana martenzytyczna

Przemiana martenzytyczna jest możliwa dzięki występowaniu wysokotemperaturowych, metastabilnych odmian alotropowych tlenku cyrkonu, tetragonalnej oraz regularnej [8, 13, 19, 26, 29, 31]. Przejście fazowe jest generowane poprzez [8, 13]:

- obróbkę termiczną – w trakcie chłodzenia ceramiki od temperatury 1343 K do temperatury pokojowej,
- nadmierny rozrost ziaren w trakcie obróbki termicznej,
- naprężenia zewnętrzne,
- oddziaływanie z wilgocią w zakresie temperatur 303–773°K.

W konsekwencji przemiany dochodzi do powstania gradientu naprężeń, uzależnionego od dyspersji odmiany jednoskośnej oraz wzrostu objętości ziarn o ok. 2–5% [8, 13, 19, 26, 29, 31]. Siłą napędową procesu jest różnica energii swobodnej stanu metastabilnego i stabilnego [13]:

$$\Delta F_0 = \Delta F_{Ch} + \Delta U_E + \Delta U_S - \Delta U_I \quad (1)$$

gdzie:

ΔF_0 – zmiana energii swobodnej ($Jmol^{-1}$),

- ΔF_{Ch} – zmiana potencjału chemicznego (Jmol⁻¹),
 ΔU_E – zmiana energii odkształcenia (na mol) (Jmol⁻¹),
 ΔU_S – zmiana swobodnej energii powierzchniowej (Jmol⁻¹),
 ΔU_I – człon określający wywierane naprężenia (na mol) (Jmol⁻¹).

Zmiana potencjału chemicznego może zostać zapisana jako różnica entropii odmiany tetragonalnej i jednoskośnej [15]:

$$\Delta F_{Ch} = \Delta S^{t \rightarrow m} (T_0 - T) \quad (2)$$

gdzie:

- $\Delta S^{t \rightarrow m}$ – zmiana entropii (JK⁻¹),
 T_0 – temperatura początku przemiany fazy tetragonalnej (K),
 T – temperatura zadana (K).

W oparciu o powyższe równania można zapisać zależność określającą wielkość naprężenia zewnętrznego, indukującego przemianę martenzytyczną:

$$\Delta U_I = \sigma_C^T = \frac{\Delta S^{t \rightarrow m} (M_S - T)}{\varepsilon^T} \quad (3)$$

gdzie:

- σ_C^T – naprężenia krytyczne (Pa),
 M_S – temperatura inicjująca przemianę martenzytyczną (K),
 ε^T – naprężenie wywołane przemianą (Pa),
 T – temperatura zadana (K).

Chemicznie czysty ZrO₂ w wyniku przemiany martenzytycznej ulega niekontrolowanemu rozkruszeniu. Temu niekorzystnemu zjawisku można zapobiec poprzez domieszkowanie cyrkonu związkami stabilizującymi w temperaturze pokojowej odmiany metastabilne. W tym celu stosuje się między innymi tlenki [8, 13, 19, 26, 29, 31]:

- wapnia – CaO,
- itru – Y₂O₃,
- ceru – CeO₂,
- magnezu – MgO,
- gadolinu – Gd₂O₃,
- lantanu – La₂O₃.

2.2. Utwardzenie przeobrażeniowe

Warunkiem zajścia utwardzenia przeobrażeniowego jest występowanie w temperaturze pokojowej odmiany tetragonalnej ZrO₂. Transformacja ma miejsce w obszarze, w którym pod wpływem przyłożonych z zewnątrz naprężeń dochodzi do pęknięcia. Wokół powstającej szczeliny dochodzi do spontanicznej przemiany fazowej ziaren z formy tetragonalnej na jednoskośną, której rezultatem jest wzrost objętości ziaren w strefie pęknięcia, zwiększenie twardości i zablokowanie jego dalszej propagacji [4, 5, 14, 17]. Ceramikę podlegającą takim przemianom nazywa się ceramiką transformującą (TTC –

transforming toughened ceramics) [25]. Do innych mechanizmów blokujących pęknięcie (*crack-tip shielding*) można zaliczyć [8, 13, 19, 26, 29, 31]:

- kompensację generowaną mikropęknięciami powstającymi wzdłuż głównego pęknięcia,
- kompensację generowaną dyssypacją pęknięcia po granicach ziaren jednoskośnych.

W temperaturze pokojowej zachodzące przemiany są jednokierunkowe. Wyrzwanie ceramiki w zakresie temperatur 1173–1273 K pozwala odwrócić proces [14]. Istotnym zagadnieniem związanym z mechanizmem utwardzenia jest dobór odpowiedniej domieszki stabilizującej, która zabezpieczy występowanie fazy tetragonalnej oraz umożliwi przewidywalną kontrolę przemiany martenzytycznej. Wartości modułu Younga stabilizatora oraz matrycy (materiału bazowego) powinny być do siebie zbliżone, w przeciwnym wypadku w trakcie propagacji pęknięcia dochodzi do wytworzenia niekorzystnego gradientu naprężeń kompensujących, które zmniejszą podatność ceramiki na przemianę [8]. Na podatność materiału do utwardzania przeobrażeniowego wpływają również [8, 13]:

- rozmiar ziaren, większe ziarna utrudniają transformację,
- temperatura eksploatacyjna, wzrost temperatury środowiska roboczego poprawia stabilizację fazy tetragonalnej, wpływając tym samym niekorzystnie na możliwość przeobrażenia.

Zachowanie „konwencjonalnej” ceramiki (niepodlegającej utwardzeniu przeobrażeniowemu), poddanej naprężeniom krytycznym powodującym zniszczenie materiału, dobrze opisuje model Griffitha [8, 13]:

$$K_{IC} = \sigma_f Y \sqrt{c} \quad (4)$$

gdzie:

- K_{IC} – odporność na pękanie (MPam^{-1/2}),
- σ_f – naprężenia krytyczne (MPa),
- Y – współczynnik kształtu pęknięcia (wartość empiryczna) (m⁻²),
- c – krytyczny promień krzywizny pęknięcia (m).

W modelu opisującym zachowanie ceramiki transformującej należy rozpatrzyć również [8, 13]:

- pole naprężeń powstające w wyniku transformacji fazowej,
- wzrost objętości transformujących ziaren,
- moduł Younga stabilizatora i matrycy.

Uwzględniając powyższe czynniki model obliczeniowy przyjmuje postać [8]:

$$K_{ICtr} = K_0 + \Delta K_c \quad (5)$$

gdzie:

- K_{ICtr} – odporność na pękanie ceramiki transformującej (MPam^{-1/2})
- K_0 – odporność na pękanie matrycy (MPam^{-1/2}),
- ΔK_c – człon opisujący odporność na pękanie w zależności od przemiany fazowej (MPam^{-1/2}).

2.3. Degradacja niskotemperaturowa

Degradacja niskotemperaturowa jest zjawiskiem towarzyszącym przemianie martenzytycznej ceramiki przebywającej w środowisku elektrolitu. Występuje w zakresie temperatur 273–773 K [8, 13, 19]. Zachodzi najintensywniej w temperaturze ~523 K oraz w środowisku:

- wodnym,
- ciekłego amoniaku,
- kwasu siarkowego (VI),
- kwasu azotowego.

Niszczenie postępuje od kontaktującej z elektrolitem powierzchni materiału do jego wnętrza. Zachodzące zjawiska można podzielić na [19]:

- penetrację przez ciecz granic ziarnowych transformujących ziaren,
- generowanie naprężeń w strukturze materiału,
- wypychanie ziaren ku powierzchni,
- generowanie mikropęknięć,
- kruszenie materiału,
- wypadanie ziaren,
- postęp degradacji w głąb materiału.

Zachodzące przemiany mają charakter procesu autokatalitycznego, bowiem generowane przez ciecz naprężenia wywołują niekontrolowaną przemianę martenzytyczną, co powoduje postęp degradacji w głąb materiału [8, 13, 19]. Do czynników wpływających na degradację niskotemperaturową należą [8, 13, 19]:

- rodzaj i stężenie stabilizatora – obecnie najchętniej stosowanym stabilizatorem, pozwalającym osiągnąć dobre rezultaty, jest Y_2O_3 . Domieszką która prawdopodobnie umożliwi uniknięcie degradacji niskotemperaturowej jest CeO_2 (obecnie w fazie badawczej), stosowanie wyższych stężeń pozwala spowolnić degradację,
- rozmiar ziaren – ziarna większe niż 1 μm wykazują tendencję do spontanicznej przemiany martenzytycznej oraz wysoką podatność na degradację,
- obecność fazy regularnej – ziarna regularne mogą powodować spadek stężenia stabilizatora w granicach ziaren fazy tetragonalnej, co prowadzi do destabilizacji i wzrostu podatności ceramiki na przemianę martenzytyczną oraz degradację,
- czystość substratów – efekt zależny od rodzaju wtrącenia (SiO_2 , Al_2O_3 – zmniejszają podatność, TiO_4 , Fe_2O_3 – efekt odwrotny),
- warunki eksploatacyjne – roztwory polarne oraz podwyższone ciśnienie sprzyjają degradacji.

Mechanizm degradacji niskotemperaturowej nie jest dokładnie poznany [5, 26]. Przypuszcza się, że erozja ma charakter korozji naprężeniowej o mechanizmie adsorpcyjnym [2, 5, 19, 26]. Jonami, które powodują osłabienie wiązań Zr-O-Zr, są jony tlenu (O^{2-}). Kinetykę przemian generowanych przez degradację niskotemperaturową można przybliżyć równaniem [6]:

$$\alpha = 1 - \exp(-(bt)^n) \quad (6)$$

gdzie:

- α – liczba ziaren tetragonalnych przekształconych w jednoskośne,
- b – stała empiryczna zależna od temperatury reakcji (K^{-1}),
- t – czas ekspozycji w środowisku wilgotnym (s),
- n – wykładnik zależny od temperatury reakcji (0,5–4).

Stała empiryczna dla danej temperatury jest wyznaczana przy pomocy równania Arrheniusa [1, 6].

3. Wpływ wykonawstwa laboratoryjnego na trwałość prac protetycznych z ZrO_2

Wykonawstwo laboratoryjne prac protetycznych z tlenku cyrkonu obejmuje etapy obróbki mechanicznej oraz cieplnej, do których są zaliczane [14, 31]:

- frezowanie – w zależności od rodzaju obrabianego ZrO_2 dzieli się na:
 - ▶ *soft machining* – obrabianie bloków z ceramiki wstępnie spieczonej, na którą po obróbce mechanicznej są наносzone warstwy ceramiczne i następnie jest poddawana spiekaniu definitywnemu, w trakcie którego dochodzi do liniowego skurczu materiału (ok. 25%);
 - ▶ *hard machining* – obrabiane bloki są w pełni spieczone, materiał cechuje się bardzo dużą twardością, nie ulega skurczowi podczas wypalania ostatecznego, obróbka mechaniczna wymaga zastosowania frezarek o większej mocy niż w przypadku pierwszej techniki;
- obróbka cieplna (spiekanie), która w zależności od rodzaju wykonywanych uzupełnień dzieli się na:
 - ▶ wypalanie licowań z ceramiki nałożonej na podbudowy z ZrO_2 ;
 - ▶ wypalanie uzupełnień barwionych roztworami tlenków metali.

W zależności od wybranej techniki frezowania można otrzymać zróżnicowane rezultaty. Materiał dostarczony w „miękkiej” postaci (*green state*), obrabiany pierwszą z wymienionych technik, daje się łatwo opracowywać i można go obrabiać frezarkami większości producentów sprzętu stomatologicznego dedykowanego do CAD/CAM (3M ESPE, Nobel Biocare, Dentsply Degudent). Proces wytwórczy nie jest energochłonny i pozwala uzyskać uzupełnienia o precyzyjnie odwzorowanym kształcie. W trakcie spiekania ZrO_2 dedykowanego do tej techniki dochodzi do skurczu materiału rzędu ok. 25%, co wymaga od wytwórcy doliczenia odpowiedniego naddatku. Istotną wadą tego rodzaju techniki i dedykowanego do niej materiału jest możliwość segregacji fazowej, występującej w trakcie spiekania. Pojawiająca się w trakcie procesu faza regularna ZrO_2 może zubażać granice ziaren tetragonalnych z cząsteczek stabilizatora, zwiększając podatność materiału na niekontrolowaną przemianę martenzytyczną oraz LTD [12, 14, 19, 21]. Technika *hard machining* wymaga zastosowania frezarek o dużej mocy oraz specjalnych frezów (Decim AB, DCS Dental AG). Uzupełnienia wykonane tą techniką cechują się znaczną twardością i wytrzymałością na ściskanie. Stosowany materiał wymaga bardziej „inwazyjnej” obróbki mechanicznej, która stwarza możliwość zarodkowania fazy jednoskośnej i wzrostu podatności na LTD [31].

Istotnym i wciąż nie rozwiązany problemem związanym z wykonawstwem laboratoryjnym jest brak ujednoczonych procedur dotyczących obróbki ZrO_2 , które zapewniałyby powtarzalne wyniki i pozwalałyby zmniejszyć liczbę niepowodzeń w leczeniu protetycznym uzupełnieniami pełnoceramicznymi. W tabeli 1 zestawiono obecnie stosowne systemy ceramiki cyrkonowej i ich wybrane właściwości [12, 13, 31, 32].

Tabela 1. Ceramika cyrkonowa stosowna w protetyce stomatologicznej

Charakterystyka	ZTA (<i>zirconia toughened alumina</i>)	PSZ (<i>partially stabilized zirconia</i>)	YSZ (<i>yttrium stabilized zirconia</i>)
Skład chemiczny (%)	Al_2O_3 -67 Ce- ZrO_2 -33	ZrO_2 -90÷92 MgO - 8÷10	ZrO_2 -95÷97 Y_2O_3 -3÷5
Stabilizator	CeO_2	CaO, MgO, La_2O_3 , Y_2O_3	Y_2O_3
Podatność na LTD	materiał stabilny	umiarkowanie stabilny (mg-PSZ)	podatny
Temperatura spiekania (K)	1373÷1803	1953÷2073	1573÷1773
Porowatość (%)	<0.1	-	<0.1
Producenci	Vita Zahnfabrik – In-Ceram Zirconia	Dentronic AB – Denzir-M	Ivoclar Vivadent – IPS e.max ZirCAD

4. Aspekty kliniczne

Najczęściej wykonywanym uzupełnieniem z ZrO_2 są pojedyncze licowane korony, zaopatrujące odcinek przedni i boczny [31]. Na podstawie danych klinicznych, zebranych na grupie 204 koron, stwierdzono 93% skuteczność leczenia protetycznego. Jako powody niepowodzenia wymieniono [31]:

- utratę retencji pomiędzy koroną a zębem filarowym,
- utratę zęba,
- trwałe zespoły bólowe,
- odpryskiwanie licowania (*chipping*).

Obserwacje dotyczące koron pokrywają się danymi zebranymi na mostach o klasycznej budowie (korona całkowita-prześło-korona całkowita). Uszkodzenia uzupełnień licowanych na podbudowie z tlenku cyrkonu dotyczą pęknięć i delaminacji naniesionych warstw ceramicznych. W żadnym przypadku doświadczalnym nie stwierdzono uszkodzenia podbudowy z ZrO_2 [31]. Sytuacja zmienia się diametralnie przy rozpatrywaniu mostów typu MOD (mezjalno-okluzyjno-dystalny) zacementowanych na koronach częściowych [30, 31]. Zasięg korony, szerokość i grubość przęsła mają zasadniczy wpływ na żywotność tego typu uzupełnień. Dobór odpowiedniej postaci konstrukcyjnej protezy w tym wypadku jest czynnikiem kluczowym. Problem jest o tyle skomplikowany, że uzupełnienia są wykonywane indywidualnie dla pacjenta, co może bezpośrednio wpływać na ryzyko popełnienia błędu. W literaturze można znaleźć pokaźną ilość opracowań dotyczących

projektowania protez z wykorzystaniem MES (metoda elementów skończonych) [15, 23, 27], na podstawie których można stwierdzić dość dobrą korelację pomiędzy modelem numerycznym a danymi doświadczalnymi. Na podstawie tych informacji można wnioskować o celowości zastosowania modelowania CAD przy określeniu optymalnych postaci geometrycznych dla nowoprojektowanych protez i personalizacji rozwiązań dla danego pacjenta.

Główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu protetycznym z wykorzystaniem uzupełnień z licowanym ZrO_2 jest odpryskiwanie napalanych warstw ceramicznych. Jako przyczyny tego zjawiska wymienia się [31]:

- ostre przejścia pomiędzy ceramiką napalaną a podbudową z ZrO_2 ,
- wywieranie znacznych nacisków przez siły zgryzowe,
- niedokładne oczyszczenie powierzchni podbudowy przed nakładaniem ceramiki,
- zbyt rzadko zarobiona masa ceramiczna, w której po wypaleniu pozostają nierówności i pęcherze,
- duże różnice liniowego współczynnika rozszerzalności termicznej ZrO_2 i licowania, przyczyniające się do powstania niekorzystnego gradientu naprężeń w trakcie wypalania ceramiki.

Jednocześnie należy stwierdzić, że ilość potwierdzonych danych doświadczalnych dotyczących protez stałych z barwionego ZrO_2 oraz łączników implantologicznych jest wciąż zbyt mała, aby móc wyciągnąć rzeczowe wnioski na temat tego typu uzupełnień [31]. Równie ważnym zagadnieniem, które do tej pory nie znalazło obszerniejszego studium, jest wpływ bruksizmu na żywotność protez stałych [31]. Na rynku materiałów stomatologicznych ukazały się już modyfikacje ZrO_2 dedykowanego specjalnie dla pacjentów bruksujących (BruxZir), co może sugerować konieczność wnikliwszego rozpatrzenia wpływu tej dysfunkcji na uzupełnienia protetyczne [33].

5. Wnioski

W ostatnim dwudziestolecu w protetyce stomatologicznej nastąpił znaczący postęp, będący wynikiem wprowadzenia na rynek nowego typu litych ceramik tlenkowych obrabialnych numerycznie. Ze względu na bardzo dobre właściwości mechaniczne oraz naturalną białą barwę, w chwili obecnej najchętniej stosowany jest tlenek cyrkonu domieszkowany tlenkiem itru. Z ZrO_2 wykonuje się cały zakres protez stałych, od pojedynczych koron po wszczepy śródkostne. Pomimo swoich doskonałych walorów eksploatacyjnych tlenek cyrkonu jest materiałem kontrowersyjnym. Istnieje bowiem jeszcze kilka dyskusyjnych kwestii dotyczących stabilności i starzenia materiału w środowisku jamy ustnej oraz wykonawstwa laboratoryjnego, których rozwiązanie z pewnością przyczyni się do poprawy materiału, od którego zależy przyszłość protetyki stomatologicznej.

Streszczenie

Wzrost zainteresowania kwestią poprawy wyglądu zewnętrznego i samopoczucia pacjentów leczonych protetycznie przez badaczy zajmujących się protetyką stomatologiczną zaowocował wprowadzeniem uzupełnień pełnoceramicznych mocowanych na

zębach własnych, jak i na wszczepach. Zastosowanie ceramiek tlenkowych, tj. Al_2O_3 , MgO , a zwłaszcza ZrO_2 domieszkowanego Y_2O_3 , umożliwiło otrzymanie protez o bardzo dobrych właściwościach mechanicznych oraz lepszych walorach estetycznych niż protezy metalowo-ceramiczne. Ważnym czynnikiem, który przyczynił się do popularyzacji protez pełnoceramicznych oraz implantoprotetyki, jest rozwój i dostępność obrabiarek numerycznych pracujących w technologii CAD/CAM oraz skanerów trójwymiarowych, dzięki którym można precyzyjnie odwzorować warunki anatomiczne panujące w jamie ustnej pacjenta oraz wykonać funkcjonalne uzupełnienia protetyczne.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat najpopularniejszego materiału stosowanego do wykonywania protez stałych – ZrO_2 . Przegląd literatury został przeprowadzony w oparciu o publikacje zamieszczone w czasopismach zajmujących się szeroko pojętą inżynierią materiałową, jak i badaniami klinicznymi oraz aspektami praktycznymi protetyki stomatologicznej.

Na podstawie analizy dostępnych danych teoretycznych i doświadczalnych stwierdzono, że tlenek cyrkonu jest materiałem, z którego można wykonać protezy stałe o bardzo dobrych właściwościach eksploatacyjnych i pożądanym efekcie estetycznym. Jednakże istnieją przesłanki i dane doświadczalne, na podstawie których można wnioskować, że stabilność ZrO_2 eksploatowanego w środowisku płynów ustrojowych jest niewystarczająca. Zjawiska zachodzące w jamie ustnej wiążą się z tzw. degradacją niskotemperaturową oraz utwardzeniem przeobrażeniowym ZrO_2 , które mogą zostać zainicjowane przez niewłaściwe postępowanie laboratoryjne, oddziaływanie z wilgocią oraz siły wywierane w trakcie żucia. W skrajnym przypadku zachodzące procesy mogą przyczynić się do uszkodzenia uzupełnień oraz konieczności ich wymiany, która wiąże się z dość znacznymi kosztami ekonomicznymi. Niemniej wykorzystanie tlenku cyrkonu w protetyce stomatologicznej wydaje się pomysłem perspektywicznym, który po wyeliminowaniu wspomnianych niedogodności przyniesie pacjentom korzyści pod postacią trwałych i estetycznych uzupełnień braków zębowych.

Literatura

- [1] Atkins P. W., *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 2003.
- [2] Baszkiewicz J., Kamiński M., *Korozja materiałów*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2006.
- [3] Bhaduri S. B., Bhaduri S., *Biomaterials for dental applications [w:] Biomedical Materials*, red. Natayan R., Springer, Berlin 2009, s. 295–324.
- [4] Borcher L., Stiesch M., Bach F. W., Buhl J. Ch., Hübsch Ch., Kellner T., Kohorst P., Jendras M., *Influence of hydrothermal and mechanical conditions on the strength of zirconia*, *Acta Biomaterialia* 6, s. 4547–4552, 2010.
- [5] Chevelier J., *What future for zirconia as a biomaterial?*, *Biomaterials* 27, s. 535–543, 2006.
- [6] Chevalier J., Gremillard L., Virkar A. V., Clarke D. R., *The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends*, *Journal of American Ceramic Society* 92, s. 1901–1920, 2009.
- [7] Fujimoto J., Land M. F., Rosentiel S. R., *Współczesne protezy stałe*, Czelej, Lublin 2002.

- [8] Hannink R. Kelly P. M., Muddle B. C., *Transformation Toughening in Zirconia-Containing Ceramics*, Journal of American Ceramic Society 83, s. 461–487, 2000.
- [9] Hiserbergues M., Vandeville S., Vandeville P., *Zirconia: Established facts and prospectives for a biomaterial in dental implantology*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 88B, s. 519–529, 2009.
- [10] Hohman W., *Korony – kompendium techniki dentystycznej*, Quintessence, Warszawa 1998.
- [11] Hohman W., *Mosty – kompendium techniki dentystycznej*, Quintessence, Warszawa 1998.
- [12] Katalog firmowy – Vita Zahnfabrik-VITA In-Ceram.
- [13] Kelly R. J., Denry I., *Stabilized zirconia as a structural ceramic: An overview*, Dental Materials 24, s. 289–298, 2008.
- [14] Kelly R. J., Denry I., *State of art of zirconia for dental applications*, Dental Materials 24, s. 299–307, 2008.
- [15] Kitagawa T., Tanimoto Y., Odaki M., Nemoto K., Aido M., *Influence of Implant/Abutment Joint Design on Abutment Screws Loosening in a Dental Implant System*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 75B (2), s. 457–463, 2005.
- [16] Praca zbiorowa pod red. Koecka B., *Protetyka stomatologiczna – korony i mosty*, U&P, Wrocław 2000.
- [17] Lawson S., *Environmental degradation of zirconia ceramics* Journal of European Ceramic Society 15, s. 485–502, 1995.
- [18] Lebrun N., Perrot P., *Cerium-Oxygen-Zirconium*, The Landolt-Börnstein – Group IV Physical Chemistry Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology 11 (E3), s. 87–109, 2010.
- [19] Lughi V., Sergio V., *Low temperature degradation – aging – of zirconia: A crucial review of the relevant aspect in dentistry*, Dental Materials 26, s. 807–820, 2010.
- [20] Majewski S.W., *Gnatofizjologia stomatologiczna*, PZWL, Warszawa 2007.
- [21] Majewski S. W., *Rekonstrukcja zębów uzupełnieniami stałymi*, WFRP, Kraków 2005.
- [22] Miyazaki T., Hotta Y., *CAD/CAM systems available for the fabrication of crown and bridge restorations*, Australian Dental Journal 56, s. 97–106, 2011.
- [23] Möllers K., Parkot D., Kirsten A., Güth J. F., Edelhoff D., Fischer H., *Influence of tooth mobility on critical stresses in all-ceramic inlay-retained fixed dental prostheses: A finite element study*, Dental Materials 28, s. 146–151, 2012.
- [24] Nelson R. F. A., Sailer I., Zhang Y., Coelho P. G., Guess P. C., Zembic A., Kohal R. J., *Performance of Zirconia for Dental Healthcare*, Materials 2, s. 863–896, 2010.
- [25] Paspaspyridakos P., Kunal L., *Immediate loading of the Maxilla with Prefabricated Interim Prosthesis Using Interactive Planning Software, and CAD/CA, Rehabilitation with Definitive Zirconia Prosthesis: 2-Year Clinical Follow-up*, Journal of Esthetic and Restorative Dentistry 22, s. 223–234, 2010.
- [26] Piconi C., Maccauro G., *Zirconia as a ceramic biomaterial*, Biomaterials 20, s. 1–25, 1999.
- [27] Rahbar N., Soboyejo W. O., *Design of functionally graded dental multilayers*, Fatigue & Fracture Engineering Materials & Structures 34, s. 887–897, 2011.
- [28] Spiechowicz E., *Protetyka stomatologiczna*, PZWL, Warszawa 2010.
- [29] Praca zbiorowa pod red. Stauba F., *Metaloznawstwo*, Śląsk, Katowice 1979.

- [30] Swain W., Thompson M. C., Thompson K. M., *The all-ceramic, inlay supported fixed partial denture. Part 1. Ceramic inlay preparation design: a literature overview*, Australian Dental Journal 55, s. 120–127, 2010.
- [31] Tara W. A., Eschbach S., Wolfart A., Kern M., *Zirconia ceramic inlay-retained fixed dental prostheses-first clinical results with a new design*, Journal of Dentistry 39, s. 208–211, 2011.
- [32] Zarone F., Russo S., Sorrentiono R., *From porcelain-fused-to-metal – to zirconia: Clinical and experimental considerations*, Dental Materials 27,s. 83–96, 2011.
- [33] Strona internetowa: www.bruzzir.com, data ostatniej wizyty 22.02.2013.

Zaawansowane metody prowadzenia hodowli *Clostridium difficile* i izolacji toksyn w badaniach nad poantybiotycznym rzekomobłoniastym zapaleniem jelita grubego

Sylwia Wałęsa*

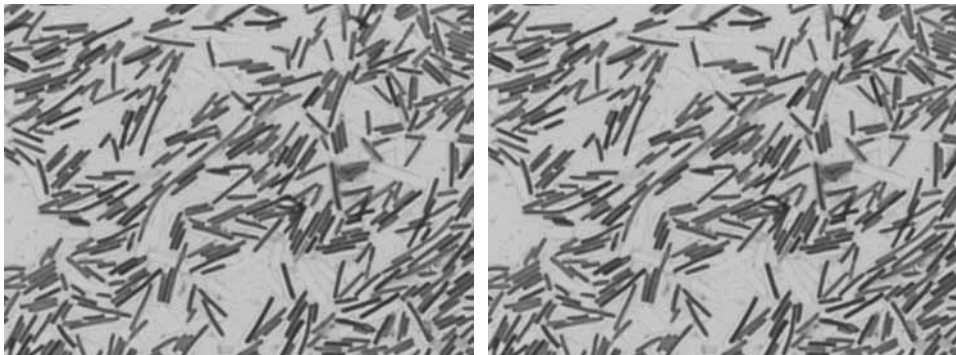
Summary

This paper presents a methodology for culturing *Clostridium difficile* (further: *C. difficile*) and isolation of bacterial toxins in the study of pseudomembranous colitis (PMC). The object of this study was to develop optimal conditions for the batch culture of *C. difficile* in a technologically advanced BIOFLO 415* bioreactor (New Brunswick Scientific) to find new diagnostic and therapeutic methods.

Keywords: bioreactor, toxin, *Clostridium difficile*, culture, pseudomembranous colitis

Wprowadzenie

Takie czynniki jak przedłużające się terapie antybiotykowe skutkujące zubożeniem naturalnej flory jelita czy braki w higienie szpitalnej niosą ze sobą ryzyko infekcji *C. difficile* (Rys. 1).



Rys. 1. Preparat *C. difficile* – barwienie Grama i proste

* Biotechnologia farmaceutyczna, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska.

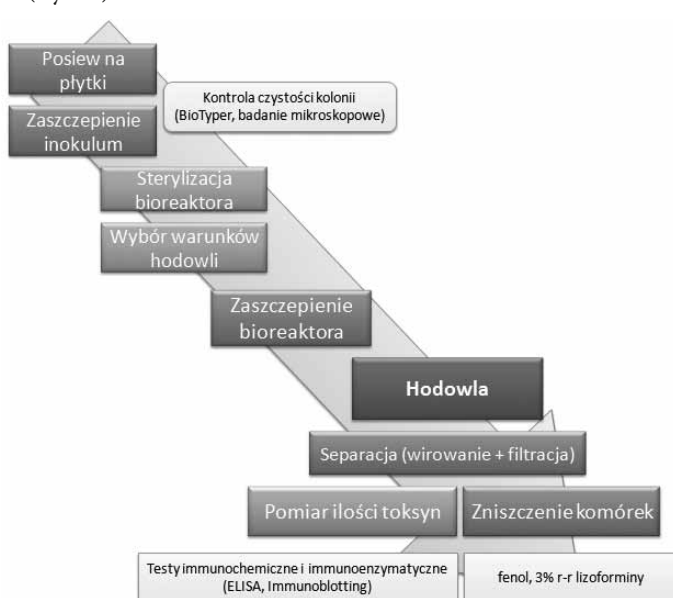
Bakteria ta jest odpowiedzialna za poantybiotykowe rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego. Choroba występuje najczęściej u pacjentów długotrwanie leczonych antybiotykami takimi jak cefalosporyny, ampicylina czy klindamycyna. *C. difficile* występuje naturalnie u około 5% dorosłych ludzi i u około 50% niemowląt, natomiast wśród chorych długotrwanie hospitalizowanych obserwuje się 10–30% odsetek nosicieli. *C. difficile* charakteryzuje się produkcją dwóch toksyn: A i B, odpowiedzialnych za zespół chorobowy. Pierwsza z nich charakteryzuje się chemotaktycznym działaniem wobec neutrofilii, co przejawia się naciekaniami ściany jelita krętego przez leukocyty oraz uwalnianiem cytokin prowadzących do wodnisto krwawej biegunki i krwotocznej martwicy. Cytotoksyna B odpowiedzialna jest za martwicę komórek nabłonka jelit, zapalny wysięk, a w efekcie powstawanie błon rzekomych [5].

Przedmiotem niniejszych badań było opracowanie optymalnych warunków okresowej hodowli *C. difficile* w zaawansowanym technologicznie bioreaktorze BIOFLO 415® (New Brunswick Scientific) w celu wydajnej produkcji i izolacji toksyn.

Mikroorganizm, dla którego prowadzono procedury hodowli, stanowił toksynotwórczy szczep *C. difficile* 1296T pochodzący z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Tkankowych (DSMZ). Badania prowadzone były w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek (Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu).

Schemat postępowania

Każdą z poszczególnych hodowli *C. difficile* prowadzono według ustalonego schematu postępowania (Rys. 2).



Rys. 2. Schemat postępowania w trakcie hodowli *C. difficile*

Hodowla *C. difficile*

Hodowlę *C. difficile* prowadzono w skali docelowej w fermentorze BIOFLO 415° o pojemności 14,0 litrów (Rys. 3).

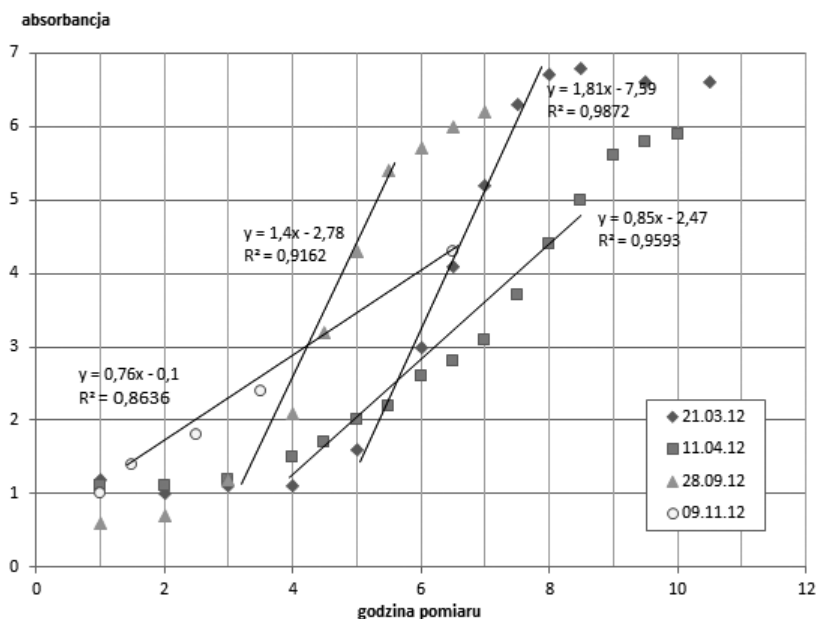
Zastosowanie w hodowli zaawansowanego technologicznie bioreaktora, pozwoliło na monitoring istotnych dla hodowli *C. difficile* warunków, takich jak rozpuszczony w medium hodowlanym tlen (elektroda DO), kwasowość (elektroda pH), skład mieszaniny gazów (azotu i dwutlenku węgla) oraz ich natężenie przepływu, temperatura hodowli i liczba obrotów mieszadła w czasie. Krytyczny spadek lub wzrost któregoś z zadanych parametrów (pH, DO) kontrolowano za pomocą systemu kaskad.



Rys. 3. Bioreaktor BIOFLO 415°

Krzywe wzrostu hodowli

Z przeprowadzonych hodowli kreślono krzywe wzrostu w oparciu o zmiany absorbancji przy długości fali światła 550 nm [3] regularnie pobieranych próbek hodowli (Rys. 4).



Rys. 4. Krzywe wzrostu hodowli *C. difficile* – zmiana absorbancji próbki w funkcji czasu

Poszczególne hodowle różniły się takimi parametrami jak skład procentowy mieszaniny gazów (azot i dwutlenek węgla), wielkość przepływu mieszaniny gazów oraz prędkość mieszania hodowli (Tab. 1).

Tabela 1. Zmienne parametry hodowli *C. difficile*

Data prowadzenia hodowli / mierzony parametr	21.03.12	11.04.12	28.09.12	08–09.11.12
azot [%]	100	100	95	80
dwutlenek węgla [%]	0	0	5	20
przepływ gazu [l/min]	1	3	1–5*	0–1**
mieszanie [obr/min]	60	60	100	60

* – zwiększony przepływ gazu zastosowano w celu szybkiego usunięcia pozostałości powietrza po chwilowym otwarciu fermentora, ** – próba hodowli bez dopływu gazu, po etapie wstępnego wysycania mieszaniną gazów (przez pierwsze 3 godziny).

Za odstępy czasowe poboru próbek przyjęto: 1 godzinę (w fazie początkowej oraz wówczas gdy nie obserwowano wzrostu) oraz 30 minut (w fazie logarytmicznej i na początku fazy plateau). Pobrane próbki posłużą docelowo do pomiaru stężenia produktu – toksyny A i B (największa produkcja toksyn przypada na początek fazy plateau [2]). Pierwszą próbkę do pomiaru absorbancji pobierano po 30 minutach od zaszczepienia bioreaktora (po wymieszaniu inokulumu z medium hodowlanym). Z wykreślonych na podstawie zmian absorbancji próbek w czasie krzywych hodowli wybrano punkty odpowiadające logarytmicznemu charakterowi wzrostu bakterii.

Poszczególne hodowle *C. difficile* charakteryzowały się bardzo zróżnicowanym tempem i dynamiką wzrostu (Rys. 4). Pożądane jest, aby bakterie w jak najkrótszym czasie osiągały koniec fazy logarytmicznego wzrostu, gdyż największa produkcja toksyn zachodzi na początku fazy plateau [5]. Taki charakter zmian prezentuje hodowla z dn. 21.03.12. Faza logarytmicznego wzrostu biegnie długo, a w czasie jej trwania hodowla osiąga mniejszy przyrost biomasy (a zatem mniejsza jest produkcja toksyn) niż w pozostałych przypadkach. Najmniej korzystny przebieg ma krzywa przedstawiająca fragment logarytmicznej fazy wzrostu z dn. 08–09.11.12. Hodowla ta przeprowadzona została bez udziału penicyliny. Początkowo nie obserwowano wzrostu bakterii, jednak nastąpił on później niż zwykle (hodowlę nastawiono dn. 08.11.12, widoczne zmiany absorbancji zaobserwowano 09.11.12). *C. difficile* potrzebowały więcej czasu na przejście z fazy stacjonarnej do fazy wzrostu logarytmicznego, gdyż zostały one zmyte z płytek Petriego buforem PBS i w tak powstałym środowisku pozostawione były w próbówce typu Falcon do inokulacji bioreaktora. Zabieg ten skutkowało powstaniem ubogiego w składniki odżywcze otoczenia dla bakterii i wydłużył ich czas przystosowania do nowego środowiska.

Podsumowanie

Korelacja warunków hodowli z poziomem wytwarzanych toksyn i ich efektywna izolacja pozwolą w przyszłości na opracowanie nowych metod identyfikacji chorobotwórczego drobnoustroju w badanym materiale i prowadzenie skuteczniejszych terapii. Spośród dużej oferty płynnych podłoży, do prowadzenia hodowli *C. difficile* wybrano bulion mózgowo-sercowy (brain-heart infusion, BHI). Jest to podłoże do hodowli i namnażania drobnoustrojów (w tym chorobotwórczych) o wysokich wymaganiach pokarmowych. Wybór warunków fizykochemicznych miał miejsce każdorazowo przez prowadzeniem hodowli *C. difficile*. Zabieg ten miał na celu zróżnicowanie warunków i dobór takich, które zapewniają możliwie najwyższy wzrost (namnożenie) bakterii w najkrótszym czasie. Wyższe stężenie komórek, przejawiające się większą gęstością optyczną prób, oznacza większą produkcję toksyn. Istotny jest również taki dobór parametrów hodowli, który skutkuje jak najszybszym przejściem drobnoustrojów w koniec fazy logarytmicznego powielania i początek fazy stacjonarnej. W tym okresie produkcja toksyn przez *C. difficile* jest największa. Najbardziej pożądanym charakterem ma krzywa wzrostu hodowli *C. difficile* z dn. 21.03.12, w której atmosferę stanowił czysty azot. Niewiele gorszy przebieg ma krzywa wzrostu hodowli z dn. 28.09.12 (95% azotu i 5% dwutlenku węgla). Z przeprowadzonych badań wynika zatem, że optymalną atmosferą dla hodowli *C. difficile* jest atmosfera azotu, z ewentualnym 5% dodatkiem dwutlenku węgla. Wobec zebranych danych pomiarowych, hodowlę prowadzoną w opisanych warunkach można przerwać i izolować toksyny już po upływie 24 godzin, wkrótce po wejściu bakterii w fazę zamierania i po upewnieniu się o braku wzrostu absorbancji. Należy zaznaczyć, że czas ten zależy od ogromnej mierze od stosowanego medium hodowlanego i warunków [1, 4, 6]. Dane literaturowe wskazują, że korzystnym dla wzrostu bakterii jest dodatek wodoru w atmosferze hodowlanej [4], jednak ze względów bezpieczeństwa nie wykorzystywanego tego gazu w badaniach.

Streszczenie

Praca przedstawia metodologię prowadzenia okresowej hodowli *Clostridium difficile* (dalej: *C. difficile*) oraz izolacji toksyn bakteryjnych w badaniach nad poantybiotycznym rzekomoblioniastym zapaleniem jelita grubego. Przedmiotem niniejszych badań było opracowanie optymalnych warunków hodowli *C. difficile* w zaawansowanym technologicznie bioreaktorze BIOFLO 415® (New Brunswick Scientific) w celu wydajnej izolacji toksyn. Zastosowano również szeroki zakres technik towarzyszących – od klasycznych technik mikrobiologicznych po nowoczesne techniki instrumentalne (MALDI-TOF/TOF BioTyper®) wykorzystywane przez najnowocześniejsze laboratoria diagnostyczne. Mikroorganizm, dla którego prowadzono procedury hodowli, stanowił toksynotwórczy szczep *C. difficile* 1296T pochodzący z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Tkanekowych (DSMZ). Korelacja warunków hodowli z poziomem wytwarzanych toksyn i ich efektywna izolacja pozwolą w przyszłości na opracowanie nowych metod ich identyfikacji w badanym materiale i prowadzenie skuteczniejszych terapii. Badania prowadzone były w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek (Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu).

Literatura

- [1] Drummond L.J., Smith D.G.E., Poxton I.R., *Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by Clostridium difficile*. J Med Microbiol, 2003, 52, s. 1033–1038.
- [2] Fang A., Gerson D.F., Demain A.L., *Production of Clostridium difficile toxin in a medium totally free of both animal and dairy proteins or digests. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Waszyngton 2009, 106(32), s. 13225–13229.
- [3] Onderdonk A.B., Lowe B.R., Bartlett J.G., *Effect of Environmental Stress on Clostridium difficile Toxin Levels During Continuous Cultivation*. Appl Environ Microbiol, 1979.
- [4] Haslam S.C., Ketley J.M., Mitchell T.J., Stephen J., Burdon D.W., Candy D.C.A., *Growth of Clostridium difficile and production of toxins A and B in complex and defined media*. J Med Microbiol, 1986, 21, s. 293–297.
- [5] Szewczyk E.M., *Diagnostyka bakteriologiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009, s. 162–164.
- [6] Voth D.E., Ballard J.D. *Clostridium difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease*. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2), s. 247–263.

Naturalne i syntetyczne inhibitory metylotransferaz DNA (DNMTi) i deacetylaz histonów (HDACi) w walce z nowotworami

Bartosz Woźniak*, Paulina Jarosz*

Abstract

Tumor cell biology is still not completely understood science. The processes associated with neoplastic processes are slowly discovered and the relationships between the different events occurring in the cancer cells are stacked together. Epigenetic changes play a key role in these processes. Subtle changes in silencing or stimulating of genes expression are closely associated with them. The researchers and the doctors began to use anti-cancer prevention, focus just on cancer epigenetics. Synthetic inhibitors of DNMTs and HDACs are still discovered and delivered to patients. This methods are used parallel with chemo-and radiotherapy. Interestingly, in our nature environment we can find natural inhibitors that may be a part of our daily diet. The aim of this publication is to present basic epigenetic mechanisms that are disrupted in cancers and to present synthetic and natural „brakes” of these processes.

Keywords: cancer, epigenetics, polyphenols, carcinogenesis

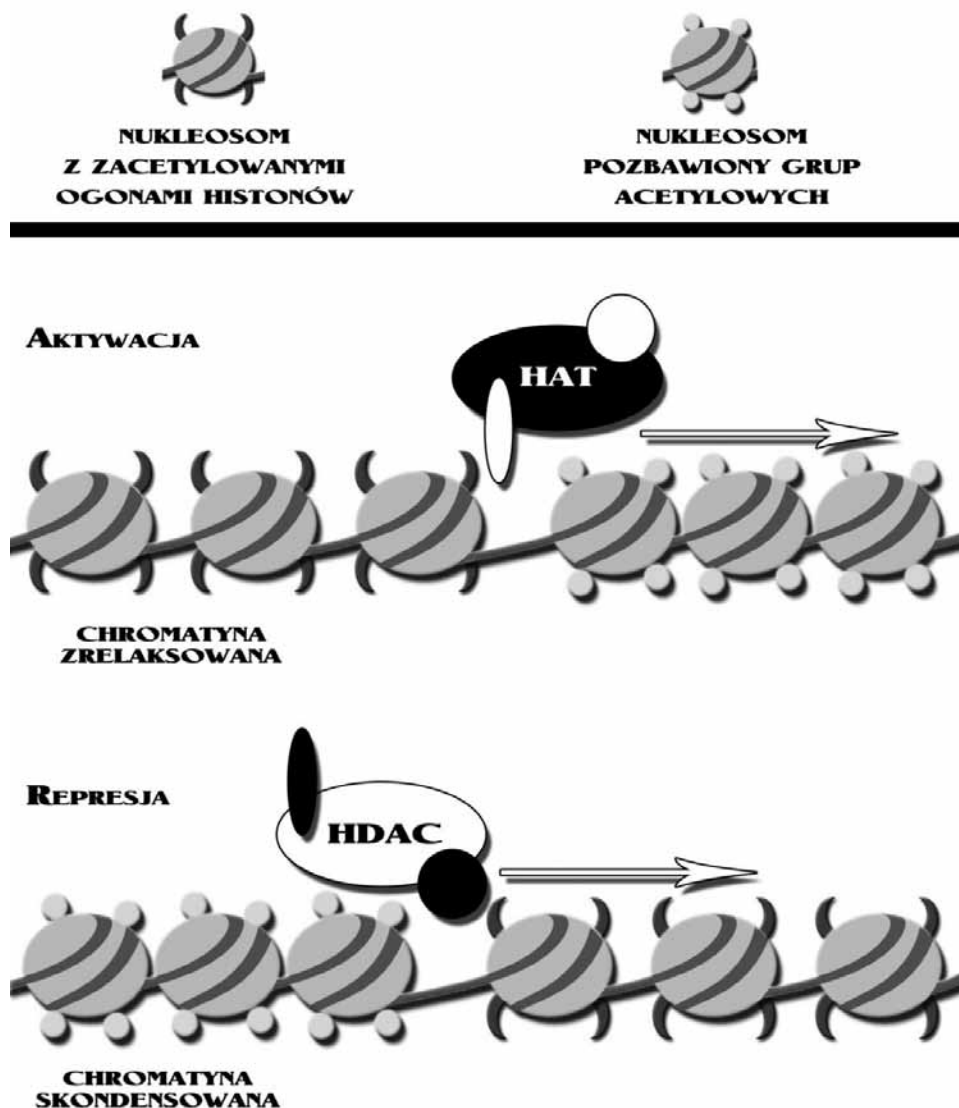
Wprowadzenie

Epigenetyka jest badaniem dziedziczności pozagenowej regulacji ekspresji genów, która nie powoduje zmian w sekwencji DNA., a także nie wpływa na modyfikację sekwencji białek z nim związanych. Najlepiej poznanymi zmianami epigenetycznymi są przede wszystkim metylacja DNA występująca głównie w dinukleotydach wysp CpG., a także acetylacja i deacetylacja histonów. Zaburzenia w regulacji tych kluczowych procesów mogą prowadzić do rozwoju nowotworów [1–2].

U ludzi większą część genomu stanowią zmetylowane sekwencje niekodującego DNA., zabezpieczone tym samym przed transkrypcją sekwencji powtórzonych. Metylacja DNA jest katalizowana przez enzymy z rodziny metylotransferaz DNA (ang. *DNA methyltransferases* – DNMTs). U ssaków zidentyfikowano trzy rodzaje tego enzymu: DNMT1, DNMT3a oraz DNMT3b. Pierwszy z nich odpowiedzialny jest za proces poreplikacyjnej metylacji zachowawczej, pozostałe inicjują tak zwaną metylację *de novo* [3–4]. Wyciszenie genów poprzez metylację DNA może odbywać się na kilka sposobów. Po pierwsze metylacja może bezpośrednio utrudniać dostęp czynników aktywujących transkrypcję do rejonów promotorowych genów. Innym mechanizmem jest rekrutacja kilku domen białkowych z rodziny MBDs (ang. *methyl-binding domain proteins*), wiążących się do grup metylo- wych, a tym samym wyciszających geny podlegające transkrypcji lub przyłączających

* Koło Naukowe Biotechnologii Bio-Tech, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów, Polska.

się do kompleksów regulatorowych transkrypcji, wywołując podobny efekt [5]. Utrata kontroli nad wyciszeniem niektórych genów odpowiedzialnych za różne procesy, takie jak apoptoza, regulacja cyklu komórkowego czy wszelkiego rodzaju naprawy DNA., może doprowadzić do rozpoczęcia procesów nowotworowych [6–8].



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie aktywacji i represji transkrypcji w chromatinie przy pomocy enzymów HAT i HDAC. Opracowanie własne [za:] Hess-Stumpp (2005) [31]

Chromatyna zbudowana jest z DNA., białek histonowych i niehistonowych. Helisa DNA owinięta jest na rdzeniu histonów H2A., H2B., H3 i H4 (po dwa na każdy rdzeń) ułożonych w oktamer histonowy, razem tworzących nukleosom. N-końcowe ogony histonów wystają poza nukleosom i podlegają różnorodnym modyfikacjom takim jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, glikozylacja, biotynylacja czy karbonylacja [9–11]. Najlepiej poznanymi modyfikacjami histonów są ich acetylacja i proces odwrotny – deacetylacja, kontrolowane przez dwa enzymy – acetylotransferazę histonów (ang. *histone acetyltransferases* – HATs) i deacetylazę histonów (ang. *histone deacetylases* – HDACs) (rys. 1). HDACs usuwa grupy acetylowe z histonów poprzez mechanizm w którym biorą udział dwie sąsiadujące reszty histydyny, dwie reszty asparaginianowe i jedna reszta tyrozyny. Do prawidłowej działania tego mechanizmu ważny jest także udział jonów cynku [12]. Deacetylazy histonów można podzielić na trzy główne klasy. Klasa pierwsza (należą tu HDAC1–3 oraz 8) i druga (HDAC 4–7, 9 i 10) to deacetylazy zależne od jonów cynku. Trzecia grupa deacetylaz jest zależna od NAD⁺ [7; 12]. Do tej grupy zaliczają się białka z rodziny Sir2 (ang. *Silent Information Regulator 2*) (homolog u ssaków SIRT1) – sirtuiny, które mają zdolność deacetylacji histonów, jak i posiadają aktywność monorybozylotransferaz [13–15]. Ciekawym jest fakt, że mogą one regulować tworzenie kluczowych w cyklu komórkowym białek np. białka z rodziny p53 [16–17].

Zmiany epigenetyczne w procesach nowotworowych

Jak wskazuje wiele badań kluczową rolę w procesach nowotworowych stanowią zmiany epigenetyczne. Charakterystyczny obraz tych zmian to globalna hipometylacja DNA z jednoczesną hipermetylacją wysp CpG., a także zredukowana liczba modyfikacji histonów, a konkretnie utrata monoacetylacji lizyny-16 i trimetylacja lizyny-20 histonu H4 [18–21]. Te drastyczne zmiany w genomie prowadzą do aktywacji onkogenów, przyczyniają się do utraty piętna genomowego, zaburzają prawidłową inaktywację chromosomu X oraz zwiększają szansę na różnego rodzaju aberracje chromosomowe wskutek hipometylacji struktur chromosomowych np. telomerów [22–23]. Wyciszenie swoistych genów supresorowych, swego rodzaju „hamulców karcynogenezy”, jest ściśle skorelowane z powstawaniem mutacji podczas progresji nowotworów. Dla przykładu niektóre z genów naprawczych wyciszone przez metylację prowadzą do podwyższenia częstości występowania mutacji oraz zwiększenia ryzyka pęknięć niestabilnej chromatyny (tab. 1) [24–25]. Ponieważ zaburzenia w metylacji DNA odgrywają kluczową rolę w nowotworzeniu naukowcy wciąż badają nowe profile metylacji genów supresorowych przy pomocy technik biologii molekularnej, używając jako markera zmetylowanych wysp CpG [26–27]. Wczesne wykrycie nieprawidłowości zwiększa skuteczność terapii.

Tabela 1. Przykłady genów wyciszanych przez metylację DNA

Nazwa genu	Funkcja
P16CDKN2A	Inhibicja kinaz cyklozależnych indukujących zatrzymanie cyklu komórkowego
RASSF1A	Regulacja szlaku Ras
Kaspaza-8	Inicjacja apoptozy
P14ARF	Udział w proapoptozie
Rb	Gen supresorowy
Trombospondyna-1	Inhibicja angiogenezy
BRCA1	Naprawa uszkodzeń DNA

[za:] Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003;22:6479–83.

Jak wspomniano, zaburzenia w modyfikacji histonów można również powiązać z procesami nowotworzenia. Globalna deacetylacja histonu H4 za pośrednictwem HDACs powoduje represję ważnych dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego genów. Podwyższona ekspresja HDACs jest często wykrywana w różnych typach nowotworów. Podobnie enzymy HATs, które ściśle współpracują z HDACs utrzymując prawidłową acetylację histonów mogą przyczyniać się do rozwoju raka [28–29]. Przykładem zaburzenia związanego z nieprawidłową regulacją modyfikacji histonów może być Zespół Rubinsteina-Taybiego, w którym mutacja w jednym z alleli genu *CBP* (najczęściej mikrodelecja 16p) prowadzi do inaktywacji HATs [30]. Innym przykładem są translokacje często występujące w nowotworach. Gen fuzyjny po translokacji obejmującej gen *CBP* i *p300* jest często wykrywany w nowotworach układu krwiotwórczego w tym białaczek [31].

Syntetyczne inhibitory DNMTs i HDAC

Zmiany epigenetyczne nie wpływają na zmianę sekwencji DNA i są, w przeciwieństwie do modyfikacji genetycznych, odwracalne, co może niewątpliwie być drogą do obmyślenia strategii terapeutycznych w leczeniu raka [32]. Inhibitory DNMT i HDAC mogą wzbudzać transkrypcję wyciszonych w komórkach nowotworowych genów supresorowych, co z kolei przyczynia się do zahamowania ich niekontrolowanego wzrostu. W przeprowadzonych badaniach komórek nowotworowych wykazano podwyższoną ekspresję zarówno genów DNMT1, 3a i 3b, jak i HDAC1, 2, 5, 7 i 8 w porównaniu z normalną zdrową tkanką. Te epigenetyczne zmiany są doskonałym celem do odkrywania leków antynowotworowych [33]. Obecnie prowadzone są liczne badania przedkliniczne i kliniczne potencjalnych leków przeciwnowotworowych, jednakże tylko cztery zostały do tej pory zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration* – FDA). Są nimi: inhibitory DNMT (ang. *DNA methyltransferases inhibitors* – DNMTIs) 5-azacytydina (Vidaza®); 5-aza-2'-deoksytydina (Decitabine®) oraz inhibitory HDAC inhibitors (ang. *histone deacetylases inhibitors* – HDACIs) suberoiloanilid kwasu hydroksamowego (SAHA; vorinostat; Zolinza®) i romidepsyna (depsipeptide; Istodax®)

[33–35]. Inhibitory DNMTs mają za zadanie przywrócić do odpowiedniego stanu nieprawidłowo hipermetylowane geny. Wśród nich znajdują się m.in. geny p53, RIZ1 oraz geny kodujące S-transferazę glutationową π . Wykazano, że inhibicja przy udziale inhibitorów DNMT genów odpowiedzialnych za kodowanie cząsteczek immunologicznych, jak np. cząsteczki HLA klasy I (ang. *human leukocyte antigen*), prowadzi do regresji nowotworu [36]. Ponadto inhibitory DNMTs mają możliwość przenikania przez barierę krew-mózg, co z kolei jest znakomitą drogą do zwalczania guzów mózgu [37].

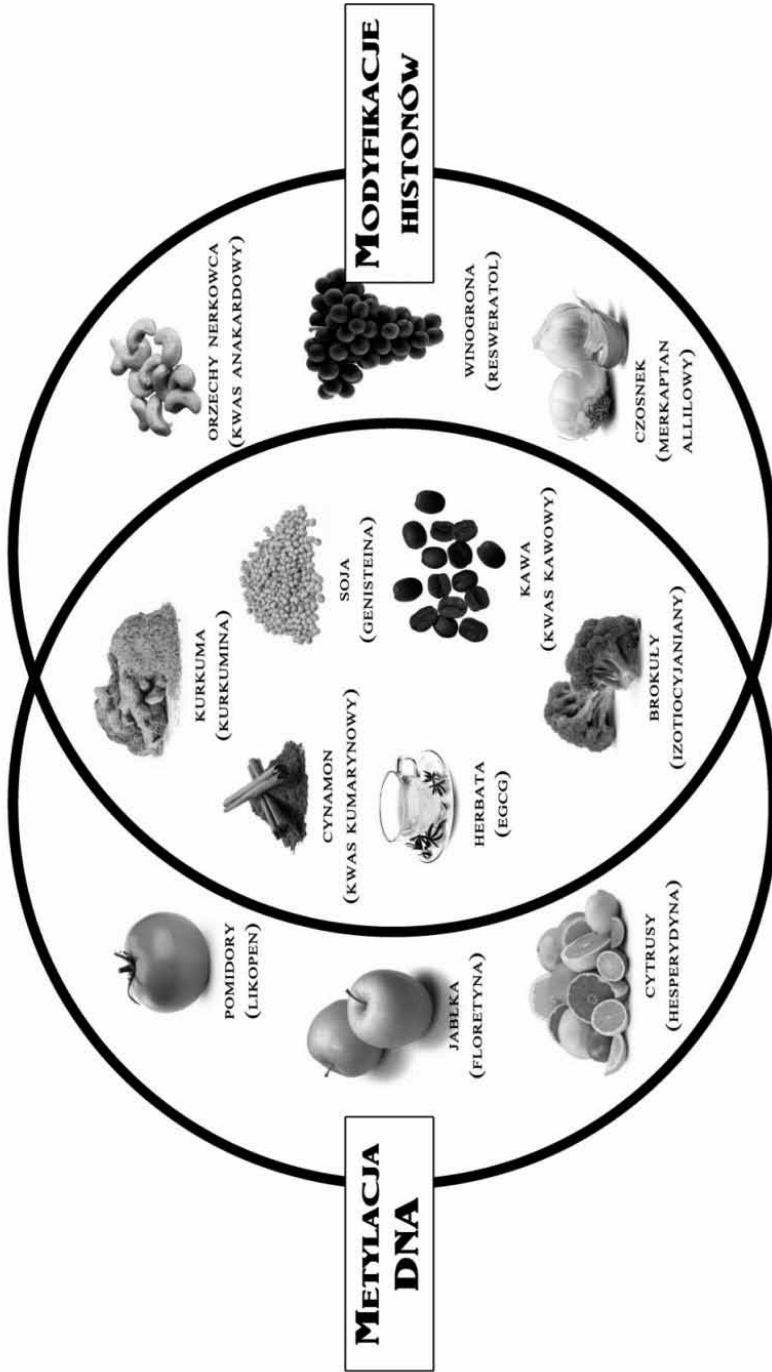
Polifenole jako naturalne inhibitory metylotransferaz i acetylaz histonów

Terapia antynowotworowa w znacznym stopniu zmieniła swoje oblicze na przełomie ostatnich lat. Stan wiedzy na temat leczenia nowotworów na dzień dzisiejszy jest dość zaawansowany. W leczeniu towarzyszą nam najstarsze a zarazem najskuteczniejsze metody takie jak chemoterapia czy naświetlanie. Jednakże zaczęto skupiać się nie tylko na leczeniu, ale przede wszystkim na zapobieganiu nowotworzeniu, a dokładniej chemoprewencji nowotworów [38].

Jednymi z naturalnych związków chemoprewencyjnych są niewątpliwie te występujące w roślinach będących zarazem składnikami naszej diety. Polifenole, bo o nich mowa, to jak się okazuje nie tylko substancje chroniące rośliny przed stresem oksydacyjnym, ale także takie które mogą hamować niekorzystne działanie metylotransferaz i acetylaz histonów [39–40]. Posiadają szerokie spektrum działania zapobiegając powstawaniu różnego typu nowotworów [38; 41]. Polifenole znaleźć można w wielu warzywach i owocach (rys. 2). Jednymi z najlepiej poznanych i obiecujących są m.in. polifenole zawarte w winogronach, jagodach, zielonej herbacie czy curry [42].

Do jednego z najważniejszych polifenoli mających wpływ na metylację DNA można zaliczyć związek galusan epigallokatechiny (ang. *epigallocatechin gallate* – EGCG), należący do grupy katechin, znajdujący się w znacznych ilościach (1/3 suchej masy) w zielonej herbacie. Stwierdzono, że może bezpośrednio mieć on wpływ na inhibicję DNMTs. Co ciekawe EGCG ma również właściwości pozwalające na modyfikację histonów, a dokładnie ma możliwość inhibować HDACs [43]. Innym związkiem jest flawonoid genisteina zawarta w ziarnach soi. Posiada on właściwości cytostatyczne. Może prowadzić komórki na szlak apoptozy przez inhibicję niektórych enzymów takich jak kinazy tyrozynowe. Genisteina ma także możliwość inhibicji DNMTs [44]. Kolejnymi związkami mającymi zdolność do inhibicji DNMTs są: likopen występujący w pomidorach, arbuzech czy grejpfrutach, polifenole zawarte w kawie, sulforafan zawarty w brokułach, izotiocyjaniany, kwas rozmarynowy, kurkumina, a także resweratrol występujący w winogronach. Niektóre z tych związków mają również właściwości inhibitora HDACs [38]. Dodatkowo tą właściwość wykryto w związkach allilu, obficie występujących w czosnku [45–46].

W niektórych doniesieniach można również znaleźć informację o niepożądanych właściwościach tych związków. Działanie cytostatyczne oraz idące w parze cytotoksyczne może wpływać na zdrowe komórki i zaburzać ich funkcje. Przykładem mogą być flawonoidy, które dostarczane w okresie ciąży do organizmu (np. przez nadmierne spożywanie czerwonego wina), skutkują podwyższeniem ich stężenia, co z kolei może prowadzić do występowania u niemowląt ostrych białaczek szpikowych [47].



Rys. 2. Schemat przedstawiający rośliny mające ogromne znaczenie w epigenetyce. Opracowanie własne [za:] Link i wsp. (2010) [38]

Podsumowanie

W wielu badaniach naukowych stwierdzono, że zarówno naturalne jak i syntetyczne inhibitory HDACs i DNMTs mają korzystny wpływ na wiele problemów zdrowotnych, w tym raka. Potencjał tych pierwszych jest niewątpliwie fenomenem w leczeniu, a przede wszystkim w zapobieganiu przed nowotworzeniem. Dostęp do naturalnych środków – potencjalnych inhibitorów procesów nowotworzenia – jest tak prosty, że każdy może na własną rękę wspomagać leczenie bądź zapobiegać tym procesom.

Streszczenie

Biologia komórki nowotworowej to niewątpliwie wciąż nie dość poznana dziedzina nauki. Procesy towarzyszące procesom nowotworzenia są powoli odkrywane, a zależności między poszczególnymi zjawiskami zachodzącymi w komórkach nowotworowych są stopniowo układane w jedną całość. Jak się okazuje zmiany epigenetyczne mają kluczowe znaczenie w tych procesach. Subtelne zmiany w wyciszaniu bądź stymulowaniu ekspresji genów są ściśle z nimi związane. Naukowcy wraz z lekarzami zaczęli stosować już profilaktykę antynowotworową skupiając się właśnie na epigenetycy nowotworów. Syntetyczne inhibitory DNMTs oraz HDACs są wciąż odkrywane i podawane pacjentom równoległe z prowadzoną chemio- i radioterapią. Co ciekawe w przyrodzie występują naturalne inhibitory, które mogą być częścią naszej codziennej diety. Publikacja ma na celu zaprezentowanie podstawowych mechanizmów epigenetycznych, które ulegają zaburzeniu w nowotworach, a także przedstawienie syntetycznych i naturalnych „hamulców” tych procesów.

Słowa kluczowe: rak, nowotwór, epigenetyka, polifenole, karcynogeneza

Literatura

- [1] Goldberg A. D., Allis C. D., Bernstein E.: *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell 128: 635–8, 2007.
- [2] Bird A.: *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev 16: 6–21, 2002.
- [3] Bestor T. H.: *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet 9: 2395–402, 2000.
- [4] Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E.: *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell 99: 247–57, 1999.
- [5] Dhasarathy A., Wade P. A.: *The MBD protein family-reading an epigenetic mark?* Mutat Res 647: 39–43, 2008.
- [6] Lan J., Hua S., He X., Zhang Y.: *DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 42: 243–52, 2010.
- [7] Hellebrekers D. M., Griffioen A. W., van Engeland M.: *Dual targeting of epigenetic therapy in cancer*. Biochim Biophys Acta 1775: 76–91, 2007.
- [8] Momparler R. L.: *Cancer epigenetics*. Oncogene 22: 6479–83, 2003.
- [9] Turner B. M.: *Cellular memory and the histone code*. Cell 111: 285–91, 2002.
- [10] Strahl B. D., Allis C. D.: *The language of covalent histone modifications*. Nature 403: 41–5, 2000.
- [11] Hake S. B., Xiao A., Allis C. D.: *Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer*. Br J. Cancer 96 Suppl: R31–9, 2007.
- [12] McLaughlin F., La Thangue N. B.: *Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy*. Biochem Pharmacol 68: 1139–44, 2004.

- [13] North B. J., Verdin E.: *Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases*. *Genome Biol.* 5: 224, 2004.
- [14] Yamamoto H., Schoonjans K., Auwerx J.: *Sirtuin functions in health and disease*. *Mol Endocrinol* 21: 1745–55, 2007.
- [15] Mai A., Massa S., Rotili D., Cerbara I., Valente S., Pezzi R., Simeoni S., Ragno R.: *Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy*. *Med Res Rev* 25: 261–309, 2005.
- [16] Cheng H. L., Mostoslavsky R., Saito S., Manis J. P., Gu Y., Patel P., Bronson R., Appella E., Alt F. W., Chua K. F.: *Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10794–9, 2003.
- [17] van Leeuwen I., Lain S.: *Sirtuins and p53*. *Adv Cancer Res* 102: 171–95, 2009.
- [18] Seligson D. B., Horvath S., McBrien M. A., Mah V., Yu H., Tze S., Wang Q., Chia D., Goodglick L., Kurdistani S. K.: *Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers*. *Am J. Pathol* 174: 1619–28, 2009.
- [19] Seligson D. B., Horvath S., Shi T., Yu H., Tze S., Grunstein M., Kurdistani S. K.: *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence*. *Nature* 435: 1262–6, 2005.
- [20] Fraga M. F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N. G., Perez-Rosado A., Calvo E., Lopez J. A., Cano A., Calasanz M. J., Colomer D., Piris M. A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M.: *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. *Nat Genet* 37: 391–400, 2005.
- [21] Yang B., Sun H., Lin W., Hou W., Li H., Zhang L., Li F., Gu Y., Song Y., Li Q., Zhang F.: *Evaluation of global DNA hypomethylation in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasm tissues by immunohistochemistry*. *Urol Oncol*, 2011.
- [22] Cui H., Onyango P., Brandenburg S., Wu Y., Hsieh C. L., Feinberg A. P.: *Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2*. *Cancer Res* 62: 6442–6, 2002.
- [23] Dodge J. E., Okano M., Dick F., Tsujimoto N., Chen T., Wang S., Ueda Y., Dyson N., Li E.: *Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization*. *J Biol Chem* 280: 17986–91, 2005.
- [24] Bosviel R., Garcia S., Lavediaux G., Michard E., Dravers M., Kwiatkowski F., Bignon Y. J., Bernard-Gallon D. J.: *BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls*. *Cancer Epidemiol*, 2012.
- [25] Huang Q., Huang J. F., Zhang B., Baum L., Fu W. L.: *Methylation variable position profiles of hMLH1 promoter CpG islands in human sporadic colorectal carcinoma*. *Diagn Mol Pathol* 21: 24–33, 2012.
- [26] Lee S. M., Lee W. K., Kim D. S., Park J. Y.: *Quantitative promoter hypermethylation analysis of RASSF1A in lung cancer: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance*. *Mol Med Report* 5: 239–44, 2012.
- [27] Yamamoto N., Nakayama T., Kajita M., Miyake T., Iwamoto T., Kim S. J., Sakai A., Ishihara H., Tamaki Y., Noguchi S.: *Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARBeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay*. *Breast Cancer Res Treat* 132: 165–73, 2012.
- [28] Wang Z., Zang C., Cui K., Schones D. E., Barski A., Peng W., Zhao K.: *Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes*. *Cell* 138: 1019–31, 2009.

- [29] Johnstone R. W.: *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer*. Nat Rev Drug Discov 1: 287–99, 2002.
- [30] Marks P., Rifkind R. A., Richon V. M., Breslow R., Miller T., Kelly W. K.: *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. Nat Rev Cancer 1: 194–202, 2001.
- [31] Hess-Stumpp H.: *Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic*. Eur J Cell Biol 84: 109–21, 2005.
- [32] Zhang J. J., Zhu Y., Wu J. L., Liang W. B., Zhu R., Xu Z. K., Du Q., Miao Y.: *Association of increased DNA methyltransferase expression with carcinogenesis and poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Transl Oncol 14: 116–24, 2012.
- [33] Kwa F. A., Balcerczyk A., Licciardi P., El-Osta A., Karagiannis T. C.: *Chromatin modifying agents – the cutting edge of anticancer therapy*. Drug Discov Today 16: 543–7, 2011.
- [34] Kaminskas E., Farrell A. T., Wang Y. C., Sridhara R., Pazdur R.: *FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension*. Oncologist 10: 176–82, 2005.
- [35] Bumber Y., Issa J. P.: *Epigenetics in cancer: what's the future?* Oncology (Williston Park) 25: 220–6, 228, 2011.
- [36] Sers C., Kuner R., Falk C. S., Lund P., Sueltmann H., Braun M., Bunes A., Ruschhaupt M., Conrad J., Mang-Fatehi S., Stelniec I., Krapfenbauer U., Poustka A., Schafer R.: *Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells*. Int J Cancer 125: 1626–39, 2009.
- [37] Diede S. J., Guenthoer J., Geng L. N., Mahoney S. E., Marotta M., Olson J. M., Tanaka H., Tapscott S. J.: *DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences*. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 234–9, 2010.
- [38] Link A., Balaguer F., Goel A.: *Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics*. Biochem Pharmacol 80: 1771–92, 2010.
- [39] Szliszka E., Krol W.: *The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention*. Eur J Cancer Prev 20: 63–9, 2011.
- [40] Jin H., Tan X., Liu X., Ding Y.: *The study of effect of tea polyphenols on microsatellite instability colorectal cancer and its molecular mechanism*. Int J Colorectal Dis 25: 1407–15, 2010.
- [41] Wang P., Aronson W. J., Huang M., Zhang Y., Lee R. P., Heber D., Henning S. M.: *Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention*. Cancer Prev Res (Phila) 3: 985–93, 2010.
- [42] Katiyar S. K.: *Matrix metalloproteinases in cancer metastasis: molecular targets for prostate cancer prevention by green tea polyphenols and grape seed proanthocyanidins*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 6: 17–24, 2006.
- [43] Chen D., Wan S. B., Yang H., Yuan J., Chan T. H., Dou Q. P.: *EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment*. Adv Clin Chem 53: 155–77, 2011.
- [44] Sahin K., Tuzcu M., Sahin N., Akdemir F., Ozercan I., Bayraktar S., Kucuk O.: *Inhibitory effects of combination of lycopene and genistein on 7,12 – dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in rats*. Nutr Cancer 63: 1279–86, 2011.
- [45] Rivlin R. S.: *Can garlic reduce risk of cancer?* Am J Clin Nutr 89: 17–8, 2009.

- [46] Singh S. V., Powolny A. A., Stan S. D., Xiao D., Arlotti J. A., Warin R., Hahm E. R., Marynowski S. W., Bommareddy A., Potter D. M., Dhir R.: *Garlic constituent diallyl trisulfide prevents development of poorly differentiated prostate cancer and pulmonary metastasis multiplicity in TRAMP mice*. *Cancer Res* 68: 9503–11, 2008.
- [47] Ross J. A.: *Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?* *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4411–3, 2000.

Wpływ kanionu akustycznego na organizm człowieka

Krystyna Szajnowska*

Summary

The paper touched upon the overall impact of noise on the human body. As part of the conducted study, the hazardous noise impact of the acoustic canyon on the human body was analysed. The effect of noise on changes in body temperature, (systolic) blood pressure and heart rate were studied. The research was conducted with the use of an infrared thermometer, blood pressure meter and a sound level meter at the selected location in the city. The tests performed allowed to demonstrate that the noise as well as accompanying stressful conditions have an adverse effect on the well-being and the proper organism condition.

Keywords: Road traffic noise, annoyance, health, environmental stress.

1. Wprowadzenie

Według wszystkich norm i zagadnień dotyczących ochrony słuchu, ludzie nie powinni być narażeni na hałas o podwyższonym poziomie, zagrażający ich zdrowiu, a samo zjawisko hałasu jest jednym z najbardziej narastających problemów współczesnej cywilizacji. Wynikiem tego są liczne choroby i obniżenie wydajności pracy organizmu ludzkiego.

Hałas w warunkach urbanistycznych jest praktycznie nie do uniknięcia. Mieszkańcy terenów zurbanizowanych są stale narażeni na działanie hałasu pochodzącego od ruchu pojazdów samochodowych, a jego wpływ na organizm ludzki jest różny. Równocześnie nieodzowną częścią życia ludzi są dźwięki, które odgrywają dwojaką rolę:

- jako zjawiska pożądane, czyli środek porozumiewania się i odbioru wrażeń słuchowych,
- jako zjawiska niepożądane, przeszkadzające, szkodliwie działające na zdrowie.

Zakres spotykanych w środowisku poziomów dźwięku jest dość rozległy, począwszy od wartości progowej, tj. poziomu 0 dB, będącej już w stanie wywołać u człowieka wrażenie słuchowe, po wartości powodujące fizyczne odczucie bólu, tj. 130 dB. Przy poziomach dźwięku wyższych od 65 dBA (norma akustyczna w polskich miastach) występują zróżnicowane anomalie u ludzi w postaci zauważalnych zmian akcji serca, ciśnienia krwi czy rytmu oddychania. Hałas działa niekorzystnie na słuch. Powoduje czasowe lub trwałe przesunięcie progu słyszenia.

Podczas wykonywania pomiarów hałasu komunikacyjnego głównym celem było określenie wpływu szkodliwości hałasu powstającego w kanionie akustycznym na ciało człowieka. Skupiono się przede wszystkim na występowaniu zaburzeń pozasłuchowych,

* Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych, Uniwersytet Rzeszowski, Werynia 502, 36-100 Kolbuszowa.

a więc zmian zdrowia somatycznego i niektórych funkcji związanych z funkcjonowaniem organizmu, które w mniejszym stopniu zależą od wielkości obciążenia organizmu sumowaną dawką energii akustycznej, a częściej i w większym stopniu od cech pojedynczych zdarzeń akustycznych. W przypadku tego rodzaju hałasu uszkodzenia słuchu są możliwe tylko w niektórych sytuacjach i nie są realnym zagrożeniem wszystkich narażonych. Lokalizację miejsca pomiarów miał stanowić miejski kanion akustyczny, czyli układ dość długich i wysokich budynków zlokalizowanych po przeciwległych stronach ruchliwej ulicy.

Klimat akustyczny w środowisku może być oceniany zarówno subiektywnie, jaki i na podstawie zmierzonych wartości poziomów dźwięku. Za kryterium szkodliwości przyjęto wartości dopuszczalne ze względu na ochronę słuchu. Subiektywne badania skorelowane z pomiarami pozwoliły Państwowemu Zakładowi Higieny (PZH) przedstawić skalę ocen uciążliwości [1] w odniesieniu do hałasu komunikacyjnego.

Skala ocen uciążliwości hałasu wg PZH:

- I. Mała uciążliwość hałasu $L_{Aeq} < 52$ dB,
- II. Średnia uciążliwość hałasu $52 \leq L_{Aeq} \leq 62$ dB,
- III. Duża uciążliwość hałasu $63 \leq L_{Aeq} \leq 70$ dB,
- IV. Bardzo duża uciążliwość hałasu $L_{Aeq} > 70$ dB.

W procesie ocen stanu akustycznego (w aspekcie hałasu komunikacyjnego) powszechnie wykorzystuje się także skalę pomocniczą, w stosunku do kryteriów wynikających z przepisów prawnych, mówiącą o komforcie akustycznym (Tab. 1).

Tabela 1. Komfort akustyczny, a zagrożenie hałasem [8]

Opis warunków	Poziom hałasu L_{Aeq} [dBA]	
	pora dzienna	pora nocna
pełny komfort akustyczny	<50	<40
przeciętne warunki akustyczne	50–60	40–50
przeciętne zagrożenie hałasem	60–70	50–60
wysokie zagrożenie hałasem	>70	>60

2. Wpływ hałasu na organizm człowieka

Hałas jako negatywny bodziec powoduje poważne zaburzenia w organizmie ludzkim i jest przyczyną wielu ciężkich schorzeń, wcześniejszego starzenia się i może spowodować skrócenie życia o 8–12 lat. Odpowiednio nasilony hałas może już po 10 minutach wywołać u człowieka zdrowego wiele zmian fizjologicznych, w tym zmianę w strukturze hormonów nadnercza, ponadto może spowodować wystąpienie zmian czynnościowych mózgu [2]. Możliwość ingerowania w życie człowieka wynika ze specyfiki dróg nerwowych narządu słuchu, ponieważ jest on silnie unerwiony, a połączenia nerwowe od tego narządu prowadzą nie tylko do ośrodka zlokalizowanego w korze mózgowej (gdzie powstaje wrażenie słuchowe), lecz i do innych ośrodków nerwowych, zlokalizowanych w ośrodkach podkorowych i pniu mózgu – częściach mózgu sterujących różnymi procesami życiowymi.

Wskutek tego sygnały słuchowe mogą wywołać zróżnicowane reakcje ogólnoustrojowe. Tak więc dźwięki poprzez połączenia nerwowe wpływają na:

- 1) autonomiczny układ nerwowy, odpowiedzialny m.in. za pracę narządów wewnętrznych,
- 2) twór siatkowy, który odpowiada za zakres i wielkość reakcji fizjologicznych na bodźce,
- 3) korowe i podkorowe ośrodki mózgowy, odpowiedzialne w głównej mierze za myślenie i rozwiązywanie zadań i problemów.

Wpływ hałasu na narząd słuchu

Hałas komunikacyjny, jak każdy inny sygnał akustyczny, oddziałuje bezpośrednio na ucho i narząd słuchu, co może być przyczyną jego trwałego uszkodzenia. Powstawanie uszkodzeń słuchu jest najczęściej procesem powolnym – ubytki słuchu pojawiają się stopniowo i bezboleśnie. Z tego powodu osoby narażone na nadmierny hałas często nie dostrzegają jego negatywnego oddziaływania, aż do momentu, w którym okazuje się, że nastąpiły u nich poważne ubytki słuchu.

Tabela 2. Bezpieczny czas przebywania w hałasie o różnej częstotliwości [9]

Hałas w [dBA]	Maksymalny czas przebywania
85	8 [godz.]
90	4 [godz.]
95	2 [godz.]
100	1 [godz.]
105	0,5 [30 min]
110	0,25 [15 min]
115	0,125 [7,5 min]

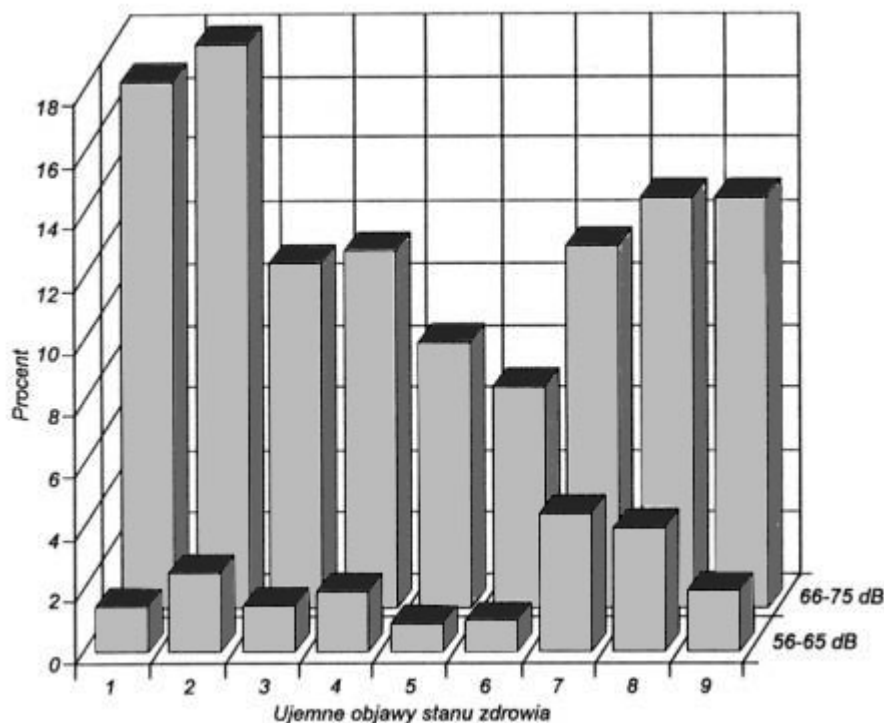
Wpływ hałasu na układ sercowo-naczyniowy

Z badań laboratoryjnych i epidemiologicznych wynika, że hałas, działając jako silny stresor środowiskowy, który pobudza autonomiczny system nerwowy i układ gruczołów o wydzielaniu dokrewnym, doprowadza między innymi do wzrostu ciśnienia krwi, skurczu naczyń krwionośnych i przyspieszenia akcji serca, co może prowadzić do zawału serca. Naukowcy uważają, że hałas zwiększa ryzyko zawału nawet o 50%. Po ekspozycjach krótkotrwałych, zmienione parametry wracają do normy po krótkim czasie. Wskutek długotrwałych i powtarzanych ekspozycji na hałas o wysokim natężeniu, u niektórych, bardziej wrażliwych członków narażonej populacji, może się rozwinąć choroba nadciśnieniowa oraz niedokrwienna choroba serca. Wzrasta wtedy również lepkość krwi i stężenie tłuszczów we krwi, pojawiają się zaburzenia poziomu elektrolitów, zmiany stężenia adrenaliny, noradrenaliny i kortyzolu. Stałe narażenie na duży hałas pochodzący z ruchu drogowego

może prowadzić do podwyższonego ryzyka udaru, szczególnie u osób po 65 roku życia. Stwierdzono, że każde 10 dB więcej w otoczeniu podnosi to ryzyko średnio aż o 14%.

Badania hałasu drogowego w Niemczech wykazały wpływ hałasu o poziomie 65 dB na skurczowe ciśnienie krwi, czas krzepnięcia krwi oraz obniżenie kortyzolu i liczby trombocytów [3]. Podobne badania prowadzone w Anglii sugerują, że ekspozycja na hałas uliczny o poziomie 66–70 dB może powodować niewielki wzrost relatywnego ryzyka niedokrwiennej choroby serca. Zbieżne wyniki zaobserwowano również w Szwecji, analizując przypadki zawałów mięśnia sercowego u mężczyzn.

Wyniki badań prowadzonych przez PZH w Warszawie oraz na zlecenie GIOŚ w Lublinie pozwalają wyciągnąć podobne wnioski. Zaobserwowano zmiany w zakresie układu krążenia, pokarmowego i mięśniowo-stawowego, a także zakłócenia równowagi emocjonalnej u osób zamieszkałych w rejonie hałasu powyżej 65 dB [4]. Wyniki tych badań przedstawia wykres 1.



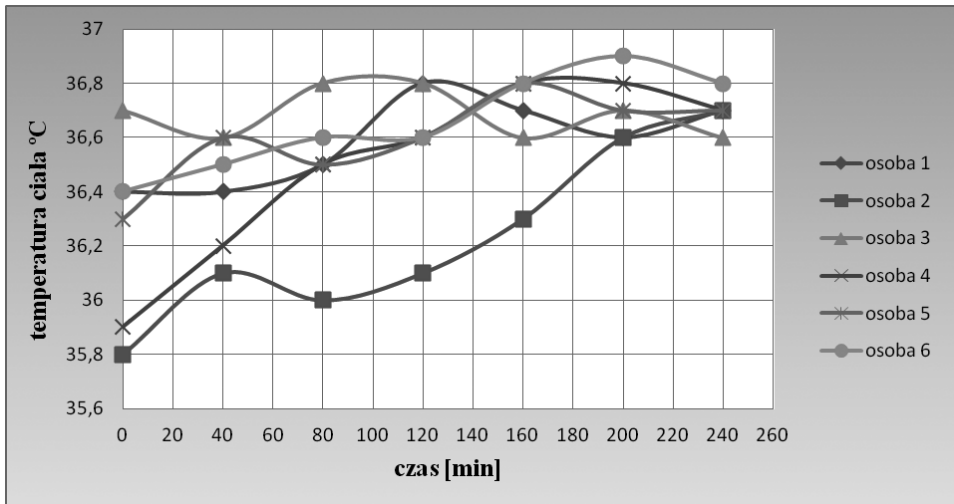
Wykres 1. Ryzyko względne pogorszenia stanu zdrowia ocenianego przez mieszkańców z rejonu o wyższym poziomie hałasu w odniesieniu do osób zamieszkałych w korzystnych warunkach akustycznych: 1 – szybkie męczenie się, 2 – bóle i kołatanie serca, 3 – duszność, 4 – zawroty głowy, 6 – uderzenia krwi do głowy, 7 – bóle i łzawienie oczu, 8 – marznięcie kończyn, 9 – niska samoocena zdrowia.

Wpływ hałasu na wybrane funkcje życiowe

W ramach pomiarów wpływu szkodliwości hałasu na organizm człowieka przeprowadzono badania na grupie sześciuosobowej. Podczas pomiarów zwrócono uwagę na interesujące parametry i ewentualne ich zmiany pod wpływem narażenia na czterogodzinny hałas. Zarejestrowane za pomocą odpowiednich urządzeń wyniki zaprezentowano w sposób graficzny w dalszej części pracy.

Temperatura ciała

Temperaturę ciała mierzono za pomocą termometru na podczerwień. Do pomiaru wybrano punkt położony na czole badanej osoby. Zanotowane wyniki przedstawia wykres 2.

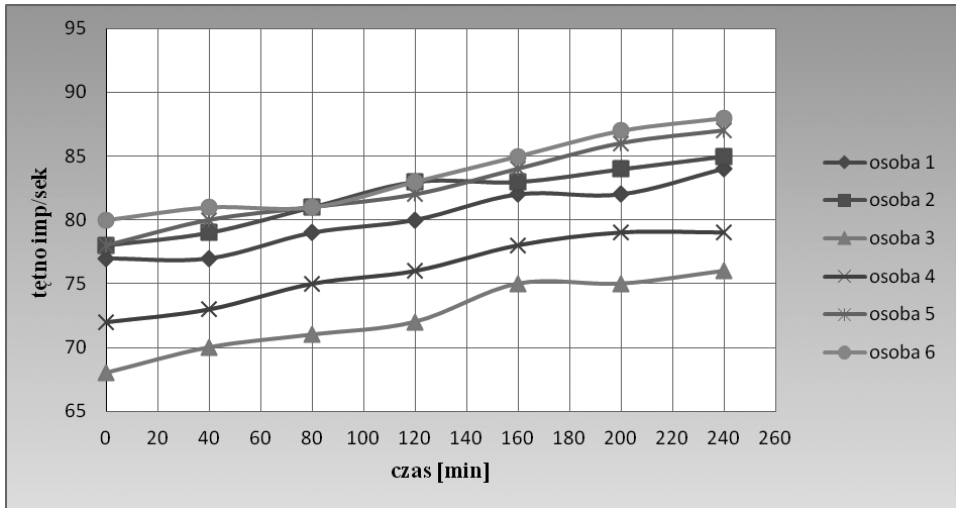


Wykres 2. Zmienność temperatury ciała w funkcji czasu

Jak widać wykres 2 ilustruje nieco różne wartości początkowe temperatury ciała, co może wynikać z indywidualnych cech organizmu każdej z badanych osób. Można zauważyć, że wyniki stają się zbieżne pod koniec czasu pomiarowego. Stan podgorączkowy u człowieka to 37°C. Jak widać ekspozycja na hałas wywoływała u wszystkich ten sam efekt – wzrost temperatury różniący się od stanu początkowego, lecz nie doprowadziła do aż tak drastycznego skoku temperatury wywołującego stan podgorączkowy. U niektórych wzrost temperatury przebiegał w dość regularny, stopniowy sposób, zaś u pozostałych z wahaniami i tendencjami do spadków, a później wzrostów. Działo się tak w przypadku osób numer 1, 3 oraz 5. Tak więc miarowy wzrost zaobserwowano u osoby 2, 4 oraz 6. Różnica od temperatury początkowej wynosi kolejno 2,2%, 2,5% i 1,1%. Jednocześnie u osoby 2 zaobserwowano najbardziej znaczny wzrost zmiany temperatury.

Tętno

Następnym ważnym parametrem, który rejestrowano podczas pomiarów, było tętno (ilość uderzeń/min). Po sporządzeniu wykresu wyniki przedstawiają się w następujący sposób na wykresie 3.



Wykres 3. Zmienność tętna w funkcji czasu

Zauważalny jest u wszystkich badanych w miarę jednostajny i podobny wzrost tętna na przestrzeni czasu pomiarowego. Na podstawie tego można wywnioskować, że w przypadku wszystkich osób poddanych badaniu hałas komunikacyjny powodował jednakowy efekt – zmianę (wzrost) tętna o parę impulsów więcej na minutę w odróżnieniu od stanu początkowego. Jednakże, tak samo jak w poprzednich przypadkach, zmiana ta jest indywidualna względem uwarunkowania ogólnego stanu organizmu każdej z badanych osób. Normalne tętno u osoby dorosłej utrzymuje się na poziomie 70–75 imp/sek i u zdrowej osoby w normalnych warunkach nie powinno przekraczać 100 imp/sek. Jak widać oddziałujący hałas nie doprowadził u nikogo do znacznych anomalii od wartości uznawanych za prawidłowe. Ewentualne zmiany, do których doprowadziły warunki stresogenne, mieszczą się w zakresie od 8% do 11%. Jedynie w przypadku osoby 6, która na samym początku wykazywała większe tętno od przeciętnego, uległo ono zmianie aż o 9%.

Zrealizowane doświadczalne badania innych autorów, dotyczące wpływu hałasu na organizm człowieka, przedstawiają nieco inny charakter przeprowadzonych doświadczeń. W przypadku pomiarów wpływu hałasu ulicznego na słuch [5] zostały one wykonane na dużo większych grupach osób w młodym wieku. W tym przypadku obserwacji poddano grupę 50 policjantów, pracujących na skrzyżowaniach głównych ulic w mieście Jalgaon przez ok. 12 godzin. Równoważny poziom hałasu (L_{eq}) w środowisku pracy tych osób wynosił 87,5 dBA. Zebrane wyniki doświadczalne pozwoliły wykazać, że utrata słuchu i trudności z dosłyszeniem dźwięku wystąpiły u 84% badanych, a przesunięcia

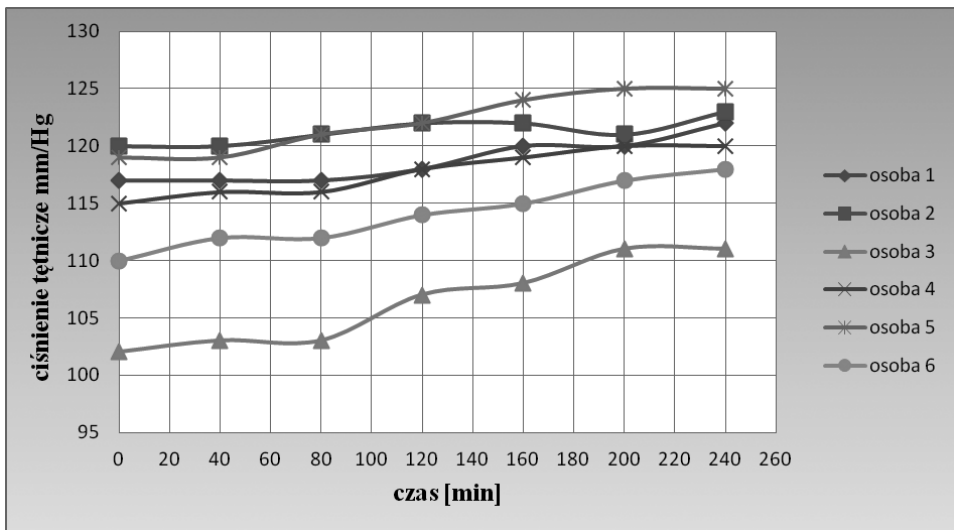
prugu słyszalności okazały się znaczące przy niskich, średnich i wysokich częstotliwościach dla obu uszu.

Natomiast w przypadku obserwacji pracy układu sercowo-naczyniowego w warunkach hałasu [6], badania wykazały związek między hałasem a występowaniem dysfunkcji w układzie krążenia. Hałas powodował uwalnianie hormonów stresu, w tym m.in. kortyzolu, którego stężenie badano w ślinie za pomocą testu radioimmunologicznego. Próbkę pobierano od kilku grup mieszkańców ruchliwych terenów trzy razy dziennie: rano, przed obiadem i ostatnią przed snem. Wykazano, że w 30 minut po przebudzeniu poziom kortyzolu był niższy, a wyższy przy narażeniu na hałas podczas pory dziennej o najbardziej wzmożonym ruchu.

Uzyskane w tej pracy wyniki, dotyczące zmienności temperatury ciała i tętna, są zgodne z wcześniejszymi wynikami innych autorów, a wynika z nich jednoznacznie, że hałas wpływa negatywnie na różne funkcje życiowe.

Ciśnienie tętnicze (skurczowe)

Kolejnym interesującym parametrem, który badano, były wahania ciśnienia tętniczego w mm/Hg. Sporządzony wykres graficzny na podstawie otrzymanych wyników prezentuje się w następujący sposób:



Wykres 4. Zmiana ciśnienia tętniczego (skurczowego) w funkcji czasu

Analizując ogólnie otrzymany wykres widoczna jest wzrostowa tendencja zmiany ciśnienia u wszystkich badanych. Z nadciśnieniem mamy do czynienia, gdy u dorosłej osoby wartość skurczowa ciśnienia przekracza 140 mm/Hg. U osoby młodej ciśnienie optymalne powinno wynosić 120 mm/Hg. U wszystkich osób biorących udział w badaniu parogodzinna ekspozycja na hałas nie spowodowała zbyt radykalnych zmian ciśnienia, jedynie doprowadziła do jego niewielkiego wzrostu. Z wykresu da się również zauważyć, że

wśród niektórych badanych ciśnienie ulegało większym wzrostom w porównaniu do innych badanych. Tak było w przypadku badanej osoby 3 i 6. Wykazały one większą tendencję od pozostałych na zmianę ciśnienia tętniczego, gdyż zwiększyła się ona o odpowiednio 7–8% w odniesieniu do stanu początkowego. Ogólnie tendencja zmian ciśnienia tętniczego zwierzała się w granicach od 2 % do 8 % w porównaniu do wartości początkowej.

Wyniki przedstawione w tej pracy można porównać z podobnym badaniem [7], w którym autor analizował wpływ hałasu ulicznego na ciśnienie skurczowe. Badanie zostało przeprowadzone na znacznie większej grupie badanych i na przestrzeni dłuższego czasu. W badaniu brały udział osoby w przedziale wiekowym 50–64 lata. Hałas drogowy był mierzony zarówno podczas pory dziennej, jak i nocnej, a następnie został obliczony jako ważony poziom dźwięku. Podczas obserwacji stwierdzono wyższe ciśnienie skurczowe o 0,26 mg/Hg w wyniku wzrostu o 10 dB średniego rocznego poziomu natężenia hałasu ruchu drogowego. Zaobserwowano bardziej widoczne zmiany u mężczyzn, wynoszące 0,59 mg/Hg, oraz u osób starszych – 0,65 mg/Hg. Jednoznacznie można stwierdzić, że wyniki wykazywały wzrost ciśnienia skurczowego osób narażonych na hałas. Na tej podstawie można wywnioskować, że otrzymane przez autorkę pracy wyniki, pomimo przeprowadzenia doświadczenia w nieco inny sposób, dały te same rezultaty.

4. Podsumowanie

Dzięki przeprowadzonym badaniom udało się zaobserwować wyraźny wpływ hałasu w kanonie akustycznym na wzrost tętna u większości badanych osób. Wpływ na zmianę temperatury ciała i ciśnienie tętnicze jest natomiast słabszy. Jednakże pomimo obserwacji w jednym przypadku większych, a w innym mniejszych zmian badanych parametrów, hałas wywierał swoisty wpływ na organizm ludzki, nie pozostawiając monitorowanych funkcji życiowych obojętnymi na jego działanie. W pracach innych autorów [5, 6], pomimo że zajmowali się oni badaniem wpływu hałasu na inne parametry życiowe, jak utrata słuchu i zmiana poziomu kortyzolu we krwi, pojawiły się podobne wnioski i wyniki wykazujące niekorzystne zmiany w stanie organizmu.

Podsumowując podany zarys istoty i zakresu oddziaływań hałasu na człowieka należy stwierdzić, że ma on w mniejszym lub w większym stopniu wpływ na odchylenia wartości od ogólnego stanu metabolicznego ustroju. W bardziej lub mniej znaczący sposób zależy od indywidualnych cech ustrojowych każdego człowieka, ponieważ każdy w odmienny sposób może znosić nadmierne narażenia na hałas. Jedni są bardziej odporni na działanie czynników stresogennych, inni szybciej ulegają zmęczeniu, podirytowaniu.

Streszczenie

W pracy przybliżono ogólny wpływ szkodliwości hałasu na organizm ludzki. W ramach realizacji pracy przeprowadzono badania wpływu szkodliwości hałasu kanionu akustycznego na organizm człowieka. Badano wpływ hałasu na zmiany temperatury ciała, ciśnienia tętniczego (skurczowego) oraz tętna. Badania przeprowadzono przy użyciu termometru na podczerwień, ciśnieniomierza i miernika dźwięku w wybranej lokalizacji na terenie

miasta. Wykonane badania pozwoliły wykazać, że hałas oraz towarzyszące mu warunki stresogenne wpływają negatywnie na samopoczucie oraz prawidłową kondycję organizmu.

Podziękowania

Pracę wykonano w ramach projektu „Studenci Kierunku Biotechnologia akcelerato-rem Gospodarki Opartej na Wiedzy”. Praca zawiera główne wyniki pracy inżynierskiej, wykonanej pod kierownictwem dr hab. inż. Wojciecha Rdzanka, prof. UR z Zakładu Akustyki Instytutu Fizyki UR.

Literatura

- [1] Orzeł I., Śluz J., *Hałas*, Raport Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Lublinie, 2003.
- [2] Dworak K., Domańska H., Paciej J., *Hałas środowiskowy a zdrowie*, raport Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej w Katowicach, 2005.
- [3] Koszarny Z., *Wpływ hałasu na zdrowie człowieka*, Ekopartner, 1999.
- [4] Koszarny Z., *Wpływ hałasu w rejonie autostrad na zdrowie mieszkańców*, Liga walki z hałasem, Wpływ autostrad na klimat akustyczny środowiska, Seminarium Warszawa, 1996.
- [5] Ingle S. T., Pachpande B. G., Wagh N. D., Attarde S. B., *Noise exposure and hearing loss among the traffic policemen working at busy streets of Jalgaon urban centre*, Transportation Research Part D: Transport and Environment, 2005; 10 (1): 69–75.
- [6] Bigert C., Bluhm G., Theorell T., *Saliva cortisol – a new approach in noise research to study stress effects*, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2005; 208(3): 227–30.
- [7] Sorensen M., *Exposure to Road traffic and railway noise and associations with blood pressure and self reported hypertension: a cohort study*, Environmental Health, 2011, 10: 92.
- [8] Balcerek Z., *Hałas*, Raport Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Lublinie, 2006.
- [9] www.halas.wortale.net.

Analiza układu kinematycznego robota Robin Heart Vision

Piotr Kroczek*, Jacek Cieślík**

Summary

The following paper presents complete kinematic analysis of surgical robot Robin Heart Vision developed by Foundation for Cardiac Surgery Development in Zabrze. Analysis begins with introduction of the kinematic structure and its basic features. The paper contains computing methodology of forward and inverse kinematics. Equations elaborated in the analytical part subsequently are tested with use of algorithm created by author. There has been done a simulation which confirmed correctness of approach and computation method.

Keywords: kinematic analysis, inverse kinematics, forward kinematics, surgical robot, Robin Heart Vision

1. Wprowadzenie

Robotyka medyczna jest szerokim, szybko rozwijającym się działem robotyki i mechatroniki. Jest odpowiedzią na zapotrzebowania współczesnych szpitalnych sal operacyjnych i cieszących się coraz większą popularnością zabiegów metodą chirurgii minimalnie inwazyjnej (MIS – minimally invasive surgery). Dzięki tym operacjom pacjenci szybciej powracają do zdrowia i aktywności życiowej. Mniej jest urazów tkanek, komplikacji i bólu. Prowadzenie operacji MIS umożliwia zastosowanie specjalnie zaprojektowanych narzędzi laparoskopowych wprowadzanych do ciała pacjenta przez małe nacięcia o wymiarach nie przekraczających kilkunastu milimetrów lub naturalne otwory ciała. Narzędzia laparoskopowe to długie (powyżej 300mm), cienkie rurki zakończone odpowiednim narzędziem (szczypczyki, nożyczki) posiadające specjalny uchwyt przekazujący ruch i umożliwiające zamykanie oraz otwieranie narzędzi. Chirurdzy rozwijając endoskopową technikę wykonywania zabiegów napotkali barierę dokładności człowieka (np. przy operacji pomostowania naczyń wieńcowych). Objawia się to szczególnie przy operacjach kardiochirurgicznych, gdzie przestrzeń do operowania narzędziami to zaledwie 2–3 cm pomiędzy sercem a ścianą klatki piersiowej. Alternatywą dla tradycyjnych narzędzi laparoskopowych stają się roboty chirurgiczne, przy budowie których usunięto większość wad klasycznych na-

* Katedra Robotyki i Mechatroniki, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Robotyki, Akademia Górniczo-Hutnicza, Robin Science Club przy International Society for Medical Robotics i Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze.

** Katedra Robotyki i Mechatroniki, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Robotyki, Akademia Górniczo-Hutnicza.

rzędzi. Precyzja pozycjonowania narzędzia chirurgicznego robota osiąga, niemożliwą dla ręki chirurga, dokładność 0,1 mm.

Specyfika operacji chirurgicznej i waga bezpieczeństwa powoduje, że roboty chirurgiczne są głównie telemanipulatorami pozostawiając wszystkie decyzje dotyczące ruchu i działania efektora lekarzowi. Telemanipulator jest manipulatorem kopiującym, pracującym w układzie master-slave, gdzie częścią podrzędną jest manipulator, a nadrzędną zadajnik ruchu. Operator – chirurg trzymając za manetki zadajnika ruchu zadaje pozycję i orientację, przeliczaną przez specjalną jednostkę nadzorującą i odwzorowywaną przez manipulator. System sterowania pośredniczący pomiędzy operatorem, a manipulatorem umożliwia dodatkową obróbkę sygnału sterującego ruchem narzędzia, np. usunięcie drżenia rąk lub skalowanie. Zaletą korzystania ze sterowania pośredniego jest możliwość prowadzenia operacji na odległość. Razem z systemem sterowania i systemem endowizyjnym, manipulator i zadajnik ruchu tworzą kompletny system [1].

W Polsce od 2000 roku w Fundacji Rozwoju Kardiouchirurgii im. Z. Religii w Zabrze pod kierownictwem dr Z. Nawrata trwają prace nad polskim robotem kardiouchirurgicznym. Powstały kolejne prototypy należące do rodziny robotów pod wspólną nazwą Robin Heart. Robot Robin Heart Vision opracowany w latach 2007–2008 na podstawie projektu Robin Heart 1 służy do sterowania położeniem endoskopowego toru wizyjnego.

W niniejszej pracy przedstawiono wynik dokładnej analizy kinematycznej robota kardiouchirurgicznego Robin Heart Vision.

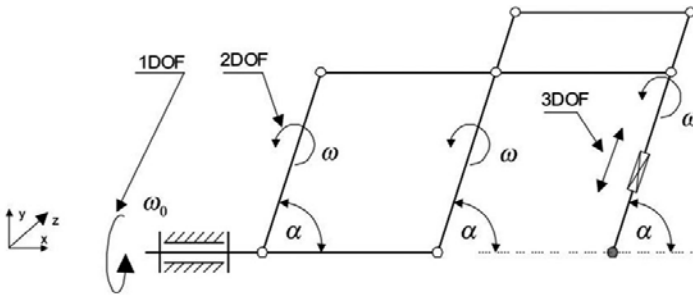
2. Wymagania wobec konstrukcji

Specyfika prowadzenia zabiegów małoinwazyjnych polega na wprowadzeniu do ciała pacjenta narzędzia przez niewielkie nacięcie w powłokach ciała. Z racji na ciągłość powłok otwór w ciele pacjenta nie może się przemieszczać i przez cały czas trwania zabiegu pozostaje w tym samym punkcie w przestrzeni. Robot chirurgiczny musi utrzymywać w przestrzeni jeden stały punkt bez względu na osiąganą przez niego pozycję i orientację. Warunek ten zwany jest warunkiem stałopunktowości. Otwór zwany portem z punktu widzenia mechaniki jest rodzajem przegubu kulowego o średnicy nie przekraczającej 15mm. Każdy ruch związany z czynnościami chirurgicznymi wewnątrz ciała pacjenta jest realizowany przez ruch ramienia robota nad stołem operacyjnym w układzie odwrotnym. Operacje małoinwazyjne są przeprowadzane z zastosowaniem więcej niż jednego narzędzia, których porty znajdują się blisko siebie, co skutkuje ograniczoną przestrzenią manipulacji. Dlatego utrzymanie przez robota niezmiennego w przestrzeni punktu nie może wiązać się z zastosowaniem dodatkowego mechanizmu przy ciele pacjenta, a musi być osiągnięte w inny sposób.

Stałopunktowość można osiągnąć na kilka sposobów. Jednym z nich jest stałopunktowość pasywna, gdzie port traktowany jest jako punkt podparcia narzędzia. Wadą tego rozwiązania jest powstanie znaczącej siły pochodzącej od portu, co uniemożliwia precyzyjne prowadzenie operacji. Kolejną metodą stałopunktowości jest uwzględnienie stałego punktu na poziomie sterowania – stałopunktowość aktywna. Wymaga zastosowania dodatkowych stopni swobody oraz zarezerwowania dodatkowej mocy obliczeniowej

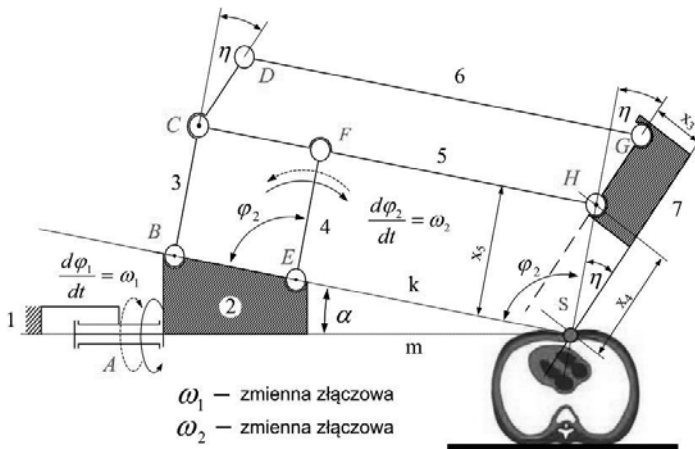
jednostki sterującej na przeliczanie pozycji uwzględniającej ten punkt. Ostatnim stosowanym sposobem jest stałopunktowość kinematyczna. Polega na wymuszeniu stałego punktu poprzez zastosowanie specjalnej struktury manipulatora – struktury sferycznej, w środku której znajduje się port. Wymuszenie kinematyczne pozwala na pozbycie się wad poprzednich metod kosztem bardziej skomplikowanej budowy i zapotrzebowaniem na większą przestrzeń nad stołem operacyjnym.

Konstrukcja robota Robin Heart Vision ma strukturę sferyczną spełniającą jednocześnie wymóg stałopunktowości kinematycznej, realizowaną poprzez układ podwójnego czworoboku przegubowego (Rys. 1) [3, 4].



Rys. 1. Zasada podwójnego czworoboku przegubowego [5]

Jak pokazano na Rys. 1 stały punkt znajduje się w osi pierwszego stopnia swobody (1DOF) i przedłużeniu osi trzeciego stopnia swobody (3DOF). Zastosowanie podwójnego czworoboku przegubowego wymusza jednakowe przemieszczenie kątowe (kąt α) oraz jednakową prędkość kątową zaznaczonych członów (prędkość ω).



Rys. 2. Schemat strukturalny mechanizmu stałopunktowego z geometrycznym przemieszczeniem kątowym końcówki [6]

Potrzeba zastosowania toru endoskopowego mocowanego na ostatnim członie wymusza modyfikację schematu kinematycznego. Bez zmiany struktury, stały punkt będzie zlokalizowany w punkcie A pokazanym na Rys. 1, a nie w osi endoskopu. Niezbędnę modyfikację przedstawia Rys. 2. Wprowadzenie dodatkowego kąta pochylenia (η) odcinka CD i GH względem BC skutkuje przeniesieniem punktu stałego do osi narzędzia.

Kąt pochylenia narzędzia η jest określony wzorem:

$$\eta = \arctg\left(\frac{x_3}{x_4}\right) = \arctg\left(\frac{x_3}{x_5}\right) \quad (1)$$

Tak skomplikowana struktura geometryczna wymaga dużej dokładności wykonania wraz ze spełnieniem podanych warunków geometrycznych. Jakiękolwiek odstępstwo od niej skutkuje utraceniem stałopunktowości.

$$BE \parallel CF; CH \parallel DG; BC \parallel EF; CD \parallel GH; \quad (2)$$

Dodatkowo na Rys. 1 pokazano pierwsze dwa stopnie swobody. Pierwszym stopniem swobody jest obrót wokół osi poziomej – θ_1 , drugim obrót wokół osi prostopadłej do płaszczyzny schematu – θ_2 . Pozostałe dwa stopnie związane są z ruchem efektora manipulatora (przemieszczenie liniowe toru wizyjnego) – trzeci stopień swobody i obrotem wokół własnej osi czwarty stopień swobody.

3. Analiza kinematyczna robota RobIn Heart Vision

Kinematyka jest nauką, zajmującą się badaniem ruchu, bez wnikania w przyczyny ruchu ten wywołujące [7]. Zadaniem kinematyki jest poznanie pozycji i orientacji w przestrzeni układu kinematycznego lub pewnych jego części. Wyróżnia się dwa zadania kinematyki: zadanie proste i odwrotne. Kinematyka prosta pozwala na przejście ze współrzędnych złączowych na współrzędne kartezjańskie oraz określa kąty orientacji, jednoznacznie pozycjonujące człon (układ współrzędnych związany z członem) w przestrzeni kartezjańskiej. Kinematyka odwrotna, jest problemem odwrotnym do kinematyki prostej. Znając współrzędne punktu początkowego układu i jego orientację względem bazowego układu szuka się zmiennych złączowych. Zadanie odwrotne kinematyki jest kluczowe dla sterowania mechanizmem. Ze względu na możliwość wystąpienia rozwiązań wielokrotnych lub braku rozwiązań w postaci jawnej (jak w przypadku struktur redundantnych o nadmiarowych ruchach) zadanie kinematyki odwrotnej jest znacznie trudniejsze od zadania kinematyki prostej. [2, 6]

Celem kinematyki prostej jest otrzymanie równań w jawnej postaci pozwalających na transformację jednego układu na drugi. Jeżeli rozważania ograniczymy do otwartych łańcuchów kinematycznych składających się tylko z kilku wybranych typów par kinematycznych (obrotowych, postępowych i cylindrycznych) możemy zastosować notację Denavita-Hartenberga [2]. Notacja pozwala na otrzymanie matematycznego opisu kinematyki stosując pewne reguły wprowadzania lokalnych układów odniesienia.

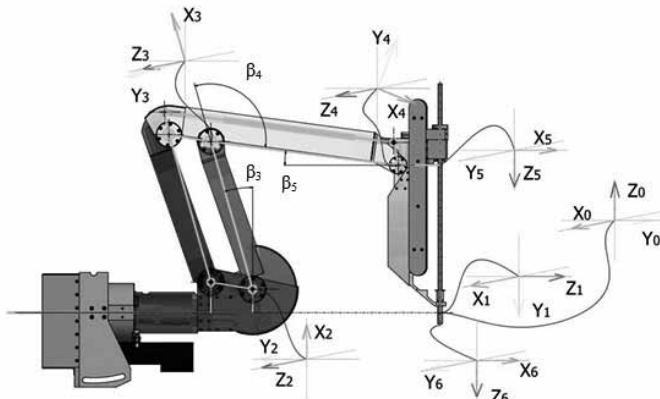
3.1. Kinematyka prosta robota RobIn Heart Vision

W celu obliczenia równań kinematyki prostej robota Robin Heart Vision posłużono się notacją Denavita-Hartenberga i utworzono tabelę przekształceń jednorodnych (Tab. 1) opisującą przekształcenia kolejnych układów współrzędnych zgodnie z metodyką przedstawioną na Rys. 3. W tabeli zawarto również pewne wymiary geometryczne przyjęte zgodnie z Rys. 3 i Rys. 4.

Tabela 1. Tabela przekształceń jednorodnych robota Robin Heart Vision

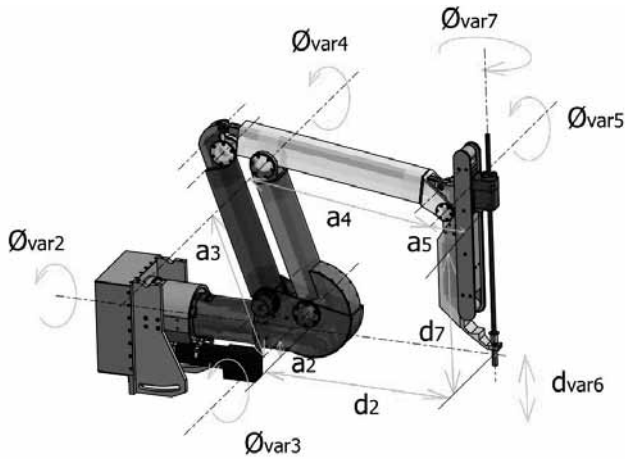
Układ	θ_i [deg]	d_i [mm]	a_i [mm]	α_i [deg]
1	0	0	0	-90
2	$\theta_{var2}-90$	$-d_2$	a_2	-90
3	$\theta_{var3} - \beta_3$	0	a_3	0
4	$\theta_{var4} + \beta_4$	0	a_4	0
5	$\theta_{var5} - \beta_5$	0	a_5	90
6	0	$d_{var6} + d_7$	0	0
7	θ_{var7}	0	0	0

Pokazana na Rys. 4 liczba zmiennych złączowych jest pozornie różna od założonej (robot posiada tylko cztery stopnie swobody). Spowodowane jest to zastosowaniem struktury podwójnego równoległowodu. W rzeczywistości kąty θ_{var4} i θ_{var5} są liniowo zależne od kąta θ_{var3} .



Rys. 3. Metoda doboru układów współrzędnych

Korzystając z tabeli przekształceń jednorodnych oraz wymnażając kolejne macierze przekształceń jednorodnych otrzymano równania kinematyki prostej zebrane w Tabeli 2.



Rys. 4. Przyjęte wymiary oraz kierunki kątów obrotu

Tabela 2. Tabela zawierająca równania kinematyki prostej

$\cos(\theta_{var2}) * \sin(\theta_{var7}) - \cos(\theta_{var7}) * \sin(\theta_{var2}) * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3}))$	$\cos(\theta_{var2}) * \cos(\theta_{var7}) + \sin(\theta_{var2}) * \sin(\theta_{var7}) * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3}))$	$-\sin(\theta_{var2}) * (W1 * \sin(\theta_{var3}) - W2 * \cos(\theta_{var3}))$	$-\sin(\theta_{var2}) * (Q1 * a_4 - a_2 + (d_{var6} + d_7) * (W1 * \sin(\theta_{var2}) - W2 * \cos(\theta_{var3})) + a_5 * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3})) - a_3 * (Q5 * \cos(\theta_{var3}) + Q6 * \sin(\theta_{var3})))$
$\cos(\theta_{var7}) * (W1 * \sin(\theta_{var3}) - W2 * \cos(\theta_{var3}))$	$-\sin(\theta_{var7}) * (W1 * \sin(\theta_{var3}) - W2 * \cos(\theta_{var3}))$	$-W1 * \cos(\theta_{var3}) - W2 * \sin(\theta_{var3})$	$Q2 * a_4 - d_4 - (d_{var6} + d_7) * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3})) + a_5 * (W1 * \sin(\theta_{var3}) - W2 * \cos(\theta_{var3})) - a_3 * (Q5 * \sin(\theta_{var3}) - Q6 * \cos(\theta_{var3}))$
$-\sin(\theta_{var2}) * \sin(\theta_{var7}) - \cos(\theta_{var2}) * \cos(\theta_{var7}) * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3}))$	$\cos(\theta_{var2}) * \sin(\theta_{var7}) * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3})) - \cos(\theta_{var7}) * \sin(\theta_{var2})$	$-\cos(\theta_{var2}) * (W1 * \sin(\theta_{var3}) - W2 * \cos(\theta_{var3}))$	$-\cos(\theta_{var2}) * (Q1 * a_4 - a_2 + (d_{var6} + d_7) * (W1 * \sin(\theta_{var2}) - W2 * \cos(\theta_{var3})) + a_5 * (W1 * \cos(\theta_{var3}) + W2 * \sin(\theta_{var3})) - a_3 * (Q5 * \cos(\theta_{var3}) + Q6 * \sin(\theta_{var3})))$
0	0	0	1

gdzie:

$$Q1 = \cos(\theta_{var3} + \beta_4) * \sin(\theta_{var3} - \beta_3) + \sin(\theta_{var3} + \beta_4) * \cos(\theta_{var3} - \beta_3)$$

$$Q2 = \cos(\theta_{var3} + \beta_4) * \sin(\theta_{var3} - \beta_3) - \sin(\theta_{var3} + \beta_4) * \cos(\theta_{var3} - \beta_3)$$

$$Q3 = \cos(\beta_5),$$

$$Q4 = \sin(\beta_5),$$

$$Q5 = \cos(\beta_3),$$

$$Q6 = \sin(\beta_3)$$

$$W1 = Q1 * Q3 + Q2 * Q4$$

$$W2 = Q1 * Q4 - Q2 * Q3$$

Równania te są funkcjami wielkości fizycznych zawartych w tabeli przekształceń jednorodnych (Tab. 1). Zebrane w Tab. 2 równania kinematyki prostej należy odczytywać poprzez przyrównanie odpowiednich komórek macierzy z podstawową macierzą przekształcenia jednorodnego, której sposób interpretacji został przedstawiony na Rys. 5 [2, 7].

Do celów obliczeniowych wykorzystano oprogramowanie firmy MathWorks™ – MATLAB w wersji R2010a. Do celów wizualizacyjnych wykorzystano oprogramowanie firmy Autodesk – Inventor Professional 13 w wersji edukacyjnej.

3.2. Kinematyka odwrotna robota RobIn Heart Vision

Do celów obliczenia zadania odwrotnego dla robota Robin Heart posłużono się metodą macierzową rozwiązywania równań. Z każdym punktem w przestrzeni możemy związać lokalny układ współrzędnych. Podając trzy współrzędne kartezjańskie określające translację i trzy kąty określające orientację względem bazowego układu współrzędnych. Na podstawie tych parametrów tworzymy wektor translacji o wymiarach [1x3] oraz macierz rotacji o wymiarach [3x3]. Transponowany wektor translacji i macierz rotacji wraz z wektorem odpowiedzialnym za perspektywę oraz współczynnikiem skali składają się na macierz przekształcenia jednorodnego (poniżej).

$$C = \begin{bmatrix} \begin{matrix} \text{Macierz rotacji [3x3]} & \text{Wektor translacji [3x1]} \\ \text{Wektor perspektywy [1x3]} & \text{Wsp. Skali} \end{matrix} \end{bmatrix}$$

Rys. 5. Macierz przekształcenia jednorodnego

Przyrównując odpowiadające sobie równania kinematyki prostej z wartościami macierzy przekształceń, interesującego układu współrzędnych (pozycji), można ułożyć układ równań. Na podstawie układu wyznacza się funkcje zmiennych przegubowych będące rozwiązaniem zadania odwrotnego kinematyki.

$$\theta_{\text{var}3} = \arctan 2 \left(\sqrt{\frac{C_{13}^2 + C_{33}^2}{W_1^2 + W_2^2}}, \pm \sqrt{1 - \frac{C_{13}^2 + C_{33}^2}{W_1^2 + W_2^2}} \right) + \arctan 2(W_2, W_1) \quad (3)$$

$$\theta_{\text{var}2} = \arctan 2 \left(-\frac{C_{13}}{W_1 \cdot \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cdot \cos(\theta_{\text{var}3})}, -\frac{C_{33}}{W_1 \cdot \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cdot \cos(\theta_{\text{var}3})} \right) \quad (4)$$

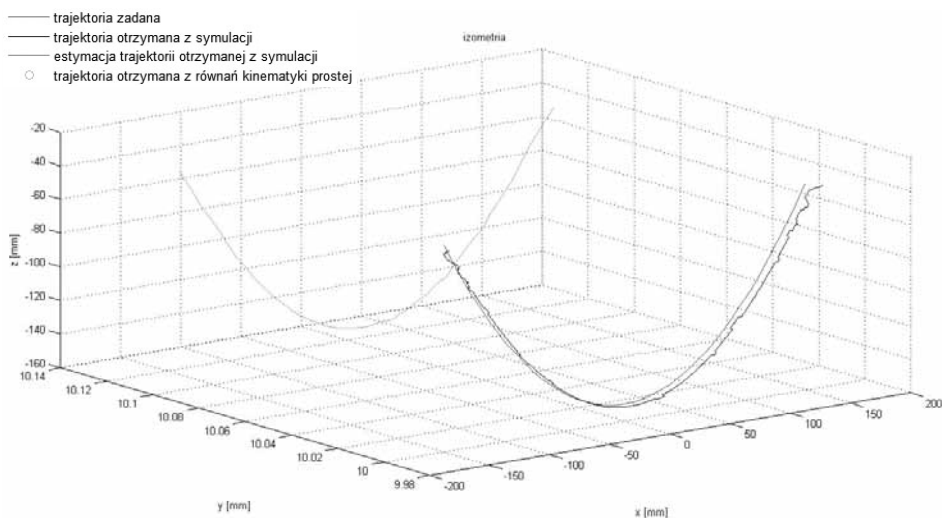
$$\theta_{\text{var}7} = \arctan 2 \left(-\frac{C_{22}}{W_1 \cdot \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cdot \cos(\theta_{\text{var}3})}, \frac{C_{21}}{W_1 \cdot \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cdot \cos(\theta_{\text{var}3})} \right) \quad (5)$$

$$d_{\text{var}6} = -\frac{(C_{34} + \cos(\theta_{\text{var}2})) (Q_1 a_4 - a_2 + a_5 (W_1 \cos(\theta_{\text{var}3}) + W_2 \sin(\theta_{\text{var}3})))}{\cos(\theta_{\text{var}3}) (W_1 \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cos(\theta_{\text{var}3}))} + \frac{a_3 (Q_5 \cos(\theta_{\text{var}3}) + Q_6 \sin(\theta_{\text{var}3}))}{\cos(\theta_{\text{var}3}) (W_1 \cdot \sin(\theta_{\text{var}3}) - W_2 \cdot \cos(\theta_{\text{var}3}))} - d_7 \quad (6)$$

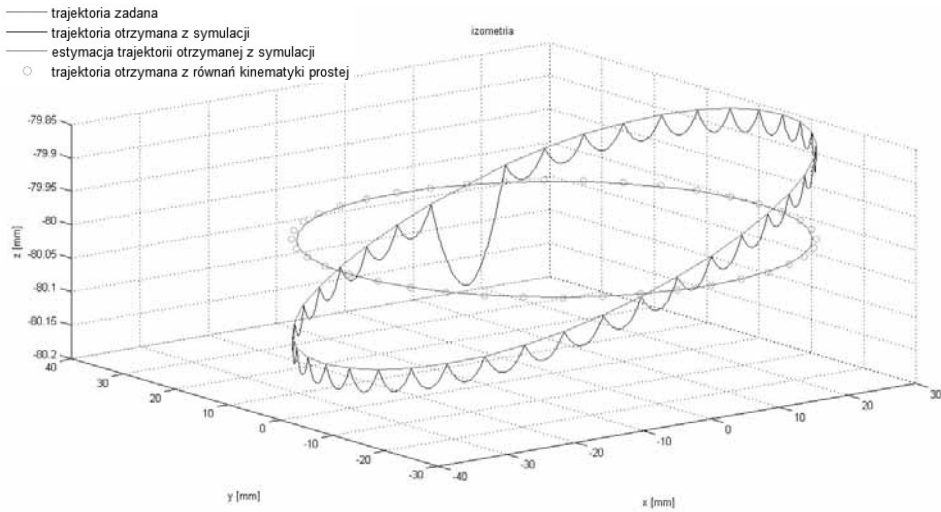
Do wyznaczenia równań zmiennych przegubowych $\theta_{\text{var}2}$, $\theta_{\text{var}3}$ i $\theta_{\text{var}7}$ posłużono się funkcją $\arctan2(y, x)$, która oblicza wartość $\arctangens(y/x)$ uwzględniając znaki zarówno przy x jak i przy y w celu wyznaczenia ćwiartki, w której leży znaleziony kąt.

3.3. Symulacje

Symulacje polegały na zadaniu trajektorii w formie zbioru punktów, na podstawie których obliczane były zmienne złączowe. Następnie otrzymane zmienne złączowe wprowadzono jako wymuszenie ruchu dla poszczególnych par kinematycznych w modelu CAD. Na tej podstawie przeprowadzono symulację, podczas której zapisywane były kolejne pozycje końcówki endoskopu. Dla porównania wyników otrzymanych przez symulację na modelu przeprowadzono drugą symulację z wykorzystaniem równań kinematyki prostej. Zmienne złączowe zostały wprowadzone jako dane wejściowe dla równań, natomiast na wyjściu otrzymano, analitycznie wyliczone, pozycje końcówki manipulatora. Wszystkie trzy trajektorie – trajektoria zadana, trajektoria wyznaczona na podstawie symulacji modelu CAD oraz trajektoria wyliczona przy pomocy równań kinematyki – w celu porównania zostały umieszczone na jednym wykresie na rysunkach 6 i 7.



Rys. 6. Symulacja trajektorii parabolicznej



Rys. 7. Symulacja trajektorii kołowej

4. Podsumowanie

W trakcie symulacji udało się uzyskać dokładność odwzorowania trajektorii na poziomie 0,15 mm. Nieregularne kształty trajektorii wyznaczonych na drodze symulacji spowodowane są wykorzystaniem tylko 41 dyskretnych punktów co w praktyce spowodowało się do obliczenia 41 pozycji manipulatora. Kształt otrzymanych trajektorii był zgodny z zadaniem, co dowodzi nie tylko poprawności przeprowadzonych obliczeń kinematyki ale również metod ich testowania.

Kolejnym krokiem powinno być przetestowanie równań kinematyki dla bardziej skomplikowanych trajektorii oraz implementacja równań w systemie sterowania rzeczywistym robotem.

Streszczenie

Powyższa praca przedstawia kompletną analizę kinematyczną robota Robin Heart Vision rozwijanego w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze. Analiza rozpoczyna się od wprowadzenia do struktury kinematycznej oraz przedstawienia podstawowych cech konstrukcji. Zaprezentowana jest metodologia postępowania przy wyznaczaniu równań kinematyki poprzedzona odpowiednim wstępem teoretycznym. W dalszej części pracy otrzymane równania są weryfikowane przy wykorzystaniu autorskiego algorytmu. Przeprowadzono symulacje sprawdzające poprawność modelu oraz obliczeń, które potwierdzają słuszność przyjętych założeń.

Literatura

- [1] Craig J. J., *Wprowadzenie do Robotyki – Mechaniki i sterowania*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1993.
- [2] Frączek J., Wojtyra M., *Kinematyka układów wieloczłonowych: metody obliczeniowe*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2008.
- [3] Nawrat Z., *Polski robot kardiochirurgiczny*. [w:] Postępy robotyki. Przemysłowe i medyczne systemy robotyczne. Red. K. Tachonia; Wydawnictwa Komunikacji i Łączności, Warszawa 2005, 117–129.
- [4] Nawrat Z., *Roboty i manipulatory w medycynie*. [w:] Mechanika Techniczna, tom XII. – Biomechanika. Red. R. Będziński. IPPT PAN, 753–827, Warszawa 2011.
- [5] Podędkowski L., *Forward and inverse kinematics of the cardio-surgical robot with non-coincident axis of the wrist*. SyRoCo 2003, 525–530.
- [6] Podędkowski L., *RobIn Heart 0, 1, and 3 – mechanical construction development*; Bulletin of the Polish Academy Of Sciences: Technical Sciences; Vol. 53, No. 1, 2005.
- [7] Podędkowski L., *Roboty medyczne: Budowa i zastosowanie*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2010.
- [8] Tejszerska D., Ilewicz G., *Studium czynności ruchowych końcówki operacyjnej telemanipulatora kardiochirurgicznego*. ZNKMS, 225–230, Gliwice 2010.

Metoda fotogrametryczna z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej jako metoda oceny postawy ciała

Justyna Drzał-Grabiec*, Maciej Rachwał*, Katarzyna Walicka-Cupryś*

Summary

Photogrammetric method with the usage of projective Mora as a method of body posture evaluation

The development of digital photogrammetric within the last years has led to devise commercial systems served to widely understood humans' body measurements.

Photogrammetric method used for evaluation of humans' body measurement makes use of the projective mora phenomenon known from optics. Reaching the spatial view is able due to the device projecting the lines with the defined parameters. Those lines fall on the back with the certain angle and it undergo distortions depending on the specific points being placed further or closer to the device. Those distortions are recorded by the computer which because of the numeric algorithm process it to level map of analyzed surface.

Photogrammetric examination cannot replace medical or radiological examination because it is an external examination and it do not reveal any structural changes, level of skeleton maturity etc. However, it is a not-invasive method, though it can be performed unlimitedly and in the cases that do not require radiological examination.

Keywords: photogrammetric, body posture, scoliosis

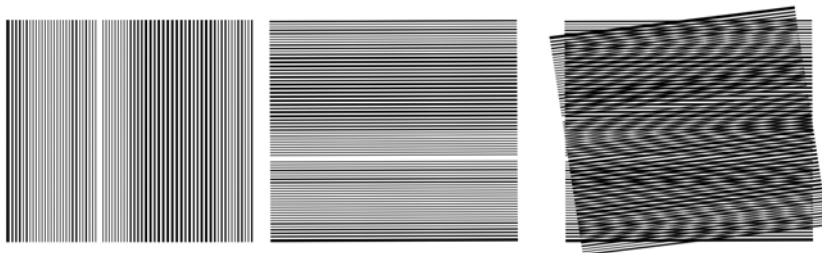
Wprowadzenie

Fotogrametria to dziedzina nauk technicznych zajmująca się pozyskiwaniem informacji o kształcie obiektu, jego usytuowaniu względem innych obiektów w przestrzeni, ewentualnie ich przemieszczeniu lub odkształceniu [8].

W typowych badaniach posturometrycznych, ukierunkowanych na wykrywanie wad postawy, postawę ocenia się w swobodnej pozycji stojącej tzw. habitualna. Oceniany układ ciała porównywany jest do pewnych wzorców tzw. normatywów z uwzględnieniem płaszczyzny czołowej, strzałowej i poprzecznej. Trzeba jednak pamiętać, że postawę ciała charakteryzuje indywidualność i zmienność. Jest ona bowiem cechą osobniczą, zmienną w ciągu całego życia, a nawet w ciągu dnia, pod wpływem różnych czynników. Warto zwrócić uwagę na to, że często trudno jest jednoznacznie wypowiedzieć się na temat jakości postawy danego osobnika [16].

* Instytut Fizjoterapii UR.

Metoda fotogrametryczna wykorzystuje znane w optyce zjawisko mory projekcyjnej. Uzyskanie obrazu przestrzennego możliwe jest dzięki temu, iż urządzenie „wyświetla” na plecach pacjenta linie o ściśle określonych parametrach, które ulegają interferencji (Ryc. 1). Zniekształcenia obrazu linii rejestrowane są przez komputer, który dzięki algorytmom numerycznym przetwarza je na mapę warstwicową (wysokościową) badanej powierzchni (Ryc. 2).



Ryc. 1. Zjawisko mory



Ryc. 2. Przykładowe badania fotogrametryczne z mapą warstwicową na plecach badanego

Początkowo w fotogrametrii korzystano z rastra mechanicznego i zwykłych technik fotograficznych, co – poza koniecznością obróbki zdjęć – stwarzało dodatkową niedogodność, w postaci żmudnego i czasochłonnego opracowania uzyskanych w ten sposób fotogramów. Cały ten proces znacznie usprawniło wprowadzenie rastra optycznego i rejestracja obrazu przez kamerę cyfrową, co umożliwiło z kolei wprowadzenie go do komputera i dalszą, szybką obróbkę danych [7, 17]. Rozwój metody odbywał się dwukierunkowo. Po pierwsze, dziś coraz częściej zastępuje się raster mechaniczny optycznym, który stanowi diapozytyw prążków rzutowanych na ciało badanego z projektora do przeźroczy. Drugi natomiast kierunek wiąże się z rozwojem techniki komputerowej. Uzyskany dzięki zastosowaniu rastra obraz obiektu może być bowiem odebrany przez specjalny układ optyczny z kamerą, a następnie

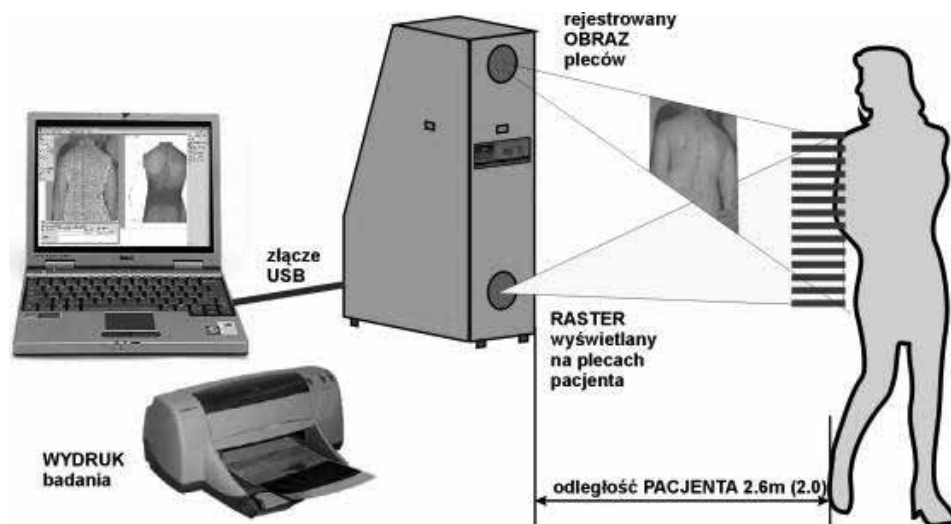
przekazany do komputera, który dzięki odpowiedniej karcie i programowi, dokona właściwej analizy postawy badanego. Wobec znacznej zbieżności wyników uzyskanych poprzez takie badania z wynikami badań klinicznych i radiologicznych [10] metoda

ta pozwala na eliminowanie części badań rentgenowskich i częstsze obiektywne kontrolowanie stanu osoby z wadą postawy.

Badanie fotogrametryczne nie zastępuje badania lekarskiego, ale może być cennym badaniem uzupełniającym. Badanie to nie zastępuje też badania radiologicznego, ponieważ jest to pomiar zewnętrzny, nie informujący o ewentualnych zmianach strukturalnych, stopniu dojrzałości szkieletu itp. Jest to jednak badanie nieinwazyjne (operowane światłem widzialnym), wobec czego może być ono powtarzane bez ograniczeń i wykonywane w tych przypadkach, gdzie potrzebujemy często informacji o np. postępach rehabilitacji, a nie ma jeszcze wskazań do badania radiologicznego. Dokładność fotogrametrii oceniana jest na 94% [17]. Ewentualne błędy radiogramu przy wyznaczaniu kąta Cobba określa się na 5–7,2% [6].

Jedną z zalet fotogrametrii jest możliwość rejestrowania nawet niewielkich zmian i odchyłeń [1, 5]. Metoda fotogrametryczna służy do oceny postawy ciała i dostarcza bardziej wiarygodnych informacji niż badanie oglądowe [12]. Jej zaletą jest możliwość zapisywania plików cyfrowo. Analizując wyniki badań własnych oraz badania innych autorów nasuwają się czytelne wnioski dotyczące rzetelności fotogrametrii jako metody oceny postawy ciała. Istotnym argumentem jest zgodność fotogrametrii z badaniem rentgenowskim, które jest uważane obecnie za standard w diagnostyce skolioz [11, 15, 9, 13, 12, 4, 3]. Pojawianie się nowych metod oceny postawy ciała, takich jak metoda fotogrametryczna z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej stwarza możliwość zminimalizowania ilości zdjęć rtg. Wykonując badanie fotogrametryczne w pierwszej kolejności, tylko niewielką część pacjentów należałoby kierować na badanie rentgenowskie.

Istotną wartością badania fotogrametrycznego – zwłaszcza w odniesieniu do bocznych skrzywień kręgosłupa – jest to, że od razu obrazuje ono zmiany w trzech płaszczyznach.



Ryc. 3. Schemat badania z wykorzystaniem aparatury do komputerowej oceny postawy ciała systemu MORA 4 Generacji [14]

Przy mniejszych skrzywieniach od początku znany jest stopień rotacji, a później wysokość garbu żebrowego tylnego. W zaawansowanych skoliozach pojawia się jednak problem, w postaci mniejszej precyzji pomiaru wielkości kąta skrzywienia. Wynika to przede wszystkim z torsji, a ściślej mówiąc z przesunięcia wyrostków kolczystych względem rzeczywistej osi.

Jednym z powszechnie używanych urządzeń jest aparatura Systemu MORA 4 Generacji, firmy CQ Elektronik System, łącząca zalety systemów analizy przestrzennej typu MORA/ISIS i laboratoriów analizy ruchu/chodu opartych na markerach. Jednocześnie odpowiada ona założeniu aby badanie było proste i szybkie. Schemat badania przedstawia Rycina 3.

System pozwala na wykonywanie:

- testów statycznych takich jak badanie postawy ciała (analiza trójpłaszczyznowa krzywej kręgosłupa, ustawień łopatek, garbu żebrowego itp.)
- testów dynamicznych przy rejestracji sekwencji ruchowych np. skłon, uniesienie ręki (pomiar ruchomości, zakresów ruchu)
- testów korekcyjnych np. zachowanie kręgosłupa przy wymuszonej korekcji ustawienia miednicy, gorsetowaniu, kinesiotapinkgu itp.
- testów porównawczych np. obserwacja progresji skoliozy w krótkich okresach czasowych
- ćwiczeń autokorekcyjnych (biofeedback)
- dokumentacji fotogrametrycznej sylwetki

Podstawowe cechy techniczne:

- Rejestracja przestrzenna całej obserwowanej powierzchni 3D
- Bardzo krótki czas pojedynczego pomiaru wynoszący ok.1/30 s
- Możliwość rejestracji ruch (sekwencji) 4D = 3D+TIME
- Bardzo łatwe podłączenie do komputera przez port USB
- Przyjazne, łatwe w obsłudze, oprogramowanie w języku polskim
- Możliwość pracy w trybie synchronizacji z kamerami (CQ-KAM), stanowiskiem STOP2, platformą stabilometryczną, wagą 2P, EMG, termowizją itp.
- Niewielkie wymiary i neseserowa obudowa czynią ten system całkowicie mobilnym
- Krótki czas przygotowania pacjenta i wykonania badania – ok. 4–5min [14].

Powtarzalność metody zapewniają wstępne założenia, np. wykonania samego pomiaru w ciemności, korekcji ustawienia miednicy względem kamery, jak i samej (stałej) odległości badanego od urządzenia. W praktyce nie jest możliwe pokazanie na skórze pacjenta punktów fizjologicznych z dokładnością większą niż 15 mm, \pm 5mm. Z tego powodu należy przyjąć, iż wartość 1cm jest granicą dokładności metody z uwagi na cechy fizjologiczne. Dokładność samej aparatury jeżeli chodzi o rozdzielczość obrazu i wartość liczonych parametrów wynosi 1mm. W praktyce nie jest możliwe pokazanie na skórze pacjenta punktów fizjologicznych z dokładnością większą niż 15 mm, \pm 5mm. Z tego powodu należy przyjąć, iż wartość 1cm jest granicą dokładności metody z uwagi na cechy

fizjologiczne mimo, iż metoda jest aż 10 razy dokładniejsza niż to konieczne z punktu widzenia fizjologii. Schemat badania przedstawia rycina 3.

Przygotowanie stanowiska pomiarowego i możliwe błędy

Aby badanie zostało wykonane w sposób prawidłowy oraz aby mogło być powtarzalne należy wykonać je zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta. Istotnym jest aby zadbać o zaciemnienie pomieszczenia w którym będzie wykonywane badanie. W kolejnym etapie należy odmierzyć odpowiednią odległość od kamery do miejsca gdzie będzie stał pacjent (2,6 m). Istotnym jest wypoziomowanie kamery, za pomocą „nóżek” obserwując poziomice. W trakcie nanoszenia charakterystycznych punktów antropometrycznych zachodzi problem z ich właściwym oznaczeniem, błąd ten szacuje się na ± 5 mm. Kolejnym możliwym błędem jest błąd pozycjonowania na monitorze punktów charakterystycznych, który zależy od doświadczenia operatora, rozdzielczości ekranu w poszczególnych płaszczyznach, wielkości plamki świetlnej oraz kontrastu zaznaczonych punktów.

Przebieg badania

1. Badanie antropometryczne:

- wysokość ciała przy użyciu antropometru (z dokładnością do $\pm 0,5$ cm),
- masa ciała przy użyciu wagi elektronicznej (z dokładnością do $\pm 0,1$ kg).

2. Postawa habitualna badanego tyłem do kamery (badamy postawę nawykową pacjenta, kąt skręcenia miednicy wynosi 0, badane dziecko powinno stać na obu nogach, w postawie swobodnej. Głowa powinna być skierowana na wprost – patrzeć „na cień swoich uszu”, ręce opuszczone luźno po bokach). Osoba badana staje w wyznaczonym miejscu tak, aby znaleźć się w polu widzenia kamery, w stałej odległości (2, 6 metra od kamery), a jej obraz jest bezpośrednio widoczny na ekranie komputera.

3. Oznaczenie na skórze pleców badanego, za pomocą markerów (o średnicy 1 cm), punktów potrzebnych do scharakteryzowania postawy ciała:

C 7 – wyrostek kolczysty siódmego kręgu szyjnego

K P – szczyt kifozy piersiowej

P L – przejście odcinka piersiowego kręgosłupa w odcinek lędźwiowy

L L – szczyt lordozy lędźwiowej

S 1 – wyrostek kolczysty pierwszego kręgu krzyżowego

Ł l – dolny kąt łopatki lewej

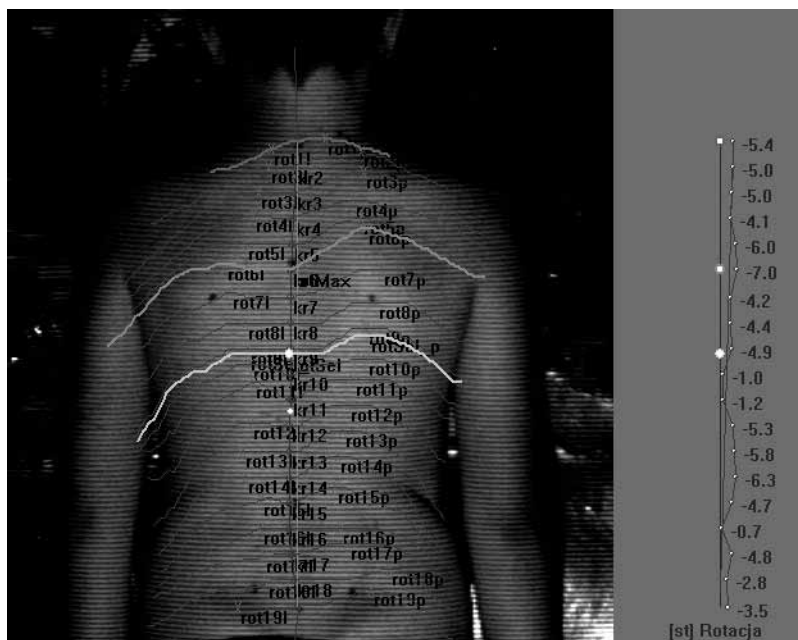
Ł p – dolny kąt łopatki prawej

M l – kolec biodrowy tylny górny lewy

M p – kolec biodrowy tylny górny prawy

4. Po wpisaniu niezbędnych danych o badanym (imię i nazwisko, rok urodzenia, ciężar ciała, wzrost, uwagi: o stanie kolan i pięt, klatki piersiowej, przebytych urazach, zabiegach chirurgicznych, chorobach narządu ruchu, chodzie, itd.) następuje rejestracja w pamięci komputera cyfrowego obrazu pleców (ryc. 4).

Z kilkudziesięciu rejestrowanych zdjęć komputer automatycznie wybiera ujęcie odpowiadające prawidłowemu ustawieniu pacjenta.



Ryc. 4. Zdjęcie badanego z naniesionymi punktami antropometrycznymi oraz widoczną mapą warstwicową pleców, po stronie prawej widoczny kształt krzywizn przednio-tylnych wraz z oznaczonymi punktami C7, szczytem kifozy piersiowej, przejściem kifozy piersiowej w lordozę lędźwiową, szczytem lordozy lędźwiowej oraz kością krzyżową. Zdjęcie przedstawia pacjenta z asymetrią barków, łopatek i skolioza z rotacją. Źródło: opracowanie własne

5. Po wykonaniu zdjęcia i przeniesieniu go do komputera należy nanieść za pomocą kursora na ekranie monitora punkty antropometryczne, wcześniej zaznaczone na ciele pacjenta, na ich podstawie wygenerowany zostanie trójwymiarowy obraz. Na podstawie uzyskanych fotogramów uzyskujemy kilkadziesiąt parametrów opisujących postawę ciała. Parametry wykorzystane w badaniach przedstawiono i omówiono w tabeli

6. Opracowanie obrazów odbywa się bez udziału badanego.

7. Po dokonaniu analizy następuje wydruk wyznaczonych parametrów i rysunków [14]. Przykładowy wydruk przedstawia Rycina 5.

Nazwisko i imię:
Wywiad:

Wzrost: 120 cm, Rok ur.:

Data badania:

Kąty pochylenia odcinków

Lędźwiowo-krzyżowego: ALFA 13.1 [st]
Piersiowo-lędźwiowego: BETA 13.7 [st]
Piersiowego górnego: GAMMA 18.0 [st]

Wskaźnik kompensacji: MI=GAMMA-ALFA 4.8 [st]
Kąt pochylenia tułowia 0.7 [st]

Kifoza piersiowa

Kąt kifozy piersiowej 148.4 [st]
Stosunek głębokości do długości 0.120

Głębokość kifozy piersiowej 27 [mm]
Proporcja (C7-PL):(C7-S1) = 60.2%

Lordoza lędźwiowa

Kąt lordozy lędźwiowej 153.2 [st]
Stosunek głębokości do długości -0.2

Głębokość lordozy lędźwiowej -25 [mm]
Proporcja (C7-PL):(C7-S1) = 39.8%

Płaszczyzna czołowa

Kąt nachylenia tułowia 3.7 [st]

Lewy bark wyżej o 20 [mm]

Lewa łopatka niżej o 26 [mm], bliżej o 3 [mm]

Lewy trójkąt talii niższy o 45 [mm] węższy o 31 [mm]

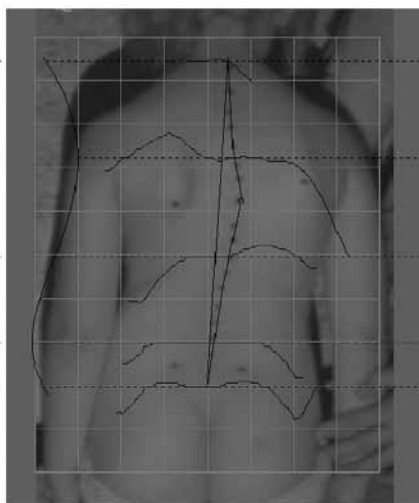
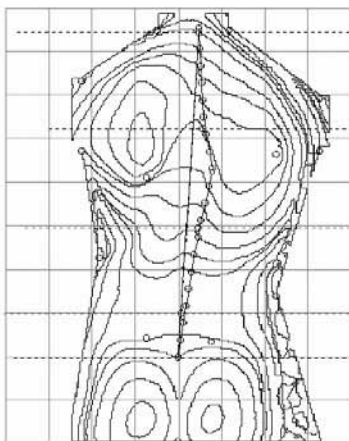
Lewy kołec biodrowy tylny górny wyżej o 4 [mm], dalej o 2 [mm]

Kąt nachylenia miednicy -3.0 [st], kąt skręcenia 1.7 [st]

Maksymalne odchylenie kręgosłupa od prostej C7-S1: 26 [mm] na wys.Th8

Liczba łuków 1, liczba przecięć kręgosłupa z linią C7-S1 0

Łuk kręgosłupa prawostronny: długość 374 [mm], strzałka 26 [mm], kąt 163.9 [st]



Ryc. 5. Przykładowy wydruk badania kręgosłupa u pacjenta ze skoliozą który badany otrzymuje. Na wydruku opisano liczone parametry w obrębie kręgosłupa i stóp, przedstawiono mapy warstwicowe stóp i pleców oraz dołączono opis badania wraz z diagnozą i zaleceniami.

Tabela 1. Charakterystyka parametrów postawy ciała użytych w pracy

Nr	Parametry		
	Symbol	Jednostka miary	Nazwa i opis
1	Alfa α	Stopnie	Kąt nachylenia odcinka lędźwiowo krzyżowego kręgosłupa.
2	Beta β	Stopnie	Kąt nachylenia odcinka piersiowo-lędźwiowego kręgosłupa.
3	Gamma γ	Stopnie	Kąt nachylenie odcinka piersiowego górnego kręgosłupa.
4	Delta	Stopnie	Łączna wielkość krzywizn: DELTA=ALFA+BETA+GAMMA.
5	KKP	Stopnie	Kąt kifozy piersiowej: $KKP = 180 - (\beta + \gamma)$.
6	KLL	Stopnie	Kąt lordozy lędźwiowej: $KLL = 180 - (\alpha + \beta)$.
7	MI	-	Wskaźnik kompensacji $MI = KKP - KLL$ – jeżeli przyjmuje wartości dodatnie świadczy o przewadze kifozy nad lordozą, jeżeli wartości ujemne to odwrotnie.
8	KPT	Stopnie	Kąt pochylenia tułowia do przodu lub tyłu – określony jest odchyleniem linii C7-S1 od pionu do przodu względem płaszczyzny czołowej przechodzącej przez S1. Wartość jest dodatnia, jeżeli C7 leży dalej niż S1, ujemna, jeżeli C7 leży bliżej niż S1.
9	DCK	mm	Wysokość kręgosłupa – wynik stanowi odległość pomiędzy punktami C7 i S1, która liczona jest jedynie w osi pionowej. Parametr procentowy liczony jest tak jak wyżej.
10	DKP	mm	Długość C7-KP. Położenie szczytu kifozy liczone od C7.
11	GKP	Stopnie	Głębokość KP-PL.
12	RKP	mm	Długość C7-PL – wysokość kifozy liczona pomiędzy C7 a PL.
13	DLL	mm	Długość S1-LL – położenie szczytu lordozy liczona od S1.
14	RLL	mm	Długość S1-PL – wysokość lordozy liczona pomiędzy S1 a punktem przejścia.
15	WKP	-	Wskaźnik stosunku głębokości do długości $WKP = GKP/RKP$.
16	GLL	Stopnie	Głębokość LL-PL.
17	WLL	-	Wskaźnik stosunku głębokości do długości $WLL = GLL/RLL$.
18	WBC	-	Współczynnik asymetrii barków względem punktu C7 – identycznie jak parametr [26], z tym, że punkt odniesienia stanowi wyrostek kolczysty siódmego kręgu szyjnego (wskaźnik C7).
19	KLB	Stopnie	Kąt nachylenia linii barków – wszystkie dane liczone analogicznie jak dla nachylenia linii miednicy (parametr [15]).

Nr	Parametry		
	Symbol	Jednostka miary	Nazwa i opis
20	KSM	Stopnie	Kąt skręcenia miednicy – kąt między linią przechodzącą przez punkt ML i będącą jednocześnie prostopadłą do osi kamery a prostą przechodzącą przez ML i MP. Miednica skręcona w prawo, gdy wynik jest dodatni „+”, w lewo, gdy wynik jest ujemny „-”.
21	KNT	Stopnie	Kąt zgięcia tułowia w bok – określony jest odchyleniem linii C7-S1 od pionu, gdy punkt C7 położony jest na lewo od S1 to wynik ujemny „-”, jak na prawo to wynik jest dodatni „+”.
22	UB	mm	Ustawienie barków (UB) – różnica wysokości ustawienia barków.
23	UL	mm	Ustawienie dolnych kątów łopatek – różnica w wysokości usytuowania dolnych kątów łopatek.
24	OL	mm	Odległość dolnych kątów łopatek od linii kręgosłupa – różnica w odległości dolnych kątów łopatek od kręgosłupa.
25	UK	mm	Odchylenie wyrostków kolczystych – największe odchylenie wyrostka kolczystego od linii łączącej punkty C7 i S1. Odległość jest mierzona w osi pionowej, gdy punkt położony jest na lewo od linii C7-S1 to wynik jest ujemny „-”, gdy na prawo to wynik jest dodatni „+”.
26	KNM	Stopnie	Kąt nachylenia miednicy – kąt między linią poziomą a prostą przechodzącą przez punkty M1 i Mp. Prawy talerz biodrowy wyżej „+”, lewy talerz biodrowy wyżej „-”.

Badanie fotogrametryczne z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej jest cennym i potrzebnym narzędziem w określaniu prawidłowości, bądź istniejących tendencji w postawie ciała. Niestety często badanie wykonane jest nieprawidłowo, a wynik źle interpretowany. Ponadto samo badanie fotogrametryczne, bez badania klinicznego i funkcjonalnego ma niewielką wartość w diagnostyce wad postawy ponieważ nie opublikowano dotąd norm do których można odnieść wartości podane na wydruku. Zatem wartości te są zupełnie nieużyteczne klinicznie. Warunkiem wykonania badania fotogrametrycznego powinno być połączenie go z badaniem klinicznym i funkcjonalnym pacjenta aby postawić diagnozę i zalecić odpowiednie postępowanie fizjoterapeutyczne.

Badanie fotogrametryczne z wykorzystaniem zjawiska mory projekcyjnej jest interesującym narzędziem, również w badaniach naukowych, nie po to aby określać konkretne wartości liczbowe i do nich się odnosić, ale aby określać i badać tendencje w zmianach wartości parametrów postawy ciała zachodzących po zadziałaniu różnego rodzaju czynników czy w konkretnych grupach badanych.

Omawiane w pracy badanie jest przydatne i cenne dla wizualizacji i diagnostyki postawy, stwarza wiele możliwości. Przeprowadzone prawidłowo pozwala zmniejszyć ilość

wykonywanych zdjęć rentgenowskich. Jednak aby miało swoją wartość diagnostyczną, badanie musi być rzetelnie przeprowadzone, w prawidłowych, powtarzalnych warunkach i przez osoby odpowiednio do tego przeszkolone.

Streszczenie

Rozwój fotogrametrii cyfrowej pozwolił w ostatnich latach na opracowanie komercyjnych systemów służących do szeroko rozumianego pomiaru ciała ludzkiego.

Metoda fotogrametryczna wykorzystywana do oceny postawy ciała wykorzystuje znane w optyce zjawisko mory projekcyjnej. Uzyskanie obrazu przestrzennego możliwe jest dzięki temu, iż urządzenie „wyświetla” na plecach pacjenta linie o ściśle określonych parametrach. Linie te padając pod określonym kątem na plecy ulegają zniekształceniom są one rejestrowane są przez komputer, który dzięki algorytmom numerycznym przetwarza je na mapę warstwicową (wysokościową) badanej powierzchni.

Badanie fotogrametryczne nie zastępuje badania lekarskiego ani badania radiologicznego, ponieważ jest to pomiar zewnętrzny, nie informujący o ewentualnych zmianach strukturalnych, stopniu dojrzałości szkieletu itp. Jest to jednak badanie nieinwazyjne wobec czego może być ono powtarzane bez ograniczeń i wykonywane w tych przypadkach, gdzie nie ma jeszcze wskazań do badania radiologicznego.

Literatura

- [1] ASPRS American Society for Photogrammetry and Remote Sensing. What is ASPRS? Bethesda: American Society for Photogrammetry and Remote Sensing.
- [2] Bąk S., *Postawa ciała, jej wady i leczenie*, PZWL, Warszawa, 1964.
- [3] Braun B. L., Amundson L. R., *Quantitative assessment of head and shoulder posture*. Arch Phys Med Rehabil 1989; 70: 322–329.
- [4] Iunes D., Castro F., Salgado H., Moura I., Oliveira A., Bevilaqua-Grossi D., *Intra and inter-examiner reliability and method repeatability of postural evaluation via photogrammetry*. Rev Bras Fisioter 2005; 9: 327–334.
- [5] Kernozek T. W., Greer N. L. *Quadriceps angle and rearfoot motion: relationships in walking*. Arch Phys Med Rehabil 1993; 74: 407–10.
- [6] Kilian J. T., Mayberry S., Wilkinson L. *Aktualne poglądy dotyczące samoistnej skoliozy wieku młodzieńczego*. Medycyna Praktyczna – Pediatria 2001; 1: 55–61.
- [7] Nowotny J., Zawieska D., Saulicz E., *Fototopografia z wykorzystaniem rastra optycznego i komputera jako sposób oceny postawy ciała*. Postępy Rehabilitacji 1992; 6(1): 15–23.
- [8] Pilgrim L. J., *History of photogrammetry in medicine*. Australasian physical and engineering sciences in medicine 1992; 15(1): 1–8.
- [9] Prętkiewicz-Abacjew E., Wróblewska A., Zajt-Kwiatkowska J., Rogo B., Zeyland-Malawka E., *Spostrzeżenia i uwagi dotyczące oceny postawy ciała na podstawie badania metodą fotogrametryczną*, Pediatria Polska 2001; LXXVI, 9, s. 643–650.
- [10] Rogala E., *Metody wczesnego wykrywania skolioz*. [W]: *Wczesne wykrywanie i zapobieganie progresji bocznych skrzywień kręgosłupa*. Red. Dega . PZWL, Warszawa, 1983: 79–85.

- [11] Ruggeri Saad K., Siqueira Colombo A., Ribeiro A. P., Amado João A. M., *Reliability of photogrammetry in the evaluation of the postural aspects of individuals with structural scoliosis*, Journal of Bodywork & Movement Therapies 2012; 16, 210–216.
- [12] Saad K. R., Colombo A. S., Ribeiro A. P., João S. M. A. *Reliability of photogrammetry in the evaluation of the postural aspects of individuals with structural scoliosis*. Journal of Bodywork and Movement Therapies 2012; 16, 2: 210–216.
- [13] Saad K. R., Colombo A. S., Amado João S. M. *Reliability and Validity of the Photogrammetry for Scoliosis Evaluation: a Cross-Sectional Prospective Study*. Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics 2009; 32, Issue 6, July 2009, Pages 423–430.
- [14] Świerc A., *Komputerowa Diagnostyka Wad Postawy – Instrukcja obsługi*. CQ Elektronik System, Czernica Wrocławska, 2011.
- [15] Thometz J. G., Lamdan R., Liu X. C., Lyon R., *Relationship between Quantec measurement and Cobb angle in patients with idiopathic scoliosis*. J Pediatr Orthop. 2000; 20(4):512–6.
- [16] Zawieska D. i wsp. *Fotogrametria – mity i rzeczywistość* 2002; 4(4):498–502.
- [17] Zawieska D., Nowotny J., Podlasiak P., *System diagnozowania oraz kontrolowania sutków leczenia wad postawy z wykorzystaniem techniki mory*. Urząd Patentowy RP, Nr-P296611, 1992.

