

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Kwartalnik

Tom 59

Zeszyt 1•2020

STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:

PMKMAV 59 (1)

2020

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)

Impact Factor ISI = 0,298 (2018)

Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

<http://www.pm.microbiology.pl>

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOŚLAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541312; e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

AGNIESZKA SOBOLEWSKA-RUTA (Sekretarz)
Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa
tel. 22 3786229, e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPLAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski)
ALEKSANDER DEPTUŁA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM)
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Adhezja komórek *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 do ludzkich komórek nabłonkowych linii HEC-1-B.
Preparatyka: mgr Jagoda Płaczkiwicz i dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Pracownia Inżynierii Nanohybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki
i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczka Polskiej Akademii Nauk.
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel.: 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

OD WIELKIEJ GENETYKI DO NEUROPSYCHOLOGII – ZARYS HISTORII BADAŃ NAD POWIĄZANIEM MIKROBIOMU Z ZACHOWANIEM CZŁOWIEKA

Dominik Czajeczny*, Karolina Kabzińska, Rafał Wojciech Wójciak

Katedra i Zakład Psychologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Po sukcesie Projektu Poznania Genomu Ludzkiego, w wyniku którego oszacowano liczbę genów u człowieka na jedynie 30–40 tysięcy, badacze skierowali swoją uwagę na ogromną pulę dodatkowych genów obecnych w ciele i na powierzchni ciała człowieka. Same tylko jelita są siedliskiem dla nawet 1000 szczepów bakterii i innych mikroorganizmów. Mikroorganizmy współzyczące z człowiekiem dostarczają pulę 2–4 milionów dodatkowych genów. W 2009 roku postawiono hipotezę mówiącą, że zmiany kompozycji mikrobiomu wychwytywane są przez neurony zlokalizowane na całej długości jelita i komunikowane do mózgu, tworząc tzw. oś mózgowo-jelitową, której głównym szlakiem jest nerw błędny. Poza wpływem na funkcjonowanie układu trawienno i odpornościowego, pierwsze badania prowadzone w obszarze neuropsychologii wskazują, że mikrobiom jelitowy powiązany jest także z funkcjonowaniem osi HPA, a przez to z regulacją pobudzenia i emocji. Badania sugerują także związek z funkcjonowaniem poznawczym. Jak na razie, mechanizmy tych oddziaływań pozostają w dużej mierze nieznane. Historia badań nad mikrobiomem człowieka obrazuje złożoną naturę naszego funkcjonowania i potrzebę integrowania wiedzy pochodzącej z dziedzin, na pierwszy rzut oka, bardzo odległych, jak mikrobiologia i psychologia. Dopóki związki pomiędzy człowiekiem a jego mikrobiomem nie zostaną poznane, nasza wiedza o ludzkiej biologii i zachowaniu będzie niekompletna.

1. Projekt Poznania Ludzkiego Genomu. 2. W poszukiwaniu brakujących genów. 3. Projekt Poznania Ludzkiego Mikrobiomu. 4. Poszukiwanie struktury w nieskończoności. 5. Oś mózgowo-jelitowa, w kierunku neuropsychologii. 6. Podsumowanie

FROM GREAT GENETICS TO NEUROPSYCHOLOGY – OUTLINE OF THE RESEARCH ON THE ASSOCIATION BETWEEN MICROBIOTA AND HUMAN BEHAVIOUR

Abstract: After the success of the Human Genome Project, which led to estimating the number of human genes at only about 30–40 thousand, researchers started paying attention to a great number of genes present inside and on the surface of the human body. The gastrointestinal tract alone is a habitat for up to 1000 species of bacteria and other microorganisms. These microorganisms add a pool of 2–4 million additional genes. In 2009, a hypothesis was proposed that changes in microbiota are sensed by neurons localized along the entire bowel length, and communicated to the brain, making up the gut-brain axis. The vagus nerve seems to serve as the main communication path. Besides affecting gastrointestinal tract functions, primary neuropsychological studies show that gut microbiota is linked to HPA activity, and thus with arousal regulation and emotional functions. Research also suggests a link to cognitive functions. For now, mechanisms of those connections remain, for the most part, unknown. History of the research on human microbiota shows a complex nature of human functions and the need for integration of knowledge from, as it may seem, distant branches of science, like microbiology and psychology. While connections between microbiota and host organism remain unrecognized, our knowledge of human biology will be incomplete.

1. Human Genome Project. 2. In search for the missing genes. 3. Human Microbiome Project. 4. In search for the structure in infinity. 5. Gut-brain axis, towards neuropsychology. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: genom człowieka, mikrobiom jelitowy, psychologia

Key words: human genome, gut microbiota, psychology

1. Projekt Poznania Ludzkiego Genomu

Gwałtowny rozwój badań nad mikroorganizmami zasiedlającymi przewód pokarmowy człowieka i jego znaczeniem dla całego organizmu jak też zachowania, związany był w dużej mierze z opublikowaniem pierwszej kompletnej sekwencji genomu ludzkiego.

W 1964 roku, Vogel [74] opublikował pracę, w której zawarł obliczenia szacujące liczbę genów u człowieka. Bazując na ówczesnej wiedzy i czyniąc szereg założeń, uzyskał liczbę rzędu 6,7 miliona genów. Nawet

wówczas, badacz ten uznał tę liczbę za „niepokojąco wysoką”. Wtedy nie było jeszcze wiadomo, że między genami kodującymi białka znajdują się liczne sekwencje niekodujące (introny), jak też – powtarzające się, tworzone przez liczne mutacje punktowe, sekwencje – tzw. nonsensowne [60]. Korzystając z coraz bardziej zaawansowanych narzędzi molekularnych, kolejni naukowcy podejmowali się szacowania liczby genów człowieka [1, 6, 26, 28]. Wyniki tych szacunków przynosiły coraz niższe liczby. Raport opublikowany w 1990 roku przez National Institutes of Health (NIH) oraz Department of

* Autor korespondencyjny: Dominik Czajeczny, Katedra i Zakład Psychologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań; e-mail: d.czajeczny@gmail.com

Energy (DE) [3] zawierał już szacunkową liczbę genów wynoszącą około 100 000. W 2000 roku praca Ewinga z zespołem [26] przewidywała istnienie 35 000 genów kodujących białka w genomie człowieka. Spodziewano się, że dokładną liczbę genów pozwoli ustalić dopiero wykonanie pełnej sekwencji genomu. To wymagało jednak powołania projektu naukowego na niespotykaną do tamtej pory skalę.

Jak opisał Collins z zespołem [19], pierwsze poważne dyskusje na temat możliwości ustalenia pełnej sekwencji ludzkiego genomu zostały zainicjowane w 1985 roku przez kanclerza Uniwersytetu Kalifornijskiego w Santa Cruz – Roberta Sinsheimera. Naukowcy podają w artykule [19], że większość środowisk naukowych uznało wtedy pomysł za szalony, lub w najlepszym wypadku – przedwczesny. Projekt nabrał tempa, kiedy kierownictwo przejął James D. Watson, laureat Nagrody Nobla z 1962 roku, którą przyznano mu za opisanie struktury DNA.

W 1986 roku, DeLisi z amerykańskiego DE zdecydował o rozpoczęciu finansowania badań nad sekwencjonowaniem i mapowaniem DNA człowieka [19]. W 1988 roku U.S. National Research Council of the U.S. National Academy of Sciences rekomendowała powołanie Human Genome Project (HGP), wnioskując o finansowanie wynoszące około 200 milionów dolarów rocznie. Projekt miał trwać 15 lat [19]. W 1990 roku Kongres utworzył budżet dla HGP i wyznaczył termin realizacji na rok 2005. W październiku 1989 roku, kilka tysięcy naukowców różnych specjalizacji zgromadziło się w San Diego, na konferencji „Human Genome 1” [29]. Oficjalne rozpoczęcie projektu związane było z opublikowaniem w 1990 manifestu Jamesa D. Watsona, który ukazał się w czasopiśmie *Science* [77]. Projekt stanął pod znakiem zapytania w 1998 roku. W dniu 9 maja, spółka Perkin-Elmer, będąca właścicielem Applied Biosystems – największego producenta sprzętu laboratoryjnego i odczynników do sekwencjonowania DNA, ogłosiła plan zsekwencjonowania ludzkiego genomu z wykorzystaniem prywatnego finansowania [58]. Jak opisywał Olson [58], na czele projektu miał stanąć biolog molekularny – Craig Venter. Nowe przedsięwzięcie nazwano Celera (nazwa wywiedziona została od łacińskiego słowa *accelerātiō*, oznaczającego przyspieszenie). Spółka twierdziła, że jest w posiadaniu technologii umożliwiającej zrealizowanie celu w okresie 3 lat, przy ułamku HGP i przy utrzymaniu rygorystycznej kontroli jakości. Wynik miał zostać upubliczniony, z wyjątkiem „skromnej liczby” sekwencji, które zostałyby opatentowane. Jeśli zapowiedzi okazałyby się prawdziwe, zasadność dalszego publicznego finansowania HGP stanęłaby pod znakiem zapytania. Agresywna kampania medialna Craiga Ventera tworzyła narrację o „naukowcu – indywidualiście, który występuje przeciwko zabetonowanemu układowi pozabawionemu wyobraźni”.

Subcommittee on Energy and Environment of the Committee on Science of the U.S. House of Representatives zorganizował 17 czerwca 1998 przesłuchanie [72], mające na celu zweryfikować, czy Celera jest projektem uzupełniającym wobec HGP, czy też może potencjalnie sprawić, że ten drugi okaże się zbyteczny [58]. Po przesłuchaniach, Francis Collins, dyrektor National Human Genome Research Institute of the National Institutes of Health, wydał oświadczenie mówiące, że zapewnienia Ventera o upublicznieniu sekwencji przez Celera Corporation nie są dla spółki w żaden sposób wiążące, dlatego też jedyną drogą zapewnienia publicznego dostępu do sekwencji ludzkiego genomu jest kontynuowanie prac publicznego projektu. Wypowiedź tę określono później jako proroczą [58]. Według Olsona [58], 3 lata później żadne sekwencje odczytane przez przedsięwzięcie Ventera nie zostały opublikowane w banku genów.

Jak pisze Collins z zespołem [19], wielu pobocznych obserwatorów podnosiło głos, że właściwym rozwiązaniem jest poszukiwanie możliwości współpracy między dwoma przedsięwzięciami. Wielokrotnie podejmowane próby połączenia wysiłków, jednak żadna nie była zwieńczona sukcesem. Mimo, że współpraca okazała się niemożliwa, dzięki negocjacjom, w których brał udział m.in. Aristides Patrinos, dyrektor Office of Biological and Environmental Research in the U.S. Department of Energy [19], uzgodniono, że wyniki prac obu zespołów zostaną opublikowane jednocześnie. Jako datę publikacji wybrano luty 2001 roku.

Po 11 latach od rozpoczęcia HGP i zaledwie 3 latach od rozpoczęcia prywatnej inicjatywy Ventera, opublikowana została pierwsza pełna sekwencja genomu człowieka. Pierwszy z zespołów opublikował efekty międzynarodowej współpracy w czasopiśmie *Nature* [42], drugi – w *Science* [73]. Obie prace okazały się wzajemnie uzupełniać swoje wyniki. Sukces pierwszej poważnej próby wejścia w „wielką naukę” zachęcił badaczy do podejmowania kolejnych projektów na tak dużą skalę [19].

2. W poszukiwaniu brakujących genów

Od lat 60. XX wieku, do początku XXI wieku, szacowana przez naukowców liczba genów człowieka systematycznie się zmniejszała [60]. Zespół HGP, którym kierował Watson, oszacował liczbę ludzkich genów kodujących białka na 30 000–40 000 [42]. Zespół kierowany przez Ventera [73] argumentował, że liczba genów u człowieka może być nawet niższa niż 30 000. Analizy wykonane przez Celera Corporation sugerowały istnienie 26 588 genów podpartych mocnymi dowodami, oraz przewidywały istnienie około 12 000 dodatkowych, podpartych słabszymi dowodami. Liczby te były zdecydowanie niższe niż szacunki, które publikowano przed wykonaniem sekwencji genomu człowieka [1, 6, 26, 28].

Wiadomość, że zwiększenie liczby genów o 1/3 może wystarczyć, aby prosty nicien (*Caenorhabditis elegans*, posiadający około 20 000 genów [20]), rozwinął się do poziomu człowieka, spowodowała ożywioną debatę w środowiskach naukowych [18]. Jean Michel-Claviere argumentował [18], że tzw. paradoks N-value (brak związku między masą posiadanego DNA oraz liczbą genów, a intuicyjną złożonością organizmu) wynika z niejasnego definiowania przez różnych badaczy złożoności organizmu. Claviere podaje, że odpowiadając na pytanie o złożoność organizmu, część badaczy z jego laboratorium przyjmowała za kryterium różnorodność komórkową, inni – złożoność układu nerwowego, jeszcze inni uwzględniali kulturowe osiągnięcia człowieka. W związku z tym, liczba 30 000 genów nie była dla wszystkich zaskoczeniem.

Jednak jeszcze przed zakończeniem HGP, Davies [22] argumentował, że opisywanie jego rezultatów jako „przepisu na stworzenie człowieka” jest przesadne. Zwrócił uwagę, że nasze istnienie jest zależne od czegoś więcej niż około 30 000 genów, które udało się odczytać. Powierzchnia ciała oraz także jego wnętrze są siedliskiem dla nawet 1000 szczepów bakterii i innych mikroorganizmów. Dostarczają one dodatkową pulę 2 do 4 milionów genów, które w większości nie zostały scharakteryzowane. To aż do 150 razy więcej, niż zawiera genom człowieka. Zdaniem Daviesa, dopóki związku pomiędzy człowiekiem a jego mikrobiomem nie zostaną poznane, nasza wiedza o ludzkiej biologii będzie niekompletna.

Już w 1985 roku, mikroekolodzy Stanley i Konopka [67] zwrócili uwagę, że obserwacje mikroskopowe mikroorganizmów pozyskanych z przewodu pokarmowego pozwalają na ukazanie znacznie większej złożoności mikrobiomu jelitowego, niż obrazował tradycyjny pogląd, ukształtowany z wykorzystaniem badań posiewowych, skupiających się na pojedynczych mikroorganizmach. Ograniczeniem tego drugiego podejścia były trudności z hodowlą wielu mikroorganizmów. Obecnie szacuje się, że nie jesteśmy w stanie hodować od 20% do nawet 80% mikroorganizmów zasiedlających ciało człowieka [25, 36]. Niesie to ze sobą ryzyko niedoszacowania znaczenia i złożoności mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobiomu.

Obserwacja Stanleya i Konopki dała początek badaniom mającym na celu opisanie złożoności struktury i interakcji kolonii, które zasiedlają jelita [47]. Dopiero jednak pojawienie się nowoczesnych narzędzi metagenomiki, umożliwiającej badanie genów uzyskanych bezpośrednio ze środowiska, zapoczątkowało kompleksowe prace nad próbą zrozumienia mikrobów współistniejących z człowiekiem [36, 59]. Pojęcie „mikrobiom”, do określenia ekologicznej społeczności wszystkich mikroorganizmów, które dzielą naszą przestrzeń życiową, po raz pierwszy użył w 2001 roku Joshua Lederberg [44].

3. Projekt Poznania Ludzkiego Mikrobiomu

Podczas międzynarodowego spotkania naukowego, które odbyło się w Paryżu, w listopadzie 2005 roku, przedstawiono rekomendację utworzenia Human Intestinal Metagenome Initiative (HIMI) [55]. Celem projektu miało być bardziej kompletne niż dotychczas zdefiniowanie mikrobiomu jelitowego w zdrowiu i chorobie. Jelita są największą niszą w organizmie człowieka, w której bytują mikroorganizmy, oraz stanowią największą powierzchnią kontaktu ciała z otoczeniem [49], stąd też decyzja o rozpoczęciu badań właśnie od tej lokalizacji [55]. Rekomendowano także połączenie wysiłków zespołów z różnych ośrodków badawczych i utworzenie International Human Microbiome Consortium, które zajmie się gromadzeniem wyników z laboratoriów w różnych krajach. W wyniku ustaleń poczynionych w toku paryskiego spotkania powołano także Human Microbiome Project (HMP), w ramach NIH Roadmap for Biomedical Research. Celem programu było szerokie zbadanie mikrobiomu pobranego z co najmniej 4 lokalizacji ciała (przewodu pokarmowego, ust, pochwy oraz skóry) [55]. Koszt projektu oszacowano na 150 mln dolarów [12], a środki miały pochodzić z budżetu NIH [55].

W 2007 roku, Turnbaugh z zespołem [71] opublikowali w czasopiśmie *Nature* założenia HMP, określając projekt jako logiczne następstwo HGP. Według nich, HMP wynikał z uznania faktu, że człowiek jest częścią bardziej złożonego organizmu (superorganism), w skład którego wchodzi komórki somatyczne człowieka, oraz komórki mikroorganizmów zasiedlających jego ciało. Szacuje się, że te drugie swoją liczebnością 10-krotnie przewyższają komórki ludzkie [71]. HMP miało na celu opisanie tego, jak mikrobiom przyczynia się do funkcjonowania organizmu człowieka, jego normalnej fizjologii oraz stanów chorobowych.

W 2010 roku, opublikowano wyniki projektu Meta-HIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) [61], finansowanego przez Komisję Europejską. Zespół kierowany przez Qin'a wykonał metagenomowe sekwencjonowanie próbek kału pobranych od 124 uczestników z Europy. Do badania włączono osoby o normalnym BMI (body-mass index), z nadwagą i otyłością, a także osoby z nieswoistym zapaleniem jelit. Pozyskano 3,3 miliona unikalnych genów, wyodrębnionych z sekwencji zawierających łącznie 576,7 miliardów zasad. Znaczna część genów okazała się być wspólna dla osób, od których pobrano próbki. Około 40% genów pochodzących od każdego uczestnika została odnaleziona u przynajmniej połowy pozostałych badanych. Ponad 99% genomu pochodziło od bakterii, sugerując obecność ponad 1000 szczepów. Resztę stanowiły głównie archeony. Tylko około 0,1% genów było pochodzenia eukariotycznego i wirusowego.

Według hipotezy zaproponowanej przez Gonzaleza i wsp. [32], mikrobiom jelitowy jest łącznikiem pomiędzy naszym wyposażeniem genetycznym a historią ekspozycji środowiskowych. Nowe metody sekwencjonowania DNA, które pojawiły się na początku XXI wieku, pozwoliły na opisanie funkcji, jakie mikrobiom pełni w funkcjonowaniu człowieka. Poza oddziaływaniem lokalnym, w obrębie przewodu pokarmowego, mikrobiom wpływa także na szereg procesów zachodzących w ciele człowieka. Mikrobiom jelitowy bierze udział w metabolizmie nierozkładanych przez człowieka związków, jak np. wielocukrów, niektórych aminokwasów i ksenobiotyków, biosyntezie witamin i isoprenoidów [12], oraz modyfikuje wchłanianie składników mineralnych z pokarmu [66]. Wykazano powiązania mikrobów bytujących w jelitach z otyłością o chorobami metabolicznymi, jak np. cukrzyca typu drugiego [17, 70]. Mikrobiom jelitowy pełni funkcje ochronne przed patogenami, konkurując o składniki odżywcze i nisze, w których mogłyby się osiedlać szkodliwe dla człowieka mikroorganizmy [40]. Bierze udział w dojrzewaniu układu odpornościowego, może także inicjować lub modyfikować odpowiedź immunologiczną organizmu [40, 47]. Najnowsze badania dostarczają także dowodów na powiązania mikrobiomu jelitowego z funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego OUN, a przez to z fenotypem zachowania: funkcjonowaniem poznawczym, osobowością, nastrojem, snem oraz zachowaniami związanymi z odżywianiem [32]. Zmiany składu mikrobiomu jelitowego obserwowane są nie tylko w zaburzeniach przewodu pokarmowego [8, 54], ale także w zaburzeniach psychicznych [76], w tym zaburzeniach nastroju, a także w innych zaburzeniach związanych z obniżeniem funkcjonowania poznawczego, jak np. encefalopatia cukrzycowa [80] i choroba Alzheimera [38]. Do opisywania tych zależności poszukiwano odpowiedniej ramy teoretycznej, która ułatwiałaby analizy i interpretację wyników.

4. Poszukiwanie struktury w nieskończoności

Każdy człowiek posiada unikalną kompozycję mikrobiomu, która rozwija się i zmienia w trakcie życia, jednocześnie pozostając względnie stabilną [50, 82]. Postęp w poszukiwaniu cech wspólnych mikrobiomu (czy też "rdzennego mikrobiomu") nastąpił wraz z opublikowaniem w 2011 roku, w czasopiśmie *Nature*, koncepcji enterotypów [7].

Zespół kierowany przez Arumugama [7], z próbek kału pobranych od uczestników z 4 różnych krajów, wykonał 22 sekwencjonowania metagenomowe. Do analiz włączono także opublikowane wcześniej metagenomy. Razem pozyskano 39 próbek. Pozwoliło to na zidentyfikowanie w zebranych danych 3 klastrow,

które określono mianem enterotypów. Każdy z nich charakteryzuje się dominacją jednego z rodzajów bakterii: *Bacterioides*, *Prevotella* lub *Ruminococcus*. Zespół zidentyfikował także identyczne klastry w 2 opublikowanych wcześniej kohortach. Arumugam z zespołem [7] argumentowali, że ich odkrycie przemawia za istnieniem ograniczonej liczby prawidłowo funkcjonujących stanów mikrobiomu oraz za dyskretną, a nie ciągłą, charakterystyką kompozycji mikrobiomu. We wspomnianym badaniu, enterotypy okazały się być niezależne od indywidualnych zmiennych, jak płeć, wiek czy BMI. Mimo tego, udało się zidentyfikować geny istotnie skorelowane z wyżej wymienionymi zmiennymi, co może wskazywać na diagnostyczną użyteczność markerów mikrobowych. Zespół podkreślił jednak, że analiza strukturalna nie dostarcza zbyt wielu informacji o funkcjach, które pełni mikrobiom.

Głosy krytyki pojawiły się bardzo szybko. W tym samym, 2011 roku, zespół kierowany przez Wu [79] opublikował badanie, w którym udało się zidentyfikować tylko dwa enterotypy, zdominowane przez bakterie rodzaju *Bacterioides* i *Prevotella*. Dodatkowo, dane sugerowały, że są one powiązane z dietą osób, od których pobrano próbki do analiz. Dieta bogata w białko związana była z enterotypem *Bacterioides*, dieta bogata w węglowodany współwystępowała z enterotypem *Prevotella*.

Sam Arumugam przedstawił 20 marca 2012 roku, na Międzynarodowym Kongresie Ludzkiego Mikrobiomu w Paryżu [81], nowe dane sugerujące, że granice między enterotypami mogą nie być tak wyraźne, jak sugerowały pierwsze badania. Zespół, który opublikował oryginalną pracę przedstawiającą koncepcję enterotypów, powtórzył analizy na znacznie większej grupie składającej się z 663 osób z Danii i Hiszpanii. Z danych wynikało, że bakterie rodzaju *Methanobrevibacter* wchodzi w skład enterotypu zdominowanego przez rodzaj *Ruminococcus*, a granica między tym klastrem, a enterotypem zdominowanym przez *Bacterioides* nie jest tak wyraźna. Granica między wyżej wymienionymi a trzecim enterotypem – zdominowanym przez rodzaj *Prevotella*, nadal pozostała wyraźnie zarysowana. Podczas konferencji głos w sprawie zabrał także Dan Knights [81]. Argumentował, że enterotypy mogą zupełnie nie istnieć. Jego badanie, przeprowadzone na próbkach pobranych od ponad 1200 osób, obrazowało kontinuum kolonii, rozciągające się od dominacji rodzaju *Bacterioides*, do dominacji rodzaju *Prevotella*. Według Knightsa, stwierdzenie, że kolonie bakterii jelitowych tworzą wyraźne klastry jest zbyt mocne i nie ma solidnych dowodów przemawiających za nim. Argumentował, że enterotypy nie są dyskretne, jak np. grupy krwi, a raczej tworzą pewne gradienty. Podobne argumenty pojawiały się także ze strony innych zespołów [39, 81]. W 2014 roku Knights [41] argumentował także, że chociaż dyskusja o tym, czy enterotypy mają charakterystykę dyskretną, czy

też ciągłą, mogą wydawać się nieistotna, to określenie struktury mikrobiomu ma ogromne znaczenia dla formułowania pytań badawczych i wybierania metod, które pozwolą zrozumieć złożoność i zmienność mikrobiomu jelitowego człowieka.

5. Oś mózgowo-jelitowa, w kierunku neuropsychologii

Na całej długości jelita znajduje się 10^8 neuronów różnych typów, tworzących złożone łuki odruchowe, które regulują funkcjonowanie jelit. Razem określone są mianem jelitowego układu nerwowego (enteric nervous system, ENS) [33]. Układ ten jest przedmiotem badań od dawna, a jego struktura i funkcje w obrębie przewodu pokarmowego zostały dość dobrze opisane [27, 33].

Dinan z zespołem [24] wprowadzili w 2013 roku termin „psychobiotyk”, definiując go jako żywy organizm, który spożywany w adekwatnej ilości przyczynia się do poprawy zdrowia pacjentów z zaburzeniami psychicznymi. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazują zdolność hamowania reakcji zapalnych [62], oraz przywracają balans pomiędzy pro- i przeciwzapalnymi cytokinami u pacjentów z zespołem jelita drażliwego [56]. Zdolność probiotyków do wpływania na stany psychiczne wydaje się jednak wykraczać poza dobrze opisany wpływ na szlaki zapalne [48]. Probiotyki wpływają na aktywność osi podwzgórze – przysadka – nadnercza (HPA), wykazując działanie hamujące wobec uwalniania kortyzolu [23]. W badaniach na szczurach wykazano, że terapia probiotykami reguluje aktywność osi HPA w odpowiedzi na stres, poprzez obniżenie poziomu kortykosteronu, hormonu adrenokortykotropowego, oraz ekspresji czynnika uwalniającego kortykotropinę w podwzgórzcu [2]. Badania Sudo z zespołem [69] sugerują, że ekspozycja na bakterie probiotyczne na wczesnym etapie rozwoju jest niezbędna do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania osi HPA. Probiotyki mogą wpływać na stan psychiczny poprzez zwiększanie dostępności tryptofanu (prekursora serotoniny), zwiększanie syntezy serotoniny oraz redukcję jej metabolizmu [23, 46]. Mają zdolność produkowania neuroaktywnych związków, takich jak m.in. kwas gamma-aminomasłowy (GABA), serotonina, katecholaminy oraz acetylocholina [75].

Bakterie probiotyczne mają zdolność modulowania przepuszczalności jelita [2, 53], oraz bariery krew-mózg [13]. Stres jest jednym z czynników zwiększających przepuszczalność jelita, co umożliwia transfer komensalnych, Gram-ujemnych bakterii oraz fragmentów częściowo przetrawionego jedzenia i może uruchamiać systemowe reakcje zapalne [5, 78]. W badaniach Bailey'a z zespołem [9], przeprowadzonych na myszach, wykazano zmniejszenie liczebności bakterii rodzaju *Bacteroides*, oraz zwiększenie liczebności bakterii rodzaju

Clostridium po ekspozycji zwierząt na stres. Obserwowane zmiany były najwyraźniejsze, kiedy struktura mikrobiomu oceniana była bezpośrednio po ekspozycji. Czynnikiem uruchamiającym reakcję zapalną jest m.in. transfer lipopolisacharydów (LPS) [4], będących częścią ściany komórkowej Gram-ujemnych bakterii. LPS aktywują kompleks toll-podobnych receptorów (TLR2/4)-CD14 biorących udział w inicjowaniu reakcji zapalnej [4]. Wykazano wpływ LPS na aktywację obszarów centralnego układu nerwowego związanych z kontrolą emocjonalną, w szczególności ciała migdałowatego [34]. Badania Maes [51] z zespołem sugerują, że transfer Gram-ujemnych bakterii stymuluje uwalnianie immunoglobulin typu A oraz M, których podwyższony poziom obserwuje się w surowicy pacjentów z depresją. Uzyskane przez nich wyniki wskazują, że zwiększona przepuszczalność jelita może być zarówno czynnikiem wyzwalającym depresję u podatnych osób, jak i może przyczyniać się do utrwalania pierwotnej reakcji zapalnej związanej z występowaniem depresji. Zmiany w układzie odpornościowym i powiązanych systemach związane są z etiologią, patofizjologią i współwystępowalnością zaburzeń psychiatrycznych, w tym depresji, schizofrenii oraz choroby afektywnej dwubiegunowej [35, 43]. Zwiększona przepuszczalność jelita wiązana jest również z zaburzeniami, takimi jak choroba Alzheimera [38], choroba Parkinsona [4], zaburzenia ze spektrum autystycznego [21], zespół przewlekłego zmęczenia [52], oraz depresja i zaburzenia lękowe [30]. Zdolność probiotyków do zmniejszania przepuszczalności jelita i modulowania reakcji zapalnych może być jednym z kluczowych mechanizmów ich terapeutycznego działania w zaburzeniach psychicznych [64].

W 2009 roku, Li z zespołem [45] zaproponowali hipotezę mówiącą, że zmiany kompozycji mikrobiomu jelitowego mogą być wychwytywane przez komórki nerwowe ENS i przesyłane do OUN za pośrednictwem szlaków aferentnych. Bravo z zespołem [14] dostarczyli w 2011 roku danych wspierających wspomnianą hipotezę. W ich badaniu, długotrwała suplementacja bakterii *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) u myszy, zaindukowała zlokalizowane zmiany w układzie ekspresji GABAB1b mRNA (zwiększenie w obrębie obręczy oraz kory prelimbiczej, zmniejszenie w obrębie hipokampa, ciała migdałowatego oraz miejsca sinawego). Suplementacja zmniejszyła nasilenie zachowań związanych ze stresem i depresją, regulowanych przez wydzielanie kortykosteronu. Zarówno zmiany neurochemiczne, jak i zmiany w zachowaniu, nie zostały zaobserwowane u myszy, u których przecięto nerw błędny. Pozwoliło to zidentyfikować nerw błędny jako główny szlak komunikacyjny pomiędzy jelitami a mózgiem.

W 2011 roku, zespół kierowany przez Baily'ego opublikował pracę, w której opisane zostały zmiany kompozycji mikrobiomu jelitowego pod wpływem

bodźców zewnętrznych. Ekspozycja myszy na stres istotnie zmniejszała relatywną liczebność rodzaju *Bacteroides*, oraz zwiększała relatywną liczebności rodzaju *Clostridium*. Zmiany te były najwyraźniejsze, kiedy ocena wykonywana była bezpośrednio po zadziałaniu stresora [9]. Obustronne połączenie pomiędzy ENS i OUN określone zostało mianem osi jelitowo-mózgowej (gut-brain axis), lub też szerzej, osi mikrobiota-mózg-jelita (microbiota-gut-brain axis) [16, 30, 57]. Dalsze poznanie tego szlaku komunikacyjnego może okazać się kluczowe dla poznania, jak bakterie powiązane są z zachowaniem człowieka.

W ostatnich latach pojawiają się liczne publikacje eksplorujące związek bakterii bytujących w jelitach z zachowaniem, funkcjami poznawczymi i emocjami, a więc obszarem zainteresowania psychiatrów, neurologów, psychologów i neuropsychologów. Większość dostępnych danych pochodzi z badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, w szczególności gryzoniach. Hodowla zwierząt w sterylnych warunkach, uniemożliwiających kolonizację jelit przez mikroorganizmy, oraz badania prowadzone z wykorzystaniem antybiotyków, dostarczają ważnych informacji o wpływie prawidłowego mikrobiomu na organizm, jednak mają pewne ograniczenia, które utrudniają generalizowanie wniosków na organizm człowieka. Między innymi, myszy hodowane w sterylnych warunkach wykazują zmiany w barierze krew-mózg, co może wpływać na wyniki badań [31].

Hu i wsp. [38] zaobserwowali, że brak właściwej mikrobioty jelitowej u myszy związany był z atypowym rozwojem osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) oraz zwiększonym poziomem kortykosteronu. Burokas z zespołem [16] uzyskali istotne obniżenie poziomu kortykosteronu uwalnianego po ekspozycji na stresor w wyniku suplementacji prebiotyków selektywnie stymulujących wzrost bakterii w jelitach (fruktooligosacharydów oraz kombinacji fruktooligosacharydów i galaktooligosacharydów). Pogorszenie funkcjonowania poznawczego (także u myszy), nasilone zachowania przypominające zachowania lękowe oraz zmiany w układzie serotonergicznym u myszy ze stanem zapalnym układu nerwowego wywołanym hiperamonemią udało się zredukować przez suplementację bakterii *Lactobacillus helveticus* NS8 [46].

Pierwsze doniesienia z badań prowadzonych na ludziach sugerują korzystny wpływ probiotyków i prebiotyków na zdrowie człowieka. Wykazano, że suplementacja bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* przez 4 tygodnie istotnie obniża poznawczą reaktywność na obniżony nastrój, a zwłaszcza tendencję do ruminacji oraz agresywne myśli, u osób bez zaburzeń nastroju [68]. Spożywanie przez 3 tygodnie jogurtu zawierającego probiotyki poprawiało nastrój u osób z obniżonym nastrojem (bez zaburzeń nastroju) [11].

Schmidt i wsp. [65] uzyskali obniżenie poziomu wydzielanego kortyzolu u zdrowych osób, w wyniku suplementacji prebiotyku – galaktooligosacharydów. Zespół kierowany przez Jasmohana Bajaja [10], zaprezentował w kwietniu 2017 roku na Międzynarodowym Kongresie Wątroby (International Liver Congress) w Amsterdamie badanie, w którym jednorazowy przeszczep flory kałowej od zdrowego dawcy okazał się wywoływać istotnie większą poprawę funkcji poznawczych u pacjentów z encefalopatią wątrobową, w porównaniu do pacjentów leczonych według standardowego protokołu. Zaobserwowano także zmiany kompozycji mikrobiomu u pacjentów po przeszczepie – zwiększenie liczebności rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Suplementacja probiotyków pozytywnie wpłynęła także na zdolności poznawcze pacjentów z chorobą Alzheimera w badaniu Akbari z zespołem [3]. W badaniu polskiego zespołu z 2019 roku [63] udało się wykazać wspierający efekt szczepu *Lactobacillus plantarum* 299v wobec terapii SSRI oraz poprawę funkcjonowania poznawczego u pacjentów z depresją.

Dane te mogą mieć istotne znaczenie dla naszego myślenia o zaburzeniach psychicznych. Kuracje probiotykowe wskazuje się jako potencjalną terapię uzupełniającą oraz profilaktykę zaburzeń nastroju i zaburzeń poznawczych, związanych np. z procesami starzenia się czy chorobami wpływającymi na aktywność mózgu. Zrozumienie funkcjonowania mikrobiomu jelitowego może także pomóc zwiększyć skuteczność psychofarmakologii oraz obniżyć ryzyko i skutki uboczne z nią związane [15].

6. Podsumowanie

Chociaż już w 1986 roku Linda Hegstrand i Roberta Hine opublikowały pracę, w której wykazały wpływ mikrobiomu jelitowego na aktywność chemiczną mózgu (obserwacja różnic w poziomie histaminy powzgórzowej u myszy hodowanych w sterylnych warunkach i konwencjonalnie) [37], dopiero rewolucja związana z odczytaniem genomu człowieka i rozwój technik sekwencjonowania skierowały uwagę wielu badaczy, w tym psychologów i neuronaukowców, na dodatkowy organ – mikrobiom, z którym organizm człowieka żyje w symbiozie. Kolejne wielkie (i mniejsze) projekty uzupełniały wiedzę o funkcjonowaniu człowieka i pozwalały na stawianie hipotez, które jeszcze kilkadziesiąt lat wcześniej mogłyby wydawać się lekkomyślne. Pozwoliły także na poszukiwanie nowych sposobów na terapię lub wspomaganie terapii wielu chorób i zaburzeń. Historia badań nad mikrobiomem człowieka obrazuje złożoną naturę naszego funkcjonowania i potrzebę integrowania wiedzy pochodzącej z dziedzin, na pierwszy rzut oka bardzo odległych, jak mikrobiologia i psychologia.

Piśmiennictwo

1. Adams M.D., Kerlavage A.R., Fleischmann R.D., Fuldner R.A., Bult C.J., Lee N.H., Kirkness E.F., Weinstock K.G., Gocayne J.D., White O.: Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, **377**, 3–174 (1995)
2. Ait-Belgnaoui A., Durand H., Cartier C., Chaumaz G., Eutamene H., Ferrier L., Houdeau E., Fioramonti J., Bueno L., Theodorou V.: Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinol.* **37**, 1885–1895 (2012)
3. Akbari E., Asemi Z., Daneshvar Kakhaki R., Bahmani F., Kouchaki E., Tamtaji O.R., Hamidi G.A., Salami M.: Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind and controlled trial. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 256 (2016)
4. Anderson G., Seo M., Berk M., F Carvalho A., Maes M.: Gut permeability and microbiota in Parkinson's disease: role of depression, tryptophan catabolites, oxidative and nitrosative stress and melatonergic pathways. *Curr. Pharmac. Des.* **22**, 6142–6151 (2017)
5. Anderson G., Maes M.: The gut-brain axis: The role of melatonin in linking psychiatric, inflammatory and neurodegenerative conditions. *Adv. Integr. Med.* **2**, 31–37 (2015)
6. Antequera F., Bird A.: Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 11995–11999 (1993)
7. Arumugam M., Bork P. i wsp.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180 (2011)
8. Aziz Q., Doré J., Emmanuel A., Guarner F., Quigley E.M.M.: Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**, 4–15 (2013)
9. Bailey M.T., Dowd S.E., Galley J.D., Hufnagle A.R., Allen R.G., Lyte M.: Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 397–407 (2011)
10. Bajaj J.: Faecal microbiota transplantation improves cognitive impairment caused by recurrent severe liver disease. In: *The International Liver Congress*. pp. 1–3 (2017)
11. Benton D., Williams C., Brown A.: Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, 355–361 (2007)
12. Binek M.: Mikrobiom człowieka – Zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)
13. Braniste V., Peterson S. i wsp.: The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014)
14. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M. V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan, T.G., Bienenstock J., Cryan J.F.: Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16050–16055 (2011)
15. Bravo J.A., Julio-Pieper M., Forsythe P., Kunze W., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F.: Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 667–672 (2012)
16. Burokas A., Arboleya S., Moloney R.D., Peterson V.L., Murphy K., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F.: Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biol. Psychiatry*. (2017)
17. Claesson M.J., O'Toole P.W. i wsp.: Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, **488**, 178–184 (2012)
18. Claverie J.M.: Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science*, **291**, 1255–1257 (2001)
19. Collins F.S., Morgan M., Patrinos A.: The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, **300**, 286–290 (2003)
20. The *C. elegans* Sequencing Consortium: Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, **282**, 2012–2018 (1998)
21. Dalton N., Chandler S., Turner C., Charman T., Pickles A., Loucas T., Simonoff E., Sullivan P., Baird G.: Gut permeability in autism spectrum disorders. *Autism Res.* **7**, 305–313 (2014)
22. Davies J.: In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, **291**, 2316 (2001)
23. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Bienenstock J., Dinan T.G.: The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J. Psychiatr. Res.* **43**, 164–174 (2008)
24. Dinan T.G., Stanton C., Cryan J.F.: Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry*. **74**, 720–726 (2013)
25. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Ravel D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638 (2005)
26. Ewing B., Green P.: Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat. Genet.* **25**, 232–234 (2000)
27. Ferri G.-L., Probert L., Cocchia D., Michetti F., Marangos P.J., Polak J.M.: Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, **297**, 409–410 (1982)
28. Fields C., Adams M., White O., Venter J.: How many genes are in the human genome? *Nature*, 1–5 (2013)
29. Fortun M.A.: The Human Genome Project : past, present, and future anterior. 339–362 (2001)
30. Foster J.A., McVey Neufeld K.A.: Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* **36**, 305–312 (2013)
31. Fröhlich E.E., Holzer P. i wsp.: Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain. Behav. Immun.* **56**, 140–155 (2016)
32. Gonzalez A., Stombaugh J., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Gordon J.I., Knight R.: The mind-body-microbial continuum. *Dialogues Clin. Neurosci.* **13**, 55–62 (2011)
33. Grundy D., Schemann M.: Enteric nervous system. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **22**, 102–110 (2006)
34. Haba R., Shintani N., Onaka Y., Wang H., Takenaga R., Hayata A., Baba A., Hashimoto H.: Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. *Behav. Brain Res.* **228**, 423–431 (2012)
35. Hamdani N., Tamouza R., Leboyer M.: Immuno-inflammatory markers of bipolar disorder: a review of evidence. *Front. Biosci.* **4**, 2170–2182 (2012)
36. Handelsman J.: Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004)
37. Hegstrand L.R., Hine R.J.: Variations of brain histamine levels in germ-free and nephrectomized rats. *Neurochem. Res.* **11**, 185–191 (1986)
38. Hu X., Wang T., Jin, F.: Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci. China Life Sci.* 1–18 (2016)
39. Jeffery I.B., Claesson M.J., O'Toole P.W., Shanahan F.: Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 591–592 (2012)
40. Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G.: Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* **14**, 685–690 (2013)

41. Knights D., Ward T.L., McKinlay C.E., Miller H., Gonzalez A., McDonald D., Knight R.: Rethinking "Enterotypes." *Cell Host Microbe*, **16**, 433–437 (2014)
42. Lander E.S. Chen Y.J. i wsp.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860–921 (2001)
43. Leboyer M., Berk M., Yolken R.H., Tamouza R., Kupfer D., Groc L.: Immuno-psychiatry: An agenda for clinical practice and innovative research. *BMC Med.* **14**, (2016)
44. Lederberg J., McCray A.T.: 'Ome sweet `omics – a genealogical treasury of words. *Science*, **15**, 8–8 (2001)
45. Li W., Dowd S.E., Scurlock B., Acosta-Martinez V., Lyte M.: Memory and learning behavior in mice is temporally associated with diet-induced alterations in gut bacteria. *Physiol. Behav.* **96**, 557–567 (2009)
46. Luo J., Wang T., Liang S., Hu X., Li W., Jin F.: Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat. *Sci. China Life Sci.* **57**, 327–335 (2014)
47. Lynch S. V., Pedersen O.: The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2369–2379 (2016)
48. Lyte M.: Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, **33**, 574–581 (2011)
49. MacDonald T.T., Monteleone I., Fantini M.C., Monteleone G.: Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterol.* **140**, 1768–1775 (2011)
50. Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R.: Developmental microbial ecology of the neonata gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1035S–1045S (1999)
51. Maes M., Kubera M., Leunis J.C., Berk M.: Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J. Affect. Disord.* **141**, 55–62 (2012)
52. Maes M., Leunis J.C., Maes M.: Normalization of leaky gut in chronic fatigue syndrome (CFS) is accompanied by a clinical improvement: effects of age, duration of illness and the translocation of LPS from Gram-negative bacteria. *Neuroendocrinol. Letters*, **29**, 902 (2008)
53. Maqsood R., Stone T.W.: The gut-brain axis, BDNF, NMDA and CNS disorders. *Neurochem. Res.* **41**, 1–17 (2016)
54. Nagao-Kitamoto H., Kamada N.: Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. *Immune Netw.* **17**, 1 (2017)
55. NIH HMP Working Group: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
56. O'Mahony L., Quigley, E. M. i wsp.: *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterol.* **128**, 541–551 (2005)
57. O'Sullivan E., Barrett E., Grenham S., Fitzgerald P., Stanton C., Ross R.P., Quigley E.M.M., Cryan J.F., Dinan T.G.: BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: Does *Bifidobacterium breve* 6330 alter BDNF levels? *Benef. Microbes*, **2**, 199–207 (2011)
58. Olson M. V.: The human genome project: A player's perspective. *J. Mol. Biol.* **319**, 931–942 (2002)
59. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Human Microbiome Project – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post. Mikrobiol.* **51**, 243–256 (2012)
60. Pertea M., Salzberg S.L.: Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biol.* **11**, 206 (2010)
61. Qin, J., Wang, J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
62. Riedel C.U., Foata F., Philippe D., Adolfsson O., Eikmanns B.J., Blum S.: Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- κ B activation. *World J. Gastroenterol.* **12**, 3729–3735 (2006)
63. Rudzki L., Ostrowska L., Pawlak D., Małus A., Pawlak K., Waszkiewicz N., Szulc A.: Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study. *Psychoneuroendocrinol.* **100**, 213–222 (2019)
64. Rudzki L., Szulc A.: "Immune Gate" of psychopathology – The role of gut derived immune activation in major psychiatric disorders. *Frontiers in Psychiatry*, **9**, 205 (2018)
65. Schmidt K., Cowen P.J., Harmer C.J., Tzortzis G., Errington S., Burnet P.W.J.: Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacol. (Berl)*, **232**, 1793–1801 (2015)
66. Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J.: Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism. *Br. J. Nutr.* **87**, S179 (2002)
67. Staley J.T., Konopka A.: Microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985)
68. Steenbergen L., Sellaro R., van Hemert S., Bosch J.A., Colzato L.S.: A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain. Behav. Immun.* **48**, 258–264 (2015)
69. Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X.N., Kubo C., Koga Y.: Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* **558**, 263–275 (2004)
70. Tremaroli V., Bäckhed F.: Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, **489**, 242–249 (2012)
71. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The Human Microbiome Project. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
72. United States. Congress. House. Committee on Science. Subcommittee on Energy and Environment.: The human genome project : how private sector developments affect the government program : hearing before the Subcommittee on Energy and Environment of the Committee on Science, U.S. House of Representatives, One Hundred Fifth Congress, second session, June 17, 1998. U.S. G.P.O. (1998)
73. Venter J.C., Zhu X. i wsp.: The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304–1351 (2001)
74. Vogel F.: A preliminary estimate of the number of human genes. *Nature*, **201**, 847 (1964)
75. Wall R., Cryan J.F., Paul Ross R., Fitzgerald G.F., Dinan T.G., Stanton C.: Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **817**, 221–239 (2014)
76. Wallace C.J.K., Milev R.: The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: a systematic review. *Ann. Gen. Psychiatry*, **16**, 14 (2017)
77. Watson, J.D.: The human genome project: past, present, and future. *Science*, **248**, 44–49 (1990)
78. Wischmeyer P.E.: Glutamine: Role in gut protection in critical illness. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care*, **9**, 607–612 (2006)
79. Wu G.D., Lewis J.D.: Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, **334**, 105–108 (2011)
80. Xu Y., Zhou H., Zhu Q.: The Impact of microbiota-gut-brain axis on diabetic cognition impairment. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 106 (2017)
81. Yong E.: Gut microbial "enterotypes" become less clear-cut. *Nature*, 8–10 (2012)
82. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., De Vos, W.M.: Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854–3859 (1998)

PRZYCZYNY WZROSTU LICZBY ZACHOROWAŃ NA KRZTUSIEC

Marta Prygiel*, Ewa Mosiej, Aleksandra Anna Zasada

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Czynnikiem etiologicznym krztuśca jest pałeczka *Bordetella pertussis*. Pomimo globalnych programów szczepień, krztusiec pozostaje endemiczny w wielu krajach i nadal uznawany jest za istotny problem zdrowia publicznego. Szacuje się, że w 2014 roku na całym świecie na krztusiec zachorowało około 24 miliony osób, z czego 160 700 dzieci poniżej 5 roku życia zmarło. Dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciw krztuścowi: całokomórkowe będące zawiesinami całych inaktywowanych komórek *B. pertussis* oraz bezkomórkowe zawierające oczyszczone antygeny tej bakterii. Ze względu na to, iż szczepionki zawierające całe komórki uznawane są za bardziej reakto-genne, szczepionki acelularne są obecnie częściej stosowane. Od połowy lat 90. obserwowany jest wzrost zapadalności na krztusiec w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji. Wymienia się kilka czynników, które mogą być odpowiedzialne za powrót choroby w populacjach z wysokim odsetkiem osób zaszczepionych, a do najważniejszych należą spadek odporności poszczepiennej w czasie oraz presja selekcyjna stosowanych szczepień.

1. Wstęp. 2. Czynniki zjadliwości *Bordetella pertussis*. 3. Patogeneza krztuśca. 4. Obraz kliniczny krztuśca. 5. Epidemiologia. 6. Zmienność genetyczna pałeczek *Bordetella pertussis*. 7. Szczepionki całokomórkowe. 8. Szczepionki bezkomórkowe. 9. Nowe szczepionki przeciw krztuścowi. 10. Podsumowanie

CAUSES OF PERTUSSIS INCIDENCE INCREASE

Abstract: *Bordetella pertussis* is an etiological factor of whooping cough. Despite global vaccination programs, this disease remains endemic in many countries and is still recognized as a significant public health problem. It is estimated that in 2014, around 24 million people worldwide contracted pertussis, of whom 160,700 children under the age of 5 died. Two types of pertussis vaccines are available: suspensions based on whole, killed, *B. pertussis* cells and acellular pertussis vaccines containing highly purified bacterial antigens. Due to concerns of potential neurological side effects of the whole-cell vaccines, less reactogenic acellular vaccines are now more commonly used. In recent years, many developed countries have reported a resurgence of pertussis disease despite of the high vaccine coverage. Several causes have been suggested for the re-emergence of pertussis including waning immunity and bacterial adaptation resulting from the selection pressure of the used vaccinations.

1. Introduction. 2. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. 3. Pathogenesis of pertussis infection. 4. Clinical symptoms of pertussis. 5. Epidemiology. 6. Genetic variation in *Bordetella pertussis*. 7. Whole-cell pertussis vaccines. 8. Acellular pertussis vaccines. 9. Future pertussis vaccines. 10. Summary

Słowa kluczowe: krztusiec, szczepionki bezkomórkowe, szczepionki całokomórkowe

Key words: whooping cough, acellular pertussis vaccines, whole-cell pertussis vaccines

1. Wstęp

Pałeczka *Bordetella pertussis* wywołuje ostrą chorobę zakaźną dróg oddechowych zwaną krztuścem. Jest to bakteryjne zapalenie tchawicy i oskrzeli. Pomimo dostępnej od ponad 60 lat immunoprofilaktyki, krztusiec pozostaje endemiczny w wielu krajach i nadal uznawany jest za istotny problem zdrowia publicznego. Obecnie zapadalność na krztusiec jest znacznie niższa niż w erze przed rozpoczęciem szczepień, jednak od połowy lat 90. obserwowany jest stabilny wzrost zapadalności w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji. Niepokojący jest również fakt wzrostu częstości hospitalizacji oraz umieralności nieuodpornionych noworodków lub nie w pełni uod-

pornionych niemowląt. Krztusiec stał się najbardziej rozpowszechnioną chorobą w krajach rozwiniętych, której można zapobiegać poprzez szczepienia [65]. Światowa Organizacja Zdrowia oszacowała, że pomimo powszechnych programów szczepień, w 2008 r. na świecie wystąpiło około 16 milionów przypadków krztuśca (95% przypadków dotyczyło krajów rozwijających się) powodując około 195 000 zgonów wśród dzieci, z czego większość dotyczyła dzieci poniżej 5 lat [99]. Wymienia się kilka czynników, które mogą być odpowiedzialne za powrót choroby w populacjach o wysokim stopniu zaszczepienia. Są to m.in. spadek odporności poszczepiennej w czasie, presja selekcyjna szczepień, przejście ze szczepionki całokomórkowej na szczepionkę bezkomórkową, obniżenie poziomu wyszczepialności, spadek

* Autor korespondencyjny: dr n. med. Marta Prygiel, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 22 542 12 14, e-mail: mprygiel@pzh.gov.pl

skuteczności szczepionki, zwiększenie świadomości na temat krztuśca, w tym poprawa diagnostyki i lepszy nadzór epidemiologiczny choroby [65].

Najprawdopodobniej czas trwania poszczepiennej ochronnej odpowiedzi immunologicznej, skutecznej w zapobieganiu zachorowaniom na krztusiec, jest krótszy niż zakładano. Słabnąca w miarę upływu czasu odpowiedź immunologiczna może wpływać na zwiększoną częstość zachorowań u młodzieży oraz osób dorosłych. W ten sposób dochodzi do utworzenia stałego rezerwuaru bakterii, które są źródłem zakażeń dla nieuodpornionych noworodków lub nie w pełni uodpornionych niemowląt i małych dzieci, u których choroba często przybiera najcięższą postać [38]. Szacuje się, że ochrona po immunizacji szczepionkami całokomórkowymi spada o 50% w ciągu 6 do 12 lat po szczepieniu [43], a immunizacja trzema dawkami szczepionki bezkomórkowej zapewnia ochronę przed zachorowaniem na około 5–6 lat [72]. Ponadto, jedną z podstawowych przyczyn odpowiedzialnych za skrócenie czasu skutecznej odpowiedzi poszczepiennej może być pojawienie się nowych szczepów *B. pertussis* mniej wrażliwych na działanie odpowiedzi odpornościowej [37]. Indukowanie bardziej swoistego spektrum przeciwciał przez szczepionki bezkomórkowe może wpływać na przyspieszenie powstawania zmian genetycznych w populacji bakterii *B. pertussis*. Kolejnym istotnym czynnikiem mającym potencjalny związek ze wzrostem zachorowań na krztusiec jest pojawianie się pałeczek *B. pertussis* w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia [38]. Presja selekcyjna, którą stanowi indukowana drogą szczepień ochronna odpowiedź immunologiczna, może prowadzić do powstania różnorodnych mutacji, których kumulacja może przejawiać się wzrostem zjadliwości lub wytworzeniem mechanizmów umożliwiających unikanie odpowiedzi poszczepiennej. Jednym z mechanizmów ochronnych może być utrata zdolności szczepu do syntezy niektórych antygenów, szczególnie tych o silnych właściwościach immunogennych. W takim przypadku, powstające w wyniku immunizacji przeciwciała nie pełnią funkcji ochronnych [14].

2. Czynniki zjadliwości *Bordetella pertussis*

Właściwości chorobotwórcze pałeczek *B. pertussis* wynikają ze zdolności syntezy szeregu czynników zjadliwości, które umożliwiają bakteriom kolonizację, namnażanie, niszczenie komórek nabłonka rzęskowego układu oddechowego oraz hamowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Do najważniejszych czynników zjadliwości *B. pertussis* należą: toksyna krztuścowa Ptx (Pertussis toxin), hemaglutynina włóknikowa FHA (Filamentous Hemagglutinin Adhesin), fimbrie Fim (Fimbriae) i aglutynogeny, pertaktyna

Prn (Pertactin), cyklaza adenylova ACT (Adenylate Cyclase Toxin), cytotoksyna tchawicza TCT (Tracheal CytoToxin), toksyna dermonekrotyczna DNT (Dermonecrotic Toxin), białko BrkA (*Bordetella* resistance to killing A), lipopolisacharyd, czynnik kolonizacji tchawicy oraz składniki systemu sekrecji typu III. Ekspresja większości czynników zjadliwości (poza cytotoksyną tchawiczą) zależna jest od warunków środowiska [59]. Pod wpływem bodźców fizycznych lub chemicznych bakterie mogą zmieniać swój skład antygenowy na jeden z trzech fenotypów: niewirulentny – Bvg⁻, wirulentny – Bvg⁺ oraz pośredni – Bvgⁱ (Bvg intermediate). Proces ten zachodzi przy udziale systemu regulacji BvgAS (*Bordetella* virulence genes Activator/Sensor). W skład systemu regulacji wchodzi występujące w błonie komórkowej białko sensorowe BvgS oraz cytoplazmatyczny regulator odpowiedzi BvgA. Wrażliwe na czynniki zewnętrzne białko sensorowe zostaje ufosforylowane, następnie przenosi grupę fosforanową na białko regulatorowe BvgA, które przyłącza się do promotorów genów regulowanych i uruchamia ich transkrypcję. W zależności od stężenia wewnątrzkomórkowego fosforylowanych białek regulatorowych (BvgA-P) dochodzi do ekspresji różnych genów, które determinują występowanie różnych fenotypów *B. pertussis* [44]. Przy wysokim stężeniu BvgA-P dochodzi do aktywacji genów *vag* (virulence-activated genes) klasy 1 oraz 2 i w konsekwencji syntezy większości poznanych czynników zjadliwości. Bakterie przyjmują wówczas fenotyp Bvg⁺ i są zdolne do kolonizacji i infekcji dróg oddechowych. W warunkach laboratoryjnych czynnikiem indukującym fazę Bvg⁺ jest temperatura 37°C [44]. W fazie Bvg⁻ następuje aktywacja transkrypcji genów *vrg* (virulence-repressed genes). Bakterie syntetyzują wówczas charakterystyczne dla fenotypu Bvg⁻ białka błonowe o nieznannej funkcji [56]. Słabo poznana jest tzw. pośrednia faza fenotypu Bvgⁱ, w której bakterie wytwarzają produkty genów klasy 2 i 3 tj. odpowiednio, wspólne z fazą wirulentną adhezyny oraz specyficzne tylko dla fenotypu pośredniego, białka o niepoznanej funkcji [44].

3. Patogeneza krztuśca

Pałeczka *B. pertussis* pokonuje barierę w postaci błony śluzowej górnych dróg oddechowych gospodarza poprzez silne przyleganie do komórek nabłonka oddechowego za pomocą adhezyn, głównie toksyny krztuścовой i hemaglutyniny włóknikowej ale również za pomocą białek fimbrialnych, pertaktyny i BrkA [40]. Bakterie najczęściej są wchłaniane przez komórki nabłonkowe i nie przenikają do komórek niższych warstw, ani do krwiobiegu, do którego dostają się toksyny powodujące objawy chorobowe. Toksyna krztuścowa, cyklaza adenylova i BrkA mają znaczący wpływ na funkcje

układu odpornościowego gospodarza [75]. Cyklaza adenylowa indukuje wytwarzanie wysokich poziomów cyklicznego AMP (cAMP) zaburzając funkcje komórek układu odpornościowego. Toksyna krztuszcowa hamuje chemotaksję komórek fagocytujących w miejscu zapalenia, a BrkA chroni pałeczki *B. pertussis* przed odpowiedzią ze strony układu dopełniacza. Cytotoksyna tchawicy i toksyna dermonekrotyczna są prawdopodobnie zaangażowane w uszkodzenie komórek nabłonka tchawicy, które jest bardzo charakterystyczne dla tej choroby [75]. Utrzymywanie się objawów chorobowych przez dłuższy czas prawdopodobnie wynika ze zdolności pałeczek *B. pertussis* do interakcji z komórkami układu odpornościowego gospodarza. Bakterie hamują działanie układu dopełniacza i fagocytów oraz powodują supresję odpowiedzi komórek T i B [58].

4. Obraz kliniczny krztusca

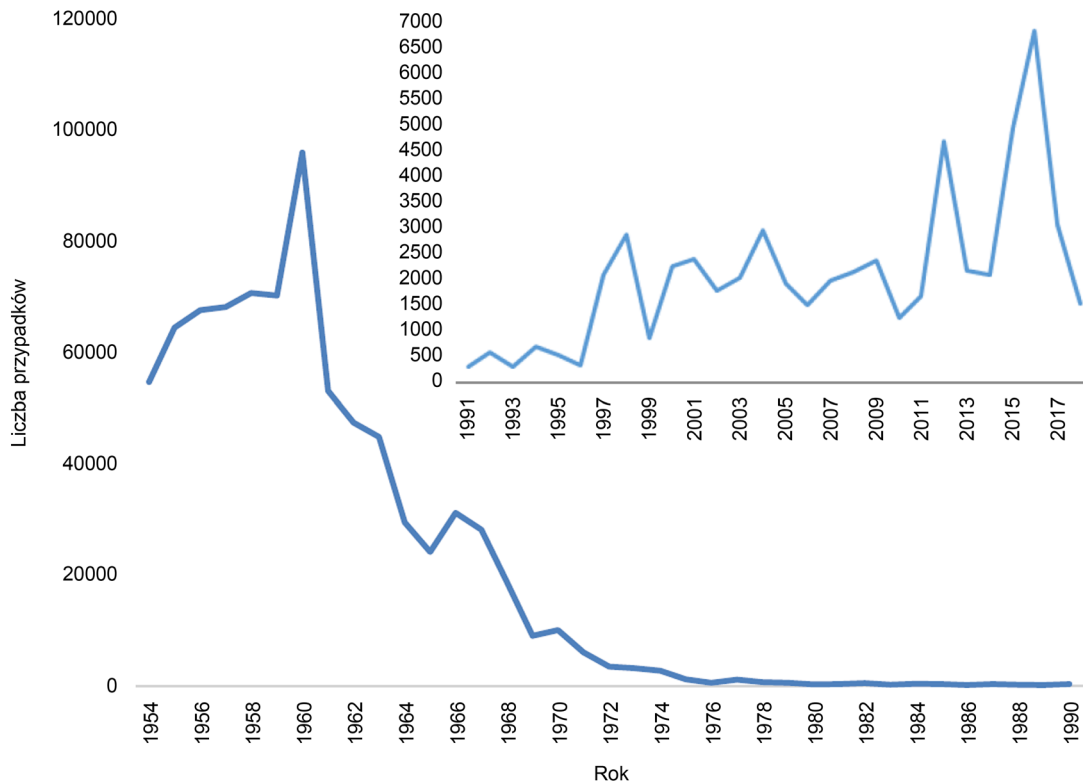
Bakteria wywołująca chorobę przenoszona jest drogą kropelkową poprzez kaszel lub kichanie. Krztusiec jest wysoce zakaźną jednostką chorobową. Wskaźnik transmisji wśród wrażliwych domowników wynosi aż 90%, a w szkołach waha się pomiędzy 50–80%. Krztusiec może wystąpić w każdym wieku, chociaż najbardziej podatne są niemowlęta w ciągu pierwszych kilku tygodni lub miesięcy życia, wtedy też śmiertelność z powodu krztusca jest najwyższa. Przez wiele lat uważano, że zachorowanie na tę chorobę zapewnia odporność na całe życie. Przed wprowadzeniem powszechnych szczepień ochronnych, około 20% wszystkich zachorowań dotyczyło niemowląt poniżej 1 roku życia oraz blisko 60% dzieci w wieku od 1 do 4 lat. Kolejną grupę chorujących stanowiły osoby starsze narażone na kontakt z chorymi dziećmi [75].

Krztusiec objawia się charakterystycznym kaszlem napadowym utrzymującym się nawet do kilku tygodni. Przebieg choroby składa się z trzech charakterystycznych etapów: fazy kataralnej (nieżytowej), w której najczęściej dochodzi do zakażenia, fazy paroksyzmalnej oraz okresu rekonwalescencji. Okres inkubacji wynosi na ogół od 7 do 10 dni i przebiega z początkowymi objawami zakażenia górnych dróg oddechowych, z towarzyszącym zwykle nieżytem nosa, bólem gardła oraz stanem podgorączkowym. Kaszel, początkowo przerywany, postępuje w ciągu 1 lub 2 tygodni przekształcając się w napadowy. Częstotliwość i nasilenie kaszlu zwiększa się, a następnie napady stopniowo ustępują, przeważnie w okresie od 2 do 6 tygodni. Kaszel najczęściej pojawia się w nocy, towarzyszą mu duszności oraz wymioty. Napadowy kaszel, który występuje seriami charakteryzuje się głośnym świstem krtaniowym przypominającym „pianie koguta” (whooping). Niekiedy może dochodzić nawet do wylewów krwi do

spojówek i do powstania wybroczyn na twarzy chorego. U niemowląt może występować bezdech. Krztusiec przy nieodpowiednim leczeniu może doprowadzić do szeregu powikłań, w tym zapalenia ucha środkowego, zapalenia mózgu oraz zapalenia płuc. Wczesne rozpoznanie i rozpoczęcie leczenia krztusca mają istotne znaczenie w zapobieganiu śmierci u dzieci poniżej 5 roku życia [97]. Najczęściej stosowaną formą leczenia krztusca jest antybiotykoterapia. W przypadku dzieci niezaszczepionych lub nie w pełni uodpornionych, choroba może przybierać ciężki przebieg i wymagana jest hospitalizacja chorych. U dzieci z nietypowym, łagodniejszym przebiegiem choroby o wcześniej przebytej infekcji mogą świadczyć jedynie wyniki badań serologicznych [100]. Przed rozpowszechnieniem szczepień przeciwko krztuscowi sądzono, że tylko małe dzieci są podatne na krztusiec. Obecnie wiadomo, że dorośli również są narażeni na zakażenie, ale często przechodzą bezobjawową infekcję [75]. Większość pacjentów z pełnoobjawowym obrazem choroby wykazuje pewien stopień niedodmy lub odoskrzelowego zapalenia płuc, które może upośledzić funkcje układu oddechowego na tyle poważnie, że może nawet doprowadzić do śmierci. Obserwuje się agregację leukocytów w małych tętnicach płucnych, żyłach i naczyniach limfatycznych. Badania immunohistochemiczne potwierdzają obecność bakterii w rzęskach komórek nabłonka migawkowego tchawicy, oskrzeli i oskrzelików oraz w makrofagach [75]. Te obserwacje sugerują, że zapalenie płuc związane z krztuscem spowodowane jest przez nadmierną odpowiedź immunologiczną organizmu. Z komplikacji neurologicznych najczęściej występuje ostra encefalopatia krztuszcowa objawiająca się zaburzeniami świadomości, wynikająca zwykle z niedotlenienia lub krwawienia śródczaszkowego związanego z napadowym kaszlem. Według Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) encefalopatia występuje u 0,4% dzieci w wieku poniżej 12 miesięcy hospitalizowanych z powodu krztusca. U około jednej trzeciej dzieci z encefalopatią krztuszcową dochodzi do trwałego uszkodzenia mózgu [75].

5. Epidemiologia

Krztusiec jest chorobą endemiczną, której wybuchy epidemii występują co 2 do 5 (zwykle 3 do 4) lat [35]. Pierwsza odnotowana epidemia krztusca, opisana przez Guillaume de Baillou, wydarzyła się latem 1578 roku w Paryżu i spowodowała wiele zgonów wśród niemowląt i małych dzieci. Nie obserwuje się sezonowości występowania zachorowań [75]. Wprowadzenie powszechnych szczepień przeciw krztuscowi u dzieci nie wpłynęło na zmianę cykliczności epidemii [14]. Szczepienia przyczyniły się do kontroli choroby lecz nie



Ryc. 1. Liczba przypadków krztuśca w Polsce w latach 1954–2018, na podstawie: [52, 57].

do opanowania rozprzestrzeniania się drobnoustroju w populacji [16]. Jednak późniejsze analizy przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazały wydłużenie okresów pomiędzy wybuchami kolejnych epidemii w okresie stosowania szczepionek całokomórkowych [75]. Niemniej jednak oczywiste jest, że *B. pertussis* występuje endemicznie w populacji pomimo powszechnych programów szczepień.

Przed wprowadzeniem powszechnych szczepień ochronnych, krztusiec był jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród dzieci. Dla przykładu, w Stanach Zjednoczonych odnotowywano w tym czasie średnio aż 270 000 przypadków zachorowań na krztusiec rocznie, które doprowadzały do około 10 000 zgonów [16]. Wdrożenie całokomórkowej szczepionki przeciw krztuścowi przyniosło ogromne korzyści, w tym szybki spadek zachorowalności i umieralności z powodu krztuśca. Częstość występowania choroby była od 10 do 100 razy niższa w krajach, w których poziom zaszczepienia wynosił około 95%. W większości krajów liczba przypadków krztuśca spadła ze 100 przypadków na 100 000 mieszkańców w okresie przed wprowadzeniem szczepień do mniej niż 1 przypadku na 100 000 mieszkańców po ich wprowadzeniu. Globalnie liczba wszystkich przypadków krztuśca spadła z 3 mln zachorowań w 1974 roku do 100 000 – 200 000 zachorowań w latach 1993–1997 [52].

Rejestrację zachorowań na krztusiec w Polsce wprowadzono w 1919 roku. W latach 1920–1938 Polska należała do państw o najniższej zapadalności na tę chorobę,

która wynosiła 20–40 przypadków na 100 000 mieszkańców. Okres po II Wojnie Światowej można podzielić na trzy etapy: fazę epidemii krztuśca w latach 1952–1960, okres ciągłego spadku zachorowań w latach 1961–1989 i ponownego wzrostu liczby zgłaszanych przypadków w latach dziewięćdziesiątych. W szczytowym okresie epidemii w 1960 roku, zapadalność wynosiła 325,5 na 100 000 mieszkańców, z największą liczbą zgłoszonych przypadków wynoszącą 95 968. Najwyższa umieralność odnotowano w 1950 roku i wynosiła 6,3 na 100 000 mieszkańców (1580 zgonów). Powszechne szczepienia przeciw krztuścowi wprowadzono w Polsce w 1960 roku. W latach 1982–1992 osiągnięto prawie 100% spadek średniej zapadalności na krztusiec w stosunku do okresu 1950–1960 [52]. Najniższą zapadalność odnotowano w 1989 roku i wynosiła ona 0,28 na 100 000 mieszkańców. W 1992 roku zapadalność po raz pierwszy od 10 lat była wyższa niż 1 na 100 000 mieszkańców, a w 1998 roku wyniosła 7,4 [52]. Odnotowany w 1997 roku wzrost zachorowań na krztusiec był zaskoczeniem, gdyż program obowiązkowych szczepień przeciw krztuścowi krajową szczepionką DTP (Diphtheria-Tetanus-Pertussis) stosowano niezmiennie od 1960 roku, a średni poziom zaszczepienia w latach 1985–2000 nie zmienił się i przekraczał 95% [52]. Co więcej w Polsce w latach 90. nie doszło do zmian w diagnostyce choroby ani w systemie nadzoru epidemiologicznego, które mogłyby wpłynąć na zawyżenie rejestrowanej liczby przypadków. Powyższy trend

wzrostu zachorowań na krztusiec utrzymuje się do dzisiaj. W 2016 r. w Polsce liczba zachorowań na krztusiec była największa w ciągu ostatnich 20 lat. Według danych Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru NIZP-PZH, w 2016 roku zarejestrowano 6856 zachorowań na krztusiec (zapadalność 17,84) pomimo, iż około 97,2% dzieci otrzymało podstawowe szczepienie przeciw krztuścowi [57, 90].

6. Zmienność genetyczna pałeczek *Bordetella pertussis*

Hipoteza dotycząca zmian genetycznych zachodzących w populacji bakterii *B. pertussis* pod wpływem presji selekcyjnej w postaci odpowiedzi immunologicznej indukowanej drogą powszechnie stosowanych szczepień przeciw krztuścowi została po raz pierwszy przedstawiona przez zespół prof. F. Mooi [67]. Szereg badań polimorfizmu sekwencji genów kodujących czynniki wirulencji wśród klinicznych izolatów *B. pertussis* przeprowadzonych przez zespoły badawcze z wielu krajów wykazało, że obecnie krążące izolaty są antygenowo odmienne od szczepów stosowanych do produkcji szczepionek całokomórkowych [12, 29, 69, 94]. Szczepy *B. pertussis* antygenowo odmienne od szczepów wchodzących w skład szczepionek mogą być potencjalnie mniej wrażliwe na działanie odpowiedzi odpornościowej indukowanej drogą szczepień. Adaptacja *B. pertussis* do rozprzestrzeniania się w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia może wpływać na obniżenie efektywności szczepień oraz wzrost zachorowań na krztusiec [38, 64]. Rozbieżność antygenowa pomiędzy szczepami szczepionkowymi a izolatami klinicznymi *B. pertussis* jest zjawiskiem obecnie obserwowanym globalnie [64]. Szereg badań wykonanych na modelu mysim wykazało, że szczepionki przeciw krztuścowi były mniej efektywne w eliminacji szczepów posiadających antygeny nieszczepionkowe [7, 49, 51].

Do tej pory opisano 13 alleli genu podjednostki S1 toksyny krztuścowej: *ptxA1-ptxA13*, kodujących 6 wariantów białka [65, 70]. Dla genu *ptxC*, kodującego podjednostkę S3 toksyny krztuścowej, dotychczas opisano trzy allele – *ptxC1*, *ptxC2*, *ptxC3*, kodujące trzy warianty białka [70]. Gen kodujący pertaktynę charakteryzuje się wysokim polimorfizmem. Dotychczas opisano 13 alleli (*prn1-prn13*), kodujących 13 wariantów białka Prn [65]. Sześć alleli (*tcfA1-tcfA6*), kodujących 6 wariantów białka TcfA, zidentyfikowano dla genu *tcfA* [64]. Dla genu *fim2* dotychczas opisano 2 allele – *fim2-1* oraz *fim2-2*, kodujące 2 warianty białka [65]. Z kolei dla genu *fim3* zidentyfikowano 6 alleli (*fim3-1-fim3-6*), kodujących cztery warianty białka [65]. Największą zmienność odnotowano w regionie promotora toksyny krztuścowej, dla którego do tej pory opisano

17 różnych typów (*ptxP1-ptxP17*) [65]. Polimorfizm promotora genu toksyny krztuścowej (*ptxP*) może być szczególnie istotny dla adaptacji pałeczek *B. pertussis*. Badania przeprowadzone przez zespół F. Mooi [66] wykazały, że izolaty *B. pertussis* posiadające allel *ptxP3* wytwarzają niemal dwukrotnie więcej toksyny krztuścowej w porównaniu do izolatów posiadających allel *ptxP1* i w związku z tym są bardziej wirulentne.

W wielu krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji przeciw krztuścowi zaobserwowano ostatnio pojawienie się izolatów *B. pertussis*, które utraciły zdolność wytwarzania niektórych antygenów. Pojawienie się mutantów charakteryzujących się brakiem syntezy immunogenów szczepionkowych może być efektem naturalnej ewolucji *B. pertussis* lub może być mechanizmem adaptacyjnym umożliwiającym zwiększone krążenie pałeczek *B. pertussis* wśród osób zaszczepionych przeciw krztuścowi. Utrata zdolności wytwarzania immunogenów szczepionkowych wydaje się być szczególnie istotna w adaptacji pałeczek *B. pertussis* do odpowiedzi indukowanej przez szczepionki bezkomórkowe wywołujące wąski zakres odpowiedzi immunologicznej. Istnieją przypuszczenia, że pojawienie się izolatów *B. pertussis* niewytwarzających antygenów szczepionkowych może być wynikiem zastąpienia szczepionek całokomórkowych szczepionkami bezkomórkowymi [64].

Wśród mutantów *B. pertussis* niewytwarzających poszczególnych antygenów dominują izolaty niewytwarzające pertaktyny (Prn⁻). Szczepy (Prn⁻) wyizolowano we Francji, Finlandii, Holandii, Belgii, Danii, Norwegii, Szwecji, Wielkiej Brytanii, Włoszech, w Polsce, Izraelu, Kanadzie, USA, Australii oraz Japonii [76]. Przeprowadzone badania molekularne wykazały, że brak syntezy pertaktyny nie był wynikiem ekspansji pojedynczego klonu lecz był skutkiem powstania niezależnych mutacji. Opisano szereg mechanizmów takich jak: insercja IS481 lub IS1002 w gen kodujący Prn, delecja całego genu *prn* lub jego fragmentów, pojawienie się kodonu STOP w miejscu powodującym przedwczesne zakończenie syntezy białka, insercja guaniny do homopolimerycznego fragmentu poly(G) prowadząca do odwracalnego przesunięcia ramki odczytu w mechanizmie zmienności fazowej, inwersja części promotora *prn*, tranzycja G → A w pozycji -162 uniemożliwiająca transkrypcję genu *prn*, a także dotychczas niezidentyfikowane mutacje występujące poza promotorem oraz rejonem kodującym genu *prn* [76].

Wpływ utraty możliwości syntezy pertaktyny na transmisję i patogenezę pałeczek *B. pertussis* oraz na skuteczność szczepień przeciw krztuścowi nie został do końca poznany. Badania przeprowadzone przez zespół Bodilis i Guiso [6] wykazały, że infekcje wywoływane przez izolaty niewytwarzające pertaktyny u noworodków oraz dzieci poniżej 6 miesiąca życia przebiegały z typowym kaszlem napadowym. Dotychczas przeprowadzone

badani wskazują, że szczepy niewytwarzające pertaktyny nie wykazują obniżenia zdolności do adhezji i zakażenia komórek ssaków [25]. Wysoki odsetek tego typu izolatów sugeruje, że brak syntezy pertaktyny nie wpływa negatywnie na przeżywalność bakterii w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi. Dynamiczny wzrost częstości izolacji szczepów o fenotypie (Prn^-) wskazuje, że izolaty te zachowały zdolność transmisji wśród ludzi. Badania na modelu mysim wykazały, że izolaty, które nie wytwarzają pertaktyny są zdolne do przedłużenia infekcji w porównaniu ze szczepami wytwarzającymi Prn , co mogłyby zapewnić selektywną przewagę szczepom (Prn^-) [39].

Do chwili obecnej opisano 3 szczepy niewytwarzające toksyny krztuścowej (Ptx^-), z których jeden nie wytwarzał również pertaktyny (Prn^-). Dwa szczepy (Ptx^-) zostały wyizolowane we Francji, a szczep (Ptx^- ; Prn^-) w USA [9, 39, 96]. Mutacja odpowiedzialna za brak syntezy toksyny krztuścowej została poznana jedynie u dwóch szczepów i była związana z delecją operonu *ptx-ptl* obejmującego geny kodujące 5 podjednostek toksyny krztuścowej oraz geny odpowiedzialne za jej sekrecję [9, 96]. Wykazano, że izolaty (Ptx^-) nie utraciły zdolności do indukowania apoptozy makrofagów oraz do wnikania do komórek nabłonka tchawicy człowieka [9, 39]. W badaniu na modelu mysim wykazano, że mutanty (Ptx^-) były niezdolne do namnażania się w płucach myszy i wywołania efektu letalnego myszy zakażonych drogą donosową [9].

Na świecie zidentyfikowano dotychczas 2 szczepy *B. pertussis* niewytwarzające włóknikowej hemaglutyniny (FHA⁻). Obydwa mutanty zostały wyizolowane we Francji, jeden pochodził z okresu przed wprowadzeniem szczepień przeciw krztuścowi a drugi, niewytwarzający również pertaktyny, po wprowadzeniu szczepionek bezkomórkowych [39]. U pierwszego z tych szczepów zidentyfikowano kodon STOP w genie kodującym włóknikową hemaglutyninę natomiast brak ekspresji FHA przez drugi szczep był związany z pojawieniem się sekwencji insercyjnej w genie *fhaB* [39]. Badania przeprowadzone przez zespół Hegerle i wsp. [39] wykazały, że oba szczepy (FHA⁻) były cytotoksyczne wobec makrofagów oraz letalne dla myszy po eksperymentalnym zakażeniu donosowym.

Do tej pory opisano 3 izolaty niewytwarzające Fim 2 i Fim 3, z których dwa pochodziły z Japonii a jeden z Kanady i zostały wyizolowane w okresie powszechnego stosowania szczepionek bezkomórkowych [63, 87]. Nie wiadomo czy fenotyp (Fim⁻) był wynikiem czasowego wyłączenia ekspresji genów w mechanizmie zmienności fazowej czy wynikał z mutacji skutkujących inaktywacją ekspresji genów *fim2* i *fim3*.

Dotychczas zidentyfikowane izolaty *B. pertussis* niewytwarzające czynnika kolonizacji tchawicy pochodziły z Belgii, Wielkiej Brytanii, Holandii, Polski i USA [74,

76, 93]. Przeprowadzone badania wykazały, że pojawienie się izolatów (TcfA⁻) było spowodowane wystąpieniem niezależnych mutacji w niepowiązanych epidemiologicznie genomach szczepów *B. pertussis* [93]. Opisano 2 typy mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie fenotypu (TcfA⁻) – delecję genu *tcfA* oraz insercję/delecję pojedynczego nukleotydu G w obrębie homopolimerycznej sekwencji poly(G) skutkującą przesunięciem ramki odczytu genu *tcfA* i przedwczesnym zakończeniem syntezy białka [93].

7. Szczepionki całokomórkowe

Szczepionki całokomórkowe przeciw krztuścowi (wP – whole cell Pertussis) są zawiesinami całych inaktywowanych komórek *B. pertussis*. Po raz pierwszy zostały zarejestrowane w 1914 r. w Stanach Zjednoczonych (w Massachusetts Public Health Biological Laboratories). W 1943 r. komponent krztuścowy został skojarzony z toksoidem błoniczym i tężcowym w postaci szczepionki DTP, która w 1948 r. została zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych [75].

W latach 30. w Stanach Zjednoczonych prowadzono intensywne badania nad szczepionkami przeciw krztuścowi. Przetestowano różne metody wytwarzania szczepionek m.in. zastosowanie przemytych lub nieprzemitych zawiesin inaktywowanych bakterii, szczepionki otrzymane metodą frakcjonowania, szczepionki odtoksyczone, a także szczepionki wzbogacone o „czynniki toksyczne” oraz szczepionki zawierające w składzie inne bakterie z układu oddechowego człowieka [75].

Wykazano, że skuteczność kliniczna szczepionek była zależna od liczby komórek *B. pertussis* zawartych w dawce szczepionki. W celu poprawy skuteczności szczepionek zwiększono liczbę komórek *B. pertussis* w pojedynczej dawce, zastosowano wystandaryzowane podłoża hodowlane, będące w I fazie wzrostu bakterie oraz delikatniejsze metody ich inaktywacji [75].

Ze względu na brak laboratoryjnych testów skuteczności szczepionek przeciw krztuścowi, efektywność pierwszych szczepionek była oceniana na podstawie wyników badań klinicznych [16]. Jedno z pierwszych badań klinicznych oceny szczepionki całokomórkowej zostało przeprowadzone przez Madsena podczas wybuchu dwóch epidemii krztuśca w 1923 i 1924 roku na Wyspach Owczych [55, 75]. Zastosowana w badaniu szczepionka, przygotowana przez Duński Instytut Sero-terapeutyczny w Kopenhadze, składała się z 48-godzinnej hodowli *B. pertussis* prowadzonej na podłożu Bordet-Gengou, zawieszona w roztworze soli zawierającej fenol, o stężeniu 10⁹ komórek/ml. Przeprowadzone badanie wykazało, że zastosowana szczepionka z reguły chroniła przed zachorowaniem, a u osób u których wystąpiła choroba, łagodziła jej objawy [55, 75].

Niezwykle zasłużone w badaniach nad krztuścem oraz szczepionkami przeciw krztuścowi były Pearl Kendrick i Grace Eldering. Badania rozpoczęte w 1932 r. w Grand Rapids, w stanie Michigan, w USA doprowadziły do opracowania i ulepszenia metody hodowli pałeczek *B. pertussis*, wprowadzenia sposobu inaktywacji bakterii za pomocą tiomersalu oraz opracowania szczepionki przeciw krztuścowi [47]. Początkowo produkowały one autogenne szczepionki przeciw krztuścowi dla miejscowych lekarzy, a ich bezpieczeństwo sprawdzały wstrzykując je we własne ramiona [47, 85]. Kendrick i Eldering przeprowadziły pierwsze na dużą skalę badanie kliniczne szczepionki przeciw krztuścowi [85]. W badaniu terenowym przeprowadzonym w latach 1934–1935 uczestniczyło 1592 dzieci (712 zaszczepionych i 880 z grupy kontrolnej). Badanie wykazało, że tylko 4 z 712 zaszczepionych dzieci zachorowało na krztusiec i tylko na łagodną postać choroby, natomiast w grupie nie poddanej immunizacji, 45 dzieci zachorowało na krztusiec o ciężkim przebiegu [47]. W 1938 r. Departament ds. Produktów Biologicznych zastosował opracowaną przez Kendrick i Eldering technologię do produkcji szczepionki przeciw krztuścowi na skalę masową dla dzieci w Michigan, a do 1940 r. szczepionka została użyta do powszechnych szczepień dzieci w całym Stanach Zjednoczonych [85]. W 1947 r. Kendrick i Eldering opracowały test do oceny efektywności szczepionek całokomórkowych przeciw krztuścowi przeprowadzany na myszach immunizowanych a następnie zakażanych domózgowo zjadliwym szczepem *B. pertussis* (tzw. test Kendrick) [48]. Test ten w sposób powtarzalny mierzy aktywność szczepionki skorelowaną ze skutecznością ochronną u ludzi i w wielu laboratoriach nadal jest stosowany.

Szczepionki przeciw krztuścowi produkowane w Stanach Zjednoczonych różniły się między sobą pod względem metod produkcji i generowały różne poziomy przeciwciał ochronnych [23], nie mniej jednak po ich wprowadzeniu nastąpił szybki spadek zachorowalności i śmiertelności z powodu krztuśca. Podczas gdy większość szczepionek DTwP była bardzo skuteczna (na poziomie 80–98%) [73], kilka zarejestrowanych tego typu szczepionek indukowało niską ochronę. Szczepionka DTwP produkowana przez Connaught Laboratories (obecnie Sanofi Pasteur, Toronto), stosowana w Kanadzie w latach 1985–1998, charakteryzowała się skutecznością na poziomie 49–61%. Szczepionka ta uzyskała niskie wskaźniki oceny skuteczności po trzech dawkach również w Szwecji (na poziomie 48%) oraz we Włoszech (na poziomie 36%) [36]. Stosowanie tej szczepionki uznano za główny czynnik odpowiedzialny za powrót zachorowań na krztusiec w Kanadzie w latach 90. [71]. Powrót choroby w Szwecji w latach 70. prawdopodobnie był związany z wcześniejszymi zmianami w procesie produkcji szwedzkiej szczepionki DTwP

[92]. Z kolei prawie natychmiastowy wzrost zachorowań na krztusiec w Szwecji po zaprzestaniu szczepień wskazuje na wysoką skuteczność szczepionek DTwP w ograniczaniu zachorowań [80].

Pomimo, że wyniki niektórych badań szczepionek wP przeprowadzonych w Europie wykazały zaskakująco niskie wskaźniki oceny skuteczności [41, 62], to jednak większość badań wykazała wysoką efektywność ochronną szczepionek wP [19, 68]. Ogólnokrajowe badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii w latach 1989–1990, wykazały wskaźniki skuteczności całokomórkowej szczepionki Wellcome (podawanej w 3, 5 i 10 miesiącu życia) na poziomie 87% i 93%, odpowiednio w okresach epidemicznych i nieepidemicznych [78]. Skuteczność szczepionki spadała wraz z upływem czasu od momentu immunizacji, ale utrzymywała się na wysokim poziomie do 8 roku życia. W 1994 r. przeprowadzono powtórne badanie w celu sprawdzenia czy skuteczność szczepionki Wellcome nie uległa zmianie w związku ze zmianą schematu immunizacji na podanie w 2, 3 i 4 miesiącu życia, bez późniejszej dawki przypominającej. Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność nie uległa zmianie i wynosiła 94% dla dzieci w wieku od 6 miesięcy do 5 lat [95].

Dowody na skuteczność szczepionki wP wynikają również z obserwacji, że zgłaszana zapadalność na krztusiec jest odwrotnie proporcjonalna do poziomu wyszczepialności. Badanie przeprowadzone w Anglii i Walii wykazało, że w regionach z niską akceptacją szczepień przeciw krztuścowi (<30%) odnotowano o 59% wyższą częstość występowania krztuśca wśród dzieci niż na obszarach o dużej (>50%) akceptacji szczepień [75]. W Stanach Zjednoczonych, gdzie szczepienia zaczęły być stosowane rutynowo pod koniec lat 40. XX wieku, krajowy nadzór wykazał ponad 95% spadek liczby zachorowań na krztusiec [13]. Dodatkowymi dowodami na skuteczność szczepionki wP są wybuchy epidemii krztuśca w populacjach nieimmunizowanych [14, 73].

Szczepionki zawierające całe komórki *B. pertussis* od dawna uznawane są za jedne z bardziej reaktogennych szczepionek. Reakcje miejscowe w postaci zaczerwienienia, obrzęku i bólu w miejscu wstrzyknięcia występują u około połowy dzieci poddanych szczepieniu DTwP. Reakcje te występują pięciokrotnie częściej po szczepionce DTwP w porównaniu do szczepionki DT. Podobnie, łagodne reakcje układowe, takie jak gorączka, drażliwość i senność są znacznie częstsze po DTwP niż po DT. Około 30% dzieci, które otrzymały szczepionkę wP doświadczyło niewielkiej gorączki po szczepieniu, ale tylko mniej niż 1% o temperaturze powyżej 40,5°C [18]. Przez pewien czas istniało poważne podejrzenie, że szczepionki całokomórkowe mogą być przyczynowo związane z wystąpieniem encefalopatii u dzieci, zespołem nagłej śmierci niemowląt (SIDS – Sudden

Infant Death Syndrome), czy zespołem hipotoniczno-hiporeaktywnym (HHE – Hypotonic Hyporesponsive Episode) [42]. Przeprowadzona metaanaliza wykazała jednak brak związku między szczepionką wP a ryzykiem wystąpienia poważnych zespołów chorobowych [42].

Obawy związane z bezpieczeństwem szczepionki DTwP nasiliły się w latach 70. i 80. XX wieku. W związku z brakiem zaufania do szczepień oraz w połączeniu z obniżającymi się wskaźnikami zachorowalności, w wielu krajach zaprzestano stosowania szczepionki całokomórkowej [16, 30], co doprowadziło do wzrostu liczby zachorowań na krztusiec [14, 50]. W innych krajach, takich jak Wielka Brytania, Włochy, Irlandia, Niemcy Zachodnie, Rosja i Australia odnotowano obniżenie poziomu zaszczepienia z powodu braku zgody rodziców na szczepienie [30]. W związku z negatywnym rozgłosem wokół zdarzeń niepożądanych wyszczepialność spadła z około 75% do prawie 25%, co skutkowało wystąpieniem poważnych epidemii krztuśca [16]. Począwszy od 1975 roku, po zaprzestaniu powszechnych szczepień w Japonii, nastąpił kolejny wybuch epidemii krztuśca, w wyniku którego setki dzieci zmarło [46]. Podobnie było w Anglii i Walii [16]. W Szwecji, gdzie szczepienie przeciw krztuścowi zostało zawieszono w 1979 r., częstość występowania krztuśca wzrosła ponad czterokrotnie w okresie 1980–1985 i doszło do poważnych epidemii w kolejnych latach [80].

Szczepionki całokomórkowe produkowane są lokalnie w wielu regionach świata. Ich produkcja jest stosunkowo niedroga dlatego są dostępne na całym świecie i dominują w krajach o niskim i średnim dochodzie, gdzie stosowane są w formie skojarzonej z antygenem błoniczym i tężcowym. Wykorzystywane są także szczepionki w postaci pięcioskładnikowej zawierające także antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (wzw B) oraz polisacharyd szczepu *Haemophilus influenzae* typu b. Szczepionki DTwP są standardem opieki w Afryce, w większości krajów Azji i wielu krajach Ameryki Łacińskiej [75]. Według danych WHO, 64% krajów na świecie nadal stosuje szczepionki wP przeciw krztuścowi, w tym 96% krajów Afryki i 100% krajów w regionie Azji Południowo-Wschodniej. Polska jest jedynym krajem europejskim, w którym nadal stosuje się szczepionkę DTwP do szczepienia podstawowego niemowląt [75].

W wytycznych WHO z września 2015 r. zalecono, aby kraje, które obecnie stosują szczepionki całokomórkowe nadal je stosowały, ponieważ dane z nadzoru epidemiologicznego sugerują, że stosowanie szczepionek bezkomórkowych może spowodować powrót krztuśca. Przejście ze szczepionki całokomórkowej na bezkomórkową może zostać rozważone tylko w przypadku zapewnienia szczepień przypominających oraz szczepień kobiet w ciąży [99].

8. Szczepionki bezkomórkowe

Poznanie patogenezы pałeczek *B. pertussis* pozwoliło na produkcję szczepionek bezkomórkowych (aP – acellular Pertussis) zawierających oczyszczone antygeny *B. pertussis*. Obecne szczepionki aP oparte są na różnych kombinacjach pięciu głównych antygenów *B. pertussis* takich jak toksyna krztuścowa, włókienkowa hemaglutynina, pertaktyna oraz dwa białka fimbrii (Fim 2 i Fim 3). Pierwsze szczepionki aP, opracowane przez Sato i współpracowników w Japonii, zawierały traktowaną formaldehydem FHA oraz inaktywowaną formaliną Ptx (JNIIH 6) i produkowane były przez japońskie firmy farmaceutyczne Takeda i Biken [82]. Przedmiotem badań była również szczepionka monowalentna zawierająca jedynie toksynę krztuścową (JNIIH 7). Szczepionki te podawane były dzieciom w wieku 2 lat i starszym. Skuteczność szczepionki JNIIH 6 została oszacowana na poziomie 78–92%, w zależności od liczby podanych dawek i wieku szczepionych dzieci [82]. Obie szczepionki zostały przetestowane również w Szwecji. Skuteczność po 2 dawkach u niemowląt wynosiła 69% dla szczepionki dwuskładnikowej (FHA i Ptx) i 54% dla szczepionki jednoskładnikowej (Ptx) [1]. W 1981 r. szczepionka aP została wprowadzona w Japonii do rutynowych szczepień przeciw krztuścowi [30]. W 1992 r. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA – Food & Drug Administration) zatwierdziła szczepionki aP do stosowania w ramach szczepienia przypominającego [13], a w 1996 r. szczepionki te zostały włączone do kalendarza szczepień do uodpornienia podstawowego niemowląt [83].

Pozytywne wyniki badań skuteczności japońskich szczepionek aP zachęciły inne uprzemysłowione kraje do badań nad opracowaniem nowych szczepionek bezkomórkowych. Opracowano wiele szczepionek aP, które różniły się od siebie pod względem liczby i stężenia poszczególnych antygenów, metod ich oczyszczania, stosowanych adiuwantów i substancji pomocniczych. W latach 90. przeprowadzono wiele badań klinicznych oceny skuteczności i bezpieczeństwa szczepionek bezkomórkowych. Były to jedne z największych i najdroższych badań klinicznych w historii szczepień. Trudno jednak porównywać uzyskane wyniki między sobą, ponieważ w badaniach zastosowano różne metodologie badawcze obejmujące różne schematy immunizacji i dawki oraz stosowano różne definicje przypadku krztuśca. Jako szczepionki odniesienia zastosowano charakteryzujące się różną skutecznością szczepionki całokomórkowe [33]. W styczniu 1991 r. WHO powołała grupę ekspertów w celu opracowania definicji przypadku krztuśca do stosowania w badaniach klinicznych. Według definicji WHO, aby stwierdzić, że przyczyną choroby jest krztusiec, kaszel musi trwać co najmniej 21 dni, a następnie choroba powinna

zostać potwierdzona w badaniach laboratoryjnych np. w wyniku pozytywnej hodowli pałeczek *B. pertussis* lub znacznego wzrostu przeciwciał IgG lub IgA przeciwko Ptx, FHA lub Fim-2 oraz Fim-3 [98].

Ze względu na to, że test domózgowego zakażenia myszy (test Kendrick) nie sprawdził się w przypadku oceny skuteczności szczepionek bezkomórkowych, rozpoczęto prace nad optymalizacją metody do oceny skuteczności szczepionek aP *in vitro* [35]. Próby donosowego zakażenia myszy prowadzone przez zespół Nicole Guiso dały obiecujące wyniki [34], jednak szersze zastosowanie okazał się mieć test ELISA służący do pomiaru u immunizowanych myszy poziomu przeciwciał swoistych dla poszczególnych antygenów zawartych w szczepionce.

Szczepionki DTaP początkowo stosowane były tylko do szczepień przypominających u dzieci, a następnie zostały wprowadzone do schematów szczepień podstawowych [24]. Zalecenia Doradczego Komitetu ds. Szczepień (USA) (ACIP – Advisory Committee on Immunisation Practices) dotyczące stosowania szczepionek DTaP jako czwartej i piątej dawki przypominającej wprowadzono w 1992 r. [13]. Z kolei, w 2006 r. wprowadzono dawkę przypominającą szczepionki dTap o zmniejszonej ilości antygenów błoniczego i krztuścowego dla nastolatków [10]. W 2011 r. ACIP wprowadził zalecenia immunizacji szczepionką dTap wszystkich kobiet w ciąży w celu ochrony noworodków przed krztuścem [75].

W większości krajów rozwiniętych, szczepionki całokomórkowe zostały wyparte przez szczepionki bezkomórkowe. Szczepionki DTaP całkowicie zastąpiły szczepionki DTwP w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii, Nowej Zelandii, w Europie (z wyjątkiem Polski) oraz w niektórych krajach Azji i Ameryki Łacińskiej i są powszechnie stosowane w sektorze prywatnym na całym świecie. Z krajów afrykańskich tylko Mauritius i kraje południowej części Afryki używają szczepionek bezkomórkowych. W każdym kraju schemat szczepień przeciw krztuścowi obejmuje trzy dawki szczepionki w pierwszych 6 miesiącach życia. W części krajów stosowana jest dawka przypominająca w drugim roku życia, a tylko w nielicznych krajach stosuje się kolejną dawkę przypominającą dla dzieci w wieku od 4 do 6 lat [75]. W 2006 roku na całym świecie wyprodukowano ponad 500 milionów dawek szczepionek zawierających w swoim składzie składnik krztuścowy, z czego ponad 100 milionów dawek pochodziło z dwóch największych koncernów farmaceutycznych – Sanofi Pasteur i GSK [75].

W Polsce, do uodpornienia podstawowego niemowląt i małych dzieci nadal stosuje się szczepionkę DTwP. Szczepionka bezkomórkowa jest dostępna w Polsce od 1998 roku i refundowana jest do szczepienia podstawowego niemowląt jedynie dla wcześniaków i noworod-

ków urodzonych z niską masą urodzeniową tj. poniżej 2500 gramów. Pomimo braku refundacji szacuje się, że obecnie ponad połowa polskich rodziców wybiera odpłatne szczepionki ze składnikiem aP [89]. W 2004 r. do szczepień obowiązkowych w Programie Szczepień Ochronnych wprowadzono dawkę przypominającą szczepionki aP dla dzieci w 6 roku życia, a w 2016 r. wprowadzono kolejną dawkę przypominającą dla nastolatków w wieku 14 lat. Istnieją zalecenia dotyczące szczepień przeciw krztuścowi personelu oddziałów neonatologicznych i pediatrycznych, kobiet w ciąży, nastolatków w wieku 19 lat, osób w wysokim stopniu narażonych na zakażenie oraz osób dorosłych co 10 lat. Schemat szczepień przeciw krztuścowi w Polsce obejmuje podawanie kolejnych dawek szczepionki DTwP lub DTaP dzieciom w wieku 2, 3–4, 5–6, 16–18 miesięcy oraz szczepionki DTaP w 6 roku życia. Szczepionki przeciw krztuścowi bezkomórkowe i całokomórkowe charakteryzują się różnymi profilami bezpieczeństwa. W przypadku szczepionek DTaP obserwowanych jest mniej niepożądanych reakcji miejscowych, takich jak zaczerwienienie, obrzęk, ból w miejscu wstrzyknięcia oraz mniej reakcji ogólnoustrojowych, takich jak gorączka i uporczywy płacz [18].

9. Nowe szczepionki przeciw krztuścowi

W celu uzyskania lepszej kontroli nad zakażeniami na krztusiec niezbędne jest udoskonalanie obecnie stosowanych szczepionek lub opracowanie nowych szczepionek w celu wydłużenia czasu trwania odporności poszczepiennej. Zaproponowano różne podejścia w tym: nową formułą obecnie istniejących szczepionek bezkomórkowych poprzez dodanie nowych adiuwantów wzmacniających odpowiedź zależną od Th1 lub Th17, włączenie nowych antygenów pałeczek *B. pertussis* zawierających więcej natywnych struktur bez modyfikacji chemicznych, a także opracowanie szczepionek opartych na pęcherzykach błony zewnętrznej lub żywych, atenuowanych bakteriami [21].

Wśród badanych potencjalnych nowych antygenów szczepionkowych są m.in. ekspozowane na powierzchni pałeczek *B. pertussis* unikalne wysoce immunogenne białka IRP1-3 i AfuA, które są zaangażowane w wychwyty żelaza. Włączenie białka IRP1-3 i rekombinowanej formy białka AfuA do eksperymentalnej szczepionki powodowało skuteczniejszą ochronę myszy w porównaniu do szczepionki niezawierającej tych białek [3]. Innym potencjalnym antygenem szczepionkowym jest rekombinowana forma cykazy adenylowej pozbawiona aktywności enzymatycznej. Badania na modelu mysim wykazały, że immunizacja rekombinowaną formą ACT powodowała wzrost ochrony przed donosowym zakażeniem pałeczkami *B. pertussis* i indukowanie odpowiedzi

immunologicznej zarówno o profilu Th1, jak i Th2 [17]. Przedmiotem badań jest również białko błony komórkowej BipA oraz białko BrkA. Immunizacja myszy rekombinowanym białkiem BipA aktywowała przeciwciała opsonizujące i znacznie ograniczyła kolonizację płuc myszy przez pałeczki *B. pertussis* [20]. Badania na modelu mysim wykazały, że samo podanie będącego autotransporterem białka BrkA nie chroni znacząco myszy przed zakażeniem *B. pertussis*, ale dodanie go do obecnych w szczepionkach antygenów Ptx i FHA zwiększa znacznie ochronę przed kolonizacją płuc pałeczkami *B. pertussis* podanymi drogą donosową. Wykazano również, że genetycznie odtoksyczniona toksyna krztuścowa jest bardziej immunogenna niż chemicznie unieczynniona, co przekłada się na uzyskanie wyższego miana przeciwciał neutralizujących oraz silniejszej odpowiedzi Th1/Th17 [84].

W badaniach na modelu mysim wykazano, że pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV – Outer Membrane Vesicles) zawierające powierzchniowe białka antygenowe pałeczek *B. pertussis* są bezpieczne i wysoce immunogenne [8]. Profil bezpieczeństwa szczepionek OMV jest porównywalny do szczepionek aP i znacznie lepszy od szczepionek wP [81]. Fernandez i wsp. [27] wykazali, że preparat proteoliposomowy pochodzący z *B. pertussis* indukuje ochronę u 90% myszy przed letalną infekcją *B. pertussis* i z czasem powoduje całkowitą eliminację bakterii podanych drogą domózgową i donosową. Szczepionka OMV indukuje odpowiedź immunologiczną o mieszanym profilu Th1/Th17 i Th2 z silną odpowiedzią humoralną [8]. Ponadto wykazano, że szczepionka OMV chroni przed zróżnicowanymi genetycznie izolatami *B. pertussis* także tymi, które nie wytwarzają pertaktyny [11]. Innym podejściem jest zastosowanie pęcherzyków błony zewnętrznej zawierających antygeny powierzchniowe, takie jak Prn i Ptx. Roberts i współpracownicy wykazali, że donosowe lub śródtrzewne podawanie pęcherzyków błony zewnętrznej indukuje ochronę przed zakażeniem krztuścem u myszy [79].

W obecnie zarejestrowanych szczepionkach bezkomórkowych, jako adiuwanty powszechnie stosowane są związki glinu w postaci wodorotlenku glinu i fosforanu glinu. Ich rola polega na zwiększaniu efektywności odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez zawarte w szczepionce antygeny przez m.in. wywoływanie efektu depot w miejscu wstrzyknięcia, aktywację układu dopełniacza, stymulację makrofagów oraz wzmacnianie aktywności odpowiedzi limfocytów szlaku Th2. Ze względu na fakt, że kluczową rolę w skutecznej eliminacji pałeczek *B. pertussis* odgrywa odpowiedź typu Th1, rozpoczęto badania nad adiuwantami nowej generacji, wzmacniającymi aktywność limfocytów Th1 [53]. Badania przeprowadzone przez Polewicz i wsp. [77] wykazały, że zastosowanie jako

adiuwantów krótkich, jednoniciowych, syntetycznych cząsteczek DNA zawierających wyspy CpG, indukuje wyższe poziomy przeciwciał IgG2a i IgA oraz wzmacnia odpowiedź typu Th1 u myszy. Ponadto, pomagają one przełamać supresję pierwotnej odpowiedzi na toksynę krztuścową u niemowląt posiadających przeciwciała pochodzenia matczyne [77]. Motywy CpG ze względu na ich obfitość w genomach drobnoustrojów, ale rzadkość w genomach kręgowców, uważane są za wzory cząsteczkowe związane z patogenami PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) i są selektywnie rozpoznawane przez mechanizmy nieswoistej odpowiedzi wrodzonej i uruchamiają proces zwalczania infekcji. W innych badaniach testowano lipoproteinę z *B. pertussis* [22], adiuwant emulsyjny MF59 [2], syntetyczny peptyd regulujący mechanizmy wrodzonej odporności [32], monofosforylolid A oraz wiele innych cząsteczek immunostymulujących [4, 31, 86]. Wszystkie powyżej testowane adiuwanty, poprzez podobieństwo do struktur charakterystycznych dla drobnoustrojów chorobotwórczych, rozpoznawane są dzięki specyficznym receptorom znajdujących się na powierzchni leukocytów. Do takich receptorów zalicza się receptory Toll-like (TLR), które m.in. inicjują nabytą odpowiedź immunologiczną przez aktywację komórek dendrytycznych [5].

Najbardziej zaawansowana w badaniach jest szczepionka BPZE1 zawierająca żywe, atenuowane komórki bakteryjne. Substancją czynną szczepionki jest szczep *B. pertussis* pozbawiony toksyczności poprzez genetyczną inaktywację trzech toksyn tj. toksyny krztuścowej, toksyny dermonekrotycznej i cytotoksyny tchawiczej [61]. Wykazano, że zdolność do kolonizacji płuc myszy przez szczep BPZE1 jest podobna do zdolności szczepu macierzystego. W przeciwieństwie do zjadliwego szczepu rodzicielskiego, szczep BPZE1 nie indukuje zmian w płucach u myszy po podaniu donosowym [54, 61]. Stabilność genetyczną szczepu BPZE1 oceniano po kilku pasażach *in vitro* i *in vivo* [28]. Bezpieczeństwo szczepionki BPZE1 zostało potwierdzone w kilku badaniach przedklinicznych [53]. Badania na modelu mysim dowodzą, że jedna dawka szczepionki chroni przed kolonizacją bakterii w płucach [60]. Wykazano, że pojedyncze podanie szczepionki BPZE1 indukuje poziom przeciwciał porównywalny do poziomu obserwowanego po dwóch dawkach szczepionki aP [61]. Szczepionka BPZE1 podana donosowo indukuje zarówno śluzówkową, jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, która wzbudza szybką i szerszą odporność w porównaniu do szczepionek podawanych domięśniowo. Wykazano, że indukowana przez szczepionkę BPZE1 ochrona przed kolonizacją płuc po zakażeniu *B. pertussis* jest długotrwała i znacznie silniejsza w porównaniu do ochrony wzbudzonej przez szczepionkę bezkomórkową [28].

Co więcej, szczepionka ta zapewnia szybszą ochronę przed zachorowaniem w porównaniu do szczepionek aP [53]. Wykazano, że skuteczność szczepionki BPZE1 w indukowaniu przeciwciał przeciwko antygenom *B. pertussis*, a także w wytwarzaniu swoistego antygenowo IFN- γ zależy od użytej dawki [60]. Okazało się, że szczepionka BPZE1 zapewnia ochronę również przed bakteriami *Bordetella bronchiseptica* [45]. Badania przeprowadzone na modelu pawiana wykazały, że szczep BPZE1 przejściowo kolonizuje jamę nosowo-gardłową [54]. Donosowa droga podania szczepionki stymuluje miejscową odporność na poziomie błony śluzówkowej, co zapobiega kolonizacji przez bakterie *B. pertussis*. W efekcie, szczepionka BPZE1 zapewnia ochronę nie tylko przed zachorowaniem, ale też przed kolonizacją. Ochrona ta jest bardzo podobna do odporności po naturalnej infekcji. Wykazano, że kolonizacja przez zjadliwy szczep płuc pawianów zaszczepionych szczepionką BPZE1 została zmniejszona o 99,998% w porównaniu z nieszczepionymi pawianami [54]. Obecnie stosowane szczepionki aP i wP nie eliminują nosicielstwa. Otrzymane wyniki są o tyle obiecujące, że BPZE1 może zapobiegać kolonizacji, a co za tym idzie blokować transmisję *B. pertussis* w populacji. Badanie przedkliniczne wykazało, że BPZE1 sprzyja indukowanej chemokinami CCL migracji komórek dendrytycznych i stymuluje odpowiedź typu Th1/Th17 [26]. W badaniach na myszach dowiedziono, że szczepionka BPZE1 stymuluje odpowiedzi przeciwciał porównywalne do szczepionek acelularnych [61]. Szczepionka BPZE1 w swoich właściwościach immunologicznych zbliżona jest do właściwości szczepionki całokomórkowej, a swoim bezpieczeństwem przypomina szczepionkę aP [53]. Myszy immunizowane żywym, atenuowanym szczepem były chronione przez co najmniej 1 rok po immunizacji co sugeruje, że szczepionka ta może zapewniać również ochronę długoterminową [88]. Badanie kliniczne fazy I przeprowadzone na dorosłych mężczyznach wykazało, że szczepionka BPZE1 jest bezpieczna i immunogenna [91]. Obecnie trwają badania kliniczne fazy II szczepionki BPZE1 [89].

10. Podsumowanie

Od połowy XX wieku szczepionki wywarły znaczący wpływ na zdrowie publiczne, kontrolując rozprzestrzenianie się wielu chorób zakaźnych na całym świecie. Prowadzone masowo szczepienia ukierunkowały proces zmienności bakterii *B. pertussis* na wyeliminowanie z populacji szczepionkowych wariantów tego drobnoustroju. Początkowo do produkcji szczepionek przeciw krztuścowi stosowano od kilku do kilkunastu szczepów na bieżąco izolowanych od chorych [52]. Wydaje się, że gdyby proces wytwarzania szczepionek opierał się

na ww. strategii, częstość izolacji szczepów *B. pertussis* o wcześniej niespotykanych genotypach byłaby zdecydowanie niższa. Można przypuszczać, że stosowanie szczepionek bezkomórkowych indukujących bardziej swoiste spektrum przeciwciał może nasilać ekspansję szczepów coraz bardziej odmiennych antygenowo. Stabilność ewolucyjna składnika zakaźnego wydaje się być ważna szczególnie wśród chorób kontrolowanych za pomocą szczepień. W przypadku gdy szczepionki oparte będą o izolaty cechujące się najwyższą zjadliwością, z populacji eliminowane będą drobnoustroje charakteryzujące się najwyższym zagrożeniem chorobotwórczym. Z kolei, jeśli stosowane szczepionki oparte będą o antygeny szczepów o nie w pełni określonej lub mniejszej zjadliwości, w populacji mogą rozprzestrzeniać się szczepy potencjalnie bardziej zjadliwe. W związku z niekorzystnymi zmianami w epidemiologii krztuśca w krajach, które od dziesięcioleci utrzymywały wysoki poziom zaszczepienia, rozpoczęto próby nad optymalizacją strategii ograniczenia zachorowań m.in. wprowadzono zalecenia do powszechnych szczepień młodzieży i osób dorosłych, kobiet w ciąży, czy osób mających bliski kontakt z noworodkami [99]. Wiadomym jest, że kontrola zachorowań na krztusiec nie jest możliwa przez podawanie szczepionek wyłącznie dzieciom, ponieważ następuje spadek odporności w miarę upływu czasu od podania ostatniej dawki szczepionki. Szczepienia zapobiegają rozwojowi choroby, a nie zakażeniu, a osoby dorosłe biorą udział w transmisji zakażeń [15]. Rosnąca liczba zachorowań stłumiła entuzjazm wynikający z powszechnego wprowadzenia szczepionek bezkomórkowych, jako bezpieczniejszej alternatywy. Szczepionki całokomórkowe, poza Polską, nie są już stosowane w Europie, a im dłuższy okres czasu upłynął od ich wycofania z programów szczepień, tym bardziej problem wzrostu liczby zachorowań zaczął się nasilać. Należy również podkreślić, że realna skala zachorowań może być zdecydowanie wyższa, ponieważ diagnostyka obejmuje przypadki o typowych objawach klinicznych. Najprawdopodobniej w starszych grupach wiekowych, gdzie choroba przybiera łagodniejszy przebieg, pozostaje ona niezdiagnozowana [15].

Piśmiennictwo

1. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines.: Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden: protective efficacy and adverse events. *Lancet*, **1**, 955–960 (1988)
2. Agnolon V., Bruno C., Leuzzi R., Galletti B., D'Oro U., Pizza M., Seubert A., O'Hagan D., Baudner B.: The potential of adjuvants to improve immune responses against TdaP vaccines: A preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int. J. Pharm.* **492**, 169–176 (2015)
3. Alvarez Hayes J., Erben E., Lamberti Y., Principi G., Maschi F, Ayala M, Rodriguez M.: *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine*, **31**, 3543–3548 (2013)

4. Asokanathan C., Corbel M., Xing D.: A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against *Bordetella pertussis*. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 325–331 (2013)
5. Bernard N., Finlay C Tannahill G., Cassidy J., O'Neill L., Mills K.: A critical role for the TLR signaling adapter Mal in alveolar macrophage-mediated protection against *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* **8**, 982–992 (2015)
6. Bodilis H., Guiso N.: Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 471–474 (2013)
7. Bottero D., Hozbor D. i wsp.: Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1490–1498 (2007)
8. Bottero D., Hozbor D. i wsp.: Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine*, **34**, 3303–3309 (2016)
9. Bouchez V., Hegerle N., Strati F., Njamkepo E., Guiso N.: New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines*, **3**, 751–770 (2015)
10. Broder K., Cortese M., Iskander J.: Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* **55**, 1–34 (2006)
11. Carbonetti N.: *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29**, 287–294 (2016)
12. Cassidy P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K., Popovic T.: Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J. Infect. Dis.* **182**, 1402–1408 (2000)
13. Centers for Disease Control and Prevention.: Pertussis-United States, January 1992–June 1995. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **44**, 525–529 (1995)
14. Cherry J.: The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr. Probl. Pediatr.* **14**, 1–78 (1984)
15. Cherry J.: Epidemic pertussis and acellular pertussis vaccine failure in the 21st century. *Pediatrics*, **135**, 1130–1132 (2015)
16. Cherry J., Brunell P., Golden G.: Report of the task force on pertussis and pertussis immunization – 1988. *Pediatrics*, **81**, 939–984 (1988)
17. Cheung G., Xing D., Prior S., Corbel M., Parton R., Coote J.: Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect. Immun.* **74**, 6797–6805 (2006)
18. Cody C., Baraff L., Cherry J., Marcy S., Manclark C.: Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics*, **68**, 650–660 (1981)
19. Cvjetanovic B., Grab B., Uemura K.: Diphtheria and whooping cough: diseases affecting a particular age group. *Bull. World Health Organ.* **56**, 103–133 (1978)
20. de Gouw D., Serra D., de Jonge M., Hermans P., Wessels H., Zomer A., Yantorno O., Diavatopoulos D., Mooi F.: The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, e58 (2014)
21. Diavatopoulos D., Edwards K.: What is wrong with Pertussis vaccine immunity? Why immunological memory to Pertussis is failing. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **9**, a029553 (2017)
22. Dunne A., Mielke L., Allen A., Sutton C., Higgs R., Cunningham C., Higgs S., Mills K.: A novel TLR2 agonist from *Bordetella pertussis* is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol.* **8**, 607–617 (2015)
23. Edwards K., Decker M., Halsey N., Koblin B., Townsend T., Auerbach B., Karzon D.: Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics*, **88**, 1019–1023 (1991)
24. Edwards K., Deloria M. i wsp.: Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics*, **96**, 548–557 (1995)
25. Fedele G., Bianco M., Ausiello C.: The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **61**, 445–457 (2013)
26. Fedele G., Bianco M., Debie A., Loch C., Ausiello C.: Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1 promotes human dendritic cell CCL21-induced migration and drives a Th1/Th17 response. *J. Immunol.* **186**, 5388–5396 (2011)
27. Fernández S., Pérez J. i wsp.: A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol.* **14**, S8 (2013)
28. Feunou P., Ismaili J., Debie A., Huot L., Hot D., Raze D., Lemoine Y., Loch C.: Genetic stability of the live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1. *Vaccine*, **26**, 5722–5727 (2008)
29. Fry N., Neal S., Harrison T., Miller E., Matthews R., George R.: Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect. Immun.* **69**, 5520–5528 (2001)
30. Gangarosa E., Galazka A., Wolfe C., Phillips L., Gangarosa R., Miller E., Chen R.: Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet*, **351**, 356–361 (1998)
31. Garlapati S., Gerdtts V. i wsp.: Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine*, **29**, 6540–6548 (2011)
32. Gracia A., Polewicz M., Halperin S., Hancock R., Potter A., Babiuk L., Gerdtts V.: Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel *Bordetella pertussis* vaccine formulations. *Vaccine*, **29**, 1595–1604 (2011)
33. Greco D., Salmaso S., Mastrantonio P., Giuliano M., Tozzi A., Anemona A.: A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 341–348 (1996)
34. Guiso N., Capiou C., Carletti G., Poolman J., Hauser P.: Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine*, **17**, 2366–2376 (1999)
35. Guris D., Strebel P., Bardenheier B., Brennan M., Tachdjian R., Finch E., Wharton M., Livengood J.: Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990–1996. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1230–1237 (1999)
36. Gustafsson L., Hallander H. O., Olin P., Reizenstein E., Storsaeter J.: A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* **334**, 349–355 (1996)
37. He Q., Mäkinen J., Berbers G., Mooi F., Viljanen M., Arvilommi H., Mertsola J.: *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J. Infect. Dis.* **187**, 1200–1205 (2003)
38. He Q., Mertsola J.: Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.* **3**, 329–339 (2008)
39. Hegerle N., Dore G., Guiso N.: Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, **32** (2014)
40. Hewlett E.: Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**, 78–84 (1997)

41. Hinman A., Koplan J.: Pertussis and pertussis vaccine. Reanalysis of benefits, risks, and costs. *JAMA*, **251**, 3109–3113 (1984)
42. Howson C., Fineberg H.: Adverse events following pertussis and rubella vaccines. Summary of a report of the Institute of Medicine. *JAMA*, **267**, 392–396 (1992)
43. Jenkinson D.: Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *Brit. Med. J.* **296**, 612–614 (1988)
44. Jones A., Boucher P., Williams C, Stibitz S., Cotter P.: Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* **58**, 700–713 (2005)
45. Kammoun H., Feunou P., Foligne B., Debie A., Raze D., Mielcarek N., Loch C.: Dual mechanism of protection by live attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 against *Bordetella bronchiseptica* in mice. *Vaccine*, **30**, 5864–5870 (2012)
46. Kanai K.: Japan's experience in pertussis epidemiology and vaccination in the past thirty years. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **33**, 107–143 (1980)
47. Kendrick P., Eldering G.: Progress report on pertussis immunization. *Am. J. Public Health*, **26**, 8–12 (1936)
48. Kendrick P., Eldering G., Dixon M. K., Misner J.: Mouse protection tests in the study of pertussis vaccines: a comparative series using the intracerebral route of challenge. *Am. J. Public Health*, **37**, 803–810 (1947)
49. King A., Berbers G., van Oirschot H., Hoogerhout P., Knipping K., Mooi F.: Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology*, **147**, 2885–2895 (2001)
50. Klein N.: Licensed pertussis vaccines in the United States. History and current state. *Hum. Vacc. Immunother.* **10**, 2684–2690 (2014)
51. Komatsu E., Yamaguchi F., Abe A., Weiss A., Watanabe M.: Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 807–812 (2010)
52. Kostrzewski J., Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D.: Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku. PZWL, Warszawa, 2001.
53. Loch C., Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **66**, 121–133 (2012)
54. Loch C., Papin J., Lecher S., Debie A., Thalen M., Solovay K., Rubin K., Mielcarek N.: Live Attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis.* **216**, 117–124 (2017)
55. Madsen T.: Vaccination against whooping cough. *JAMA*, **101**, 187–188 (1933)
56. Mattoo S., Cherry J.: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 326–382 (2005)
57. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce, NIZP-PZH. Strona http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (10.08.2019).
58. Melvin J., Scheller E., Miller J., Cotter P.: *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 274–288 (2014)
59. Merkel T., Stibitz S., Keith J., Leef M., Shahin R.: Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **66**, 4367–4373 (1998)
60. Mielcarek N., Debie A., Mahieux S., Loch C.: Dose response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 317–324 (2010)
61. Mielcarek N., Loch C. i wsp.: Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* **2**, e65 (2006)
62. Miller D., Alderslade R., Ross E.: Whooping cough and whooping cough vaccine: the risks and benefits debate. *Epidemiol. Rev.* **4**, 1–24 (1982)
63. Miyaji Y., Otsuka N., Toyozumi-Ajisaka H., Shibayama K., Kamachi K.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One*, **8**, e77165 (2013)
64. Mooi F.: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 36–49 (2010)
65. Mooi F., Van Der Maas N., De Melker H.: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.* **142**, 685–694 (2014)
66. Mooi F., Mertsola J. i wsp.: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1206–1213 (2009)
67. Mooi F., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H., Gaastra W., Willems R.: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect. Immun.* **66**, 670–675 (1998)
68. Mortimer E., Jones P.: An evaluation of pertussis vaccine. *Rev. Infect. Dis.* **1**, 927–934 (1979)
69. Mosiej E., Augustynowicz E., Zawadka M., Dąbrowski W., Lutyńska A.: Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1452e7 (2011)
70. Mosiej E., Zawadka M., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Augustynowicz E., Piekarska K., Lutyńska A.: Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959–2013. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 147e52 (2015)
71. Nteyayabo B., De Serres G., Duval B.: Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 22–27 (2003)
72. Olin P., Gustafsson L., Barreto L., Hessel L., Mast T., Rie A., Bogaerts H., Storsaeter J.: Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, **21**, 2015–2021 (2003)
73. Onorato I., Wassilak S., Meade B.: Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA*, **267**, 2745–2749 (1992)
74. Packard E., Parton R., Coote J., Fry N.: Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J. Med. Microbiol.* **53**, 355–365 (2004)
75. Plotkin S., Orenstein W., Offit P., Edwards K.: Plotkin's Vaccines 7th Edition. Elsevier, 2017
76. Polak M., Zasada A., Mosiej E., Krysztopa-Grzybowska K., Witkowski L., Rzczkowska M., Piekarska K., Lutyńska A.: Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland – a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect.* **21**, 170–175 (2018)
77. Polewicz M., Gracia A., Buchanan R., Strom S., Halperin S., Potter A., Babiuk L., Gerds V.: Influence of maternal antibodies on active pertussis toxoid immunization of neonatal mice and piglets. *Vaccine*, **29**, 7718–7726 (2011)
78. Ramsay M., Farrington C., Miller E.: Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods. *Epidemiol. Infect.* **111**, 41–48 (1993)
79. Roberts R., Moreno G., Bottero D., Gaillard M., Fingerhann M., Graieb A., Rumbo M., Hozbor D.: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, **26**, 4639–4646 (2008)

80. Romanus V., Jonsell R., Bergquist S.: Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **6**, 364–371 (1987)
81. Rumbo M., Hozbor D.: Development of improved pertussis vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2450–2453 (2014)
82. Sato Y., Kimura M., Fukumi H.: Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*, **1**, 122–126 (1984)
83. Sato Y., Sato H.: Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*, **27**, 61–69 (1999)
84. Seubert A., D'Oro U., Scarselli M., Pizza M.: Genetically detoxified pertussis toxin (PT-9K/129G): implications for immunization and vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, **13**, 1191–1204 (2014)
85. Shapiro-Shapin C.: Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1273–1278 (2010)
86. Sharma S., Benson H., Mukkur T., Rigby P., Chen Y.: Preliminary studies on the development of IgA-loaded chitosan-dextran sulphate nanoparticles as a potential nasal delivery system for protein antigens. *J. Microencapsul.* **30**, 283–294 (2013)
87. Shuel M., Jamieson F., Tang P., Brown S., Farrell D., Martin I., Stoltz J., Tsang R.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e413–417 (2013)
88. Skerry C., Mahon B.: A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 187–193 (2011)
89. National Library of Medicine: First adult safety trial on nasal live attenuated *B. pertussis* vaccine 31.01.2012 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01188512?cond=pertussis&draw=2&rank=7> (29.11.2019)
90. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny: Szczepienia-info, <https://szczepienia.pzh.gov.pl/> (29.11.2019)
91. Thorstensson R., Loch C. i wsp.: A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine – BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One*, **9**, e83449 (2014)
92. Trollfors B. i Rabo E.: Whooping cough in adults. *Brit. Med. J.* **283**, 696–697 (1981)
93. van Gent M., Pierard D., Lauwers S., van der Heide H.G., King A.J., Mooi F.R.: Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 149–154 (2007)
94. Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G., Caro V., Guiso N.: Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4396–4403 (2001)
95. White J., Fairley C., Owen D., Matthews R., Miller E.: The effect of an accelerated immunisation schedule on pertussis in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **6**, 86–91 (1996)
96. Williams M., Sen K., Weigand M., Skoff T., Cunningham V., Halse T., Tondella M.: CDC Pertussis Working Group. *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 319–322 (2016)
97. Winter K., Zipprich J., Harriman K., Murray E., Gornbein J., Hammer S., Yeganeh N., Adachi K., Cherry J.: Risk factors associated with infant deaths from pertussis: a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 1099–1106 (2015)
98. World Health Organization: Report of the meeting on case definition of pertussis, 10–11.01.1991, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66921/MIM_EPI PERT_91.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y (29.11.2019)
99. World Health Organization: Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record, 09.2015, <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1> (29.11.2019)
100. Zackrisson G., Taranger J., Trollfors B.: History of whooping cough in nonvaccinated Swedish children, related to serum antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. *J. Pediatr.* **116**, 190–194 (1990)

ROLA I ZNACZENIE WYBRANYCH CZYNNIKÓW WIRULENCJI DETERMINUJĄCYCH CHOROBTWÓRCZOŚĆ UROPATHOGENNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI*

Sylwia Joanna Chmielewska*, Katarzyna Leszczyńska

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w lipcu 2019 r.

Streszczenie: Najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego (ZUM) są szczepy UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*), będące przyczyną 75–95% przypadków ZUM. W patomechanizmie ZUM ogromną rolę odgrywają czynniki wirulencji bakterii UPEC, jak również zdolność do tworzenia biofilmu. Główną przeszkodą do wzrostu mikroorganizmów jest niedobór żelaza, dlatego też szczepy UPEC wytwarzają siderofory jak również receptory sideroforów, które umożliwiają skuteczny wychwyt i transport żelaza do komórki bakteryjnej. Ponadto, w celu modulacji odpowiedzi immunologicznej i szlaków metabolicznych gospodarza szczepy UPEC produkują następujące toksyny, tj. α -hemolizynę (HlyA), cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący (CNF-1) i toksynę autotransportującą (VAT, Vat-like/Vat-ExEc). Kolejnym nowo poznany czynnikiem wirulencji jest genotoksyna, tj. białko Usp wywołujące fragmentację DNA i apoptozę komórek. Z kolei, białko Ag43 umożliwia bakteriom UPEC adhezję do komórek układu moczowego czy agregację i formowanie biofilmu. Należy podkreślić, że wszystkie wymienione wyżej czynniki wirulencji jak również zdolność do tworzenia biofilmu, ułatwiają szczepom UPEC kolonizację i rozprzestrzenianie w układzie moczowym. Podsumowując, bakterie UPEC posiadają cały arsenał czynników wirulencji, które umożliwiają przetrwanie nawet w tak niesprzyjającym środowisku, jakim jest układ moczowy, co ostatecznie prowadzi do rozwoju ZUM.

1. Wstęp. 2. System wychwytu żelaza – siderofory, receptory sideroforów. 3. Toksyny. 3.1. α -hemolizyna HlyA. 3.2. Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1. 3.3. Toksyna VAT. 4. Białko Usp. 5. Białko Ag43. 6. Biofilm bakteryjny. 7. Podsumowanie

THE ROLE AND IMPORTANCE OF SELECTED VIRULENCE FACTORS DETERMINING THE PATHOGENICITY OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Abstract: The most frequent etiologic agents of the urinary tract infections (UTIs) are UPEC strains (Uropathogenic *Escherichia coli*), which are responsible for 75–95% of UTIs. The virulence factors of UPEC bacteria, as well as their ability to form biofilm, play a significant role in the pathogenicity of UTIs. Limiting iron availability is a major host defense against the growth of microorganisms within hosts. That is why UPEC strains produce various types of siderophores as well as siderophore receptors, which facilitate the uptake and transport of iron to the bacterial cell. Moreover, in order to modulate an inflammatory response and host signaling pathways, UPEC strains produce the following toxins: α -hemolysin (HlyA), cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF-1) and vacuolating autotransporter toxin (VAT, Vat-like/Vat-ExEc). Moreover, Usp is a novel genotoxin of UPEC strains which provokes DNA fragmentation and cell apoptosis. Furthermore, the presence of protein Ag43 enhances adhesion of UPEC within the urinary tract, aggregation and biofilm formation. It is important to underline that all of the virulence factors mentioned above and the ability to form biofilm facilitate and enable UPEC colonization and dissemination in the urinary tract. In conclusion, UPEC harbors an arsenal of virulence factors which promote persistence within the adverse settings of the host urinary tract and finally lead to the development of UTI.

1. Introduction. 2. Iron acquisition system – siderophores, siderophore receptors. 3. Toxins. 3.1. α -hemolysin HlyA. 3.2. Cytotoxic necrotizing factor 1. 3.3. Toxin Vat. 4. Protein Usp. 5. Protein Ag43. 6. Bacterial biofilm. 7. Summary

Słowa kluczowe: Ag43, biofilm, system pobierania żelaza, toksyny, Usp

Key words: Ag43, biofilm, iron acquisition system, toxins, Usp

1. Wstęp

Pozajelitowe patogenne szczepy *Escherichia coli* ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) charakteryzują się różnorodnymi genotypami, jak i fenotypami, a w ich obrębie wyróżnia się, m.in. grupę uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (uropathogenic *E. coli*, UPEC) odpowiedzialnych za 75–95% przypadków zakażeń układu moczowego (ZUM), zarówno u dzieci,

jak i osób dorosłych [4, 6, 10, 33, 34]. UPEC mogą kolonizować nabłonek układu moczowego człowieka, lecz o ich chorobotwórczości i zdolności do przeżycia w określonym środowisku decydują posiadane czynniki wirulencji i/lub nabyte przez bakterie cechy oporności na antybiotyki [4, 10, 60].

UPEC są niezwykle zróżnicowane pod względem prezentowanych czynników wirulencji. Potencjał inwazyjny tego patotypu związany jest z wytwarzaniem

* Autor korespondencyjny: dr n. med. Sylwia Joanna Chmielewska, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok; tel. 695 348 868; e-mail: sylwia.chmielewska@umb.edu.pl

różnych typów adhezyn i inwazyj umożliwiających bakteriom przyleganie do komórek gospodarza, toksyn modulujących odpowiedź immunologiczną i szlaki metaboliczne oraz sideroforów niezbędnych do asymilacji żelaza [4, 38]. Ponadto ogromną rolę w patomechanizmie ZUM odgrywa zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy UPEC. Biofilm stanowi bowiem skuteczną barierę dla stosowanych antybiotyków, co niejednokrotnie prowadzi do niepowodzeń terapeutycznych oraz przyczynia się do przewlekłych i nawracających stanów zapalnych układu moczowego [41].

Geny kodujące czynniki wirulencji szczepów UPEC umiejscowione są na ruchomych elementach genetycznych przenoszonych drogą horyzontalnego transferu genów (horizontal gene transfer, HGT). Zmieniające się środowisko stymuluje powstawanie nowych kombinacji genów czynników wirulencji powodując rozprzestrzenianie się nieobserwowanych dotąd patogennych klonów *E. coli*, wyróżniających się większą zjadliwością i ekspansywnością [4]. Dlatego też kompleksowa wiedza na temat determinant wirulencji szczepów UPEC, tj. sideroforów, receptorów sideroforów, toksyn, genotoksyn, białek Usp i Ag43, czy też zdolności do tworzenia biofilmu umożliwi lepsze poznanie patomechanizmu ZUM, co w przyszłości może posłużyć do opracowania nowych strategii zapobiegania i leczenia zakażeń wywołanych przez UPEC [55].

2. System wychwytu żelaza – siderofory, receptory sideroforów

Żelazo to niezbędny element wielu procesów komórkowych, m.in. zasadniczy kofaktor enzymów zaangażowanych w pierwotny i wtórny metabolizm komórkowy zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych [7, 63].

Pomimo, że w organizmie występuje znaczna ilość żelaza, to przeważająca część jest związana z białkami, takimi jak: hemoglobina, transferyna, laktoferyna lub ferrytyna, co znacznie ogranicza dostępność tego pierwiastka dla drobnoustrojów chorobotwórczych. Skutkuje to zahamowaniem wzrostu bakterii i uniemożliwia dalszy rozwój zakażenia [7, 15, 51, 63]. Szacuje się, iż stężenie wolnego żelaza we krwi wynosi zaledwie 10^{-24} – 10^{-25} M, podczas gdy w tkankach wartość ta waha się od 10^{-7} do 10^{-8} . Należy zaznaczyć, iż przytoczone wartości są zdecydowanie niższe od poziomu żelaza wymaganego do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych i podziałów komórkowych bakterii tj. 10^5 – 10^6 M [51, 63]. Niedobór żelaza to główna przeszkoda do wzrostu drobnoustrojów, dlatego też bakterie wykształciły różnorodne mechanizmy umożliwiające pozyskanie tego pierwiastka z organizmu gospodarza. Jednym z nich jest tzw. system wychwytu żelaza wyko-

rzystujący siderofory, takie jak: enterobaktyna (*ent*), salmochelina (*iro*), jersiniabaktyna (*irp*, *ybt*) i aerobaktyna (*iuc*), mające zdolność do chelatowania żelaza organicznego ze środowiska [2, 7, 56, 63]. Siderofory można podzielić na pięć głównych klas, tj. katecholan, fenolany, siderofory typu kwasu hydroksamowego, α -hydroksykarboksylany oraz siderofory typu mieszanego. Zgodnie z tą klasyfikacją enterobaktyna i salmochelina zaliczane są do katecholanów, z kolei jersiniabaktyna do fenolanów, a aerobaktyna do sideroforów typu mieszanego [51].

Wśród szczepów UPEC mogą występować różne kombinacje wspomnianych sideroforów, z czego niektóre szczepy wytwarzają wszystkie cztery [57]. Komórka bakteryjna za pośrednictwem sideroforów jest w stanie wiązać żelazo i z powodzeniem konkurować z białkami gospodarza o dostęp do tego pierwiastka [7, 63]. Z kolei receptory błony zewnętrznej dla sideroforów ułatwiają transport kompleksu żelazo-siderofor przez błonę zewnętrzną bakterii do cytozolu, w którym to żelazo jest uwalniane. Wśród szczepów UPEC znanych jest wiele receptorów dla sideroforów, m.in. IroN (receptor dla salmocheliny), IutA (receptor dla aerobaktyny), FyuA (receptor dla jersiniabaktyny), Iha (receptor dla enterobaktyny) [3]. Dla przykładu szczep *E. coli* CFT073 koduje aż 14 receptorów błony zewnętrznej dla sideroforów oraz 4 systemy biosyntezy i transportu sideroforów, jak również szereg przepuszczalnych TonB zależnych receptorów zaangażowanych w wychwyty żelaza [20]. Co interesujące, badania doświadczalne wykazały, iż w mysim modelu zakażeń górnych dróg moczowych, delecja genów dla TonB receptorów w szczepach UPEC skutkowałą osłabieniem kolonizacji przez drobnoustroje w okresie 48 godzin od zakażenia [36].

Powszechnym sideroforem występującym w szczepach UPEC jest enterobaktyna [48, 63]. Niemniej jednak, produkcja enterobaktyny nie jest unikalna dla *E. coli* i została opisana również wśród innych izolatów ZUM, tj. *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. i *Citrobacter* spp. [48]. Enterobaktyna charakteryzuje się powinowactwem do jonów żelaza rzędu $K_d \sim 10^{-49}$ i konkuruje z transferyną o wiązanie tego pierwiastka w organizmie gospodarza, dlatego też szczepy UPEC syntetyzujące enterobaktynę wykazują zdolność do kolonizacji miejsc ubogich w żelazo, takich jak drogi moczowe [48, 63]. Z kolei w organizmie gospodarza aktywowane neutrofile uwalniają białko lipokalina 2, zwaną również lipokalina neutrofilową, związaną z żelatynazą wykazującą zdolność do wiązania się z enterobaktyną i uniemożliwiającą tym samym jej połączenie z żelazem. Lipokalina 2 wykazuje, więc właściwości bakteriostatyczne, zmniejszając konkurencyjny wychwyty Fe^{3+} przez szczepy UPEC, co hamuje ich namnażanie [63].

Kolejnym sideroforem jest salmochelina, po raz pierwszy wykryta u szczepu *Salmonella* spp., skąd też

wywodzi się jej nazwa [51]. Salmochelina powstaje w wyniku glikozylacji enterobaktyny przez glikozylotransferazę [48, 63]. Tego typu modyfikacja enterobaktyny zakodowana w klastrze genów *iroBCDEN* zlokalizowanym na plazmidzie ColV1, ColBM lub wyspie patogenności (PAI, pathogenicity island), zapobiega jej rozpoznaniu przez lipokalinę 2 [4, 51, 63]. Ze względu na fakt, iż kompleks żelazo-salmochelina nie jest rozpoznawany przez receptor dla enterobaktyny bakterie wykształciły kolejny receptor, tj. IroN, którego główną rolą jest wiązanie i transport do cytoplazmy ww. kompleksów, co umożliwia efektywne wykorzystywanie żelaza przez szczepy UPEC [4, 63]. Co więcej, białko IroN przypisuje się zasadniczą rolę w inwazji *in vitro* komórek nabłonka dróg moczowych przez szczepy ExPEC [18].

Jersiniabaktyna to kolejny siderofor umożliwiający pozyskiwanie Fe^{3+} z ustroju gospodarza, kodowany na PAI. Jersiniabaktyna po raz pierwszy została wykryta u bakterii *Yersinia pestis*, zaś w chwili obecnej opisana została jako istotna determinanta wirulencji takich drobnoustrojów jak: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i kilka patotypów *E. coli* [48, 51, 62]. Jednym z ważniejszych genów obecnych na PAI jest gen *fyuA* kodujący 71 kDa białko błony zewnętrznej pełniące rolę receptora dla kompleksu Fe^{3+} -jersiniabaktyna. Ponadto wyniki badań przeprowadzonych przez Hancock i wsp. [24] wskazują, że *FyuA* odgrywa istotną rolę w tworzeniu biofilmu przez patogenne szczepy w środowisku ubogim w żelazo, takim jak ludzki mocz. Badania szczepu *E. coli* VR50, mutantu *fyuA*, wykazały bowiem aż 92% redukcję zdolności tworzenia biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego.

Podczas gdy enterobaktyna jest wytwarzana i wykorzystywana niemal przez wszystkie szczepy *E. coli*, to aerobaktyna, salmochelina i jersiniabaktyna oraz receptory dla tych sideroforów występują głównie u szczepów patogennych. Istnieje wiele dowodów potwierdzających istotną rolę systemu wychwytu żelaza u bakterii odpowiedzialnych za zakażenia dróg moczowych. U pacjentów z nawracającym ZUM wśród wyizolowanych szczepów *E. coli* zaobserwowano zwiększoną syntezę salmocheliny i jersiniabaktyny. Podobnie UPEC odpowiedzialne za zapalenie pęcherza moczowego u kobiet kodowały większość z opisanych elementów systemu wychwytu żelaza łącznie z lokus dla biosyntezy i transportu jersiniabaktyny [20, 63].

W badaniach nad szczepionkami zapobiegającymi niepowikłanym ZUM przez szczepy UPEC to właśnie receptory dla sideroforów zlokalizowane na błonie zewnętrznej bakterii są głównym przedmiotem zainteresowań wakcynologów. Okazało się bowiem, że szczepionki zawierające białka będące elementem systemu wychwytu żelaza stanowią skuteczną ochronę

przez zakażeniem szczepami UPEC w modelu eksperymentalnym [3, 7].

Alteri i wsp. [1] przeprowadzili badania z wykorzystaniem bioinformatyki, genomiki, transkryptomiki i proteomiki oceniające przydatność, m.in. Iha, IreA, IutA IroN w szczepionkach. Podczas donosowej immunizacji myszy dwa, z czterech badanych receptorów dla sideroforów, tj. IreA, IutA, indukowały odpowiedź immunologiczną, zarówno układową, jak i miejscową, tj. błony śluzowej obejmującą wytwarzanie przeciwciał klasy IgM, IgG i IgA, co zapobiegało kolonizacji pęcherza moczowego przez szczepy *E. coli*. Spośród 5 379 białek pochodzących ze szczepu *E. coli* CFT073 odpowiedzialnego za odmiedniczkowe zapalenie nerek (OZN), tylko sześć spełniało wszystkie kryteria określono jako PASivE (pathogen-specific, antigenic, surface-exposed, and *in vivo* expressed). Obejmowały one: wysoką specyficzność mającą na celu uniknięcie kierowania odpowiedzi immunologicznej na komensalne szczepy *E. coli*, antygenowość, ekspozycję powierzchniową w celu łatwego rozpoznania przez układ odpornościowy gospodarza oraz ekspresję *in vivo* [3, 7, 8].

Brumbaugh i wsp. [7] zidentyfikowali czwarty antygen możliwy do zastosowania w szczepionkach, m.in. *fyuA*, zapewniający skuteczną i długotrwałą odpowiedź humoralną chroniącą przed zakażeniami UPEC.

Należy również podkreślić ważną rolę receptora błony zewnętrznej dla salmocheliny, tj. IroN w zapobieganiu ZUM. Podskórna immunizacja myszy zdenaturowaną formą IroN skutkowałą znaczącym wzrostem wytwarzania specyficznych przeciwciał w klasie IgG, jednakże nie wywoływała istotnej układowej, jak i śluzówkowej odpowiedzi przeciwciał w klasie IgA. W modelu doświadczalnym immunizacja z wykorzystaniem receptora IroN zapewniała ochronę przed zakażeniem UPEC w nerkach myszy, jakkolwiek nie zaobserwowano skutecznej ochrony przed zakażeniem w pęcherzu moczowym. Nie jest jednak wykluczone, że dalsze badania skupiające się na zastosowaniu, m.in. adjuwantów lub innej alternatywnej drogi podania szczepionki, umożliwią w przyszłości w pełni skuteczne wykorzystanie IroN w zapobieganiu zakażeniom szczepami UPEC [8].

Podsumowując systemy biosyntezy i transportu sideroforów oraz receptory OM dla sideroforów umożliwiają UPEC wychwyty żelaza, co ułatwia kolonizację i utrzymywanie się w drogach moczowych [57].

3. Toksyny

3.1. α -hemolizyna HlyA

Okolo 15% komensalnych szczepów *E. coli* koduje α -hemolizynę HlyA. W przypadku UPEC obecność tej toksyny stwierdza się u 31–48% szczepów

odpowiedzialnych za zapalenie pęcherza moczowego oraz u 78% szczepów związanych z OZN [13]. Należy również podkreślić, że w przypadku produkcji tej toksyny przez UPEC obserwuje się pogorszenie stanu klinicznego pacjentów z ZUM [29, 47, 54, 56].

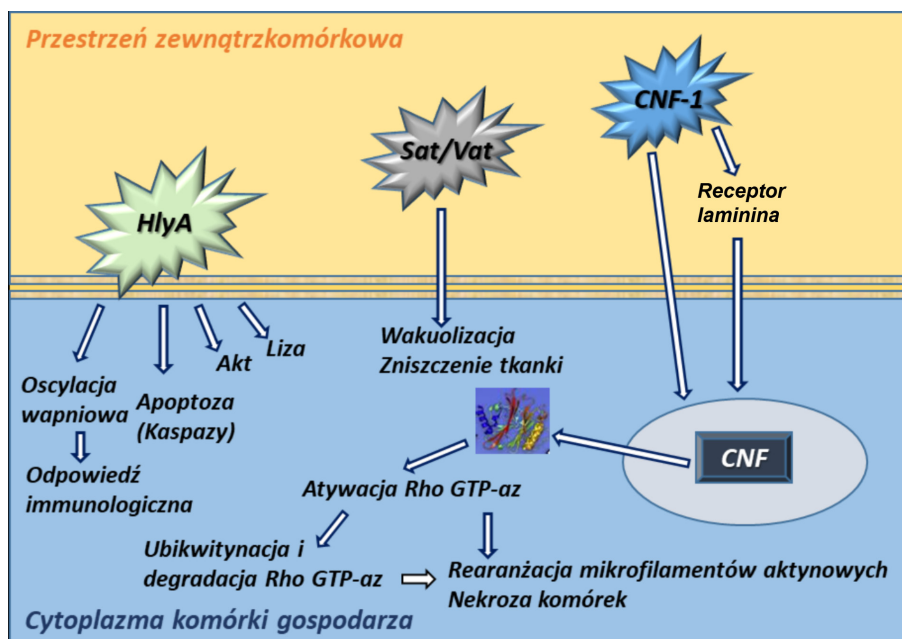
Nazwa tej toksyny wywodzi się od zdolności do przeprowadzania lizy erytrocytów. Należy jednak zaznaczyć, że HlyA wykazuje aktywność cytotoksyczną względem innych komórek, np.: monocytów, granulocytów, komórek śródbłonka oraz komórek nabłonka kanalików nerkowych myszy i naczelników [47, 54]. W temperaturze 37°C, w ciągu zaledwie 12 sekund, toksyna HlyA wiąże się z błoną krwinek czerwonych, co jest procesem nieodwracalnym i nieograniczonym [54]. Przypuszcza się, że wiązanie HlyA do komórek docelowych może być niezależne od receptora, ze względu na zdolność łączenia się tej toksyny ze sztucznymi błonami. Jednak kwestia obecności, czy też braku swoistych receptorów HlyA na powierzchni różnorodnych komórek wciąż pozostaje nierozstrzygnięta [5, 54].

HlyA to zależna od wapnia toksyna (calcium-dependent toxin) o wielkości 110-kDa, należy do tzw. rodziny RTX (repeats-in-toxin family) wykazujących zdolność do tworzenia porów o szerokości 1–3 nm w komórkach gospodarza, co może prowadzić do lizy komórek i ostatecznie niszczenia komórek nabłonkowych dróg moczowych [6, 47]. Główną funkcją tej toksyny jest niszczenie komórek gospodarza, co ułatwia pozyskiwanie składników odżywczych i innych związków, np. żelaza niezbędnego do wzrostu bakterii [63]. Wyniki licznych badań wskazują na swoistą interakcję między hemolizyną, a endotoksyną LPS (lipopolysaccharide). Sugeruje się, że LPS uczestniczy w formowaniu oraz utrzymaniu aktywnej konformacyjnie HlyA, a ponadto chroni ją przed deformacją i/lub agregacją [54]. Z przeprowadzonych badań [47] wynika, że cytotoksyczne właściwości HlyA wobec komórek ludzkich nabłonka pęcherza moczowego zmniejszyły się, gdy białko to zostało oczyszczone i oddzielone od LPS. W przyszłości poznanie dokładnego znaczenia LPS w cytotoksyczności HlyA oraz wyjaśnienie charakterystycznych różnic między oddziaływaniem na komórki oczyszczonej HlyA oraz HlyA-LPS, może zdefiniować nową rolę endotoksyny LPS bakterii Gram-ujemnych.

Gen *hlyA* koduje białko HlyA, będące początkowo nieaktywnym prekursorem tzw. pro-HlyA. Potranslacyjna aktywacja pro-HlyA obejmuje acylację obu reszt lizynowych w pozycji 564 i 690 przez cytoplazmatyczną acylotransferazę HlyC. Białko HlyA składa się z kilku domen. C-końcowy peptyd HlyA rozpoznaje tzw. translokator składający się z HlyB (wiązanie ATP) i HlyD (białko pomocnicze). Translokator wraz z białkiem błony zewnętrznej TolC umożliwia sekrecję HlyA na zewnątrz komórki bakteryjnej. Ponadto u toksyn należących do rodziny RTX tzw. obszar centralny C-ter-

minalnego regionu łańcucha jest szczególnie bogaty w glicynę i składa się z powtarzającej sekwencji dziewięciopeptydowej G-G-X-G-(N/D)-D-X-(L/I/F)-X (X – aminokwas charakterystyczny dla danej toksyny). Powtarzające się domeny wiążą jony Ca^{2+} , co jest niezbędne do rozpoznania komórek docelowych ssaków oraz przyłączenia HlyA do błony komórek gospodarza, jednakże nie jest konieczne do utworzenia kanałów w dwuwarstwie lipidowej [5, 54]. Związanie jonów Ca^{2+} (jeden jon wapnia na jedno powtórzenie) skutkuje strukturalnymi, jak i konformacyjnymi zmianami HlyA, tj. utworzeniem przez sekwencje nanopeptydowe β -łańcuchów, które następnie organizują się w tzw. β -helisy. W warunkach *in vitro* toksyna wykazuje maksymalną aktywność cytolityczną w momencie, gdy wszystkie jej miejsca wiążące wapń są wypełnione [47, 54]. Z kolei N-terminalny region białka HlyA odgrywa istotną rolę w procesie lizy komórek eukariotycznych. Reszty aminokwasowe (238–410) w tym fragmencie białka odpowiadają za aktywność hemolityczną HlyA tworząc hydrofobowe i/lub amfipatyczne α -helisy niezbędne do formowania porów, zarówno w błonach biologicznych, jak i sztucznych [5, 47]. Co więcej, N-terminalny region toksyny wbudowuje się w błonę komórek eukariotycznych i przyjmuje rolę integralnego białka błony biologicznej [54]. Sánchez-Magraner i wsp. [50] badając domeny odpowiedzialne za wbudowywanie się w błonę komórek gospodarza wykazali, że brak aminokwasu w pozycji 601 w N-terminalnej części HlyA prowadzi do zaniku tej cechy. Naukowcom jednoznacznie nie udało się wyjaśnić jak duże stężenie α -hemolizyny konieczne jest do wywołania hemolizy komórek, dlatego też większą wagę przywiązuje się do tzw. sublitycznych stężeń HlyA i ich wpływu na fizjologię komórek. Wg Wiles i wsp. [63] sublityczne stężenia toksyn tworzących pory w błonie komórek eukariotycznych mogą modulować różnorodne ścieżki sygnalizacyjne, wliczając w to oscylację wapniową, aktywację kinazy MAP (microtubule associated protein), czy inaktywację kinazy serynowo-treoninowej Akt (serine/threonine protein kinase), odgrywającej kluczową rolę w regulacji procesów komórkowych, m.in. związanych z metabolizmem, wzrostem, apoptozą, cyklem komórkowym oraz proliferacją komórek. Ponadto HlyA pośredniczy w hamowaniu chemotaksji i niszczeniu bakterii w procesie fagocytozy oraz stymulacji apoptozy i procesu zapalnego (Ryc. 1).

Wewnątrzkomórkowe wahania jonów wapnia wywołane przez α -hemolizynę stanowią sygnał do syntezy cytokin prozapalnych, tj. IL-8 i IL-6 [54]. Zdolność HlyA do wywoływania oscylacji wapniowej zależy od kilku czynników, w tym, m.in. od aktywacji GTP-azy RhoA (ras homolog gene family). Ponadto, pro-HlyA może wiązać się z błoną komórek eukariotycznych, lecz nie indukuje oscylacji wapniowej, co wskazuje, że



Ryc. 1. Mechanizm działania i rola w patogenezie ZUM toksyn, tj. HlyA, Vat i CNF-1 wytwarzanych przez szczepy UPEC
 Objasnienia skrótów: HlyA – α -Hemolysin, hemolizyna α , Akt – Serine/Threonine Protein Kinase, kinaza serynowo-treoninowa, Sat – Secreted Autotransporter Toxin, autotransportująca toksyna, VAT – Vacuolating Autotransporter Toxin, autotransportująca wakuolizująca toksyna, CNF-1 – Cytotoxic Necrotizing Factor, cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący, Rho – Ras Homologues, białko należące do rodziny małych białek G, GTP-aza – guanosine-5'triphosphatase, guanozyno-5'trifosfataza. Na podstawie [63].

proces acylowania jest wymagany do nabycia tej zdolności. Co więcej, oczyszczone HlyA, które jest wolne od endotoksyny LPS, nie może indukować wewnątrzkomórkowych wahań wapnia, lecz nadal wykazuje zdolność do lizy komórek, co podkreśla, że właściwości cytotoksyczne tej toksyny, jak i możliwość wywoływania oscylacji wapniowej są niezależne [47].

Tworzenie porów w błonie komórek eukariotycznych może wywołać chwilową utratę jonów potasowych. Co więcej, napływ jonów Ca^{2+} aktywuje kanały potasowe $\text{K}(\text{Ca})3.1$ i TMEM16A . Oba te procesy prowadzą do aktywacji drogi p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases), co może skutkować uruchomieniem różnorodnych procesów, wliczając w to apoptozę komórek oraz aktywację pro-zapalnej produkcji cytokin. Wyniki licznych badań wskazują także, że subletyczne stężenia HlyA stymulują inaktywację Akt pośrednicząc w jej defosforylacji, poprzez aktywację fosfataz PP1 i PP2A . Skutkuje to zmniejszeniem odpowiedzi zapalnej, co umożliwia bakteriom rozwój zakażenia. Ponadto, zwiększeniu ulega ilość proapoptotycznych czynników, co z kolei przyczynia się do eksfoliacji komórek. Procesy te mogą więc wyjaśnić wpływ ekspresji HlyA u szczepów UPEC na nasilenie objawów zakażenia u pacjentów z ZUM [47].

Należy dodać, iż w ciągu ostatnich lat toksyna HlyA stała się celem badań wakcynologów. Analiza wykonanych badań [66] wykazała, iż immunizacja myszy HlyA przyczyniła się do zmniejszenia bliznowacenia nerek,

lecz nie chroniła przed kolonizacją szczepami UPEC, dlatego też w celu opracowania skutecznych strategii terapeutycznych wymagana jest dalsza kontynuacja badań.

3.2. Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1

Szacuje się, że około 40% szczepów UPEC, jak również do 30% szczepów *E. coli* wywołujących biegunkę, koduje cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący (cytotoxic necrotizing factor, CNF-1) [21]. Rola tego czynnika wirulencji polega głównie na aktywacji białek z rodziny Rho (ras homologues) GTP-azy RhoA, Rac (małe białko G z rodziny Rho) i/lub Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) (Ryc. 1) [2, 63]. Toksyna CNF-1 jest białkiem należącym do tzw. dermonekrotycznej rodziny toksyn (dermonecrotic toxin family), w skład której wchodzi: CNF-1 i CNF-2 pochodzące od szczepu *E. coli*, CNFY występująca u *Y. pseudotuberculosis* i DNT u *Bordetella* spp. Toksyna CNF-1 zbudowana jest z domeny N-końcowej zawierającej miejsca wiążące receptor oraz domeny C-końcowej odpowiedzialnej za aktywność katalityczną [17].

Toksyna CNF-1 to 113-kDa białko odgrywające ważną rolę w patomechanizmie ZUM. Podczas zakażenia CNF-1 wytwarzany przez bakterie wiąże się z powierzchnią komórek nabłonkowych poprzez receptor lamininę. Następnie przy udziale receptorów następuje endocytoza toksyny do wnętrza komórek

eukariotycznych. Kwaśne warunki panujące w pęcherzyku endocytarnym stymulują translokację domeny katalitycznej CNF do cytozolu komórek gospodarza, gdzie następuje aktywacja Rho GTP-az (RhoA, Rac i/lub Cdc42). Przedłużająca się aktywacja oraz wysoki poziom Rho GTP-az prowadzi do ich ubikwitynacji, a następnie degradacji w proteasomach, co umożliwia osiągnięcie stężeń bliższych fizjologicznym [63].

Białka Rho są molekularnymi przełącznikami, oscylującymi między postacią nieaktywną – związaną z GDP (guanosine-5'diphosphate), a formą aktywną – związaną z GTP (guanosine-5'triphosphate). Cykl Rho GTP-az przebiega pod ścisłą kontrolą białek regulacyjnych, takich jak: GAP (GTPase-activating protein), GEF (guanine nucleotide exchange factor) i GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). W cytoplazmie Rho GTP-azy występują w postaci nieaktywnej, tworząc kompleks z białkiem GDI, które hamuje wymianę GDP na GTP. Aktywacja Rho GTP-az następuje z udziałem białka GEF, które umożliwia zarówno przyłączenie GTP, jak również dysocjację GDI. W formie związanej z GTP, białko Rho oddziałuje z różnymi cząstkami efektorowymi zapoczątkowując łańcuch kolejnych reakcji. W tym samym czasie białko GAP, czyli białko stymulujące aktywność GTP-azową małych białek G, inicjuje hydrolizę GTP do GDP, wywołując przejście z postaci aktywnej w nieaktywną. Należy podkreślić, że Rho GTP-azy są ważnym ogniwem rozmaitych szlaków sygnalizacyjnych, dzięki czemu regulują wiele istotnych procesów komórkowych [17, 21, 44]. Aktywność enzymatyczna CNF-1 polega na deamidacji określonej glutaminy białek Rho, tj. glutaminy 63 w białku RhoA i glutaminy 61 w Rac1 i Cdc42. Skutkuje to zablokowaniem hydrolizy GTP, co w konsekwencji wywołuje stale utrzymującą się aktywację białek Rho. Białka Rho kontrolują wiele procesów komórkowych, a ich aktywacja prowadzi w szczególności do rearanżacji mikrofilamentów aktynowych, zaburzeń cyklu komórkowego, modyfikacji kluczowych ścieżek sygnałowych i aktywności czynników transkrypcyjnych [17, 21, 44].

Ekspresja CNF-1 przez szczepy UPEC może w istotny sposób wpływać na przebieg ZUM. Należy zaznaczyć, iż CNF-1 przypisuje się zasadniczą rolę w wywoływaniu zmian w cytoszkieletu komórek eukariotycznych, a w szczególności w organizacji cytoszkieletu, tj. mikrofilamentów aktynowych czy mikrotubul. Aktywowane białka – RhoA, Rac, i/lub Cdc42 wpływają, m.in. na wydłużanie lamellipodiów i filopodiów oraz tworzenie włókien naprężeniowych w komórkach eukariotycznych [63]. Zmiany w cytoszkieletu komórek wywołane przez toksynę CNF-1 indukują zdolność do przechwytywania i internalizacji, np. komórek apoptotycznych, czy bakterii przez komórki nabłonkowe. W związku z powyższym, należy podkreślić istotną rolę tej toksyny w indukowaniu inwazji komórek gospodarza

przez szczepy UPEC. Ponadto CNF-1 zmniejsza zdolności fagocytarne leukocytów wielojądrowych (polymorphonuclear leukocytes, PMN) oraz aktywuje NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) w komórkach nabłonkowych, co prowadzi do ekspresji czynników prozapalnych. Znaczący jest również udział toksyny CNF-1 w ochronie komórek nabłonka pęcherza moczowego przed apoptozą [7]. Miraglia i wsp. [39] wykazali, że CNF-1 chroni komórki HEp-2 przed śmiercią na drodze apoptozy. Ponadto CNF-1 aktywuje białka Rac i Rho. Inaktywacja Rho, z udziałem systemu ubikwityna-proteasom, umożliwia dominującemu białku Rac aktywację anty-apoptotycznego szlaku, tj. PI3K/Akt/IKK prowadzącego do uwolnienia czynnika NF- κ B. Uwolniony NF- κ B ulega następnie translokacji do jądra, gdzie dochodzi do aktywacji transkrypcji genu *bcl-2*. Z kolei nadekspresja *bcl-2* wywołuje zmiany w morfologii mitochondrium, zapobiegając w ten sposób indukowanej przez UVB śmierci komórkowej.

Interesujące wyniki badań udało się uzyskać Guo i wsp. [23], które wykazały, iż CNF-1 wydzielany przez szczepy UPEC umożliwiał migrację i inwazję komórek nowotworu gruczołu krokowego oraz ostatecznie metastazę. W badaniach *in vitro* stwierdzono aktywację Cdc42-PAK1 (cell division control protein 42 homolog – P21-activated kinases 1), co wywoływało fosforylację PAK1 i zwiększenie ekspresji MMP-9 (matrix metalloproteinase 9). Z kolei, inne badania potwierdziły [64], iż fagocytoza szczepów UPEC przez makrofagi pod wpływem CNF-1, ulegała zmniejszeniu. W modelu doświadczalnym OZN nerek u myszy, zaobserwowano, iż toksyna CNF-1 przyczyniała się do zwiększenia liczby neutrofilów, powodujące ostry proces zapalny i uszkodzenie tkanki. Co więcej, ekspresja CD36 w makrofagach ulegała redukcji pod wpływem działania CNF-1 zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*.

Podsumowując efekty wywołane przez CNF-1 mogą ułatwiać rozprzestrzenianie się szczepów UPEC, jak również uniemożliwiać ich szybkie wyeliminowanie z układu moczowego [63].

3.3. Toksyna Vat

Proteazy serynowe występujące zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych, stanowią obecnie jedną z najbardziej zróżnicowanych grup, zwłaszcza pod względem spełnianej funkcji [49]. W organizmach prokariotycznych zaangażowane są w liczne procesy biologiczne, związane, m.in. z metabolizmem, rozwojem oraz wirulencją [14, 49].

Wśród proteaz serynowych wyróżnia się, m.in. SPATE (serine protease autotransporters of *Enterobacteriales*), czyli rodzinę zewnątrzkomórkowych proteaz produkowanych przez *Enterobacteriales*. SPATE, jak

sama nazwa wskazuje, to autotransporterzy wydzielane przez tzw. system sekrecji typu Va bakterii Gram-ujemnych [14]. Białka SPATE wytwarzane są przez szczepy należące do rzędu *Enterobacterales*, takie jak: *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Edwardsiella* spp. oraz *Citrobacter* spp. [49]. Autotransporterzy (AT) zbudowane są z trzech domen: peptydu sygnałowego (signal peptide), inicjującego transport białka prekursorowego przez błonę wewnętrzną; kolejno domeny N-terminalnej tzw. 'domeny pasażera' (passenger domain), zwanej również α -domeną, kodującej biologiczną funkcję cząstek AT i C-terminalnej porotwórczej domeny tzw. 'domain translocator', znanej także, jako β -domena, niezbędnej do translokacji α -domeny przez błonę zewnętrzną (outer membrane, OM) [14, 42, 49]. Ponadto wspólną cechą zróżnicowanych proteaz serynowych wytwarzanych przez bakterie rzędu *Enterobacterales* jest obecność w α -domenie charakterystycznego motywu GDSGS zawierającego serynę, a także tzw. triady katalitycznej formowanej przez reszty His (histydyna), Asp (kwas asparaginowy) i Ser (seryna). Dodatkowo niezwykle istotna jest obecność dwóch występujących po sobie aminokwasów, asparaginy (N-N), które łączą α -domenę z β -domeną oraz konserwatywne motywy składające się z 5–10 reszt aa obecnych w α - i β -domenach [49]. Z kilkoma wyjątkami, po syntezie białka SPATE zostają przetransportowane za pomocą Sec-zależnej sekrecji, przy czym białko prekursorowe musi posiadać N-terminalną sekwencję sygnałową. Następnie β -domena jest umieszczana w błonie zewnętrznej, gdzie formułuje tzw. β -beczułkę. W kolejnym etapie α -domena uwalniana jest do środowiska zewnętrznego przez błonę zewnętrzną lub pozostaje związana z powierzchnią komórki bakteryjnej. Brak β -domeny AT uniemożliwia translokację α -domeny przez OM [14, 49].

Rodzina SPATE obejmująca ponad 25 proteaz serynowych została filogenetycznie podzielona na dwie klasy, tj. klasę-1 i klasę-2, na podstawie sekwencji aminokwasowej α -domeny. Ponadto proteazy serynowe należące do klasy-1 SPATE zostały ogólnie określone jako tzw. cytotoksyczne, zaś przynależne do klasy-2 jako lektynopodobne immunomodulatory. Należy również dodać, że podstawą klasyfikacji proteaz serynowych do klasy-2 jest obecność tzw. domeny 2 w α -domenie. Przy czym zidentyfikowano wiele allelicznych wariantów SPATE, które nie posiadają tej domeny, lecz mimo to, dzięki dużej homologii z proteazami klasy-2, zostały zaklasyfikowane do tej grupy. U szczepów UPEC zidentyfikowano następujące autotransporterzy SPATE: 1/ Klasa 1 – Sat (secreted autotransporter toxin), EspC (EPEC secreted protein C)-like, tj. EcPCN033-C1sp; 2/ Klasa 2 – Pic (protease involved in intestinal colonization)-like, Vat-like/Vat-ExEc i AdcA (adhesin involved in diffuse citrobacter adhesion)-like, tj. RE22-C2-sp [49].

Toksyna Vat (vacuolating autotransporter toxin) jest 111,8-kDa białkiem, kodowanym na wyspie patogenności VAT-PI szczepu APEC (avian pathogenic *E. coli*) Ec222 [52]. Bakterie APEC odpowiedzialne są, m.in. za zakażenia układu oddechowego, *cellulitis* oraz sepsę u drobiu [14, 49]. Vat podobnie jak Sat i EspC wywołuje wakuolizację komórek eukariotycznych (Ryc. 1). Co interesujące, Tsh (temperature-sensitive hemagglutinin), pomimo 75% homologii z toksyną Vat, nie indukuje powstawania wakuoli [14]. Ponadto Vat jest jedyną proteazą wśród SPATE, w której występują dwa odmienne aminokwasy (ATSGSP) w konserwatywnej sekwencji GDSGSP [14, 49]. Należy również podkreślić, że charakterystyczny motyw proteaz serynowych, tj. GDSGSP, jest ważny dla pełnionych przez nie funkcji, takich jak cytotoksyczność, czy aktywność proteolityczna. Może to tłumaczyć inaktywację aktywności proteolitycznej toksyny Vat wobec kazeiny, będącej uniwersalnym substratem dla wielu proteaz [43, 52]. Co interesujące, do tej pory nie zidentyfikowano substratów dla toksyny Vat [49].

Z kolei w przypadku bakterii ExPEC wyróżnia się tzw. toksynę Vat-like, Vat-ExEc. Toksyna ta wykazuje aż 96,5/97% homologię z toksyną Vat oraz 69,6/79% homologię z Tsh/Hbp (hemoglobin binding protein). Należy również zaznaczyć, że analiza homologów toksyny Vat wśród bakterii ExPEC wykazała niezmienny motyw GDSGSPL [49].

Toksynę VAT-ExEc identyfikuje się u 61% szczepów UPEC wywołujących OZN oraz w 65% przypadków zapalenia pęcherza moczowego [49]. Główną funkcją toksyny Vat jest wakuolizacja komórek eukariotycznych, co prowadzi do niszczenia komórek pęcherza moczowego i nerek [4, 49].

4. Białko Usp

Gen *usp* kodujący białko Usp (uropathogenic specific protein) wykrywa się u 93,4% szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów z OZN i 88% szczepów pochodzących od pacjentów z przerostem gruczołu krokowego. Dla porównania zaledwie 24% szczepów *E. coli* izolowanych od zdrowych osób z próbek kału posiada w swoim genomie *usp*. Wysoką częstość występowania tego genu stwierdzono również w przypadku szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów z bakterie-mią i/lub urosepsą [40, 67].

Po raz pierwszy gen *usp* został wykryty w szczepie UPEC Z42 wyizolowanym od pacjenta z przerostem gruczołu krokowego. Gen *usp* (1,8 kb) kodowany jest na małej wyspie patogenności PAI_{usp} wraz z 3 otwartymi ramkami odczytu *imu1-3*, oznaczanymi również, jako *orfU1*, *orfU2* i *orfU3*, kodującymi białka OrfU1, OrfU2 i OrfU3 [40, 68]. Istnieją dwa warianty tego genu – *uspI*

i *uspII* różniące się sekwencją końca 3' oraz strukturą regionu zawierającego *orfUs*. W związku z tym, w zależności od wariantów *usp* i sekwencyjnego układu *orfUs*, *PAI_{usp}* można sklasyfikować do czterech podtypów, tj. Ia, Ib, IIa, IIb. Co interesujące, u szczepów *E. coli* wyizolowanych od pacjentów z ZUM obserwuje się w obrębie *PAI_{usp}* dwa lub trzy *orfUs*, podczas gdy, wśród szczepów tzw. kałowych tylko jeden *orfU* [67]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Kanamaru i wsp. [30] stwierdzono, że 42,4% szczepów UPEC *usp*⁺ należało do podtypu IIa, podczas gdy 28,4% szczepów do Ia, 9,8% do Ib i tylko 2,7% do IIb. W 2000 r. ukazała się praca Clermonta i wsp. [11] opisująca technikę typowania filogenetycznego, z wykorzystaniem reakcji PCR. Według autorów na podstawie obecności genów markerowych (*chuA*, *yjaA* oraz fragmentu DNA oznaczonego jako TspE4.C2, pochodzącego z biblioteki naukowców) szczepy *E. coli* można sklasyfikować do następujących grup filogenetycznych, tj. A, B1, B2 i D.

Liczne dane literaturowe wskazują, że wirulentne pozajelitowe szczepy *E. coli* reprezentują głównie grupę B2 i w mniejszym stopniu grupę D, z kolei większość szczepów komensalnych klasyfikuje się do grupy A lub B1 [9]. Wyniki uzyskane przez Kanamaru i wsp. [30] wykazały, iż 94,9% szczepów *E. coli* posiadających gen *usp* sklasyfikowano do grupy filogenetycznej B2, natomiast zaledwie 11,4% do grupy A, 13,8% do B1 i 24,3% do grupy D. Ponadto analiza sekwencji nukleotydowej wykazała około 40–45% identyczność regionu C-terminalnego białka Usp z bakteriocynami typu nukleaz, tj. kolicyną E7 *E. coli* oraz piocyjaniną S *Pseudomonas aeruginosa*, posiadającymi tzw. motyw H-N-H nukleaz. Z kolei w przypadku N-terminalnego regionu Usp wykazano podobieństwo do białka systemu sekrecji typu VI, tj. Hcp-like [12, 40].

Liczne badania eksperymentalne potwierdziły, że Usp *E. coli* wykazuje homologię do bakteriocyn typu nukleaz. Bakteriocyny definiowane są jako bakterio-bójcze białka lub peptydy wytwarzane przez bakterie. Różnią się one od tradycyjnych antybiotyków tym, że wykazują aktywność wobec bakterii ściśle związanych ze szczepem produkującym. Bakteriocyny typu nukleaz niszczą komórki docelowe poprzez degradację ich kwasu nukleinowego [67]. Ponadto, postuluje się, że białka OrfU1-3 zaangażowane są w ochronę komórek wytwarzających Usp przed ich własną aktywnością nukleazową oraz nadają bakteriom oporność wobec innych bakteriocyn [12, 67]. Szczepy kodujące trzy *orfUs* są odporne na większą liczbę bakteriocyn, dlatego też mogą być bardziej rozpowszechnione niż bakterie kodujące jedno lub dwa *orfUs* [67]. C-terminalny region Usp wykazuje homologię z motywem H-N-H. Charakterystyczny motyw H-N-H obserwuje się w obrębie różnego typu nukleaz reprezentowanych przez bakteriocyny typu nukleaz, jak również wśród

endonukleaz typu 'homing'. Co więcej, motyw H-N-H obecny jest również w obrębie nukleaz uczestniczących w różnorodnych procesach biologicznych, takich jak rekombinacja, czy zaprogramowane przegrupowanie DNA podczas różnicowania. H-N-H obserwuje się także w centrum aktywnym niektórych enzymów restrykcyjnych. Należy dodać, że nukleazy te wytwarzane są przez bakterie, wirusy i eukarionty. Już wcześniejsze badania potwierdziły, że Usp wykazuje homologię z bakteriocynami typu nukleaz, np. kolicynami. Większość bakteriocyn typu nukleaz posiada trzy funkcjonalne domeny: domenę nukleazy, domenę translokacji i domenę rozpoznawania receptora. Ich główną rolą jest rozpoznanie specyficznego receptora, translokacja białka do komórki docelowej i ostatecznie degradacja chromosomalnego DNA. W przypadku Usp, oprócz domeny nukleazy stwierdza się również obecność regionu homologicznego do domeny translokacji [68].

Na podstawie badań przeprowadzonych przez Zaw i wsp. [68] stwierdzono, że Usp wykazuje aktywność DNA-zy. Ponadto ukierunkowana mutagenезa potwierdziła, że motyw H-N-H w C-terminalnym regionie Usp jest niezbędny do jej aktywności nukleazowej, co wskazuje, że Usp można sklasyfikować do tzw. H-N-H nadrodziny nukleaz. Nipic i wsp. [40] stwierdzili, że Usp jest nowo poznana genotoksyna oddziałująca na komórki eukariotyczne, wywołującą, m.in. fragmentację DNA komórek [32]. Co więcej, genotoksyczna aktywność Usp zwiększa się wówczas, gdy Usp występuje łącznie z białkiem Imu2 [22, 37]. Szczepy *E. coli* posiadające zarówno *usp-imu2*, jak i *usp-imu1-3* mogą wywołać zaokrąglenie komórek, rozpad cytoszkieletu aktywnego i aktywację kaspazy 3 i 7, co w efekcie prowadzi do apoptozy komórek.

Ze względu na fakt, że Usp jest stosunkowo nowo poznany czynnikiem wirulencji szczepów *E. coli* wyjaśnienie zarówno samej właściwości tego białka, jak i jego wpływu na komórki eukariotyczne wymaga dalszych badań. Pomimo przeprowadzonych analiz wskazujących, że Usp wykazuje tzw. niespecyficzną aktywność nukleazową podobną do znanych bakteriocyn typu nukleaz, brak jest danych potwierdzających, iż aktywność czy spektrum niszczonej komórek są takie same. W celu poznania jednoznacznej odpowiedzi niezbędne są dalsze badania [68]. Ponadto niezwykle interesująca byłaby ocena czy krótkoterminowa ekspozycja komórek na oczyszczony Usp-Imu2 lub zakażenie szczepami *E. coli usp-imu1-3* może aktywować klasyczną DDR (DNA damage response) indukowaną przez CDT, toksynę 'typhoid' czy kolibaktynę [22]. Aktywacja DDR następuje w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i obejmuje mechanizmy mające na celu aktywację szlaków naprawy DNA. Co więcej, DDR wpływa na punkty kontrolne samego cyklu komórkowego [32].

Należy zaznaczyć, iż w chwili obecnej zidentyfikowano jedynie kilka bakteryjnych genotoksyn. Wśród nich, oprócz Usp wyróżnia się, m.in. toksyny typu AB, tj. rodzinę toksyn CDT (cytolethal distending toxin) oraz toksynę 'typhoid' wydzielaną przez *Salmonella enterica* serovar Typhi. Toksyna CDT zbudowana jest z trzech jednostek, tj. CdtA, CdtB o aktywności DNA-zy i CdtC. Wytwarzana jest przez liczne bakterie Gram-ujemne, m.in. *E. coli* (EcCDT), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AaCDT), *Haemophilus ducreyi* (HdCDT), *Shigella dysenteriae* (SdCDT), *Campylobacter* spp. (CjCDT) oraz *Helicobacter hepaticus* (HhCDT). Toksyna CDT wywołuje uszkodzenia materiału genetycznego, co skutkuje zaburzeniami cyklu komórkowego i apoptozą komórek eukariotycznych [22, 32].

Kolejną genotoksyną jest kolibaktyna zidentyfikowana w 2006 r., wytwarzana przez szczepy *E. coli* należące do grupy filogenetycznej B2. Kolibaktyna należy do tzw. poliketydowych-nieribosomalnych peptydów. W przypadku kolibaktyny zmiany w materiale genetycznym komórek w odróżnieniu od CDT nie są indukowane przez białka efektorowe, lecz wiążą się z obecnością 54 KB genomowej wyspy, znajdującej się w locus *asnW* tRNA [22].

5. Białko Ag43

Białka autotransporterowe (autotransporter proteins, AT) reprezentujące ogromną rodzinę białek, odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób, głównie ze względu na pełnione przez nie różnorodne funkcje biologiczne, tj. adhezja, agregacja, czy formowanie biofilmu. Należy dodać, iż AT są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Wytwarzają je wszystkie klasy *Proteobacteria*, jak również liczne gatunki należące do *Chlamydiales* i *Fusobacteriales*. Wśród AT wyróżnia się, m.in. AIDA (adhesin involved in diffuse adherence)-I, której reprezentantem jest Ag43 stanowiący białko błony zewnętrznej. Autotransportery AIDA-I zbudowane są z peptydu sygnałowego, 'passenger domain', tj. α -domeny oraz 'translocation domain', czyli β -domeny [46, 61].

Białko Ag43 (autotransporter protein antigen 43) kodowane jest przez gen *agn43*, pierwotnie określony, jako *flu* locus [61]. Antygen 43 obecny jest u licznych bakterii *E. coli*, zarówno chorobotwórczych, jak i kอมensalnych należących do różnych grup filogenetycznych. Należy również podkreślić, że niektóre szczepy posiadają nawet kilka kopii tego genu. W przypadku kอมensalnych szczepów *E. coli* 56% z nich koduje *agn43*. Dla porównania u ponad 90% szczepów UPEC stwierdzono obecność tego genu. Wyniki te sugerują częstsze występowanie *agn43* u szczepów chorobotwórczych. W chwili obecnej wyróżnia się co najmniej 5 wariantów allelicz-

nych *agn43*, tj. *agn43* K12, *agn43* EDL933, *agn43* RS218, *agn43a* CFT073 i *agn43b* CFT073 [46]. Ag43 zalicza się do AT, które ulegają glikozylacji przez cytozolowe transferazy. Glikozylacja wpływa na utrzymanie konformacji białek, zapewnia oporność na trawienie proteolityczne, ułatwia adhezję komórkową oraz rozpoznanie komórek gospodarza [31]. Reidl i wsp. [45] wykazali, że O-glikozylacja domen Ag43 doprowadzała do zaburzeń agregacji i znaczącego zmniejszenia adhezji do linii komórek eukariotycznych.

Białko Ag43 pełni wiele ważnych funkcji, m.in. pośredniczy w agregacji komórek, co sprzyja tworzeniu biofilmu, a to z kolei może wiązać się z długotrwałą obecnością bakterii w pęcherzu moczowym. Wyniki uzyskane przez Ulett i wsp. [58] wyraźnie wskazują, że Ag43 (z K-12 *E. coli*) powiązane jest z wczesnym stadium tworzenia biofilmu. Ag43 ze względu na pośrednictwo w formowaniu biofilmu promuje długotrwałą kolonizację dróg moczowych. Biofilm bakteryjny odgrywa bowiem ważną rolę w przeciwstawianiu się siłom obronnym gospodarza oraz antybiotykowi, co z kolei utrudnia skuteczne i szybkie wyleczenie pacjentów [55]. Wyniki badań uzyskane przez Heras i wsp. [25] wskazują, że domena α Ag43 dzięki unikatowej β -helikalnej strukturze w kształcie litery L umożliwia i ułatwia tworzenie agregatów komórkowych poprzez tzw. molekularny mechanizm 'Velcro-like handshake'.

Białko Ag43 jest szeroko rozpowszechnione u szczepów wywołujących bezobjawową bakteriurię, zapalenie pęcherza moczowego oraz OZN [59]. Badania przeprowadzone przez Lüthje i wsp. [35] wykazały występowanie tego genu u 92% szczepów wywołujących nawrotowe ZUM, co może sugerować ważną rolę tego białka w długotrwałym utrzymywaniu się bakterii w drogach moczowych. Wysoką ekspresję Ag43 zaobserwowano u szczepów tworzących tzw. 'młody' biofilm, w przeciwieństwie do szczepów stanowiących biofilm 'dojrzały'. W związku z czym postuluje się, że Ag43 odgrywa ważną rolę we wczesnym etapie tworzenia biofilmu, jednakże nie jest niezbędne do 'dojrzwania' biofilmu. Jest to zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Wallecha i wsp. [61], którzy zaobserwowali najwyższy poziom ekspresji Ag43 u *E. coli* K12 w początkowej fazie wzrostu bakterii.

Szczep UPEC CFT073 koduje przynajmniej 10 białek AT. W przypadku Ag43 obecne są dwa warianty, tj. Ag43a i Ag43b, kodowane na PAI. Białka te wykazują około 90% homologię w sekwencji aminokwasowych, zaś kodujące je geny około 91% identyczność sekwencji nukleotydowych. Ponadto obserwuje się 85% homologię α -domeny obydwu białek. Pomimo tak dużego stopnia podobieństwa Ag43a i Ag43b różnią się między sobą, np. stopniem agregacji komórek. Podczas gdy Ag43a promuje silną agregację, Ag43b pośredniczy w zdecydowanie słabszej agregacji komórek [25, 58]. Ponadto

wykazano, że równoczesna ekspresja fimbrii typu 1, może blokować bezpośredni kontakt komórka-komórka, co skutkuje zmniejszeniem agregacji komórek [59]. Wyniki uzyskane przez naukowców wyraźnie wskazują, że ekspresja Ag43a przez szczep CFT073 jest konieczna do optymalnej kolonizacji pęcherza moczowego w mysim modelu ZUM. Z kolei Ag43b charakteryzuje się słabszymi właściwościami w promowaniu agregacji i tworzeniu biofilmu, co nie sprzyja kolonizacji dróg moczowych [59]. W oparciu o metodę immunofluorescencji ekspresję Ag43 wykazano również wśród szczepów tworzących IBCs, (intracellular bacterial communities), co może sugerować ważną rolę tego białka w wewnątrzkomórkowej fazie wzrostu szczepów UPEC [55].

6. Biofilm bakteryjny

Biofilm bakteryjny określany jest jako złożona, wielokomórkowa, niejednorodna strukturalnie i zróżnicowana genetycznie tzw. 'społeczność bakterii' otoczona warstwą zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS, extracellular polymeric substance) [53, 55]. Wytwarzanie EPS nie jest niezbędne do adhezji bakterii do określonej powierzchni, lecz odgrywa ważną rolę w tworzeniu trójwymiarowej struktury biofilmu [65]. Szacuje się, że komórki bakteryjne stanowią zaledwie 10–25% biofilmu, podczas gdy EPS, aż 75–90% [37]. Biofilm mogą tworzyć bakterie należące do jednego lub kilku gatunków, a także grzyby [55]. Na formowanie biofilmu mają wpływ czynniki środowiskowe, np. obecność substancji odżywczych, czy ciśnienie osmotyczne. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wzrost osmolarności do 0,3 M NaCl w pożywce hamuje tworzenie biofilmu przez szczepy *E. coli* oraz ogranicza wzrost badanych bakterii [65]. W zależności od miejsca powstawania i składu gatunkowego biofilm może przyczynić się do rozwoju zakażeń wywołujących implikacje zarówno kliniczne, jak i terapeutyczne. W medycynie bakterie tworzące biofilm na sztucznych powierzchniach, czy innego rodzaju ciałach obcych, tj. protezach ortopedycznych, sztucznych zastawkach serca, cewnikach moczowych, odgrywają istotną rolę w patogenezie, m.in. zapalenia wsierdza, zapalenia płuc, jak również zapalenia szpiku kostnego oraz pęcherza moczowego [41].

Proces powstawania biofilmu można podzielić na pięć etapów. W pierwszym z nich dochodzi do adhezji bakteryjnej do różnego rodzaju powierzchni, zarówno biotycznych, jak i abiotycznych. O skuteczności przylegania bakterii do powierzchni docelowej decydują właściwości zarówno samej powierzchni, jak również właściwości hydrofobowe powierzchni komórki bakteryjnej. Ponadto duże znaczenie mają oddziaływania międzycząsteczkowe, np. siły van der Waalsa, wiązania jonowe oraz wodorowe. W drugim etapie komórki

bakteryjne zostają nieodwracalnie związane z kolonizowaną powierzchnią i rozpoczyna się proces wytwarzania EPS. W kolejnych dwóch etapach dochodzi do formowania dojrzałego biofilmu, poprzez tworzenie mikrokolonii, intensywne podziały komórkowe oraz dalszą syntezę macierzy pozakomórkowej. Ważną rolę odgrywa w tych etapach proces wyczuwania liczebności (quorum sensing), w którym to komórki bakteryjne komunikują się ze sobą poprzez uwalnianie, wykrywanie i reagowanie na cząstki sygnałowe stymulujące ich podziały komórkowe oraz regulujące procesy fizjologiczne. W ostatnim etapie pojedyncze komórki bakteryjne lub nawet większe fragmenty biofilmu ulegają dyspersji, a następnie adhezji do nowych powierzchni, nawet odległych anatomicznie [41].

Bakterie tworzące biofilm wykazują wielokrotnie większą oporność (nawet 1000–1500-krotnie) na antybiotyki oraz substancje toksyczne w porównaniu do komórek planktonowych. EPS stanowi bowiem fizyczną barierę utrudniającą opsonizację i fagocytozę przez komórki układu immunologicznego [28, 37, 41]. Co więcej, bakterie w obrębie biofilmu często tworzą różne subpopulacje, cechujące się odrębnymi właściwościami fizjologicznymi, metabolizmem, czy ekspresją genów, dlatego też „wspólnota bakteryjna biofilmu” składająca się z wielu różnych subpopulacji, wykazuje oporność na tak szeroki zakres czynników środowiskowych [28].

W przypadku ZUM niebezpieczne są zwłaszcza implikacje kliniczne związane z tworzeniem biofilmu na cewnikach. Należy podkreślić, że formowanie biofilmu rozpoczyna się natychmiast po umieszczeniu cewnika w pęcherzu moczowym [27]. *E. coli* dzięki zdolności adhezji do wielu polimerów wchodzących w skład cewników, takich jak: polipropylen, polistyren, polichlorek winylu, czy silikon, jest w stanie trwale i skutecznie je skolonizować [40]. Rozwinięcie się ZUM jest ściśle związane z długością okresu pozostawiania cewnika w drogach moczowych, przy czym każdy kolejny dzień zwiększa to ryzyko o 3–8% [26, 27, 41].

Cechą odróżniającą komórki tworzące biofilm od komórek planktonowych jest obecność EPS składającej się, np. z białek, polisacharydów i/lub DNA. Skład macierzy biofilmu różni się także między poszczególnymi gatunkami bakterii [28, 55]. Należy podkreślić, że fimbrie spiralne zostały zidentyfikowane, jako pierwsze tzw. funkcjonalne amyloidy będące zewnątrzkomórkowymi białkami wytwarzanymi przez wiele bakterii jelitowych, w tym *E. coli* i *Salmonella* spp. Amyloidy od dziesięcioleci są intensywnie badane, przy czym należy zaznaczyć, że odgrywają one ważną rolę w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona i Huntingtona. Niedawno odkryto nową klasę amyloidów, określonych, jako tzw. amyloidy funkcjonalne [16].

W przypadku szczepów *E. coli*, fimbrie spiralne są głównym składnikiem białkowym macierzy biofilmu,

przy czym ich produkcja ograniczona jest do wybranych subpopulacji. Ekspresja fimbrii spiralnych jest kontrolowana przez szereg sygnałów środowiskowych i gradientów chemicznych, takich jak temperatura, osmolarność i tlen. Główną podjednostką fimbrii spiralnych jest CsgA, ponadto wyróżnia się, m.in. CsgB i CsgC [16]. Fimbrie spiralne są istotnym czynnikiem wirulencji szczepów UPEC, gdyż ułatwiają kolonizację pęcherza moczowego w mysim modelu doświadczalnym oraz pośredniczą w tworzeniu biofilmu. Należy dodać, że w przypadku nieleczonych zakażeń, może rozwinąć się bakteremia, wówczas, w próbkach surowicy pochodzących od pacjentów z bakteriami stwierdza się obecność przeciwciał przeciwko głównej podjednostce fimbrii spiralnych, tj. CsgA, co podkreśla ich istotną rolę w patomechanizmie niektórych zakażeń. Bakterie wytwarzające fimbrie spiralne stymulują w organizmie gospodarza produkcję cytokin prozapalnych, tj. IL-8. Co więcej, szczepy te charakteryzują się wyższym poziomem oporności na przeciwbakteryjny peptyd katelicydynę (LL-37). LL-37 hamuje polimeryzację genów kodujących główną podjednostkę strukturalną CsgA, co zapobiega adhezji bakteryjnej i tworzeniu biofilmu w warunkach *in vitro*. W chwili obecnej poszukiwane są nowe strategie terapeutyczne zakażeń szczepami UPEC, gdzie istotne zastosowanie mogą mieć chemiczne inhibitory biosyntezy fimbrii spiralnych [28, 55].

Innym ważnym polimerem obecnym w EPS szczepów *E. coli* jest celuloza będąca liniowym łańcuchem β -(1,4)-monomerów glukozy. W 2001 r. po raz pierwszy opisano wytwarzanie celulozy przez bakterie rzędu *Enterobacteriales*. Ekspresja genów syntezy celulozy jest zazwyczaj uzależniona od głównego regulatora tworzenia biofilmu, czyli CsgD [28]. Ważną rolę w promowaniu kolonizacji dróg moczowych oraz tworzeniu biofilmu przez szczepy UPEC odgrywa również antygen 43 i fimbrie typu 1 [28, 55]. Fimbrie typ 1 pełnią ważną funkcję w zakażeniach dróg moczowych, gdyż biorą udział w stymulowaniu bakteryjnej autoagregacji i formowaniu biofilmu [55]. Co więcej, Floyd i wsp. [19] wykazali, że bakterie ekspresyjące fimbrie typu 1 tworzą głównie górną warstwę biofilmu, gdzie zapewniony jest dostęp powietrza. Spadek stężenia tlenu prowadzi do znacznej redukcji ekspresji fimbrii typu 1 na powierzchni komórek bakteryjnych. Na podstawie tych badań można wywnioskować, że przepuszczalność tlenu, przynajmniej częściowo, reguluje ekspresję fimbrii typu 1.

7. Podsumowanie

Szczepy UPEC, będące czynnikiem etiologicznym 75–95% przypadków ZUM, kodują wiele różnorodnych czynników wirulencji, tj. systemy biosyntezy i transportu sideroforów, receptory OM dla sideroforów, tok-

syny, białka Usp i Ag43 oraz charakteryzują się zdolnością do tworzenia biofilmu [34, 38, 55, 60]. Potencjał wirulentny UPEC umożliwia nie tylko kolonizację układu moczowego, lecz również ułatwia drobnoustrojom utrzymywanie się w obrębie dróg moczowych nawet przy silnej odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Ponadto wiele determinant wirulencji umożliwia UPEC dostęp do niezbędnych składników odżywczych, kolejno ich wzrost i namnażanie nawet w tak nieprzyjnym środowisku jak drogi moczowe. Co więcej, niektóre czynniki wirulencji przyczyniają się do uszkodzenia komórek, co warunkuje dostęp do głębszych tkanek gospodarza [6, 55].

W Polsce, podobnie, jak i na całym świecie, ZUM wywołane przez szczepy UPEC, stanowią ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W związku z powyższym, tak cenna jest wiedza na temat czynników wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli*, która może przyczynić się do opracowania nowych opcji terapeutycznych w profilaktyce i leczeniu ZUM i/lub zaowocować rozwojem nowych metod diagnostycznych [55].

Piśmiennictwo

1. Alteri C.J., Hagan E.C., Sivick K.E., Smith S.N., Mobley H.L.: Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000586 (2009)
2. Asadi Karam M.R., Habibi M., Bouzari S.: Urinary tract infection: pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.* **108**, 56–67 (2019)
3. Awasthi T.R., Pant N.D., Dahal P.R.: Prevalence of multidrug resistant bacteria in causing community acquired urinary tract infection among the patients attending outpatient Department of Seti Zonal Hospital, Dhangadi, Nepal. *Nepal. J. Biotechnol.* **3**, 55–59 (2015)
4. Baldy-Chudzik K., Bok E., Mazurek J.: Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako konsekwencja plastycznego genomu. *Post. Hig. Med. Dosw.* **69**, 345–361 (2015)
5. Benz R., Maier E., Bauer S., Ludwig A.: The deletion of several amino acid stretches of *Escherichia coli* alpha-Hemolysin (HlyA) suggests that the channel-forming domain contains beta-strands. *PLoS One*, **9**, e112248 (2014)
6. Bien J., Sokolova O., Bozko P.: Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int. J. Nephrol.* **2012**, 681473 (2012)
7. Brumbaugh A.R., Mobley H.L.: Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert. Rev. Vaccines.* **11**, 663–676 (2012)
8. Brumbaugh A.R., Smith S.N., Mobley H.L.: Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection. *Infect. Immun.* **81**, 3309–3316 (2013)
9. Carlos C., Pires M.M., Stoppe N.C., Hachich E.M., Sato M.I., Gomes T.A., Amaral L.A., Ottoni L.M.: *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* **10**, 161 (2010)
10. Chmielewska S.J., Fiedoruk K., Daniluk T., Ściepuk M., Kaczmarzyk D., Leszczyńska K.: Znaczenie uropatogennych

- szczepów *Escherichia coli* (UPEC) w etiopatogenezie zakażeń układu moczowego. *Post. Mikrobiol.* **55**, 45–56 (2016)
11. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E.: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558 (2000)
 12. Crnigoj M., Podlesek Z., Budič M., Zgur-Bertok D.: The *Escherichia coli* uropathogenic-specific-protein associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity. *BMC Microbiol.* **14**, 16 (2014)
 13. Croxen M.A., Finlay B.B.: Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010)
 14. Dautin N.: Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins (Basel)*, **2**, 1179–1206 (2010)
 15. Dikshit N., Bist P., Fenlon S.N., Pulloor N.K., Chua C.E., Scidmore M.A., Carlyon J.A., Tang B.L., Chen S.L., Sukumaran B.: Intracellular uropathogenic *E. coli* exploits host Rab35 for iron acquisition and survival within urinary bladder cells. *PLOS Pathog.* **6**, e1005083 (2015)
 16. Evans M.L., Chapman M.R.: Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1551–1558 (2014)
 17. Fabbri A., Travaglione S., Fiorentini C.: *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, *in vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*, **2**, 283–296 (2010)
 18. Feldmann F., Sorsa L.J., Hildinger K., Schubert S.: The salmonelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *in vitro*. *Infect. Immun.* **75**, 3183–3187 (2007)
 19. Floyd K.A., Moore J.L., Eberly A.R., Good J.A., Shaffer C.L., Zaver H., Almqvist F., Skaar E.P., Caprioli R.M., Hadjifrangiskou M.: Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. *PLOS Pathog.* **11**, e1004697 (2015)
 20. Garcia E.C., Brumbaugh A.R., Mobley H.L.: Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **79**, 1225–1235 (2011)
 21. Garcia T.A., Ventura C.L., Smith M.A., Merrell D.S., O'Brien A.D.: Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infect. Immun.* **81**, 99–109 (2013)
 22. Grasso F., Frisan T.: Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. *Biomolecules*, **5**, 1762–1782 (2015)
 23. Guo Y., Zhang Z., Wei H., Wang J., Lv J., Zhang K., Keller E.T., Yao Z., Wang Q.: Cytotoxic necrotizing factor 1 promotes prostate cancer progression through activating the Cdc42-PAK1 axis. *J. Pathol.* **243**, 208–219 (2017)
 24. Hancock V., Ferrières L., Klemm P.: The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, **154**, 167–175 (2008)
 25. Heras B., Totsika M., Peters K.M., Paxman J.J., Gee C.L., Jarrott R.J., Perugini M.A., Whitten A.E., Schembri M.A.: The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 457–462 (2014)
 26. Hooton T.M., Bradley S.F., Cardenas D.D., Colgan R., Geerlings S.E., Rice J.C., Saint S., Schaeffer A.J., Tambayh P.A., Tenke P., Nicolle L.E.: Infectious Diseases Society of America. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 625–663 (2010)
 27. Hryniewicz W., Holecki M.: Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki zakażeń układu moczowego u dorosłych, 2015, <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/uklmoczowyinternet.pdf> (05.07.2019)
 28. Hufnagel D.A., Depas W.H., Chapman M.R.: The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol. Spectr.* **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014 (2015)
 29. Jamet A., Nassif X.: New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *MBio.* **6**, e00285-15 (2015)
 30. Kanamaru S., Kurazono H., Nakano M., Terai A., Ogawa O., Yamamoto S.: Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *Int. J. Urol.* **13**, 754–760 (2006)
 31. Knudsen S.K., Stensballe A., Franzmann M., Westergaard U.B., Otzen D.E.: Effect of glycosylation on the extracellular domain of the Ag43 bacterial autotransporter: enhanced stability and reduced cellular aggregation. *Biochem. J.* **412**, 563–577 (2008)
 32. Kobińska P., Wyszynska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Charakterystyka genotoksyn CDT (cytolethal distending toxin). *Post. Mikrobiol.* **52**, 315–324 (2013)
 33. Lo Y., Zhang L., Foxman B., Zöllner S.: Whole-genome sequencing of uropathogenic *Escherichia coli* reveals long evolutionary history of diversity and virulence. *Infect. Genet. Evol.* **34**, 244–250 (2015)
 34. Luo Y., Ma Y., Zhao Q., Wang L., Guo L., Ye L., Zhang Y., Yang J.: Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 4002–4007 (2012)
 35. Lüthje P., Brauner A.: Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.* **65**, 337–372 (2014)
 36. Mann R., Mediati D.G., Duggin I.G., Harry E.J., Bottomley A.L.: Metabolic adaptations of uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 241 (2017)
 37. Matusiak D.M.: Zakażenia układu moczowego z udziałem *Proteus mirabilis* – rola biofilmu i inkrustacji cewnika urologicznego. *Post. Mikrobiol.* **53**, 173–180 (2014)
 38. McLellan L.K., Hunstad D.A.: Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends. Mol. Med.* **22**, 946–957 (2016)
 39. Miraglia A.G., Travaglione S., Meschini S., Falzano L., Matarrese P., Quaranta M.G., Viora M., Fiorentini C., Fabbri A.: Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 2735–2744 (2007)
 40. Nipic D., Podlesek Z., Budič M., Črnigoj M., Žgur-Bertok D.: *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J. Infect. Dis.* **208**, 1545–1552 (2013)
 41. Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Stączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67**, 1027–1033 (2013)
 42. Paxman J.J., Heras B.: Unique structural features of a bacterial autotransporter adhesin suggest mechanisms for interaction with host macromolecules. *Nat. Commun.* **10**, 967 (2019)
 43. Pérez-Moreno M.O., Pérez-Moreno M., Carulla M., Rubio C., Jardí A.M., Zaragoza J.: Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 234–241 (2004)
 44. Piteau M., Papatheodorou P., Schwan C., Schlosser A., Aktories K., Schmidt G.: Lu/BCAM adhesion glycoprotein is a receptor for *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *PLOS Pathog.* **10**, e1003884 (2014)
 45. Reidl S., Lehmann A., Schiller R., Salam Khan A., Dobrindt U.: Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhe-

- sion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 389–401 (2009)
46. Restieri C., Garriss G., Locas M.C., Dozois C.M.: Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1553–1562 (2007)
 47. Ristow L.C., Welch R.A.: Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: a cloak or a dagger. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 538–545 (2016)
 48. Robinson A.E., Heffernan J.R., Henderson J.P.: The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiol.* **13**, 745–756 (2018)
 49. Ruiz-Perez F., Nataro J.P.: Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life. Sci.* **71**, 745–770 (2014)
 50. Sánchez-Magraner L., Viguera A.R., García-Pacios M., Garcilán M.P., Arrondo J.L., de la Cruz F., Goñi F.M., Ostolaza H.: The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 11827–11835 (2007)
 51. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Książczyk M., Bugła-Ploskonska G., Choroszy-Krol I.: Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut. Pathog.* **11**, 10 (2019)
 52. Schito G.C., Naber K.G., Botto H., Palou J., Mazzei T., Gualco L., Marchese A.: The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 407–413 (2009)
 53. Sharma G., Sharma S., Sharma P., Chandola D., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 309–319 (2016)
 54. Sobieszczkańska M.B.: Hemolizyny *Escherichia coli*. *Post. Mikrobiol.* **46**, 343–353 (2007)
 55. Subashchandrabose S., Mobley H.L.: Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015–2012 (2015)
 56. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E.: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front. Microbiol.* **8**, 1566 (2017)
 57. Ulett G.C., Totsika M., Schaale K., Carey A.J., Sweet M.J., Schembri M.A.: Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 100–107 (2013)
 58. Ulett G.C., Valle J., Beloin C., Sherlock O., Ghigo J.M., Schembri M.A.: Functional analysis of Antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect. Immun.* **75**, 3233–3244 (2007)
 59. Vollmerhausen T.L., Katouli M.: Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from hospitalized children and adults with urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 975–982 (2014)
 60. Wagenlehner F.M.E., Naber K.G.: Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur. Urol.* **49**, 235–244 (2006)
 61. Wallecha A., Oreh H., van der Woude M.W., deHaseth P.L.: Control of gene expression at a bacterial leader RNA, the *agn43* gene encoding outer membrane protein Ag43 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **196**, 2728–2735 (2014)
 62. Watts R.E., Totsika M., Challinor V.L., Mabbett A.N., Ulett G.C., De Voss J.J., Schembri M.A.: Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 333–344 (2012)
 63. Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A.: Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–19 (2008)
 64. Yang H., Li Q., Wang C., Wang J., Lv J., Wang L., Zhang Z.S., Yao Z., Wang Q.: Cytotoxic necrotizing nactor 1 downregulates CD36 transcription in macrophages to induce inflammation during acute urinary tract infections. *Front. Immunol.* **9**, 1987 (2018)
 65. Zalewska-Piątek B., Wilkanowicz S., Bruździak P., Piątek R., Kur J.: Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr⁺ strains. *Microbiol. Res.* **168**, 367–378 (2013)
 66. Zalewska-Piątek B.M., Piątek R.J.: Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta. Biochim. Pol.* **66**, 129–138 (2019)
 67. Zaw M.T., Lai Y.M., Lin Z.: Uropathogenic specific protein: epidemiologic marker of uropathogenic *Escherichia coli* as well as non-specific DNase. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health*, **5**, 630 (2013)
 68. Zaw M.T., Yamasaki E., Yamamoto S., Nair G.B., Kawamoto K., Kurazono H.: Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. *Gut. Pathog.* **5**, 13 (2013)

SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII W ZESPOLE JELITA DRAŻLIWEGO

Przemysław Gałązka¹, Aleksandra Baska², Jakub Kazik^{2*}, Kamil Leis²

¹Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Dzieci i Młodzieży, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w sierpniu 2019 r., zaakceptowano w lutym 2020 r.

Streszczenie: Probiotyki to organizmy należące do grzybów lub bakterii, wpływające m. in. na prawidłową florę bakteryjną w świetle przewodu pokarmowego oraz redukujące stan zapalny. Znajdują one zastosowanie w wielu chorobach, takich jak alergie pokarmowe, biegunki, choroby autoimmunologiczne czy zespół jelita drażliwego (IBS), którego występowanie w populacji światowej wynosi ponad 10%. Z racji braku odpowiedniej farmakoterapii, skutkującej pełnym wyleczeniem, preparaty probiotyczne, wpływające na redukcję objawów stanowią jedne z najczęściej podawanych środków. Wśród nich wysoką skutecznością w walce z IBS charakteryzuje się drożdżak *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Wyróżnia się trzy sposoby działania tego probiotyku: przeciwdrobnoustrojowe (bezpośrednie oraz redukujące produkowane toksyny), troficzne oraz przeciwzapalne.

1. Wprowadzenie. 2. Zespół jelita drażliwego. 3. Historia. 4. Morfologia. 5. Mechanizm działania. 5.1. Działanie w świetle jelita. 5.2. Działanie troficzne. 5.3. Działanie przeciwzapalne na błonę śluzową. 6. Taksonomia. 7. Probiotyki. 8. Podsumowanie

SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII IN IRRITABLE BOWEL SYNDROME

Abstract: Probiotics are organisms which belong to the fungi or bacteria groups and affect e.g., bacterial flora in the intestine or inflammation site by reduction of the condition. They are applied in many cases, such as food allergies, diarrhea, autoimmune disorders, and irritable bowel syndrome (IBS) that affects 10% of the world population. Due to the lack of proper pharmacological treatment which would result in complete remission, probiotic preparations which lead to a reduction of the symptoms are one of the most often used drugs. Among them, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* has a high efficacy of IBS treatment. There are three main mechanisms of action of this probiotic: antimicrobial activity (direct or anti-toxin), trophic activity, and anti-inflammatory activity.

1. Introduction. 2. Irritable bowel syndrome. 3. History. 4. Morphology. 5. Mechanism of action. 5.1. Luminal action. 5.2. Trophic action. 5.3. Anti-inflammatory action. 6. Taxonomy. 7. Probiotics. 8. Summary

Słowa kluczowe: probiotyki, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, zespół jelita drażliwego

Key words: probiotics, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, irritable bowel syndrome

1. Wprowadzenie

Zespół jelita drażliwego jest przewlekłą chorobą układu pokarmowego, objawiającą się zmianą rytmu wypróżnień oraz bólami brzucha. Szacuje się, że występuje ona u około 10% populacji. Obecnie, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy medycznej nie istnieje terapia przynosząca całkowite wyleczenie z choroby. Stosuje się jedynie środki poprawiające jakość życia i redukujące ból. Możemy do nich zaliczyć odpowiednią dietę czy stosowanie preparatów zawierających probiotyki. Wśród organizmów tych wyróżnić należy drożdże *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) posiadające udowodnioną na podstawie wielu badań wysoką skuteczność w terapii IBS (irritable bowel syndrome). Ich działanie można podzielić na trzy rodzaje,

do których zalicza się: działanie troficzne, działanie w świetle jelita (przeciwko drobnoustrojom) oraz działanie przeciwzapalne.

2. Zespół jelita drażliwego

Zespół jelita drażliwego (IBS) to przewlekła choroba układu pokarmowego, należąca do funkcjonalnych zaburzeń żołądkowo-jelitowych (functional gastrointestinal disorder – FGID) [65] i dotycząca 11,2% populacji [59] lub według innych źródeł 5–10% [28]. Objawia się ona bólami brzucha, wzdęciami, uczuciem dyskomfortu oraz zmianą konsystencji oddawanego stolca. W chorobie tej występują także objawy psychiatryczne, jak np. objawy depresyjne czy lękowe.

* Autor korespondencyjny: Jakub Kazik, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Jagiellońska 13, 85-067 Bydgoszcz; e-mail: jakub.tomasz.kazik@gmail.com

Wyróżnia się trzy typy choroby: IBS-D, czyli postać z przewlekłą biegunką, IBS-C – postać z występowaniem zaparć oraz IBS-M – tzw. postać mieszana [29].

Patofizjologia choroby nie została jeszcze poznana [59]. Jedną z hipotez są zmiany w obrębie neuroendokrynnych peptydów, znajdujących się w żołądku oraz jelitach [28]. Te z kolei wpływają na nadwrażliwość przewodu pokarmowego oraz na zaburzenia procesów trawienia. Zgodnie z kolejną hipotezą wpływ na rozwój choroby mają: nieprawidłowa motoryka jelit, zaburzenia w funkcjonowaniu autonomicznego układu nerwowego oraz wrażliwość przewodu pokarmowego [39]. Inne dane, dostępne w piśmiennictwie mówią, że rolę w powstawaniu zespołu jelita drażliwego odgrywają interakcje w obrębie układów: hormonalnego, nerwowego oraz odpornościowego. Ci sami autorzy podkreślają, iż stres stanowi jedną z najważniejszych przyczyn pojawienia się choroby, powodując wzrost stężenia kortyzolu czy wpływając na mikrobiom organizmu [59]. Do innych czynników zaliczają oni także infekcje pokarmowe, zapalenia, urazy, alergie pokarmowe, a także czynniki genetyczne.

Carter i wsp. dokonali analizy 440 822 osób w wieku 18–39 lat, w której oszacowano częstość występowania zespołu jelita drażliwego na 221:100 000 osobolat [13]. Inne badanie kohortowe, opublikowane w 2017 roku dotyczyło 5 986 osób w wieku 18–50 lat i wskazywało na częstość zachorowań na poziomie 15,4% [43]. Canavan i wsp. natomiast twierdzą, iż zespół jelita drażliwego dotyczy 11% światowej populacji, a zachorowania częściej odnotowuje się u kobiet (około 1,5–3 razy częściej), jednak zachorowania te nie mają związku z wiekiem, a jedynie około 30% osób, u których występują objawy zgłasza się po pomoc do lekarza [12, 25]. Badacze ci wskazują Europę, Amerykę Północną oraz Azję Południowo-Wschodnią jako główne obszary zachorowań.

Kryteria rozpoznania zespołu jelita drażliwego określają kryteria rzymskie IV, wprowadzone w maju 2016 roku, stanowiące aktualizację kryteriów rzymskich III z 2006 roku [24, 65]. Zgodnie z nowymi wytycznymi IBS diagnozuje się, gdy ból występuje co najmniej jeden dzień w tygodniu, trwa od co najmniej trzech miesięcy i spełnia dwa lub trzy warunki: towarzyszy mu zmiana konsystencji oddawanego stolca, zmiana rytmu defekacji lub jest on związany z wypróżnianiem [52].

W diagnostyce zespołu jelita drażliwego funkcjonują także kryteria Manninga z 1978 roku oraz Kruis system z 1984 roku. Pierwszy z nich opierał się na 6 cechach choroby, wybranych na podstawie analiz spośród 15 początkowych. Drugi natomiast polegał na połączeniu objawów alarmowych z charakterystyką choroby, dających wynik punktowy. Jeśli wynosił on powyżej 44 punkty, rozpoznawano wówczas IBS [23, 44, 47].

Inną z metod diagnostycznych zespołu jelita drażliwego jest ustalenie poziomu chromograniny A [28].

Białko to występuje w komórkach neuroendokrynnych. Marker charakteryzuje się wysoką swoistością i czułością. Związek jest również wykorzystywany w diagnostyce rakowiaków przewodu pokarmowego [53], raków prostaty, trzustki, okrężnicy, jajnika lub piersi [75]. Podwyższony poziom chromograniny jest również obserwowany w guzie chromochłonnym [17].

3. Historia

Gatunek *Saccharomyces boulardii* został odkryty przez francuskiego mikrobiologa Henri Boularda w 1920 roku, gdy ten poszukiwał nowych odmian drożdży, które mogłyby być użyte w procesie fermentacji. W czasie swoich podróży do Indochin, zaobserwował, że tubylcy pijący specjalną odmianę herbaty ze skórek liczi i mangostanu nie ulegali panującej wówczas epidemii cholery. Boulardowi udało się wyizolować gatunek drożdży, które nazwał *Saccharomyces boulardii*. Patent na drożdże został wykupiony w roku 1947 przez Laboratories Biocodex, które rozpoczęło badania naukowe oraz produkcję. Od tego czasu zainteresowanie drożdżakiem znacznie wzrosło [9, 48, 49, 61].

4. Morfologia

Szczep *S. boulardii* jest drożdżakiem, należącym do eukariontów. Jego ściana jest zbudowana z chityny, mannozy i glukanu, a jej grubość wynosi średnio 4,18 µm dla komórek haploidalnych lub 5,3 µm dla komórek diploidalnych. W stanie stacjonarnym drożdże mają tendencję do flokulacji (kłaczkowania), w przebiegu której białka lektyno-podobne (tzw. flokuliny) wystają ze ściany komórkowej grzyba i wybiórczo łączą się z resztami mannozy obecnymi w ścianie komórkowej innych komórek drożdża. Dodatek wolnej mannozy do medium może więc wpływać na zdolności *S. boulardii* do adhezji. Optymalne do jego rozwoju pH wynosi 4,5–6,5, natomiast temperatura około 37°C, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Jest niezdolny do transmisji materiału genetycznego oraz odporny na antybiotyki i proteolizę [8, 18, 26, 27, 41, 51, 72]. Jako drożdżak wchodzi w interakcje z innymi mikroorganizmami: symbiozę, mutualizm, parazytyzm i konkurencję. Rozmnaża się zarówno bezpłciowo, jak i płciowo [61].

Gatunek *S. boulardii* jest jedynym probiotykiem drożdżowym, który znalazł zastosowanie podczas przeprowadzonych badań. Wykazuje on stosunkową odporność na kwaśne środowisko i żółć, ginie w temperaturze wynoszącej około 55–60°C oraz toleruje 20% stężenie alkoholu [18, 26, 41, 51].

Drożdżak *S. boulardii* dociera do organu docelowego, jakim jest jelito. Mimo że większość mikroorga-

nizmów zostaje zniszczona (szacuje się, że ilość ta jest 100–1000x mniejsza od dawki doustnej), przetrwałe drożdżaki są zdolne do wywołania odpowiedzi organizmu. Osiąga odpowiednie stężenie w ciągu 3 dni od zastosowania, a efekt zanika po 3–5 dniach od przerwania kuracji. Czas półtrwania *S. boulardii* szacuje się na 6 godzin. Niektóre formy błonnika (m.in. ziarna i łupiny babki jajowatej) mogą zwiększać ilość *S. boulardii* w jelicie [41, 48].

5. Mechanizm działania

W jelicie zajęтым przez bakterie dochodzi do produkcji toksyn, które zwiększają sekrecję wody do jego światła. Bakterie zajmują śluzówkę jelita, niszcząc połączenia szczelinowe, podczas gdy wirusy doprowadzają do martwicy dojrzałych enterocytów. W kosmkach jelita dochodzi do rozkładu disacharydaz, co w konsekwencji powoduje biegunkę osmotyczną, jednocześnie rozwija się proces zapalny oraz spada produkcja IgA. Co więcej, mikrobiota ulega wyniszczeniu przy stosowaniu antybiotykoterapii [49].

Probiotyk jest dostarczany do narządu docelowego w niezmienionej formie, dzięki odporności na ekstremalne warunki, takie jak niskie pH, enzymy żołądkowe czy sole żółciowe. Części drożdżaków udaje się przetrwać, a po dostaniu się do jelita wykazują trzy główne mechanizmy działania: działanie w świetle jelita, działanie troficzne oraz działanie przeciwzapalne na błonę śluzową [3, 49] (Tabela I).

5.1. Działanie w świetle jelita

W świetle jelita *S. boulardii* wykazuje aktywność przeciwko drobnoustrojom poprzez inhibicję wzrostu bakterii i pasożytów, redukcję translokacji tych patogenów, neutralizację czynników zjadliwości bakterii oraz uniemożliwianie przylegania do komórek gospodarza. *S. boulardii* przylączy się do szczepów bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium i *S. enterica*

subsp. *enterica* ser. Typhi, nie pozwalając im na adhezję do ściany jelita i inwazję tkanek gospodarza. Jak się okazuje, te enteropatogenne drobnoustroje same wykazują podatność wobec *S. boulardii*: szczep enteropatogeny *E. coli* (EPEC) wiąże się bezpośrednio do powierzchni drożdżaka zamiast do enterocytów, podobnie jak *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium wykazująca chemotaksję wobec *S. boulardii*. Ponadto, *S. boulardii* wywiera wpływ hamujący na wzrost niektórych gatunków, takich jak gatunki *Aeromonas* produkujące hemolizynę (np. *Aeromonas hydrophila*), *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* czy *Candida albicans*. Dodatkowo, drożdżak wspomaga zachowanie fizjologii enterocytów, między innymi poprzez zachowywanie międzykomórkowych połączeń szczelinowych, uniemożliwiających wniknięcie patogenów do wnętrza komórek oraz wytwarzanie gęstej warstwy wydzieliny ochronnej [2, 5, 8, 37, 41, 48, 49, 51, 58, 69, 71, 72]. Międzykomórkowe połączenia szczelinowe mogą być utrzymane dzięki ciągłej ekspresji E-kadheryny na powierzchni komórek. Wchłonięta w procesie endocytozy E-kadheryna jest skutecznie ponownie przekazywana na powierzchnię enterocytów, co odnawia połączenia szczelinowe i wzmacnia barierę jelitową [70]. Gęsty śluz natomiast umożliwia *S. boulardii* wzrost i budowanie ochronnych, przeplatanych warstw, utrudniających patogenom dotarcie do warstwy śluzowej jelita [51].

Oprócz bezpośredniego działania bójczego *S. boulardii* skutecznie zwalcza toksyny bezpośrednio je proteolizując, stymulując produkcję przeciwciał przeciwko nim oraz blokując miejsca receptorowe dla toksyn. Przykładami są inaktywacja toksyny cholery, defosforylacja LPS *E. coli* oraz wydzielanie proteaz działających antagonizacyjnie wobec toksyn A i B *C. difficile* [49, 51, 58]. Co więcej, *S. boulardii* neutralizuje toksynę A dzięki inaktywacji szlaków ERK1/2 i JNK/SAPK oraz intensyfikację produkcji specyficznej wobec tej toksyny IgA [56]. W infekcjach związanych z *Shigella flexneri* drożdżak ten uszczelnia barierę jelitową, zapobiega procesom zapalnym poprzez zmniejszenie stężenia ERK, IL-8 oraz zapobieganie aktywacji NF-κB i migracji

Tabela I
Mechanizmy działania *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Działanie <i>S. boulardii</i>		
w świetle jelita	troficzne	przeciwzapalne na błonę śluzową
<ul style="list-style-type: none"> – działanie przeciw toksynom drobnoustrojów – działanie bezpośrednio przeciw drobnoustrojom – wpływ na florę jelitową – aktywność metaboliczna (zwiększenie ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych) 	<ul style="list-style-type: none"> – wpływ na aktywność enzymatyczną (poliaminy) – regulacja ekspresji receptorów serotoninowych – wzmaganie odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększanie stężenia IgA 	<ul style="list-style-type: none"> – działanie na sygnały komórkowe i zmniejszenie syntezy cytokin prozapalnych

leukocytów. Jednocześnie nie zmniejsza populacji *Shigella* [58]. Udowodniono też, że *S. boulardii* zwiększa ilość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w jelicie, których liczba podczas procesu zapalnego jest ograniczona. W efekcie dochodzi do zmiany składu kału oraz przyspieszenia odbudowy naturalnej mikrobioty jelita [41, 48, 49, 51].

5.2. Działanie troficzne

W przebiegu doustnego przyjmowania *S. boulardii* nie dochodzi do morfologicznej przebudowy jelita; brak jest różnic w wysokości kosmków, głębokości krypt jelitowych, czy infiltracji komórkowej błony właściwej [10]. Dochodzi natomiast do wydzielania sperminy i spermidyny, czyli poliamin, które wspomagają proces proliferacji, różnicowania oraz dojrzewania enterocytów. To one prowadzą do wzrostu wydzielania enzymów mikroskopów jelitowych, takich jak sacharaza, aminopeptydaza i trehalaza oraz wzmożonej sekrecji IgA w jelicie czczym i krętym, zwiększonej produkcji receptorów dla polimerycznych immunoglobulin na komórkach krypt jelitowych i znaczącego wzrostu stężenia kotransportera glukozy zależnego od sodu (SGLT-1) (stymulowane zwiększonym wchłanianiem D-glukozy przez pęcherzyki rąbka szczoteczkowego) [9–11, 19, 41, 49, 51]. Oprócz egzogenego działania, poliaminy te biorą też udział w regulacji czynników transkrypcyjnych i ekspresji genów. Spermina i spermidyna dzięki swoim ładunkom polikationowym łączą się bezpośrednio z jonami DNA o ujemnym ładunku (PO_4^-) i umożliwiają formację potrójnej struktury DNA i regulację czynników transkrypcyjnych dla czynników wzrostu [10].

Probiotyk *S. boulardii* wpływa także na ekspresję receptorów serotoninowych (SERT) na nabłonku komórek jelitowych. SERT, czyli transbłonowe białka transportowe, przenoszą do wnętrza komórki nadmiar 5-hydroksytryptaminy (serotoniny, 5-HT), która odpowiedzialna jest za regulację motoryki jelit. Drożdżak, poprzez swój wpływ na SERT, zmniejsza perystaltykę jelit i ilość wypróżnień [31].

Działanie troficzne polega także na zmniejszeniu stanu zapalnego błony śluzowej jelita, przywróceniu równowagi osmotycznej (poprzez zmniejszoną aktywację cykazy adenylanowej, zmniejszenie produkcji cAMP i następowy spadek sekrecji jonów chlorkowych) oraz stymulacji produkcji białka i energii [5, 19, 41, 49, 51]. Szczep *S. boulardii* zmniejsza ilość zainfekowanych komórek, zapobiega apoptozie i syntezie TNF- α , a stymuluje wydzielanie czynników mitogennych, które umożliwią odnowienie warstwy komórek jelita. Dodatkowo, dochodzi do zwiększenia wydzielania enzymów i glikoprotein warstwy szczoteczkowej, a także powstrzymania hiperplazji krypt [41].

5.3 Działanie przeciwzapalne na błonę śluzową

Gatunek *S. boulardii* reguluje procesy immunologiczne, zarówno w świetle jelita, jak i w całym organizmie, działając jako inhibitor procesów prozapalnych oraz stymulator odpowiedzi immunologicznej (aktywacja dopełniacza oraz migracja monocytów i granulocytów) [8,49,68]. Komórki drożdżowe są źródłem $\beta(1,3)$ D-glukanu, które mają zdolność do pobudzania układu immunologicznego – glukany przyłączają się do specyficznego receptora na komórkach dendrytycznych (dektyna-1), a także do receptorów na komórkach wrodzonego układu immunologicznego (receptory Toll podobne, receptor 3 dopełniacza) [51]. W badaniach na myszach, *S. boulardii* zwiększa liczbę komórek Kupffera (makrofagi wątrobowe) oraz stężenie immunoglobuliny M (IgM) w surowicy, co podnosi efektywność fagocytozy bakterii. Może podwyższać stężenie wydzielniczej immunoglobuliny A (IgA), a także G (IgG) przeciwko toksynom A i B *C. difficile*. Co więcej, zmniejsza stan zapalny poprzez uwięzienie limfocytów T pomocniczych produkujących interferon γ w węzłach chłonnych krezkowych. Dzięki temu ogranicza limfocytarny naciek zapalny i produkcję cytokin prozapalnych w jelitach [21, 49, 64, 68, 71]. Dochodzi też do stymulacji regulatorowych limfocytów T (ekspresja transformującego czynnika wzrostu beta TGF- β , który redukuje proces zapalny) i modyfikacji adherencji limfocytów do komórek endotelialnych, czyli usprawnienia toczenia się komórek i adhezji [41, 66]. Drożdżak *S. boulardii* jest odpowiedzialny za wysokie stężenia kostymulujących cząsteczek CD80 i CD86, które są charakterystyczne dla dojrzałych komórek dendrytycznych (DC). DC są natomiast odpowiedzialne za produkcję cytokin, takich jak IL-12, IL-6, TNF- α czy IL-10 [68].

Chen i wsp. w 2006 roku opublikowali pracę, która dowodzi, że *S. boulardii* wzmacnia produkcję drobnocząsteczkowych rozpuszczalnych czynników, które blokują aktywację NF- κ B i kinaz ERK1/2 oraz MAP odpowiedzialnych za ekspresję genów IL-8 w komórkach nabłonkowych jelita i monocytach. Spadek tej prozapalnej interleukiny (IL-8) umożliwia kontrolę procesu zapalnego. Abbas i wsp. w 2014 roku przeprowadzili badanie mające na celu zbadanie ilości interleukin prozapalnych w jelicie i krwi pacjentów po leczeniu IBS za pomocą *S. boulardii*. U chorych tych po 6-tygodniowym leczeniu znacznie spadło stężenie cytokin prozapalnych IL-8 i TNF- α zarówno we krwi jak i nabłonku jelita, a także wzrosło stężenie przeciwzapalnych IL-10 [1, 8, 14, 49]. Dodatkowo można zaobserwować spadek stężenia tlenku azotu (NO) i inhibicję produkcji indukwalnych syntaz NO (NOS) (NO, odpowiedzialne za większą przepuszczalność naczyń i uszkodzenia tkanek, jest podwyższone w stanach zapalnych jelit) [41, 50, 67].

Najnowsze techniki, szacujące ilość szczepów bakteryjnych w jelicie człowieka na 40 000, wykazują, że po antybiotykoterapii mikrobiota odnawia się w przeciągu 6–8 tygodni. Gatunek *S. boulardii* przyspiesza to odnawianie, a u zdrowego człowieka nie wykazano jego interakcji z innymi, naturalnie występującymi szczepami bakterii. Dodatkowo wywiera pozytywny wpływ na odnowę naturalnego mikrobiomu, gdyż tworzy on odpowiednie warunki do jej rozwoju, między innymi poprzez działanie ochronne na warstwę śluzową jelita [49, 51]. Może też wykazywać właściwości antykancerogenne [56]. Sugeruje się jednak, aby nie używać probiotyków zawierających *S. boulardii* u chorych z ciężką immunosupresją bądź neutropenią [46].

6. Taksonomia

Wśród organizmów probiotycznych wyróżniamy bakterie oraz drożdże. Mikroorganizmy bakteryjne charakteryzują się budową prokariotyczną w przeciwieństwie do drożdży, które przynależą do jądrowców inaczej nazywanych eukariotami. Drożdże to organizmy należące do królestwa grzybów (*Fungi*), w systematyce klasyfikowane jako typ – workowce (*Ascomycota*), klasa – drożdżaki (*Saccharomycetes*), rząd – drożdżakowce (*Saccharomycetales*), rodzina – drożdżakowate (*Saccharomycetaceae*) [18, 35, 49].

Probiotyki drożdżowe ze względu na swoją przynależność do eukariotów różnią się od, należących do prokariotów, probiotyków bakteryjnych pod względem struktury fizjologicznej (np. rodzaj materiału genetycznego, obecność organeli komórkowych takich jak m.in. aparat Golgiego czy mitochondria) oraz większym rozmiarem komórki. Ponadto, antybiotyki nie wywierają na nie wpływu, a drożdże nie nabywają genów oporności na antybiotyki [18, 49].

Z biegiem czasu przynależność taksonomiczna *S. boulardii* była poddawana dyskusjom czy ze względu na swoje podobieństwo gatunek ten nie powinien zostać uznany za odmianę *S. cerevisiae*. Pierwsze badania, które zostały przeprowadzone przy pomocy PCR wykazały brak możliwości odróżnienia *S. boulardii* od innych szczepów *S. cerevisiae*, jednakże dzięki zastosowaniu nowocześniejszych metod (np. analizy polimorfizmu mikrosatelit) w kolejnych próbach dowiedziono, że *S. boulardii* wyróżnia się pod względem fizjologicznym, metabolicznym (wyższa optymalna temperatura wzrostu, a także większa odporność na kwasowy zakres pH w porównaniu do *S. cerevisiae*), a także poprzez swoje działanie antypatogenowe [49]. Obecnie według Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Botanicznej *S. boulardii* powinno się nazywać *S. cerevisiae* var. *boulardii*, chociaż zaznacza się, że mała możliwość krzyżowania się z innymi odmianami

najprawdopodobniej w toku ewolucji doprowadzi do powstania odrębnego gatunku [36].

7. Probiotyki

Słowo „probiotyki” wywodzi się z języka greckiego i oznacza „dla życia”, a więc zgodnie z tym założeniem preparaty probiotyczne powinny korzystnie wpływać na zdrowie gospodarza. Ponad 100 lat temu uważał tak laureat nagrody Nobla – Ilja Miecznikow, który twierdził, że suplementacja pałeczkami kwasu mlekowego może wydłużyć czas życia człowieka [38, 60, 62]. Pierwszy raz termin „probiotyki” został użyty w 1953 roku przez Kollath’a w opisie suplementów pochodzenia zarówno organicznego jak i nieorganicznego, które uważano, że poprawiają stan zdrowia pacjentów w stanie niedożywienia. Na przestrzeni lat definicja probiotyków ulegała systematycznym zmianom. Obecnie stosowana definicja probiotyków została zaproponowana przez Roya Fuller’a, który opisuje je jako „żywe mikroorganizmy wpływające korzystnie na organizm gospodarza poprzez poprawę równowagi w obrębie mikrobioty jelitowej [30].

Mikroorganizmy wchodzące w skład mikrobioty, mimo faktu, że nie posiadają pewnych cech, warunkujących inwazyjność, charakterystycznych dla drobnoustrojów chorobotwórczych zachowują w pewnym stopniu zdolność do przenikania przez barierę tworzoną przez nabłonek jelit i tym samym wykazują zdolność do wywoływania odpowiedzi immunologicznej w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego. W zdecydowanej większości przypadków dochodzi do wytworzenia tolerancji immunologicznej i w konsekwencji braku odpowiedzi odpornościowej przeciwko antygenowi ze strony organizmu gospodarza. W niektórych przypadkach np. u osób chorujących na nieswoiste zapalenia jelit dochodzi do zachwiania równowagi między mikrobiomem gospodarza, a jego układem odpornościowym, co skutkuje stymulacją odpowiedzi immunologicznej przez mikroorganizmy obecne w przewodzie pokarmowym, co w konsekwencji prowadzi do powstania stanu zapalnego i rozwinięcia się choroby. Do zmian w zakresie składu mikrośrodowiska jelitowego dochodzi często w okresach chorobowych, działania silnego stresu czy leczenia antybiotykiem. W efekcie dochodzi do zaburzenia stanu równowagi i przesunięcia jej na korzyść drobnoustrojów chorobotwórczych co może objawiać się np. utratą apetytu czy biegunką. Celem działania probiotyków jest zmniejszenie lub eliminacja procesu zapalnego w wyniku wprowadzenia do środowiska jelitowego mikroorganizmów, które mają za zadanie przywrócenie stanu równowagi [7, 32].

Stosowanie probiotyków staje się coraz bardziej popularne, zarówno w Europie, jak i Stanach Zjednoczonych. Najczęściej stosowanymi probiotykami są

Lactobacillus spp., *Bifidobacterium* spp. oraz niechorobotwórcze drożdże takie jak *Saccharomyces boulardii*. Ich stosowanie jest zalecane przede wszystkim w celu wzmocnienia odporności oraz jako forma leczenia wspomagającego m.in. w chorobach jelit o podłożu zapalnym oraz IBS (wywierają wpływ na funkcjonowanie jelit poprzez zmianę składu mikrobioty jelitowej) [45, 49, 60, 63, 74].

Wśród mechanizmów poprzez które probiotyki wywierają swoje korzystne działanie na organizm gospodarza wymienia się: wytwarzanie ochronnej bariery mechanicznej, poprawa procesów trawienia i wchłaniania pewnych substancji odżywczych (np. poprzez uwalnianie enzymów działających korzystnie na przebieg trawienia), wchodzenie w interakcje metaboliczne (np. synteza witamin, obniżanie stężenia cholesterolu np. poprzez rozprzęganie kwasów żółciowych do produktów których cholesterol stanowi materiał prekursorowy), konkurencja o składniki odżywcze z organizmami patogennymi, wzmacnianie bariery śluzowej jelit (np. poprzez działanie na receptory TLR (ang. toll-like receptor), znajdujące się na komórkach nabłonkowych, co indukuje wytwarzanie cytokin o działaniu ochronnym (np. IL-6, KC-1) pośredniczących w regeneracji komórek nabłonkowych), regulacja odpowiedzi zapalnej w jelitach (m.in. poprzez wpływ na sekrecję cytokin prozapalnych (np. działanie hamujące wobec TNF) i regulatorowych (np. indukcja produkcji IL-10 i TGF- β), wpływ na komórki limfoidalne (probiotyki prawdopodobnie działają stymulująco na limfocyty T regulatorowe, które wywierają hamujący wpływ na komórki efektorowe odpowiedzialne za powstawanie stanu zapalnego), produkcja bakteriocyny (cząsteczka chemiczna odpowiadająca za bezpośrednie działanie hamujące wobec konkurencyjnych drobnoustrojów), zmniejszenie przepuszczalności jelit czy działanie przeciwdrobnoustrojowe poprzez obniżanie pH w świetle jelita bądź hamowanie adhezji komórek bakteryjnych do nabłonka jelitowego [7, 20, 32, 33, 54, 60, 74].

Warunkiem skuteczności działania probiotyku jest spełnienie 5 kryteriów: musi mieć udowodniony korzystny wpływ na organizm gospodarza, nie może wywierać działania patogennego, zawarte w nim mikroorganizmy muszą być zdolne do przeżycia (np. odporność na kwas żołądkowy), reprodukcji i wykazywania aktywności metabolicznej wewnątrz jelit, powinien zawierać odpowiednio wysoką ilość mikroorganizmów w jednostce objętości, a także zachowywać swoje działanie podczas przechowywania i stosowania [16, 20, 45, 57, 63].

Przy wyborze odpowiedniego leczenia probiotycznego należy mieć na uwadze specyfikę danej choroby, efektywność probiotyku w danym zaburzeniu oraz skład preparatu. Właściwości probiotyków zależą zarówno od rodzaju, gatunku, jak i szczepu danego drobnoustroju.

Skuteczność różnych szczepów mikroorganizmów i ich właściwości probiotyczne mogą się znacząco różnić pomimo przynależności do tego samego rodzaju i gatunku, zatem wybór odpowiedniego drobnoustroju w danej jednostce chorobowej ma istotne znaczenie dla skuteczności wprowadzonego leczenia [20, 38, 49].

Preparaty probiotyczne dostępne są w różnej postaci: kapsułek zawierających kolonie mikroorganizmów, w supernatantach, a także wchodzą w skład wielu powszechnie dostępnych białkowych produktów spożywczych takich jak m.in. jogurty, sery, kefir czy lody. Uważa się, że produkty nabiałowe stanowią idealny nośnik do wprowadzenia mikroorganizmów probiotycznych do mikrobioty jelita. Ze względu na pewne ograniczenia produktów nabiałowych (np. konieczność utrzymywania niskiej temperatury oraz obecność alergenów) wykorzystuje się również nośniki nienabiałowe takie jak warzywa czy owoce, za wykorzystaniem których przemawia obecność witamin, minerałów i błonnika. Probiotyki dostępne na rynku mogą zawierać wyłącznie jeden wybrany szczep, ale mogą stanowić również mieszankę kilku różnych szczepów. Ze względu na wysoki profil bezpieczeństwa i stosunkowo niski koszt stosowania, probiotyki stanowią wartą rozważenia opcję terapeutyczną w chorobach takich jak np. zespół jelita drażliwego [6, 16, 34, 49, 57, 73].

W 2011 roku Choi, C.H. i wsp. opublikowali wyniki analizy, która dotyczyła efektów stosowania *S. boulardii* w zespole jelita drażliwego z dominującą biegunką (IBS-D) oraz w typie mieszanym zespołu jelita drażliwego (IBS-M). Badaniem objęto 67 pacjentów, którzy zostali losowo przydzieleni do dwóch grup. Pierwszej grupie przez okres 4 tygodni podawano *S. boulardii*, natomiast druga grupa otrzymywała placebo. Wyniki analizy wykazały, że w przypadku pacjentów otrzymujących *S. boulardii* ogólna poprawa jakości życia była większa niż w przypadku placebo, ale nie doszło do istotnej poprawy pod względem częstości wypróżnień czy konsystencji stolca [15].

W roku 2013 M. Bafutto i wsp. opublikowali pracę, której celem było porównanie wpływu monoterapii mesalazyną, mesalazyny w skojarzeniu z *S. boulardii* oraz monoterapii *S. boulardii* na objawy występujące w przypadku zespołu jelita drażliwego z dominującą biegunką (IBS-D). 53 pacjentów zostało przydzielonych do 3 różnych grup. W pierwszej grupie znalazło się 20 pacjentów, którym podawano mesalazynę w dawce 800 mg przez okres 30 dni, druga grupa objęła 21 osób, które otrzymywały mesalazynę w dawce 800 mg i *S. boulardii* w dawce 200 mg, a w trzeciej grupie znalazło się 12 pacjentów, którym podawano jedynie *S. boulardii* w dawce 200 mg. Wyniki badania wykazały, że w obrębie wszystkich grup po 30 dniach stosowanego leczenia doszło do istotnej poprawy pod względem występujących objawów. Ponadto rezultaty

badania pokazały, że stosowanie mesalazyny w monoterapii lub w skojarzeniu z *S. boulardii* daje lepsze wyniki niż w przypadku monoterapii *S. boulardii* [5].

Z. Abbas i wsp. w 2014 roku opublikowali wyniki badania, którego głównym tematem była ocena skuteczności probiotyku *S. boulardii* u pacjentów cierpiących z powodu zespołu jelita drażliwego z dominującą biegunką (IBS-D). Badanie zostało przeprowadzone metodą randomizowaną z podwójnie ślepą próbą kontrolowaną placebo. Analizą objęto 72 pacjentów przydzielonych do 2 grup. Pierwsza grupa obejmowała 37 pacjentów, którzy otrzymywali *S. boulardii* w dawce 750 mg/dziennie razem z nasionami babki płesznik przez okres 6 tygodni. W drugiej grupie znalazło się 35 pacjentów, którzy przez 6 tygodni otrzymywali placebo i nasiona babki płesznik. Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że w przypadku grupy pacjentów przyjmującej *S. boulardii* w krwi i w tkankach doszło do zauważalnego obniżenia poziomu cytokin prozapalnych (IL-8 oraz TNF- α) oraz podwyższenia poziomu działającej przeciwzapalnie IL-10. W grupie pacjentów otrzymującej placebo nie zauważono pod tym względem istotnych zmian. W przypadku obu grup pacjentów doszło do złagodzenia objawów jelitowych, jednakże poprawa jakości życia była bardziej znacząca w przypadku grupy otrzymującej *S. boulardii* [1].

W roku 2015 de Chambrun, G.P. i wsp. opublikowali wyniki analizy, której głównym celem była ocena wpływu *S. cerevisiae* na objawy występujące w zespole jelita drażliwego. 179 pacjentów zostało losowo przydzielonych do 2 grup. Pierwsza grupa otrzymywała *S. cerevisiae* w dawce 500 mg dziennie przez okres 3 tygodni, a druga grupa otrzymywała w tym czasie placebo. Wyniki badania wykazały, że w przypadku grupy pacjentów otrzymującej *S. cerevisiae* doszło do bardziej istotnej poprawy pod względem złagodzenia objawów takich jak uczucie dyskomfortu lub bólu brzucha w porównaniu do grupy otrzymującej placebo. W przypadku innych objawów nie doszło do zauważalnej poprawy [22].

W 2018 roku Kerry i wsp. opublikowali pracę, w której wśród wniosków podkreślili istotną rolę probiotyków w praktyce klinicznej ze względu na pozytywne wyniki ich stosowania w wielu chorobach i zaburzeniach, wśród których wymieniono m.in. IBS, alergie pokarmowe oraz biegunkę wywołaną przez rotawirusy. Co więcej w świecie naukowym zauważono w ostatnich latach duży postęp i zainteresowanie w temacie wpływu substancji probiotycznych na zapobieganie oraz leczenie otyłości, cukrzycy i chorób nowotworowych [42].

W roku 2019 Oak i wsp. opublikowali pracę przeglądową, której tematem były efekty stosowania probiotyków u osób z nietolerancją laktozy. W publikacji uwzględniono 15 badań randomizowanych przeprowadzonych z podwójnie ślepą próbą. Ocenie podlegało

8 wyselekcjonowanych organizmów probiotycznych o udowodnionym najkorzystniejszym działaniu na organizm człowieka – m.in. *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *S. boulardii*. Wyniki badania wykazały ogólny pozytywny wpływ stosowania probiotyków w nietolerancji laktozy, niemniej jednak wyniki różniły się w zależności od zastosowanego szczepu. Spośród ocenianych mikroorganizmów *B. animalis* należał do wykazujących najwyższą skuteczność działania [55].

Również w 2019 roku Astó i wsp. opublikowali metaanalizę, której celem była m.in. ocena skuteczności probiotyków we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Analizą 1491 pacjentów pochodzących z 18 badań kontrolowanych placebo lub aktywnym leczeniem. Metaanaliza wykazała, że stosowanie probiotyków we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego ma działanie korzystne w indukowaniu remisji, niemniej jednak wyniki pozostają w zależności od zastosowanej do oceny skali – najkorzystniejsze wyniki zaobserwowano w przypadku skal UCDAI (ang. *Ulcerative Colitis Disease Activity Index*) oraz DAI (ang. *Disease Activity Index*). Co więcej, skład zastosowanych probiotyków odgrywał zauważalną rolę w procesie terapeutycznym – produkty zawierające *Bifidobacterium* wykazywały najkorzystniejsze dla pacjenta działanie [4].

Na przestrzeni lat kolejne badania zdają się potwierdzać korzystny wpływ wynikający ze stosowania probiotyków. Wśród potencjalnych korzyści najczęściej wymienia się: poprawa w zakresie stanu zdrowia przewodu pokarmowego, zmniejszenie prawdopodobieństwa rozwoju choroby nowotworowej czy obniżenie stężenia cholesterolu (m.in. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*). Różnokierunkowość działania probiotyków zależy od ich składu i zawartości różnych szczepów działających poprzez różnorakie mechanizmy. Skuteczność probiotyków w zakresie działania przeciwbiegunkowego, w zapobieganiu biegunki poantybiotykowej oraz poprawy trawienia pokarmów bogatych w laktozę u osób z nietolerancją laktozy udokumentowana jest wieloma badaniami co być może stanowi jeden z ważnych powodów wysokiej popularności probiotyków. Mimo to wciąż wiele z opisywanych potencjalnych korzystnych efektów stosowania probiotyków wymaga dodatkowych badań mogących potwierdzić lub wykluczyć ich pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka [32, 33, 40].

8. Podsumowanie

Zespół jelita drażliwego z racji częstego występowania określanego na około 10% populacji oraz braku ustalonego schematu leczenia, gwarantującego powrót chorego do zdrowia stanowi istotny problem dla lekarzy. Dodatkową trudnością są występujące często objawy

psychiatryczne u chorych na IBS. Podawanie probiotyków, mimo iż nie powoduje całkowitego wyleczenia, łagodzi objawy oraz poprawia komfort życia. Wysoką skutecznością charakteryzują się preparaty *Saccharomyces boulardii*, co potwierdza wiele badań oraz meta-analiz. Terapia tym drożdżakiem, po dokładnym poznaniu jego działania molekularnego oraz immunologicznego na zmienione chorobowo jelita może w przyszłości okazać się bardzo skutecznym sposobem leczenia zespołu jelita drażliwego, przynosząc jeszcze lepsze rezultaty.

Piśmiennictwo

1. Abbas Z., Yakoob J., Jafri W., Ahmad Z., Azam Z., Usman M.W., Shamim S., Islam M.: Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 630–639 (2014)
2. Agbaje M., Begum R.H., Oyekunle M.A., Ojo O.E., Adenubi O.T.: Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *F. Microbiol.* **56**, 497–503 (2011)
3. Arslan S., Erbas M., Tontul I., Topuz A.: Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT-Food Sci Technol.* **63**, 685–690 (2015)
4. Astó E., Méndez I., Audivert S., Farran-Codina A., Espadaler J.: The Efficacy of probiotics, prebiotic inulin-type fructans, and synbiotics in human ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, **11**, 293 (2019)
5. Bafutto M., Almeida J.R.D., Leite N.V., Costa M.B.G., Oliveira E.C.D., Resende-Filho J.: Treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with mesalazine and/or *Saccharomyces boulardii*. *Arq Gastroenterol.* **50**, 304–309 (2013)
6. Barbara G., Cremon C., Azpiroz F.: Probiotics in irritable bowel syndrome: Where are we? *Neurogastroenterol.* **30**, e13513 (2018)
7. Boirivant M., Strober W.: The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol.* **23**, 679–692 (2007)
8. Brun P., Scarpa M., Marchiori C., Sarasin G., Caputi V., Porzionato A., Giron M.C., Palù G., Castagliuolo I.: *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supplementation reduces gastrointestinal dysfunction in an animal model of IBS. *PLoS One*, **12**, e0181863 (2017)
9. Buts J.P.: Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 15–18 (2009)
10. Buts J.P., De Keyser N.: Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig. Dis. Sci.* **51**, 1485–1492 (2006)
11. Buts J.P., De Keyser N.: Transduction pathways regulating the trophic effects of *Saccharomyces boulardii* in rat intestinal mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* **45**, 175–185 (2010)
12. Canavan C., West J., Card T.: The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clin. Epidemiol.* **6**, 71 (2014)
13. Carter D., Beer-Gabel M., Tzur D., Levy G., Derazne E., Novis B., Afek A.: Predictive factors for the diagnosis of irritable bowel syndrome in a large cohort of 440,822 young adults. *J. Clin. Gastroenterol.* **49**, 300–305 (2015)
14. Chen X., Kokkotou E.G., Mustafa N., Bhaskar K.R., Sougioultzis S., O'Brien M., Pothoulakis C., Kelly C.P.: *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J. Biol. Chem.* **281**, 24449–24454 (2006)
15. Choi C.H., Jo S.Y., Park H.J., Chang S.K., Byeon J.S., Myung S.J.: A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *Saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: effect on quality of life. *J. Clin. Gastroenterol.* **45**, 679–683 (2011)
16. Ciorba M.A.: A gastroenterologist's guide to probiotics. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 960–968 (2012)
17. Cotesta D., Caliumi C., Alò P., Petramala L., Reale M.G., Masciangelo R., Signore A., Cianci R., D'Erasmo E., Letizia C.: High plasma levels of human chromogranin A and adrenomedullin in patients with pheochromocytoma. *Tumori*, **91**, 53–58 (2005)
18. Czerucka D., Piche T., Rampal P.: Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **26**, 767–778 (2007)
19. Czerucka D., Rampal P.: Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP-and Ca²⁺-dependent Cl⁻secretion in T84 cells. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 2359–2368 (1999)
20. Dai C., Zheng C.Q., Jiang M., Ma X.Y., Jiang L.J.: Probiotics and irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* **19**, 5973 (2013)
21. Dalmasso G., Cottrez F., Imbert V., Lagadec P., Peyron J.F., Rampal P., Czerucka D., Groux H.: *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*, **131**, 1812–1825 (2006)
22. de Chambrun G.P., Neut C., Chau A., Cazaubiel M., Pelerin F., Justen P., Desreumaux P.: A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig. Liver Dis.* **47**, 119–124 (2015)
23. Dogan B., Una S.: Kruis scoring system and Manning's criteria in diagnosis of irritable bowel syndrome: is it better to use combined? *Acta Gastro-Emerologica Belgica*, 59 (1996)
24. Drossman D.A.: Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. *Gastroenterology*, **150**, 1262–1279 (2016)
25. Drouault-Holowacz S., Bieuvelet S., Burckel A., Cazaubiel M., Dray X., Marteau P.: A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroen. Clin. Biol.* **32**, 147–152 (2008)
26. Du L.P., Hao R.X., Xiao D.G., Guo L.L., Gai W.D.: Research on the Characteristics and Culture Conditions of *Saccharomyces boulardii*. *Adv. Mater. Res.* **343**, 594–598 (2012)
27. Elhasi T., Blomberg A.: Integrins in disguise-mechanosensors in *Saccharomyces cerevisiae* as functional integrin analogues. *Microb. Cell*, **6**, 335 (2019)
28. El-Salhy M., Seim I., Chopin L., Gundersen D., Hatlebakk J.G., Hausken T.: Irritable bowel syndrome: the role of gut neuroendocrine peptides. *Front. Biosci.* **4**, 2783–2800 (2012)
29. Fond G., Loundou A., Hamdani N., Boukouaci W., Dargel A., Oliveira J., Roger M., Tamouza R., Leboyer M., Boyer L.: Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **264**, 651–660 (2014)
30. Gogineni V.K., Morrow L.E., Gregory P.J., Malesker M.A.: Probiotics: history and evolution. *J. Anc. Dis. Prev. Rem.* DOI: 10.4172/2329-8731.1000107 (2013)
31. Gu Y., Zhou G., Liu X., Wang B., Cao H.: 105-*Saccharomyces Boulardii*, a Yeast Probiotic, Regulates Serotonin Transporter in the Intestine. *Gastroenterology*, **156**, 26 (2019)
32. Hemaiswarya S., Raja R., Ravikumar R., Carvalho I.S.: Mechanism of action of probiotics. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **56**, 113–119 (2013)
33. Homayouni A., Payahoo L., Azizi A.: Effects of probiotics on lipid profile: A review. *Am. J. Food Technol.* **7**, 251–265 (2012)
34. Hoveyda N., Heneghan C., Mahtani K.R., Perera R., Roberts N., Glaszio P.: A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* **9**, 15 (2009)

35. Index Fungorum: *Saccharomyces*, <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=4813> (05.02.2020)
36. Intech Open: Probiotics, <http://dx.doi.org/10.5772/3444> (05.02.2020)
37. Janda J.M., Abbott S. L.: The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 35–73 (2010)
38. Jiménez M.B.: Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **101**, 553–564 (2009)
39. Karantanos T., Markoutsaki T., Gazouli M., Anagnou N.P., Karamanolis D.G.: Current insights in to the pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome. *Gut Pathog.* **2**, 3 (2010)
40. Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M.: Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr.* **2013**, DOI:10.5402/2013/481651 (2013)
41. Kelesidis T., Pothoulakis C.: Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **5**, 111–125 (2012)
42. Kerry R.G., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H. S., Das G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**, 927–939 (2018)
43. Krosgaard L.R., Engsbro A.L., Jones M.P., Bytzer P.: The epidemiology of irritable bowel syndrome: Symptom development over a 3-year period in Denmark. A prospective, population-based cohort study. *Neurogastroenterol. Motil.* **29**, (2017)
44. Kruis W., Thieme C.H., Weinzierl M., Schuessler P., Holl J., Paulus W.: A diagnostic score for the irritable bowel syndrome. Its value in the exclusion of organic disease. *Gastroenterology*, **87**, 1–7 (1984)
45. Lee B.J., Bak Y.T.: Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **17**, 252 (2011)
46. Leventogiannis K., Gkolfakis P., Spithakis G., Tsatali A., Pistiki A., Sioulas A., Giamarellos-Bourboulis E.J., Triantafyllou K.: Effect of a preparation of four probiotics on symptoms of patients with irritable bowel syndrome: association with intestinal bacterial overgrowth. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **11**, 627–634 (2019)
47. Manning A.P., Thompson W.G., Heaton K.W., Morris A.F.: Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br. Med. J.* **2**, 653–654 (1978)
48. McFarland L.V.: Common organisms and probiotics: *Saccharomyces boulardii*. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, Academic Press, 145–164 (2017)
49. McFarland L.V.: Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* **16**, 2202 (2010)
50. Méabed E.M., Abdelhafez D.N., Abdelaliem Y.F.: *Saccharomyces boulardii* inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase genes in the colonic mucosa of rats experimentally-infected with *Blastocystis* subtype-3 cysts. *Parasitology*, DOI:10.1017/S0031182019000696 (2019)
51. More M.I., Swidsinski A.: *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis – a review. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **8**, 237 (2015)
52. Mulak A., Smereka A., Paradowski L.: Nowości i modyfikacje w Kryteriach Rzymskich IV. *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy*, **8** (2016)
53. Nikou G.C., Lygidakis N.J., Toubanakis C., Pavlatos S., Tseleni-Balafouta S., Giannatou E., Mallas E., Safioleas M.: Current diagnosis and treatment of gastrointestinal carcinoids in a series of 101 patients: the significance of serum chromogranin-A, somatostatin receptor scintigraphy and somatostatin analogues. *Hepato-Gastroenterology*, **52**, 731–741 (2005)
54. Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C.: Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 300–310 (2008)
55. Oak S.J., Jha R.: The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 1675–1683 (2019)
56. Oelschlaeger T.A.: Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62 (2010)
57. Parkes G.C., Sanderson J.D., Whelan K.: Treating irritable bowel syndrome with probiotics: the evidence. *Proc. Nutr. Soc.* **69**, 187–194 (2010)
58. Pothoulakis C.: Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol. Ther.* **30**, 826–833 (2009)
59. Qin H.Y., Cheng C.W., Tang X.D., Bian Z.X.: Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* **20**, 14126 (2014)
60. Quigley E.M.: Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol. Res.* **61**, 213–218 (2010)
61. Rima H., Steve L., Ismail F.: Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* **3**, 421 (2012)
62. Ringel Y., Quigley E.M., Lin H.C.: Using probiotics in gastrointestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **1**, 34, (2012)
63. Ringel Y., Ringel-Kulka T.: The rationale and clinical effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **45**, 145–148 (2011)
64. Rodrigues A.C.P., Cara D.C., Fretez S.H.G.G., Cunha F.Q., Vieira E.C., Nicoli J.R., Vieira L.Q.: *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 404–414 (2000)
65. Schmulson M.J., Drossman D.A.: What is new in Rome IV. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **23**, 151 (2017)
66. Sherman P.M., Ossa J.C., Johnson-Henry K.: Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr. Clin. Pract.* **24**, 10–14 (2009)
67. Soyuturk M., Saygili S.M., Baskin H., Sagol O., Yilmaz O., Saygili F., Akpinar H.: Effectiveness of *Saccharomyces boulardii* in a rat model of colitis. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6452 (2012)
68. Stier H., Bischoff S.C.: Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **9**, 269 (2016)
69. Szajewska H., Skorka A., Dylag M.: Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol. Ther.* **25**, 257–264 (2007)
70. Terciolo C., Andre F. i wsp.: *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 restores intestinal barrier integrity by regulation of E-cadherin recycling. *J. Crohns Colitis*, **11**, 999–1010 (2017)
71. Terciolo C., Dapoigny M., Andre F.: Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **12**, 67 (2019)
72. Tiago F.D.C.P., Martins F.D.S., Souza E.L.S., Pimenta P.F.P., Araújo H.R.C., Castro I.D.M., Brandão R.L., Nicoli J.R.: Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1194–1207 (2012)
73. Whelan K.: Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **14**, 581–587 (2011)
74. Whelan K., Quigley E.M.: Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 184–189 (2013)
75. Wu J.T., Erickson A.J., Tsao K.C., Wu T.L., Sun C.F.: Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages. *Ann. Clin. Lab Sci.* **30**, 175–178 (2000)

ANTYBIOTYKI I BAKTERIE: MECHANIZMY DZIAŁANIA I STRATEGIE OPORNOŚCI

Magdalena Skarżyńska*, Magdalena Zając, Dariusz Wasyl

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Polska

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Oporność bakterii na substancje przeciwbakteryjne jest jednym z najistotniejszych problemów epidemiologicznych notowanych w skali globalnej. Powszechne stosowanie w medycynie i weterynarii substancji przeciwbakteryjnych należących do tych samych klas, niejednokrotnie bez potwierdzenia w laboratorium skuteczności zastosowanej substancji czynnej, przyczynia się do selekcji opornych bakterii u ludzi i zwierząt oraz ich rozprzestrzenienia w przyrodzie. Narastająca antybiotykooporność bakterii patogennych prowadzi do poważnych konsekwencji zarówno dla zdrowia ludzi jak i zwierząt. Równie ważna jest oporność bakterii komensalnych, gdyż stanowią one rezerwuar i wektor genów oporności w środowisku. Ekspozycja na środki przeciwbakteryjne należące do różnych klas może prowadzić do oporności krzyżowej i selekcji genów rozprzestrzeniających się horyzontalnie z udziałem ruchomych elementów genetycznych. Alarmujący jest fakt pojawienia się przenoszonej z udziałem plazmidów oporności na substancje o najwyższym poziomie istotności dla medycyny ludzkiej np. karbapenemy czy polimyksyny. Na przykładzie antybiotyków zaliczanych do kategorii „krytycznie istotnych” możliwe jest omówienie niemal wszystkich sposobów działania substancji przeciwbakteryjnych oraz bakteryjnych mechanizmów antybiotykooporności. Do efektywnej walki z rosnącą antybiotykoopornością bakterii niezbędna jest znajomość mechanizmów oporności oraz sposobów ich nabywania przez bakterie. Celem artykułu jest przegląd sposobów w jaki substancje krytycznie istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego działają na komórki bakteryjne oraz przedstawienie złożonych mechanizmów, które odpowiadają za oporność na te substancje oraz genów warunkujących pojawienie się oporności.

1. Wprowadzenie. 2. Substancje przeciwbakteryjne powodujące utratę integralności ściany komórkowej: β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego. 2.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 2.2. Mechanizmy oporności. 3. Substancje przeciwbakteryjne wpływające na błony komórek bakteryjnych: polimyksyny i lipopeptydy. 3.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 3.2. Mechanizmy oporności. 4. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę kwasów nukleinowych: chinolony i ansamycyny. 4.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 4.2. Mechanizmy oporności. 5. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę białek: makrolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny, oksazolidynony. 5.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 5.2. Mechanizmy oporności. 6. Podsumowanie

ANTIBIOTICS AND BACTERIA: MECHANISMS OF ACTION AND RESISTANCE STRATEGIES

Abstract: The resistance of bacteria to antimicrobial substances is one of the most serious epidemiological problems present on a global scale. The widespread use of same classes of antimicrobials in human and veterinary medicine, often without laboratory confirmation of the efficacy of active compounds used, contributes to the selection of resistant bacteria in humans and animals, and their spread in nature. The increasing resistance of pathogenic bacteria leads to serious consequences for both human and animal health. However, the resistance of commensal bacteria is equally important as they constitute a reservoir and vector of resistance determinants in the environment. Exposure to antimicrobials belonging to different classes can lead to cross-resistance and the selection of genes that may spread horizontally on mobile genetic elements. The emergence of plasmid-encoded resistance to critically important antibiotics for human medicine e.g. carbapenems or polymyxins is alarming. On the example of antibiotics classified as critically important for human medicine, it is possible to discuss almost all bacterial mechanisms of antimicrobial resistance. For effective combat against the growing antibiotic resistance of bacteria, it is necessary to know the mechanisms of resistance and the methods of their acquisition by bacteria. The aim of the paper is to review the ways that critically important antimicrobials act on bacterial cells and present complex mechanisms that are responsible for resistance to these substances as well as genes conferring for resistance.

1. Introduction. 2. Antimicrobials that cause loss of cell wall integrity: β -lactams, glycopeptides and phosphonic acid derivatives. 2.1. Mechanisms of antimicrobial action. 2.2. Mechanisms of resistance. 3. Antimicrobials affecting the cell membrane: polymyxins and lipopeptides. 3.1. Mechanisms of antimicrobial action. 3.2. Mechanisms of resistance. 4. Antimicrobial substances that inhibit the synthesis of nucleic acids: quinolones and ansamycins. 4.1. Mechanisms of antimicrobial action. 4.2. Mechanisms of resistance. 5. Antimicrobial substances inhibiting protein synthesis: macrolides, ketolides, aminoglycosides, glycyclines, oxazolidinones. 5.1. Mechanisms of antimicrobial action. 5.2. Mechanisms of resistance. 6. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki, geny oporności, mechanizmy oporności, oporność na antybiotyki
Key words: antibiotics, resistance genes, resistance mechanisms, antimicrobial resistance

* Autor korespondencyjny: mgr Magdalena Skarżyńska, Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: magdalena.skarzynska@piwet.pulawy.pl

1. Wprowadzenie

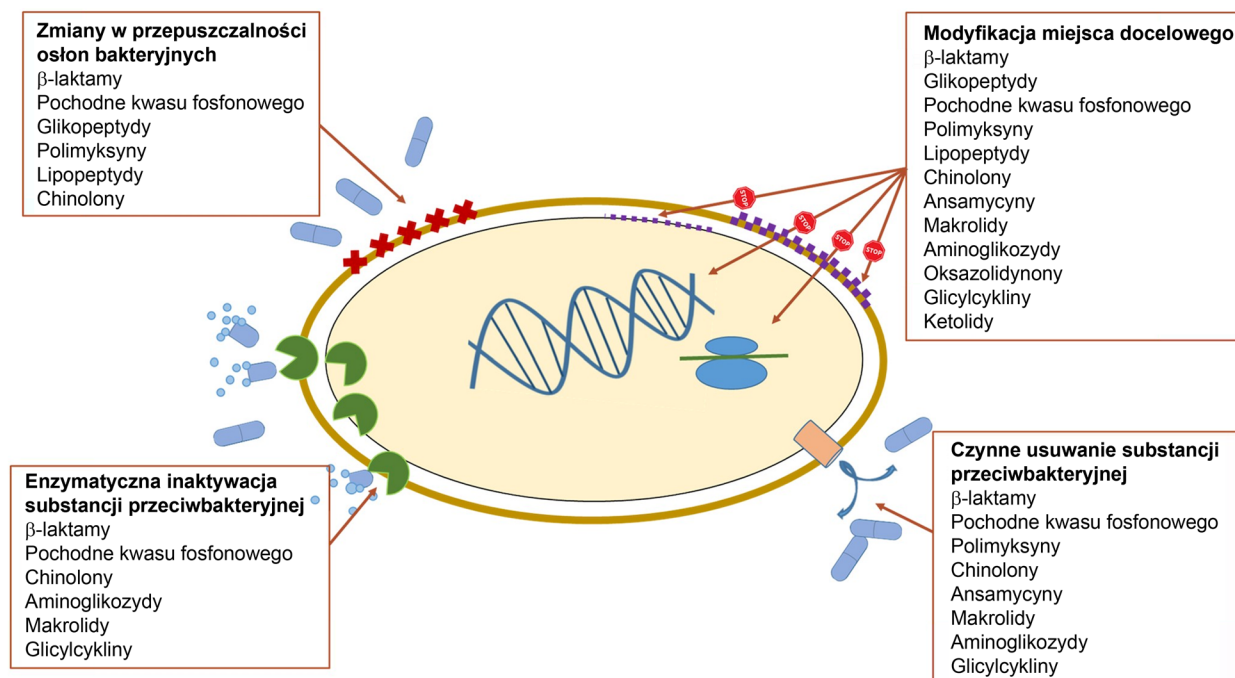
Oporność bakterii na substancje przeciwbakteryjne jest jednym z najistotniejszych problemów epidemiologicznych notowanych w skali globalnej. Każdego roku jest ona przyczyną nawet 700 000 zgonów na świecie [74]. Na podstawie danych z 2015 roku oszacowano, że niepowodzenia w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie są powodem 33 000 przypadków śmiertelnych na terenie Unii Europejskiej (UE) i Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EOG) (European Economic Area, EEA) [19]. Straty ekonomiczne związane z tego typu infekcjami w UE opiewają na 1,5 miliarda Euro, natomiast związane z nimi koszty hospitalizacji w samych Stanach Zjednoczonych wynoszą w ciągu roku 20 miliardów USD [22, 33].

Istnieją niezaprzeczalne dowody potwierdzające negatywne konsekwencje powszechnego stosowania substancji przeciwbakteryjnych w medycynie, rolnictwie i weterynarii, które przyczynia się do selekcji opornych bakterii oraz ich rozprzestrzenienia i utrzymywania w środowisku. Występowanie determinant oporności i łatwość ich transmisji między bakteriami w konsekwencji prowadzi do ograniczenia możliwości terapeutycznych wielu zakażeń bakteryjnych. Szczególnie istotna jest oporność patogenów powodujących infekcje o wysokim wskaźniku śmiertelności jak np. *Klebsiella (K.) pneumoniae*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa* czy *Acinetobacter (A.) baumannii* [82, 106]. Warto podkreślić znaczenie bakterii komensalnych w szere-

niu oporności na substancje przeciwbakteryjne. Nie tylko są one rezerwuarem i wektorem mechanizmów oporności, ale same mogą również stanowić zagrożenie np. dla osób z obniżoną odpornością.

Substancje przeciwbakteryjne mogą działać bakteriostatycznie lub bakteriobójczo. W zależności od klasy, do której należą powodują zaburzenia integralności ściany lub błony komórkowej, zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych, białek lub zakłócają szlaki metaboliczne. Bakterie wykształciły liczne mechanizmy, dzięki którym stają się odporne na substancje przeciwbakteryjne. Polegają one na modyfikacjach miejsca działania leku, zmianach w przepuszczalności osłon komórkowych, aktywnym wypompowywaniu cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej, wytwarzaniu specyficznych enzymów zdolnych do „unieszkodliwienia” antybiotyku lub zmianie szlaków metabolicznych, na które wpływa dana substancja czynna [95]. Mechanizmy te przedstawiono schematycznie w ryc. 1.

Współcześnie, jednym z największych wyzwań w koncepcji „Jedno Zdrowie” jest zachowanie skuteczności działania substancji przeciwbakteryjnych. Problem dotyczy zwłaszcza tych substancji, które są ważne w ochronie zdrowia człowieka. Celem promocji racjonalnego stosowania antybiotyków, Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization, WHO) wprowadziła hierarchizację wszystkich stosowanych w lecznictwie klas substancji przeciwbakteryjnych. Opracowana na podstawie ściśle określonych kryteriów klasyfikacja dzieli substancje przeciwbak-



Ryc. 1. Schemat mechanizmów oporności na substancje przeciwbakteryjne krytycznie istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego (critically important antimicrobials). Bakteryjne mechanizmy oporności wraz z podanymi klasami substancji przeciwbakteryjnych, których dany mechanizm dotyczy.

teryjne na kategorie: „krytycznie istotne” (“critically important”), „bardzo istotne” (“highly important”), lub „istotne” (“important”). Substancje przeciwbakteryjne zaliczane do grupy „krytycznie istotne” stanowią jedyną lub jedną z niewielu dostępnych opcji w leczeniu zagrażających życiu zakażeń bakteryjnych ludzi. Ponadto mogą być stosowane w zwalczaniu infekcji wywołanych przez bakterie pochodzenia odzwierzęcego czy też środowiskowego. W kategorii „krytycznie istotne” wyodrębniono również grupę substancji przeciwbakteryjnych o najwyższej wadze z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego tzw. „highest priority”, obejmującą cefalosporyny od trzeciej do piątej generacji, glikopeptydy, chinolony, makrolidy, ketolidy oraz polimiksyny [106].

Znajomość mechanizmów oporności oraz sposobów ich nabywania przez bakterie jest niezwykle istotna w dobie rosnącej antybiotykooporności i powszechności występowania determinant oporności. Na przykładzie substancji zaliczanych do kategorii „krytycznie istotnych” możliwe jest omówienie niemal wszystkich sposobów działania substancji przeciwbakteryjnych oraz bakteryjnych mechanizmów oporności.

Celem pracy jest przegląd i przedstawienie sposobów w jaki substancje krytycznie istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego działają na komórki bakteryjne, złożonych mechanizmów, które odpowiadają za oporność na te substancje oraz genów warunkujących pojawienie się oporności.

2. Substancje przeciwbakteryjne powodujące utratę integralności ściany komórkowej: β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego

2.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego zaburzają integralność ściany komórkowej w różny sposób. β -laktamy stanowiące najliczniejszą grupę substancji stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych, a także glikopeptydy działają na białka wiążące penicylinę tzw. PBP (Penicillin Binding Proteins) o aktywności transglikozylaz i transpeptydaz. Białka te odpowiadają za polimeryzację łańcuchów cukrowych i tworzenie peptydowych połączeń między sąsiednimi łańcuchami mureiny w czasie syntezy bakteryjnej ściany komórkowej.

β -laktamy hamują funkcjonowanie D,D-transpeptydaz katalizujących końcowy etap syntezy bakteryjnego peptydoglikanu, polegający na formowaniu mostków peptydowych gwarantujących stabilność ściany komórkowej. Jako analogi strukturalne dwupeptydu D-alanylo-D-alaniny (D-Ala-D-Ala) będącego substratem

D,D-transpeptydaz, β -laktamy łączą się z transpeptydazami prowadząc do ich inaktywacji [31].

Glikopeptydy, w przeciwieństwie do antybiotyków β -laktamowych, nie działają bezpośrednio na enzym, a wiążą się z terminalną D-alanylo-D-alaniną prekursora peptydoglikanu, blokując tym samym etapy transglikozylacji i transpeptydacji [9].

Kolejną klasą substancji przeciwbakteryjnych wywołujących zaburzenia syntezy ściany komórkowej bakterii są pochodne kwasu fosfonowego, do których należy fosfomycyna [6, 34]. Antybiotyk ten łączy się nieodwracalnie z cysteiną, w miejscu aktywnym transferazy (MurA, UDP-N-acetyloglukozamino-enolopirogronotransferazy) katalizującej przyłączanie fosfoenolopirogronianu (PEP) do N-acetyloglukozamino-urydynodifosforanu (UDP-GlcNAc). Fosfomycyna działa jako analog strukturalny PEP zapobiegając powstawaniu kluczowego prekursora peptydoglikanu a tym samym hamuje początkowy etap syntezy bakteryjnej ściany komórkowej [35].

2.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Oporność bakterii może być wynikiem modyfikacji docelowego miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej. Jest to podstawowy mechanizm oporności na omawiane klasy substancji u bakterii Gram-dodatnich [36].

W przypadku β -laktamów na obniżenie wrażliwości wpływają modyfikacje białek PBP. Zmienione PBP zachowują zdolności katalityczne w obecności antybiotyku. Przykładem są L,D-transpeptydazy niewrażliwe na działanie większości antybiotyków β -laktamowych (z wyjątkiem karbapenemów). Wysoki udział tych białek występuje np. w ścianie komórkowej bakterii z rodzaju *Clostridium* spp. oraz *Mycobacterium* spp. Obecność tego typu enzymów potwierdzono również u izolatów *Escherichia* (*E.*) *coli* i *Enterococcus* (*E.*) *faecium* opornych na β -laktamy [31, 50].

Zmodyfikowane transpeptydazy notowane są również u gronkowców opornych na metycylinę, w tym u *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (meticillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Enzymy typu PBP 2a (zwane również PBP 2') mają niskie powinowactwo do antybiotyku, dzięki czemu pomimo jego obecności w środowisku bakterie są w stanie syntetyzować właściwie usieciowany peptydoglikan. Geny *mecA* oraz *mecC*, kodujące transpeptydazy PBP 2a, zlokalizowane są w obrębie chromosomalnych kaset genowych SCC_{mec} (staphylococcal cassette chromosome mec) i z ich udziałem mogą być przenoszone pomiędzy różnymi gatunkami gronkowców [44, 46]. Warto nadmienić, iż u *S. aureus* opisano również występowanie plazmidowego genu *mecB*.

Pierwotnie obecność *mecB* notowano u *Macrococcus caseolyticus* – składnika mikrobiomu skóry zwierząt [8]. Powyższe doniesienia wskazują na możliwość transferu kodowanej przez *mecB* oporności na β -laktamy pomiędzy różnymi rodzajami bakterii. Co więcej, u izolatów *M. caseolyticus* pochodzących od bydła i psów zidentyfikowano nowy gen *mecD*, odpowiadający za oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe [85].

Podobny mechanizm, będący wynikiem strukturalnej modyfikacji miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej a polegający na zmianie D-alanylo-D-alaniny na D-alanylo-D-mleczan (D-Ala-D-Lac) bądź D-alanylo-D-serynę (D-Ala-D-Ser) warunkuje oporność na glikopeptydy u *Enterococcus* spp. (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*, VRE) [9]. Za syntezę alternatywnych dwupeptydów odpowiadają operony *Van* np. *VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM* (D-Ala-D-Lac) oraz *VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanN* (D-Ala-D-Ser). Warto podkreślić, że operony *VanA*, *VanB*, *VanM* i *VanN* mogą być zlokalizowane na plazmidach i przy ich udziale przenosić się pomiędzy różnymi rodzajami bakterii, czego przykładem jest wyizolowany w 2002 roku, w USA szczep *S. aureus* (vancomycine resistant *S. aureus* VRSA) niosący *VanA* [9, 80].

Mutacje wpływające na zmiany miejsca wiązania enzymu z substancją przeciwbakteryjną mogą również obniżać wrażliwość na fosfomicynę. Wykazano, że bakterie naturalnie odporne na ten antybiotyk np. *Mycobacterium (M.) tuberculosis* posiadają zamiast cysteiny resztę kwasu asparaginowego w miejscu aktywnym enzymu MurA [49]. Dotychczas występowanie tego typu mutacji u izolatów klinicznych stwierdzano incydentalnie np. u *E. coli* [53, 92].

3. Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Kolejnym mechanizmem wpływającym na obniżenie wrażliwości na omawiane klasy substancji przeciwbakteryjnych jest zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych. Przykładem jest substratowo specyficzne białko porynowe u *P. aeruginosa*, kodowane przez gen *oprD*. Białko to pełni rolę kanału zapewniającego przepływ do komórki bakteryjnej niezbędnych aminokwasów i krótkich peptydów. Umożliwia ono również wnikanie do komórki karbapenemów. Mutacje, delecje, insercje skutkujące funkcjonalnymi zmianami bądź utratą aktywności białka OprD prowadzą do zmniejszenia wrażliwości na karbapenemy [61].

W przypadku fosfomicyny oporność tego typu może być rezultatem defektów funkcjonowania systemów transportu α -glicerofosforanu (GlpT) lub glukozo-6-fosforanu (UhpT), poprzez które antybiotyk trafia do wnętrza komórki bakteryjnej. Zmiany będące wynikiem mutacji w genach strukturalnych *uhpT*, *glpT* bądź regu-

latorowych np. *uhpA*, *uhpB*, *uhpC* tych systemów prowadzą do obniżenia wrażliwości na fosfomicynę [72]. Obecność mutacji dotyczących *uhpT* i/lub *glpT* wykazano u metycyliny-opornych szczepów *S. aureus* [37].

Opisano również zmniejszoną wrażliwość na wancomycynę szczepów *S. aureus* (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA), której przyczyną była pogrubiona i zmieniona strukturalnie ściana komórkowa stanowiąca mechaniczną barierę utrudniającą wnikanie leku do komórki. Wykazano, że kluczową rolę w syntezie tak zmodyfikowanej ściany komórkowej odgrywają mutacje w regionie *walkR* (znanym również jako *yycGF*, *vicKR*, *micAB*) zaangażowanym w kontrolę jej metabolizmu [48].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Systemy aktywnie wypompowujące cząsteczki z komórki (efflux pumps), mogą powodować obniżenie wrażliwości na szereg substancji przeciwbakteryjnych. Pompy umożliwiają bakteriom usuwanie z komórki rozmaitych szkodliwych związków. Spektrum ich działania obejmuje nie tylko substancje przeciwbakteryjne, ale również sole żółci, toksyny, detergenty, biocydy i in. Co ważne, jeden rodzaj pomp może być aktywny wobec wielu różnych substancji. Geny determinujące obecność pomp wypompowujących zazwyczaj kodowane są chromosomalnie.

Nadprodukcja systemów wypompowujących oraz ich synergistycznie działanie z innymi mechanizmami np. zmniejszoną przepuszczalnością osłon może wpływać na pojawienie się oporności na różne klasy substancji przeciwbakteryjnych. Podwyższenie syntezy pomp jest najczęściej efektem mutacji w genach regulujących ich działanie [60].

Obniżenie wrażliwości na β -laktamy w wyniku zwiększonej syntezy pomp typu AcrAB-TolC opisano np. u klinicznych izolatów *K. pneumoniae* [78]. Mechanizm czynnego usuwania β -laktamów, w tym karbapenemów z udziałem pomp MexAB-OprM notowano także u *P. aeruginosa*. Ponieważ spektrum substratowe systemów Mex obejmuje wiele różnych klas substancji przeciwbakteryjnych, ich podwyższona synteza może przyczyniać się do występowania wielooporności u *Pseudomonas*. Fosfomicyna nie stanowi substratu dla systemów typu Mex, natomiast dowiedziono, że może być usuwana z komórek bakteryjnych przy udziale pompy Tet38 [60, 94].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Powszechnym mechanizmem w jaki bakterie nabywają oporność na substancje przeciwbakteryjne jest zdolność do ich enzymatycznego rozkładu. Enzymy te w przypadku bakterii Gram-dodatnich wydzielane są

pozakomórkowo, bądź występują w przestrzeni periplazmatycznej bakterii Gram-ujemnych. Mechanizm ten jest najbardziej rozpowszechnionym spośród mechanizmów oporności na β -laktamy.

β -laktamazy, które odpowiadają za inaktywację tej klasy antybiotyków stanowią bardzo zróżnicowaną grupę enzymów, zarówno ze względu na ich budowę strukturalną, jak i profil substratowy (tj. aktywność wobec penicylin, cefalosporyn czy karbapenemów) [14, 95]

Enzymem o wąskim spektrum, który odpowiada za hydrolizę penicylin u bakterii Gram-dodatnich (np. gronkowców, enterokoków) jest β -laktamaza warunkowana obecnością genu bla_z . Gen bla_z może być zlokalizowany na chromosomie, niemniej jego obecność wykrywano również na plazmidach a nawet w materiale genetycznym fagów bakteryjnych [24]. Enzymy typu ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) o rozszerzonym spektrum substratowym są najbardziej rozpowszechnione wśród *Enterobacterales*. Enzymy te hydrolizują penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn) i monobaktamy. Obecnie często notowane są enzymy ESBL wykazujące aktywność wobec cefotaksymu CTX-M (cefotaximase-Munich), kodowane przez geny bla_{CTX-M} , które u *Enterobacterales* zazwyczaj zlokalizowane są na plazmidach [15]. Do enzymów ESBL zaliczają się także enzymy hydrolizujące karbapenemy: IMI (imipenem hydrolyzing beta-lactamase), NMC (non-metallo-carbapenemase) identyfikowane u *Enterobacter* spp., a także SME notowane u *Serratia marcescens* (*Serratia marcescens* enzyme) [54, 82]. Szeroko rozpowszechnione są należące do tej samej kategorii karbapenemazy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) kodowane przez geny bla_{KPC} zlokalizowane na plazmidach. Dotychczas zanotowano występowanie bla_{KPC} u wielu Gram-ujemnych pałeczek w tym *Enterobacter* spp. i *Salmonella* spp. [4, 82]. Do ESBL zaliczane są również liczne enzymy OXA (oxacillin-hydrolyzing) hydrolizujące karbapenemy. Występują one głównie u *Enterobacterales* i kodowane są przez plazmidowe geny bla_{OXA} [14, 54].

Kolejną grupę β -laktamaz stanowią cefalosporynazy typu AmpC, warunkujące oporność przede wszystkim na cefalosporyny (z wyjątkiem czwartej generacji), w tym cefamycyny. Spektrum ich aktywności obejmuje również penicyliny, monobaktamy oraz inhibitory β -laktamaz np. kwas klawulanowy. Najczęściej są to enzymy kodowane chromosomalnie, produkowane indukcyjnie. Ich występowanie opisano m.in. u *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. Mutacje w genie *ampD*, jednym z trzech genów regulatorowych odpowiadających za syntezę cefalosporynaz typu AmpC, mogą prowadzić do konstytutywnego wytwarzania tych enzymów np. u *P. aeruginosa* [51, 57]. Podobny skutek mają mutacje genu *ampR* stwierdzone u izolatów *Enterobacter*

cloacae [56]. Kodowane chromosomalnie cefalosporynazy typu AmpC występują również u *E. coli* oraz *Acinetobacter* spp. Nie powodują one oporności ze względu na niski poziom konstytutywnej ekspresji kodujących je genów. Również w tym przypadku mutacje genów regulatorowych mogą powodować podwyższenie ekspresji i wystąpienie oporności. Coraz częściej u *Enterobacterales* notowane są konstytutywne cefalosporynazy typu AmpC, kodowane przez geny bla_{CMY} zlokalizowane na plazmidach [7].

Metallo β -laktamazy (MBL), posiadające w centrum aktywnym cynk, odpowiadają za oporność na większość antybiotyków β -laktamowych, w tym karbapenemy. Geny kodujące te enzymy występują na chromosomie w formie kaset genowych u pałeczek niefermentujących *A. baumannii* czy *P. aeruginosa* [54]. U *Enterobacterales* przenoszone są na plazmidach. Przykładami genów kodujących enzymy MBL są geny bla_{IMP} ("active on imipenem") oraz bla_{VIM} (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) zidentyfikowane po raz pierwszy u *P. aeruginosa* oraz bla_{NDM} (New Delhi metallo-beta-lactamase) pochodzące od *A. baumannii*, a rozprzestrzeniające się wśród *Enterobacterales* [54].

Mechanizm enzymatycznej inaktywacji dotyczy również fosfomycyny. Dotychczas opisano występowanie metaloenzymów FosA, FosB, FosX katalizujących rozerwanie pierścienia epoksydowego fosfomycyny. Enzymy te kodowane są zarówno przez chromosomalne jak i przenoszone z udziałem plazmidów geny. Ich występowanie potwierdzono zarówno u bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) jak i Gram-dodatnich (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes*). Za enzymatyczną inaktywację fosfomycyny odpowiadają również kinazy FosC, FomA oraz FomB katalizujące fosforylację jej cząsteczek, a opisane u *Streptomyces* oraz *Pseudomonas syringae* wytwarzających fosfomycynę [20].

3. Substancje przeciwbakteryjne wpływające na błony komórek bakteryjnych: polimyksyny i lipopeptydy

3.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Aktywność bakteriobójcza polimyksyn i lipopeptydów jest zbliżona do działania związków powierzchniowo czynnych. Spektrum przeciwbakteryjne omawianych klas substancji determinuje ich działanie na określone błony komórek bakteryjnych. Lipopeptydy oddziałują na błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-dodatnich. Polimyksyny natomiast mają wpływ zarówno na błonę zewnętrzną jak i błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych.

Polimyksyny reagują elektrostatycznie z cząsteczkami lipopolisacharydu (LPS) oraz fosfolipidami

w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Dodatkowo naładowane reszty kwasu α , γ -diaminomasłowego polimyksyn wchodzi w interakcję z naładowanymi ujemnie grupami fosforanowymi lipidu A LPS. W efekcie dochodzi do wypierania dwudodatnich kationów wapnia i magnezu stabilizujących rozmieszczenie sąsiadujących cząsteczek LPS. Hydrofobowe łańcuchy tłuszczowe polimyksyn wnikają w błonę zewnętrzną, powodując jej strukturalną i funkcjonalną dezorganizację, ułatwiając tym samym wnikanie kolejnych cząsteczek antybiotyku. W rezultacie dochodzi również do utraty integralności błony cytoplazmatycznej, zaburzenia równowagi osmotycznej i śmierci komórki bakteryjnej [43].

Aktywność należącej do antybiotyków lipopeptydowych daptomycyny jest wynikiem złożonego mechanizmu, którego początkowy etap stanowi depolaryzacja błony cytoplazmatycznej w procesie zależnym od jonów wapnia. Wapń wpływa na zmiany konformacyjne daptomycyny, prowadząc do powstawania miceli, które wnikają w błonę. Jony Ca^{2+} ułatwiają ten proces wiążąc się z ujemnie naładowanymi grupami lipidu błonowego – fosfatydyloglicerolu (PG) [68, 89]. Po wniknięciu w membranę następuje agregacja cząsteczek daptomycyny i tworzenie porów transbłonowych, powodujących utratę potasu z komórki. Rezultatem są zmiany zawartości lipidów błonowych, zakłócenie procesów związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz zaburzenie syntezy składników ściany komórkowej. Dochodzi również do zatrzymania syntezy kwasów nukleinowych, białek a ostatecznie zahamowania podziału i śmierci komórki [89, 93].

3.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Najczęstszą przyczyną oporności na omawiane klasy substancji przeciwbakteryjnych są zmiany ładunku bakteryjnych osłon komórkowych, których skutkiem jest zmniejszenie powinowactwa substancji do miejsca działania. W przypadku polimyksyn do zmniejszenia wrażliwości prowadzą modyfikacje lipidu A np. poprzez przyłączenie dodatkowo naładowanych cząsteczek 4-amino-4-deoksy-L-arabinozy (L-Ara4N) bądź fosfoetanolaminy (pEtN). Większość bakterii wykazujących naturalną oporność na polimyksyny np. *Proteus* spp., posiada LPS, który zawiera cząsteczki L-Ara4N. Oporność nabyta, występująca między innymi u *Salmonella enterica*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, wiąże się z modyfikacją, za którą odpowiadają dwuskładnikowe systemy regulatorowe PmrA/PmrB i PhoP/PhoQ. Systemy te kontrolują i aktywują reakcje komórki bakteryjnej na czynniki zewnętrzne np. jony Mg^{2+} czy obecność antybiotyku oraz regulują kaskadę reakcji prowadzących do modyfikacji lipidu A [76].

Aktywacja dwuskładnikowych systemów może być również wynikiem mutacji prowadzących do konstytutywnej ekspresji kodujących je genów. Potwierdzono szereg mutacji genów kodujących białka omawianych systemów np. u *Salmonella* spp., *A. baumannii* (*pmrA*, *pmrB*), *K. pneumoniae* czy *E. coli* (*phoP*, *phoQ*) oraz genów regulujących ich funkcjonowanie np. *mgrB* u *Klebsiella* spp. [28, 76]. Kodowana chromosomalnie oporność na polimyksyny, w tym kolistynę ogranicza się do klonalnego pojawiania się opornych szczepów. W 2015 roku po raz pierwszy opisano występowanie plazmidowego genu *mcr-1* kodującego transferazę fosfoetanolaminy katalizującą przyłączenie pEtN do lipidu A u *E. coli*. Zakrojone na szeroką skalę badania wykazały, iż szczepy posiadające gen *mcr-1* izolowane są nie tylko od zwierząt ale również ze środowiska, z żywności jak i od ludzi [28, 87]. Występowanie genu *mcr-1* potwierdzono dotychczas u *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. oraz *Enterobacter* spp. a nawet u izolatów *E. coli* pochodzących z 1980 roku [65, 87]. Wkrótce po odkryciu *mcr-1* zidentyfikowano kolejne geny oporności na kolistynę przenoszone z udziałem plazmidów: *mcr-2* – *mcr-9* [1, 10, 17, 18, 107, 110, 111]. Kolistyna jest lekiem ostatniej szansy w przypadku zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie wykazujące oporność również na karbapenemy. Warto nadmienić, iż pojawiły się już doniesienia o szczepach *K. pneumoniae* izolowanych zarówno od ludzi jak i zwierząt, u których opisano równoczesne występowanie genu *mcr-8* oraz *bla_{NDM}* [99].

Oporność izolatów klinicznych na daptomycynę notowana jest incydentalnie, a jej przyczyną mogą być zmiany ładunku membran powodowane zmniejszeniem ilości zawartego w nich fosfatydyloglicerolu [68]. Różnice w składzie lipidowym błony bakterii tłumaczą spektrum bójczej aktywności daptomycyny. Błony komórkowe bakterii Gram-dodatnich zawierają znaczne ilości fosfatydyloglicerolu (u *S. aureus* stanowi on 58%) natomiast u bakterii Gram-ujemnych większość składu lipidowego błony stanowi dodatnio naładowana fosfatydyloetanolamina (około 80% u *E. coli*). Zmniejszenie ujemnego ładunku błon może być skutkiem mutacji w genach odpowiedzialnych za syntezę fosfolipidów błonowych. Mutacje genu *pgsA* kodującego enzym syntazę fosfatydyloglicerolu, prowadzące do zmniejszenia ilości PG w membranach stwierdzono dotychczas np. u opornych na daptomycynę izolatów *Bacillus subtilis* i *S. aureus*.

Obniżoną wrażliwość powoduje również wzrost zawartości błonowej kardiolipiny związany z mutacjami genu *cls*. Tego typu mutacje opisano u *S. aureus* i *E. faecalis* [68]. Sugeruje się, iż kardiolipina zapobiega tworzeniu przez cząsteczki daptomycyny porów transbłonowych [114].

U *S. aureus* wykazano także zmniejszoną wrażliwość na daptomycynę, której przyczyną były mutacje genu

kodującego dwufunkcyjny enzym MprF (multiple peptide resistance factor). Enzym ten modyfikuje PG powodując zmianę ładunku jego cząsteczki, dodatkowo ponieważ posiada aktywność flipazy, przenosi tak zmodyfikowany PG do warstwy zewnętrznej membrany [68].

Oporność może być także konsekwencją całkowitej utraty docelowego miejsca działania substancji czynnej. Znakomitym przykładem są odporne na kolistynę izolaty *A. baumannii*, u których mutacje w obrębie genów *lpxA*, *lpxC*, i *lpxD* odpowiadających za początkowe etapy biosyntezy lipidu A, doprowadziły do całkowitej utraty LPS [71, 76].

Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Kolejnym przykładem mechanizmu oporności na polimyksyny i lipopeptydy jest tworzenie bariery osłaniającej komórkę bakteryjną przed antybiotykiem. Wykazano zmniejszoną wrażliwość na polimyksyny u izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających otoczki polisacharydowe. Naładowane ujemnie polisacharydy, wiążąc cząsteczki polimyksyn, ograniczają interakcję substancji przeciwbakteryjnej z miejscem docelowym. Mniejsza liczba cząsteczek antybiotyku docierająca do powierzchni komórki bakteryjnej przyczynia się do osłabienia skuteczności jego działania [76].

Oporność na daptomycynę może wiązać się ze zmianami funkcjonowania systemów regulatorowych biorących udział w utrzymaniu homeostazy ściany komórkowej [93], a także ze zwiększeniem jej grubości [27]. Dowiedziono, że synteza zmodyfikowanej, pogrubionej ściany komórkowej, będąca wynikiem mutacji w regionie *walkR*, wspominanym już przy mechanizmach oporności na wankomycynę, prowadzi również do zmniejszenia wrażliwości na daptomycynę u *S. aureus* [48].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Nadprodukcja systemów wypompowujących także może przyczyniać się do obniżenia wrażliwości na polimyksyny. Przykładem mogą być pompy typu efflux zidentyfikowane u *K. pneumoniae*, czy *E. coli* kodowane przez operon *acrAB* oraz notowane u szczepów *P. aeruginosa* systemy MexAB-OprM [112].

4. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę kwasów nukleinowych: chinolony i ansamycyny

4.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Bakteryjne DNA oraz RNA stanowią cel działania chinolonów i ansamycyn. Chinolony wpływają na syntezę i zmiany struktury bakteryjnego DNA poprzez

działanie na enzymy bakteryjne: topoizomerazę typu II – gyrazę oraz topoizomerazę IV. Enzymy te odgrywają zasadniczą rolę w prawidłowym przebiegu procesów wymagających dostępu do informacji genetycznej zawartej w DNA m.in. replikacji [3, 23, 55]. Determinują one stopień skręcenia podwójnej helisy DNA. Topoizomerazy powodują powstanie tymczasowych pęknięć nici DNA, jednocześnie zabezpieczają je łącząc się odwracalnie z nowo powstałymi końcami DNA. Przecięcie umożliwia swobodny obrót wokół kolejnego wiązania heliksu DNA, prowadząc do zmniejszenia napięcia torsyjnych. Topoizomerazy katalizują również ponowne połączenie nici heliksu po rozpleceniu [3].

Chinolony łącząc się z kompleksem topoizomeraza-DNA, hamują zdolność enzymów do ligacji przeciętych nici kwasu nukleinowego. Konsekwencjami są zaburzenia replikacji, zahamowanie syntezy DNA a ostatecznie śmierć komórki bakteryjnej [5]. Gyraza jest preferowanym miejscem działania chinolonów u bakterii Gram-ujemnych, natomiast topoizomeraza IV u Gram-dodatnich [55]. U gatunków, które nie posiadają topoizomerazy IV np. *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori* czy *Treponema pallidum* gyraza stanowi jedyny cel działania chinolonów [47].

Ansamycyny, a wśród nich rifampicyna wykazują szeroki zakres aktywności biologicznych. Stanowią one grupę substancji przeciwbakteryjnych hamujących transkrypcję. Rifampicyna przyłącza się do podjednostki β polimerazy RNA. W obecności antybiotyku aktywność polimerazy RNA zostaje zablokowana, tym samym nie dochodzi do transkrypcji genów niezbędnych do funkcjonowania komórki, czego następstwem jest śmierć bakterii [12].

4.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja lub ograniczenie dostępności miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Częstą przyczyną oporności na chinolony są mutacje prowadzące do zmniejszenia powinowactwa substancji przeciwbakteryjnej, do miejsca docelowego. Są to mutacje w tzw. regionach determinujących oporność na chinolony QRDR (quinolone resistance determining region) co najmniej jednego z genów kodujących podjednostki topoizomerazy II (*gyrA*, *gyrB*) lub IV (*parC*, *parE*). Skutkiem mutacji są zmiany strukturalne enzymów, które uniemożliwiają przyłączenie substancji przeciwbakteryjnej [25]. Najczęściej identyfikowane są mutacje w podjednostkach GyrA i ParC topoizomeraz. Wysoki poziom oporności u niektórych izolatów bakteryjnych jest skutkiem występowania kilku mutacji, często dotyczących obydwu enzymów [25, 102].

Mutacje, których skutkiem jest oporność na rifampicynę zwykle dotyczą genu *rpoB* kodującego

podjednostkę β polimerazy RNA. Wpływają one na zmiany konformacji polimerazy i utratę powinowactwa do antybiotyku. Mutacje te dotyczą głównie rejonu determinującego oporność na rifampicynę tzw. RRDR (Rif-resistance determining region), a ich występowanie potwierdzono m.in. u opornych izolatów *M. tuberculosis* i *E. faecium* [32, 41]. Do mutacji może dochodzić nie tylko w obecności substancji przeciwbakteryjnej, ale również pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych. Pojawienie się mutacji genu *rpoB*, jako efektu stresu temperaturowego, opisano np. u *E. coli*. Ponieważ mutacje wpływały na adaptację do warunków stresowych ich obecność była korzystna dla bakterii [84].

Nieco inny mechanizm, ale również dotyczący działania substancji przeciwbakteryjnej w miejscu docelowym dotyczy chinolonów. Polega on na syntezie białek kodowanych przez geny *qnr*. Jest to jeden z mechanizmów oporności na chinolony przenoszonych plazmidowo (PMQR – plasmid-mediated quinolone resistance). Białka Qnr przyłączają się do topoizomeraz blokując możliwość ich połączenia z bakteryjnym DNA. Tym samym zmniejsza się liczba dostępnych kompleksów topoizomeraza-DNA stanowiących cel działania chinolonów [47]. Dotychczas opisano występowanie genów *qnrA* [67], *qnrB* [52], *qnrC* [98], *qnrD* [21], *qnrS* [45], *qnrVC* [108] oraz *qnrE1* [2].

Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Wzrost oporności na chinolony bywa skutkiem zmian przepuszczalności osłon komórkowych. Chinolony wnikają do wnętrza komórek bakteryjnych poprzez domeny lipidowe zarówno błony zewnętrznej jak i błony cytoplazmatycznej. W przypadku bakterii Gram-ujemnych transport przez błonę zewnętrzną odbywa się również z udziałem białek porynowych. Dyfuzja przez dwuwarstwę fosfolipidową jest bardziej wydajna w przypadku cząsteczek o większej hydrofobowości natomiast efektywność transportu drogą porynową jest większa dla cząsteczek hydrofilowych np. ciprofloksacyny, norfloksacyny [13, 25]. Zarówno zmiany organizacji błony komórkowej jak i zmniejszenie syntezy białek porynowych: OmpA, OmpF, OmpC, OmpD, LamB i Tsx (dotyczy tylko Gram-ujemnych), mogą prowadzić do wzrostu oporności na tę klasę substancji przeciwbakteryjnych [25].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Aktywne wypompowywanie chinolonów z komórki zwykle jest wynikiem mutacji w obrębie genów kodujących białka regulatorowe wpływające na funkcjonowanie pomp. Wiele tego typu pomp odpowiada za usuwanie chinolonów z komórek *Enterobacterales* np.

AcrAB-TolC u *E. coli* czy *Salmonella* spp. Jest to również najczęściej notowany mechanizm oporności na chinolony u *P. aeruginosa* (pompy MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM) [81]. Zidentyfikowano także pompy kodowane przez plazmidowe geny *qepA* i *oqxAB*. Ich występowanie opisano zarówno u bakterii komensalnych *E. coli* (*qepA*, *oqxAB*) [109] jak i patogennych *Salmonella* spp. i *K. pneumoniae* (*oqxAB*) [79, 105]. Aktywne wypompowywanie chinolonów z komórki stwierdzono również u bakterii Gram-dodatnich. Nadekspresja genów kodujących transportery NorA, NorB, NorC, MdeA u *S. aureus* [26], a także genu *pmrA* kodującego pompę u *Streptococcus pneumoniae*, skutkuje między innymi obniżeniem wrażliwości na omawianą klasę substancji przeciwbakteryjnych [40].

Mechanizm oporności z udziałem pomp aktywnie usuwających cząsteczki leku z komórki dotyczy także rifampicyny. Przykładem mogą być systemy Rv2937, Rv1258, Rv0783c, zidentyfikowane u prątków gruźlicy wykazujących obniżoną wrażliwość na rifampicynę [66].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Odnotowano również występujący u *Enterobacterales* mechanizm enzymatycznej inaktywacji chinolonów. Ten przenoszony z udziałem plazmidów mechanizm polega na modyfikacji antybiotyku i unieczynnieniu go z udziałem enzymu acetylotransferazy aminoglikozydowej, kodowanej przez gen *aac(6')-Ib-cr*. Spektrum aktywności enzymu obejmuje zarówno aminoglikozydy jak również fluorochinolony hydrofilowe: ciprofloksacynę i norfloksacynę [54].

5. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę białek: makrolidy, ketolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny, oksazolidynony

5.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Makrolidy, ketolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny i oksazolidynony hamują syntezę białek na różnych etapach. Makrolidy oraz wywodzące się od nich ketolidy np. telitromycyna działają w podobny sposób, reagując z podjednostką 50S rybosomów bakteryjnych, a dokładnie z rybosomalnym 23S rRNA. Makrolidy wiążą się z domeną V cząsteczki rRNA, ketolidy dodatkowo z domeną II 23S rRNA w pobliżu białek rybosomalnych L4 oraz L22. Substancje te blokują tzw. kanał wyjściowy, poprzez który powstające peptydy opuszczają rybosom. Tym samym dochodzi do zahamowania elongacji w wyniku przedwczesnej dysocjacji krótkich peptydylo-tRNA z rybosomu tuż po inicjacji translacji [38, 64]. Antybiotyki wymienionych klas mogą także

zmieniać allosterycznie właściwości centrum katalitycznego rybosomu prowadząc do zatrzymania translacji, bądź powodować zmianę ramki odczytu, czego skutkiem jest nieprawidłowa synteza białek [38, 88].

Linezolid należący do oksazolidynonów łączy się z rybosomalnym 23S rRNA podjednostki 50S w centrum peptydylotransferazy rybosomu (PTC). Doniesienia opisujące dokładny mechanizm działania linezolidu wymieniają zmiany konformacyjne PTC [103], blokadę właściwego przyłączania tRNA do rybosomu [63] i tworzenia wiązań peptydowych oraz hamowanie powstawania kompleksu inicjującego złożonego z podjednostki 30S rybosomu, fMet-tRNA, czynników inicjujących (IF2, IF3) i mRNA [11].

Glicylcykliny, a także aminoglikozydy wpływają na podjednostkę 30S rybosomu. Tigecyklina należąca do glicylcyklin, wiąże się odwracalnie z podjednostką 30S, hamując syntezę białka poprzez blokowanie wiązania aminoacylo-tRNA. Zapobiega tym samym włączaniu kolejnych aminokwasów do powstającego peptydu [42]. Aminoglikozydy hamują translację przyłączając się do rybosomalnego 16S rRNA podjednostki 30S. Różne antybiotyki tej klasy mogą wiązać się w nieco inny sposób z 16S RNA, niemniej skutkiem tego jest zahamowanie translokacji tRNA, zaburzenia rozpoznawania kodonów co sprzyja włączaniu niewłaściwych aminokwasów w powstający peptyd [39, 70].

Sugeruje się, że bójcze działanie aminoglikozydów w odróżnieniu od pozostałych substancji przeciwbakteryjnych hamujących syntezę białek, wynika z indukcji wytwarzania nieprawidłowych białek błonowych prowadzącej do upośledzenia transportu transbłonowego [39, 83].

5.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja lub ochrona miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Zmiany wpływające na zmniejszenie powinowactwa leku do miejsca jego działania stanowią częstą przyczynę oporności na wymienione antybiotyki. W przypadku makrolidów i linezolidu ten mechanizm oporności związany jest z mutacjami w obrębie domen 23S rRNA oraz mutacjami genów kodujących białka rybosomalne [63]. Tego typu mutacje stwierdzano np. u opornych na makrolidy szczepów *S. pneumoniae* oraz enterokoków i gronkowców opornych na linezolid [16, 38, 63]. Opisano także mutację dotyczącą białka rybosomalnego S10 podjednostki 30S rybosomu, warunkującą oporność na tigecyklinę u izolatów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy [96].

Szeroko rozpowszechnione są również enzymatyczne modyfikacje miejsca działania substancji czynnej prowadzące do oporności na omawiane klasy antybiotyków. Metylacja rybosomalnego 23S rRNA z udziałem

metylotransferaz kodowanych przez geny *erm* prowadzi do oporności na makrolidy. Dotychczas opisano kilkadziesiąt genów *erm* kodowanych chromosomalnie lub plazmidowo. Ich występowanie notowane jest zarówno u bakterii Gram-ujemnych np. *Salmonella* spp. jak i Gram-dodatnich np. *Staphylococcus*, *Streptococcus* [58, 95]. Ponieważ miejsce wiązania makrolidów z rybosomem nakłada się z miejscem wiązania linkozamidów i streptogramin B, obecność konstytutywnych genów *erm* warunkuje oporność również na te dwie klasy substancji [38, 58, 64]. Taki fenotyp oporności, określane jako MLS_B, jest często notowany u *Enterococcus* spp [69].

Ketolidy (np. telitromycyna) wiążą się silniej z podjednostką 50S rybosomu, dlatego często pozostają aktywne wobec szczepów, których oporność na makrolidy jest efektem ekspresji indukcyjnych genów *erm*. Niemniej stopień metylacji (dimetylacja) może determinować oporność także na tę klasę substancji przeciwbakteryjnych [104].

Modyfikacje rybosomalnego 23S rRNA z udziałem metylotransferazy kodowanej przez przenoszony plazmidowo gen *cfr* determinują oporność na linezolid. Wykazano, że obecność genu *cfr* oprócz oksazolidynonów warunkuje dodatkowo oporność na fenikole, linkozamidy, pleuromutyliny i streptograminy A. W odróżnieniu od enzymów kodowanych przez geny *erm*, metylacja będąca wynikiem ekspresji genu *cfr* nie powoduje oporności na makrolidy. Opisany fenotyp oporności (PhLOPS_A) stwierdzono np. u szczepów *S. aureus* i *E. coli* [62].

Przyczyną oporności na aminoglikozydy mogą być mutacje chromosomalne wpływające na zmiany konformacyjne miejsca wiązania antybiotyku jak i modyfikacja 16S rRNA z udziałem metylaz. Dotychczas opisano występowanie przenoszonych plazmidowo metylaz 16S rRNA, kodowanych przez geny *armA* i *rmtB* [39, 95].

Oporność na makrolidy warunkowana jest również obecnością białek kodowanych przez geny *msr* [95]. Do niedawna sugerowano, że działają one jako pompy, jednakże ostatnie doniesienia dowodzą, iż pełnią one raczej funkcję białek ochronnych. Białka te wiążąc się do rybosomu powodują odłączenie zakotwiczonego już antybiotyku [75, 86].

Do tej samej rodziny należy kodowane przez przenoszony plazmidowo gen *optrA* białko warunkujące oporność na oksazolidynony (linezolid, tedizolid) oraz fenikole (chloramfenikol, florfenikol). Występowanie genu *optrA* potwierdzono dotychczas u opornych izolatów *Enterococcus* [101]. Mechanizm działania OptrA wpływający na oporność nie jest do końca wyjaśniony. Postuluje się, że białko to chroni rybosom przed przyłączeniem antybiotyku [100].

Najlepiej poznanymi białkami ochronnymi są proteiny będące produktami genów *tet(M)* i *tet(O)*, które

determinują oporność na tetracykliny. Tetracykliny mają to samo miejsce działania co tigeocyklina. Wiążąc się z rybosomem białka Tet(M) i Tet(O) powodują zmianę jego konformacji i wypieranie zakotwiczonej tetracykliny [77]. Tigeocyklina jest niewrażliwa na działanie białek ochronnych ponieważ łączy się z podjednostką 30S przyjmując inną organizację przestrzenną niż tetracykliny. Tworzy ona przeszkodę uniemożliwiającą przyłączenie się białek ochronnych typu TetM i TetO [42, 77, 113].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Aktywne wypompowywanie substancji czynnej z komórki również prowadzi do zmniejszenia wrażliwości na omawiane substancje. Oporność na makrolidy może być wynikiem syntezy pomp kodowanych przez geny *mef* i stwierdzanych najliczniej u bakterii Gram-dodatnich w tym *Streptococcus*, *Staphylococcus*, a nawet beztlenowców z rodzaju *Clostridium* [95]. Oporność determinowana obecnością genów *mef* występuje także u bakterii Gram-ujemnych jak *Escherichia* czy *Pseudomonas* [38, 95].

Mechanizm aktywnego wypompowywania leku z komórki jest zwykle nieefektywny w odniesieniu do ketolidów gdyż kumulują się one w komórkach bakteryjnych znacznie szybciej niż makrolidy. Ponadto silniejsze wiązanie ze strukturami rybosomu oraz ich słabe działanie jako czynników indukujących oporność sprawia, że w większości przypadków ketolidy zachowują aktywność wobec szczepów niewrażliwych na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B [30, 59].

Podwyższona synteza pomp MexXY występujących u *Pseudomonas*, może przyczynić się do obniżenia skuteczności działania aminoglikozydów [60].

Oporność na glicylcykliny, w tym tigeocyklinę może być również związana z nadprodukcją systemów wypompowujących. Ich występowanie stwierdzono dotychczas u *A. baumannii* (AdeABC), *Proteus mirabilis*, (AcrAB) [91]. Tigeocyklina ma znacznie większe powinowactwo do rybosomu aniżeli tetracykliny i minocykliny posiadające to samo miejsce wiązania i prawdopodobnie z tego powodu jest aktywna wobec szczepów opornych na tetracykliny, posiadających pompy kodowane przez liczne geny *tet* np. *tet*(B), *tet*(C), *tet*(K) [73, 91, 113].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Modyfikacje cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej bądź ich rozkład z udziałem enzymów również prowadzi do oporności na omawiane klasy substancji czynnych.

Erazy kodowane przez plazmidowe geny *ere* powodują hydrolityczną inaktywację makrolidów o 14 bądź 15 atomowym rdzeniu laktonowym [38, 58].

W przypadku tych substancji przeciwbakteryjnych wymieniane są również modyfikacje przez fosfotransferazy, które prowadzą do zaburzenia interakcji ich cząsteczek z rybosomem. Geny *mph* kodujące fosfotransferazy makrolidowe zwykle zlokalizowane są w obrębie ruchomych elementów genetycznych, często w sąsiedztwie genów determinujących oporność na inne klasy substancji przeciwbakteryjnych. Enzymy te rozpowszechnione są u bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza należących do *Enterobacteriales*. Coraz więcej doniesień dotyczy pojawiania się wymienionych genów u bakterii Gram-dodatnich np. *Staphylococcus* [38, 58, 95].

Mechanizm oporności polegający na enzymatycznej modyfikacji dotyczy również tigeocykliny. Hydroksylacja z udziałem monoooksygenazy flawinowej kodowanej przez *tet*(X) powoduje inaktywację jej cząsteczek, jak również tetracyklin pierwszej i drugiej generacji [29, 91, 97]. Warto nadmienić, iż wykazano jednoczesne szerzenie się kodowanych plazmidowo genów *tet*(X4) i *mcr-1* u *E. coli* pochodzenia odzwierzęcego i środowiskowego [90].

Występowanie enzymów odpowiadających za acetylację, acetylację i fosforylację stanowi najważniejszy ze sposobów w jaki bakterie nabywają oporność na aminoglikozydy. Skutkiem ich aktywności jest zmniejszone powinowactwo cząsteczek antybiotyku do miejsca docelowego, czyli 16S rRNA. Enzymy odpowiedzialne za modyfikacje aminoglikozydów charakteryzują się różnym profilem substratowym. Geny determinujące ich występowanie najczęściej przenoszone są z udziałem mobilnych elementów genetycznych.

Aminoglikozydo N-acetylotransferazy (AAC) są wśród licznych enzymów tego typu notowane najczęściej, zwłaszcza u bakterii Gram-ujemnych. Enzymy te katalizują acetylację grup aminowych w cząsteczkach antybiotyków, a ze względu na różne miejsca modyfikacji klasyfikowane są jako AAC(1), AAC(2'), AAC(3) oraz AAC(6') [39, 83]. Najbardziej rozpowszechnione są acetylotransferazy klasy AAC(6'), których profil substratowy obejmuje wiele klinicznie ważnych aminoglikozydów m. in. gentamycynę [39, 83]. Występowanie genów kodujących enzymy AAC(6') opisano np. u *Escherichia* spp. (*aac*(6')-Ia, *aac*(6')-Im), *Salmonella* spp. (*aac*(6')-IIa, *aac*(6')-Iy), *Acinetobacter* spp. (*aac*(6')-Is) [95].

Kolejną grupę enzymów odpowiadającą za modyfikacje tej klasy substancji przeciwbakteryjnych stanowi fosfotransferazy APH (kinazy aminoglikozydowe). Podobnie jak acetylotransferazy podzielono je na klasy w zależności od miejsca ich działania: APH(2''), APH(3'), APH(3''), APH(4), APH(6), APH(7'') oraz APH(9) [95]. Większość fosfotransferaz aminoglikozydowych zaliczana jest do klasy APH(3'), a ich obecność warunkuje oporność m. in. na kanamycynę i neomycynę. Proteiny należące do grupy APH(2'') odgrywają znaczącą rolę w oporności bakterii Gram-dodatnich na

gentamycynę. Determinanty kodujące obecność enzymów APH wykryto np. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. (*aph(3'')-III*), ale też u *Salmonella* spp. (*aph(3'')-Ia*, *aph(6'')-Id*) [83, 95].

Ostatnią grupę enzymów mających znaczenie w epidemiologii oporności na aminoglikozydy stanowią nukleotydylotransferazy ANT (adenylotransferazy), które dzielone są na pięć klas. Enzymy ANT(2''), ANT(3'') częściej notowane są u Gram-ujemnych bakterii, natomiast ANT(4'), ANT(6), ANT(9) dominują u bakterii Gram-dodatnich [83, 95].

Zidentyfikowano także nieliczne enzymy dwufunkcyjne (tj. posiadające dwie różne domeny katalityczne) warunkujące oporność na aminoglikozydy. Dotychczas opisano np. enzym odpowiadający za adenylację i acetylację kodowany przez *ant(3'')-Ih/aac(6'')-IId* u *Serratia marcescens*. Zidentyfikowano również enzym powodujący acetylację i fosforylację warunkowany obecnością genu *aac(6'')-aph(2'')*, którego występowanie stwierdzono np. u *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. czy *Streptococcus* spp. [95].

6. Podsumowanie

Poznanie mechanizmów oporności na środki przeciwbakteryjne jest niezbędne do efektywnej walki z rosnącą antybiotykoopornością bakterii. Szereg aspektów wpływa na pojawianie się i rozprzestrzenianie tego zjawiska. Łatwość przenoszenia mechanizmów oporności w wyniku horyzontalnego transferu genów z udziałem ruchomych elementów genetycznych np. plazmidów, transpozonów, a nawet fagów bakteryjnych, wpływa na szerzenie oporności pomiędzy różnymi gatunkami i rodzajami bakterii, także niespokrewnionymi filogenetycznie. Ekspozycja na substancje przeciwbakteryjne należące do różnych klas może prowadzić do oporności krzyżowej i selekcji genów przenoszonych właśnie z udziałem ruchomych elementów genetycznych. Doskonały przykład stanowią omówione geny *cfr* i *optrA*.

Różnorodne czynniki działające na komórki bakteryjne mogą wpływać na pojawianie się oporności. Obecność pestycydów, metali ciężkich, detergentów, dezynfektantów przyczynia się do selekcji szczepów opornych. Stres środowiskowy, nawet przy nieobecności substancji przeciwbakteryjnej, sprzyja powstawaniu mutacji, które w efekcie mogą skutkować obniżeniem wrażliwości. Warto wspomnieć o zdolności bakterii do tworzenia biofilmów umożliwiających komórkom bakteryjnym przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiskowych, w tym również w obecności antybiotyków.

Obfitość rozmaitych mechanizmów oporności świadczy o ogromnych zdolnościach adaptacyjnych bakterii. Fakt wykrycia genu warunkującego oporność

na kolistynę (*mcr-1*) u izolatów *E. coli* z roku 1980, podczas gdy został on po raz pierwszy opisany pod koniec 2015 roku, nasuwa pytanie jak wielu występujących w przyrodzie mechanizmów oporności dotychczas jeszcze nie zidentyfikowano.

Mając na względzie złożoność i skalę zjawiska oporności, zachowanie skuteczności działania substancji przeciwbakteryjnych, zwłaszcza istotnych w aspekcie zdrowia publicznego, staje się poważnym wyzwaniem i priorytetem. Ranga problemu wymaga podjęcia kompleksowych działań obejmujących przede wszystkim propagowanie rozsądnego stosowania antybiotyków oraz ograniczenie nadużywania substancji przeciwbakteryjnych zarówno w rolnictwie, weterynarii jak i medycynie.

Piśmiennictwo

1. AbuOun M., Anjum M.F. i wsp.: *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 2904 (2018)
2. Albornoz E., Martino F., Tijet N., Corso A., Belder D.D., Gomez S., Melano R.G., Petroni A.: *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, 1:e02555–16 (2017)
3. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N.: Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, **53**, 1565–1574 (2014)
4. Arnold R.S., Thom K.A., Sharma S., Phillips M., Johnson J.K., Morgan D.J.: Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *South. Med. J.* **104**, 40–45 (2011)
5. Bambeke F.V., Michot J.-M., Eldere J.V., Tulkens P.M.: Quinolones in 2005: an update *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 256–280 (2005)
6. Banerjee S., Sengupta M., Sarker T.K.: Fosfomicyn susceptibility among multidrug-resistant, extended-spectrum beta-lactamase-producing, carbapenem-resistant uropathogens. *Indian. J. Urol.* **33**, 149–154 (2017)
7. Batchelor M., Hopkins K.L., Threlfall E.J., Clifton-Hadley F.A., Stallwood A.D., Davies R.H., Liebana E.: Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2261–2265 (2005)
8. Becker K., van Alen S., Idelevich E.A., Schleimer N., Seggewiss J., Mellmann A., Kaspar U., Peters G.: Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 242–248 (2018)
9. Binda E., Marinelli F., Marcone G.L.: Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance *Antibiotics*, **3**, 572–594 (2014)
10. Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B.: Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 3317–3324 (2017)
11. Bozdogan B., Appelbaum P.C.: Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**, 113–119 (2004)

12. Brodolin K.: Antibiotics targeting bacterial RNA polymerase. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*, **12**, DOI/10.1002/9783527659685.ch12 (2013)
13. Bryan L.E., Bedard J.: Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 232–239 (1991)
14. Bush K., Jacoby G.A.: Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010)
15. Canton R., Coque T.M.: The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 466–475 (2006)
16. Canu A., Malbrun B., Coquemont M., Davies T.A., Appelbaum P.C., Leclercq R.: Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 125–131 (2002)
17. Carattoli A., Villa L., Feudi C., Curcio L., Orsini S., Luppi A., Pezzotti G., Magistrali C.F.: Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* **22**(31), 30589. DOI/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589 (2017)
18. Carroll L.M., Gaballa A., Guldemann C., Sullivan G., Henderson L.O., Wiedmann M.: Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *mBio*, **10** (3) e00853–19; DOI: 10.1128/mBio.00853-19 (2019)
19. Cassini A., Monnet L.D. I wsp.: Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 56–66 (2019)
20. Castañeda-García A., Blázquez J., Rodríguez-Rojas A.: Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics*, **2**, 217–236 (2013)
21. Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M.: *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 603–608 (2009)
22. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats In The United States, 2013, 1–114, <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (26.11.2019)
23. Champoux J.J.: DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369–413 (2001)
24. Chancey S.T., Zahner D., Stephens D.S.: Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* **7**, 959–978 (2012)
25. Correia S., Poeta P., Hebraud M., Capelo J.L., Igrejas G.: Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* **66**, 551–559 (2017)
26. Costa S.S., Viveiros M., Amaral L., Couto I.: Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open. Microbiol. J.* **7**, 59–71 (2013)
27. Cui L., Tominaga E., Neoh H.M., Hiramatsu K.: Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1079–1082 (2006)
28. Dalmolin T.V., Lima-Morales D.d., Barth A.L.: Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? *J. Infectiology*, **1**, 16–22 (2018)
29. Deng M., Li L.J. i wsp.: Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 297–303 (2014)
30. Edelstein P.H.: Pneumococcal resistance to macrolides, lincosamides, ketolides, and streptogramin B agents: molecular mechanisms and resistance phenotypes. *Clin. Infect. Dis.* **38 Suppl 4**, S322–327 (2004)
31. Edoó Z., Arthur M., Hugonnet J.-E.: Reversible inactivation of a peptidoglycan transpeptidase by a β -lactam antibiotic mediated by β -lactam-ring recyclization in the enzyme active site. *Sci. Rep.* **7**, DOI:10.1038/s41598-017-09341-8
32. Enne V.I., Delsol A.A., Roe J.M., Bennett P.M.: Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 203–207 (2004)
33. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency: Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. 2009 https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf (26.11.2019)
34. Falagas M.E., Kastoris A.C., Kapaskelis A.M., Karageorgopoulos D.E.: Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 43–50 (2010)
35. Falagas M.E., Vouloumanou E.K., Samonis G., Konstantinos Z. Vardakasa: Fosfomicin *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 321–347 (2016)
36. Fisher J.F., Mobashery S.: beta-Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a025221 (2016)
37. Fu Z., Ma Y., Chen C., Guo Y., Hu F., Liu Y., Xu X., Wang M.: Prevalence of Fosfomicin Resistance and Mutations in *murA*, *glpT*, and *uhpT* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Blood and Cerebrospinal Fluid Samples. *Front. Microbiol.* **6**, 1544 (2015)
38. Fyfe C., Grossman T.H., Kerstein K., Sutcliffe J.: Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 6(10), a025395. DOI: 10.1101/cshperspect.a025395 (2016)
39. Garneau-Tsodikova S., Labby K.J.: Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm.* **7**(1): 11–27. DOI:10.1039/C5MD00344J (2016)
40. Gill M.J., Brenwald N.P., Wise R.: Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 187–189 (1999)
41. Goldstein B.P.: Resistance to rifampicin: a review. *J. Antibiot.* **67**, 625–630 (2014)
42. Greer N.D.: Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proc. (Bayl Univ Med Cent)*. **19**, 155–161 (2006)
43. Gupta S., Govil D., Kakar P.N., Prakash O., Arora D., Das S., Govil P., Malhotra A.: Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian J. Crit. Care. Med.* **13**, 49–53 (2009)
44. Hanssen A.M., Ericson Sollid J.U.: SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 8–20 (2006)
45. Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K.: Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005)
46. Hawkey P.M.: The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*, **317**, 657–660 (1998)
47. Hooper D.C., Jacoby G.A.: Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 1–22 (2016)
48. Howden B.P., Stinear T.P. i wsp.: Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* **7**, e1002359 (2011)

49. Hrast M., Sosic I., Šink R., Gobec S.: Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorg. Chem.* **55**, 2–15 doi: 10.1016/j.bioorg.2014.03.008 (2014)
50. Hugonnet J.E., Arthur M. i wsp.: Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife*, **5**, e19469 (2016)
51. Jacoby G.A.: AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009)
52. Jacoby G.A., Walsh K.E., Mills D.M., Walker V.J., Oh H., Robicsek A., Hooper D.C.: *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1178–1182 (2006)
53. Kim D.H., Lees W.J., Kempell K.E., Lane W.S., Duncan K., Walsh C.T.: Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, **35**, 4923–4928 (1996)
54. Kocsis B., Szabó D.: Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: Mendez-Vilas, A., ed., *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, Spain: Formatex Research Center*, 251–257 (2013)
55. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J.: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435 (2010)
56. Kuga A., Okamoto R., Inoue M.: *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 561–567 (2000)
57. Langaee T.Y., Dargis M., Huletsky A.: An *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3296–3300 (1998)
58. Leclercq R.: Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 482–492 (2002)
59. Leclercq R., Courvalin P.: Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2727–2734 (2002)
60. Li X.-Z., Nikaido H.: Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*, **69**, 1555–1623 (2009)
61. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D.: Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009)
62. Long K.S., Poehlsaard J., Kehrenberg C., Schwarz S., Vester B.: The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2500–2505 (2006)
63. Long K.S., Vester B.: Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 603–612 (2012)
64. Lonks J.R., Goldmann D.A.: Telithromycin: a ketolide antibiotic for treatment of respiratory tract infections. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1657–1664 (2005)
65. MacNair C.R., Stokes J.M., Carfrae L.A., Fiebig-Comyn A.A., Coombes B.K., Mulvey M.R., Brown E.D.: Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nat. Commun.* **9**, 1–8 (2018)
66. Malinga L.A., Stoltz A., Walt M.v.d.: Efflux pump mediated second-line tuberculosis drug resistance. *Mycobact. Dis.* **6**, 1–9 (2016)
67. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A.: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351**, 797–799 (1998)
68. Miller W.R., Bayer A.S., Arias C.A.: Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026997 (2016)
69. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **12**, 1221–1236 (2014)
70. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M.: Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 727–737 (1999)
71. Moffatt J.H., Harper M., Harrison P., Hale J.D.F., Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., Michael F.S., Cox A.D. et al.: Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4971–4977 (2010)
72. Nilsson A.I., Berg O.G., Aspevall O., Kahlmeter G., Andersson D.I.: Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2850–2858 (2003)
73. Noskin G.A.: Tigecycline: a new glycolcycline for treatment of serious infections. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 5**, S303–314 (2005)
74. O'Neill J.: Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. . Review on Antimicrobial Resistance, (2014)
https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (26.11.2019)
75. Ojo K.K., Striplin M.J., Ulep C.C., Close N.S., Zittle J., Luis H., Bernardo M., Leitao J., Roberts M.C.: *Staphylococcus efflux msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1089–1091 (2006)
76. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M.: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* **5**, 643 (2014)
77. Olson M.W., Ruzin A., Feyfant E., Rush T.S., 3rd, O'Connell J., Bradford P.A.: Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2156–2166 (2006)
78. Pages J.M., Lavigne J.P., Leflon-Guibout V., Marcon E., Bert E., Noussair L., Nicolas-Chanoine M.H.: Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One*, **4**, e4817 (2009)
79. Perez F., Bonomo R.A. i wsp.: OqxAB, a quinolone and olamquinodox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4602–4603 (2013)
80. Perichon B., Courvalin P.: VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4580–4587 (2009)
81. Poole K.: Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2233–2241 (2000)
82. Queenan A.M., Bush K.: Carbapenemases: the Versatile B-Lactamases *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007)
83. Ramirez M.S., Tolmasky M.E.: Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **13**, 151–171 (2010)
84. Rodriguez-Verdugo A., Gaut B.S., Tenaillon O.: Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol. Biol.* **13**, 50 (2013)
85. Schwendener S., Cotting K., Perreten V.: Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci. Rep.* **7**, 43797 (2017)
86. Sharkey L.K.R., Edwards T.A., O'Neill A.J.: ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *mBio*, **7**, e01975–15 (2016)

87. Shen Z.Q., Wang Y., Shen Y.B., Shen J.Z., Wu C.M.: Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 293–293 (2016)
88. Sothivelvam S., Mankin A.S. i wsp.: Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *PNAS USA*, **111**, 9804–9809 (2014)
89. Straus S.K., Hancock R.E.W.: Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *BBA-Biomembranes*, **1758**, 1215–1223 (2006)
90. Sun J., Liu Y.H. i wsp.: Plasmid-encoded *tet(X)* genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat. Microbiol.* **4**, 1457–1464 (2019)
91. Sun Y., Cai Y., Liu X., Bai N., Liang B., Wang R.: The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **41**, 110–116 (2013)
92. Takahata S., Ida T., Hiraishi T., Sakakibara S., Maebashi K., Terada S., Muratani T., Matsumoto T., Nakahama C., Tomono K.: Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**, 333–337 (2010)
93. Tran T.T., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1354**, 32–53 (2015)
94. Truong-Bolduc Q.C., Wang Y., Hooper D.C.: Tet38 Efflux Pump Contributes to Fosfomicin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00927–18 (2018)
95. van Hoek A.H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J.M.: Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* **2**, 203 doi: 10.3389/fmicb.2011.00203 (2011)
96. Villa L., Feudi C., Fortini D., Garcia-Fernandez A., Carattoli A.: Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1707–1712 (2014)
97. Volkens G., Palm G.J., Weiss M.S., Wright G.D., Hinrichs W.: Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. *FEBS Lett*, **585**, 1061–1066 (2011)
98. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M.: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1892–1897 (2009)
99. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Li J., Yin W., Wang S., Zhang S., Shen J., Shen Z., Wang Y.: Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 122 (2018)
100. Wang Y., Li X., Wang Y., Schwarz S., Shen J., Xia X.: Intracellular accumulation of linezolid and florfenicol in *oprA*-producing *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, **23**, e3195 (2018)
101. Wang Y., Shen J. i wsp.: A novel gene, *oprA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 2182–2190 (2015)
102. Wasyl D., Hoszowski A., Zajac M.: Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Vet Microbiol*, **171**, 307–314 (2014)
103. Wilson D.N., Schluenzen F., Harms J.M., Starosta A.L., Connell S.R., Fucini P.: The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *PNAS USA*, **105**, 13339–13344 (2008)
104. Wolter N., Smith A.M., Farrell D.J., Northwood J.B., Douthwaite S., Klugman K.P.: Telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* is conferred by a deletion in the leader sequence of *erm(B)* that increases rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 435–440 (2008)
105. Wong M.H., Chen S.: First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 658–660 (2013)
106. World Health Organization.: Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision 2018. 1–45 (2019)
107. Xavier B., Lammens C., Ruhel R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S.: Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* **21**, e30280 (2016)
108. Xia R., Guo X., Zhang Y., Xu H.: *qnrVC*-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3471–3474 (2010)
109. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y.: New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3354–3360 (2007)
110. Yang Y.Q., Li Y.X., Lei C.W., Zhang A.Y., Wang H.N.: Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1791–1795 (2018)
111. Yin W., Zhang R., Li H., Shen Y., Walsh T.R., Liu Z., Shen J., Wang S., WangmBio Y., 8:e00543–17: Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, **8**, e00543–00517 (2017)
112. Yu Z., Qin W., Lin J., Fang S., Qiu J.: Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res. Int.* **2015**, 679109 (2015)
113. Zhanel G.G., Karlowsky J.A., Rubinstein E., Hoban D.J.: Tigecycline: a novel glycylicycline antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **4**, 9–25 (2006)
114. Zhang T.H., Muraih J.K., Tishbi N., Herskowitz J., Victor R.L., Silverman J., Uwumarenogie S., Taylor S.D., Palmer M., Mintzer E.: Cardiolipin Prevents Membrane Translocation and Permeabilization by Daptomycin. *J. Biol. Chem.* **289**, 11584–11591 (2014)

NOWE SYNTETYCZNE I NATURALNE ANTYMYKOTYKI W KONTEKŚCIE TERAPII DERMATOMYKOZ

Sebastian Gnat^{1,*}, Dominik Łagowski¹, Aneta Nowakiewicz¹, Mariusz Dyląg²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło w wrześniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Paradoksalnie, pomimo postępu w medycynie obserwuje się rosnącą z każdym rokiem prevalencję infekcji grzybiczych. Na początku trzeciego tysiąclecia możliwości terapeutyczne wciąż są bardzo ograniczone. Obecnie w klinicznym użyciu znajduje się zaledwie osiem klas związków przeciwgrzybiczych, z których tylko cztery mają zastosowanie w terapii dermatomykoz. Trwające od drugiej połowy XX wieku intensywne poszukiwania „świętego Graala” terapii przeciwgrzybiczej napotykać na poważne przeszkody wynikające z eukariotycznego modelu budowy komórki grzyba. W niniejszej pracy w syntetyczny sposób zostały opisane nowe grupy związków chemicznych pochodzenia głównie naturalnego, które ze względu na przejawianą przez nie aktywność przeciwgrzybiczą, w tym wobec patogennych gatunków dermatofitów, mogą stanowić nowe opcje terapeutyczne. Spośród związków budzących obecnie duże zainteresowanie na uwagę zasługują związki z grupy terpenoidów, alkaloidów, saponin, flawonoidów i olejków eterycznych. Wiele z tych związków znajduje się w fazie badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwgrzybicze, podczas gdy inne są na etapie badań przedklinicznych. Przyszłe badania powinny być skupione na próbie określenia możliwości aplikacyjnych danych substancji w implementacji do rutynowego stosowania oraz ich skuteczności, toksyczności i powodowanych działań niepożądanych.

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka dermatofitów w aspekcie terapeutycznym. 3. Nowe syntetyczne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym. 4. Naturalne preparaty przeciwgrzybicze. 4.1. Terpenoidy i olejki eteryczne. 4.2. Alkaloidy. 4.3. Flawonoidy. 4.4. Saponiny. 4.5. Inne związki chemiczne 5. Podsumowanie

CLINICALLY USED AND POTENTIAL ANTIMYCOTICS IN THE CONTEXT OF THERAPY OF DERMATOMYCOSES

Abstract: Paradoxically, despite the progress in medicine, the prevalence of fungal infections is increasing from year to year. At the beginning of the third millennium, practical therapeutic options are still very limited. Currently, only eight classes of antifungal compounds are in clinical use, only four of which are used in the treatment of dermatomycoses. The intense search for the “Holy Grail” of antifungal therapy that has been going on since the second half of the 20th century faces serious obstacles arising from the eukaryotic model of fungal cell structure. In this paper, new groups of chemical compounds of mainly natural origin have been synthetically described, which due to their interesting antifungal activity, including pathogenic species of dermatophytes, may constitute new therapeutic options. Among compounds currently arousing great interest, compounds from the group of terpenoids, alkaloids, saponins, flavonoids and essential oils deserve attention. Many of these compounds are in clinical trials as potential antifungal agents, while others are in preclinical studies. Future research should focus on attempting to determine the applicability of the given substances in implementation for routine use and their effectiveness, toxicity and side effects.

1. Introduction. 2. General characteristics of dermatophytes in the therapeutic aspect. 3. New synthetic preparations with antifungal activity. 4. Natural antifungal preparations. 4.1. Terpenoids and essential oils. 4.2. Alkaloids. 4.3. Flavonoids. 4.4. Saponins. 4.5. Other chemical compounds 5. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, dermatomykozy, antymykotyki, produkty naturalne, spektrum działania

Key words: dermatophytes, dermatomycoses, antimycotics, natural products, spectrum of activity

1. Wprowadzenie

Dermatofity to w ogromnej większości grzyby chrobotwórcze o wysokim powinowactwie do silnie skratynizowanych struktur, takich jak paznokcie, skóra (naskórek) i włosy, które powodują zakażenia powierzch-

owne znane jako dermatomykozy lub grzybice powierzchowne [33]. W języku angielskim jednostki chorobowe powodowane przez dermatofity określane są terminami dermatomycoses lub superficial mycoses [21]. Rosnąca częstość występowania zakażeń grzybiczych u ludzi, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną

* Autor korespondencyjny: Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

odpornością, powoduje, że choroby te, a zwłaszcza inwazyjne infekcje grzybicze stają się ogólnosiowym problemem zdrowia publicznego [32]. Rokowania w przebiegu dermatomykoz mogą być różne, a obraz kliniczny choroby w dużym stopniu zależny jest od statusu immunologicznego gospodarza i może przyjmować postać od ograniczonych zmian skórnych do głębszych infekcji podskórnych, jak w przypadku *kerion Celsi*, które przy braku lub niewłaściwym leczeniu mogą pozostawić trwałe zmiany [68]. Chociaż dermatofity są częstymi czynnikami etiologicznymi grzybiczych infekcji powierzchniowych, należy również nadmienić, że grzyby z rodzaju *Candida* i *Malassezia* znacznie częściej odpowiadają za tego typu infekcje [32, 33, 36].

W pierwszych dziesięcioleciach XX wieku pojawiły się pierwsze obawy związane z narastającą prewalencją infekcji grzybiczych u ludzi, której powodów upatrywano w różnych czynnikach środowiskowych i antropopresji. W konsekwencji zostały podjęte pierwsze próby terapeutyczne ukierunkowane na leczenie tych infekcji [90]. Stosowane wówczas leki przeciwgrzybicze ograniczone były do środków nieswoistych, takich jak jodek, rtęć, kwasy benzoesowe i salicylowe, pochodne fenolu, kwas undecylenowy, fiolet metylowy, pochodne sulfonamidów i inne czynniki, w większości szkodliwe dla ludzi, m. in. oparte na preparatach bromu, nadmanganianu potasu i oleju terpentynowego w mieszaninie z oliwą z oliwek [37, 51].

Od tamtego czasu zainteresowanie kliniczną terapią przeciwgrzybiczą stopniowo wzrasta, aczkolwiek tempo opracowywania leków przeciwgrzybiczych wciąż jest bardzo wolne. Problemy związane z poszukiwaniem nowych skutecznych leków przeciwgrzybiczych wynikają przede wszystkim z wielkiego podobieństwa komórek grzybów do komórek zwierzęcych, a więc również prezentujących eukariotyczny model budowy [72]. Można to zobrazować chociażby przykładem echinokandyn, które chociaż odkryte na początku lat 70. XX wieku, znacznie później zostały wprowadzone do praktyki klinicznej, a ich opis uwzględniono w dodatku do farmakopei przeciwgrzybiczej, dopiero na początku XXI wieku [81]. Ponadto, od ponad 20 lat do praktyki klinicznej w terapii kryptokokowego zapalenia opon mózgowych, jednej z najważniejszych przyczyn zgonów związanych z chorobami zakaźnymi u pacjentów z AIDS, nie wprowadzono żadnych nowych leków [49]. W rzeczywistości obecna terapia tzw. „złotym standardem” opiera się na stosowaniu kombinacji dwóch leków, tj. amfoterycyny B i 5-flucytozyny, które w użyciu klinicznym są już od 50 lat [49]. W zasadzie niewielka liczba leków i wolne tempo rozwoju nowych farmaceutyków przeciwgrzybiczych nie byłyby problemem, gdyby obecnie stosowane terapie były wysoce skuteczne. Niestety, wskaźniki dotyczące występowania działań niepożądanych i oporności w leczeniu infekcji

grzybiczych wahają się od 20% do 100%, w zależności od organizmu i stanu odporności gospodarza [10]. Oczywistym jest, że tempo rozwoju nowych leków i strategii przeciwgrzybiczych musi wzrosnąć, aby zaspokoić obecne i przyszłe potrzeby.

Inny problem wynikający z powszechnego stosowania leków przeciwgrzybiczych związany jest z nakładającymi się mechanizmami ich działania i tożsamymi celami komórkowymi, co może przyczyniać się do powstawania fenotypów oporności wielolekowej (MDR, Multi-Drug Resistance) obserwowanych wśród coraz większej liczby patogennych grzybów [62]. Zarówno oporność kliniczna, jak również mikrobiologiczna może skutkować niepowodzeniem terapii. Z definicji, oporność kliniczna jest niepowodzeniem w eradykacji infekcji nawet przy podawaniu leków wykazujących aktywność *in vitro*, podczas gdy oporność mikrobiologiczna oparta jest na różnych mechanizmach molekularnych indukowanych w komórkach grzybów w celu przewyciężenia inhibicyjnego działania leków przeciwgrzybiczych [42]. W komórce grzyba może dojść do aktywacji kilku takich mechanizmów, które mogą funkcjonować niezależnie od siebie lub jako wypadkowa dwóch lub większej ilości takich mechanizmów [18, 63, 77]. Z drugiej strony, pacjenci często zaniedbują i rezygnują z leczenia ze względu na konieczność długotrwałego stosowania leków i występowanie związanego z tym działania niepożądanego [63]. Wszystko to skłania mikrobiologów do poszukiwania nowych preparatów przeciwgrzybiczych o wysokiej skuteczności i łatwej dostępności.

Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu piśmiennictwa traktującego o różnych nowatorskich metodach leczenia grzybic powierzchniowych opartych o chemioterapeutyki, antybiotyki przeciwgrzybicze i substancje pochodzenia naturalnego. Ponadto, w niniejszej pracy opisane są zalety i ograniczenia oraz mechanizmy działania tych antymykotyków.

2. Ogólna charakterystyka dermatofitów w aspekcie terapeutycznym

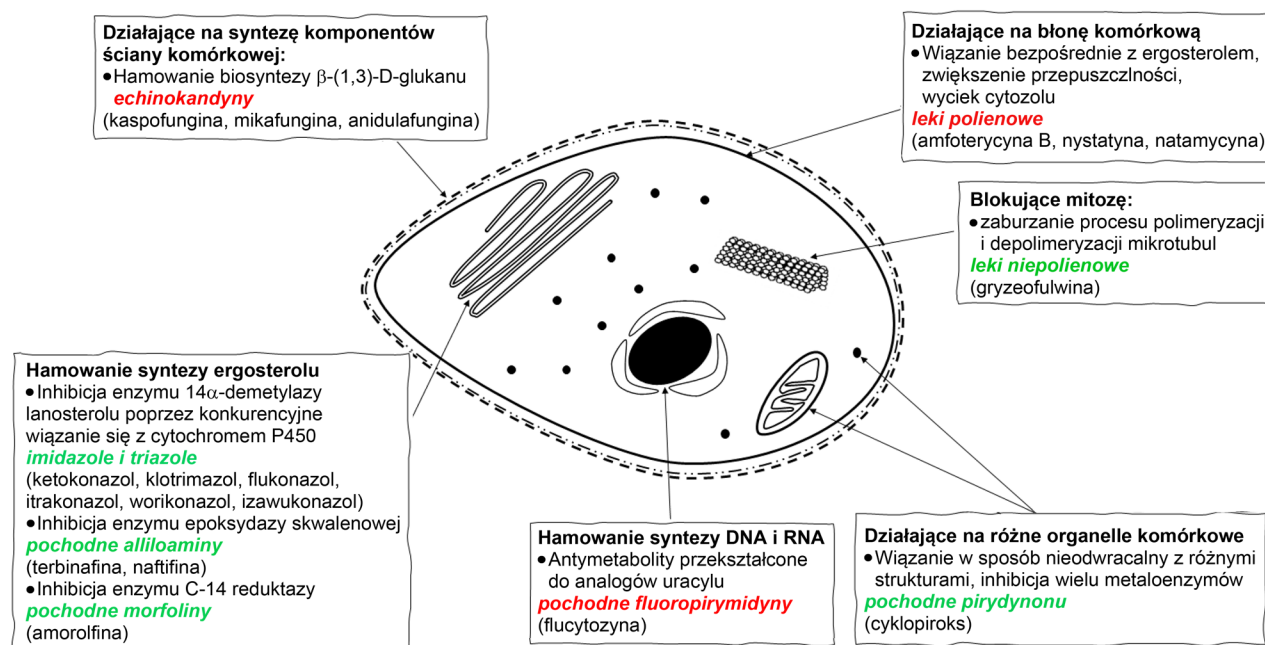
Termin dermatofity, chociaż wprowadzony głównie ze względów praktycznych i nie mający wartości taksonomicznej, skupia gatunki należące do rzędu *Onygenales*. Ogromna większość z nich stanowi patogeny ludzi oraz zwierząt i posiada zdolność rozkładu keratyny w celu pozyskania składników odżywczych [32]. Sekrecja szerokiego spektrum enzymów litycznych, takich jak lipazy, proteazy i keratynazy, przez strzępki tych grzybów, stanowi najlepiej przebadany czynnik wirulencji, umożliwiający pierwotną kolonizację i utrzymanie się tych patogenów w tkankach gospodarza [28, 59]. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że

enzymy te posiadają wysoką specyficzność substratów, która zarazem definiuje spektrum gospodarzy preferowanych przez poszczególne gatunki dermatofitów [28, 29]. Jednocześnie uwolnione enzymy pełnią rolę antygenów indukujących i modelujących stan zapalny towarzyszący przede wszystkim infekcjom powodowanym przez gatunki zoofilne [59].

Duże różnice między gatunkami dermatofitów można wskazać w odniesieniu do ich naturalnego środowiska występowania. Dotychczas, trzy szerokie grupy ekologiczne dermatofitów zostały opisane: antropofilne, zoofilne i geofilne [33]. Gatunki antropofilne naturalnie kolonizują wytwory naskórka człowieka, przenosząc się między gospodarzami i powodując przewlekłe, ale łagodnie przebiegające infekcje, często osiągające rozmiary epidemii [22, 33]. Transmisja zakażenia na zwierzęta tymi gatunkami była notowana, ale sporadycznie i jest uznawana za wyjątkową [33]. Gatunki zoofilne bytują na zwierzętach, ich przenoszenie na ludzi jest możliwe i częste, a odbywa się zwykle poprzez rezerwuary, którymi mogą być same zwierzęta, ich sierść lub przedmioty, z którymi miały styczność [27, 30, 31, 58]. Dermatofity zoofilne diagnozowane u zwierząt, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [59]. Naturalnym miejscem bytowania dermatofitów geofilnych jest gleba, często wokół nor i jam określonych ssaków lądowych [32]. Ta grupa grzybów może być przenoszona przez zwierzęta mechanicznie na powłokach zewnętrznych [32, 59], imitując bezobjawowe nosicielstwo, stąd różnica między dermatofitami geofilnymi i zoofilnymi nie zawsze jest ostra [33].

Ekologiczny podział dermatofitów jest ważny, ponieważ występowanie zróżnicowanych objawów klinicznych związane jest z odpowiedzią immunologiczną gospodarza na infekcję różnymi gatunkami grzybów. Gatunki antropofilne są związane z przewlekłymi zakażeniami i z niższym naciekiem komórkowym w skórze niż w przypadku gatunków zoofilnych [40]. W pierwszych stadiach zakażenia dermatofity kolonizują skórę i stymulują keratynocyty do wytwarzania cytokin, które pośredniczą w odpowiedzi zapalnej i akumulacji leukocytów, głównie neutrofilów, w zakażonej tkance [32, 40, 61]. Dermatofity są początkowo rozpoznawane przez receptory wrodzonych komórek odpornościowych gospodarza, takich jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne, które indukują aktywację odpowiedzi adaptacyjnej w celu zwalczania zakażenia. Modele infekcji *in vitro* i *in vivo* wykazały, że gatunki antropofilne (przede wszystkim *Trichophyton tonsurans*) indukują keratynocyty do wydzielania ograniczonego spektrum cytokin, głównie IL-8, IL-6 i IL-1 β . Z kolei, zoofilny gatunek *Arthroderma benhamiae* indukuje szersze spektrum cytokin, takich jak IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-2, IL-15, TGF- β , przyczyniając się do zwiększenia liczby komórek zapalnych w miejscu zakażenia, które są odpowiedzialne za eliminowanie komórek grzybów, regenerację i przebudowę tkanek [32, 35].

Pomimo dostępności przynajmniej kilku klas leków przeciwgrzybiczych przeznaczonych do użytku klinicznego, stanowią one ograniczone spektrum w kontekście dostępnych dla nich celów komórkowych (Ryc. 1). Należy jednak zaznaczyć, że aż cztery z ośmiu klas obecnie dostępnych leków przeciwgrzybiczych tj.



Ryc. 1. Obecnie stosowane antymykotyki i ich cele komórkowe

polieny, azole, alliloaminy i pochodne morfoliny działają na poziomie błony komórkowej [26, 60, 72]. Dodatkowo, pierwsze z wymienionych, chociaż jako leki grzybobójcze cechujące się nieporównywalnie wyższą aktywnością przeciwgrzybiczą w porównaniu z pozostałymi, nie znalazły do tej pory zastosowania w terapii dermatomykoz [26, 54, 60, 72]. Z kolei pochodne azolowe, w tym imidazole i triazole pomimo najszerszego spektrum działania jako leki o właściwościach grzybostatycznych są obarczone zjawiskiem często narastającej na nie tzw. oporności nabytej, niejednokrotnie opisywanej w literaturze [12, 88]. Ponadto, leki azolowe wchodzi w interakcje z innymi lekami, co stwarza niejednokrotnie duże problemy w odniesieniu do pewnych grup pacjentów [60]. W kontekście penetracji zainfekowanych, silnie skeratynizowanych tkanek leki azolowe nie są równocenne. W praktyce klinicznej przejawia się to znacznie częstszym stosowaniem preparatów zawierających itraconazol niż tych posiadających w składzie flukonazol, z uwagi na lepsze właściwości lipofilne pierwszego z wymienionych [4, 60]. W odróżnieniu od leków azolowych, alliloaminy i pochodne morfoliny wykazują wobec komórek grzybów, w tym dermatofitów, wysoką aktywność grzybobójczą [60, 82] i nie towarzyszy im powszechne dla azoli zjawisko narastania oporności [12, 88]. Uważa się, że jest to wynikiem blokowania przez te leki szlaku biosyntezy ergosterolu na wcześniejszych etapach w przeciwieństwie do leków azolowych [1, 60, 72], jak również brakiem zaangażowania białek błonowych z rodziny ABC transporterów w proces detoksyfikacji komórki grzyba z tych toksycznych związków [12, 88]. Należy też zaznaczyć, że pochodne morfoliny, z których największym zastosowaniem cieszy się amorolfina, mają jak do tej pory zastosowanie jedynie miejscowe, co ogranicza ich możliwości terapeutyczne [43]. Z pozostałych dostępnych obecnie leków przeciwgrzybiczych na uwagę zasługuje jeszcze gryzeofulwina, jako jeden z najstarszych leków przeciwgrzybiczych przejawiających wysoką skuteczność w terapii dermatomykoz [34]. Należy jednak zauważyć, że lek ten w wielu krajach został już wycofany z użycia [26]. Podobnie jak amorolfina wysoką skutecznością i zastosowaniem jedynie miejscowym charakteryzuje się cyklopiroks [60], którego mechanizm działania jest złożony i jak do tej pory opisany w znikomym stopniu [53, 60]. Pozostałe ze znajdujących się w klinicznym użyciu leków tj. echinokandyny [20] i pochodne fluoropirymidyny [89] nie znalazły jak do tej pory zastosowania w terapii zakażeń powodowanych przez dermatofity [20]. W kontekście powyższych rozważań popartych literaturą nie trudno zauważyć, że możliwości terapii infekcji powodowanych przez dermatofity są bardzo ograniczone i wskazują na nagłą potrzebę poszukiwania nowych skutecznych i bezpiecznych w użyciu antymykotyków.

3. Nowe syntetyczne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym

Rosnąca liczba szczepów grzybów lekoopornych, w tym wielolekoopornych stanowi poważne zagrożenie dla obecnych i przyszłych terapii przeciwgrzybiczych, niejednokrotnie ratujących życie. Pomimo postępów w zakresie profilaktyki, diagnostyki i terapii, inwazyjne infekcje grzybicze powodowane przez szczepy odporne nadal powodują znaczną śmiertelność u pacjentów z upośledzoną odpornością, co podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych leków przeciwgrzybiczych [41, 83]. Odkrywanie nowych leków do wykorzystania w terapii przeciwgrzybiczej jest skomplikowane przynajmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, większość infekcji grzybiczych dotyka ludzi z upośledzoną funkcją immunologiczną, a zatem ci pacjenci są bardziej uzależnieni od skuteczności leku przeciwgrzybiczego niż pacjenci z prawidłową odpornością. Po drugie, opracowanie skutecznych i zarazem cechujących się wysokim profilem bezpieczeństwa leków przeciwgrzybiczych jest wyzwaniem, ponieważ wiele podstawowych procesów biologicznych jest wysoce konserwatywnych między grzybami i ludźmi [81]. W konsekwencji identyfikacja związków chemicznych zabijających patogen i jednocześnie oszczędzających gospodarza jest bardzo trudna. Pomimo wielu przeszkód, istnieją jednak możliwości rozwoju nowatorskich terapii. Ostatnie postępy w zrozumieniu cyklu życiowego grzybów, genomiki funkcjonalnej, proteomiki i mapowania genów otwierają możliwości w identyfikacji nowych celów komórkowych dla potencjalnych leków przeciwgrzybiczych, które mogłyby wzmocnić arsenał dostępnych środków przeciwgrzybiczych (Tabela I).

Obecnie leki syntetyczne o działaniu przeciwgrzybiczym są w trakcie badań naukowych lub w badaniach przedklinicznych i/lub klinicznych. Leki te wykazują działanie wobec nowych celów komórkowych, będąc inhibitorami odmiennych niż dotychczas opisywane szlaków metabolicznych, m.in. cyklu glioksylanowego, biosyntezy pirymidyn i hemu, szlaku cytochromu P450, metabolizmu żelaza, wraz ze szlakami przekazywania sygnału, takimi jak kinaza aktywowana mitogenem (MAP) i szlaku kalcyneuryny [62]. Niektóre z nich są aktywne wobec czynników transkrypcyjnych bądź stanowią inhibitory blokujące syntezę DNA poprzez inhibicję deacetylazy histonowej, przy czym te ostatnie z wymienionych wpisują się już w terapię epigenetyczną [64].

Większość cząsteczek chemicznych rozważanych w kontekście potencjalnych leków przeciwgrzybiczych została oceniona pod kątem skuteczności przeciwko grzybom odpowiedzialnym za infekcje ogólnoustrojowe i zagrażające życiu. Wśród czynników etiologicznych powodujących zagrażające życiu infekcje

Tabela I
Potencjalne antypykotyki, syntetyczne i o pochodzeniu naturalnym

Typ preparatu	Związek chemiczny	Pochodzenie	Piśmiennictwo
Preparaty syntetyczne	VT-1161	–	[25, 84]
	AR-12	–	[48, 50]
Preparaty naturalne	Terpenoidy i olejki eteryczne	<i>Lavender angustifolia</i> Mill.	[73]
		<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor.	[79]
		<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	[74]
	Alkaloidy	<i>Solanum tuberosum</i> L.	[47]
		<i>Tabernaemontana catharinensis</i> Mill.	[65]
	Flawonoidy	<i>Inula viscosa</i> Ait.	[11]
		<i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	[6]
	Saponiny	<i>Medicago sativa</i> L.	[38]
		<i>Maesa lanceolata</i> Forsk.	[86]
<i>Hedera colchica</i> K.		[66]	

badania biologicznej aktywności większości nowych związków przeprowadzono na szczepach grzybów z gatunków *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. i *Aspergillus fumigatus* [64, 77]. W nielicznych tylko badaniach *in vitro* oceniano wpływ tych leków na dermatofity. Jednym z takich przykładów może być preparat oznaczony symbolem VT-1161, który obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych jako potencjalne alternatywne rozwiązanie w terapii grzybicy paznokci [25, 84]. Lek ten podobnie jak pochodne azolowe hamuje obecną w komórkach grzybów 14- α -demetylazę lanosterolu (CYP51). Wykazano jego wysoką skuteczność *in vitro* wobec komórek takich gatunków dermatofitów jak *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Epidermophyton floccosum* [25]. VT-1161 został zaprojektowany w ten sposób, aby zapewnić selektywną inhibicję wspomnianego enzymu obecnego w komórkach grzybów, przy jednoczesnym braku powinowactwa do homologów tego białka występujących w komórkach ludzkich. Ponadto, w trakcie badań przedklinicznych wykazano, że pojedyncze dawki doustne preparatu podawane *in vivo* śwince morskiej prowadziły do utrzymania się w osoczu, przez co najmniej 48 h, stężeń aktywnego związku wyższych od tych oznaczonych jako wartości MIC (minimal inhibitory concentration) skuteczne *in vitro*. W oparciu o te rezultaty Garvey i wsp. [25] postawili hipotezę, że VT-1161 wykazuje znaczącą skuteczność zarówno *in vivo*, jak również *in vitro* w terapii zakażeń powodowanych przez *T. mentagrophytes*. Zostało to wykazane na eksperymentalnym modelu świnki morskiej zakażonej tym właśnie szczepem grzyba, która raz dziennie miała aplikowany doustnie preparat VT-1161. W późniejszych badaniach klinicznych mających na celu opracowanie schematów dawkowania doustnego, VT-1161 rzeczywiście wykazywał bardzo wysoką skuteczność, co przejawiało się szybkim ustępowaniem objawów chorobowych u zaka-

żonej świnki morskiej. Co więcej, VT-1161 miał wysokie i długotrwanie utrzymujące się stężenie nie tylko w osoczu, ale także w skórze i włosach, a więc tkankach sprzyjających rozwojowi dermatofitu. Biorąc powyższe pod uwagę, przewiduje się, że związek VT-1161 wykaże również znaczącą skuteczność w leczeniu innych zakażeń dermatofitowych u ludzi, takich jak grzybica stóp i paznokci [25].

Innym preparatem o szerokim spektrum działania jest związek oznaczony jako AR-12, będący pochodną celekoksybu stanowiącego skuteczny inhibitor cyklo-oksigenazy 2 (Cox2). Kushawa i wsp. [50] wykazali również jego wysoką skuteczność wobec *T. rubrum*, jednego z najczęściej izolowanych dermatofitów z przypadków dermatomykoz u ludzi. Wspomniani badacze stwierdzili, że związek ten jako lek przeciwnowotworowy pierwszego zastosowania blokujący syntezę acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) i znajdujący się obecnie w trakcie badań klinicznych w terapii chłoniaków i guzów litych, mógłby znaleźć zastosowanie w zwalczaniu infekcji dermatofitowych jako lek drugiego wyboru. Dalsze analizy wykazały, że związek AR-12 wykazuje działanie przeciwgrzybicze obejmujące szerokie spektrum gatunków, w tym oprócz dermatofitów takie gatunki drożdżaków jak: *Candida albicans*, non-albicans *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*, pleśnie, np. *Fusarium* spp., *Mucor* spp. i grzyby dimorficzne (*Blastomyces* spp., *Histoplasma* spp. i *Coccidioides* spp.) [48, 50]. Ponadto, w kontekście możliwej w przyszłości terapii związek AR-12 wykazuje dobrą penetrację w ludzkiej płytce paznokciowej, przez co jest uznawany za obiecujący w terapii tej jednostki chorobowej [50]. Dodatkowo, dekspantenol i PEG 400 (politlenek etylenu) okazały się środkami zwiększającymi zdolność penetracji związku AR-12 [50]. Wysoce prawdopodobne jest, że obydwa wspomniane związki poprawiają penetrację AR-12 poprzez zwiększenie

rozpuszczalności leku w filamentach keratyny, które ulegają wydajniejszej hydratacji, gdy wspomniane związki są obecne w płycie paznokciowej [50].

4. Naturalne preparaty przeciwgrzybicze

Różnorodność gatunkowa królestwa roślin jest nie do końca oszacowana, a spośród znanych gatunków roślin przez ludzi wykorzystywanych jest mniej niż 10% [9]. Niepodważalny jest jednak pogląd, że rośliny mogą służyć jako źródło związków leczniczych, także o właściwościach przeciwgrzybiczych. Ponadto, te naturalne związki pochodzenia roślinnego stanowią źródło danych o aktywnych przeciwdrobnoustrojowych molekułach, które mogą być wykorzystywane bezpośrednio lub funkcjonować jako prekursorzy do rozwoju nowych, skuteczniejszych cząsteczek [2, 19, 70]. W literaturze naukowej przedstawiane są liczne doniesienia dotyczące roślin leczniczych i związków chemicznych z nich pozyskiwanych, takich jak metabolity wtórne, związki fenolowe, olejki eteryczne i ekstrakty, w aspekcie ich trwałości, przyswajalności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Przy ustalaniu, czy produkt naturalny jest użytecznym lekiem przeciwczybnym, brane są pod uwagę następujące parametry: (1) możliwość zastosowania rozpuszczalnika pozbawionego aktywności przeciwgrzybiczej, szczególnie dla związków o słabej rozpuszczalności; (2) możliwość wyznaczenia wartości stężeń hamujących wzrost i proliferację grzybów (MIC) za pomocą metod referencyjnych (protokoły: M27-A3, M38-A i M2-A8) opracowanych przez CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute); (3) możliwość standaryzacji inokulum zgodnie z protokołami opracowanymi przez CLSI; (4) możliwość stosowania szczepów referencyjnych rekomendowanych w protokołach CLSI; (5) możliwość stosowania syntetycznego leku jako kontroli; oraz (6) możliwie krótki czas inkubacji gwarantujący szybkie uzyskanie wyników [70]. Obecnie stosowana strategia badania roślinnych związków o właściwościach przeciwgrzybiczych zakłada dwa etapy: pierwszy z nich stanowi badanie przesiewowe surowego ekstraktu roślinnego, a następnie wykonuje się testy ukierunkowane na identyfikację cząsteczek odpowiedzialnych za aktywność przeciwgrzybiczą [57, 65, 70].

Omawiane związki o potencjale leczniczym pełnią w roślinach różnorodne funkcje, m.in. zapachowe (terpenoidy), pigmentacyjne (chinony i taniny) oraz smakowe (terpenoidowa kapsaicyna z papryki chili) [2]. Jednocześnie, w wielu przypadkach substancje te służą jako środki obrony roślin przed fitopatogennymi mikroorganizmami, owadami i roślinożercami [9]. Związki te zostały zbadane również pod kątem mechanizmów

działania komórkowego. Stwierdzono, że kumaryny wykazują działanie immunoregulacyjne wobec makrofagów, podczas gdy chinony wiążą się z adhezynami i polipeptydami ściany komórkowej, upośledzając ich funkcję [2, 61]. Z kolei saponiny działają poprzez rozrywanie błon komórkowych zawierających sterole, co prowadzi do utraty turgoru i w krótkim czasie do śmierci komórki [2, 44]. Podobnie jak w przypadku kumaryny działanie immunoregulacyjne wykazano też dla kwasu cynamonowego, który aktywuje przede wszystkim monocyty [17]. Z kolei rosnące zainteresowanie kurkumą i izokwercytną wynika z interesującego, aczkolwiek niespecyficznego mechanizmu działania przejawiającego się w uszkodzeniu błon komórkowych [52, 91]. O wiele ciekawszą opcję stanowi kwas kawowy ze względu na wyższą specyficzność i hamowanie jednego z kluczowych dla patogennych grzybów enzymu szlaku glioksyłanowego, liazy izocytrynianowej [15]. Różnorodne działania fitochemiczne określone *in vitro* skłoniło do zbadania potencjału przeciwgrzybiczego tych związków, także w stosunku do dermatofitów.

4.1. Terpenoidy i olejki eteryczne

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących przeciwgrzybiczego działania terpenoidów pochodzenia naturalnego. Związki te występują w olejkach eterycznych z szerokiej gamy ziół aromatycznych, wykazują dużą różnorodność strukturalną i wysoki potencjał przeciwbakteryjny [2]. Jednym z przykładów terpenoidów jest linalol (3,7-Dimetylo-1,6-oktadien-3-ol), będący alkoholem monoterpennym szeroko stosowanym w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym i spożywczym [3]. Linalol przejawia zróżnicowaną aktywność biologiczną, w tym: działanie przeciwbakteryjne [46], przeciwłękowe [56], obniżające poziom cholesterolu [16] i przeciwdrgawkowe [85]. Ponadto Peana i wsp. [76] stwierdzili, że linalol jest głównym składnikiem chemicznym olejku eterycznego otrzymywanego z lawendy (*Lavender angustifolia* Mill.), który wykazuje działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne u zwierząt. Dane z piśmiennictwa pozwalają wnioskować również o przeciwgrzybiczej aktywności linalolu [39]. Obecność tego związku została wykazana w olejkach eterycznych innych roślin o znanej już aktywności przeciwgrzybiczej, takich jak *Ocimum sanctum* L. [45] i *Ocimum basilicum* L. [67].

Mechanizm działania terpenoidów ściśle związany jest z ich lipofilną naturą i wchodzeniem w interakcje z błoną komórkową grzybów [2]. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony, zaburzenia funkcji białek błonowych i oddychania komórkowego [45]. Cardoso i wsp. [67] udowadniają ponadto, że przeciwgrzybicze działanie linalolu związane jest z hamowaniem biosyntezy ergosterolu, ważnego sterolu

zaangażowanego w modulację przepływu elektrolitów przez błonę komórkową grzybów. Wyniki te potwierdza Oliveira Lima i wsp. [73], którzy na podstawie swoich badań wyrażają pogląd, że terpeny wpływają na integralność i funkcję błony plazmatycznej, a zatem są zdolne do hamowania wzrostu i wywoływania znaczących zmian morfologicznych w komórkach grzybów.

Ostatnio też de Oliveira Lima i wsp. [73] dokonali oceny przeciwgrzybiczego działania linalolu wobec izolatów klinicznych *T. rubrum* pozyskanych ze skóry i paznokci pacjentów z dermatomykozą wywołaną przez wspomniany czynnik etiologiczny. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było stwierdzenie, że linalol jest w stanie hamować inicjację tworzenia grzybni *T. rubrum* w miejscu zakażenia, wykazując prawdopodobnie, zahamowanie adhezji dermatofitów do tkanek gospodarza i „kielkowanie” konidiów, poprzedzające tworzenie strzępek i właściwą penetrację. Hamowanie blastokonidiogenezy i tworzenia strzępek oraz tzw. „germ tubes” przez linalol zostało już wcześniej opisane dla *C. albicans* [39]. Wydaje się, że ten mechanizm przeciwgrzybiczego działania jest uniwersalny w przypadku tego związku i pozwala skutecznie zahamować wzrost grzyba już w początkowych etapach rozwoju infekcji grzybiczej. Dalsze badania aktywności linalolu w późniejszych stadiach rozwoju grzybni wykazały, że związek ten uszkadza błonę komórkową *T. rubrum* i powoduje uwalnianie składników komórkowych do środowiska zewnętrznego [73]. Ponadto, zaobserwowane zostały istotne zmiany morfologiczne w odniesieniu do grzybni *T. rubrum*, w szczególności dotyczące tworzenia chlamydospor, indukowane obecnością w środowisku wzrostu grzyba linalolu [73].

Podobne wyniki dotyczące zmian na poziomie morfologii grzybni w trakcie wzrostu *T. rubrum* odnotowali Perreira i wsp. [74] jako skutek działania olejku eterycznego *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. Ta roślina lecznicza jest pospolitym ziołem uprawianym w Indiach i Brazylii, wykorzystywanym przez ludność jako środek odstraszaający owady, przeciwgrzybiczy i roztoczbójczy [75]. Olejki eteryczne z liści *C. winterianus* zawierają ponad 80 różnych składników, wśród których jako główne wymienia się terpenoidy – cytronelal, citronelol i geraniol [7].

Obserwacje grzybni *T. rubrum* ATCC 1683 w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x po ekspozycji na olejek eteryczny *C. winterianus* ujawniły istotne skrócenie i rozszerzenie strzępek, utratę ich pigmentacji i obecność wakuoli, które to cechy nie zostały odnotowane w warunkach optymalnych dla wzrostu dermatofita [74]. Interesujące jest, że te zmiany morfologiczne były niezależne od stężenia olejku. Natomiast nie zostały odnotowane zaburzenia struktury konidiów, chociaż ich wytwarzanie było znacznie ograniczone w obecności każdego ze stężeń preparatu. Przeciwnie,

liczba wytwarzanych chlamydospor wzrastała proporcjonalnie do stężenia olejku. Oprócz działania na dermatofity, olejek eteryczny *C. winterianus* posiada również działanie hamujące wzrost grzybów pleśniowych, m.in. *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium digitatum* [74].

Dane piśmiennicze dostarczają informacji także o terpenoidzie (6-cynamoiloksy-1-hydroksyeudesm-4-en-3-on) pozyskanym z rośliny *Vernonanthura Tweediana* (Baker) H. Rob., dla którego wykazano silne właściwości przeciwgrzybicze wobec *T. mentagrophytes* [79]. Uzyskane przez Portillo i wsp. [79] wartości MIC i MFC dla tego seskwiterpenu skuteczne wobec komórek izolatów klinicznych *T. mentagrophytes* były identyczne i wynosiły 4,0 µg/ml, co pozwala stwierdzić, że związek ten wykazuje przy tym stężeniu działanie nie tylko grzybobójcze, ale przede wszystkim grzybobójcze.

4.2. Alkaloidy

Heterocykliczne związki azotu nazywane są alkaloidami. Pierwszym medycznie użytecznym alkaloidem była morfina, wyizolowana w 1805 roku z maku lekarskiego *Papaver somniferum* L. [2, 23]. Większość alkaloidów izolowanych jest z różnych gatunków roślin psiankowatych z rodzaju *Solanum* L. [2].

Aktywność przeciwgrzybicza została udowodniona dla pochodnych alkaloidów – glikoalkaloidów. Głównym sposobem przeciwgrzybiczego działania glikoalkaloidów jest zaburzenie integralności błon komórkowych poprzez wiązanie z grupami 3-β-hydroksysterolu, powodujące wzrost przepuszczalności błony, tworzenie porów, a w konsekwencji rozpad i utratę integralności komórek [2, 62]. Jednymi z szerzej przebadanych związków z tej grupy o wysokiej toksyczności wobec komórek dermatofitów, w tym *T. rubrum* są solamargina i solasonina [78]. Ponadto dla alkaloidu MMV (12-metoksy-4-metylovoachalotyna), uzyskanego z *Tabernaemontana catharinensis* Mill. również wykazano aktywność przeciwgrzybiczą wobec *T. rubrum* [65].

Inny mechanizm działania został opisany dla glikoalkaloidów występujących w ziemniakach (*Solanum tuberosum* L.), przede wszystkim dla α-solaniny, której skuteczność została wykazana w stosunku do *T. rubrum* [47]. Działanie przeciwgrzybicze tego związku wynika z inhibicji konidiogenezy i wzrostu strzępek [2, 62]. Komoto i wsp. [47] wykazali, że α-solanina powoduje obniżenie poziomu ekspresji genów z cyklu glioksylanowego, zaangażowanych w proces biosyntezy ergosterolu oraz genów kodujących proteazy, co zaobserwowano w komórkach *T. rubrum* hodowanych jednocześnie z linią komórkową keratynocytów. Wymienione geny ulegają zwiększonej ekspresji szczególnie w pierwszych etapach rozwoju infekcji dermatofitowej. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że wspomniane

już glikoalkaloidy mogą hamować biosyntezę pewnych podstawowych metabolitów istotnych dla funkcjonowania komórki grzyba. Związki te mogą też działać jako antymetabolity, co przejawia się wyraźnymi zmianami w morfologii poszczególnych komórek grzyba, które przekładają się na deformacje strzępek grzybni [24].

4.3. Flawonoidy

Flawonoidy są strukturami fenolowymi zawierającymi jedną grupę karbonylową, występującymi naturalnie w roślinach [2]. Flawonoidy są gromadzone głównie w wakuolach komórek owoców (zwłaszcza cytrusowych), warzyw (np. pomidorów, papryki), a także roślin strączkowych, herbaty i ziół. Najwięcej tych substancji zawiera zewnętrzna tkanka (potocznie nazywana skórka) liści, kwiatów i owoców [11]. Cafarchia i wsp. [11] wykazali, że flawonoidy pochodzące z *Inula viscose* Ait., rośliny występującej pospolicie w regionie Morza Śródziemnego, mają znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą wobec dermatofitów, nawet przy niskich stężeniach. Na ten fakt może mieć wpływ również wysoka zawartość seskwiterpenu (karboksyeudesmadienu), związku z grupy terpenoidów, w ekstraktach z liści tej rośliny i synergistyczne działanie przynajmniej tych dwóch substancji w olejku eterycznym [11]. Zatem aktywność przeciwgrzybicza flawonoidów wytwarzanych przez *I. viscose*, w tym wobec komórek patogennych dermatofitów wymaga dalszych wnikliwych badań.

Specyficzną grupę flawonoidów stanowią chalkony (1,3-diarilo-2-propen-1-on), będące flawonoidami o otwartym łańcuchu [6]. Chalkony stanowią szeroko rozpowszechnione naturalne związki, które są przedmiotem coraz większego zainteresowania ze względu na zróżnicowane spektrum aktywności farmakologicznej [71]. Związki te są uważane za interesujące i obiecujące jako prekursorzy nowych leków przeciwgrzybiczych. Ich proste struktury chemiczne pozwalają na ich syntezę w bezpieczny i niedrogi sposób [69]. Wykazano, że związki te wywierają znaczną aktywność przeciwgrzybiczą, zwłaszcza przeciwko dermatofitom [71]. Większość chalkonów hamuje biosyntezę istotnych komponentów ściany komórkowej grzybów [8], ale istnieją dowody na to, że chalkony blokują również syntazę kwasów tłuszczowych (FAS, fatty acid synthase) w komórkach drożdży i prątków [6]. Bitencourt i wsp. [6] zaobserwowali, że hamowanie syntezy kwasów tłuszczowych i ergosterolu w komórkach *T. rubrum* przez kwercetynę i trans-chalkon prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji odpowiednich genów przez obydwie flawonoidy. Dalsze badania na modelu komórek *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że kwercetyna i trans-chalkon hamują aktywność enzymatyczną FAS. Kwercetyna chociaż wykazywała *in vitro* lepszą aktywność inhibicyjną wobec samego enzymu, przejawiała słabszą aktywność

przeciwgrzybiczą w porównaniu z trans-chalkonem. Uzyskane przez Bitencourt i wsp. [6] wyniki sugerują, że przeciwgrzybicza aktywność trans-chalkonu może być związana z występowaniem dodatkowych (poza FAS) celów komórkowych dla tego związku, najprawdopodobniej na szlaku syntezy ergosterolu. Pełna ocena sposobu działania kwercetyny i trans-chalkonu wymaga analizy dodatkowych genów i wykonania uzupełniających testów, które mogłyby wykazać interferencję hamowania FAS z homeostazą kwasów tłuszczowych w komórkach *T. rubrum*. Być może odpowiedź na to pytanie dostarczą prowadzone przez zespół Bitencourt badania, w których stosuje się suplementacje podłoży hodowlanych egzogennymi kwasami tłuszczowymi w obecności kwercetyny i trans-chalkonu.

Badania nad aktywnością przeciwgrzybiczą innego związku z grupy chalkonów – lico-chalkonu, potwierdza sugestie zespołu Bitencourt [6] wskazującą na możliwą represję szlaku syntezy ergosterolu jako dodatkowego mechanizmu działania związków z tej grupy. Cantelli i wsp. [13] wykorzystali układ hodowli *T. rubrum* z ludzkimi keratynocytami, symulujący naturalną infekcję, do określenia poziomu ekspresji genów *ERG1*, *ERG6* i *ERG11*, które są krytyczne dla syntezy ergosterolu. W swoich badaniach wykazali, że dodawanie do hodowli lico-chalkonu znacząco obniża stopień ekspresji tych genów. Ponadto związek ten wyraźnie spowalniał rozwój strzępek podczas interakcji *T. rubrum* z linią komórkową keratynocytów i znacząco hamował aktywność liazy izocytrynianowej [13].

4.4. Saponiny

Saponiny są metabolitami wtórnymi występującymi w tkankach wielu gatunków roślin. Pod względem chemicznym składają się z aglikonu – saponogeniny (saponenol) i glikonu – sacharydu (cukru) [80]. Związki te przechowywane są w komórkach roślinnych jako nieaktywne prekursorzy, które mogą zostać przekształcane enzymatycznie w biologicznie aktywne antybiotyki [2, 44]. Nazwa saponiny wywodzi się od łacińskiego słowa „*sapo*”, oznaczającego mydło, co związane jest z właściwościami do tworzenia piany w kontakcie tych substancji z wodą [80]. Saponiny stanowią naturalne źródło substratów do syntezy leków steroidowych oraz hormonów (progesteronu oraz pochodnych kortyzonu) [80]. Rośliny zawierające saponiny od dawna były stosowane również w ziołolecznictwie i medycynie ludowej jako surowce przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciw-wirusowe, cytotoksyczne i wykrztuśne. W chwili obecnej znajdują zastosowanie w branży kosmetycznej do produkcji toników, maseczek czy też szamponów [86].

Wykazano, że bogate w saponiny ekstrakty *Medicago sativa* L. posiadają działanie przeciwgrzybicze w stosunku do dermatofitów. Houghton i wsp. [38] prze-

badali aktywność saponin wyizolowanych z korzeni i części nadziemnych *M. sativa* L., *Medicago murex* L., *Medicago arabica* L. i *Medicago hybrida* L. w stosunku do dermatofitów *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton interdigitale* i *T. tonsurans*. Wszystkie badane saponiny działały inhibicyjnie na wzrost wszystkich trzech badanych gatunków dermatofitów, przy czym *T. tonsurans* okazał się grzybem najbardziej wrażliwym na działanie tych związków. Ponadto, saponiny ekstrahowane z korzeni *M. murex* L. i *M. hybrida* L. były skuteczniejsze niż związki uzyskane z części nadziemnych tych roślin. Nie ma jednak wystarczającej wiedzy dotyczącej składu chemicznego tych ekstraktów, która mogłaby wyjaśnić zaobserwowane różnice w aktywności przeciwrzybiczej.

Saponiny wyizolowane z afrykańskiej rośliny *Maesa lanceolata* Forssk. wykazują działanie przeciwrzybicze wobec *E. floccosum*, *T. rubrum* i *Microsporum canis* [86]. Ponadto, działanie tych naturalnych związków jest wprost proporcjonalne do stosowanego stężenia. Istotnym problemem jest jednak brak wiedzy na temat składu chemicznego ekstraktów *M. lanceolata*.

Mshvildadze i wsp. [66] przeprowadzili badania celem oceny aktywności przeciwrzybiczej ośmiu saponin wyizolowanych z liści bluszczu (*Hedera colchica* K.). Hederagenina, należąca do saponin triterpenowych, wykazywała najwyższą aktywność przeciwrzybiczą spośród ośmiu saponin wyizolowanych z bluszczu. Zaobserwowano również, że liczba, rodzaj oraz sekwencja podjednostek wchodzących w skład łańcucha węglowodanowego saponin mają znaczący wpływ na aktywność przeciwrzybiczą. Podobne wyniki uzyskali Biały i wsp. [5], których badania wykazały, że części nadziemne *M. arabica* L. zawierają jedną z najbardziej aktywnych saponin – hederageninę, a także inne podobne związki aktywne. Niemniej jednak, ograniczona wiedza na temat właściwości chemicznych saponin i mechanizmów ich działania przeciwrzybiczego wciąż stanowi istotne ograniczenie w ich leczniczym stosowaniu na obecnym etapie badań.

4.5. Inne związki chemiczne

Wachlarz aktywnych przeciwrzybiczo związków pochodzenia roślinnego nie ogranicza się tylko do kilku wymienionych powyżej klas. Wiele gatunków roślin produkuje substancje, których nie da się jednoznacznie sklasyfikować, a ich właściwości przeciwrzybicze zostały już udowodnione.

Eter naftowy i dichlorometanowe ekstrakty owoców i części nadziemnych rośliny *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) wykazują umiarkowane działanie przeciwrzybicze wobec komórek *C. albicans*, *S. cerevisiae* i *C. neoformans* (wartości MIC w zakresie: 62,5–250 µg/ml) i bardzo silną aktywność biologiczną wobec komórek

dermatofitów z takich gatunków jak: *N. gypsea*, *T. rubrum* i *T. mentagrophytes* (wartości MIC w zakresie: 8–16 µg/ml) [87]. Svetaz i wsp. [87] przeprowadzając frakcjonowanie aktywnych ekstraktów tej rośliny przy użyciu bioautografii wyizolowali również związki o strukturze chemicznej zbliżonej do flawonoidów – 2', 4'-dihydroksy-3'-metoksychalkon i 2', 4'-dihydroksy-3'-metoksychalkon. Aktywność przeciwrzybicza może zatem być wypadkową działania kilku związków chemicznych obecnych w ekstrakcie *Z. punctata*.

5. Podsumowanie

Praktycznie każdy z obecnie dostępnych leków przeciwrzybiczych może być toksyczny, a wszystko zależy od wielkości dawki i czasu ekspozycji. Ta wciąż żywa w farmakologii i wielu dziedzinach ściśle związanych z medycyną teza, chociaż sformułowana przez Paracelsusa w XV wieku, nieustannie podlega bardziej lub mniej trafnym interpretacjom [14].

Warto podkreślić, że aż do połowy XX wieku w terapii grzybic stosowano szereg różnych substancji, zwykle nieaktywnych lub w znikomym stopniu wykazujących aktywność przeciwrzybiczą. Do szczególnie często wówczas stosowanych należały: produkty destylacji ropy naftowej, jodek potasu, związki zawierające brom, nadmanganian potasu czy olej z terpentyną [1]. Dopiero odkrycie w 1955 roku amfoterycyny B przez Gold i wsp. [21] oraz jej dopuszczenie przez organizację FDA (Food and Drug Administration) do klinicznego stosowania wraz z wprowadzeniem na rynek gryzeofulwiny i klotrimazolu w 1958 roku rozpoczęło erę leków przeciwrzybiczych [1]. Trwające od tamtej pory poszukiwania „świętego Graala” terapii przeciwrzybiczej [14] jak dotychczas nie przyniosły zadowalających rezultatów. Obecnie w leczeniu infekcji grzybiczych dysponujemy zaledwie ośmioma klasami leków przeciwrzybiczych, spośród których tylko cztery znalazły zastosowanie w terapii infekcji powodowanych przez dermatofity [60, 88]. Problem opracowania wzorcowego związku przeciwrzybiczego, chociaż z pewnością można traktować jako wyidealizowany, pozostaje wciąż otwarty, a wśród najczęściej wymienianych w literaturze przedmiotu [14, 55] pożądanych cech takiej substancji znajdują się:

- szerokie spektrum przeciwrzybiczego działania również wobec szczepów (gatunków) opornych na obecnie stosowane leki;
- wyrafinowany i wysoce specyficzny dla komórki grzyba mechanizm działania uniemożliwiający powstanie mechanizmów oporności nabytej;
- możliwość szerokiej i zróżnicowanej aplikacji;
- wysoka aktywność grzybobójcza (nie tylko grzybobostaticzna);

- brak toksyczności w stosunku do komórek ssaków;
- brak ryzyka wystąpienia interakcji z innymi lekami stosowanymi jednocześnie;
- niskie koszty terapii pozwalające na stosowanie u potencjalnych pacjentów.

Na przełomie ostatnich trzech dekad gdy problem lekooporności grzybów patogennych nieustannie narasta koniecznością jest poszukiwanie nowych potencjalnych antymykotyków lub związków wykazujących synergistyczne działanie z obecnie znanymi i klinicznie stosowanymi lekami przeciwgrzybiczymi. Problem związany z poszukiwaniem nowych leków przeciwgrzybiczych wynika przede wszystkim z faktu, że komórka grzyba jako komórka eukariotyczna wykazuje stosunkowo duże podobieństwo do komórek ssaków [14, 55].

Identyfikacja związków chemicznych mogących stanowić prototypy do opracowania nowych leków przeciwgrzybiczych, szczególnie w aspekcie terapii dermatomykoz, stanowi obecne wyzwanie mikrobiologów. Szereg związków o działaniu przeciwgrzybiczym zaproponowanych do tej pory, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, zostało przetestowanych pod kątem ich aktywności wyłącznie *in vitro*. Aktywność preparatu *in vivo* i *in vitro* może być jednak różna. Przyszłe badania powinny być skupione na próbie określenia możliwości aplikacyjnych danych substancji oraz ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania.

5. Piśmiennictwo

1. Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A.B.T.: Clinical Mycology. Elsevier, Edinburgh, 2009
2. Arif T., Bhosale J.D., Kumar N., Mandal T.K., Bendre R.S., Lavekar G.S., Dabur R.: Natural products – antifungal agents derived from plants. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**, 621–638 (2009)
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 446–475 (2008)
4. Beule K. De, Gestel J. Van: Pharmacology of itraconazole. *Drugs* **61 Suppl 1**, 27–37 (2001)
5. Bialy Z., Jurzysta M., Mella M., Tava A.: Triterpene saponins from aerial parts of *Medicago arabica* L. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1095–1099 (2004)
6. Bitencourt T.A., Komoto T.T., Massaroto B.G., Miranda C.E.S., Belebony R.O., Marins M., Fachin A.L.: Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, 229 (2013)
7. Blank A.F., Costa A.G., Arrigoni-Blank M.D.F., Cavalcanti S.C.H., Alves P.B., Innecco R., Ehlert P.A.D., Sousa I.F. De: Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Brazilian J. Pharmacogn.* **17**, 557–564 (2007)
8. Boeck P., Leal P.C., Yunes R.A., Filho V.C., Lopez S., Sortino M., Escalante A., Furlan R.L.E., Zacchino S.: Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **338**, 87–95 (2005)
9. Borris R.P.: Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* **51**, 29–38 (1996)
10. Brown G.D., Denning D.W., Levitz S.M.: Tackling Human Fungal Infections. *Science*, **336**, 647 (2012)
11. Cafarchia C., Laurentis N. De, Milillo M.A., Losacco V., Puccini V.: Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parasitologia*, **44**, 153–156 (2002)
12. Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C.: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 291–321 (2009)
13. Cantelli B.A.M., Bitencourt T.A., Komoto T.T., Belebony R.O., Marins M., Fachin A.L.: Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 1389–1394 (2017)
14. Chapman S.W., Sullivan D.C., Cleary J.D.: In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **119**, 197–216 (2008)
15. Cheah H.L., Lim V., Sandai D.: Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. *PLoS One*, **9**, e95951 (2014)
16. Cho S.Y., Jun H. jin, Lee J.H., Jia Y., Kim K.H., Lee S.J.: Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. *FEBS Lett.* **585**, 3289–3296 (2011)
17. Conti B.J., Bufalo M.C., Golim M. de A., Bankova V., Sforcin J.M.: Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 109864 (2013)
18. Cowen L.E.: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 187–198 (2008)
19. Danielewski M., Książczyńska D., Szelańska A.: Non-antibiotic use of antibiotics. *Post. Mikrobiol.* **57**, 301–312 (2018)
20. Denning D.W.: Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 889–891 (2002)
21. Donovick R., Gold W., Pagano J.E., Stout H.A.: Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **3**, 579–86 (1956)
22. Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatophytes: new taxonomy and differentiation methods. Review of current state of knowledge about mechanisms of pathogenesis and pathogen-host interaction. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
23. Facchini P.J., Johnson A.G., Poupart J., Luca V. de: Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol.* **111**, 687–697 (1996)
24. Fewell A.M., Roddick J.G.: Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycol. Res.* **101**, 597–603 (1997)
25. Garvey E.P., Hoekstra W.J., Moore W.R., Schotzinger R.J., Long L., Ghannoum M.A.: VT-1161 dosed once daily or once weekly exhibits potent efficacy in treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1992–1997 (2015)
26. Ghannoum M.A., Rice L.B.: Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 501–517 (1999)
27. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
28. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophytes.

- phyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
29. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: The host range of dermatophytes, it is at all possible? Phenotypic evaluation of the keratinolytic activity of *Trichophyton verrucosum* clinical isolates. *Mycoses*, **62**, 274–283 (2019)
 30. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
 31. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
 32. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
 33. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Post. Mikrobiol.* **58**, 49–58 (2019)
 34. Gull K., Trinci A.P.: Griseofulvin inhibits fungal mitosis. *Nature*, **244**, 292–294 (1973)
 35. Hau C.S., Tada Y., Kanda N., Watanabe S.: Immunoresponses in dermatomycoses. *J. Dermatol.* **42**, 236–244 (2015)
 36. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
 37. Hopkins J.G., Hillegas A.B.: Dermatophytosis at an infantry post; incidence and characteristics of infections by three species of fungi. *J. Invest. Dermatol.* **8**, 291–316 (1947)
 38. Houghton P., Patel N., Jurzysta M., Biely Z., Cheung C.: Antidermatophyte activity of medicago extracts and contained saponins and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* **20**, 1061–1066 (2006)
 39. Hsu C.C., Lai W.L., Chuang K.C., Lee M.H., Tsai Y.C.: The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **51**, 473–482 (2013)
 40. Hube B., Hay R., Brasch J., Veraldi S., Schaller M.: Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *J. Mycol. Med.* **25**, e44–58 (2015)
 41. Jerez Puebla L.E.: Fungal Infections in Immunosuppressed Patients. w: Immunodeficiency. red.: InTech, 2012,
 42. Kanafani Z.A., Perfect J.R.: Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120–128 (2008)
 43. Kerkenaar A.: Inhibition of the sterol $\Delta 14$ -reductase and $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 59 LP – 61 (1990)
 44. Keukens E.A., Vrije T. de, Boom C. van den, Waard P. de, Plasman H.H., Thiel F., Chupin V., Jongen W.M., Kruijff B. de: Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**, 216–228 (1995)
 45. Khan A., Ahmad A., Manzoor N., Khan L.A.: Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 345–349 (2010)
 46. Klein G., Ruben C., Upmann M.: Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Curr. Microbiol.* **67**, 200–208 (2013)
 47. Komoto T.T., Silva G., Bitencourt T., Cestari B.A., Marins M., Fachin A.L.: Evaluation of antifungal and cytotoxic activity of trans-Chalcone and α -Solanine. *BMC Proc.* **8**, P36–P36 (2014)
 48. Koselny K., Green J., DiDone L., Halterman J.P., Fothergill A.W., Wiederhold N.P., Patterson T.F., Cushion M.T., Rappleye C., Wellington M., Krysan D.J.: The celecoxib derivative ar-12 has broad-spectrum antifungal activity *in vitro* and improves the activity of fluconazole in a murine model of *Cryptococcosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 7115–7127 (2016)
 49. Krysan D.J.: Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genet. Biol.* **78**, 93–98 (2015)
 50. Kushwaha A.S., Sharma P., Shivakumar H.N., Rappleye C., Zukiwski A., Proniuk S., Murthy S.N.: Trans-ungual Delivery of AR-12, a Novel Antifungal Drug. *AAPS PharmSciTech* **18**, 2702–2705 (2017)
 51. Lamb J.H., Rebell G., Jones P.E., Morgan R.J., Knox J.M.: Combined therapy in histoplasmosis and coccidioidomycosis: Methyltestosterone and Meth-Dia-Mer-Sulfonamides. *JAMA Dermatology* **70**, 695–712 (1954)
 52. Lee W., Lee D.G.: An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. *IUBMB Life* **66**, 780–785 (2014)
 53. Leem S.H., Park J.E., Kim I.S., Chae J.Y., Sugino A., Sunwoo Y.: The possible mechanism of action of ciclopirox olamine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells*, **15**, 55–61 (2003)
 54. Lemke A., Kiderlen A.F., Kayser O.: Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 151–162 (2005)
 55. Lewis R.E.: Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 805–817 (2011)
 56. Linck V.M., Silva A.L. da, Figueiro M., Caramao E.B., Moreno P.R.H., Elisabetsky E.: Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, **17**, 679–683 (2010)
 57. Liu H., Li J., Zhao W., Bao L., Song X., Xia Y., Wang X., Zhang C., Wang X., Yao X., Li M.: Fatty acid synthase inhibitors from *Geum japonicum* Thunb. var. chinense. *Chem. Biodivers.* **6**, 402–410 (2009)
 58. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health*, **66**, 982–989 (2019)
 59. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. *Post. Mikrobiol.* **58**, 165–176 (2019)
 60. Macura A.B., Pawlik B.: Zarys mikologii lekarskiej. [w:] Zarys mikologii lekarskiej. red.: E. Baran. Volumes, Wrocław 1998, 648
 61. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, **182**, 215–227 (2017)
 62. Martinez-Rossi N.M., Bitencourt T.A., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Gomes E. V, Quaresimin N.R., Martins M.P., Lopes L., Rossi A.: Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* **9**, 1108 (2018)
 63. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, **166**, 369–383 (2008)
 64. McCarthy M.W., Kontoyiannis D.P., Cornely O.A., Perfect J.R., Walsh T.J.: Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *J. Infect. Dis.* **216**, S474–S483 (2017)
 65. Medeiros M.R.F., Prado L.A. de M., Fernandes V.C., Figueiredo S.S., Coppede J., Martins J., Fiori G.M.L., Martinez-Rossi N.M., Belebony R.O., Contini S.H.T., Pereira P.S., Fachin A.L.: Antimicrobial activities of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 193–196 (2011)
 66. Mshvildadze V., Favel A., Delmas F., Elias R., Faure R., Decanosidze G., Kemertelidze E., Balansard G.: Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, **55**, 325–326 (2000)
 67. N.R. Cardoso N., S. Alviano C., Blank A., Teresa V. Romanos M., Fonseca B., Rozental S., Rodrigues I., Alviano D.: Synergism

- effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. *maria bonita* and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, 1–12 (2016)
68. Nakagawa H., Nishihara M., Nakamura T.: Kerion and tinea capitis. *IDCases* **14**, e00418–e00418 (2018)
 69. Narender T., Papi Reddy K.: A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3177–3180 (2007)
 70. Negri M., Salci T.P., Shinobu-Mesquita C.S., Capoci I.R.G., Svidzinski T.I.E., Kioshima E.S.: Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, **19**, 2925–2956 (2014)
 71. Nowakowska Z.: A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 125–137 (2007)
 72. Odds F., Brown A., Gow N.: Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272–279 (2003)
 73. Oliveira Lima M.I. de, Araujo de Medeiros A.C., Souza Silva K.V., Cardoso G.N., Oliveira Lima E. de, Oliveira Pereira F. de: Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *J. Mycol. Med.* **27**, 195–202 (2017)
 74. Oliveira Pereira F. de, Alves Wanderley P., Cavalcanti Viana F.A., Baltazar de Lima R., Barbosa de Sousa F., Oliveira Lima E. de: Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon Winterianus* Jowitt Ex Bor. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 233–242 (2011)
 75. Pandey A., Rai M.: Antimycotic potential in some naturally occurring essential oils. w: Plant-derived antimycotics: Current trends and future prospects. red.: M. k. Rai, D. Mares. Haworth Press, London 2003, s. 344–345
 76. Peana A.T., Marzocco S., Popolo A., Pinto A.: (–)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* **78**, 719–723 (2006)
 77. Pianalto K.M., Alspaugh J.A.: New horizons in antifungal therapy. *J. Fungi* **2**, 26 (2016)
 78. Pinto C.L., Uchoa D.E.D.A., Silveira E.R., Deusdênia O., Pessoa L.: Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. *Quim. Nov. Fac. Ciências da Saúde, Univ. Brasília* **34**, 284–288 (2011)
 79. Portillo A., Vila R., Freixa B., Adzet T., Canigual S.: Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 93–98 (2001)
 80. Prus A.: Pharmacological activities of saponins. *Postępy Fitoter.* 200–204 (2003)
 81. Roemer T., Krysan D.J.: Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014)
 82. Ryder N.S., Mieth H.: Allylamine antifungal drugs. *Curr. Top. Med. Mycol.* **4**, 158–188 (1992)
 83. Safdar A., Bannister T.W., Safdar Z.: The predictors of outcome in immunocompetent patients with hematogenous candidiasis. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 180–186 (2004)
 84. Schell W.A., Jones A.M., Borroto-Esoda K., Alexander B.D.: Antifungal activity of scy-078 and standard antifungal agents against 178 clinical isolates of resistant and susceptible *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
 85. Sousa D.P. de, Nobrega F.F.F., Santos C.C.M.P., Almeida R.N. de: Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 1847–1851 (2010)
 86. Stefanowicz-Hajduk J., Ochocka R.: Steroidal saponins – occurrence, characteristic and application in therapeutics. *Postępy Fitoter.* 36–40 (2006)
 87. Svetaz L., Aguero M.B., Alvarez S., Luna L., Feresin G., Derita M., Tapia A., Zacchino S.: Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med.* **73**, 1074–1080 (2007)
 88. Vandeputte P., Ferrari S., Coste A.: Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, 713687 (2012)
 89. Waldorf A.R., Polak A.: Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 79–85 (1983)
 90. Wieder L.M.: Fungistatic and fungicidal effects of two wood-preserving chemicals on human dermatophytes: ortho (2-chlorophenyl) phenol sodium and tetrachlorophenol sodium. *JAMA Dermatology* **31**, 644–657 (1935)
 91. Yun J., Lee H., Ko H.J., Woo E.R., Lee D.G.: Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1848**, 695–701 (2015)

BIOTECHNOLOGICZNE I BIOMEDYCZNE ZASTOSOWANIA DEHYDROGENAZY CELOBIOZOWEJ GRZYBÓW

Katarzyna Olszewska¹, Anna Olszewska², Jerzy Rogalski¹, Justyna Sulej^{1*}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

²Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Dehydrogenaza cellobiozowa (CDH) należy do zewnątrzkomórkowych enzymów oksydoredukcyjnych, produkowanych przez grzyby rozkładające drewno, należące zarówno do *Basidiomycota* jak i *Ascomycota*. Enzym ten posiada binarną strukturę, zawierającą dwa kofaktory (FAD i hem), zlokalizowane w oddzielnych domenach połączonych proteolitycznie wrażliwym regionem zawiasowym. Ze względu na unikalną budowę oraz właściwości, CDH wykazuje ogromny potencjał aplikacyjny, zarówno biotechnologiczny jak i biomedyczny. Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury dotyczącej właściwości katalitycznych dehydrogenazy cellobiozowej oraz jej potencjalnych zastosowań.

1. Wprowadzenie. 2. Dehydrogenaza cellobiozowa. 2.1. Historia odkrycia i klasyfikacja enzymu. 2.2. Struktura, mechanizm działania i właściwości. 3. Potencjał aplikacyjny dehydrogenazy cellobiozowej. 3.1. Biomedyczne zastosowania. 3.2. Zastosowanie dehydrogenazy cellobiozowej w procesach biotechnologicznych. 4. Podsumowanie

BIOTECHNOLOGICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF FUNGAL CELLOBIOSE DEHYDROGENASE

Abstract: Cellobiose dehydrogenase (CDH) is an extracellular oxidoreductive enzyme produced by wood-decaying fungi belonging to the phylum *Basidiomycota* and *Ascomycota*. This enzyme has a binary structure containing two cofactors (FAD and hem), located in separate domains and connected by a proteolytically sensitive linker. Due to its unique structure and properties, CDH has great potential for application in both biotechnology and biomedical applications. The aim of this paper is to review the literature on catalytic properties of cellobiose dehydrogenase and its potential applications.

1. Introduction. 2. Cellobiose dehydrogenase. 2.1. History of discovery and classification of the enzyme. 2.2. Structure, mechanism of action and properties. 3. Application potential of cellobiose dehydrogenase. 3.1. Biomedical applications. 3.2. Application of cellobiose dehydrogenase in biotechnological processes. 4. Summary

Słowa kluczowe: antyoksydacyjny, biosensory, dehydrogenaza cellobiozowa, grzyby, właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Key words: antioxidant, biosensors, cellobiose dehydrogenase, fungi, antimicrobial properties

1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój populacji ludzkiej wywiera ogromny wpływ na funkcjonowanie wszystkich ekosystemów na Ziemi. Zmieniające się środowisko powoduje modyfikacje całych organizmów, a nawet pojedynczych komórek czy organelli. Żywność i woda zanieczyszczone chemikaliami nie są obojętne dla naszego zdrowia. Często zwiększając okres przydatności pokarmów do spożycia, zmniejszamy szansę naszego organizmu na funkcjonowanie w pełnej homeostazie i utrzymanie zdolności do aktywnej obrony przed patogenami. Gleba przesycona herbicydami i sztucznymi nawozami wydaje plony, które stają się źródłem substancji niekorzystnie oddziałujących na zdrowie konsumentów. Oczyszczanie środowiska ze związków, które z założenia miały oddziaływać pozytywnie na organizmy żywe, a obecnie

są dla nich zagrożeniem, to jedno z zadań współczesnej biotechnologii. Także upowszechnienie antybiotyko-terapii oprócz działania pozytywnego ma swoje negatywne skutki. Coraz większym problemem staje się zjawisko antybiotykooporności. Naukowcy opracowują coraz to lepsze metody zwalczania drobnoustrojów i syntezy leków nowej generacji. Potencjalnym, bardzo obiecującym źródłem substancji bioaktywnych, o działaniu bakteriobójczym, są żyjące wokół nas mikroorganizmy. Dzięki rozwojowi techniki oraz osiągnięciom takich nauk jak biotechnologia, mikrobiologia czy inżynieria genetyczna, możemy nie tylko poznawać mikroorganizmy, ale także wykorzystywać je w praktyce.

Enzymy to substancje białkowe katalizujące reakcje chemiczne zachodzące w przyrodzie. Ich różnorodność zapewnia prawidłowe funkcjonowanie wszystkich procesów biochemicznych. Wykazują one określoną

* Autor korespondencyjny: dr Justyna Sulej, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 48 81 537 50 42; e-mail: justyna.sulej@poczta.umcs.lublin.pl; ORCID: 0000-0003-2220-7558

specyficzność substratową, reaktywność a także właściwości fizykochemiczne, katalityczne czy biologiczne, pożądane w wielu dziedzinach biotechnologii. Dzięki temu, znajdują zastosowanie w medycynie, oraz w różnych gałęziach przemysłu, usprawniając procesy technologiczne, obniżając ich koszt oraz podnosząc wydajność [1]. Według najnowszych badań, światowy rynek enzymów oszacowany w roku 2016 na 5,01 mld USD do roku 2021 osiągnie 6,32 mld [2]. Statystycznie około 65% handlowych enzymów to enzymy techniczne, 25% to enzymy spożywcze, a 10% to enzymy paszowe. Większość enzymów przemysłowych to hydrolazy, jednak to oksydoreduktazy ze względu na ogromny, nie do końca wykorzystany potencjał aplikacyjny oraz bardzo częste występowanie w przyrodzie, są obecnie w centrum zainteresowania największych zespołów badawczych na świecie.

Oksydoreduktazy to enzymy zaklasyfikowane przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej do klasy pierwszej (EC 1), które katalizują reakcje utleniania i redukcji. Oksydoreduktazy grzybowe, o największym znaczeniu biomedycznym i biotechnologicznym, możemy podzielić na:

- peroksydazy i peroksygenazy zawierające w swojej strukturze grupę hemową, aktywowane przez H_2O_2 jako jedyny akceptor elektronów;
- oksydazy i dehydrogenazy zawierające ugrupowanie flawinowe, aktywowane przez O_2 oraz inne utleniacze, takie jak Fe^{3+} i chinony;
- oksydazy i monooksygenazy zawierające jony miedzi [3].

Ze względu na zastosowanie, oksydoreduktazy można podzielić na techniczne (np. w biosensorach analitycznych), stosowane w specjalistycznych syntezach chemicznych (np. synteza i modyfikacja polimerów), środowiskowe (np. oksydacyjna degradacja takich zanieczyszczeń jak polichlorowane bifenyle (PCB) czy związki fenolowe), spożywcze, lecznicze oraz stosowane w segmencie środków higieny osobistej [1].

W grupie oksydoreduktaz grzybowych ostatnio znów bardzo intensywnie badany enzymem jest dehydrogenaza celobiozowa (CDH), odkryta w latach 70. XX wieku. Ze względu na swoje niezwykle właściwości, znajduje ona coraz to nowe zastosowania w różnych gałęziach przemysłu oraz medycynie.

2. Dehydrogenaza celobiozowa

2.1. Historia odkrycia i klasyfikacja enzymu

Dehydrogenaza celobiozowa (CDH) to zewnątrzkomórkowy, ligninocelulolityczny enzym, odkryty w roku 1974 przez Ulle Westmark i Karl-Erika Eriks-

sona. Zaobserwowali oni odbarwienie płytek lignino-agarowych, w obecności celulozy, pod wpływem hodowanych kultur grzybowych, co świadczyło o produkcji przez te grzyby substancji zdolnych do rozkładu kompleksu ligninocelulozowego. Enzym, prawdopodobnie odpowiedzialny za odbarwienie płytek, został wyizolowany i oczyszczony z dwóch gatunków grzybów: *Phanerochaete chrysosporium* (dawniej *Sporotrichum pulverulentum*) i *Trametes versicolor*. Białko to posiadało w swojej strukturze ugrupowanie flawinowe i pierwotnie określone było jako oksydaza celobiozowo-chinonowa (CBQ). Przez wiele lat występowało w katalogu enzymów pod numerem EC 1.1.5.1 [4, 5]. Cztery lata później, w roku 1978 z grzyba *P. chrysosporium* wyizolowano białko o dwóch grupach prostetycznych: flawinowej i hemowej, wykazujące podobne właściwości do CBQ, i nadano mu nazwę „oksydaza celobiozowa” (CBO). Badacze sądzili wówczas, że istnieją dwa niezależne enzymy rozkładające ligninocelulozę: flawoproteina (CBQ) oraz hemoflawoproteina (CBO) [6]. W roku 1992 Jonathan D. Wood i Paul M. Wood w swojej pracy opublikowali dowody na to, że oksydaza celobiozowo-chinonowa to pozbawiona hemu część oksydazy celobiozowej. CBO w wyniku proteolizy ulega rozpadowi na nieaktywny fragment z grupą hemową oraz na posiadający grupę flawinową katalityczny fragment z centrum aktywnym [7]. Ze względu na właściwości enzymu, we wczesnych latach 90. zaproponowano zmianę nazwy tego biokatalizatora na „dehydrogenaza celobiozowa” (cellobiose dehydrogenase), w skrócie CDH [8]. Nazwa ta stosowana jest do dziś, a sam enzym został wpisany do katalogu pod numerem EC 1.1.99.18.

W oparciu o sekwencje genetyczne CDH może być filogenetycznie zaliczane do trzech klas: CDH I, CDH II i CDH III. Pierwsze dwie klasy zbiegają się z genetycznym podziałem organizmów zdolnych do produkcji dehydrogenazy celobiozowej. Klasa trzecia, zawierająca biokatalizatory dotąd niesklasyfikowane, została wprowadzona w roku 2008 [9, 10]. Do klasy I zaszeregowano enzymy syntetyzowane przez grzyby należące do *Basidiomycota*. Grupa ta obejmuje m.in. takie gatunki jak *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*). Do CDH II należą zaś białka wydzielane przez *Ascomycota* (m.in. *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* i *Chaetomium atrobrunneum* [11]). Enzymy poszczególnych klas różnią się między sobą właściwościami. Klasa I charakteryzuje się słabszym utlenianiem cukrów prostych, takich jak glukoza, wydajniejszym działaniem w kwaśnym pH oraz krótszą sekwencją aminokwasową. Enzymy te w domenie flawinowej mają zlokalizowane miejsce wiązania celulozy CBD (cellulose binding domen). Miejsce to, ze względu na swoją konserwatywność, rozpoznaje jedynie celulozę, nie reaguje zaś z ksyłanem, mannanem, skrobią czy chityną [12]. Sekwencja

aminokwasowa enzymów należących do CDH II jest dłuższa, a optimum pH plasuje się w zakresie obojętnym lub zasadowym. Klasa ta została podzielona na dwie podklasy: IIA zawierającą C-końcowy moduł wiążący węglowodany i IIB bez takiego modułu. W odniesieniu do swoistości substratowej, CDH podklasy IIB wykazują mniej wyraźną specyficzność substratową w stosunku do celobiozy niż enzymy podklasy IIA [9].

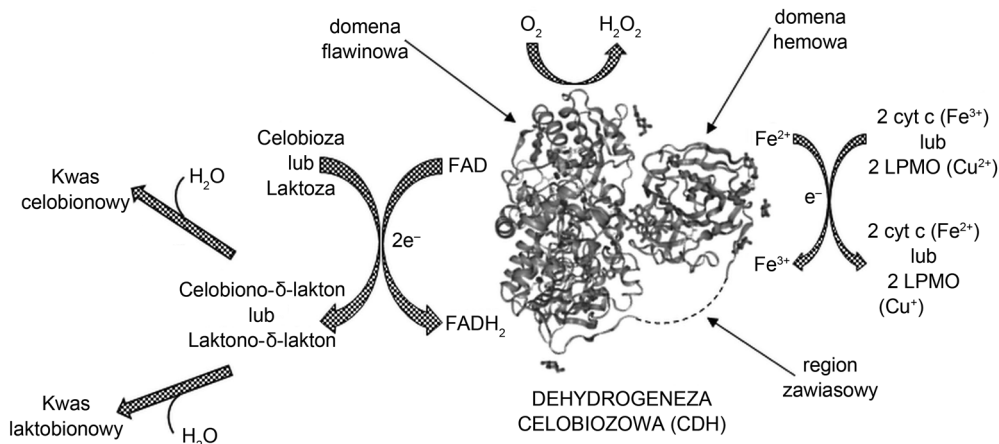
Oczyszczanie dehydrogenazy celobiozowej z kultur grzybowych, hodowanych na podłożu zawierającym celulozę, pomimo dużego stężenia białka w supernatancie, jest procesem trudnym i czasochłonnym. Zastosowanie bioinżynierii, w procesie biosyntezy CDH, z ekonomicznego punktu widzenia jest nieuniknione. Z tego też względu, w ostatnich latach opracowano kilka systemów ekspresji rekombinowanego CDH w komórkach pro- i eukariontów w celu taniej, szybkiej i bezpiecznej produkcji dużych ilości enzymu, który można łatwo oczyścić, ale także poddać modyfikacjom genetycznym [13]. Pałeczka *Escherichia coli* jest jednym z najczęściej stosowanych do produkcji białek rekombinowanych organizmów prokariotycznych. Ekspresja nieszkodzonego CDH, w tym gospodarzu, nie została do tej pory osiągnięta, co wiąże się głównie z brakiem modyfikacji potranslacyjnych (glikozylacja), które wpływają na właściwości dojrzałego białka [5]. Udokumentowanym efektem ekspresji CDH w *E. coli* była funkcjonalnie wyrażona domena flawinowa *P. chrysosporium* [14]. *Pichia pastoris* jest jednym z najczęściej używanych gospodarzy w ekspresji heterologicznej kilku CDH syntetyzowanych przez *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Drożdże te przeprowadzają podstawowe modyfikacje potranslacyjne, wydzielając zazwyczaj duże ilości funkcjonalnych enzymów [15–17]. Rozwój nowych molekularnych narzędzi genetycznych sprawił, że również grzyby nitkowane takie jak *Aspergillus niger*, *A. oryzae* czy *Trichoderma reesei* są stosowane jako gospodarze do produkcji dużych ilości białek ekspresyjnych [18]. Do dnia dzisiejszego tylko dwie dehydrogenazy celobiozowe zostały rekombinacyjnie wyprodukowane w drodze ekspresji w *A. oryzae* [19] i w *A. niger* [17].

2.2. Struktura, mechanizm działania i właściwości

Dehydrogenaza celobiozowa najczęściej jest białkiem monomerycznym, składającym się z dwóch domen połączonych przez proteolitycznie wrażliwy region zawiasowy o długości około 20–35 reszt aminokwasowych [20]. Enzym po trawieniu papainą *In vitro* rozpada się na dwie domeny: flawinową (DH cdh) i cytochromową (CYT cdh). Większa domena (DH cdh) jest związana z dinukleotydem flawinoadeninowym, podczas gdy mniejsza domena cytochromowa (CYT cdh) wiąże się z pojedynczą cząsteczką hemu. Sekwencja domeny cytochromowej jest unikalna w porównaniu

z obecnie znanymi w przyrodzie flawocytochromami. Natomiast ze względu na sekwencję domeny flawinowej CDH, ta katalitycznie aktywna podjednostka zaliczana jest do rodziny oksydoreduktaz GMC (glukoza-metanol-cholina) [5]. Domena cytochromowa, znajdująca się na N-końcu łańcucha białkowego, zawiera hem b, który pełni funkcję kofaktora. Koniec C białka zawiera domenę flawinową, która jest niekowalencyjnie związana z fragmentem FAD [21]. Występowanie obok siebie grupy flawinowej i hemowej w jednym białku katalitycznym, jest unikalne wśród enzymów zewnątrzkomórkowych i zapewnia niezwykle właściwości CDH, które mogą mieć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu oraz w medycynie [22].

Funkcja biologiczna dehydrogenazy celobiozowej, pomimo wielu lat badań, nadal nie została do końca wyjaśniona. Enzym ten uczestniczy w degradacji celulozy, a badania prowadzone w ciągu ostatniej dekady dowodzą, że proces ten wymaga współdziałania CDH z lityczną monoooksygenazą polisacharydową (LPMO). Celobioza jest naturalnym substratem dla dehydrogenazy celobiozowej, która utlenia ten związek do celobionolaktonu [23]. Podczas tego procesu powstają dwa elektrony, które są następnie przenoszone przez CDH na LPMO. Zredukowane LPMO może dalej reagować z tlenem i tworzyć rodniki, które atakują matrycę celulozową, co ułatwia jej penetrację i rozkład. Lityczne monoooksygenazy polisacharydowe wyróżniają się wśród oksydoreduktaz miedziowych, ponieważ są zdolne do oksydacyjnego rozbijania krystalicznej celulozy, której dezintegracja jest nadal poważnym problemem przemysłowym [3]. Wobec tego dehydrogenaza celobiozowa uczestniczy w systemie degradacji celulozy na dwa sposoby: poprzez utlenianie celobiozy i/lub funkcjonowanie jako enzym redoks integrujący działanie LPMO. Enzym CDH może również redukować Fe^{3+} do Fe^{2+} i O_2 do H_2O_2 [24]. Podczas reakcji redukcji, β -D-celobioza jest utleniana, tworząc w ten sposób celobionolakton, który jest następnie hydroli-zowany w dużej ilości wody do odpowiedniego kwasu karboksylowego. Następuje przepływ elektronów z centrum katalitycznego, przy udziale grupy FAD, która zostaje zredukowana do $FADH_2$ [25], poprzez między domenowy transfer elektronów do domeny hemowej [26]. Akceptorem elektronów jest kompleks żelazowy, prawdopodobnie z atomem Fe^{3+} . Zredukowana CDH ulega ponownemu utlenieniu przez akceptory elektronów, takie jak 1,2- lub 1,4-benzochinon, kationy ABTS oraz skompleksowane jony metali, takie jak Fe^{3+} , Cu^{2+} i Mn^{3+} lub tlen. Otrzymane jony żelaza mogą następnie uczestniczyć w reakcji Fentona, której produktami są wysoko reaktywne rodniki hydroksylowe. W nienaruszonym enzymie hem stymuluje redukcję Fe^{3+} działając jako akceptor elektronów lub bezpośrednio redukując Fe^{3+} [27] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat cyklu katalicznego oraz łańcucha transportu elektronów w dehydrogenazie celobiozowej z *Myriococcum thermophilum* [MtCDH (pdb 4QI6)] [21]

3. Potencjał aplikacyjny dehydrogenazy celobiozowej

Złożoność organizmu ludzkiego sprawia, że przy opracowywaniu nowych wyrobów biomedycznych należy uwzględnić interakcje pomiędzy substancjami wchodzącymi w skład naszego ciała, a komponentami

produktów medycznych. Działania niepożądane mogą być przyczyną nie tylko braku skuteczności działania opracowanych rozwiązań, ale także wywoływać nowe schorzenia. Aby zminimalizować ryzyko takiej sytuacji, coraz częściej stosowane są substancje pochodzenia naturalnego, pozwalające uniknąć przykrych konsekwencji zjawiska nietolerancji (Tab. I).

Tabela I
Grzyby produkujące CDH o najwyższym potencjale aplikacyjnym

Źródło enzymu	Klasa enzymu	Zastosowanie	Piśmiennictwo
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[22, 23]
		Biosensor do detekcji katecholamin	[24]
<i>Phanerochaete sordida</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[25–27]
<i>Trametes villosa</i>	CDH I	Biosensor laktozowy	[22, 25]
		Bioogniwo paliwowe	[28]
<i>Sclerotium rolfsii</i> (<i>Athelia rolfsii</i>)	CDH I	Biosensor do detekcji katecholamin	[24]
		Produkcja kwasu laktozowego	[29]
<i>Corynascus thermophilus</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[30]
		Biosensor laktozowy	[31]
		Biosensor glukozowy	[32–34]
		Język bioelektroniczny	[35]
<i>Dichomera saubinetii</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[36]
<i>Myriococcum thermophilum</i>	CDH II	Biosensor glukozowy	[37, 38]
		Język bioelektroniczny	[35]
		Synteza nadtlenu wodoru	[39]
		Wybielanie papieru	[40]
		System regeneracji przeciwutleniaczy	[41]
		Systemy przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe	[42–44]
		Detoksykacja	[45]
<i>Humicola insolens</i>	CDH II	Bioogniwo paliwowe	[46]
<i>Chaetomium cellulolyticum</i> (<i>Collariella virescens</i>)	CDH II	Degradacja celulozy	[47]
<i>Neurospora crassa</i>	CDH II	Produkcja kwasu celobionowego	[48–50]
		Język bioelektroniczny	[35]

3.1. Biomedyczne zastosowania

Doskonałymi komponentami materiałów biomedycznych, o dużym potencjale aplikacyjnym, są enzymy a w tym także dehydrogenaza celobiozowa. Perspektywa zastosowania tego biokatalizatora wynika między innymi ze specyficzności substratowej oraz zdolności do bezpośredniego transferu elektronów, co wykorzystywane jest w biosensorach i bioogniwach paliwowych. Enzymy syntetyzowane przez *Ascomycota*, posiadają moduł wiążący węglowodany, dzięki czemu wykazują szerszą specyficzność substratową niż CDH wyizolowane z *Basidiomycota*. Reagują one z mono-, di- i oligosacharydami, w tym także z glukozą, powszechnie występującą w organizmie ludzkim.

Ważnym aspektem zastosowania CDH, zarówno w procesach biotechnologicznych jak i biomedycznych, są także produkty powstające w wyniku reakcji enzymatycznych katalizowanych przez to białko. Cukry znajdujące się w organizmie ludzkim, ale także w środowisku naturalnym, mogą stanowić potencjalne substraty dla CDH, umożliwiając poprawne działanie tego enzymu. W wyniku ich utleniania powstają kwasy aldonowe, stosowane w wielu dziedzinach. Podczas reakcji enzymatycznej następuje także przeniesienie elektronów na tlen cząsteczkowy. Produktem ubocznym tej reakcji jest nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący silnym środkiem utleniającym, wykazującym właściwości dezynfekujące oraz antyseptyczne [46].

Systemy przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe oparte na CDH

Zdolność dehydrogenazy celobiozowej do wytwarzania nadtlenu wodoru przy udziale tlenu cząsteczkowego jako akceptora elektronów uczyniła ten enzym bardzo interesującym kandydatem do opracowywania systemów antybakteryjnych, zapobiegających kolonizacji implantów lub cewników moczowych poprzez hamowanie tworzenia biofilmów [49]. Nadtlenek wodoru to związek, który już w niskich stężeniach rzędu 0,25–3% wykazuje właściwości antyseptyczne i dezynfekujące. Działa on na bakterie m.in. poprzez peroksydację i przerwanie błony komórkowej, utlenianie nukleozydów, hamowanie syntezy białek oraz inhibicję enzymów. Następstwem tych zjawisk jest śmierć komórki [58]. Niewątpliwą zaletą H_2O_2 jest jego niska stabilność w roztworze, która pozwala na precyzyjną lokalizację jego działania. Aktywność systemu wytwarzania H_2O_2 z udziałem CDH może być kontrolowana przez podawanie do środowiska reakcji odpowiedniego substratu. Co więcej wydajność powyższego układu wykazuje stechiometryczną zależność tzn. podanie do układu 2 mM celobiozy powoduje wytworzenie 2 mM nadtlenu wodoru. Prowadzone badania dowodzą, że całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustrojów z gatunku

Escherichia coli i *Staphylococcus aureus* można osiągnąć poprzez dodanie do układu 0,8 mM celobiozy, zaś 50% redukcja zachodzi na poziomie odpowiednio 0,25 mM dla *E. coli* i 0,19 mM dla *S. aureus* [59]. W ostatnich latach przeprowadzono badania nad możliwym zastosowaniem dehydrogenazy celobiozowej do wytwarzania nadtlenu wodoru, dezynfekującego cewniki moczowe. Są one standardowymi narzędziami medycznymi stosowanymi na całym świecie. Obecnie przeprowadza się u pacjentów częstą wymianę cewników, co powoduje znaczne niedogodności i zwiększa koszty opieki zdrowotnej. Infekcje cewników powodowane są głównie przez drobnoustroje z rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Enterobacter*, które przylegają do powierzchni cewnika w złożonym biofilmie [60]. Badania wykazały, że rekombinacyjnie wytwarzany w *Pichia pastoris* CDH z *Myriococcum thermophilum* całkowicie hamuje wzrost *E. coli* i *S. aureus* zarówno w ciekłym, jak i stałym podłożu, gdy jest ono uzupełnione o 0,8 mM lub 2 mM roztwór celobiozy. W ten sam sposób wzbogacając układ w 1 mM roztwór celobiozy możemy hamować tworzenie się biofilmu na foliach silikonowych. System CDH/celobioza skutecznie hamował wiele mikroorganizmów kolonizujących cewniki, w tym lekooporne szczepy *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Co ciekawe, CDH utleniał również zewnątrzkomórkowe polisacharydy (exPS) wytwarzane przez mikroorganizmy, generując nadtlenek wodoru w układzie nie zawierającym celobiozy. Produkcja H_2O_2 , a w konsekwencji właściwości przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe, wzmocnione zostały przez włączenie do systemu hydrolaz glikozydowych, takich jak α -amylazy. Przeprowadzały one hydrolizę polisacharydów, zwiększając liczbę końcowych substratów dla CDH i destabilizowały strukturę biofilmu [49]. Aby przetestować skuteczność tego systemu w środowisku medycznym zespół badawczy profesora G.S. Nyanhongo wyizolował bakterie powszechnie zasiedlające cewniki, a następnie inkubował je z CDH w obecności celobiozy. Testy *in vitro* wykazały, że układ zawierający 10 mM roztwór wymienionego wyżej dwucukru i CDH, całkowicie eliminuje *S. aureus* i *A. baumannii* oraz intensywnie hamuje wzrost *S. epidermidis* i *S. maltophilia*. Badane szczepy bakteryjne, podobnie jak większość organizmów tlenowych, posiadały zdolność do syntezy katalazy, enzymu rozkładającego H_2O_2 . Oznacza to, że były one wyposażone w czynnik oporności, który czynił te szczepy niewrażliwymi na nadtlenek wodoru. Wykorzystywanie celobiozy jako substratu w reakcji wytwarzania nadtlenu wodoru z udziałem CDH jest również bardzo korzystne z medycznego punktu widzenia, gdyż cukier ten nie należy do łatwo przyswajalnych źródeł węgla dla mikroorganizmów. Dzięki temu możemy już w pewien

sposób ograniczać ich wzrost. Ponadto CDH może wykorzystywać również inne substraty, takie jak oligo- i polisacharydy obecne w systemach biomedycznych [59]. Daje nam to możliwość dostosowania rodzaju substratów reakcji do typu środowiska. Zjawisko powstawania biofilmu odgrywa ogromną rolę we współczesnej walce człowieka z patogennymi mikroorganizmami. Stopień ekspansywności tej struktury bakteryjnej obrazuje fakt, iż 80% wszystkich zakażeń drobnoustrojami ma związek z powstaniem biofilmu [61]. Jego wytworzenie sprawia, że konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe stają się nieskuteczne. Proces ten zachodzi według następującego schematu: odwracalne przyłączenie bakterii do powierzchni, nieodwracalna adhezja, wzrost i podział bakterii, tworzenie zewnętrznej osłonki i powstanie biofilmu, nabycie przez biofilm struktury trójwymiarowej [62]. Główną funkcją biofilmu jest ochrona drobnoustrojów przed negatywnym wpływem środowiska zewnętrznego [63]. Mikroorganizmy tworzące biofilm są bardziej odporne na antybiotykoterapię i trudniejsze do usunięcia. Z tego względu zapobieganie powstawaniu biofilmu jest kluczowe dla udanej strategii walki z infekcjami wywoływanymi przez mikroorganizmy zasiedlające powierzchnię biomateriałów medycznych [49]. Biofilmy odporne na antybiotykoterapię stają się źródłem ciągle nawracających i przewlekłych zakażeń. Dzieje się tak dlatego, że bakterie żyjące wewnątrz tej struktury są dobrze chronione przed środkami bójczymi, które mają ograniczony dostęp do patogenów. Dochodzi do powstawania opornych fenotypów oraz modyfikacji mikrośrodowiska [64]. Jednym z rozwiązań, które możemy zastosować do walki z biofilmami, jest unieruchomienie na powierzchni chronionych struktur enzymów, które dzięki swoim właściwościom zdolne są do zakłócania ważnych dla komórek bakteryjnych procesów, hamowania ich wzrostu i podziału oraz niszczenia składników niezbędnych do osiągnięcia przez biofilm stabilności [51]. Badacze z zespołu profesora G.S. Nyanhongo przyłączyli dehydrogenazę celobiozową do powierzchni cewników moczowych wykonanych z polidimetylosiloksanu (PDMS) i obserwowali wpływ enzymu na proces tworzenia się biofilmów [59]. Enzym CDH wbudowany został w środek poślizgowy, tradycyjnie stosowany w celu zminimalizowania dyskomfortu podczas cewnikowania [49]. Badania wykazały, że immobilizowany enzym był w stanie zakłócać wczesne etapy powstawania biofilmu (próba na *S. aureus*). Żywotność komórek bakteryjnych w tym układzie była o 70% niższa niż tych pochodzących z próby kontrolnej, a całkowita biomasa zdeponowana na powierzchni cewników zmniejszyła się o 30%. Inny eksperyment pokazuje, że antybiofilmowe działanie CDH aktywne jest przez dłuższy czas, gdyż po tygodniu umieszczona na cewnikach biomasa bakteryjna zmniejszyła się o 70% [50]. Badania te pokazują, że dehydrogenaza celobio-

zowa jest enzymem, który w efektywny sposób może być wykorzystywany w takich aplikacjach jak systemy antybiofilmowe i komponenty biomateriałów.

System regeneracji przeciwutleniaczy

Rany przewlekłe, stanowiące poważny problem zdrowotny, definiuje się jako trudne do wyleczenia i pozostające w fazie zapalnej przez nieprzewidywalny czas. Dużą przeszkodą pojawiającą się podczas próby ich leczenia jest ciągle uwalnianie proteaz, wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu (ROS) i reaktywnych form azotu (RNOS) oraz duże ilości wysięków sprzyjających zakażeniom mikrobiologicznym. W ostatnich latach zespół profesora Nyanhongo opracował hydrożel na bazie CDH, który może zrewolucjonizować sektor opatrunków medycznych [65]. Skonstruowano go poprzez włączenie związku fenolowego – katecholu (pełniącego funkcję przeciwutleniacza) i celobiozy do hydrożelu (alginianu i/lub żelatyny), tworząc w ten sposób wielofunkcyjny polimer pomocny w leczeniu chronicznych ran. Hydrożele te wspomagają proces gojenia w dwojaki sposób. CDH włączony do hydrożelu regeneruje cyklicznie przeciwutleniacze po tym, jak zostają one zużyte w procesie neutralizacji wolnych rodników. Równocześnie ciągła produkcja H_2O_2 hamuje rozwój mikroorganizmów i odkaża ranę. Wyniki badań wskazują, że opatrunki te mogą całkowicie zahamować wzrost *S. aureus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Bacillus subtilis* oraz *Pseudomonas putida*, umożliwiając tym samym sprawne gojenie się rany [59].

Produkcja bioaktywnych cząsteczek na bazie CDH

Kwasy aldonowe, zwane także kwasami cukrowymi, to związki, które znajdują szerokie zastosowania biomedyczne. Wykorzystywane są między innymi jako środki nawilżające i bioaktywne w medycynie, a w transplantologii jako składniki roztworów do przechowywania narządów przygotowanych do przeszczepów. Z nich także w przemyśle farmaceutycznym i chemicznym syntetyzuje się biokompatybilne i biodegradowalne systemy dostarczania leków [66]. Proces ich syntezy prowadzony w sposób tradycyjny jest źródłem wielu nieprzyjaznych dla środowiska substancji takich jak wodorotlenki bromu, miedzi lub srebra [67], dlatego tak ważne jest opracowanie alternatywnych metod ich otrzymywania. Jednym z powszechnie używanych związków z tej grupy jest kwas laktobionowy (LBA). Związek ten jest obecnie najbardziej rozpowszechnionym składnikiem systemów chłodniczych stosowanych do stabilizacji narządów przed przeszczepem. Znajduje również zastosowanie w kosmetologii jako środek do wygładzania zmarszczek, ogólnej pielęgnacji skóry i jej wytworów [68, 69]. Jego syntezę można przeprowadzić z udziałem CDH, która w temperaturze 25–50°C biotransformuje laktozę

w laktono- δ -lakton, ulegający spontanicznej hydrolizie w roztworach wodnych do LBA. W tych warunkach po 2,5 godz. inkubacji zachodzi 100% przekształcenie wyjściowego cukru w kwas laktobionowy [70]. Enzymatyczne utlenianie laktozy jest znacznie wydajniejsze niż procesy chemicznego otrzymywania LBA [71]. Dehydrogenaza celobiozowa wykazuje jak dotąd najwyższą selektywność (na poziomie 100%) i wydajność (95%) spośród dotychczas testowanych enzymów [72]. Zapewnia to duży spadek kosztów procesu oraz oszczędność czasu.

Celobioza będąca naturalnym substratem dla CDH utleniana jest przez ten enzym do kwasu celobionowego. Związek ten jest wysoce higroskopijny. Właściwość ta została wykorzystana do produkcji nawilżających skórę matryc żelowych. W obecności tego enzymu zachodzą również reakcje utleniania pochodnych celulozy zawierających grupy aminowe, acetamidowe i azydowe [73]. Związki te badane są pod kątem wykorzystania jako biomedyczne systemy dostarczania leków oraz prekursorów podczas syntezy substancji pomocniczych w farmakologii [74].

Produkcja prebiotyków bez laktozy

Prebiotyk określa się jako substrat selektywnie wykorzystywany przez mikroorganizmy gospodarza, zapewniający mu korzyści zdrowotne. Termin ten może być stosowany tylko wtedy, gdy korzystny wpływ na zdrowie związany jest z modulacją mikrobioty w określonej lokalizacji [75]. Do substancji prebiotycznych zaliczamy m.in. galakto-oligosacharydy (GOS) będące złożonymi mieszaninami różnych cukrów wytwarzanych poprzez transgalaktozylację laktozy przy użyciu enzymu β -galaktozydazy [76]. Szczególnie stymulują one wzrost bakterii z grup *Bifidobacteria* i *Lactobacillus*. Przyczynia się to do zwiększonego wchłaniania minerałów przez organizm ludzki, hamowania rozwoju patogenów oraz modulacji układu odpornościowego. Jednakże komercyjne GOS-y zawierają w swoim składzie jednostki galaktolaktozy, co stanowi duży problem, ponieważ obecnie około 70% populacji światowej cierpi na niedobór β -galaktozydazy w jelicie cienkim [77]. Defekt ten powoduje zwiększoną wrażliwość na laktozę, której usunięcie z GOS jest trudne i nieopłacalne [59]. Aby rozwiązać ten problem możemy wykorzystać zdolność CDH do biotransformacji laktozy w LBA omówioną w poprzednim podrozdziale. Kwas laktobionowy wytworzony z laktozy w obecności CDH zostaje następnie usunięty z preparatu za pomocą chromatografii jonowymiennej [5].

3.2. Zastosowanie dehydrogenazy celobiozowej w procesach biotechnologicznych

Enzymy grzybowe wykazują znaczny potencjał biotechnologiczny ze względu na unikalne właściwości. Stoso-

wane są w biodegradacji związków toksycznych, konwersji polimerów czy produkcji substancji bioaktywnych.

Dehydrogenaza celobiozowa, ze względu na zdolność do rozkładu i modyfikacji składników kompleksu ligninocelulozowego, może znaleźć praktyczne zastosowanie w przemyśle celulozowo-papierniczym w procesie wybielania papieru obok powszechnie używanych do tego celu enzymów ligninolitycznych takich jak lakaza czy peroksydazy manganozależna (MnP) i ligninowa (LiP) [78, 79]. Właściwości CDH nie ograniczają się jedynie do degradacji składników drewna. Prowadzone przez grupy rosyjskich naukowców badania wykazały, że enzym ten może rozkładać różnego rodzaju związki o charakterze ksenobiotyków. Zaobserwowano zdolność CDH do biodegradacji m.in: poliakrylanu, kopolimeru akrylanowo-akrylamidowego, heksohydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyny oraz herbicydów triazynowych (np. atrazyny). W latach 90. w Europie, jednym z najczęściej stosowanych herbicydów była atrazyna, wykazująca silne właściwości karcinogenne. Związek ten pomimo wycofania z użycia ciągle znajduje się zarówno w wodach gruntowych jak i glebie. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania dehydrogenazy celobiozowej w procesie usuwania zanieczyszczeń środowiska, między innymi z takich związków jak pestycydy [79, 80], co sugeruje potencjalne zastosowanie CDH w bioremediacji związków powszechnie zanieczyszczających środowisko. Zdolność CDH do usuwania toksyn wykazali także naukowcy z dwóch zaprzyjaźnionych uniwersytetów wiedeńskich poddając procesowi detoksykacji pozostałości po tłoczeniu oliwy z oliwek. Po raz pierwszy oceniali oni współdziałanie CDH i lakazy, wykorzystując odpady poddane działaniu enzymów jako substraty do produkcji biogazu [52].

W ostatniej dekadzie, wiele zespołów badawczych skupiło się na synergistycznym działaniu CDH i litycznej monoooksygenazy polisacharydowej (LPMO). Enzymy te uczestniczą w rozkładzie celulozy będącej potencjalnym substratem w produkcji biopaliw nowej generacji [81].

Dehydrogenazy celobiozowe mogą być również stosowane jako biokomponenty w biosensorach amperometrycznych lub przy konstrukcji enzymatycznych bioogniw paliwowych, ze względu na sposób przenoszenia elektronów w układzie katalitycznym, oraz specyficzność substratową biokatalizatora.

Biosensory enzymatyczne oparte na CDH

Dehydrogenazy celobiozowe to wszechstronne biokatalizatory, zdolne do wykrywania węglowodanów, a także chinonów i katecholamin. Biosensory oparte na CDH znalazły swoje zastosowanie w wielu różnych dziedzinach biotechnologii, technologii żywności, rolnictwie, ochronie zdrowia, medycynie czy monitorowaniu zanieczyszczeń [82]. W zależności od źródła z jakiego

oczyszczono białko, specyficzne właściwości katalityczne enzymu umożliwiają utlenianie różnych substratów, a zatem użycie różnych analitów w zakresie zastosowań biosensora. Klasa I CDH, syntetyzowana przez grzyby należące do *Basidiomycota*, wykazuje bardzo wysoką specyficzność w stosunku do substratów połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym, a zatem są to idealne biokomponenty do wykrywania celobiozy i laktozy [83]. Pierwszy biosensor zawierający CDH skonstruowano na początku lat dziewięćdziesiątych w grupie badawczej Lindquista, na bazie węgla szklanego, CDH (*Phanerochaete chrysosporium*) oraz osmu, oznaczając ilościowo zawartość celobiozy i laktozy [84]. Ze względu na wysoką toksyczność jonów osmu, praktyczne zastosowanie takiego układu było znacznie ograniczone. Jednakże potrzeba opracowania metody szybkiej detekcji laktozy w środkach spożywczych, wynikająca z coraz częstszych nietolerancji tego disacharydów społeczeństwie, doprowadziła do intensyfikacji badań. Poszukiwano nietoksycznych substancji łączących biokatalizator do powierzchni czujnika. Zastosowanie nanorurek węglowych w analizach elektrochemicznych, doprowadziło do przełomu w badaniach. Amperometryczne biosensory trzeciej generacji, o bardzo dużej czułości, bazujące na CDH z *Trametes villosa* lub *Phanerochaete sordina* zostały opracowane do zastosowań w przemyśle mleczarskim [32, 83].

Odkrycie CDH produkowanych przez *Ascomycota*, należących do klasy II, zdolnych do utleniania także monosacharydów, stworzyło możliwość zaprojektowania bioczujnika glukozowego opartego na dehydrogenazie celobiozowej. Określono właściwości katalityczne oraz profile pH kilku CDH, jednak najbardziej obiecujące, jako składnik biosensora glukozowego, okazały się enzymy z *Corynascus thermophilus* (CtCDH) [40, 41] i *Myriococcum thermophilum* (MtCDH) [44, 45], ze względu na zdolność do bezpośredniego przeniesienia elektronów (DET – direct electron transfer) w fizjologicznym dla człowieka pH [85].

Biosensory bazujące na elektrodzie grafitowej zmodyfikowanej CDH stosowane są także do prostego i szybkiego pomiaru zawartości związków fenolowych w środowiska [86]. Możliwe jest również monitorowanie stężenia katecholamin będących prekursorami neurotransmiterów i hormonów, w medycynie przy leczeniu zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych [78].

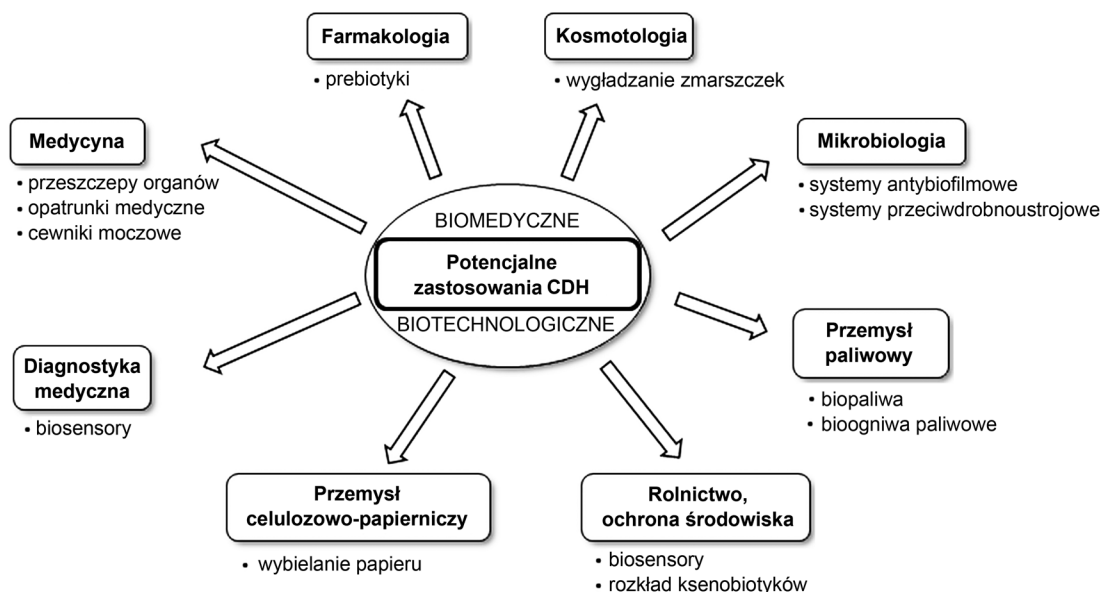
Innym, ciekawym zastosowaniem CDH jako elementu detekcyjnego, jest konstrukcja tzw. elektronicznych języków (electronics tongues, ET). Są to systemy wieloczujnikowe wykorzystujące reakcje krzyżowe, które mogą przetwarzać sygnał za pomocą zaawansowanych metod matematycznych opartych na rozpoznawaniu wzorców i/lub wielowymiarowej analizie danych. Umożliwiają one interpretację kompozycji złożonych analitów oraz odróżnianie elementów pierwotnych

od zakłócających [87]. Matryce czujnikowe, których sygnały analizowane są przez odpowiednie procedury numeryczne (tzw. elektroniczne języki) charakteryzują się odmienne w stosunku do klasycznej analizy chemicznej podejście. Zamiast oznaczania wybranych substancji w badanych próbkach, matryce najczęściej mają za zadanie określić cechy jakościowe próbek niezwiązane z jej pojedynczymi, analizowanymi oddzielnie składnikami. Dzięki temu możliwe jest na przykład określenie przydatności do spożycia, wartości odżywczej, odpowiedniego czasu leżakowania lub fermentacji. Z tego względu w ciągu ostatnich kilkunastu lat matryce czujnikowe z powodzeniem wykorzystywane były w szeregu aplikacji – od analizy żywności, przez monitoring środowiskowy i procesowy, do diagnostyki medycznej [88, 89]. Systemy ET oparte na cząsteczkach biologicznych, takich jak enzymy, nazywane są językami bioelektronicznymi (bioelectronics tongues, BioET). Zastosowanie CDH w BioET jest związane z dużą różnorodnością form enzymów pochodzących z różnych źródeł, która pozwala na dostosowanie systemu do wykrywania różnych analitycznie istotnych cukrów, takich jak np. laktoza, maltoza i celobioza. Istotna była również, niedawno odkryta zależność poziomu aktywności enzymu od obecności w środowisku kationów, a w szczególności Ca^{2+} . Właściwość ta sprawia, że białka z klasy II, które są w większym stopniu regulowane przez Ca^{2+} , mogą być używane do określania zawartości jonów wapnia w mleku. Dodatkowo wykorzystując reakcję krzyżową CDH różnego pochodzenia z laktozą i glukozą oraz interferującymi kationami Ca^{2+} można przeprowadzić rozdzielenie tych analitów [42].

Bioogniwa paliwowe oparte na CDH

Konstrukcja bioogniw paliwowych (biofuel cells, BFC) opartych na działaniu dehydrogenazy celobiozowej, to kolejna aplikacja wykorzystująca bioelektrochemiczne właściwości CDH. Enzym ten dzięki możliwości zarówno bezpośredniego (DET) jak i pośredniego (MET – mediated electron transfer) transferu elektronów, stał się interesującym składnikiem anodowej części bioogniwa paliwowego. Urządzenia te są w stanie przekształcić energię chemiczną w elektryczną przeprowadzając reakcje biochemiczne odbywające się za pomocą biokatalizatorów, katalizujących utlenianie biopaliwa i redukcję utleniacza [90]. Urządzenia zasilane bioogniwami mogą być w prosty sposób miniaturyzowane, dlatego ich potencjał aplikacyjny związany jest głównie z zasilaniem niewielkich wszczepialnych lub przenośnych urządzeń, także biomedycznych [91].

Początkowe prace nad zastosowaniem CDH w bioogniwach paliwowych oparte były na elektrodach grafitowych modyfikowanych zaadsorbowanym enzymem. Białka należące do klasy I CDH produkowane przez *Phanerochaete chrysosporium* [33, 45], *Trametes villosa*



Ryc. 2. Potencjalne zastosowania dehydrogenazy celobiozowej w procesach biomedycznych i biotechnologicznych

[29, 35] i *Dichomera saubinetii* [43] oraz klasy II CDH z *Myriococcum thermophilum* [45] i *Corynascus thermophilus* [38] zostały użyte we wstępnych badaniach z laktozą i glukozą jako paliwem anodowym [83]. Przykładem takiego bioogniwa jest zaprojektowany przez Comana i wsp. [43] model bioogniwa paliwowego, w którym dehydrogenaza celobiozowa stanowi bioanodę, natomiast na katodzie immobilizowana jest lakaza. W ostatnich latach badania nad bioogniwami paliwowymi prowadzone są bardzo intensywnie, skutkując zgłoszeniami patentowymi obiecujących mikrosystemów stosowanych w dyscyplinach medycznych i inżynierskich. Wykazano możliwość tworzenia miniaturowanych, samodzielnego biourządzeń zasilanych bioogniwem, w którym CDH unieruchomiono na anodzie a oksydazę bilirubinową (BOD) na katodzie. Ogniwko to umożliwia produkcję nowej generacji bezprzewodowych interfejsów neuronalnych znajdujących zastosowanie kliniczne. Używa się ich również w przeprowadzanych *in vivo* badaniach neurofizjologicznych. Dzięki połączeniu ogniwa i metody spektroskopii impedancyjnej (EIS) zademonstrowano sprzężenie indukcyjne między urządzeniem a neuronami mózgu szczura [85]. Kolejnym przykładem urządzeń zasilanych energią pochodzącą z BFC jest elektroniczna soczewka kontaktowa. Zastosowany w niej układ CDH/BOD do wytwarzania prądu wykorzystuje glukozę i tlen rozpuszczone we łzach [92]. Ryc. 2

4. Podsumowanie

Dehydrogenaza celobiozowa jest enzymem, który dzięki oryginalnej strukturze i właściwościom może być stosowany w wielu procesach biotechnologicznych oraz

w medycynie. Intensywnie prowadzone badania dostarczają coraz to nowych możliwości aplikacyjnych tego białka. Rozpoczynając od degradacji ligninocelulozy, będącej substratem w produkcji biopaliw, umożliwiając tym samym prowadzenie procesów technologicznych w sposób bardziej przyjazny dla środowiska. Poprzez procesy detoksykacyjne, aż do zastosowań bioelektrochemicznych związanych z detekcją lub zasilaniem wszczepialnych i przenośnych urządzeń, zwłaszcza biomedycznych. Biomedyczne zastosowania tego enzymu obejmują takie dziedziny jak antybiotykoterapia, sektor opatrunków, regeneracja przeciwutleniaczy, a przede wszystkim systemy antibiofilmowe. Właściwości antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe CDH są obecnie intensywnie badane pod kątem nowych możliwości zastosowania w przemyśle spożywczym a dokładniej w opakownictwie. Zastosowanie tego enzymu może stać się alternatywą dla posiadającej podobne właściwości oksydazy glukozowej, stosowanej także w sektorze opakowań.

Dehydrogenaza celobiozowa używana jest również do produkcji cząsteczek bioaktywnych takich jak np. kwasy aldonowe, których zastosowanie wykracza poza obszar medycyny. Niezwykle istotna jest także możliwość zastosowania CDH w procesie produkcji prebiotyków niezawierających laktozy. Możliwości zastosowania tego biokatalizatora są bardzo szerokie i z pewnością wciąż nie do końca odkryte. Dlatego tak ważne jest nieustanne pogłębianie naszej wiedzy o tym enzymie, ale również o innych białkach katalitycznych, które mogą zrewolucjonizować przemysł i rynek produktów medycznych. Otaczające nas mikroorganizmy są źródłem substancji bioaktywnych o ogromnym potencjale aplikacyjnym.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego z środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2015/17/D/NZ9/02066.

Piśmiennictwo

- Xu F.: Applications of oxidoreductases: recent progress. *Ind. Biotechnol.* **1**, 38–50 (2005)
- Chapman J., Ismail A., Dinu C.: Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, DOI: 10.3390/catal8060238 (2018)
- Martínez A.T., Alcande M. i wsp.: Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.* **35**, 815–831 (2017)
- Westermarck U., Eriksson K.-E.: Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta. Chem. Scand.* **828**, 209–214 (1974)
- Zamocky M., Ludwig R., Peterbauer C., Hallberg B.M., Divne C., Nicholls P., Haltrich D.: Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 255–280 (2006)
- Ayers A.R., Ayers S.B., Eriksson K.-E.: Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* **90**, 171–181 (1978)
- Wood J.D., Wood P.M.: Evidence that cellobiose:quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase. *Biochim. Biophys.* **1119**, 90–96 (1992)
- Cameron M.D., Aust S.D.: Cellobiose dehydrogenase – an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzym. Microb. Technol.* **28**, 129–138 (2001)
- Harreither W., Sygmund C., Augustin M., Narciso M., Rabinovich M.L., Gorton L., Haltrich D., Ludwig R.: Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1804–1815 (2011)
- Sulej J., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Rachubik P., Mazur A., Komaniecka I., Choma A., Rogalski J.: Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important *Cerrena unicolor* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **176**, 1638–1658 (2015)
- Schulz C.: Cellobiose dehydrogenase on electrodes-an electrochemical biosensor for various analytes tunable by positive charges. Department of Chemistry, Lund University; (2015)
- Henriksson G., Salumets A., Divne C., Pettersson G.: Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1. *Biochem. J.* **324**, 833–838 (1997)
- Ma S., Preims M., Piumi F., Kappel L., Seiboth B., Record E., Kracher D., Ludwig R.: Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Microb. Cell Fact.* **16**, 1–14 (2017)
- Ferri S., Sode K.: Functional expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase flavin domain in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **32**, 855–859. (2010)
- Bey M., Berrin J.G., Poidevin L., Sigoillot J.C.: Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microb. Cell Fact.* **10**, DOI:10.1186/1475-2859-10-113 (2011)
- Harreither W., Felice A.K.G., Paukner R., Gorton L., Ludwig R., Sygmund C.: Recombinantly produced cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* for glucose biosensors and biofuel cells. *Biotechnol. J.* **7**, 1359–1366 (2012)
- Turbe-Doan A., Arfi Y., Record E., Estrada-Alvarado I., Levasseur A.: Heterologous production of cellobiose dehydrogenases from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* and the ascomycete *Podospira anserina* and their effect on saccharification of wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4873–4885 (2013)
- Punt P.J., van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., van den Hondel C.: Filamentous fungi as cell factories for metabolite production. *Trends Biotechnol.* **20**, 200–206 (2002)
- Langston J.A., Brown K., Xu F., Borch K., Garner A., Sweeney M.D.: Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 802–812 (2012)
- Sützl L., Laurent C.V.F.P., Abrera A.T., Schütz G., Ludwig R., Haltrich D.: Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2477–2492 (2018)
- Bao W.J., Usha S.N., Renganathan V.: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 705–713 (1993)
- Xia Z., Mathews F.S.: Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 837–863 (1990)
- Qin X., Su X., Luo H., Ma R., Yao B., Ma F.: Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, DOI: 10.1186/s13068-018-1060-9 (2018)
- Valadares F., Gonçalves T.A., Gonçalves D.S.P.O., Segato F., Romanel E., Milagres A.M.F., Squina F.M., Ferraz A.: Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, DOI: 10.1186/s13068-016-0525-y (2016)
- Henriksson G., Pettersson G., Johansson G., Ruiz A., Uzcategui E.: Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *Eur. J. Biochem.* **196**, 101–106 (1991)
- Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: Is cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* a one-electron reductase? *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1144**, 184–190 (1993)
- Hallberg B.M., Bergfors T., Bäckbro K., Pettersson G., Henriksson G., Divne C.: A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *Structure*, **8**, 79–88 (2000)
- Rose A.S., Bradley A., Valasatava Y., Duarte J., Prlic A., Rose P.: NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, **34**, 3755–3758 (2018)
- Stoica L., Ruzgas T., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L.: Direct electron transfers-a favorite electron route for cellobiose dehydrogenase (CDH) from *Trametes villosa*. Comparison with CDH from *Phanerochaete chrysosporium*. *Langmuir*, **22**, 10801–10806 (2006)
- Matsumura H., Ortiz R., Ludwig R., Igarashi K., Samejima M., Gordon L.: Direct electrochemistry of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase covalently attached onto gold nanoparticle modified solid gold electrodes. *Langmuir*, **28**, 10925–10933 (2012)
- Stoica L., Lindgren-Sjölander A., Ruzgas T., Gorton L.: Biosensor based on cellobiose dehydrogenase for detection of catecholamines. *Anal. Chem.* **76**, 4690–4696 (2004)
- Safina G., Ludwig R., Gorton L.: A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes. *Electrochim. Acta* **55**, 7690–7695 (2010)
- Tasca F., Gorton L., Harreither W., Haltrich D., Ludwig R., Noll G.: Comparison of direct and mediated electron transfer

- for cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete sordida*. *Anal. Chem.* **81**, 2791–2798 (2009)
34. Tasca F., Harreither W., Ludwig R., Gooding J.J., Gorton L.: Cellobiose dehydrogenase aryl diazonium modified single walled carbon nanotubes: enhanced direct electron transfer through a positively charged surface. *Anal. Chem.* **83**, 3042–3049 (2011)
35. Stoica L., Schuhmann W. i wsp.: Membrane-less biofuel cell based on cellobiose dehydrogenase (anode)/ laccase (cathode) wired via specific os-redox polymers. *Fuel Cells*, **9**, 53–62 (2009)
36. Van Hecke W., Bhagwat A., Ludwig R., Dewulf J., Haltrich D., Langenhove H.: Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of lactose to lactobionic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1475–1482 (2009)
37. Ortiz R., Ludwig R., Gorton L.: Highly efficient membraneless glucose bioanode based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase on aryl diazonium-activated single-walled carbon nanotubes. *Chem. Electro. Chem.* **1**, 1948–1956 (2014)
38. Coman V., Ludwig R., Harreither W., Haltrich D., Gorton L., Ruzgas T., Shleev S.: A direct electron transfer-based glucose/oxygen biofuel cell operating in human serum. *Fuel Cells*, **10**, 9–16 (2010)
39. Bollella P., Mazzei F., Favero G., Fusco G., Ludwig R., Gorton L., Antiochia R.: Improved DET communication between cellobiose dehydrogenase and a gold electrode modified with a rigid self-assembled monolayer and green metal nanoparticles: The role of an ordered nanostructuring. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 196–203 (2017)
40. Tasca F., Zafar N.M., Harreither W., Noll G., Ludwig R., Gorton L.: A third generation glucose biosensor based on cellobiose dehydrogenase from *Corynascus thermophilus* and single-walled carbon nanotubes. *Analyst*, **136**, 2033–2036 (2011)
41. Zafar M.N., Safina G., Ludwig R., Gorton L.: Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions. *Anal. Biochem.* **425**, 36–42 (2012)
42. Cipri A., Schulz C., Ludwig R., Gorton L., del Valle M.: A novel bio-electronic tongue using different cellobiose dehydrogenases to resolve mixtures of various sugars and interfering analytes. *Biosens. Bioelectron.* **79**, 515–521 (2016)
43. Coman V., Vaz-Dominguez C., Ludwig R., Harreither W., Haltrich D., De Lacey A., Ruzgas T., Gordon L., Shleev S.: A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6093–6096 (2008)
44. Harreither W., Coman V., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L.: Investigation of graphite electrodes modified with cellobiose dehydrogenase from the Ascomycete *Myriococcum thermophilum*. *Electroanalysis*, **19**, 172–180 (2007)
45. Tasca F., Gorton L., Harreither W., Haltrich D., Ludwig R., Noll G.: Highly efficient and versatile anodes for biofuel cells based on cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. *J. Phys. Chem. C*, **112**, 13668–13673 (2008)
46. Pricelius S., Ludwig R., Lant N., Haltrich D., Guebitz G.M.: Substrate specificity of *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase on mono-, oligo-, and polysaccharides related to in situ production of H₂O₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 75–83 (2009)
47. Flitsch A., Prasetyo E.N., Sygmund C., Ludwig R., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Cellulose oxidation and bleaching processes based on recombinant *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase. *Enzyme. Microb. Technol.* **52**, 60–67 (2013)
48. Nyanhongo G.S., Sygmund C., Ludwig R., Prasetyo E.N., Guebitz G.M.: An antioxidant regenerating system for continuous quenching of free radicals in chronic wounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **83**, 396–404 (2013)
49. Thallinger B., Argirova M., Lesseva M., Ludwig R., Sygmund C., Schlick A., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Preventing microbial colonisation of catheters: antimicrobial and antibiofilm activities of cellobiose dehydrogenase. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **44**, 402–408 (2014)
50. Thallinger B., Brandauer M., Burger P., Sygmund C., Ludwig R., Ivanova K., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Cellobiose dehydrogenase functionalized urinary catheter as novel antibiofilm system. *J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.* **104**, 1448–1456 (2016)
51. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **8**, 97–109 (2013)
52. Prasetyo E.N., Rodriguez R.D., Lukesch B., Weiss S., Murkovic M., Katsoyannos E., Sygmund C., Ludwig R., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.: Laccase – cellobiose dehydrogenase-catalyzed detoxification of phenolic-rich olive processing residues. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **12**, 1343–1352 (2015)
53. Krikstolaityte V., Lamberg P., Toscano M.D., Silow M., Eicher-Lorka O., Ramanavicius A., Niaura G., Abariute L., Ruzgas T., Shleev S.: Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells with improved cellobiose dehydrogenase based bioanode. *Fuel Cells*, **14**, 792–800 (2014)
54. Fährnich P., Irrgang K.: Conversion of cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 775–780 (1982)
55. Hildebrand A., Kasuga T., Fan Z.: Production of cellobionate from cellulose using an engineered *Neurospora crassa* strain with laccase and redox mediator addition. *PLoS One*, **10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0123006 (2015)
56. Lin H., Hildebrand A., Kasuga T., Fan Z.: Engineering *Neurospora crassa* for cellobionate production directly from cellulose without any enzyme addition. *Enzyme. Microb. Technol.* **99**, 25–31 (2017)
57. Hildebrand A., Bennett Addison J., Kasuga T., Fan Z.: Cellobionic acid inhibition of cellobiohydrolase I and cellobiose dehydrogenase. *Biochem. Eng. J.* **109**, 236–342 (2016)
58. McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999)
59. Nyanhongo G.S., Thallinger B., Guebitz G.M. Cellobiose dehydrogenase-based biomedical applications. *Process. Biochem.* **59**, 37–45 (2017)
60. Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T., Mena B.: Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am. J. Infect. Control.* **40**, 854–859 (2012)
61. Römling U., Balsalobre C.: Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* **272**, 541–561 (2012)
62. Soto S.M.: Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Adv. Biol.* DOI: 10.1155/2014/543974 (2014)
63. Lequette Y., Boels G., Clarisse M., Faille C.: Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, **26**, 421–431 (2010)
64. Stewart P.S., Costerton J.W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet (London, England)*, **358**, 135–138 (2001)
65. Nyanhongo G.S., Sygmund C., Ludwig R., Prasetyo E.N., Guebitz G.M.: Synthesis of multifunctional bioresponsive polymers for the management of chronic wounds. *J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater.* **101 B**: 882–891 (2013)
66. Alonso S., Rendueles M., Díaz M.: Bio-production of lactobionic acid: current status, applications and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1275–1291 (2013)
67. Varela O.: Oxidative reactions and degradations of sugars and polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **58**, 307–369 (2003)

68. Green B.A., Yu R.J., Van Scott E.J.: Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.* **27**, 495–501 (2009)
69. Tasic-Kostov M., Savic S., Lukic M., Tamburic S., Pavlovic M., Vuleta G.: Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *J. Cosmet. Dermatol.* **9**, 3–10 (2010)
70. Baminger U., Ludwig R., Galhaup C., Leitner C., Kulbe K.D., Haltrich D.: Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **11**, 541–550 (2001)
71. Miyamoto Y., Ooi T., Kinoshita S.: Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas sp.* LS13-1. *Biotechnol. Lett.* **22**, 427–430 (2000)
72. Dhariwal A., Mavrov V., Schroeder I.: Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM). *J. Mol. Catal. B Enzym.* **42**, 64–69 (2006)
73. Fort S., Boyer V., Greffe L., Davies G.J., Moroz O., Christiansen L., Schulein M., Cottaz S., Driguez H.: Highly efficient synthesis of β (1 \rightarrow 4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5429–5437 (2000)
74. Chaveriat L., Stasik I., Demailly G., Beaupère D.: The direct synthesis of 6-amino-6-deoxyaldonic acids as monomers for the preparation of polyhydroxylated nylon 6. *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 1349–1354 (2006)
75. Markowiak P., Ślizewska K.: The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* DOI: 10.1186/s13099-018-0250-0 (2018)
76. Adamczak M., Bednarski W.: Enzymatyczna synteza galaktooligosacharydów i laktulozy w permeacie po ultrafiltracji serwatki. *Żywność Nauk. Technol. Jakość.* **6**, 105–117 (2008)
77. Drouault S., Anba J., Corthier G.: *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 938–941 (2002)
78. Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* **78**, 93–113 (2000)
79. Wingate K.G., Stuthridge T., Mansfield S.D.: Colour remediation of pulp mill effluent using purified fungal cellobiose dehydrogenase: reaction optimisation and mechanism of degradation. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 95–106 (2005)
80. Khromonygina V.V., Saltykova A.I., Vasilchenko L.G., Kozlov Y.P., Rabinovich M.L.: Degradation of the herbicide atrazine by the soil mycelial fungus INBI 2-26 (-), a producer of cellobiose dehydrogenase. *Appl. Biochem. Microbiol.* **40**, 285–290 (2004)
81. Frommhagen M., Westphal A.H., van Berkel W.J.H., Kabel M.A.: Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monoxygenases. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2018.01080 (2018)
82. Solna R., Dock E., Christenson A., Winther-Nielsen M., Carlsson C., Emmneus J., et al. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases. *Anal. Chim. Acta.* **528**, 9–19 (2005)
83. Ludwig R., Ortiz R., Schulz C., Harreither W., Sygmund C., Gorton L.: Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: advances by materials science and biochemical engineering. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3637–3658 (2013)
84. Heller A.: Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *J. Phys. Chem.* **96**, 3579–3587 (1992)
85. Bollella P., Gorton L., Antiochia R.: Direct electron transfer of dehydrogenases for development of 3rd generation biosensors and enzymatic fuel cells. *Sensors*, DOI: 10.3390/s18051319 (2018)
86. Wollenberger U., Lisdat F., Rose A., Streffer K.: Phenolic biosensors (w) Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications, red. Bartlett P., John Wiley and Sons, DOI: 10.1002/9780470753842, 2008
87. del Valle M.: Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis*, **22**, 1539–1555 (2010)
88. Ciosek P., Wróblewski W.: Sensor arrays for liquid sensing – electronic tongue systems. *Analyst*, **132**, 963–978 (2007)
89. Riul A., Dantas C.A.R., Miyazaki C.M., Oliveira O.N.: Recent advances in electronic tongues. *Analyst*, **135**, 2481–2495 (2010)
90. Cooney M.J., Svoboda V., Lau C., Martin G., Minteer S.D.: Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy Environ. Sci.* **1**, 320–337 (2008)
91. Xiao X., Xia H., Wu R., Bai L., Yan L., Magner E., Cosnier S., Lojou E., Zhu Z., Liu A.: Tackling the challenges of enzymatic (bio) fuel cells. *Chem. Rev.* DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00115 (2019)
92. Falk M., Andoralov V., Blum Z., Sotres J., Suyatin D.B., Ruzgas T., Arnebrant T., Shleev S.: Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses. *Biosens. Bioelectron.* **37**, 38–45 (2012)

BIONANOCELULOZA – WŁAŚCIWOŚCI, POZYSKIWANIE I PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Remigiusz Olędzki*, Ewa Walaszczyk

Katedra Biotechnologii i Analizy Żywności, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Branża spożywcza jest jednym z obszarów działalności przemysłowej, która wymaga częstego wdrażania technologicznych i produktowych innowacji. Wyroby spożywcze powstające zarówno w zaawansowanych technologicznie fabrykach, jak i w małych przedsiębiorstwach produkcyjnych, są coraz częściej wytwarzane z wykorzystaniem innowacyjnych dodatków do żywności, do których należą m.in. naturalne składniki polisacharydowe. Jednym z takich składników jest produkowana przez bakterie (najczęściej z rodzaju *Komagataeibacter xylinus*, znanego wcześniej jako *Gluconacetobacter xylinus*) celuloza, nazywana bionanocelulozą. Bionanoceluloza to polimer o wyjątkowo cennych własnościach użytkowych, wynikających z jego unikalnej molekularnej budowy, którą stanowi chemicznie ultra czysty β -1,4-glukan. Główne cechy tego bionanopolimeru to m.in. wysoka higroskopijność, elastyczność i wytrzymałość mechaniczna. Różne postacie fizyczne i chemiczne bionanocelulozy (wytworzonej zarówno w wyniku hodowli powierzchniowej, jak i wgłębnej) coraz częściej znajdują zastosowanie w wytwórstwie produktów spożywczych. Potrzeba wytwarzania silnie zróżnicowanych (np. użytkowo lub sensorycznie) wyrobów żywnościowych, a także coraz większe trudności związane z dostępem do konwencjonalnych źródeł węgla zewnętrznego, stwarzają konieczność poszukiwania alternatywnych podłoży hodowlanych do wytwarzania bionanocelulozy. Celem pracy jest przybliżenie problematyki wykorzystania alternatywnych źródeł węgla do mikrobiologicznej syntezy bionanocelulozy oraz jej zastosowania w przemyśle spożywczym.

1. Wprowadzenie. 2. Budowa i charakterystyka fizyko-mechaniczna bionanocelulozy. 3. Proces syntezy bionanocelulozy i jej znaczenie dla drobnoustrojów. 4. Drobnoustroje wykorzystywane do produkcji bionanocelulozy. 5. Surowce wykorzystywane w procesie syntezy bionanocelulozy. 6. Techniki hodowli drobnoustrojów produkujących bionanocelulozę. 7. Możliwości zastosowania bionanocelulozy w przemyśle spożywczym. 8. Podsumowanie

BIONANOCELLULOSE – PROPERTIES, ACQUISITION AND PERSPECTIVES OF APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

Abstract: The food industry is one area of industrial activities that requires the frequent implementation of technological and product innovations. Foodstuffs obtained both in technologically advanced factories, as well as in small manufacturing enterprises, are increasingly produced using innovative food additives, which include natural polysaccharide ingredients. One of these substances is bionanocellulose – microbially produced cellulose (most commonly by the genus *Komagataeibacter xylinus*, formerly known as *Gluconacetobacter xylinus*). Bionanocellulose is a polymer with exceptionally valuable functional properties resulting from its unique molecular structure (formed by the chemically ultra-pure β -1,4-glucan). The main features of bionanocellulose are high hygroscopicity, flexibility and mechanical strength. Various physical and chemical forms of bionanocellulose (produced both during surface and submerged cultivation) are increasingly used in the production of food products. The need to produce highly diversified (e.g., usable or sensory) food products as well as the increasing difficulties associated with access to conventional sources of external coal, necessitate the search of alternative culture media for the production of bionanocellulose. The aim of the work is to describe the use of alternative carbon sources for the microbiological synthesis of bionanocellulose and its application in the food industry.

Introduction. 2. Structure and physico-mechanical characteristics of bionanocellulose. 3. The process of synthesis of bionanocellulose and its importance for microorganisms. 4. Microorganisms used for the production of bionanocellulose. 5. Raw materials used in the synthesis of bionanocellulose. 6. Techniques of culturing microorganisms that produce bionanocellulose. 7. Possible applications of bionanocellulose in the food industry. 8. Conclusions

Słowa kluczowe: celuloza bakteryjna, *Komagataeibacter xylinus*, nanomateriały, surowce odpadowe

Key words: bacterial cellulose, *Komagataeibacter xylinus*, nanomaterials, waste raw materials

1. Wprowadzenie

Celuloza bakteryjna (BC), zwana również bionanocelulozą, to naturalny polimer, który ze względu na swoje wyjątkowe właściwości skupia w ostatnich latach szczególną uwagę naukowców z różnych obszarów wie-

dzy i techniki, a także coraz częściej zwykłych konsumentów. Szczególne właściwości tego naturalnego nanomateriału wynikają z unikalnej molekularnej budowy, którą stanowi chemicznie ultra czysty β -1,4-glukan. Struktura chemiczna jest czynnikiem determinującym główne cechy tego bionanopolimeru, takie jak wysoka

* Autor korespondencyjny: Remigiusz Olędzki, Katedra Biotechnologii i Analizy Żywności, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław, e-mail: remigiusz.oledzki@ue.wroc.pl

higroskopijność, elastyczność oraz wytrzymałość mechaniczna, które decydują jednocześnie o szerokim komercyjnym zastosowaniu BC [43].

Celuloza bakteryjna jest produkowana przez wiele różnych drobnoustrojów, wśród których dominują bakterie z rodzaju *Komagataeibacter* (dawniej: *Gluconacetobacter*), *Rhizobium*, *Agrobacterium* oraz *Sarcina*. BC jest dla wytwarzających ją drobnoustrojów substancją ochronną, stanowiącą jednocześnie element tzw. biofilmu, który tworzy osłonę przed oddziaływaniem niekorzystnych czynników zewnętrznych. BC chroni komórki bakteryjne m.in. przed działaniem antybiotyków oraz przed kontaktem z komórkowymi składnikami systemu odporności przeciwbakteryjnej organizmu, takimi jak fagocyty (neutrofile, monocyty i makrofagi) [3, 66]. Z tego powodu niektóre drobnoustroje wykształciły skomplikowany mechanizm służący produkcji nanobiomateriału celulozowego. Produkcja BC jest realizowana przez kompleks enzymatyczny – syntazę celulozową, która, zależnie od gatunku i warunków hodowli, wytwarza celulozę o odmiennych właściwościach fizykochemicznych [58].

Różne postacie fizyczne BC (wytworzone zarówno w wyniku hodowli powierzchniowej, jak i wgłębnej) ze względu na swoje cenne właściwości znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Opracowano również metody syntezy modyfikowanej BC (np. solami chitozanu), która poprzez nadane cechy bakteriostatyczności ma zdolność hamowania wzrostu niektórych gatunków bakterii. Zrealizowane dotychczas badania nad BC dotyczą zarówno poznania molekularnych mechanizmów jej biosyntezy, jak również optymalizacji tego procesu w skali laboratoryjnej i przemysłowej. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem do masowej produkcji nowych, niestosowanych dotychczas gatunków drobnoustrojów oraz nad opracowaniem najbardziej efektywnych i opłacalnych ekonomicznie technologii produkcji BC. Podejmuje się również intensywne wysiłki nad poszukiwaniem nowych podłoży do produkcji BC, m.in. poprzez wykorzystanie surowców odpadowych.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnych doniesień na temat właściwości, metod produkcji oraz praktycznego zastosowania BC w różnych gałęziach przemysłu spożywczego.

2. Budowa i fizyko-mechaniczna charakterystyka bionanocelulozy

Pod względem struktury chemicznej BC jest liniowym polimerem glukawanowym, w którym poszczególne cząsteczki (opisane wzorem $(C_6H_{10}O_5)_n$) połączone są wiązaniem β -1,4 (β -1 \rightarrow 4) [77]. Tworzenie BC rozpoczyna się wewnątrz komórki bakteryjnej, gdzie ma

miejsce proces łączenia wielu cząsteczek glukozy w łańcuchy zawierające od 1 500 do ponad 20 000 reszt połączonych wiązaniem β -1,4 (β -1 \rightarrow 4). Powstałe pojedyncze łańcuchy glukozowe są następnie usuwane na zewnątrz komórki poprzez pory obecne w otocze i ścianie komórkowej. Na zewnątrz komórki, łańcuchy glukozy formowane są w mikrofibryle, czyli zespoły łańcuchów celulozowych, które następnie agregują w większe struktury tworząc tzw. wstążki celulozowe [24]. Z kolei „wstążki” BC budują uporządkowaną strukturę sieciową z pustymi przestrzeniami pomiędzy poszczególnymi wstążkami. Prawdopodobnie uformowane „wstążki” BC tworzą strukturę w postaci rozległej i wysoce porowatej matrycy [22]. Matryca ta jest dodatkowo stabilizowana poprzez wiązania wodorowe formujące się pomiędzy pojedynczymi łańcuchami glukozowymi [35]. Powstała w ten sposób włóknista sieć BC przyjmuje w końcowym efekcie postać wielowarstwowej cienkiej hydrożelowej powłoki o znacznej powierzchni właściwej i dużej porowatości [22].

Wykazano, że poszczególne włókienka budujące BC są około 100 razy cieńsze niż włókienka celulozy roślinnej, produkowanej przez rośliny wyższe [24]. Ponadto, w przeciwieństwie do nieprzetworzonej celulozy roślinnej, BC pod względem chemicznym jest ultraczystym materiałem, który nie posiada powiązań z ligniną czy hemicelulozami [98]. Kolejną cechą BC jest jej wysoki stopień krystaliczności (wynoszący ponad 60%) oraz odmienny, zawierający się w szerszym zakresie, stopień polimeryzacji łańcuchowej. Dla BC wynosi on od 16 000 do 20 000 cząsteczek, podczas gdy przeciętny stopień polimeryzacji celulozy roślinnej waha się od 13 000 do 14 000 cząsteczek glukozy w jednostce polimeru [7].

Potwierdzono również, że stopień polimeryzacji BC jest w dużym stopniu zależny od odczynu środowiska hodowlanego, w jakim następuje namnażanie drobnoustrojów i jej synteza. Wykazano, że bakterie podczas hodowli przy pH 4 produkują BC o stopniu polimeryzacji w zakresie od 14 000 do 16 000, natomiast przy pH 5 następuje produkcja BC zawierającej od 11 000 do 16 800 jednostek glukozy na cząsteczkę polimeru [77, 80]. Powyższa obserwacja ma istotne znaczenie dla procesu wytwarzania BC o określonych właściwościach wytrzymałościowych. Potwierdzono, że wytrzymałość mechaniczna powłoki BC wzrasta wraz z obniżeniem odczynu (wytworzona w środowisku o pH 4 jest istotnie wyższa aniżeli BC wytworzona w środowisku o pH 5) [91]. Większa wytrzymałość mechaniczna wytworzonej przez bakterie BC związana jest z obniżoną aktywnością w zakresie pH 4–4,5 bakteryjnych enzymów hydrolitycznych (takich jak celulazy), które zmniejszają stopień polimeryzacji BC poprzez jej rozkład na celobiozę (dimer glukozy) i celotriozę (3-glukozową celulozodekstrynę), a następnie na pojedyncze cząsteczki glukozy [91].

3. Proces syntezy bionanocelulozy i jej znaczenie dla drobnoustrojów

Do syntezy celulozy przez drobnoustroje dochodzi przy udziale złożonego kompleksu enzymatycznego w postaci syntazy celulozy i polega na łączeniu ze sobą cząsteczek glukozy w jeden długi łańcuch [59, 77]. Zintegrowana z błoną komórek bakteryjnych syntaza celulozy to kompleks enzymatyczny dwóch wewnątrzkomórkowych białek – BcsA i BcsB, oraz białka BcsC, które stanowi zewnętrzny składnik błonowy. Białko BcsA wraz z peryplazmatyczną, zakotwiczoną w błonie podjednostką BcsB tworzą kompleks, który jest odpowiedzialny za bezpośredni proces syntezy BC. Natomiast BcsC, jako białko błony zewnętrznej, odpowiada bezpośrednio za proces translokacji nowo wytworzonej cząsteczki BC. Dowiedziono, że białko BcsA wytwarza w pobliżu miejsca syntezy aktywny kanał transportu w błonie komórkowej, umożliwiając w ten sposób translokację nowopowstałej BC przez białko BcsC na zewnątrz komórki [65, 67, 79].

Sugeruje się, że C-końcowa część BcsC tworzy kanał, przez który następuje translokacja BC przez błonę zewnętrzną. Natomiast pozostała pozostała część kompleksu enzymatycznego oddziałuje prawdopodobnie z cytoplazmatycznymi czynnikami aktywującymi syntezę celulozy, takimi jak cykliczny diguanozyno-5'-monofosforan (c-di-GMP) czy jony Mg^{2+} [21, 59, 65]. Powstała BC jest transportowana na zewnątrz komórki bakteryjnej poprzez pory powstające w zewnętrznej otoczce i ścianie komórkowej [66, 80].

Unikalny wśród bakterii proces syntezy i formowania BC spełnia u tych drobnoustrojów dwie zasadnicze funkcje – chroni przed wpływem niektórych czynników środowiskowych, takich jak oddziaływanie niekorzystnych temperatur czy promieniowania UV, a także chroni komórki bakteryjne przed nadmierną utratą wody. Ponadto BC spełnia rolę swoistego pływaka (maty), który utrzymuje wytwarzającą ją drobnoustroje na granicy faz powietrze-woda i tym samym ułatwia komórkom drobnoustrojów pobieranie tlenu z powietrza atmosferycznego [13]

4. Drobnoustroje wykorzystywane do produkcji bionanocelulozy

Najdokładniej opisanymi drobnoustrojami wytwarzającymi celulozę to szeroko rozpowszechnione w przyrodzie bakterie z rodzaju *Komagataeibacter* (określanym dawniej terminem *Gluconacetobacter* lub *Acetobacter*). Bakterie z rodzaju *Komagataeibacter* są powszechnie izolowane z kwiatów, owoców oraz liści licznych gatunków uprawnych i dziko rosnących roślin. Z tego powodu, że do swojego rozwoju preferują podłoża zawierające określone stężenia alkoholu etylowego,

bakterie *Komagataeibacter* naturalnie występują w alkoholowych napojach fermentowanych, takich jak piwo, wino czy też cydr [61].

Do syntezy BC zdolne są również bakterie z rodzaju *Agrobacterium* (np. *Agrobacterium tumefaciens*), czyli wolno żyjące, fitopatogeniczne bakterie glebowe, które są przyczyną powszechnych zakażeń roślin (m.in. powstawania tzw. tumorowatych narośli na szyjce korzeniowej) [57]. Wytwarzane przez *A. tumefaciens* fibryle BC ułatwiają zasiedlanie powierzchni roślin poprzez bezpośredni kontakt bakterii z komórkami epidermy gospodarza. Wykazano, że włókienka bionanocelulozy biorą udział w formowaniu skupisk bakterii *A. tumefaciens*, umożliwiając w ten sposób znacznej liczbie komórek bakteryjnych na bezpośrednie oddziaływanie z tkankami organizmu gospodarza [26]. Z tego względu BC przypisuje się istotną rolę w formowaniu interakcji pomiędzy bakteriami patogennymi a komórkami gospodarza.

Przykładem podobnej interakcji z udziałem BC jest symbiotyczne oddziaływanie niepatogenicznych gatunków bakterii brodawkowych z rodzaju *Agrobacterium* (np. *Rhizobium rhizogenes* zaliczany do rodziny *Rhizobiaceae*) z roślinami motylkowatymi [88, 96]. Potwierdzono, że zdolność bakterii z rodzaju *Rhizobium* do biosyntezy BC odgrywa kluczową rolę w tworzeniu matrycy polisacharydowej biofilmu, która umożliwia trwałą adhezję bakterii do ścian komórek epidermy korzeni roślin motylkowatych [75]. Zdolność do syntezy BC przez bakterie z rodzaju *Rhizobium*, umożliwia wytworzenie odpowiednich warunków do przebiegu takich procesów, jak wiązanie azotu cząsteczkowego z powietrza, nitryfikacja i denitryfikacja [74]. W oparciu o opisany model oddziaływania, BC można uznać zatem za element pośredniczący w obiegu pierwiastków w przyrodzie [1, 26, 75].

Kolejną grupą drobnoustrojów produkujących BC są bakterie z rodzaju *Enterobacter* (zwanych również *Aerobacter*). Większość z tych drobnoustrojów to wszechobecne w przyrodzie (np. w naturalnych zbiornikach wodnych), Gram-ujemne niechorobotwórcze bakterie, które występują w dużych ilościach m.in. w jelicie grubym oraz rzadziej na skórze i w ustnej części gardła człowieka. Wiele szczepów *Enterobacter* to bakterie oportunistyczne, zakażające organizmy z obniżonym funkcjonowaniem układu immunologicznego [33, 38, 40]. Wykazano, że bakterie z rodzaju *Enterobacter* (np. *Enterobacter* sp. FY-07), w przeciwieństwie do bakterii z rodzaju *Komagataeibacter*, są zdolne do syntezy BC zarówno w warunkach tlenowych i beztlenowych. Jednakże do syntezy BC w warunkach beztlenowych wykorzystywana jest tylko niewielka ilość glukozy obecnej w podłożu, natomiast jej znaczna część jest metabolizowana poprzez szlak glikolityczny i metabolizm pirogronianu. Prowadzi to w konsekwencji do

wytwarzania kwasu mrówkowego, octowego oraz acetoiny i tym samym niekorzystnego zakwaszenia środowiska hodowlanego [38, 56].

Do drobnoustrojów, u których również potwierdzono zdolność produkcji BC, należą niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Achromobacter* (np. *Achromobacter xylosoxidans*, inaczej określane jako *Alcaligenes xylosoxidans*). *Achromobacter* to tlenowe, Gram-ujemne, oksydazo- i katalazo-dodatnie pałeczki, które zwykle zasiedlają wilgotne miejsca na ciele człowieka, takie jak fałdy pachowe, pachwiny, jama nosowa, przewody nosowe oraz zatoki przynosowe. Bakterie te mogą powodować u człowieka miejscowe i ogólnoustrojowe infekcje, szczególnie u osób z niedoborem odporności. Ponieważ bakterie *Achromobacter* opatrzone są pertrykularną wicią, wykazują zdolność do aktywnego poruszania się w płynnym lub półpłynnym środowisku hodowlanym [68]. Występowanie bakterii *Achromobacter* potwierdzono w zbiornikach wód śródlądowych i morskich oraz w glebie. Liczne gatunki z rodzaju *Achromobacter* powszechnie izoluje się z powierzchni owoców i warzyw, jak również od zwierząt (np. owadów, gryzoni i ptaków) [23]. Określone gatunki bakterii należące do rodzaju *Achromobacter* (np. *Achromobacter* sp. M15) są również izolowane z gleby, gdzie wraz z innymi drobnoustrojami stanowią ważny element edafonu [23].

Cechą charakterystyczną bakterii z rodzaju *Achromobacter* jest zdolność do produkcji BC w szerokim spektrum temperaturowym hodowli, wynoszącym od 25 do 45°C. Zaobserwowano, że BC wytworzona przez szczep bakterii *Achromobacter* sp. M15 na melasowym podłożu hodowanym charakteryzuje się wysokim stopniem krystaliczności polimeru (>70%) oraz dużą wytrzymałością mechaniczną. Cechy te są efektem silnej adhezji pomiędzy poszczególnymi włóknami BC, co przyczynia się do powstawania struktury nanokrystalicznych agregatów celulozy. Ponadto, dokonano obserwacji, że BC wytwarzana przez szczep *Achromobacter* sp. M15 charakteryzuje się dużą jednorodnością i wysoką czystością, podobną do tej uzyskiwanej z hodowli *K. xylinus* [23].

Wśród drobnoustrojów mających zdolność syntezy BC są również bakterie z rodzaju *Sarcina*. Te, należące do rodziny *Clostridiaceae*, Gram-dodatnie bakterie występują naturalnie na powierzchni ziaren zbóż, w glebie, a także w żołądku niektórych ssaków, jak królik, kawia domowa oraz człowiek [17, 72]. Zaobserwowano, że BC wytwarzana przez bakterie z rodzaju *Sarcina* (np. *Sarcina ventriculi*) jest gromadzona na zewnątrz komórki i jednocześnie pozostaje ściśle związana z jej ścianą komórkową. Tym samym BC spełnia u bakterii z tego rodzaju szczególną rolę związaną z tworzeniem ścisłych i trwałych egzopolisacharydowych powiązań pomiędzy komórkami formującymi pakiety. Formowanie pakietów przez *Sarcina* z wykorzystaniem BC

jest prawdopodobnie związane z ochroną tych bakterii przed takimi substancjami, jak antybiotyki czy dezynfektanty [63].

Spośród bakterii mogących syntetyzować BC wskazuje się również rodzaj *Salmonella* (np. *Salmonella enterica*). *Salmonella* to bakterie pochodzące z rodziny *Enterobacteriaceae*, obejmujące Gram-ujemne, względnie beztlenowe pałeczki. Bakterie z gatunku *S. enterica* mają zdolność do wnikania i namnażania się we wnętrzu ludzkich komórek, co stanowi główny powód trudności w leczeniu schorzeń wywołanych tymi drobnoustrojami (np. bakteriemia, dur brzuszny i zapalenie jelit) [103].

Inwazja bakterii *Salmonella* (np. serotyp Typhimurium) do komórek nabłonka jelitowego jest możliwa dzięki syntezie przez te bakterie czynnika wirulencji – specyficznego białka TTSS-1. Wykazano, że główną funkcją TTSS-1 jest translokacja białek efektorowych z komórek bakterii *Salmonella* do cytozolu komórki gospodarza [46]. Badania również sugerują, że produkcja BC oraz innych egzopolisacharydów, jak kwas kolonowy (czyli polianionowy heteropolisacharyd, zawierający powtarzające się jednostki cukrowe: D-glukozy, kwasu D-glukuronowego, D-galaktozy oraz L-fukozy) przez *S. typhimurium* może być istotnym elementem wspomagającym mechanizm inwazji przez te bakterie. Prawdopodobnie oba te zjawiska są kluczowym elementem niezbędnym do wytworzenia relacji symbiotycznych *S. enterica* z roślinami wyższymi [16]. W przypadku *S. typhimurium* produkcja BC może stanowić dla tych bakterii istotny czynnik biotyczny, które warunkuje odpowiednie współdziałanie pomiędzy organizmami tworzącymi układy symbiotyczne i zapewnia przeżycie lub większą ekspansję w środowisku. W przypadku bakterii z rodzaju *Salmonella*, istnieją przesłanki sugerujące, że BC determinuje bezpośrednią fizyczną interakcję z niektórymi pleśniami (np. *Aspergillus niger*), będącymi powszechnym kolonizatorem gleby i znajdujących się w niej roślin. Dzięki egzopolisacharydom, bakterie z rodzaju *Salmonella* tworzą wielogatunkowe konsorcja z innymi drobnoustrojami, w których każdy gatunek pełni odrębną, ale jednocześnie istotną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów mikrobiologicznych [9, 69].

Innym gatunkiem bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zdolnym do wytwarzania BC jest *Escherichia coli*, dla której czynnik ten stanowi istotny składnik macierzy powierzchniowej (pozakomórkowej). Dla tego gatunku bakterii synteza BC jest elementem, który umożliwia skuteczną kolonizację zasiedlanego środowiska (np. ustroju) [64]. Wykazano, że dla probiotycznego szczepu *E. coli* o nazwie Nissle 1917 wytwarzanie BC jest niezbędne do adhezji do komórek nabłonka żołądkowo-jelitowego, czego efektem jest zmniejszona produkcja cytokin odpowiadających za rozwój stanów zapalnych [64].

Przytoczone przykłady wskazują, że biosynteza BC jest procesem umożliwiającym bakteriom zarówno

zasiedlanie konkretnego środowiska, jak i efektywną adaptację podczas oddziaływań symbiotycznych lub pasożytniczych. Dlatego proces biosyntezy BC odgrywa istotną rolę zarówno w przypadku symbiontów wiążących azot (np. *Rhizobium leguminosarum*), bakterii glebowych (np. *Burkholderia* spp. i *Pseudomonas putida*), jak również bakteryjnych patogenów roślin (np. *Dickeya dadantii*, *Erwinia chrysanthemi* i *Agrobacterium tumefaciens*) [36, 78].

Proces syntezy BC wydaje się również kluczowy w rozwoju zjadliwości (wirulencji) ważnych patogenów ludzkich, jak niektóre szczepy *E. coli* i *S. enterica*, dla których celuloza i jej pochodne stanowią istotny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej oraz tzw. biofilmu [32, 87, 97].

5. Surowce wykorzystywane w procesie syntezy bionanocelulozy

Początkowo do uzyskania BC jako produktu biosyntezy przeprowadzanej przez *K. xylinus* wykorzystywano specjalnie opracowane dla tego typu drobnoustrojów płynne podłoże Hestrin-Schramm'a (podłoże H-S), zawierające takie składniki, jak glukoza, pepton, ekstrakt drożdżowy, di-sodu wodorofosforan oraz kwas cytrynowy. Obecne w podłożu H-S glukoza i kwas cytrynowy stanowią główne źródła węgla zarówno do wzrostu komórek *Komagataeibacter*, jak i tworzenia BC [62]. W celu ograniczenia wykorzystania kosztownego w przygotowaniu podłoża H-S, od wielu lat poszukuje się rozwiązań mających na celu obniżenie kosztów związanych z produkcją BC.

Melasa (melas)

Powszechnie stosowanymi alternatywnymi surowcami do produkcji BC są głównie surowce zawierające cukry proste (np. glukozę, fruktozę, ksylozę) lub dwucukry (np. sacharozę, trehalozę, laktozę) [62]. Ze względu na dużą podaż i niskie koszty pozyskania, często do produkcji BC stosuje się produkty uboczne z przemysłu cukrowniczego, takie jak melasa (melas). Melasa charakteryzuje się dużą zawartością cukrów i dla drobnoustrojów wytwarzających BC jest również źródłem składników mineralnych, głównie potasu, wapnia, magnezu, fosforu, żelaza oraz selenu [6]. W zależności od surowca, z którego melasa jest wytwarzana, do hodowli szczepów bakterii produkujących BC wykorzystuje się melasę buraczaną, trzcinową oraz karobową, pozyskiwaną z mączki chleba świętojańskiego [5, 70].

Potwierdzono, że BC wytwarzana przez szczep *K. xylinus* ATCC 10245 z melasy buraczanej, charakteryzuje się wyższym stopniem polimeryzacji niż BC pozyskana z wykorzystaniem podłoża, którego jedynym

źródłem węgla była czysta glukoza [44, 82]. Podobne rezultaty uzyskano, gdy biosynteza BC była przeprowadzana z użyciem melasy z trzciny cukrowej [70]. Składniki melasy z trzciny cukrowej, takie jak sacharoza, fruktoza, glukoza, związki azotowe (np. białka i zasady azotowe nukleotydów) oraz minerały (jak potas, żelazo czy magnez) stymulują produkcję BC przez *K. xylinus* ATCC 10245 [70]. Wyniki obecnie prowadzonych badań wskazują, że BC może być wytwarzana na skalę przemysłową przez *K. xylinus* w oparciu o podłoże melasowe szczególnie, gdy jest ono stosowane w statycznych półciągłych procesach hodowlanych [11, 15].

Ścieki gorzelnicze

Istnieją liczne doniesienia na temat prób zastąpienia kosztownej tradycyjnej pożywki H-S innymi podłożami, będącymi produktami ubocznymi z przemysłu fermentacyjnego. Skutecznym w tym zakresie rozwiązaniem może być wykorzystanie wywaru gorzelnianego i ścieków po produkcji alkoholi [99].

Jednym z rozwiązań obniżających koszty produkcji względem podłoża H-S jest wykorzystanie do wytwarzania BC odpadów powstających z procesu produkcji wina ryżowego, jakim jest m.in. tzw. cienki wywar gorzelniany (distillery thin stillage). Wykazano, że osad będący pozostałością po procesie fermentacji ziarna ryżowego i dojrzewania wina ryżowego, może być dla drobnoustrojów produkujących BC, jak *K. xylinus*, zasobnym źródłem węgla i składników mineralnych. Dzięki temu cienki wywar z produkcji wina ryżowego może być substratem zwiększającym wydajność i szybkość produkcji BC z wykorzystaniem konwencjonalnych podłoży mikrobiologicznych [93]. Wykazano, że uzupełnienie tradycyjnej pożywki H-S cienkim wywarem z produkcji wina ryżowego powoduje zwiększenie wydajności i szybkości produkcji BC przez *K. xylinus* w trakcie hodowli statycznej. Zastąpienie wody destylowanej podestylacyjnym wywarem ryżowym w procesie przygotowania pożywki H-S, spowodowało 2,5-krotne zwiększenie wydajności produkcji BC [93]. Wskazuje się, że przyczyną wzrostu produkcji BC jest odpowiedni skład chemiczny podestylacyjnego wywaru ryżowego, który charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów i kwasów organicznych. Zaobserwowano, że BC wytworzona na podłożu hodowlanym zawierającym odpad z produkcji wina ryżowego, charakteryzuje się gęstszą strukturą siatkową i wyższą wartością wskaźnika krystaliczności, niż ta uzyskana z tradycyjnego podłoża H-S. Jednocześnie BC cechowała się mniejszą zdolnością do zatrzymywania wody. Wspomniane rozwiązanie posiada również istotny walor ekonomiczny, ponieważ umożliwia obniżyć koszty produkcji BC (o 67%) w porównaniu do produkcji na tradycyjnej pożywce H-S [99, 100].

Do produkcji BC, jako zamiennik standardowej pożywki H-S, wykorzystuje się również pszeniczny cienki wywar gorzelniany (thin wheat distillery), będący pozostałością procesu produkcyjnego alkoholu etylowego. Powstająca na bazie tego płynu pożywka umożliwia bakteriom *K. sucrofermentans* B-11267 w warunkach hodowli dynamicznej produkcję BC w ilościach prawie trzykrotnie większych (6,19 g/L), aniżeli w trakcie hodowli z wykorzystaniem standardowego podłoża H-S (2,14 g/L) [73].

Odpad po produkcji wina ryżowego Makgeolli

Innym naturalnym surowcem wykorzystywanym do produkcji BC jest filtrat z odpadów powstających przy produkcji koreańskiego wina ryżowego Makgeolli (Makgeolli sludge filtrate) [34]. Wykazano, że filtrat ten może być przydatną pożywką dla bakterii produkujących BC ze względu na wysoką zawartość węglowodanów i kwasów organicznych (np. kwas jabłkowy, mlekowy, bursztynowy oraz octowy). Stosując wspomniany filtrat jako podstawowe podłoże hodowlane lub też jako dodatkowe źródło węgla do zmodyfikowanego (niezawierającego glukozy) podłoża H-S można uzyskać 4–5-krotnie wydajniejszą produkcję BC przez *K. xylinus* aniżeli na samym podłożu H-S [34].

Namok kukurydziany

Jednym z rozwiązań w produkcji BC mających na celu zastąpienie podłoża H-S, które stanowi jednocześnie element służący zagospodarowaniu uciążliwych odpadów, jest wykorzystanie namoka kukurydzianego (corn steep liquor), czyli produktu ubocznego z procesu mielenia kukurydzy na mokro. Namok kukurydziany powstaje w procesie produkcji skrobi z ziaren kukurydzy i zawiera wiele cennych składników, jak kwasy organiczne (głównie kwas mlekowy), cukry redukujące, aminokwasy (głównie siarkowe, jak cysteina, homocysteina i metionina) oraz składniki mineralne (głównie fosfor i potas), które są wykorzystywane przez drobnoustroje zarówno do wzrostu, jak i produkcji metabolitów wtórnych [76].

Wykazano, że namok kukurydziany stosowany w procesie syntezy BC jako źródło azotu dostarczanego do standardowej pożywki, przyczynia się jednocześnie do zmniejszenia (średnio o 25%) zużycia glukozy z podłoża hodowlanego. Zaobserwowano, że BC wytworzona w oparciu o podłoże zawierające namok kukurydziany charakteryzuje się ulepszonymi cechami fizykochemicznymi (np. grubość polimeru oraz tekstura powierzchni) niż BC wytworzona w oparciu o podłoże tradycyjne. Potwierdzono również, że BC powstała z zastosowaniem alternatywnej pożywki (w skład której wchodziła glukoza (1,5% v/v), wodo-

rofosforan sodu (0,27% v/v), kwas cytrynowy (1,5% v/v) oraz namok kukurydziany (2,5% v/v)) wykazuje większą odporność na działanie podwyższonej temperatury aniżeli BC wytworzona w oparciu o pożywkę H-S. Potwierdzono, że BC powstała na podłożu alternatywnym nie ulegała termicznemu rozkładowi nawet w temperaturze 250°C, podczas gdy BC wytworzona na bazie tradycyjnego podłoża H-S zachowywała stabilność strukturalną tylko w temperaturze poniżej 195°C. BC produkowana w oparciu o podłoże zawierające namok kukurydziany wykazuje wyższe zagęszczenie nanowłókien celulozowych w porównaniu do polimeru wytworzonego w oparciu o podłoże H-S [15].

Opisane właściwości BC uzyskanej na podłożu wzbogaconym o dodatek namoka kukurydzianego tłumaczy się korzystnym oddziaływaniem składników chemicznych podłoża na wzrost *K. xylinus*. Potwierdzono, że w skład namoka kukurydzianego wchodzi między innymi białko (21–45%), kwas mlekowy (20–26%), węglowodany (około 3%), jony Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ (około 8%) oraz niewielka ilość tłuszczów (0,9–1,2%). Z tego powodu uważa się, że produkt procesu mielenia kukurydzy na mokro, jakim jest namok, może stanowić niski kosztowy substrat do produkcji BC [15, 83].

Wywar z łuski ziaren kawy

Naturalnym surowcem, który może stanowić alternatywne źródło węgla dla produkcji BC mogą być również niedogotowane łuski ziaren kawy (coffee cherry husk) [71]. Potwierdzono, że wywar z oczyszczonych i zmieszanych łuski ziaren (owoców) kawy odmiany robusta może stanowić wartościowe podłoże dla szczepu bakterii *K. hansenii* UAC09 do produkcji BC. Potwierdzono, że dla tego szczepu ekstrakt wodny z łuski ziaren kawy jest zasobnym źródłem węgla ze względu na stosunkowo wysoką (7%) zawartość cukru w postaci pektyn. Zaobserwowano jednocześnie, że *K. hansenii* UAC09 wykorzystuje wspomniane wyżej podłoże do produkcji BC, lecz sam jednocześnie nie podlega plazmolizie. Opisane zjawisko ma szczególne znaczenie praktyczne, gdyż wcześniejsze badania wskazywały, że całkowita zawartość cukru w podłożu powyżej 4% powoduje zahamowanie produkcji BC. Dzieje się to ze względu na bakteriostatyczne oddziaływanie ciśnienia osmotycznego oraz nagromadzenie kwasu glukonowego, który powoduje obniżenie pH pożywki i tym samym zahamowanie rozwoju drobnoustrojów [71].

Wykazano, że BC wytwarzana w oparciu o podłoże stanowiące wywar ze zmieszanych łuski ziaren kawy charakteryzuje się korzystnymi właściwościami mechanicznymi, jak wytrzymałość na rozciąganie (wynosząca 28,5 MPa w porównaniu do 16,5 MPa dla podłoża H-S) oraz zwiększone wydłużenie nominalne (wynoszące 0,22 mm/s w porównaniu do 0,16 mm/s

dla podłoża H-S). Znacznie wyższy zakres opisanych powyżej cech odnotowywano, gdy wystandaryzowane podłoże hodowlane (zawierające podłoże tradycyjne H-S i wywar z łusek ziaren kawy w proporcji 1:1) było wzbogacone ekstraktem z namoka kukurydzianego w ilości 8% (V/V). Wytworzona BC z zastosowaniem opisanego podłoża kombinowanego charakteryzowała się zwiększoną wytrzymałością mechaniczną na rozciąganie (37,8 MPa) oraz wydłużeniem nominalnym (0,45 mm/s). Natomiast najkorzystniejsze właściwości mechaniczne pod względem wytrzymałości na rozciąganie (42,4 MPa) i wydłużenia nominalnego (0,58 mm/s) wykazuje BC, która powstała przy zastosowaniu podłoża zawierającego wywar ze zmielonych łusek ziaren kawy, ekstrakt z namoka kukurydzianego oraz, dodatkowo, niewielką ilość etanolu (1,5%) i kwasu octowego (1,0%). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że BC otrzymana z użyciem pożywki kombinowanej o powyższym składzie charakteryzuje się zwiększonym przekrojem poprzecznym włókien celulozowych, jak również zwiększoną liczbą wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami [71].

Odpady z procesu fermentacji acetonowo-butanolowo-etanolowej

Wysokiej jakości BC może być wytwarzana również z wykorzystaniem ścieków pofermentacyjnych z syntezy biorozpuszczalników, które otrzymywane są w procesie określanym jako fermentacja ABE (acetonowo-butanolowo-etanolowa). Wykazano, że bakterie *K. xylinus* są zdolne do produkcji BC z wykorzystaniem pofermentacyjnego płynu z procesu fermentacji ABE, gdzie wartość chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) wynosiła nawet powyżej 18 000 O₂ mg/L (czyli poziomu charakterystycznego dla odcieków z wysypisk śmieci). Ponadto zaobserwowano, że medium hodowlane utworzone na bazie ścieków z fermentacji ABE nie wpłynęło istotnie na strukturę powstającej BC, której budowa była zbliżona do BC uzyskiwanej z wykorzystaniem tradycyjnej pożywki H-S. Sugeruje się, że za powyższy efekt oraz za wysoką wydajność produkcji uzyskiwaną w tym procesie (wynoszącą 1,34 g/L) odpowiada specyficzny skład zastosowanego podłoża. Potwierdzono, że pofermentacyjny płyn z procesu ABE jest zasobnym źródłem węgla ze względu na obecność cukrów (głównie glukozy i ksylozy), kwasów organicznych (głównie kwasu octowego i masłowego) oraz alkoholi monohydroksylowych (głównie etanolu i butanolu) [31].

Odpady z procesu degradacji olejów

Rozwiązaniem mającym wysoki potencjał praktyczny w zakresie opracowywania podłoża do produkcji BC, jest wykorzystanie pochodzących z pofermen-

tacyjnego wywaru będącego pozostałością po procesie utylizacji substancji ropopochodnych przez drożdże. Zaobserwowano, że odpad powstały po hodowli drożdży *Trichosporon cutaneum*, przeprowadzających mikrobiologiczną degradację olejów, może stanowić dla *K. xylinus* substrat do produkcji BC. Wysoką (wynoszącą 0,659 g/L) wydajność syntezy BC tłumaczy się zdolnością wykorzystania przez *K. xylinus* obecnych w odpadzie krótkołańcuchowych węglowodorów, jako preferowanego źródła węgla [30].

Hydrolizaty biomasy drożdży

Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie do mikrobiologicznej syntezy BC hydrolizatu uzyskanego na drodze kwaśnej hydrolizy biomasy drożdży oleistych z rodzaju *T. cutaneum*. Okazuje się, że biomasa drożdży z rodzaju *T. cutaneum* po ich odseparowaniu ze środowiska hodowlanego, może stanowić alternatywę dla kosztownych tradycyjnych podłoży stosowanych do produkcji BC. Wykazano, że kwaśny hydrolizat biomasy drożdży *T. cutaneum*, które są zdolne do akumulacji dużej ilości lipidów, może być pożądanym substratem do produkcji BC przez szczep *K. xylinus*. Wskazuje się, że hydrolizat biomasy drożdży *T. cutaneum* jako odpad może stanowić cenne źródło węgla do produkcji BC, głównie ze względu na obecność takich związków jak glukoza, mannoza, kwas mrówkowy oraz octowy. Wykorzystanie do produkcji BC płynów pochodzących z pofermentacyjnych oraz hydrolizatów biomasy drożdżowej może stanowić jednocześnie skuteczny sposób zagospodarowania olejowych odpadów przemysłowych charakteryzujących się wysokim poziomem ChZT [54]. Istotnym uzupełnieniem przytoczonych rezultatów badań jest obserwacja, że wzbogacenie podłoża hodowlanego olejem roślinnym może zwiększyć wydajność produkcji BC. Wykazano, że zastąpienie 1% objętości tradycyjnej pożywki hodowlanej olejem rzepakowym pozwala aż 6-krotnie zwiększyć wydajność produkcji BC w porównaniu do wydajności uzyskanej z wykorzystaniem niezmodyfikowanej pożywki H-S. Zaobserwowano, że błony BC uformowane z wykorzystaniem pożywki wzbogaconej olejem roślinnym wykazują 3-krotnie wyższą wytrzymałość na rozciąganie (3,2 MPa) w porównaniu do BC pozyskanej z hodowli na tradycyjnym podłożu, której wytrzymałość na rozciąganie nie przekraczała 1 MPa [108].

Podejmowane są również próby wykorzystania do produkcji BC odpadowych drożdży piwarskich. Wykazano, że alkaliczne hydrolizaty odpadowych drożdży piwarskich mogą stanowić źródło cennych składników odżywczych dla *K. hansenii* CGMCC 3917. Właściwości fizykochemiczne uzyskanej w ten sposób BC były porównywalne z właściwościami tego polimeru wytworzonego z wykorzystaniem podłoża H-S [50].

Hydrolizaty biomasy roślinnej

Kolejnym przykładem zastosowania odpadów organicznych jako źródła węgla oraz energii do produkcji BC jest wykorzystanie hydrolizatów biomasy roślinnej (*plant biomass hydrolysates*). Wyniki badań wskazują, że kwaśna hydroliza biomasy niektórych gatunków traw pozwala uzyskać cenny surowiec dla podłoża do mikrobiologicznej syntezy BC. Potwierdzono, że prowadzona z wykorzystaniem 2,5% kwasu siarkowego w wysokiej temperaturze (135°C) hydroliza liści rozplenicy słoniowej (*Pennisetum purpureum*) pozwala uzyskać pożywkę umożliwiającą hodowlę *K. xylinus* (szczep CH001) w warunkach statycznych. Z tego powodu, że jednym z produktów procesu hydrolizy obecnej w liściach traw lignocelulozy jest ksyloza, sugeruje się, że monosacharyd ten może stanowić zasobne źródło węgla dla szczepu *K. xylinus* CH001 wykorzystywanego do produkcji wysokowartościowej BC [102]. Trudnością w opisaną wyżej technologię może stanowić wyeliminowanie oddziaływania obecnych w liściach rozplenicy słoniowej związków fenolowych, jak aldehyd koniferylowy, kwas ferulowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy oraz wanilina (4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd), które hamują wzrost *K. xylinus* [102, 104].

Interesujące rezultaty uzyskano w badaniach nad wykorzystaniem do hodowli *K. xylinus* podłoża, którego podstawowym surowcem były łupiny nasienne niektórych gatunków owoców poddane kwaśnej hydrolizie. Wykazano, że łupiny nasienne (pochodzącego z Azji Południowo-Wschodniej) tropikalnego owocu Durian w efekcie trawienia kwasem siarkowym dostarczają hydrolizat mogący być cennym składnikiem dla podłoża do produkcji BC. Analiza chemiczna wykazała, że źródłem węgla w tym podłożu dla *K. xylinus*, są przede wszystkim glukoza, ksyloza, kwas mrówkowy oraz kwas octowy. Stwierdzono, że BC wytworzona w oparciu o powyższe podłoże w wyniku 10-dniowej hodowli statycznej, charakteryzuje się strukturą porównywalną z budową BC wytworzonej na bazie tradycyjnej pożywki H-S [53]. Opisana technologia biosyntezy BC (której produktywność określono na poziomie 2,67 g/L) może stanowić ekologiczne rozwiązanie problemu zagospodarowania odpadów i niewykorzystanych materiałów roślinnych pochodzących z upraw rolniczych i ogrodniczych (np. liście, trawa, kiszonka z roślin zbożowych i kukurydzy) [53, 93, 102, 104].

Alkohole odpadowe z produkcji biodiesla

Badania wskazują, że wartościowymi substratami wykorzystywanymi w procesie mikrobiologicznej syntezy BC są również niektóre alkohole powstające jako odpad przy produkcji biodiesla (waste spirits from biodiesel production), jak glicerol, diacyloglicerol oraz

metanol. Wykazano, że glicerol umożliwia *K. xylinus* (szczep PTCC 1734) wysoce wydajną syntezę BC, przewyższającą tę, która odbywa się na podłożu bogatym w glukozę (np. podłożu H-S). Najpewniej wynika to z faktu, że glicerol i metanol, stosowane jako źródło węgla podczas biosyntezy BC, mają mniejszy niż glukoza udział w powstawaniu kwasu glukonowego, który hamuje proces powstawania BC. Podobne zjawisko, jak w przypadku glicerolu, zaobserwowano, gdy jako źródło węgla dla biosyntezy BC zastosowano mannitol [90].

Wodne ekstrakty z drzewnych materiałów odpadowych

Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem do produkcji BC podłoża stanowiącego ekstrakt wodny powstały po procesie rozwłóknienia surowca drzewnego, przeprowadzanego metodą ekstrakcji gorącą wodą lub parą wodną. Wykazano, że ekstrakty wodne takich surowców, jak osika, eukaliptus, brzoza, sosna czy świerk (będące jednocześnie materiałem odpadowym z przemysłu celulozowo-papierniczego) charakteryzują się wysoką zawartością monosacharydów i disacharydów, głównie fruktozy, glukozy, ksylozy oraz sacharozy. Dzięki temu wspomniane wodne ekstrakty z drzewnych (lignocelulozowych) materiałów odpadowych mogą stanowić pożywkę do produkcji BC przez *K. xylinus* (szczep 23769) [47].

Odpady poprodukcyjne z przemysłu mleczarskiego

Podobne wyniki zaobserwowano w przypadku innego surowca poprodukcyjnego z przemysłu spożywczego, jakim jest płynna serwatka. Serwatka zawiera 6–7% stałych składników odżywczych mleka, co powoduje, że surowiec ten umożliwia szybki wzrost większości drobnoustrojów. Wyniki badań wskazują, że zastosowanie serwatki jako pożywki umożliwia produkcję BC przez *K. sucrofermentans* B-11267 w warunkach hodowli dynamicznej (wstrząsanej i bioreaktorowej) w ilości 5,45 g/L. Wskazuje się, że serwatka może stanowić uzupełnienie w substancje odżywcze tradycyjnie stosowanych pożywek mikrobiologicznych oraz może poprawiać stabilność podłoża pod względem właściwości fizykochemicznych (np. pH) [73] (Tab. I).

6. Techniki hodowli drobnoustrojów produkujących bionanocelulozę

Wydajność i opłacalność produkcji oraz właściwości BC uzależnione są nie tylko od rodzaju bakterii i typu zastosowanego podłoża, ale również od metody hodowli drobnoustrojów. Warunki hodowli

Tabela I
Przykładowe surowce i drobnoustroje wykorzystywane do syntezy bionanocelulozy

Surowiec (źródło węgla)	Rodzaj bakterii	Piśmiennictwo
Melasa (melas): melasa buraczana, melasa trzcinowa, melasa karobowa	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[70]
Cienki wywar gorzelniany	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[99]
Namok kukurydziany	<i>Komagataeibacter xylinus</i> <i>Komagataeibacter hansenii</i>	[76]
Wywar z łusek ziaren kawy	<i>Komagataeibacter hansenii</i>	[71]
Odpad po produkcji wina ryżowego	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[34]
Pszeniczny cienki wywar gorzelniany	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> B-11267	[73]
Odpady z procesu fermentacji ABE	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[31]
Pofermentacyjny wywar z hodowli drożdży	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[30]
Hydrolizaty biomasy roślinnej: – hydrolizaty liści rozplenicy słoniowej – łupiny nasienne owocu Durian	<i>Komagataeibacter xylinus</i> CH001	[102]
Alkohole odpadowe z produkcji biodiesla: – glicerol – diacyloglicerol – metanol	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[54]
Wodne ekstrakty drzewne	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	[47]
Serwatka	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> B-11267	[73]

drobnoustrojów mają również wpływ na postać morfologiczną oraz właściwości fizyczne powstającej BC, jak np. wytrzymałość na rozciąganie czy zdolność do absorpcji wody.

Hodowle statyczne

Jedną z powszechnie stosowanych metod hodowli przy produkcji BC są hodowle powierzchniowe, w trakcie których wytwarzanie polimeru odbywa się na dużych powierzchniach podłoży stałych bądź płynnych. Ten rodzaj hodowli drobnoustrojów, stosowany jest przede wszystkim w celu uzyskania BC w formie płaskiej membrany o jednorodnej strukturze i zdefiniowanej grubości. W skali laboratoryjnej ten rodzaj produkcji przeprowadzany jest w naczyniach zapewniających dużą powierzchnię swobodną płynu hodowlanego. Powszechnie stosowanymi naczyniami zapewniającymi powyższe warunki są płytki Petriego, kolby typu Roux oraz kolby Fernbacha o dużej średnicy podstawy. W tego typu hodowlach drobnoustroje wykorzystują całą powierzchnię podłoża, na której formowany jest finalny produkt w postaci błony nanocelulozowej. W hodowli powierzchniowej ułatwione jest pozyskiwanie substancji wzrostowych, które pobierane są przez drobnoustroje z całej powierzchni cieplego lub stałego podłoża. Prowadzenie hodowli na podłożach stałych pozwala również na szybkie i dokładne usuwanie z jego powierzchni wytworzonej BC [27].

Na skalę przemysłową produkcję metodami statycznymi przeprowadza się w wielolitrowych tacach, kuwetach i wannach ociekowych wypełnionych pod-

łożem, na powierzchni którego formuje się BC [35]. Innym wariantem hodowli na podłożu w warunkach statycznych są hodowle okresowe z wykorzystaniem wielolitrowych fermentorów (bez wirnika). W tego typu hodowli, określanej terminem hodowli wsadowej, następuje okresowe uzupełnianie świeżej pożywki oraz okresowe pobieranie wytworzonej BC z powierzchni podłoża hodowlanego [29, 84].

W przypadku produkcji BC na skalę przemysłową coraz częściej wykorzystuje się bioreaktory typu HoLiR (Horizontal Lift Reactor). Poziome bioreaktory typu HoLiR stanowią ułożone poziomo prostopadłościennie podłużne zbiorniki wypełnione pożywką hodowlaną, na powierzchni której odbywa się synteza BC w postaci błony powierzchniowej o kształcie prostokątnego arkusza. W tego typu bioreaktorach formowanie tworzącej się BC odbywa się w sposób ciągły poprzez podnoszenie (na jednym z końców zbiornika) i bardzo powolne wyciąganie kilkumilimetrowych arkuszy (błon) BC z dna powierzchni podłoża [28].

Innym przykładem hodowli statycznej są hodowle kultur bakteryjnych prowadzone w tzw. reaktorach aerozolowych. W tego typu reaktorach składniki odżywcze dla drobnoustrojów są natryskiwane w kierunku prostopadłym do płaskiej powierzchni przesuwającej się taśmy, na której następuje formowanie się błony nanocelulozowej. Formujące się błony nanocelulozowe w reaktorach aerozolowych osiągają grubość kilku centymetrów i z tego powodu polimer w ten sposób otrzymany znajduje zastosowanie w tworzeniu materiałów konstrukcyjnych (np. biomedycznych), wymagających wysokich parametrów technicznych [11, 12, 101].

Zaobserwowano, że gdy proces hodowli drobnoustrojów (np. *G. xylinus*) przebiega w warunkach statycznych metodą powierzchniową, to formowanie BC odbywa się na powierzchni pożywki hodowlanej w postaci biało-żółtej silnie uwodnionej elastycznej błony (kożucha) [42]. W przypadku produkcji BC statycznymi metodami powierzchniowymi intensywność syntezy tego polimeru jest istotnie ograniczona ilością tlenu docierającego do powierzchni podłoża [8]. BC po wytworzeniu poddaje się procesowi oczyszczania z wytwarzających ją komórek drobnoustrojów. Najczęściej w tym celu wytworzona błonę BC poddaje się przemywaniu wodą demineralizowaną oraz namaczaniu 0,1 M NaOH w temperaturze 80°C przez 2 godziny. Po usunięciu komórek bakteryjnych uformowane folie BC ponownie kilkakrotnie przemywa się dejonizowaną wodą, aby całkowicie usunąć pozostałości ługu sodowego i tym samym nadać błonie nanocelulozowej odczyn obojętny. Etapem końcowym pozyskiwania materiału nanocelulozowego, cechującego się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi, jest proces suszenia wytworzonej BC. Najczęściej przeprowadza się go w suszarkach z naturalnym obiegiem powietrza o temperaturze około 60°C przez okres 12 godzin. Zaletą tego rodzaju suszenia jest równomierne nagrzewanie i całkowite usunięcie wody z surowca przy zachowaniu wszystkich pożądaných właściwości BC [15].

Hodowle wstrząsane

Odmiernym sposobem produkcji jest wytwarzanie BC w warunkach hodowli wstrząsanych. Prowadzenie hodowli metodą wstrząsaną ma na celu wprowadzenie do podłoża dodatkowych ilości powietrza. Napowietrzenie jest jednym z głównych zabiegów technologicznych mających na celu poprawę wydajności produkcji BC. Dodatkowe zwiększenie efektu napowietrzenia osiąga się poprzez umieszczenie w podłożu hodowlanym szklanych kuleczek. W warunkach hodowli wstrząsanych, w których wykorzystywane są pożywki ciekłe, drobnoustroje wytwarzają BC w postaci owalno-kulistych kłębków nanocelulozowych o włóknistych nieregularnych brzegach [41, 92]. Produkcję BC metodą wstrząsaną prowadzi się zazwyczaj w szklanych kolbach stożkowych (np. Erlenmeyera), które umieszczone są w inkubatorach wstrząsarkowych. Tego typu hodowlę prowadzi się zazwyczaj przy 10–30% wypełnieniu kolb pożywką hodowlaną, najczęściej przy szybkości obrotowej od 150–250 obrotów/min. oraz w zakresie temperatur 28–32°C w czasie 72–150 godzin. Poprzez zmianę każdego z tych parametrów można wpływać na przebieg produkcji BC, jak również dostosowywać warunki biosyntezy do konkretnego rodzaju drobnoustroju, jak również do właściwości i planowanych do uzyskania cech fizykochemicznych wytwarzanego materiału [45, 80, 106].

Hodowle w bioreaktorze

Kolejnym powszechnie stosowanym rodzajem hodowli drobnoustrojów produkujących BC są hodowle wgłębne prowadzone w bioreaktorach mikrobiologicznych z wykorzystaniem płynnych podłoży hodowlanych. Hodowle w bioreaktorach przeprowadzane są w celu osiągnięcia większej wydajności procesu biosyntezy. Z tego względu, że ilość tlenu w pożywkach płynnych jest stosunkowo niewielka (co jest szczególnie niekorzystne dla bezwzględnych tlenowców, do których należy np. *K. xylinus*), tego typu podłoża muszą być poddawane dodatkowemu napowietrzaniu (aeracji). Zwiększenie ilości tlenu w pożywce jest szczególnie istotne w przypadku podłoży mikrobiologicznych intensywnie i długotrwale eksploatowanych. Proces napowietrzania pożywki w hodowlach bioreaktorowych najczęściej odbywa się poprzez montaż we wnętrzu bioreaktora mieszadła mechanicznego, które poprzez intensywne mieszanie medium zapewnia zwiększenie kontaktu podłoża z powietrzem i w konsekwencji odpowiednio wysoką prężność tlenu w podłożu hodowlanym. W efekcie działania takiego mieszadła podłoże hodowlane w bioreaktorze staje się maksymalnie równomiernie natlenione [106].

Innym sposobem napowietrzania hodowli płynnych jest wtłaczanie powietrza pod ciśnieniem z użyciem kompresora podłączonego do bioreaktora, który wypełniony jest podłożem hodowlanym. Ten rodzaj napowietrzania stosuje się w hodowlach prowadzonych na skalę wielkolaboratoryjną, półprzemysłową oraz przemysłową. Zaobserwowano, że podczas hodowli drobnoustrojów z wykorzystaniem reaktora z uruchomionym mieszadłem, następuje formowanie BC w nieregularne grudki lub pasma włóknistej masy celulozowej. Otrzymaną w efekcie hodowli bioreaktorowej BC oddziela się od cieczy pohodowlanej i wytwarzających ją drobnoustrojów przez dekantację lub sączenie (filtrację), które zazwyczaj przeprowadza się poprzez przelewanie podłoża hodowlanego z wykształconą BC przez odpowiednie sączki lub bibuły filtracyjne [106]. W procesie oczyszczania wytworzonej BC wykorzystuje się wiele chemicznych i fizycznych właściwości, którymi uzyskany materiał różni się od znajdujących się zanieczyszczeń w podłożu hodowlanym. Jedną z tych cech jest odporność BC na działanie alkaliów. Dlatego jedną z najczęściej spotykanych metod oczyszczania wytworzonej BC jest działanie rozcieńczonymi roztworami alkalicznymi (np. 1% roztworem wodorotlenku sodu) w podwyższonej temperaturze (80–85°C). W powyższych warunkach następuje hydroliza zanieczyszczeń organicznych (np. komórek drobnoustrojów) [25, 71]. Innym sposobem oczyszczania BC, który bardzo często stanowi uzupełnianie hydrolizy alkalicznej w podwyższonej temperaturze, jest usuwanie osadów

i zanieczyszczeń roztworami kwasowymi (np. z wykorzystaniem 6% kwasu octowego). W końcowym etapie procesu oczyszczania uzyskaną BC intensywnie przepłukuje się wodą destylowaną, aby nadać jej odczyn obojętny [95].

7. Możliwości zastosowania bionanocelulozy w przemyśle spożywczym

Celuloza bakteryjna jest naturalnym materiałem, który ze względu na unikatowe właściwości oraz możliwość otrzymywania przy wykorzystaniu nieskomplikowanych technik syntezy mikrobiologicznej, znajduje coraz szersze zastosowanie w wielu sektorach przemysłu spożywczego. Początek zastosowania BC w przemyśle spożywczym jest związany z pojawieniem się na początku lat 90. (początkowo na rynku japońskim i filipińskim) produktów żywnościowych z dodatkiem nata de coco, czyli tzw. „galaretki kokosowej” lub „żelu kokosowego”. W pierwszym okresie istnienia na rynku, żywność z dodatkiem nata de coco była oferowana konsumentom w postaci napojów i deserów, które pełniły rolę produktów dietetycznych, stanowiących źródło błonnika pokarmowego. Dodatkowym elementem żywności z rodzaju nata de coco, który zadecydował o jej atrakcyjności wizualnej, jest charakterystyczna dla produktów wysokobłonnikowych żelowa konsystencja tworząca się po kontakcie błonnika nierozpuszczalnego z wodą [19].

Najczęstszym substratem hodowlanym do mikrobiologicznej produkcji BC, wykorzystywanej w produktach nata de coco, jest woda kokosowa pozyskiwana z niedojrzałych orzechów kokosowych [2]. Woda kokosowa to mało stężony płyn, który pozyskuje się z młodych, jeszcze zielonych, nie w pełni dojrzałych owoców palmy kokosowej (*Cocos nucifera* L.) [2]. Istotną cechą wody kokosowej jest duża zmienność jej składu chemicznego i wartości odżywczych, które uzależnione są od stopnia dojrzałości owocu kokosa. Dlatego, aby zoptymalizować efekty produkcji BC z wykorzystaniem wody kokosowej, bierze się pod uwagę jej potencjalne różnice w zawartości składników mineralnych oraz substancji organicznych będących źródłem węgla. Obecność w wodzie kokosowej glukozy, która stanowi źródło węgla dla bakterii (np. *K. xylinus*) oraz sodu, wpływa na właściwą osmolarność podłoża wykorzystywanego do produkcji BC [37]. Szczególnie istotną ze względów technologicznych właściwością wody kokosowej jest jej naturalna czystość mikrobiologiczna. Wysoka sterylność wody kokosowej jest efektem jej przepływu przez system długich i rozbudowanych kapilar przewodzących wodę, który w pniu palmy kokosowej w komórkach ksylemu osiąga od 30 do 40 m długości [49]. Potwierdzono, że podczas przemieszczania wody

od korzeni po koronę palmy kokosowej, podlega ona wielokrotnej filtracji i oczyszczaniu, dzięki czemu staje się sterylnie czysta, co ma szczególne znaczenie ze względu na konieczność zapewnienia bezpieczeństwa produkowanej na bazie wody kokosowej żywności. Tym samym przezroczysty płyn wypełniający wnętrza niedojrzałych owoców kokosa (woda kokosowa) może być wykorzystany jako pożywka hodowlana niewymagająca stosowania wysokotemperaturowej sterylizacji. Natomiast obecna w wodzie kokosowej glukoza w ilości nie przekraczającej 1–2% powoduje, że stanowi ona pożywkę mikrobiologiczną o optymalnych właściwościach biochemicznych dla rozwoju drobnoustrojów produkujących BC [20].

Proces syntezy BC z wykorzystaniem wody kokosowej (nazywany również systemem hodowli nata de coco) ma charakter tlenowy i przejawia się w formowaniu na powierzchni podłoża w trakcie 3-dniowej hodowli białawego, galaretowatego kożucha. Po oddzieleniu od płynu hodowlanego, uzyskaną błonę nanocelulozową poddaje się dokładnemu płukaniu przy użyciu wody destylowanej lub 0,9% roztworu NaCl [85]. Następnie wypłukana z resztek składników płynu hodowlanego BC poddawana jest (w celu unieszkodliwieniu drobnoustrojów) krótkotrwałej obróbce cieplnej, najczęściej wysokotemperaturowej pasteryzacji. W celu nadania odpowiedniej postaci konsumpcyjnej, skład produktów nata de coco jest uzupełniany odpowiednim rodzajem cukru, najczęściej sacharozą lub fruktozą. Przygotowane w powyższy sposób deserowe produkty spożywcze, jak np. puddingi, są dodatkowo wzbogacane kawałkami owoców (np. mango, liczi, pomarańczy, truskawki, melona i in.) lub ekstraktami owocowymi [10, 39].

Celulozę bakteryjną w postaci dodatku do żywności (kostek nata de coco) coraz częściej wykorzystuje się jako czynnik stabilizujący i poprawiający właściwości półpłynnych produktów żywnościowych. Wykazano, że BC wiąże we wnętrzu swojej struktury wodę i tym samym tworzy galaretowaty, lepki i żelowy materiał, który jest łatwy do dzielenia, np. w trakcie formowania kęsów. Dlatego BC o odpowiednio przygotowanej galaretowato włóknistej konsystencji może być surowcem wykorzystywanym do przygotowywania niskokalorycznych, atrakcyjnych sensorycznie produktów spożywczych, jak sałatki oraz desery [22].

Jednym z wielu zastosowań BC w tym obszarze jest stabilizacja układów heterogenicznych żywności, jakimi są emulsje typu olej w wodzie. Wykazano, że BC może być wykorzystywana jako stabilizator wytwarzając tzw. emulsję Pickeringa. Udowodniono, że BC dodana do żywności, obniża napięcie międzyfazowe między niemieszającymi się fazami układu dwufazowego (ciecz niepolarna – ciecz polarna). Jest to możliwe dzięki tzw. oleożelom (organożelom), czyli strukturom powstałym

w wyniku ustabilizowania oleju w sieci wytworzonej przez medium żelujące, które charakteryzuje się lepka i sprężystą konsystencją [107]. Wykazano, że do powstania emulsji olejowo-wodnych w środowisku hydrofilowym konieczna jest obecność substancji żelujących, jak np. etyloceluloza czy też hydroksypropylometyloceluloza [18]. Najprawdopodobniej podobną funkcję spełnia również BC, która poprzez proces włączania cząsteczek oleju do wodnej zawiesiny celulozowego polisacharydu prowadzi do powstania emulsji typu olej w wodzie. Na tej podstawie istnieją możliwości wykorzystania BC jako preparatu stabilizującego emulsje wodno-olejowe w strukturze żywności [56]. Dzięki tej właściwości BC dodawana do produktów może pełnić rolę naturalnych i bezpiecznych dla konsumentów emulgatorów. W przypadku takich produktów jak surimi (czyli żywności powstałej na bazie rozdrobnionego i zmielonego mięsa ryb), obecność BC staje się elementem stabilizującym mieszaninę oleju, octu i nawodnionego proszku jajecznego [52].

Ciekawym rozwiązaniem, wykorzystywanym przez producentów wyrobów spożywczych, jest stosowanie w produkcji żywności deserowej i dietetycznej preparatów zawierających sproszkowaną BC. Tego rodzaju preparaty wykorzystywane są jako środek wypełniający, zagęszczający, teksturujący oraz redukujący ilość kalorii w żywności [60].

Celuloza bakteryjna może być również wykorzystywana w przemyśle spożywczym w charakterze substancji przedłużającej trwałość żywności. Substancją wykorzystywaną w tym celu jest pochodna celulozy w postaci karboksymetylocelulozy lub soli sodowej karboksymetylocelulozy. Karboksymetyloceluloza otrzymywana z *nata de coco*, określana jako karboksymetylo-nata, najczęściej jest przygotowywana w procesie eteryfikacji kwasem monochlorooctowym oraz późniejszej merceryzacji ługiem sodowym. Jedną z praktyk mającą na celu przedłużenie trwałości owoców po ich zbiorze jest pokrywanie ich powierzchni warstwą karboksymetylocelulozy. Badania wykazały, że powlekanie owoców papryki warstwą karboksymetylocelulozy, pozwala skutecznie ograniczyć utratę jędrności oraz wody z wnętrza tych owoców, nawet w sytuacji, gdy są one przechowywane w temperaturze 25°C przez 30 dni. Wyniki badań wskazują również, że powłoki z karboksymetylocelulozy pomagają zmniejszać szybkość dojrzewania owoców, np. papryki. Tym samym stosowanie tego polimeru może być skuteczną metodą opóźnienia dojrzewania owoców. To działanie ma szczególne znaczenie w zachowaniu jakości surowców roślinnych podczas działań transportowych [81]. Podobny eksperyment z wykorzystaniem metylocelulozy potwierdził, że niejonowe etery BC zwiększają trwałość i świeżość kurzych jaj. Wykazano, że kurze jaja tuż po zbiorze, które były pokryte warstwą metylocelulozy i przecho-

wywane w temperaturze poniżej 18°C, dłużej zachowywały świeżość aniżeli jaja kontrolne (niepokryte warstwą metylocelulozy). Zastosowana warstwa metylocelulozy pozwoliła zachować kurzym jajom świeżość powyżej 28 dni po zniesieniu [89].

Pochodne chemiczne BC mogą poprawiać właściwości reologiczne produktów żywnościowych. Pozytskana z BC hydroksypropylometyloceluloza (zwana również hypromelozą) może być stosowana do sporządzania mieszanek piekarniczych. Dzięki tej substancji (oznaczanej symbolem E 464), wypiekane pieczywo nie kruszy się i zachowuje wymaganą wilgotność. Dodatek hydroksypropylometylocelulozy do mąki bezglutenowej pozwala uzyskać w procesie wypieku pieczywo, które charakteryzuje się odpowiednią spistością i elastycznością, których to brak jest dużą uciążliwością w procesie produkcji wypieków pozbawionych glutenu. Ze względu na opisane właściwości hydroksypropylometyloceluloza jest często stosowana również przy produkcji sosów, zup instant, deserów mlecznych oraz jogurtów. Wykorzystuje się ją również przy produkcji suplementów diety jako zamiennik żelatyny podczas wytwarzania zarówno twardych jak i miękkich kapsulek dla takich substancji, jak witaminy czy sole mineralne [105].

Ponadto zaobserwowano, że produkty spożywcze wzbogacone o inną pochodną BC – karboksymetylocelulozę, charakteryzują się korzystniejszymi właściwościami reologicznymi i teksturalnymi względem tradycyjnych produktów spożywczych. Karboksymetyloceluloza otrzymywana jest w wyniku katalizowanej alkalicznie reakcji oczyszczonej BC z kwasem monochlorooctowym. Obecnie w przemyśle spożywczym najpowszechniej stosowana jest sól sodowa karboksymetylocelulozy, którą otrzymuje się poprzez działanie chlorooctanu sodu na BC. Dzięki dodatkowi karboksymetylocelulozy niektóre produkty, jak np. wyroby cukiernicze i ciastkarskie, charakteryzują się sprężystą teksturą przypominającą teksturę niektórych owoców, jak np. winogron [14].

Obecnie podejmowane są również próby wytwarzania z BC opakowań dla produktów żywnościowych. Opakowania powstałe na bazie surowców biologicznych, jakim jest BC, stają się ogromną nadzieją dla przemysłu opakowaniowego ze względu na niskie koszty wytworzenia oraz ich niewielkie oddziaływanie na środowisko przyrodnicze. Z tego względu, że opakowania z BC są w pełni biodegradowalne, rozwiązania te stwarzają szansę na ich upowszechnienie i masowe wykorzystanie w przemyśle i gospodarstwie domowym [3, 85, 86]. Wykazano, że z kolei proces oksydacji (w którym następuje utlenienie grup hydroksylowych celulozy do grup aldehydowych, ketonowych lub karboksylowych) powoduje, że BC uzyskuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Z tego powodu

Tabela II
Zastosowanie bionanocelulozy i jej pochodnych w przemyśle spożywczym

Lp.	Bionanoceluloza i jej pochodne	Zastosowanie w przemyśle spożywczym	Piśmiennictwo
1	nata de coco	<ul style="list-style-type: none"> ◆ dietetyczny dodatek do deserów (jako źródło błonnika pokarmowego) ◆ stabilizator półpłynnych produktów żywnościowych 	[2, 22]
2	etyloceluloza hydroksypropylometyloceluloza (hypromeloza)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ stabilizacja emulsji typu olej w wodzie 	[18]
3	hydroksypropylometyloceluloza (hypromeloza)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ stabilizacja emulsji Pickeringa ◆ nadawanie spistości i elastyczności cukierniczym produktom bezglutenowym ◆ składnik otoczki kapsulek dla suplementów diety ◆ substancja nadająca sprężystą teksturę produktom żywnościowym 	[56, 105]
4	karboksymetyloceluloza	<ul style="list-style-type: none"> ◆ substancja przedłużająca jędrność owoców 	[81]
5	metyloceluloza	<ul style="list-style-type: none"> ◆ substancja przedłużająca świeżość kurzych jaj 	[89]
6	oksydowana celuloza	<ul style="list-style-type: none"> ◆ biodegradowalny materiał opakowaniowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych 	[86]

oksydowana BC może być potencjalnym składnikiem opakowań, które mają na celu przedłużenie trwałości mikrobiologicznej opakowywanego produktu spożywczego [90] (Tab. II).

Możliwości zastosowania na szeroką skalę BC w przemyśle spożywczym są silnie uzależnione od skuteczności metod wytwarzania czystego i sterylnego materiału o odpowiednich właściwościach reologicznych. Właściwości te są z kolei silnie uzależnione od metody zastosowanej do produkcji BC. Hodowle wstrząsane prowadzone w inkubatorach wytrząsarkowych umożliwiają syntezę silnie rozgałęzionej, trójwymiarowej BC, o siatkowej strukturze, podczas gdy hodowle statyczne umożliwiają wytwarzanie płaskiej błony celulozowej o znacząco mniejszej ilości wewnętrznych rozgałęzień [48, 51]. Z kolei zastosowanie do produkcji BC bioreaktora (fermentora) i tym samym odpowiednich warunków tlenowych umożliwia osiągnięcie dużej szybkości i wydajności produkcji. Zastosowanie do produkcji bioreaktora umożliwia ponadto wytworzenie przez *K. xylinus* polimeru celulozowego, który zbudowany jest z komponentów włóknistych o różnorodnej średnicy i strukturze przestrzennej [48]. Pożądane właściwości fizykochemiczne BC można uzyskać poprzez zmianę cech zastosowanych bioreaktorów, takich jak kształt naczynia bioreaktorowego (naczynia hodowlanego) i mieszadła wirnikowego. Zaletą bioreaktorów zbiornikowych wyposażonych w system mieszadeł mechanicznych jest możliwość uzyskania podłoża hodowlanego o wysokim stopniu jednorodności. Jednym z głównych ograniczeń w przemysłowym zastosowaniu bioreaktorów do produkcji BC jest wysoki koszt instalacji oraz trudności w usuwaniu z nich produktów ubocznych metabolizmu komórkowego *K. xylinus* [48, 51].

8. Podsumowanie

Celuloza bakteryjna (bionanoceluloza) to unikalny materiał o szczególnych właściwościach, które sprawiają, że surowiec ten znajduje coraz więcej praktycznych zastosowań w różnych gałęziach przemysłu, w tym w przemyśle spożywczym. Niektóre rodzaje drobnoustrojów, jak np. bakterie kwasu octowego, mogą stanowić (w odniesieniu do roślin wyższych) alternatywne źródło celulozy, która wytwarzana jest w procesie tlenowej biosyntezy prowadzonej w warunkach statycznych, wstrząsanych, jak i bioreaktorowych. Zastosowanie tradycyjnych podłoży mikrobiologicznych (np. Hestrin-Schramm'a), ze względu na ich wysokie koszty i niską wydajność dla produkcji, stanowi silne ograniczenie ich komercyjnego wykorzystania na skalę przemysłową. Dlatego współcześnie prowadzone badania skupiają się na wykorzystaniu organicznych i nieorganicznych odpadów przemysłowych, które mogą być nowym, opłacalnym źródłem węgla dla drobnoustrojów produkujących BC. Dzięki temu mikrobiologiczna produkcja BC może stać się elementem niwelowania negatywnego wpływu przedsiębiorstw produkcyjnych na środowisko naturalne. Być może z tego powodu w przyszłości produkcja BC będzie ściśle powiązana z systemami produkcji innych materiałów, którym towarzyszy proces powstawania uciążliwych odpadów i zanieczyszczeń.

Piśmiennictwo

1. Abarca-Grau A.M., Burbank L.P., Paz H.D., Crespo-Rivas J.C., Marco-Noales E., López M.M., Vinardell J.M., Bodman S.B., Penyalver R.: Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 Cell envelope polysaccharides in surface interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1644–1651 (2012)

2. Akoğlu A., Karahan A.G., Çakmakçı M.L., Çakır I.: Properties of bacterial cellulose and usage in food industry. *GIDA/J. Food*. **35**, 127–134 (2010)
3. Arrieta M.P., Fortunati E., Dominicci F., Rayón E., López J., Kenny J.M.: PLA-PHB/Cellulose based films: mechanical, barrier and disintegration properties. *Polym. Degrad. Stabil.* **107**, 139–149 (2014)
4. Augimeri R.V., Varley A.J., Strap J.L.: Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: Lessons learned from diverse biofilm-producing. *Proteobacteria Front. Microbiol.* **6**, 1282 (2015)
5. Bae S.O., Shoda M.: Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1366–1371 (2004)
6. Bae S.O., Shoda M.: Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 45–51 (2005)
7. Bielecki S., Kalinowska H.: Biotechnologiczne nanomateriały. *Post. Mikrobiol.* **47**, 163–169 (2008)
8. Borzani W., Souza S.J.: Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1271–1272 (1995)
9. Brand M.T., Carter M.Q., Parker C.T., Chapman M.R., Huynh S., Zhou Y.: *Salmonella* biofilm formation on *Aspergillus niger* involves cellulose – chitin interactions. *PLoS One*, **6**, e25553 (2011)
10. Budhiono A., Rosidia B., Taher H., Iguchi M.: Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydr. Polym.* **40**, 137–143 (1999)
11. Cakar F., Ozer I., Aytakin A.Ö., Sahin F.: Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydr. Polym.* **15**, 106, 7–13 (2014)
12. Cheng K.C., Catchmark J.M., Demirci A.: Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *J. Biol. Eng.* **3** (2009)
13. Cheng K.C., Catchmark J.M., Demirci A.: Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules*, **14**, 730–736 (2011)
14. Correa M.J., Añón M.C., Pérez G.T., Ferrero C.: Effect of modified celluloses on dough rheology and microstructure. *Food Res. Int.* **43**, 780–787 (2010)
15. Costa A.F.S., Almeida F.C.G., Vinhas G.M., Sarubbo L.A.: Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using Corn Steep Liquor as nutrient sources. *Front. Microbiol.* **8**, 2027 (2017)
16. Cowles K.N., Willis D.K., Engel T.N., Jones J.B., Barak J.D.: Diguanylate cyclases AdrA and STM1987 regulate *Salmonella enterica* exopolysaccharide production during plant colonization in an environment-dependent manner. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**, 1237–1248 (2016)
17. Darch R., Harrison J., Rashid M.: *Sarcina ventriculi* bacteria in stomach and duodenum of a patient with gastroesophageal obstruction by Adenocarcinoma. *J. Univers. Surg.* **4**, 46, 1–3 (2016)
18. Das R., Panda A.B., Pal S.: Synthesis and characterization of a novel polymeric hydrogel based on hydroxypropyl methyl cellulose grafted with polyacrylamide. *Cellulose*, **19**, 933–945 (2012)
19. Devinder D., Mona M., Hradesh R., Patil R.T.: Dietary fibre in foods: a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 255–266 (2012)
20. Dourado F., Gama M., Rodrigues A.C.: A review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. *Toxicol. Rep.* **4**, 543–553 (2017)
21. Du J., Vepachedu V., Cho S.H., Kumar M., Nixon B.T.: Structure of the cellulose synthase complex of *Gluconacetobacter hansenii* at 23.4 Å resolution. *PLoS One*, **11**, e0155886 (2016)
22. Esa F., Tasirin S.M., Rahma N.: Overview of bacterial cellulose production and application. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* **2**, 113–119 (2014)
23. Farag S., Asker M.M.S., Mahmoud M.G., Ibrahim H., Amr A.: Comparative study for bacterial cellulose production using egyptian *Achromobacter* sp. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **7**, 954–970 (2016)
24. Gayathry G., Gopaldaswamy G.: Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Fibre Text. Res.* **39**, 93–96 (2014)
25. George J., Ramana K.V., Sabapathy S.N., Bawa A.S.: Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1323–1327 (2005)
26. Heindl J.E., Yi W., Heckel B.C., Mohari B., Feirer N., Fuqua C.: Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front. Plant Sci.* **5**, 176–180 (2014)
27. Hornung M.L., Gerrard A.M., Schmauder H.P.: Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Eng. Life Sci.* **6**, 537–545 (2006)
28. Hornung M.L., Schmauder H.P.: Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (Part 3). *Eng. Life Sci.* **7**, 35–41 (2007)
29. Hsieh J.T., Wang M.J., Lai J.T., Liu H.S.: A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. *J. Taiwan Inst. Chem. E.* **63**, 46–51 (2016)
30. Huang C., Guo H.J., Xiong L., Wang B., Shi S.L., Chen X.F., Lin X.Q., Wang C., Luo J., Chen X.D.: Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* **20**, 136, 198–202 (2016)
31. Huang C., Yang X.Y., Xiong L., Guo H.J., Luo J., Wang B., Zhang H.R., Lin X.Q., Chen X.D.: Evaluating the possibility of using acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation wastewater for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Letts. Appl. Microbiol.* **60**, 491–496 (2015)
32. Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., et al.: Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, **21**, 1–30 (2014)
33. Hungund B.S., Gupta S.G.: Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World. J. Microb. Biot.* **26**, 1823–1828 (2010)
34. Hyun J.Y., Mahanty B., Kim C.G.: Utilization of makgeolli sludge filtrate (MSF) as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 3748–3760 (2014)
35. Islam M.U., Ullah M.W., Khan S., Shah N., Park J.K.: Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 1166–1173 (2017)
36. Jahn C.E., Selimi D.A., Barak J.D., Charkowski A.O.: The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. *Microbiology*, **157**, 2733–2744 (2011)
37. Jessa J., Hozyasz K.K.: Wartość zdrowotna produktów kokosowych (Health value of coconut products). *Pediatr. Pol.* **90**, 415–423, (2015)
38. Ji K., Wang W., Zeng B., Chen S., Zhao Q., Chen Y., Li G., Ma T.: Bacterial cellulose synthesis mechanism of facultative anaerobe *Enterobacter* sp. FY-07. *Sci. Rep.* **6**, 21863 (2016)
39. Juda S.N., Nugraha S., Nugraha D. A.: Development of nata de coco with natural dyes using value engineering method. *The 3rd International Conference on Agro-Industry 2016 "Competitive & Sustainable Agro-Industry"*, 96–109 (2016)

40. Jung H., Ha O., Shehzad S., Khan S., Yong L.J., Won P.T., Khan J., Kon P.: Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean J. Chem. Eng.* **25**, 812 (2008)
41. Jung H.I., Jeong J.H., Lee O.M., Park G.T., Kim K.K., Park H.C., Lee S.M., Kim Y.G., Son H.J.: Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresour. Technol.* **101**, 3602–3608 (2010)
42. Jung H.I., Lee O.M., Jeong J.H., Jeon Y.D., Park K.H., Kim H.S., An W.G., Son H.J.: Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 486–497 (2010)
43. Keshk S.M.: Physical properties of bacterial cellulose sheets produced in presence of lignosulfonate. *Enzyme Microb. Tech.* **40**, 9–12 (2006)
44. Keshk S.M., Razek T.M., Sameshima K.: Bacterial cellulose production from beet molasses. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 1519–1523 (2006)
45. Kim S.Y., Kim J.N., Wee Y.J., Park D.H., Ryu H.W.: Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129**, 705–715 (2006)
46. Kimbrough T.G., Miller S.I.: Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes. Infect.* **4**, 75–82 (2002)
47. Kiziltas E.E., Kiziltas A., Gardner D.J.: Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydr. Polym.* **124**, 131–138 (2015)
48. Kubiak K., Kalinowska H., Peplińska M., Bielecki S.: Celuloza bakteryjna jako bionanomateriał. *Post. Biol. Komórki*, **36**, 85–98 (2009)
49. Lima E.B., Sousa C.N., Meneses L.N., Ximenes N.C., Santos M.A., Vasconcelos G.S., Lima N.B., Patrocínio M.C., Macedo D., Vasconcelos S.M.: *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **48**, 953–964 (2015)
50. Lin D., Lopez-Sanchez P., Li R., Li Z.: Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresour. Technol.* **151**, 113–119 (2014)
51. Lin S.P. i wsp.: Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, **20**, 2191–2218 (2013)
52. Lin S.B., Chen L.C., Chen H.H.: Physical characteristics of surimi and bacterial cellulose composite gel. *J. Food Process Eng.* **34**, 1363–1379 (2011)
53. Luo M.T., Huang C., Chen X.F., Huang Q.L., Qi G.X., Tian L.L., Xiong L., Li H.L., Chen X.D.: Efficient bioconversion from acid hydrolysate of waste oleaginous yeast biomass after microbial oil extraction to bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **47**, 1025–1031 (2017)
54. Luo M.T., Zhao C., Huang C., Chen X.F., Huang Q.L., Qi G.X., Tian L.L., Xiong L., Li H.L., Chen X.D.: Efficient using Durian shell hydrolysate as low-cost substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Indian J. Microbiol.* **57**, 393–399 (2017)
55. Ma T., Ji K., Wang W., Wang J., Li Z., Ran H., Liu B., Li G.: Cellulose synthesized by *Enterobacter* sp. FY-07 under aerobic and anaerobic conditions. *Bioresour. Technol.* **126**, 18–23 (2012)
56. Martins D., Fontão A., Dourado F., Gama M.: Bacterial cellulose as a stabilizer for oil-in-water emulsions. *Chempor.* BB16, 234–235 (2018)
57. Matthyse A.G.: Exopolysaccharides of *Agrobacterium tumefaciens*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **418**, 111–141 (2018)
58. Mc Manus J.B., Yang H., Wilson L., Kubicki J.D., Tien M.: Initiation, elongation and termination of bacterial cellulose synthesis. *ACS Omega*, **31**, 3, 2690–2698 (2018)
59. Mc Namara J.T., Morgan J.L.W., Zimmer J.: A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 895–921 (2015)
60. Mesomya W., Pakpeankitvatana V., Komindr S., Songklanakarin J.: Effects of health food from cereal and nata de coco on serum lipids in human. *Sci. Technol.* **28**, 23–28 (2006)
61. Molina-Ramírez C., Castro M., Osorio M., Torres-Taborda M., Gómez B., Zuluaga R., Gómez C., Gañán P., Rojas O.J., Castro C.: Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. *Materials (Basel)*, **11**, e639 (2017)
62. Molina-Ramírez C., Enciso C., Torres-Taborda M., Zuluaga R., Gañán P., Rojas O.J., Castro C.: Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **1**, 117, 735–741 (2018)
63. Moniri M., Moghaddam A.B., Azizi S., Rahim R.A., Ariff A.B., Saad W.Z., Navaderi M., Mohamad R.: Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials (Basel)*, **7**, 257–265 (2017)
64. Monteiro C., Saxena I., Wang X., Kader A., Bokranz W., Simm R., Nobles D., Chromek M., Brauner A., Brown R.M., Römling U.: Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. *Environ. Microbiol.* **11**, 1105–1116 (2009)
65. Morgan J.L.W., Mc Namara J.T., Zimmer J.: Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic-di-GMP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 489–496 (2014)
66. Morgan J.L., Strumillo J., Zimmer J.: Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, **493**, 181–186 (2013)
67. Omadjela O., Narahari A., Strumillo J., Mérida H., Mazur O., Bulone V., Zimmer J.: BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for *in vitro* cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **29**, 110, 17856–17861 (2013)
68. Pereira R.H.V., Carvalho-Assef A.P., Albano R.M., Folescu T.W., Jones M.C., Leão R.S., Marques E.A.: *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3649–3651 (2011)
69. Pontes M.H., Lee E.J., Choi J., Groisman E.A.: *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **21**, 112, 5183–5188 (2015)
70. Premjet S., Premjet D., Ohtani Y.: The Effect of ingredients of sugar cane molasses on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. *Fibers*, **63**, 193–199 (2007)
71. Rani M.U., Appaiah K.A.: Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *J. Food Sci. Technol.* **50**, 755–762 (2013)
72. Rasheed M.R., Kim G.J., Senseng C.: A rare case of *Sarcina ventriculi* of the stomach in an asymptomatic patient. *Int. J. Surg. Pathol.* **24**, 142–145 (2016)
73. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M.: Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Braz. J. Microbiol.* **49**, 151–159 (2018)
74. Richard V., Augimeri A., Varley J., Strap J.L.: Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: Lessons learned from diverse biofilm-producing *Proteobacteria*. *Front. Microbiol.* **6**, 1282 (2015)

75. Robledo M., Rivera L., Jiménez-Zurdo J.I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A.M., Mateos P.F.: Role of *Rhizobium endoglucanase* CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb. Cell Fact.* **12**, 125 (2012)
76. Rodríguez-López L., Vecino X., Barbosa-Pereira L., Moldes A.B., Cruz J.M.: A multifunctional extract from corn steep liquor: antioxidant and surfactant activities. *Food Funct.* **7**, 3724–3732 (2016)
77. Ross P., Mayer R., Benziman M.: Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35–58 (1991)
78. Römling U.: Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* **153**, 205–212 (2002)
79. Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M.: Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 1–52 (2013)
80. Römling U., Galperin M.Y.: Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products and functions. *Trends Microbiol.* **23**, 545–557 (2015)
81. Sabularse V.C., Montalbo M.N., Hernandez H.P., Serrano E.P.: Preparation of nata de coco-based carboxymethylcellulose coating and its effect on the post-harvest life of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **60**, 206–218 (2009)
82. Salari M., Sowti K.M., Rezaei M.R., Ghanbarzadeh B., Samadi K.H.: Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. *Int. J. Biol. Macromol.* **1**, 280–288 (2019)
83. Santos D.K., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A.: Review biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 401–408 (2016)
84. Shezad O., Khan S., Khan T., Park J.K.: Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. *Korean J. Chem. Eng.* **26**, 1689–1692 (2009)
85. Shi Z., Zhang Y., Phillips G.O., Yang G.: Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocoll.* **35**, 539–545 (2014)
86. Sonia A., Dasan K.P.: Celluloses microfibers (CMF)/Poly (Ethylene-Co-Vinyl Acetate) (EVA) composites for food packaging applications: a study based on barrier and biodegradation behavior. *J. Food Eng.* **118**, 78–89 (2013)
87. Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B.: Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* **50**, 15–27 (2003)
88. Starzyk J., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., Swędrzyńska D.: Zmiany liczebności *Azospirillum* i *Azotobacter* w glebie pod uprawą kukurydzy (*Zea Mays* L.) z zastosowaniem różnych nawozów organicznych. *Fragm. Agron.* **30**, 147–155 (2013)
89. Suppakul P., Jutakor K., Bangchokedee Y.: Efficacy of cellulose-based coating on enhancing the shelf life of fresh eggs. *J. Food Eng.* **98**, 207–213 (2010)
90. Tabaii M.J., Emtiazi G.: Comparison of bacterial cellulose production among different strains and fermented media. *App. Food Biotechnol.* **3**, 35–41 (2016)
91. Tahara N., Tabuchi M., Watanabe K., Yano H., Morinaga Y., Yoshinaga F.: Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1862–1865 (1997)
92. Tanskul S., Amornthatree K., Jaturonlak N.: A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* **30**, 92, 421–428 (2013)
93. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandalala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A.: Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 14832–14849 (2015)
94. Ul-Islam M., Khan T., Park J.K.: Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification. *Carbohydr. Polym.* **88**, 596–603 (2012)
95. Vazquez A., Foresti M. L., Cerrutti P., Galvagno M.: Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Polym. Environ.* **21**, 545–554 (2013)
96. Williams A., Wilkinson A., Krehenbrink M., Russo D.M., Zorreguieta A., Downie J.A.: Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J. Bacteriol.* **190**, 4706–4715 (2008)
97. Whitney J.C., Howell P.L.: Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **21**, 63–72 (2013)
98. Wu D., Li X., Shen C., Lu J., Chen J., Xie G.: Decreased ethyl carbamate generation during Chinese rice wine fermentation by disruption of CAR1 in an industrial yeast strain. *Int. J. Food Microbiol.* **180**, 19–23 (2014)
99. Wu J.M., Liu R.H.: Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* **90**, 116–121 (2012)
100. Wu J.M., Liu R.H.: Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 284–290 (2013)
101. Wu S.C., Li M.H.: Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 444–449 (2015)
102. Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Li Y.Y., Zhang H.R., Chen X.D.: Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 995–1002 (2013)
103. Zhang S., Kingsley R.A., Santos R.L., Andrews-Polymeris H., Raffatellu M., Figueiredo J., Nunes J., Tsois R.M., Adams G.L., Bäuml A.J.: Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* **71**, 1–12 (2003)
104. Zhang S., Winstrand S., Guo X., Chen L., Hong F., Jönsson L.J.: Effects of aromatic compounds on the production of bacterial nanocellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *Microb. Cell Fact.* **13**, (2014)
105. Zhao Q., Zhao M., Li J., Yang B., Su G., Cui C., Jiang Y.: Effect of hydroxypropyl methylcellulose on the textural and whipping properties of whipped cream. *Food Hydrocoll.* **23**, 2168–2173 (2009)
106. Zhou L.L., Sun D.P., Hu L.Y., Li Y.W., Yang J.Z.: Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 483–489 (2007)
107. Żbikowska A., Kupiec M., Onacik-Gür S.: Wpływ karagenu na teksturę i stabilność oleożeli hydroksypropylometylocelulozowych. *Acta Agroph.* **24**, 553–561 (2017)
108. Żywicka A., Junka A.F., Szymczyk P., Chodaczek G., Grzesiak J., Sedghizadeh P.P., Fijałkowski K.: Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. *Carbohydr. Polym.* **199**, 294–303 (2018)

SPRAWOZDANIE Z KONFERENCJI „MAKRO-KIERUNKI W MIKRO-BIOLOGII”
WARSZAWA, 2.12.2019 R.

Dr hab. Tomasz Jagielski

Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 431; fax: 22 55 41 010

e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

Dnia 2 grudnia 2019 r., w Auli Głównej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW) w Warszawie odbyła się konferencja historyczno-naukowa pn. „MAKRO-kierunki w MIKRO-biologii”. Głównym organizatorem konferencji był Oddział Warszawski Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM), zaś współorganizatorami – PTM, Urząd Marszałkowski Województwa Mazowieckiego, Wydział Biologii i Instytut Mikrobiologii UW oraz American Society for Microbiology.

Patronat honorowy nad wydarzeniem sprawowali: Marszałek Województwa Mazowieckiego, Pan Adam Struzik, Prezydent m.st. Warszawy, Pan Dr Rafał Trzaskowski, Jego Magnificencja Rektor UW, Pan Prof. Marcin Pałys, Dyrektor Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, Pan Dr Grzegorz Juszczyk, Prezes Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Pan Prof. Stefan Tyski, a także American Society for Microbiology.



Konferencję zorganizowano dla uczczenia 70. rocznicy powołania Oddziału Warszawskiego PTM. Program konferencji obejmował dwie sesje. Pierwsza była poświęcona historii Oddziału, a w szczególności pamięci osób, które na przestrzeni kilku dekad organizowały i kierowały jego działalnością. W sesji naukowej, pomyślanej jako seria krótkich, eksperckich wykładów, przedstawiono osiągnięcia i postępy współczesnej mikrobiologii w jej kluczowych dziedzinach – tytułowych makro-kierunkach.

Konferencję otworzyli gospodarz miejsca – Dziekan Wydziału Biologii UW – Pani prof. dr hab. Agnieszka Mostowska oraz inicjator projektu, Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego, a jednocześnie Przewodniczący Oddziału Warszawskiego PTM – Pan dr hab. Tomasz Jagielski. Słowo od Zarządu Głównego PTM wygłosił Prezes Towarzystwa – Pan prof. dr hab. Stefan Tyski.

Krótki rys historyczny Oddziału przedstawił w swoim wykładzie dr hab. Tomasz Jagielski. Wykład wypełniły w znacznej mierze sylwetki osób szczególnie zasłużonych dla budowania warszawskich struktur terenowych PTM. Punktem kulminacyjnym sesji historycznej było wręczenie zasłużonym członkom Oddziału okolicznościowych medali i dyplomów.

Część naukową konferencji zajęły wykłady plenarne, przedzielone sesją plakatową. Wykłady opracowali i wygłosili uznani specjaliści w zakresie mikrobiologii medycznej, farmaceutycznej, weterynaryjnej, środowiskowej i żywności. Zagadnienie mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności szeroko omówiła Pani prof. Barbara Sokołowska (Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego). Z kolei wykład Pani prof. Bożeny Dworeckiej-Kaszak (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego) dotyczył problemów

weterynaryjnej diagnostyki mykologicznej. Schemat badań produktów leczniczych zawierających antybiotyki, w świetle wytycznych Farmakopei Polskiej, przybliżył Pan prof. Stefan Tyski (Narodowy Instytut Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny). W drugiej części wykładowej, Pan prof. Włodzimierz Gut (Główny Inspektorat Sanitarny) dokonał przeglądu chorób wirusowych, stanowiących obecnie największe zagrożenie dla ludzi. Zjawisko antybiotykooporności w środowisku naturalnym szczegółowo omówiła Pani prof. Magdalena Popowska (Uniwersytet Warszawski). Na koniec, Pani mgr Magdalena Piwowarska (Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena Eris) przedstawiła aspekty mikrobiologiczne w przemyśle kosmetycznym.

W sesji plakatowej, wyniki 63 prac eksperymentalnych prezentowano w 5 blokach tematycznych (I – Mikrobiologia medyczna i farmaceutyczna; II – Mikrobiologia środowiskowa i ogólna; III – Mikrobiologia weterynaryjna; IV – Biotechnologia; V – Wirusologia, mykologia, parazytologia). Komisje konkursowe, dla każdej grupy tematycznej, wyłoniły najlepsze prace. Ich autorom wręczono, na zakończenie konferencji, dyplomy i ufundowane przez sponsora nagrody.

W konferencji wzięło udział 151 osób. W liczbie tej było 132 pracowników i studentów reprezentujących 36 ośrodków akademickich, instytutów naukowych i laboratoriów badawczo-usługowych z 13 miast na terenie 9 województw kraju. Wśród uczestników konferencji było też 19 pracowników firm o profilu mikrobiologicznym lub biotechnologicznym, w tym przedsta-

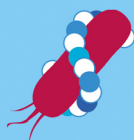
wiciele 10 spośród 16 firm sponsorskich, które wsparły konferencję finansowo.

Konferencja „MAKRO-kierunki w MIKRO-biologii” była ważnym wydarzeniem dla środowiska mikrobiologów, nie tylko z regionu Mazowsza, ale całego kraju. Zyskała przy tym duże zainteresowanie krajowego środowiska akademickiego i naukowo-badawczego. Spełniła przy tym oba zadania, które postawili sobie organizatorzy. Przede wszystkim była wyrazem pamięci o wybitnych przedstawicielach warszawskiej mikrobiologii, którzy poza intensywną działalnością naukową, odegrali kluczową rolę w organizowaniu struktur terenowych Towarzystwa i integracji środowiska mikrobiologów polskich. W tym kontekście, przeprowadzona konferencja była, w historii Oddziału Warszawskiego PTM, wydarzeniem bez precedensu.

Konferencja była też ważnym wydarzeniem naukowym. Udało się w jej trakcie przedstawić główne problemy badawcze, podejmowane przez mikrobiologów w Polsce, i to zarówno w ujęciu syntetycznym, pogładowym (w sesji plenarnej), jak i wycinkowym, dotyczącym szczegółowych prac eksperymentalnych (w sesji plakatowej).

Trwały ślad konferencja pozostawi po sobie dzięki wydanemu specjalnie na tę okazję, zeszytowi kwartalnika *Postępy Mikrobiologii* (t. 58, supl. 1, 1–132). Opublikowano w nim wszystkie doniesienia konferencyjne, streszczenia wykładów oraz okolicznościowe teksty historyczne. W publikacji tej znalazły się również teksty powitalne patronów wydarzenia.

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA



Miejsce Zjazdu:

Sangate Hotel Airport
Warszawa, ul. Komitetu Obrony Robotników 32
(dawniej 17 Stycznia, róg ul. Żwirki i Wigury)

Główny Organizator Zjazdu:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl



INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 4 z 2019 r. kwartalników *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology* i *Polish Journal of Microbiology*, Prezydium ZG PTM zajmowało się następującymi sprawami:

1. Podpisano umowę z EBSCO Publishing, Inc. dotyczącą indeksacji kwartalnika *Postępy Mikrobiologii*. Tym samym oba nasze czasopisma PM i PJM od 09.01.2020 r. są indeksowane przez tę firmę amerykańską, co mamy nadzieję przyczyni się do większej rozpoznawalności i cytowalności PM i PJM.
2. FEMS przyznała dofinansowanie do: XXIX Zjazdu PTM 2020 w wysokości 3 000 Euro oraz do I Polish Yeast Conference w wysokości 2 000 Euro. Ponadto FEMS przyznała granty na realizację projektów:
 - „Siderophores and biosurfactants produced by Antarctic psychrotolerant bacteria as new bioproducts for cold-active biotechnologies – identification and characterisation of novel secondary metabolites” złożonego przez Pana Michała Styczyńskiego z Wydziału Biologii UW;
 - „Susceptibility profiling of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Poland and Lithuania”, złożonego przez Panią Zofię Bakułę z Wydziału Biologii UW.
3. Zaczęły napływać pierwsze manuskrypty od autorów zagranicznych do naszego kwartalnika *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*, który jest wydawany on-line w wersji angielsko-języcznej. Tym samym liczymy na coraz większą rozpoznawalność i lepszą ocenę czasopisma.
4. Prezydium Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów podjęło Uchwałę nr 4–2020 z dnia 23.01.2020 r. w sprawie organizacji kolejnej edycji Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka, która będzie przyznana w roku 2020, za artykuły opublikowane w latach 2018–2019 oraz w sprawie przedłużenia kadencji pracy na 2020 r. Komisji Konkursowej powołanej Uchwałą nr 20–2018. Zasady przyznawania nagrody są określone w Regulaminie Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka znajdującej się na stronie PTM (<https://www.microbiology.pl/nagrody/nagroda-im-prof-edmunda-mikulaszka/>)

Nagroda w 2020 roku dotyczy prac opublikowanych w latach 2018–2019.

Termin składania wniosków: **15.03.2020 r.**

Ogłoszenie wyników konkursu: **30.04.2020 r.**

5. Dużo pracy zostało włożone w ustalenie konfiguracji strony internetowej XXIX Ogólnopolskiego Zjazdu PTM: **www.zjazdptm2020.pl**
Wszystkich członków PTM i osoby zainteresowane mikrobiologią zachęcamy do zapoznania się ze stroną, zarejestrowanie się i zgłaszania streszczeń na Zjazd.
6. Intensywnie poszukujemy sponsorów i wystawców na nasz Zjazd. Niestety zainteresowanie firm jest niewielkie. Spodziewamy się większego zaangażowania w tym obszarze członków i Przewodniczących Oddziałów Terytorialnych PTM, którzy są współorganizatorami Zjazdu.
7. Firma Wodociągi Krakowskie zrezygnowała z członkostwa w PTM jako Członek Wspierający PTM – srebrny z końcem 2019 r.
8. Główna Komisja Rewizyjna PTM przygotowała Regulamin swojej działalności, jest on obecnie przedmiotem analizy.
9. W dniu 03.03.2020 r. odbyło się pierwsze zebranie Sekcji Mikrobiologii Farmaceutycznej PTM, na którym przedstawiono 4 wykłady i omówiono sprawy związane z działalnością Sekcji.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
A. Laudy
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
Stefan Tycki
prof. dr hab. Stefan Tycki

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

**=Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.**



HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

**Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.**



Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

**Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.**



Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

**Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.**



BART Spółka z o.o. Sp. K
ul. Norwida 4, 05-250 Słupno
NIP: 1180741884, KRS: 0000573068
<https://bart.pl/>, email: info@bart.pl

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi.

Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotal, Gnosis, Lesaffre

SPIS TREŚCI

D. Czajeczny, K. Kabzińska, R.W. Wójciak – Od wielkiej genetyki do neuropsychologii – zarys historii badań nad powiązaniem mikrobiomu z zachowaniem człowieka	3
M. Prygiel, E. Mosiej, A.A. Zasada – Przyczyny wzrostu liczby zachorowań na krztusiec	11
S.J. Chmielewska, K. Leszczyńska – Rola i znaczenie wybranych czynników wirulencji determinujących chorobotwórczość uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i>	25
P. Gałązka, A. Baska, J. Kazik, K. Leis – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> w zespole jelita drażliwego	39
M. Skarżyńska, M. Zając, D. Wasyl – Antybiotyki i bakterie: mechanizmy działania i strategie oporności	49
S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg – Nowe syntetyczne i naturalne antymykotyki w kontekście terapii dermatomykoz	63
K. Olszewska, A. Olszewska, J. Rogalski, J. Sulej – Biotechnologiczne i biomedyczne zastosowania dehydrogenazy celobiozowej grzybów	75
R. Olędzki, E. Walaszczyk – Bionanoceluloza – właściwości, pozyskiwanie i perspektywy zastosowania w przemyśle spożywczym	87
KOMUNIKATY, INFORMACJE	103

CONTENTS

D. Czajeczny, K. Kabzińska, R.W. Wójciak – From great genetics to neuropsychology – outline of the research on the association between microbiota and human behaviour	3
M. Prygiel, E. Mosiej, A.A. Zasada – Causes of pertussis incidence increase	11
S.J. Chmielewska, K. Leszczyńska – The role and importance of selected virulence factors determining the pathogenicity of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains	25
P. Gałązka, A. Baska, J. Kazik, K. Leis – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> in irritable bowel syndrome	39
M. Skarżyńska, M. Zając, D. Wasyl – Antibiotics and bacteria: mechanisms of action and resistance strategies	49
S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg – Clinically used and potential antimycotics in the context of therapy of dermatomycoses	63
K. Olszewska, A. Olszewska, J. Rogalski, J. Sulej – Biotechnological and biomedical applications of fungal cellobiose dehydrogenase	75
R. Olędzki, E. Walaszczyk – Bionanocellulose – properties, acquisition and perspectives of application in the food industry	87
NEW REPORTS, INFORMATION	103

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%