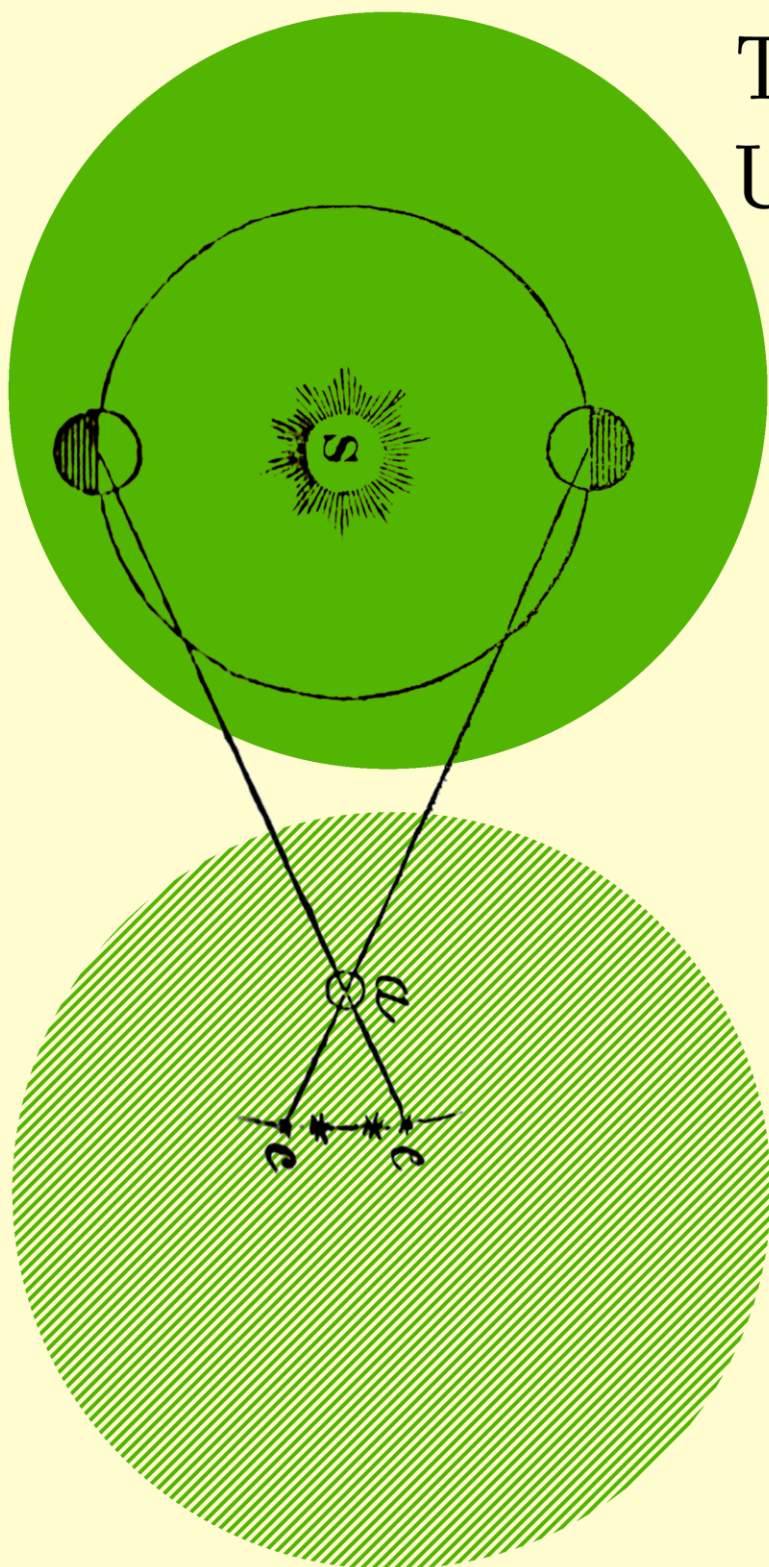


Zeszyty

NUMER 1 (1/2010)

Naukowe

Towarzystwa Doktorantów
Uniwersytetu Jagiellońskiego



Kraków 2010

WYSTĘP
W
NAUKACH
HUMANISTYCZNYCH

Zeszyty Naukowe

Towarzystwa Doktorantów
Uniwersytetu Jagiellońskiego
NUMER 1 (1/2010)

Nauki
Ścisłe



KRAKÓW 2010

Wydawca:
Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ
Ul. Straszewskiego 25/3
31-113 Kraków

Redaktor naczelna:
Paulina Tendera

Zastępca redaktor naczelnej:
Marcin Lubecki

Sekretarz redakcji:
Aleksandra Wilczura

Zespół redakcyjny Nauk Ścisłych:
Anna Bogdali (red. prowadząca),
Magdalena Kurnik

Recenzenci:
Prof. dr hab. n. med. Antoni Basta,
Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła,
Dr n. med. Tomasz Banaś,
Dr n. med. Bogdan Jakiela,
Dr n. med. Kazimierz Pityński,
Dr n. med. Krzysztof Pyrc,
Dr inż. Ewa Stodolak

Redakcja tekstów w języku angielskim:
Anna Bogdali, Anna Kowalcze-Pawlik

Redakcja językowa i korekta:
Marcin Lubecki (red. prowadzący),
Katarzyna Migdał, Anna Wrońska

Skład:
Marcin Lubecki oraz
Almond Multimedia
www.almond.pl

Projekt okładki:
Szymon Drobniaak

SPIS TREŚCI

RITA BŁOCIŃSKA	7
CYKL ESTRALNY U ŚWINI DOMOWEJ	
RITA BŁOCIŃSKA	14
FOLIKULOGENEZA I STEROIDOGENEZA JAJNIKOWA U ŚWIŃ	
MAGDALENA HUBALEWSKA-MAZGAJ, GRAŻYNA BOCHENEK, GRAŻYNA PULKA, MAREK SANAK	23
WYKRYWANIE OBECNOŚCI GENOMU RYNOWIRUSA W POPLUCZYNACH NOSOWYCH U CHORYCH NA ASTMĘ	
BARTŁOMIEJ MATEJKO, JOANNA GŁADYSZ	34
IDEA PROTEZ BIONICZNYCH W NOWOCZESNEJ PROTETYCE	
INFORMACJE O AUTORACH	45

RITA BŁOCIŃSKA

CYKL ESTRALNY U ŚWINI DOMOWEJ

ABSTRACT

Pigs belong to poliestral animals because their reproductive cycle is repeated several times per year. The characteristics of the menstruation involves repeated cycles of the integrated cellular reproductive axis. The morphological changes of the reproductive organs such as uterus, fallopian tubes and vagina accompany the progress of the menstrual cycle.

The understanding of the estral cycle mechanism and the monitoring of the estrus phase in female individuals affect the efficiency of pig farming because they can help to resolve the problems in sow reproduction that cause financial loss in pig production.

WSTĘP

Świnie należą do zwierząt poliestralnych, co oznacza, że ich cykl płciowy powtarza się wielokrotnie w ciągu roku. Charakterystyka cyklu płciowego obejmuje cyklicznie powtarzające się ekspresje zintegrowanego działania ogniw osi rozrodczej. Prowadzi to do zmian, które uwidaczniają się również w morfologii narządów rozrodczych, tj. macicy, jajowodów i pochwy. Cykl płciowy u ssaków, z wyłączeniem naczelnych i człowieka, przebiega bez krwawienia i nazywany jest cyklem estralnym. W cyklu tym wyróżnić możemy cztery okresy: przedrujowy (*proestrus*), rui właściwej (*oestrus*), porujowy (*metestrus*) oraz międzyrujowy (*diestrus*)¹.

¹ C. Jura, J. Klag, *Podstawy embriologii zwierząt i człowieka*, t. 1, Warszawa 2005, s. 76-92.

CYKL PŁCIOWY

Loszki osiągają dojrzałość płciową w wieku 6-7 miesięcy, czego dowodem jest pojawienie się pierwszego cyklu rujowego. Długość cyklu zazwyczaj wynosi 21 dni, z odchyleniem od 18 do 24 dni, i zależy od wieku, dojrzałości płciowej, rasy oraz utrzymania zwierząt². Do charakterystycznych objawów świadczących o rozpoczęciu cyklu płciowego można zaliczyć³:

- wzmożoną pobudliwość nerwową,
- wzmożoną aktywność ruchową,
- częste oddawanie małych ilości moczu,
- brak apetytu,
- wydzielanie dużych ilości śluzu z dróg rodnych samicy,
- odruch tolerancji w stosunku do samca.

Cykl oestralny jest zsynchronizowany z cyklem jajnikowym i regulowany na drodze hormonalnej przysadki i neurohormonalnej podwzgórza⁴. Cykl ten możemy podzielić na dwie fazy. Pierwszą z nich nazywamy fazą pęcherzykową (trwa ona 7 dni), a drugą – fazą lutealną (trwa około 14 dni). W fazie folikularnej dochodzi do wzrostu i dojrzewania pęcherzyków. Fazę tę Goodman i Hodgen podzielili na wczesną, gdy następuje rekrutacja pęcherzyków jajnikowych, oraz późną, gdy dominujące pęcherzyki osiągają stadium pęcherzyka Graafa⁵.

Etap rekrutacji obejmuje te pęcherzyki, których wzrost i rozwój zależny jest od gonadotropin, zaś masowa atrezja oraz wyodrębnienie pęcherzyków dominujących (owulacyjnych) tworzą fazę późną. Wymienione etapy nie obejmują pęcherzyków pierwotnych, których rozwój odbywa się w życiu płodowym. Pęcherzyki te nie wymagają do swojego wzrostu i rozwoju hormonów gonadotropowych. Zostało to potwierdzone doświadczalnie poprzez wycięcie przysadki mózgowej, której brak nie zahamował rozwoju tychże pęcherzyków⁶.

W fazie folikularnej można wyróżnić wiele stadiów rozwojowych pęcherzyków jajnikowych. Niektórzy autorzy wyodrębniają aż 8 typów pęcherzyków jajnikowych. Inni dzielą

² M. Gasiński, H. Pawlak, *Budowa układu rozrodczego u lochy, ruja, ciąży*, „Informator” 1989, nr 16/2, s. 11-12; J. Udała, B. Błaszczuk, *Przebieg cyklu rujowego u samic zwierząt gospodarskich*, „Informator” 1999, nr 16/2, s. 2-3.

³ Ibidem.

⁴ Z. Bielańska-Osuchowska, *Embriologia*, Warszawa 2001, s. 63-78.

⁵ J. Ireland, *Control of follicular growth and development*, “Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility” 1987, Vol. 34, s. 39-54; C. Jura, J. Klag, op. cit., s. 76-92.

⁶ G. Erickson, S. Shimasaki, *The physiology folliculogenesis: The role of novel growth factor*, “Fertility and Sterility” 2001, Vol. 76, Issue 5, s. 943-949.

je na małe, średnie i duże, jednakże podział ten najprawdopodobniej dotyczy tylko pęcherzyków astralnych, a nie wszystkich stadiów rozwojowych⁷. Najbardziej optymalny podział opisujący proces folikulogenezy przedstawił Erickson⁸, następnie został on uzupełniony przez Sawickiego⁹, który wyróżnił pięć typów pęcherzyków:

- pęcherzyki pierwotne – proces ich tworzenia rozpoczyna się w życiu płodowym w korowej części jajnika, w pobliżu błony białawej¹⁰. W jego skład wchodzi oocyt 1. rzędu o średnicy 40 µm, który został zahamowany w diktioenie pierwszego podziału mejozytycznego. Dookoła oocytu znajduje się pojedyncza warstwa płaskich komórek, które przekształcają się w komórki ziarniste¹¹.
- pęcherzyki pierwszo- i drugorzędowe – ich wzrost odbywa się poprzez wzrost jądra komórkowego, w którym zachodzi intensywna synteza RNA, oraz cytoplazmy oocytu. W cytoplazmie zachodzi produkcja białek, w szczególności glikoproteinowych komponentów ziaren korowych i osłonki przejrzystej¹². Obecność szorstkiej siateczki śródplazmatycznej wskazuje na wewnątrzkomórkową syntezę leptyny, która pobudza waskulogenezę i angiogenezę jajnikową. Poprawia to ukrwienie pęcherzyka i zaopatrywanie go w substancje odżywcze oraz tlen¹³. W stadium pęcherzyka pierwszo- i drugorzędowego dochodzi do formowania błony podstawnej osłonki pęcherzykowej z tkanki łącznej. Osłonkę pęcherzyka tworzą komórki fibroblastopodobne. Wewnętrzna warstwa osłonki pęcherzykowej zawiera liczne naczynia krwionośne, zaś zewnętrzną warstwę tworzą miocyty gładkie pozbawione kolagenu. Warstwa wewnętrzna pęcherzyka jajnikowego po owulacji ulega przekształceniu w małe komórki paraluteinowe¹⁴.
- pęcherzyki trzeciorzędowe – charakteryzują się istotnymi zmianami morfometrycznymi. Pomędzy powstałymi (sześcioma) warstwami komórek ziarnistych zaczynają pojawiać się wolne przestrzenie wypełnione płynem, które tworzą tzw. *antrum*, czyli jamę pęcherzyka. Pęcherzyki z tego oraz z późniejszych stadiów nazywamy pęcherzykami antralnymi¹⁵. Komórki ziarniste zaczynają produkować kwas hialuronowy, który dzięki wła-

⁷ M. Szołtys, *Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków*, „Postępy Biologii Komórki” 1992, t. 26, supl. 12, s. 221-238.

⁸ G. Erickson, S. Shimasaki, op. cit., s. 943-949.

⁹ C. Jura, J. Klag, op. cit., s. 76-92.

¹⁰ H. Peters, K.P. McNatty, *The Ovary*, London 1980.

¹¹ W. Sawicki, *Histologia*, Warszawa 2000, s. 172-189.

¹² M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12, s. 189-192.

¹³ Ibidem; W. Sawicki, op. cit., s. 172-189.

¹⁴ M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192; W. Sawicki, op. cit., s. 172-189; C. Jura, J. Klag, op. cit., s. 76-92.

¹⁵ W. Sawicki, op. cit., s. 172-189; M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

ściwościom wiązania cząsteczek wody powoduje powiększanie jamki¹⁶. Wypełniający wnętrze pęcherzyka płyn jest przesączem z osocza i zawiera wiele substancji, m.in.: glikozaminoglikany, białka, aminokwasy, cukry, sole, hormony oraz czynniki niesteroidowe¹⁷. Zgromadzony płyn wypycha oocyt na obwód pęcherzyka, w wyniku czego powstaje kompleks złożony z komórki jajowej, wieńca promienistego oraz pasma komórek ziarnistych. Kompleks ten nazywamy wzgórkciem jajonośnym. Łączy on wieniec promienisty oocytu z komórkami ziarnistymi ściany pęcherzyka. Komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego tworzą warstwę, która pozbawiona jest naczyń krwionośnych, a wzajemny kontakt umożliwia im obecność złącz szczelinowych. W wyniku tego powstaje zintegrowane syncytium, które usprawnia transport substancji małowcząsteczkowych pomiędzy komórkami granulozy. Natomiast redukcji ulega liczba desmosomów i stref przylegania¹⁸. Dalsze różnicowanie komórek warstwy ziarnistej prowadzi do wyróżnienia się warstwy muralnej. Wspecjalizowanie komórek tejże warstwy związane jest ze zwiększoną ilością receptorów dla LH oraz enzymów biorących udział w steroidogenezie, co gwarantuje prawidłową indukcję dojrzewania i owulacji oocytów. Pęcherzyki trzeciorzędowe syntetyzują estradiol, który na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego kontroluje uwalnianie LH z gruczołowej części przysadki.

- pęcherzyki przedowulacyjne – tworzą ostatnie stadium pęcherzyka przed uwolnieniem komórki jajowej do cieśni jajowodu. Średnica pęcherzyka owulacyjnego nie przekracza 1,1 cm. Wydziela on znaczne ilości E2, co prowadzi do uwolnienia LH¹⁹. LH jest hormonem owulacyjnym, który indukuje procesy wznowienia mejozy przez oocyt i tworzenia na powierzchni pęcherzyka tworzą owulacyjnego (stigmy). Działanie LH polega na prowokowaniu zaniku złącz szczelinowych między komórkami wzgórka i ścianą pęcherzyka, a także między komórkami tworzącymi wieniec promienisty a oocytem. Dodatkowo w procesie tworzenia się stigmy biorą udział enzymy proteolityczne, głównie kolagenaza, która jest odpowiedzialna za rozpad szkieletu pęcherzyka. Czynnikiem wspomagającym owulację może być również skurcz mięśni gładkich osłonki pęcherzyka, który powoduje obkurczanie podstawy pęcherzyka i rozciąganie jego części apikalnej²⁰.

¹⁶ Ibidem.

¹⁷ H. Peters, K.P. McNatty, op. cit.

¹⁸ D.F. Albertini, C.M. Combettes, E. Benecchi, M.J. Carabatsos, *Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 2001, Vol. 121, s. 647-653.

¹⁹ W. Sawicki, op. cit., s. 172-189.

²⁰ M. Szoltyś, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

Jedną z głównych funkcji pęcherzyka jajnikowego jest produkcja żeńskich hormonów płciowych. Pęcherzyki syntetyzują steroidy, m.in. progestageny, androgeny i estrogeny. Zdolność do produkcji hormonów rozwija się w pęcherzyku wraz ze wzrostem i rozwojem receptorów dla hormonów gonadotropowych FSH i LH. Badania prowadzone przez Biersinga w 1967 roku oraz przez Ryana w 1966 dowodzą, że komórki osłonki wewnętrznej produkują androgeny, które w wyniku aromatyzacji w warstwie ziarnistej ulegają przemianie w estrogeny. Jest to tzw. teoria dwóch komórek i dwóch gonadotropin, wedle której komórki osłonki wewnętrznej są stymulowane przez LH, a komórki warstwy ziarnistej przez FSH²¹. Jednak należy pamiętać, że komórki warstwy ziarnistej w dużych pęcherzykach posiadają receptory dla FSH i dla LH (receptory dla LH – warstwa muralna). Zarówno FSH, jak i LH stymulują proces aromatyzacji w pęcherzyku jajnikowym²². U świń komórki osłonki zawierają czynną aromatazę, co umożliwia im wydzielanie E2 do krwiobiegu²³. W płacie gruczołowym przysadki obok FSH wydzielany jest również LH, który wpływa na syntezę i uwalnianie progesteronu przez ciało żółte²⁴.

Wzrost stężenia LH w środku cyklu płciowego prowadzi do szeregu zmian, mających na celu przekształcenie pęcherzyka jajnikowego w ciało żółte (CL) i przejście jajnika w drugą fazę cyklu estralnego. CL w trakcie trwania fazy lutealnej cyklu estralnego w całości przejmuje funkcje produkcji hormonów steroidowych. Głównym zadaniem CL jest zainicjowanie zmian wydzielniczych w endometrium, przygotowanie go na przyjęcie zarodka oraz utrzymanie ciąży przez pierwsze 12 tygodni. Jest to możliwe w wyniku wydzielania przez CL progesteronu.

W formowaniu CL biorą udział komórki tworzące pęcherzyk jajnikowy. Komórki tkalne tworzą małe komórki lutealne, zaś komórki pochodzące z warstwy ziarnistej tworzą duże komórki lutealne. Komórki te różnią się wielkością, ultrastrukturą oraz aktywnością enzymów biorących udział w steroidogenezie. Jednakże obydwa typy wymienionych komórek lutealnych charakteryzują się obecnością lipidów oraz aktywnością enzymu 3 β hydroksysteroidodehydrogenazy (3 β HSD). Enzym ten katalizuje przemianę steroidów D5 w steroidy D4 (pregnenolon w progesteron)²⁵.

²¹ Ibidem.

²² J.E. Fortune, J. Sivois, A.M. Turzillo, S. Savoir, *Follicle selection in domestic ruminants*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1991, Vol. 43, s. 187-198; S.G. Hillier, *Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries*, "Journal of Endocrinology" 1991, Vol. 131, s. 171-175.

²³ C. Jura, J. Klag, op. cit., s. 76-92.

²⁴ Z. Bielańska-Osuchowska, op. cit., s. 69-87.

²⁵ Ibidem.

CL u świń, w przeciwieństwie do przeżuwaczy, jest niewrażliwe na działanie prostaglandyny $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) aż do 12 dnia cyklu. Uważa się, że $PGF2\alpha$ może powodować degradację lutealnych kapilar. Dodatkowo obniża produkcję progesteronu, wynikiem czego jest śmierć komórki lutealnej.

Luteoliza CL u świń rozpoczyna się około 13 dnia cyklu w wyniku uwalniania z endometrium $PGF2\alpha$. Odzyskanie wrażliwości komórek lutealnych na $PGF2\alpha$ związane jest z pojawieniem się na ich powierzchni receptorów $PGF2\alpha$ oraz zmniejszaniem się liczby receptorów dla progesteronu w części nabłonkowej i gruczołowej błony śluzowej macicy. Odkrycie receptorów LH w endometrium macicy umożliwiło wysnucie hipotezy o ich udziale w procesie luteoliny CL oraz jako elementu protekcyjnego przed regresją CL we wczesnej ciąży.

Według teorii Bazera, u świń luteoliza jest przewyżczana przez zmianę kierunku wydzielania endometrialnej $PGF2\alpha$, która zamiast dostać się do krwi i dalej do jajnika, zostaje przekazana prosto do światła macicy.

W momencie powolnej luteolizy następuje zahamowanie syntezy progesteronu. W tym samym czasie dochodzi do wzrostu nowych pęcherzyków jajnikowych, a w układzie rozrodczym samicy zachodzą zmiany przygotowujące ją do podjęcia nowego cyklu²⁶.

Objawy charakterystyczne dla fazy rui właściwej mogą trwać do 4 dni. Jednakże samo jajczkowanie to zaledwie 10-15 godzin z całego okresu. Owulację pozwala nam rozpoznać spokojniejsze zachowanie lochy i tolerancja w stosunku do knura, dodatkowo podczas uciśnięcia części grzbietowej w okolicy lędźwiowo-krzyżowej locha stoi nieruchomo. Jest to najlepszy moment na dokonanie zabiegu inseminacji. Zmianie morfologicznej podlegają wargi sromu, które pod wpływem działania hormonów estrogenowych ulegają rozpułchnieniu oraz zmieniają zabarwienie z czerwonego na sinofioletowe.

Fazę porujową najłatwiej rozpoznać poprzez próby wyzwolenia u lochy odruchu tolerancji wobec samca. Dodatkowo samica nie wykazuje tolerancji na obskakiwanie przez inne lochy²⁷. Z dróg rodnych samicy zaczyna wyciekać gęsty śluz porujowy, który jest wynikiem intensywnej pracy gruczołów wydzielniczych macicy podczas fazy oestralnej. Ponadto, obserwuje się coraz spokojniejsze zachowanie u lochy oraz powrót apetytu²⁸.

²⁶ M. Gasiński, H. Pawlak, op. cit., s. 11-12; J. Udała, B. Błaszczuk, op. cit., s. 2-3.

²⁷ [Online]. Protokół dostępu: http://www.kpodr.pl/zwierzeca/trzoda/inseminacja_loch.php [1 czerwca 2010].

²⁸ Ibidem.

ZAKOŃCZENIE

Poznanie mechanizmów przebiegu cyklu estralnego pozwoli skutecznie prowadzić hodowlę trzody chlewnej poprzez monitorowanie terminu wystąpienia rui u samic oraz kontrolowanie rozrodczości zwierząt użytkowych na podstawie analizy parametrów behawioralnych oraz molekularnych. Dodatkowo, znajomość przebiegu cyklu estralnego ułatwia dostrzeżenie zaburzeń, które mogą wystąpić u niektórych loch w procesie rozrodu. Dlatego też warto prowadzić dalsze badania nad cyklem płciowym trzody chlewnej, aby wykorzystywać nowo poznaną wiedzę i zwiększać wydajność prowadzenia hodowli tych zwierząt.

BIBLIOGRAFIA

1. Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E., Carabatsos M.J., *Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 2001, Vol. 121.
2. Bielańska-Osuchowska Z., *Embriologia*, Warszawa 2001.
3. Erickson G., Shimasaki S., *The physiology folliculogenesis: The role of novel growth factor*, "Fertility and Sterility" 2001, Vol. 76, Issue 5.
4. Fortune J.E., Sivois J., Turzillo A.M., Savoir S., *Follicle selection in domestic ruminants*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1991, Vol. 43.
5. Gasiński M., Pawlak H., *Budowa układu rozrodczego u lochy, ruja, ciąża*, „Informator” 1989, nr 16/2.
6. Hillier S.G., *Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries*, "Journal of Endocrinology" 1991, Vol. 131.
7. Ireland J., *Control of follicular growth and development*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1987, Vol. 34.
8. Jura C., Kłag J., *Podstawy embriologii zwierząt i człowieka*, t. 1, Warszawa 2005.
9. Peters H., McNatty K.P., *The Ovary*, London 1980.
10. Sawicki W., *Histologia*, Warszawa 2000.
11. Szoltys M., *Funkcja komórek ziarnistych wżgórka jajonośnego*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12.
12. Szoltys M., *Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków*, „Postępy Biologii Komórki” 1992, t. 26, supl. 12.
13. Udała J., Błaszczak B., *Przebieg cyklu rujowego u samic zwierząt gospodarskich*, „Informator” 1999, nr 16/2.
14. [Online]. Protokół dostępu: http://www.kpodr.pl/zwierzecz/trzoda/inseminacja_loch.php [1 czerwca 2010].

RITA BŁOCIŃSKA

FOLIKULOGENEZA I STEROIDOGENEZA JAJNIKOWA U ŚWIŃ

ABSTRACT

Folliculogenesis is the process in which the basic structure of ovaries is created; it is required for the oocyte environment composition. Folliculogenesis begins in fetal life and leads to the creation of suitable environment for the oocyte metabolism in the ovary. This extremely dynamic and complex process coincides with meiosis of the oogonia. The complexity of the formation, growth and maturation of ovarian follicles is well explained not only by folliculogenesis but also by steroidogenesis which plays an important role in the creation of ovarian follicles.

WSTĘP

Jajnik jest jednym z podstawowych komponentów układu rozrodczego. U świń jego formowanie zaczyna się na początku rozwoju zarodkowego, a pierwsze pęcherzyki jajnikowe pojawiają się około 40 dnia po zapłodnieniu. Proces polegający na tworzeniu się podstawowych struktur jajnikowych – pęcherzyków – nazywamy folikulogenezą. Jest to jeden z ważniejszych procesów rozrodczych, który ma na celu stworzenie odpowiedniego środowiska dla oocytu. Rozpoczyna się on w życiu płodowym i prowadzi do stworzenia odpowiedniego środowiska dla oocytu. Ten niezwykle dynamiczny i złożony proces zbiega się z chwilą podjęcia mejozy przez oogonia. Pęcherzyk jajnikowy jest miejscem wzrostu i dojrzewania komórki jajowej, dodatkowo chroni oocyt przed wpływem szkodliwych czynników. Podczas folikulogenezy pęcherzyki jajnikowe ulegają zarówno zmianom morfologicznym, jak i czynnościowym.

FOLIKULOGENEZA

Proces formowania się pęcherzyków jajnikowych przebiega w korowej części jajnika. W momencie urodzenia samica dysponuje liczbą gamet znacznie przekraczającą zapotrzebowanie rozrodcze. U świń liczbę tę szacuje się na ok. 500 000, przy czym do osiągnięcia dojrzałości płciowej ulegnie ona zmniejszeniu o około 80 000¹.

Folikulogenezę można podzielić na dwa etapy. Pierwszy etap zachodzi w życiu płodowym, a drugi zostaje zakończony w życiu osobniczym. Badania histologiczne przeprowadzone przez McCoarda wykazały, że w jajniku płodowym świni obecne są zarówno pęcherzyki pierwotne, jak i pierwszo- i drugorzędowe². Pęcherzyki pierwotne pojawiają się w 75. dniu od zapłodnienia, natomiast drugorzędowe można zaobserwować w 90. dniu od zapłodnienia. Ich wielkość wynosi od 0,14 do 0,40 mm³.

Pęcherzyki pierwszorzędowe zbudowane są z pojedynczej warstwy płaskich komórek, w których centralne miejsce zajmuje oocyt⁴. Mogą one przetrwać w jajniku wiele lat bez dalszego rozwoju, jednak część z nich zaczyna wzrastać i przechodzi kolejne stadia rozwojowe, przekształcając się w pęcherzyki pierwszo- i drugorzędowe⁵. Stadia rozwojowe pęcherzyków charakteryzuje znaczne powiększanie objętości oocytu i przylegających do niego komórek ziarnistych, które zmieniają kształt z płaskich na sześcienne. Intensywna proliferacja komórek ziarnistych prowadzi do powstania wokół komórki jajowej warstwy granularnej⁶. Pomiędzy warstwą komórek ziarnistych a oocytem zaczynają się pojawiać glikoproteiny; są one wytwarzane oocytem i tworzą składniki osłonki przejrzystej⁷. Dodatkowo, zaczyna się pojawiać osłonka pęcherzykowa przylegająca do błony podstawnej pęcherzyka. Naczynia krwionośne wnikaające w warstwę komórek tworzących osłonkę pęcherzyka jajnikowego powodują różnicowanie jej na osłonkę wewnętrzną (*theca interna*) i zewnętrzną (*theca externa*). Osłonka pęcherzyka jajnikowego zbudowana jest głównie z komórek steroidogennych, zawierających trzy rodzaje glikoprotein: ZP1, ZP2, ZP3, które stanowią receptory dla zapładniających ko-

¹ B. Błaszczuk, *Specyfika folikulogenezy i steroidogenezy jajnikowej świni domowej (Sus scrofa f. domestica)*, „Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych” 2008, Tom 57, Nr 1-2, s. 157-163.

² S.A. McCoard, T.H. Wise, J.J. Ford, *Germ cell development in Meishan and White Composite gilts*, “Animal Reproduction Science” 2003, Vol. 77, s. 85-105.

³ B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

⁴ M. Szołtys, *Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków*, „Postępy Biologii Komórki” 1992, t. 26, supl. 12, s. 221-238.

⁵ Ibidem.

⁶ Ibidem.

⁷ Ibidem.

mórkę jajową plemników⁸. Zarówno komórki ziarniste, jak i komórki osłonki zawierają receptory dla wielu czynników, których miejscowe stężenie dodatnio bądź ujemnie koreluje z wydzielanymi przez przysadkę hormonami gonadotropowymi, tj. z folikulostymuliną (FSH) oraz lutropiną (LH)⁹. Jednakże wzrost pęcherzyków pierwotnych nie zależy od hormonów gonadotropowych, co potwierdziły badania polegające na wycięciu przysadki przeprowadzone przez Ericksona¹⁰.

Kolejne etapy rozwoju pęcherzyków jajnikowych zachodzą już w życiu postnatalnym. Zaliczamy do nich pęcherzyki trzeciorzędowe i owulacyjne (pęcherzyki Graafa). Stadia te charakteryzują się istotnymi zmianami morfometrycznymi. Pomiędzy warstwami komórek ziarnistych zaczynają pojawiać się wolne przestrzenie wypełnione płynem, które po połączeniu tworzą tzw. antrum, czyli jamę pęcherzyka. Dlatego też pęcherzyki trzeciorzędowe oraz z późniejszych stadiów nazywamy antralnymi¹¹. Szczególnie ważną rolę w tworzeniu antrum odgrywają androgeny, dla których receptory znajdują się we wszystkich komórkach warstwy ziarnistej, jednak w miarę wzrostu pęcherzyka receptory te stopniowo zanikają i pozostają jedynie w komórkach wzgórka jajonośnego¹². Powstające w pęcherzyku antrum zapoczątkowuje szereg procesów odpowiedzialnych za dalszy rozwój pęcherzyka. W błonach komórek ziarnistych wzrasta synteza receptorów dla folikulostymuliny (FSH) i lutropiny (LH), a w jądrach i cytoplazmie pojawiają się receptory dla estrogenów (17 β -estradiolu, E2)¹³. Najprawdopodobniej wzrost pęcherzyków wczesnoantralnych jest kontrolowany przez lokalne czynniki wzrostowe, jednak nie jest znany dokładny sygnał, który inicjuje ten wzrost¹⁴. Tworzący wewnątrz pęcherzyka płyn jest przesączem osocza, komórek warstwy ziarnistej oraz komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego¹⁵. Płyn pęcherzykowy zawiera wiele substancji, które stymulują podziały mitotyczne, dlatego też są one szczególnie ważne w początkowej fazie wzrostu pęcherzyka jajnikowego¹⁶. Do substancji tych zaliczamy m.in.: glikozaminoglikany, białka, aminokwasy, cukry, hormony oraz czynniki niesteroidowe, które obejmują: in-

⁸ Ibidem; S. Biliński, Z. Bielańska-Osuchowska, J. Kawiak, A. Przełęcka, *Ultrastruktura i funkcje komórki*, t. 6, Warszawa 1994, s. 225-327.

⁹ Ibidem.

¹⁰ G. Erickson, S. Shimasaki, *The physiology folliculogenesis: The role of novel growth factor*, "Fertility and Sterility" 2001, Vol. 76, No. 5, s. 943-949.

¹¹ M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

¹² M. Słomczyńska, *Receptory hormonów steroidowych w jajniku świni*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12, s. 193-196; M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12; s. 189-192.

¹³ J.E. Fortune, J. Sivois, A.M. Turzillo, S. Savoir, *Follicle selection in domestic ruminants*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1991, Vol. 43, s. 187-198; M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

¹⁴ B. Błaszczak, *Specyfika folikulogenezy i steroidogenezy...*, ed. cit., s. 157-163.

¹⁵ T. Kamiński, J. Przasa, *Czynniki wzrostowe w jajniku*, „Postępy Biologii Komórki” 1994, t. 21, cz. 1, s. 79-92.

¹⁶ M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

sulinopodobne czynniki wzrostowe (IGFs), epidermalny czynnik wzrostowy (EGF), transformujący czynnik wzrostowy alfa (TGF α), inhibiny, aktywinę i transformujący czynnik wzrostowy beta (TGF β)¹⁷. Kolejnym niesteroidowym czynnikiem regulującym rozwój pęcherzyka jest GnRH, kojarzony głównie z podwzgórzem, choć najprawdopodobniej syntetyzowany również w jajniku. W początkowym stadium rozwoju pęcherzyka wywiera on hamujący wpływ na steroidogenezę, tworzenie receptorów LH oraz wzrost pęcherzyka jajnikowego. W późniejszym etapie stymuluje syntezę progesteronu, wpływa na proces owulacji oraz na wznowienie mejozy. Dodatkowo wymienić należy regulatory luteinizacji, które obecne w płynie małych pęcherzyków zapobiegają procesowi luteinizacji, oraz inhibitory wiązania gonadotropin, indukujące proces atrezji pęcherzyków¹⁸.

W celu poprawy transportu substancji małocząsteczkowych w obrębie warstwy ziarnistej, obejmującej wzgórek jajonośny, do której nie docierają naczynia krwionośne, zostaje zwiększona liczba złącz szczelinowych, zaś redukcji ulega liczba desmosomów i stref przylegania¹⁹. W wyniku dalszego wzrostu pęcherzyka dochodzi do różnicowania się komórek warstwy ziarnistej, czego wynikiem jest powstanie warstwy muralnej. Warstwa ta jest bardziej wyspecjalizowana niż przylegające do jamki komórki antralne, czego dowodem jest zwiększona liczba receptorów dla LH oraz obecność enzymów biorących udział w steroidogenezie. Proces, który prowadzi do różnicowania się warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego, warunkowany jest działaniem przeciwstawnych wpływów zarówno błony podstawnej pęcherzyka, jak również oocyty²⁰. Składowe błony podstawnej stymulują różnicowanie się komórek muralnych w struktury steroidogenne, zaś parakrynnne czynniki uwalniane przez oocyt hamują ten proces w otaczających go komórkach ziarnistych²¹. Pęcherzyki trzeciorzędowe syntetyzują E2, który na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego kontroluje uwalnianie LH z gruczołowej części przysadki²². Pęcherzyki w stadium antralnym osiągają średnicę 7 mm, co jest związane ze wzrostem objętości płynu pęcherzykowego²³.

Świńskie pęcherzyki przedowulacyjne osiągają wielkość od 8 do 10 mm²⁴. Stanowią ostatnie stadium pęcherzyka przed uwolnieniem komórki jajowej do cieśni jajowodu. Na tym

¹⁷ T. Kamiński, J. Przała, op. cit., s. 79-92.

¹⁸ M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

¹⁹ D.F. Albertini, E. Anderson, *The appearance and structure of the intracellular connetions during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junction*, "The Journal of Cell Biology" 1974, Vol. 63, s. 234-250.

²⁰ A. Amsterdam, S. Rotmensch, *Structure – function relationship during granulosa cell differentiation*, „Endocrine Reviews” 1987, Vol. 8, s. 309-337.

²¹ M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

²² Eadem, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

²³ B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

²⁴ Ibidem.

etapie rozwoju widoczne jest dalsze różnicowanie się komórek warstwy ziarnistej²⁵. Różnicowanie to nie dotyczy komórek wzgórka jajonośnego, który pozostaje najmniej zróżnicowaną subpopulacją komórek ziarnistych i wykazuje najslabszą aktywność steroidogenną²⁶. Głównym zadaniem komórek wzgórka jajonośnego jest produkcja substancji odżywczych i związków regulujących rozwój oocyta²⁷. Jednak tuż przed samą owulacją, po przysadkowym wyrzucie gonadotropin, obserwuje się różnicowanie komórek wzgórka jajonośnego. Zaczynają one produkować progesteron oraz macierz, która powoduje rozproszenie i mucyfikację wzgórka²⁸. W miarę wzrostu pęcherzyk jajnikowy produkuje i uwalnia do krwi coraz więcej E2. Wzrastające stężenia E2 prowadzi do uwolnienia LH, hormonu owulacyjnego, indukującego procesy wznowienia mejozy przez oocyt oraz utworzenia otworu owulacyjnego (stigmy). Jego działanie polega na prowokowaniu zaniku złącz szczelinowych między komórkami wzgórka i ścianą pęcherzyka jajnikowego, a także między komórkami tworzącymi wieniec promienisty a oocytem. W procesie tworzenia się stigmy biorą udział enzymy proteolityczne, głównie kolagenaza, która odpowiedzialna jest za rozpad szkieletu pęcherzyka. Czynnikiem wspomagającym owulację może być dodatkowo skurcz mięśni gładkich osłonki pęcherzyka, który powoduje obkurczanie podstawy pęcherzyka i rozciąganie jego części apikalnej²⁹.

Według Irelanda, proces folikulogenezy można podzielić na trzy etapy. Pierwszy zwany jest etapem rekrutacji i obejmuje te pęcherzyki, których wzrost i rozwój zależny jest od gonadotropin³⁰. Drugi etap to masowa atrezja, czyli zanikanie pęcherzyków jajnikowych; nazywany został etapem selekcji. Ostatni etap folikulogenezy polega na wyodrębnieniu pęcherzyków dominujących, czyli owulacyjnych. Termin „rekrutacja” wg Knoksa można stosować w stosunku do małych i średnich pęcherzyków, mających szansę dalszego wzrostu i owulacji, zaś selekcja dotyczy pęcherzyków, które uniknęły atrezji i owulują³¹.

²⁵ M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

²⁶ Eadem, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

²⁷ Ibidem.

²⁸ Ibidem.

²⁹ Eadem, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

³⁰ J. Ireland, *Control of follicular growth and development*, “Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility” 1987, suppl. 34, s. 39-54.

³¹ R.V. Knox, *Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig*, “Domestic Animal Endocrinology” 2005, Vol. 29, s. 385-397; B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

STEROIDOGENEZA JAJNIKOWA

Jedną z głównych funkcji pęcherzyka jajnikowego jest produkcja żeńskich hormonów płciowych. Już w okresie życia płodowego jajnik ma aktywność steroidogenną³². Zdolność do produkcji hormonów rozwija się w pęcherzyku wraz z jego wzrostem i rozwojem receptorów dla hormonów gonadotropowych FSH i LH³³. Intensywne badania prowadzone na dojrziałych jajnikach świńskich, których pęcherzyki syntetyzują trzy klasy steroidów płciowych, m.in. progestageny, androgeny i estrogeny, wskazują, iż mogą one odgrywać ważną rolę jako miejscowe regulatory rozwoju jajników³⁴. Wspólnym prekursorem steroidów jest cholesterol³⁵. Jego głównym źródłem w komórkach pęcherzyka jajnikowego jest krew oraz cząsteczki lipoprotein o niskiej (LDL) i wysokiej (HDL) gęstości³⁶. Ponadto, może być on syntetyzowany *de novo* z octanu, jak również pozyskiwany z estrów cholesterolu nagromadzonych w kroplach lipidowych³⁷. Cholesterol przekształca się w pregnenolon, zaś pregnenolon ulega konwersji do progesteronu. W kolejnym etapie dochodzi do hydroksylacji progesteronu, w wyniku czego powstają androgeny. Pod wpływem oksydazy cytochromu P450arom dochodzi do aromatyzacji androgenów do estrogenów, przy czym testosteron ulega aromatyzacji do estradiolu, a androstendion do estronu³⁸. Dojrzałe pęcherzyki jajnikowe wykazują wysoką aktywność aromatazy oraz koncentrację estradiolu w płynie pęcherzykowym³⁹. Falck w latach 50. XX wieku odkrył, że w syntezie hormonów estrogenowych biorą udział zarówno komórki tworzące warstwę ziarnistą, jak i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego⁴⁰. Badania prowadzone przez Biersinga w 1967 roku oraz przez Ryana w 1966 dowodzą, że komórki osłonki wewnętrznej produkują androgeny, które w wyniku aromatyzacji w warstwie ziarnistej ulegają przemianie w estrogeny. Jest to tzw. teoria dwóch komórek i dwóch gonadotropin⁴¹. Komórki osłonki wewnętrznej są stymulowane przez LH, a komórki warstwy ziarnistej – przez FSH⁴². Przy czym komórki warstwy ziarnistej w dużych pęcherzykach posiadają receptory zarówno dla FSH, jak i dla LH (receptory dla LH – warstwa muralna). Oby-

³² J. Skrzypczak, *Steroidogeneza w jajniku w fazie wzrostowej cyklu*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12, s. 139-146.

³³ M. Szołtys, *Struktura i funkcja...*, ed. cit., s. 221-238.

³⁴ Ibidem; M. Słomczyńska, op. cit., s. 193-196; J. Skrzypczak, op. cit., s. 139-146.

³⁵ Ibidem.

³⁶ Ibidem; B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

³⁷ Ibidem.

³⁸ Ibidem.

³⁹ M.G. Hunter, R.S. Robinson, G.E. Mann, R. Webb, *Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species*, „Animal Reproduction Science” 2004, Vol. 82-83, s. 461-477.

⁴⁰ B. Falck, *Site of production estrogen in the rat ovary as studied in micro-transplants*, „Acta Physiologica Scandinavica” 1959, supl. 163, s. 1-25.

⁴¹ B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

⁴² M. Szołtys, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

dwie gonadotropiny stymulują proces aromatyzacji w pęcherzyku jajnikowym⁴³. U świń komórki osłony zawierają czynną aromatazę, dzięki czemu mogą prowadzić proces aromatyzacji i wydzielać estrogeny⁴⁴. Należy dodać, że teoria „dwie komórki i dwie gonadotropiny” nie wyjaśnia, jak w rzeczywistości zachodzi synteza estrogenów w świńskich pęcherzykach jajnikowych. W swych badaniach Conley pokazuje, że w przedowulacyjnych pęcherzykach jajnikowych zdolność do syntezy estradiolu wykazują zarówno komórki ziarniste, jak i komórki osłonki wewnętrznej posiadające aktywną oksydazę P450arom⁴⁵. Oznacza to, że synteza estrogenu odbywa się pod kontrolą enzymów, oksydazy P450c17 α oraz P450arom obecnych w komórkach warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej⁴⁶. Aktywność wymienionych enzymów obniża się podczas owulacji, co powoduje zmniejszenie syntezy androgenów i estradiolu, a tym samym wzrost produkcji progesteronu i rozpoczęcie procesów luteinizacyjnych⁴⁷. Działalność komórek ziarnistych i osłonkowych nie kończy się na produkcji estradiolu. Wyprodukowane steroidy regulują steroidogenezę oraz modelują aktywność enzymów⁴⁸. Amsterdam i wsp. w swoich badaniach zaobserwowali, że intensywna produkcja progesteronu przez komórki ziarniste podczas wzmożonej steroidogenezy jest związana z przemieszczaniem się komponentów odpowiedzialnych za uwalnianie cholesterolu z obrzeży komórki ku jej środkowi oraz z konwersją cholesterolu do pregnenolonu⁴⁹.

PODSUMOWANIE

Proces folikulogenezy i steroidogenezy jest niezwykle ważnym zagadnieniem, które ukazuje nam złożoność problemu tworzenia się, wzrostu i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych.

⁴³ J.E. Fortune, J.L. Hilbert, *Estradiol Secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycle: the development of responses to follicle-stimulating hormone versus luteinizing hormone*, "Endocrinology" 1987, Vol. 118, s. 2395-2401; S.G. Hillier, *Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. Commentary*, "Journal of Endocrinology" 1991, Vol. 131, s. 171-175.

⁴⁴ B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

⁴⁵ A.J. Conley, H.J. Howard, W.D. Slinger, J.J. Ford, *Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle*, "Biology of Reproduction" 1994, Vol. 51, s. 655-661.

⁴⁶ B. Błaszczuk, op. cit., s. 157-163.

⁴⁷ Ibidem.

⁴⁸ M. Szoltyś, *Funkcja komórek ziarnistych...*, ed. cit., s. 189-192.

⁴⁹ A. Amsterdam, S. Rotmensch, op. cit., s. 309-337.

BIBLIOGRAFIA

1. Albertini D.F., Anderson E., *The appearance and structure of the intracellular connetions during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junction*, "The Journal of Cell Biology" 1974, Vol. 63.
2. Amsterdam A., Rotmensch S., *Structure – function relationship during granulosa cell differentiation*, „Endocrine Reviews” 1987, Vol. 8.
3. Biliński S., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J., Przełęcka A., *Ultrastruktura i funkcje komórki*, t. 6, Warszawa 1994.
4. Błaszczuk B., *Specyfika folikulogenezy i steroidogenezy jajnikowej świni domowej (Sus scrofa f. domestica)*, „Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych” 2008, Tom 57, Nr 1-2.
5. Conley A.J., Howard H.J., Slinger W.D., Ford J.J., *Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle*, "Biology of Reproduction" 1994, Vol. 51.
6. Erickson G., Shimasaki S., *The physiology folliculogenesis: The role of novel growth factor*, "Fertility and Sterility" 2001, Vol. 76, No. 5.
7. Falck B., *Site of production estrogen in the rat ovary os studied in micro-transplants*, "Acta Physiologica Scandinavica" 1959, supl. 163.
8. Fortune J.E., Hilbert J.L., *Estradiol Secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycle: the development of responses to follicle-stimulating hormone versus luteinizing hormone*, "Endocrinology" 1987, Vol. 118.
9. Fortune J.E., Sivois J., Turzillo A.M., Savoir S., *Follicle selection in domestic ruminants*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1991, Vol. 43.
10. Hartwig W., *Endokrynologia praktyczna*, Warszawa 1978.
11. Hillier S.G., *Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. Commentary*, "Journal of Endocrinology" 1991, Vol. 131.
12. Hunter M.G., Robinson R.S., Mann G.E., Webb R., *Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species*, "Animal Reproduction Science" 2004, Vol. 82-83.
13. Ireland J., *Control of follicular growth and development*, "Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility" 1987, supl. 34.
14. Kamiński T., Przła J., *Czynniki wzrostowe w jajniku*, „Postępy Biologii Komórki” 1994, t. 21, cz. 1.
15. Kania G., *Budowa, właściwości i rola osłonki przejrzystej komórki jajowej ssaka*, „Medycyna Weterynaryjna” 1999, Vol. 55, Nr 5.
16. Knox R.V., *Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig*, "Domestic Animal Endocrinology" 2005, Vol. 29.
17. McCoard S.A., Wise T.H., Ford J.J., *Germ cell development in Meishan and White Composite gilts*, "Animal Reproduction Science" 2003, Vol. 77.
18. Peters H., McNatty K.P., *The Ovary*, London 1980.
19. Skrzypczak J., *Steroidogeneza w jajniku w fazie wzrostowej cyklu*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12.

20. Słomczyńska M., *Receptory hormonów steroidowych w jajniku świni*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12.
21. Szoltyś M., *Funkcja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego*, „Postępy Biologii Komórki” 1999, t. 26, supl. 12.
22. Szoltyś M., *Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków*, „Postępy Biologii Komórki” 1992, t. 26, supl. 12.
23. Udała J., Błaszczak B., *Przebieg cyklu rujowego u samic zwierząt gospodarskich*, „Informator” 1999, nr 16/2.

MAGDALENA HUBALEWSKA-MAZGAJ, GRAŻYNA BOCHENEK,
GRAŻYNA PULKA, MAREK SANAK

WYKRYWANIE OBECNOŚCI GENOMU RYNOWIRUSA W POPLUCZYNACH NOSOWYCH U CHORYCH NA ASTMĘ

ABSTRACT

Human rhinoviruses (HRV) are one of the nine genera belonging to a large family of Picornaviridae. They are responsible for the most cases of common cold, as well as one third to one half of upper respiratory tract (URT) infections. However, HRV are also associated with more severe illnesses, like acute otitis media, sinusitis and some lower respiratory tract diseases such as pneumonia, wheezing in children and exacerbations of asthma. Viral infections are associated with the majority of asthma exacerbations both in children (80-85%) and adults (75-80%), and about 60% of these are caused by HRV. However, the exact mechanism of HRV-induced exacerbations of the disease is not well understood, which makes it difficult to establish the effective treatment.

There have already been many attempts to develop a sensitive and specific method of HRV detection in clinical samples. Some of them were based on virus cultures followed by acid lability test, whereas others implemented the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and amplification of conserved sequences of the rhinoviral genome. As numerous of these sequences are common to both rhinoviruses and enteroviruses (EVs), further analyses were necessary, which made those methods laborious, time-consuming and too difficult to use in routine diagnostics.

Steininger et al. established an RT-PCR-based sensitive and specific method of rhinovirus detection in clinical samples, which was tested to amplify 87 different tissue-culture-grown serotypes of HRV. The aim of this study was to evaluate a modified RT-PCR based method of HRV detection in clinical samples obtained from patients with asthma exacerbations.

tions. We collected 41 nasal lavages from patients with asthma exacerbations who received hospital treatment either following an admission or in an out-patient clinic. HRV was found in 22 cases (54%), which corresponded well with the published data.

WSTĘP

Ludzkie rynowirusy (ang. *human rhinovirus*, HRV) są rodzajem wirusów należących do rodziny pikornawirusów (*Picornaviridae*). Są to małe, pozbawione otoczki cząstki o średnicy kapsydu ok. 35-30 nm, a ich materiałem genetycznym jest pojedynczy łańcuch RNA o dodatniej polarności. Większość rynowirusów wymaga względnie niskiej temperatury do replikacji – 33°C. Świadczy to o ich przystosowaniu do obecności w jamie nosowo-gardłowej i jest związane z zakażeniami górnych dróg oddechowych.

Rynowirusy są najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń górnych dróg oddechowych u ludzi. Odpowiadają za około połowę przeziębień każdego roku oraz są przyczyną większości chorób układu oddechowego w okresie wiosennym i jesiennym. Ponadto wykazany został związek zakażeń rynowirusowych z ostrym zapaleniem ucha środkowego¹, zapaleniami płuc u dzieci² oraz zaostrzeniami astmy zarówno u dzieci, jak i u dorosłych³.

Szacuje się, że 40-85% zaostrzeń astmy ma związek z wirusowymi zakażeniami górnych dróg oddechowych⁴, z czego 60% wywołują rynowirusy. Liczne badania sugerują istnienie swoistej zależności między podatnością na zakażenie wirusem a zmianami w biologii dróg oddechowych wywołanymi takimi chorobami jak właśnie astma. Przyczyną objawów astmy jest skurcz oskrzeli, który wynika z toczącego się stanu zapalnego dróg oddechowych oraz z ich nadreaktywności. Nadal nie zostało wyjaśnione, jakie mechanizmy związane z zakażeniem wirusowym dróg oddechowych prowadzą do zaostrzeń objawów astmy.

¹ M. Arola, T. Ziegler, O. Ruuskanen, J. Mertsola, K. Nanto-Salonen, P. Halonen, *Rhinovirus in acute otitis media*, "Journal of Pediatrics" 1988, Vol. 113, s. 693-695.

² M.J. Abzug, A.C. Beam, E.A. Gyorkos, M.J. Levin MJ., *Viral pneumonia in the first month of life*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1990, Vol. 9, s. 881-885.

³ S.L. Johnston, P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell et al., *Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children*, "BMJ" 1995, Vol. 310, s. 1225-1229; K.G. Nicholson, J. Kent, D.C. Ireland, *Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults*, "BMJ" 1993, Vol. 307, s. 982-986; W.W. Busse, J.E. Gern, *Viruses in asthma*, „Journal of Allergy and Clinical Immunology" 1997, Vol. 100, s. 147-150; P.K. Pattemore, S.L. Johnston, P.G. Bardin, *Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology*, "Clinical and Experimental Allergy" 1992, Vol. 22, s. 325- 336.

⁴ S.L. Johnston, P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell et al., op. cit., s. 1225-1229; K.G. Nicholson, J. Kent, D.C. Ireland, op. cit., s. 982-986.

Obecnie zostało dobrze udokumentowane, że w porównaniu z osobami zdrowymi chorzy na astmę są bardziej podatni na zakażenia rynowirusami (HRV) oraz mają cięższe i dłuższe utrzymujące się objawy ze strony dolnych dróg oddechowych w przebiegu infekcji HRV⁵. Co więcej, potwierdzenie obecności HRV w dolnych drogach oddechowych pacjentów chorych na astmę ma swoje odzwierciedlenie w cięższym przebiegu klinicznym choroby⁶.

Znanych jest ponad 100 różnych serotypów HRV, sklasyfikowanych na podstawie wielu parametrów, takich jak między innymi powinowactwo komórkowych receptorów dla HRV czy homologia sekwencji genomu HRV. Na podstawie homologii sekwencji nukleotydowych, w szczególności analizy regionu genomu wirusa kodującego białko jego kaspynu VP4/VP2, wyodrębniono dwie główne grupy rynowirusów – HRV-A oraz HRV-B. W 2004 r. zidentyfikowano nowy genotyp rynowirusa⁷, który dał początek kolejnej grupie rynowirusów – HRV-C, odróżnianej od pozostałych na podstawie sekwencji genu VP4⁸. Ze względu na ogromne znaczenie rynowirusów jako patogenów ludzkich podejmowano liczne próby znalezienia czulej i swoistej metody wykrywania HRV w materiale klinicznym. Starsze metody oparte były na namnażaniu wirusa w hodowlach komórkowych, a następnie ich izolacji oraz inkubacji w środowisku o różnym pH w celu sprawdzenia podatności na inaktywację (ang. *acid-lability test*)⁹. W ten sposób odróżniano rynowirusy od enterowirusów. Metody te jednak miały niewystarczającą użyteczność, głównie ze względu na czasochłonność (ok. 2 tygodnie), co stanowiło o ich niskiej przydatności do rutynowej diagnostyki. Namnażanie wirusa w hodowlach komórkowych, a następnie mianowanie z użyciem swoistych dla HRV przeciwciał również nie przynosi zadowalających efektów – dzieje się tak ze względu na niską czułość metody¹⁰. Dlatego też działania te zostały wyparte przez znacznie szybsze i bardziej

⁵ J.M. Corne, C. Marshall, S. Smith, J. Schreiber, G. Sanderson, S.T. Holgate, S.L. Johnston, *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*, "Lancet" 2002, Vol. 359 (9309), s. 831-834.

⁶ M. Wos, M. Sanak, J. Soja, H. Olechnowicz, W.W. Busse, A. Szczeklik, *The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" Vol. 2088/177, s. 1082-1089.

⁷ D. Lamson, N. Renwick, V. Kapoor, Z. Liu, G. Palacios, J. Ju, A. Dean, K. George, T. Briesse, W.I. Lipkin, *MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005*, "Journal of Infectious Diseases" 2006, Vol. 194, s. 1398-1402.

⁸ S.K. Lau, C.C. Yip, H.W. Tsoi, R.A. Lee, L.Y. So, Y.L. Lau, K.H. Chan, P.C. Woo, K.Y. Yuen, *Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children*, "Journal of Clinical Microbiology" 2007, Vol. 45 (11), s. 3655-3664.

⁹ B.Y. Yun, M.R. Kim, J.Y. Park, E.H. Choi, H.J. Lee, C.K. Yun, *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1995, Vol. 14 (12), s. 1054-1059.

¹⁰ P.K. Pattemore, S.L. Johnston, P.G. Bardin, op. cit., s. 325-336.

czułe techniki molekularne oparte na odwrotnej transkrypcji i PCR¹¹. Wśród licznych doniesień, w których stosowano metody oparte o PCR do wykrywania HRV w materiale biologicznym, zdecydowana większość polegała na amplifikacji wysoce konserwatywnego regionu niekodującego końca 5' (5'NCR)¹² lub fragmentów genów kapsydu HRV (VP2, VP4)¹³. Ze względu na fakt, że niektóre z tych sekwencji są wspólne dla rynowirusów i enterowirusów, również zakażających drogi oddechowe, niezbędne są dalsze analizy prowadzące do identyfikacji materiału genetycznego pochodzącego od rynowirusów. Polegają one na hybrydyzacji otrzymanych fragmentów ze specyficznymi dla HRV sondami¹⁴, trawieniu enzymami restrykcyjnymi¹⁵, sekwencjonowaniu otrzymanych fragmentów lub analizie różnic w wielkości produktów reakcji PCR¹⁶, co znacznie wydłuża czas oczekiwania na wyniki i przez to obniża użyteczność tego typu metod do celów rutynowej diagnostyki.

¹¹ E. Arruda, A. Pitkäranta, T.J.J. Witek, C.A. Doyle, F.G. Hayden, *Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (11), s. 2864-2868.

¹² E. Arruda, F.G. Hayden, *Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR*, "Molecular and Cellular Probes" 1993, Vol. 7 (5), s. 373-379; R.E. Gama, P.R. Horsnell, P.J. Hughes, C. North, C.B. Bruce, W. al-Nakib, G. Stanway, *Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction*, "Journal of Medical Virology" 1989, Vol. 28 (2), s. 73-77; P. Halonen, E. Rocha, J. Hierholzer, B. Holloway, T. Hyypiä, P. Hurskainen, M. Pallansch, *Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization*, "Journal of Clinical Microbiology" 1995, Vol. 33 (3), s. 648-653; D.C. Ireland, J. Kent, K.G. Nicholson, *Improved detection of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR*, "Journal of Medical Virology" 1993, Vol. 40 (2), s. 96-101; S.L. Johnston, G. Sanderson, P.K. Pattemore, S. Smith, P.G. Bardin, C.B. Bruce, P.R. Lambden, D.A. Tyrrell, S.T. Holgate, *Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (1), s. 111-117; U. Kämmerer, B. Kunkel, K. Korn, *Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses*, "Journal of Clinical Microbiology" 1994, Vol. 32 (2), s. 285-291; J. Santti, T. Hyypiä, P. Halonen, *Comparison of PCR primer pairs in the detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates*, "Journal of Virological Methods" 1997, Vol. 66 (1), s. 139-147.

¹³ F. Freymuth, A. Vabret, F. Galateau-Salle, J. Ferey, G. Eugene, J. Petitjean, E. Gennetay, J. Brouard, M. Jolkik, J.F. Duhamel, B. Guillois, *Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization*, "Clinical and Diagnostic Virology" 1997, Vol. 8 (1), s. 31-40; J. Mori, J.P. Clewley, *Polymerase chain reaction and sequencing for typing rhinovirus RNA*, "Journal of Medical Virology" 1994, Vol. 44 (4), s. 323-329; D.M. Olive, S. al-Mufti, W. al-Mulla, M.A. Khan, A. Pasca, G. Stanway, W. al-Nakib, *Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification*, "Journal of General Virology" 1990, Vol. 71, s. 2141-2147.

¹⁴ D.C. Ireland, J. Kent, K.G. Nicholson, op. cit., s. 96-101; S.L. Johnston, G. Sanderson, P.K. Pattemore, S. Smith, P.G. Bardin, C.B. Bruce, P.R. Lambden, D.A. Tyrrell, S.T. Holgate, op. cit., s. 111-117; A.C. Andeweg, T.M. Bestebroer, M. Huybreghs, T.G. Kimman, J.C. de Jong, *Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (3), s. 524-530; S. Blomqvist, A. Skyttä, M. Roivainen, T. Hovi, *Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (9), s. 2813-2816; A. Pitkäranta, E. Arruda, H. Malmberg, F.G. Hayden, *Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (7), s. 1791-1793.

¹⁵ U. Kämmerer, B. Kunkel, K. Korn, op. cit., s. 285-291.

¹⁶ J. Mori, J.P. Clewley, op. cit., s. 323-329; D.M. Olive, S. al-Mufti, W. al-Mulla, M.A. Khan, A. Pasca, G. Stanway, W. al-Nakib, op. cit., s. 2141-2147; R.L. Atmar, P.R. Georgiou, *Classification of respiratory tract picornavirus isolates as enteroviruses or rhinoviruses by using reverse transcription-polymerase chain reaction*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (9), s. 2544-2546.

Steininger i wsp.¹⁷ opracowali czułą i swoistą metodę szybkiej i selektywnej detekcji HRV w materiale klinicznym. Skuteczność metody została potwierdzona na podstawie amplifikacji genomu 87 różnych serotypów HRV z hodowli komórkowych. Swoistość metody sprawdzono, poddając próbie amplifikacji wybrane enterowirusy (coxackie wirusy B1-B6, echowirusy 18, 24 oraz 30, poliovirusy 1-3) oraz inne wirusy dróg oddechowych, takie jak adenowirusy, wirusy grypy, paragrypy, koronawirus OC43 oraz wirus RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*). Sekwencje genomowe żadnego z enterowirusów, jak również innych wymienionych patogenów dróg oddechowych, nie poddawały się amplifikacji za pomocą użytej metody, co potwierdza jej wysoką swoistość wobec wirusów HRV.

Zważywszy, że większość zaostrzeń astmy jest związana z zakażeniami rynowirusowymi, celem pracy było określenie – przy zastosowaniu omawianej metody – częstości występowania HRV w popłuczynach nosowych pobranych od chorych z zaostrzeniem astmy.

OPIS METODY

DETEKCJA SEKWENCJI RYNOWIRUSOWEGO RNA W MATERIALE POCHODZĄCYM OD CHORYCH NA ASTMĘ

STARTERY I AMPLIFIKOWANA SEKWENCJA

Zgodnie z metodologią opisaną przez Steininger i wsp., sekwencje starterów do reakcji RT-PCR zostały wybrane na podstawie serotypu 14 rynowirusa. Zastosowano następujące startery do odwrotnej transkrypcji oraz pierwszego etapu reakcji PCR (PCR z zewnętrzną parą starterów): cDNA, 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'; starter antysensowny: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'; produkt amplifikacji miał wielkość 106 par zasad. Sekwencje starterów dla drugiego etapu reakcji (wewnętrzna para starterów) były następujące: cDNA, 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'; starter antysensowny: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C(AG)T CC-3'; amplifikowany fragment miał wielkość 93 par zasad.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Natychmiast po pobraniu od pacjenta aspiratu nosowego (popłuczyny z nosa uzyskane po przepłukaniu przewodów nosowych 10 ml soli fizjologicznej) do próbki dodawano 1 µl inhibitora rybonukleaz (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, Carlsbad,

¹⁷ Ch. Steininger, S.W. Aberle, T. Popow-Kraupp, *Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 2001, Vol. 39 (1), s. 129-133.

CA). Następnie próbkę przenoszono do jałowej probówki typu Falcon, mieszano z 1/3 objętości roztworu glikolu polietylenowego (0,1M HEPES pH 7.0, 30% PEG 6000, Sigma-Aldrich, z dodatkiem 1,8M NaCl) i inkubowano w 4°C przez kilka dni w celu precypitacji cząstek wirusa. Następnie próbkę wirowano (15 minut, 15000 rpm, 4°C) i izolowano z niej RNA (osobno z pelety i z supernatantu) przy pomocy zestawu do izolacji RNA (Total RNA Kit, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).

ODWROTNA TRANSKRYPCJA I AMPLIFIKACJA

Do amplifikacji sekwencji genomu HRV wprowadzono modyfikacje metody opisanej przez Steininger i wsp., głównie w zakresie programów termocyklera użytych do reakcji PCR. Do odwrotnej transkrypcji użyto 10µl roztworu wyizolowanego RNA (całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej – 50µl). Reakcję przeprowadzono osobno dla RNA wyizolowanego z pelety i z supernatantu. Posłużono się zestawem do odwrotnej transkrypcji i amplifikacji z użyciem tego samego enzymu – polimerazy Tth (GeneAmp EZ rTth RNA PCR Kit, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey), zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 60°C przez 30 minut (etap odwrotnej transkrypcji), a następnie przeprowadzono dwuetapową reakcję PCR (zagnieżdżony PCR), co stanowiło łącznie 95 cykli amplifikacji.

Parametry programu do pierwszej reakcji PCR (50 cykli) były następujące: denaturacja przez 20 sekund, przyłączanie starterów w temp. 60°C przez 30 sekund, elongacja w temp. 72°C przez 40 sekund, końcowa inkubacja w 72°C przez 5 minut. Drugi etap amplifikacji, w którym matrycę stanowiło 2µl uzyskanej uprzednio mieszaniny poreakcyjnej, rozpoczynała 10-minutowa denaturacja, po której następowało 45 cykli programu: denaturacja – 20 sekund, przyłączanie starterów w 60°C – 30 sekund, elongacja – 40 sekund oraz końcowa inkubacja – 5 minut w 72°C. Do każdej serii analizowanych próbek dodawano dwie kontrole: pozytywną (materiał od chorego, z wcześniej potwierdzoną obecnością HRV) oraz negatywną. Ponadto, każdorazowo do pierwszego etapu PCR dodawano enzym uracylo-N-glikozylazę (AmpErase UNG, 1U/µl, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey) w celu uniknięcia ewentualnej kontaminacji materiałem amplifikowanym między kolejnymi seriami próbek.

ANALIZA PRODUKTÓW REAKCJI PCR

Po przeprowadzonej amplifikacji produkty (10µl) uwidaczniano za pomocą elektroforezy w 2-procentowym żelu agarozowym (Nu Micropor Agarose, Prona) z dodatkiem bromku etydyny.

OSOBY BADANE

Popłuczyny nosowe pobrano od 41 chorych, zgłaszających się z powodu zaostrzenia astmy, hospitalizowanych lub pozostających w leczeniu ambulatoryjnym II Katedry Chorób Wewnętrznych. Chorzy byli rekrutowani w okresie od stycznia 2009 do marca 2010 roku. Ich wiek mieścił się w przedziale między 18. a 84. rokiem życia (mediana: 50 lat). Wśród zbadanych osób było 30 kobiet oraz 11 mężczyzn.

Do badania włączono wszystkich chorych, którzy spełniali kryteria zaostrzenia astmy oskrzelowej zgodnie z najnowszymi wytycznymi opublikowanymi w „American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine” w 2009 roku. Ów zaostrzony stan stwierdza się u osoby chorej, jeśli zaistniała potrzeba zastosowania systemowej steroidoterapii lub zwiększenia dotychczasowej dawki glikokortykosteroidów przez co najmniej 3 kolejne dni bądź zaszła konieczność hospitalizacji lub pobytu na oddziale intensywnej opieki medycznej z powodu astmy, wymagająca włączenia systemowej steroidoterapii¹⁸.

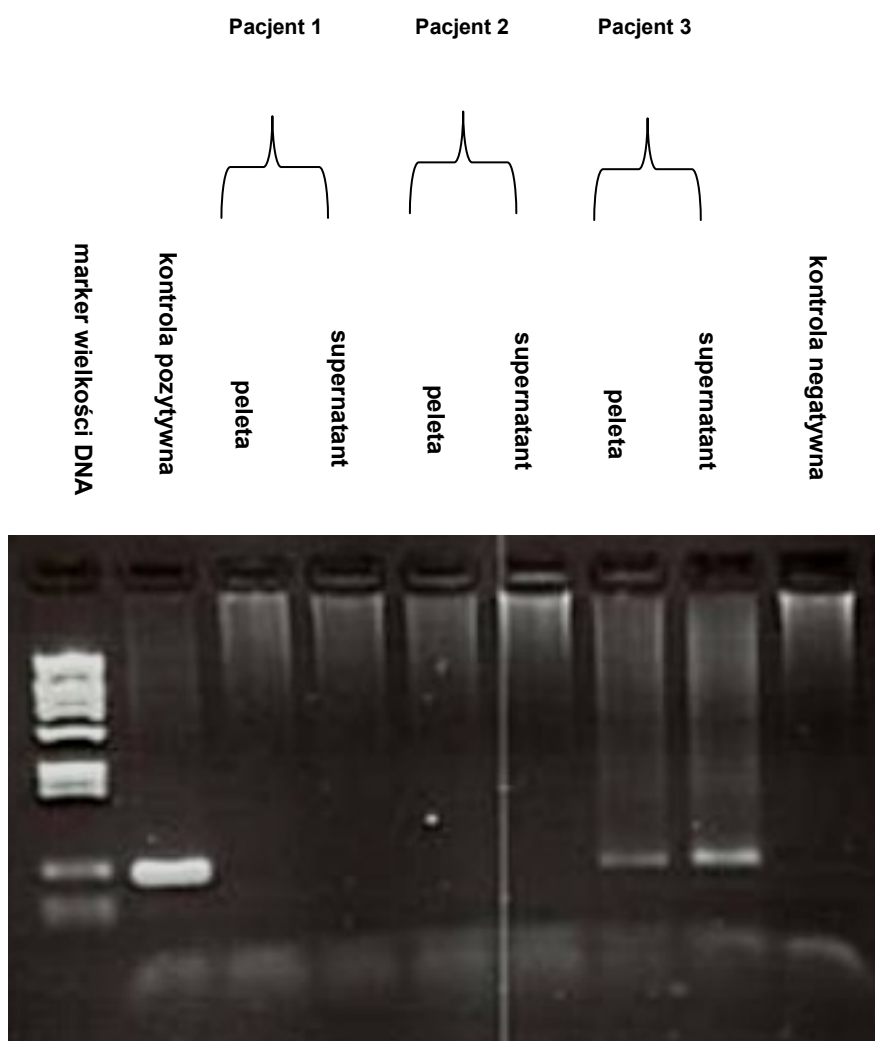
WYNIKI

Spośród 41 chorych włączonych do badania, u 22 osób wykryto obecność genomu rynowirusów, co stanowi 54% analizowanych próbek (17/30 kobiet czyli 57%, 5/11 mężczyzn, czyli 45%). Dodatni wynik reakcji PCR potwierdzono, przeprowadzając sekwencjonowanie otrzymanego produktu amplifikacji. Porównanie wyników badania pelety uzyskanej przez precypitację cząstek wirusa glikolem polietylenowym z wynikami badania supernatantu wskazuje na celowość wprowadzenia tego kroku do procedury postępowania z analizowanymi próbkami. W próbkach, w których wykryto obecność rynowirusa, najczęściej sygnał otrzymywano zarówno w pelecie, jak i w supernatancie. Były jednak przypadki, w których

¹⁸ H.K. Reddel, D.R. Taylor, E.D. Bateman, L.P. Boulet, H.A. Boushey, W.W. Busse, T.B. Casale, P. Chanez, P.L. Enright, P.G. Gibson, J.C. de Jongste, H.A. Kerstjens, S.C. Lazarus, M.L. Levy, P.M. O'Byrne, M.R. Partridge, I.D. Pavord, M.R. Sears, P.J. Sterk, S.W. Stoloff, S.D. Sullivan, S.J. Szefler, M.D. Thomas, S.E. Wenzel, *American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice*, “American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine” 2009, Vol. 180 (1), s. 59-99.

obecność rynowirusa wykrywano jedynie w pelecie, co prawdopodobnie wynika z niskiej liczby kopii wirusa w próbce. W takim przypadku precypitacja glikolem polietylenowym wydaje się mieć istotne znaczenie.

Rys. 1. Zdjęcie żelu po podziale elektroforetycznym produktów amplifikacji



Źródło: Materiały własne

DYSKUSJA

Z opublikowanych badań wynika, że około 80% przypadków zaostrzeń astmy oskrzelowej ma związek z zakażeniami wirusowymi dróg oddechowych, z czego około 60% to infekcje rynowirusowe (co daje około 50% zaostrzeń astmy wywołanych zakażeniami HRV). Odsetek chorych, u których wykryto genom HRV, w przeprowadzonym badaniu jest zbliżony i wynosi 54%. Zastosowana metoda jest niewątpliwie bardzo czuła (łącznie 95 cykli amplifi-

kacji), co znajduje potwierdzenie w przeprowadzonych eksperymentach metodologicznych, w których zawsze uzyskiwano produkt amplifikacji w przypadku obecności co najmniej 10 kopii wirusa. Jest to szczególnie istotne podczas poszukiwania materiału rynowirusowego w błonkach nosowych, ponieważ nawet w razie uzyskania małej ilości materiału do badania wciąż istnieje duże prawdopodobieństwo otrzymania dodatniego wyniku u osób z zakażeniem HRV (dzięki tak czułej reakcji PCR). Zastosowana metoda została również sprawdzona pod względem swoistości wobec HRV. Należy jednak pamiętać, że jej skuteczność jest potwierdzona dla 87 różnych serotypów rynowirusów, podczas gdy obecnie znanych jest ponad 100 różnych serotypów zakażających ludzkie drogi oddechowe. Nie ma więc pewności, czy próba detekcji HRV w materiale od osób zakażonych pozostałymi serotypami nie daje fałszywie negatywnego wyniku przy zastosowaniu takiej metody. Wskazane byłoby zatem oznaczenie genotypów wirusów wykrytych w próbkach klinicznych oraz dodatkowe sprawdzenie metody pod kątem detekcji pozostałych serotypów HRV. Konieczne jest także przeprowadzenie podobnych analiz na znacznie większej próbie badanych osób.

BIBLIOGRAFIA

1. Abzug M.J., Beam A.C., Gyorkos E.A., Levin M.J., *Viral pneumonia in the first month of life*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1990, Vol. 9.
2. Andeweg A.C., Bestebroer T.M., Huybreghs M., Kimman T.G., de Jong J.C., *Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (3).
3. Arola M., Ziegler T., Ruuskanen O., Mertsola J., Nanto-Salonen K., Halonen P., *Rhinovirus in acute otitis media*, "Journal of Pediatrics" 1988, Vol. 113.
4. Arruda E., Hayden F.G., *Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR*, "Molecular and Cellular Probes" 1993, Vol. 7 (5).
5. Arruda E., Pitkäranta A., Witek T.J.J., Doyle C.A., Hayden F.G., *Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (11).
6. Atmar R.L., Georgiou P.R., *Classification of respiratory tract picornavirus isolates as enteroviruses or rhinoviruses by using reverse transcription-polymerase chain reaction*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (9).
7. Blomqvist S., Skyttä A., Roivainen M., Hovi T., *Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (9).
8. Busse W.W., Gern J.E., *Viruses in asthma*, "Journal of Allergy and Clinical Immunology" 1997, Vol. 100.
9. Corne J.M., Marshall C., Smith S., Schreiber J., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L., *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*, "Lancet" 2002, Vol. 359 (9309).

10. Freymuth F., Vabret A., Galateau-Salle F., Ferey J., Eugene G., Petitjean J., Gennetay E., Brouard J., Jokik M., Duhamel J.F., Guillois B., *Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization*, "Clinical and Diagnostic Virology" 1997, Vol. 8 (1).
11. Gama R.E., Horsnell P.R., Hughes P.J., North C., Bruce C.B., al-Nakib W., Stanway G., *Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction*, "Journal of Medical Virology" 1989, Vol. 28 (2).
12. Halonen P., Rocha E., Hierholzer J., Holloway B., Hyypiä T., Hurskainen P., Pallansch M., *Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization*, "Journal of Clinical Microbiology" 1995, Vol. 33 (3).
13. Ireland D.C., Kent J., Nicholson K.G., *Improved detection of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR*, "Journal of Medical Virology" 1993, Vol. 40 (2).
14. Johnston S.L., Pattemore P.K., Sanderson G., Smith S., Lampe F., Josephs L., Symington P., O'Toole S., Myint S.H., Tyrrell D.A. et al., *Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children*, "BMJ" 1995, Vol. 310.
15. Johnston S.L., Sanderson G., Pattemore P.K., Smith S., Bardin P.G., Bruce C.B., Lambden P.R., Tyrrell D.A., Holgate S.T., *Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (1).
16. Kämmerer U., Kunkel B., Korn K., *Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses*, "Journal of Clinical Microbiology" 1994, Vol. 32 (2).
17. Lamson D., Renwick N., Kapoor V., Liu Z., Palacios G., Ju J., Dean A., George K., Briesse T., Lipkin W.I., *MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005*, "Journal of Infectious Diseases" 2006, Vol. 194.
18. Lau S.K., Yip C.C., Tsoi H.W., Lee R.A., So L.Y., Lau Y.L., Chan K.H., Woo P.C., Yuen K.Y., *Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children*, "Journal of Clinical Microbiology" 2007, Vol. 45 (11).
19. Mori J., Clewley J.P., *Polymerase chain reaction and sequencing for typing rhinovirus RNA*, "Journal of Medical Virology" 1994, Vol. 44 (4).
20. Nicholson K.G., Kent J., Ireland D.C., *Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults*, "BMJ" 1993, Vol. 307.
21. Olive D.M., al-Mufti S., al-Mulla W., Khan M.A., Pasca A., Stanway G., al-Nakib W., *Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification*, "Journal of General Virology" 1990, Vol. 71.
22. Pattemore P.K., Johnston S.L., Bardin P.G., *Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology*, "Clinical and Experimental Allergy" 1992, Vol. 22.
23. Pitkäranta A., Arruda E., Malmberg H., Hayden F.G., *Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (7).

24. Reddel H.K., Taylor D.R., Bateman E.D., Boulet L.P., Boushey H.A., Busse W.W., Casale T.B., Chanez P., Enright P.L., Gibson P.G., de Jongste J.C., Kerstjens H.A., Lazarus S.C., Levy M.L., O'Byrne P.M., Partridge M.R., Pavord I.D., Sears M.R., Sterk P.J., Stoloff S.W., Sullivan S.D., Szeffler S.J., Thomas M.D., Wenzel S.E., *American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" 2009, Vol. 180 (1).
25. Santti J., Hyypiä T., Halonen P., *Comparison of PCR primer pairs in the detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates*, "Journal of Virological Methods" 1997, Vol. 66 (1).
26. Steininger Ch., Aberle S.W., Popow-Kraupp T., *Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 2001, Vol. 39 (1).
27. Wos M., Sanak M., Soja J., Olechnowicz H., Busse W.W., Szczeklik A., *The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" 2008, Vol. 177.
28. Yun B.Y., Kim M.R., Park J.Y., Choi E.H., Lee H.J., Yun C.K., *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1995, Vol. 14 (12).

BARTŁOMIEJ MATEJKO, JOANNA GŁADYSZ

IDEA PROTEZ BIONICZNYCH W NOWOCZESNEJ PROTETYCE

Projekt wykonany w ramach kursu Implanty i Sztuczne Narządy
w Międzywydziałowej Szkole Inżynierii Biomedycznej AGH

ABSTRACT

Over the past decades, a tremendous progress has been made in creating artificial machines and systems. Breakthroughs in this field have been possible through the collaboration of scientists, biologists, computer scientists, engineers and patients. A particularly promising area is the invention of bionic artificial limbs as well as bionic ear and eye prostheses. The connection of the nervous system with a bionic prosthesis enables it to partly fulfill the functions of a real limb. This is an opportunity for a disabled person to live a fairly normal life. The article discusses the progress made in recent years in creating bionic prostheses and presents the requirements of bionic prostheses, their advantages, disadvantages, applied solutions and directions for their further development.

WPROWADZENIE

Obecna medycyna wiąże się z biotechnologią i szeroko rozumianą bioinżynierią, które stanowią siłę napędową nowych metod leczniczych. Niniejszy artykuł skupia się na szybko rozwijającej się dziedzinie nauki, jaką jest nowoczesna protetyka, która łączy biomechanikę z medycyną. Bionika to badanie procesów sterujących działaniem organizmów żywych. Zdobytą wiedzę wykorzystana jest do projektowania układów fizycznych znajdujących zastosowanie w automatyce, elektronice i mechanice. Szuka ona nowych pomysłów inspirowanych naturą, przydatnych do zbudowania sztucznych maszyn. Obok konstruowania urządzeń roz-

wija się również transplantologia. W latach 2004-2006 doniesiono o transplantacji 24 dłoni na świecie¹. Większości dokonano we Francji i we Włoszech. Operacja jest podobna do tej, którą przeprowadza się przy ponownym przyłączeniu odciętej kończyny. Powrót zdolności motorycznych obserwuje się po 24 miesiącach rehabilitacji. Konieczne jest jednak przyjmowanie leków immunosupresyjnych zapobiegających odrzuceniu kończyny, a czasami nawet dodatkowe operacje i ponowna hospitalizacja². Alternatywą dla transplantacji są właśnie protezy bioniczne.

Od tysięcy lat ludzie po amputacjach kończyn starali się zastępować je protezami. Protezy kosmetyczne, służące głównie celom estetycznym, wykorzystywane były już w starożytnym Egipcie. W ostatnich dziesięcioleciach nastąpił rozwój w dziedzinie konstruowania protez bionicznych działających w połączeniu z tkanką nerwową osób niepełnosprawnych. Badania nad protezami bionicznymi, które naśladują naturalne funkcjonowanie kończyn, są wciąż w fazie rozwoju. Zdania na temat sukcesu bioniki są podzielone – niejednokrotnie sugeruje się, że przeszczepy biologiczne kończyn z hodowli mają większe szanse powodzenia³. Cena najprostszych tego typu protez zaczyna się od kilkudziesięciu tysięcy dolarów, kosztowny jest także serwis, a niestety nie są to urządzenia bezawaryjne. Organizm właściciela zmienia swoje wymiary i właściwości (masa mięśniowa, wzrost itp.), co stanowi dodatkowy problem. Głównym czynnikiem ograniczającym użycie cybernetycznych kończyn jest trudność z przekazywaniem sygnałów pomiędzy własną kończyną a częścią biocybernetyczną; jak pokazują badania, nawet prosty chwyt angażuje duże partie mózgu⁴, a prawidłowe wzorce podnoszenia kształtują się do 8-10. roku życia⁵. Ogólnie rzecz ujmując, protezy te posiadają dużą masę i wymagają znacznego źródła energii. Pracuje się również nad konstrukcją sztucznych mięśni. Do ich budowy wykorzystuje się elektroaktywne polimery, które zginają się, skręcają i prostują pod wpływem impulsów elektrycznych. Ograniczeniem jest jednak potrzeba użycia dużego impulsu stymulującego, dlatego konieczne są dalsze udoskonalenia, aby lepiej zdefiniować ich rolę w nowoczesnej protetyce⁶. Obecnie istniejące systemy biocybernetycznych protez kontrolowane są przez aktywność bioelektryczną mięśni. Po-

¹ P.F. Pasquina, P.R. Bryant, M.E. Huang, T.L. Roberts, V.S. Nelson, K.M. Flood, *Limb Deficiency And Prosthetic Management: Focused Review*, [in:] *Advances in Amputee Care*, "Archives of Physical Medicine and Rehabilitation" 2006, Vol. 87, Issue 3, s. 34-43.

² Ibidem.

³ M. Kruczek. *Pierwszy Polak z bioniczną dłonią*. [Online]. Protokół dostępu: http://wyborcza.pl/1,75476,56-77333,Pierwszy_Polak_z_bioniczna_dlonia.html [10 września 2010].

⁴ B.B. Edin, L. Ascari, L. Beccai, S. Roccella, J.-J. Cabibihan, M.C. Carrozza. *Bio-inspired sensorization of a biomechatronic robot hand for the grasp-and-lift task*, "Brain Research Bulletin" 2008. Vol. 75, s. 785-795.

⁵ Ibidem.

⁶ P.F. Pasquina, P.R. Bryant, M.E. Huang, T.L. Roberts, V.S. Nelson, K.M. Flood, op. cit., s. 34-43.

wierzchnia sensora jest zależna od dobrego kontaktu ze skórą, od minimalizacji wpływu potu i zdolności pacjenta do kontroli pracy swoich mięśni. Kontrola nad ruchami np. otwierania i zamykania dłoni przez mięśnie bicepsa wymaga nauczania tych mięśni nowej, dodatkowej funkcji. Obecnie pracuje się nad wszczepieniem elektrod do wnętrza mięśni, aby zwiększyć ilość kontrolowanych stopni swobody. Innym potencjalnym źródłem kontroli jest centralny układ nerwowy. Naukowcy z Uniwersytetu w Utah zademonstrowali implantację wzdłużną elektrod do odciętych nerwów i zaobserwowali sygnały eferentne motoryczne i aferentne sensoryczne⁷. Eksperyment potwierdził, że nerwy obwodowe mogą kontrolować bioprotezę. Sugeruje to istnienie sprzężenia zwrotnego między protezą a użytkownikiem. Elektrody umieszcza się w ośrodkach motorycznych w korze mózgowej lub w ich pobliżu. Dzięki sygnałom, które są wysyłane i dekodowane przez te elektrody w procesorze komputera, możliwe jest sterowanie protezą. Urządzenia takie nazywamy *brain-machine interface*⁸.

PROTEZA KOŃCZYNY GÓRNEJ

Skonstruowanie funkcjonalnych protez kończyn górnych jest dużym wyzwaniem dla inżynierów i lekarzy ze względu na skomplikowanie oraz precyzję wykonywanych czynności. Ludzką rękę można anatomicznie rozdzielić na 18 części, które są połączone 17 elementami ruchomymi. Posiada ona również 22 stopnie swobody i 23 stopnie ruchliwości. Dawne protezy miały jedynie zastosowanie kosmetyczne – zastępowały amputowaną kończynę. Rozwój techniki i medycyny w ostatnim czasie zaowocował powstaniem opisanych poniżej funkcjonalnych protez kończyn górnych. Do podstawowych wymagań stawianych protezom zalicza się:

- dopasowanie do ciężaru i wymiarów naturalnej ręki,
- łatwą sterowalność zużywającą małą ilość energii,
- brak emisji hałasu podczas używania protezy,
- system sterowania umożliwiający jak najdokładniejsze chwytanie przedmiotu.

Klasyfikacji protez można dokonać na podstawie wysokości amputacji kończyny. Wyróżniamy protezy: ręki i poszczególnych palców, przedramienia, ramienia ze stawem łokciowym. Sterowanie protezami bionicznymi jest realizowane za pomocą trzech głównych metod – pierwszą z nich jest sterowanie elektromechaniczne, w którym ruch poszczególnych palców

⁷ Ibidem.

⁸ Ibidem.

zasilany jest przy pomocy baterii; sterowanie bioelektryczne (druga metoda) odbywa się poprzez sygnały elektryczne powstające w mięśniach w miejscu amputacji ręki. Trzecią, ciągle badaną metodą jest sterowanie za pomocą fal mózgowych, w ramach którego informacje odbierane z mózgu przekazywane są poprzez np. sieci neuronowe do sterownika, ten zaś interpretuje je i wysyła do protezy⁹.

Pierwszą protezę kończyny górnej zastosowano u amerykańskiego elektryka Jessego Sullivana¹⁰. Na skutek porażenia prądem stracił on obie ręce, a także mięśnie kierujące ich ruchem. Nie można było zatem zastosować zwykłej elektronicznej protezy, która reaguje na zachodzący w niej wzrost napięcia. Niestety, do obecnej chwili nie można też z powierzchni skóry wykryć impulsu nerwowego, który kierowałby utraconą kończyną. Ominięto więc problem poprzez chirurgiczne skierowanie końcówek nerwów do rejonu klatki piersiowej. Tym samym, próbując poruszać protezą dłoni, pacjent kierował impulsy do innych mięśni, których natężenie mogło już być odczytane przez sygnał EMG. Ku zaskoczeniu badaczy pacjent zaczynał odzyskiwać czucie, ponieważ przeniesione końcówki nerwowe jego ręki znalazły receptory w mięśniach klatki piersiowej. Tak więc pacjent czuł dotyk na protezie ręki, a także odczuwał zmiany temperatury, kształt i fakturę dotykanych przedmiotów¹¹.

Do odbierania sygnałów z nerwów i kontrolowania ruchu protezy ręki używa się od niedawna elektrod LIFEs (Longitudinally Implanted Intra Fascicular Electrodes). Elektrody te, tak jak i nerwy, potrafią pełnić funkcję odbioru i przekazywania informacji. Pojedyncza elektroda wykonana jest z przewodów zbudowanych z izolowanej, przewodzącej platyny lub metalu opłaskzonego włóknem Kevlar, osadzonych na poliamidowym podłożu zapewniającym biokompatybilność i elastyczność. Każde włókno posiada 8 rejestrujących punktów¹².

Innym sposobem wzrostu przekazywania impulsów w protezie jest wspomniane wcześniej przekazywanie bioelektryczne. Pierwsza tego typu proteza została wymyślona przez Reinholda Reinera w 1948 roku. Korzysta ona z sygnałów EMG, czyli elektrycznej aktywności mięśni szkieletowych. Ruch dłoni, łokcia czy nadgarstka jest sterowany sygnałem nerwowo-mięśniowym powstałym w nieuszkodzonych partiach mięśni. Występujące w protezie elektrody wychwytyują sygnały z aktonów mięśniowych, a system kontroluje i określa poziom

⁹ J. Kardyń. *Protezy kończyn górnych*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.inzynieria-biomedyczna.com.pl/biomechanika/97-protezy-konczyn-gornych.html> [21 września 2010].

¹⁰ *Bioniczny człowiek – spojrzenie w przyszłość*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.eioba.pl/a72549/bioniczny_czlowiek_spojrzenie_w_przyszlosc [21 września 2010].

¹¹ Ibidem.

¹² G. Di Pino, E. Guglielmelli, P.M. Rossini, *Neuroplasticity in amputees: Main implications on bidirectional interfacing of cybernetic hand prostheses*, "Progress in Neurobiology" 2009, Vol. 88, s. 114-126.

sygnału dla wyboru funkcji wykonania i/lub nadzoru nad szybkością realizacji. Wybór ten zależy od poziomu sygnału – sygnały sterujące protezą są proporcjonalne do mechanicznych zmian naprężeń włókna mięśniowego. Przetwarzany sygnał, odpowiadający stałemu sygnałowi skurczu, nie posiada stałej wartości – są to tzw. fluktuacje wokół średniej wartości – a w celu uzyskania odpowiedniego poziomu sygnału musi on być obserwowany przez pewien czas, aczkolwiek nie dłużej niż jedną dziesiątą sekundy, w przeciwnym razie nastąpi opóźnienie przyjęcia między skurczem protezy a wykonywaną czynnością. Problemem w przypadku używania tego typu protez jest sposób, w jaki ma być generowany sygnał elektryczny. Różnica między faktycznie generowanym a zamierzonym sygnałem jest nazywana „błędem operatora”. Aby zminimalizować błędy systemu i operatora, określa się zakres poziomu sygnału odpowiadający danemu działaniu. Procedura ta wymaga oszacowania dwóch poziomów sygnałów – minimalnego i maksymalnego – tak aby można było łatwo sterować protezą¹³.

Aby osiągnąć jak najlepszą funkcjonalność protez, dąży się do uzyskania jak największej ich ruchliwości, włączając w to ruchy poszczególnych palców. Haki, przejmujące funkcje palców, są trudne do sterowania. Mogą występować problemy z uchwyceniem rzeczy o nietypowych kształtach, kontrolowaniem siły chwytu, a zadania takie jak nieznaczne unoszenie przedmiotu są prawie niemożliwe do wykonania, dlatego unowocześnia się protezy poprzez stosowanie np. chwytu regulowanego pasywnie. System ten mechanicznie reguluje siłę chwytu w zależności od kształtu i wielkości przedmiotu i pomimo iż każdy palec jest sterowany przez ten sam siłownik, system sprężyn pozwala protezom palców na poruszanie się w różny sposób, co powoduje lepszą chwytliwość oraz mniejszą destrukcyjność.

Dalsze badania nad problemem chwytu doprowadziły do powstania tzw. chwytu regulowanego aktywnie, w którym w miejsce systemu mechanicznego zostały wprowadzone sensory i mikroprocesory. Czujniki ciśnienia umiejscowione są na końcach palców, a czujniki miejsca na aktywatorach, dzięki czemu indywidualny ruch każdego palca jest kontrolowany przez mikroprocesor na podstawie reakcji i sygnałów pochodzących od czujników, co umożliwia łatwiejszą manipulację i precyzyjniejsze ruchy. Najbardziej popularnymi aktywatorami są małe silniki prądu stałego¹⁴. Używa się także aktywatorów sztucznych mięśni, które imi-

¹³ H. Herr, G.P. Whiteley, D. Childress . *Chapter 5: Cyborg Technology – Biomimetic Orthotic and Prosthetic Technology*. [Online]. Available at: <http://biomech.media.mit.edu/publications/HerrSPIETextbook.pdf> [September 21, 2010].

¹⁴ G. Di Pino, E. Guglielmelli, P.M. Rossini, op. cit., s. 114-126.

tują ścięgnię palców¹⁵. Oprócz kontroli ruchu palców i dłoni aktywatory są także używane do zapewniania sztywności stawów¹⁶.

Sztuczne mięśnie coraz częściej zastępują napędy elektryczne, pneumatyczne i hydrauliczne stosowane w protezach bionicznych. Umożliwiają one zmniejszenie ciężaru i wymiarów protezy oraz zminimalizowanie energii potrzebnej do ich poruszania i sterowania. Obecnie sztuczne mięśnie wykonane są z biomateriałów pobudzanych elektrycznie, chemicznie, termicznie, magnetycznie, optycznie, pneumatycznie lub hydraulicznie. Istnieje kilka typów produkowanych substytutów mięśni. Poniższy podział uwzględnia materiały, z których zostały one wyprodukowane. Można wyróżnić mięśnie¹⁷:

- wykonane z nanorurek węglowych wypełnionych elektrolitem,
- wykonane z kurczliwego polimeru, najczęściej z włókna poliakrylonitrylu (PAN),
- polimerowo-żelowe, z elementem kurczliwym zbudowanym z włókna polimerowego wypełnionego płynem żelowym wrażliwym na zmianę pH,
- wykonane z kompozytów polimerowo-metalowych,
- wykorzystujące efekt piezoelektryczny,
- hydrauliczne – wypełnione cieczą,
- pneumatyczne – wypełnione gazem.

Pierwsze mięśnie pneumatyczne PAM (Pneumatic Artificial Muscles) zostały wyprodukowane przez Josepha L. McKibbena w 1950 roku. Wykonano je z elastycznej i pneumatycznej membrany¹⁸.

Najnowszym osiągnięciem jest wyprodukowanie w 2006 roku przez nanotechnologów z Uniwersytetu Tekszańskiego w Dallas mięśni napędzanych wodorem i alkoholem¹⁹. Mięśnie te są około 100 razy mocniejsze od naturalnych mięśni, a dzięki zastąpieniu tradycyjnych form zasilania, jakimi są baterie, energią pochodzenia chemicznego możliwa stała się ich długotrwała i intensywna praca. Składają się one z elektrod zawierających katalizator i są zbudowane z nanorurek węglowych. Mogą przetwarzać energię chemiczną na energię elektrycz-

¹⁵ Ibidem.

¹⁶ M. Cook, J. Duncan, M. Gibbons, B. Harvey, G. Nicholson *Mechatronics Case Study: Prosthetic hand*. [Online]. Available at: http://www.surrey.ac.uk/eng/InfoPoint/online/mechatronics_case_studies/Prosthetic%20hand%20report.doc [October 27, 2010].

¹⁷ J. Kardyń, op. cit., s. 4-9.

¹⁸ F. Daerden, D. Lefeber. *Pneumatic Artificial Muscles: actuators for robotics and automation*. [Online]. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.89.6717&rep=rep1&type=pdf> [November 18, 2010].

¹⁹ *Nano Technologists Demonstrate Artificial Muscles Powered By Highly Energetic Fuels*. [Online]. Available at: <http://www.sciencedaily.com/releases/2006/03/060317110801.htm> [October 27, 2010].

ną, przechowywać ją i ostatecznie zamieniać na energię mechaniczną. Sztuczne mięśnie najczęściej umieszcza się w protezie w postaci dwóch mięśni działających przeciwnie – jest to tak zwany system BMDS (Bi-Muscular Driving System)²⁰.

W 2000 roku naukowcy z Uniwersytetu Hokkaido w Japonii przygotowali protezę, której mechanizm zmienia się w zależności od podnoszonego ciężaru, co pozwala poruszać się palcom szybciej w przypadku operowania lekkim przedmiotem²¹.

Naukowcy z Uniwersytetu w Southampton wynaleźli bioniczną rękę naśladującą ruchy naturalnego organu (każdy palec porusza się niezależnie). Proteza ta waży około 400 g²². Problem braku czucia w bionicznej ręce rozwiązali konstruktorzy *Cyberhand*, w której nerwy zostały połączone ze skomplikowanym systemem czujników dotyku i temperatury, motorów, stawów i kontrolerów²³. W 2008 roku bioniczną rękę amerykańskiej firmy Touch Bionics otrzymał Polak Marcin Kaczmarzyk. Proteza tego typu zapewnia ruch wszystkich pięciu palców oraz ma dwie powłoki imitujące skórę. Można nią podnosić ciężary do 20 kg (na każdy palec po 8 kg)²⁴.

BIONICZNA PROTEZA KOŃCZYNY DOLNEJ

Firma Bionic Technology by Ossur wprowadziła urządzenie o nazwie *Power Knee* – przeznaczone specjalnie dla sportowców – protezę, która jest kontrolowana przez sztuczną inteligencję wspomagającą naturalne chodzenie i wstawanie. Użytkownik zakłada na nogę but ze specjalną wkładką, która przesyła informacje na temat sposobu chodzenia do protezy i moduluje jej pracę w zależności od potrzeb pacjenta²⁵. Była to pierwsza na świecie proteza, która umożliwiała użytkownikowi wchodzenie po schodach²⁶. Zalety tej protezy są następujące:

- szybsze chodzenie niezwiększające zmęczenia,
- pomoc podczas chodzenia po stromych wzniesieniach,

²⁰ T. Sasaki, K. Kawashima, *Remote control of backhoe at construction site with a pneumatic robot system MYPE*, "Automation in Construction", 2008, Vol. 17, s. 907-914.

²¹ M.C. Carrozza, G. Cappiello, S. Micera, B.B. Edin, L. Beccai, C. Cipriani, *Design of a cybernetic hand for perception and action*, "Biological Cybernetics" 2006, Vol. 95, s. 629-644.

²² C.M. Light, P.H. Chappell, *Development of a lightweight and adaptable multiple-axis hand prosthesis*, "Medical Engineering & Physics" 2000, Vol. 22, s. 679-684.

²³ P. Dario, S. Micera, A. Menciassi et al., *CYBERHAND – a consortium project for enhanced control of powered artificial hands based on direct neural interfaces*, [in:] *33rd Neural Prosthesis Workshop*, Bethesda 2002.

²⁴ M. Kruczek, op. cit.

²⁵ *Prosthetic knees from Össur*. [Online]. Available at: <http://www.ossur.com> [September 10, 2010].

²⁶ *Power Knee*. [Online]. Available at: <http://www.victhom.com/en/bionic-prosthesis-orthosis/power-knee.php> [September 21, 2010].

- efektywniejsze wstawanie i siadanie na krześle,
- mniejsze urazy skóry w porównaniu z innymi protezami, naturalny chód i znaczne zmniejszenie częstości występowania bólu pleców.

Kolejnym wynalazkiem firmy Ossur jest inteligentna stopa bioniczna *PROPRIO FOOT*. Jest to elektroniczna stopa protetyczna wykonana z włókna węglowego z silownikiem zasilanym zewnętrzną baterią i kontrolowanym przez mikroprocesory. Użytkownik nie musi nieustannie sterować ustawieniem stopy względem podłoża, gdyż robi to za niego proteza. Zalety stopy widać podczas wspinania się (optymalne rozłożenie ciężaru ciała) i schodzenia (lepsza stabilizacja i ergonomia chodu). Stopa pracuje dobrze również na równym terenie, zapewniając użytkownikowi skoordynowany ruch bez wysiłku. Podczas prostego procesu kalibracji z udziałem 16 kroków urządzenie oblicza i zapamiętuje wzór chodu właściciela²⁷.

BIONICZNE UCHO

Jedno z najstarszych bionicznych uszu opracowano już w 1969 roku (William House i Jack Urban)²⁸. Jest to najbardziej udana proteza dzięki prostej budowie połączeń nerwowych. Model pozwolił uratować słuch ponad 80000 pacjentów. Proteza jest wszczepialnym implantem, przekazującym i interpretującym dźwięk z mikrofonu ukrytego za uchem na impulsy interpretowalne przez mózg²⁹. Do wszczepialnych elektronicznych protez słuchu zalicza się implanty ślimakowe, pniowe, implanty ucha środkowego oraz aparaty wszczepialne na przewodnictwo kostne. Składają się one z części wewnętrznej – odbiornika i stymulatora elektrycznego we wspólnej obudowie wraz z wiązką elektrod (implanty ślimakowe lub pniowe) bądź przetwornika elektromechanicznego (implanty ucha środkowego) – oraz z części zewnętrznej, czyli cyfrowego, wielokanałowego procesora mowy. W uszkodzeniach słuchu spowodowanych nieprawidłowym wypełnieniem przestrzeni ucha środkowego (płynem lub tkanką) stosuje się implant balonowy. Jest to zbudowany z membrany o niskiej impedancji akustycznej balon wypełniony powietrzem. Membrana zbudowana jest z takich materiałów jak: homopolimery lub kopolimer izobutylenu, polistyrenu, chlorek winylidenu, politereftalan etylenu, alkohol etylowinyłowy lub akrylonitryl. Giętka membrana może być błoną pojedyn-

²⁷ G. Toporek. *Inteligentna stopa bioniczna PROPRIO FOOT*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.inzynieria-biomedyczna.com.pl/biomechanika/136-inteligentna-stopa-bioniczna.html> [21 września 2010].

²⁸ *Bionic humans*. [Online]. Available at: http://www.copperwiki.org/index.php?title=Bionic_humans [October 27, 2010].

²⁹ *Bioniczny człowiek – spojrzenie w przyszłość*, op. cit.

czą lub wielowarstwową. W drugim przypadku tylko najbardziej zewnętrzna warstwa musi być biozgodna³⁰.

Niestety, w przypadku bionicznych protez ucha nadal istnieje szereg kwestii do rozwiązania, takich jak np. problemy ze zrozumieniem słów w głośnym środowisku czy też brak odczuwania przyjemności podczas słuchania muzyki.

BIONICZNE OKO

Trwają prace nad konstrukcją protez bionicznych oczu wykorzystujących optoelektroniczne protezy siatkówki. Proteza ta ma za zadanie stymulować komórki zdrowe, osadzone poniżej uszkodzonej warstwy fotoreceptorów. Obecnie bada się implanty zawierające około 60 elektrod, jednak jest to liczba niewystarczająca, aby móc czytać, pisać czy nawet rozpoznawać kształty.

Naukowcy z londyńskiego Moorfields Eye Hospital rozpoczęli ostatnio badania kliniczne nad implantowanym sztucznym okiem połączonym bezprzewodowo z małą, umieszczoną w okularach kamerą. Sztuczne oko *Argus II* jest dziełem amerykańskiej firmy Second Sight. Nowa technologia może przywrócić podstawowy czarno-biały poziom widzenia³¹.

ZAKOŃCZENIE

Przyszłość protez bionicznych wydaje się być obiecująca, jednak daleko jeszcze do skonstruowania protezy, która przejęłaby w pełni funkcje prawdziwej kończyny lub narządu. Ponadto, coraz więcej uwagi będzie się również poświęcać problemom etycznym. W nowoczesnej medycynie wcielającej w życie ideę protez bionicznych pojawia się wymóg konsultacji potrzeb pacjentów z inżynierami, biologami i informatykami, aby osiągnąć zamierzony rezultat. Niezbędna jest również współpraca uczelni z sektorem biznesowym, aby pomysły, które powstaną w ośrodkach akademickich, udało się wprowadzić w życie. Niewątpliwie jednak stosowane dziś rozwiązania umożliwiają osobom niepełnosprawnym prowadzenie normalnego życia.

³⁰ A. Mietła, I. Waśniowska. *Implanty ucha środkowego*. [Online]. Protokół dostępu: <http://student.agh.edu.pl/~olcia/biomaterialy/Implanty%2520ucha%2520%259crodkowego.ppt> [18 listopada 2010].

³¹ *Jesteśmy bliżej zbudowania sztucznego oka*. [Online]. Protokół dostępu: <http://artykuly.ekologia.pl/Jestesmy-blizej-zbudowania-sztucznego-oka,2520.html> [21 września 2010].

BIBLIOGRAFIA

1. *Bioniczny człowiek – spojrzenie w przyszłość*. [Online]. Protokół dostępu: http://www.eioba.pl/a72549/bioniczny_czlowiek_spojrzenie_w_przyszlosc [21 września 2010].
2. Carrozza M.C., Cappiello G., Micera S., Edin B.B., Beccai L., Cipriani C., *Design of a cybernetic hand for perception and action*, "Biological Cybernetics" 2006, Vol. 95.
3. Cook M., Duncan J., Gibbons M., Harvey B., Nicholson G. *Mechatronics Case Study: Prosthetic hand* [Online]. Available at: http://www.surrey.ac.uk/eng/InfoPoint/online/mechatronics_case_studies/Prosthetic%20hand%20report.doc [October 27, 2010].
4. Daerden F., Lefeber D. *Pneumatic Artificial Muscles: actuators for robotics and automation*. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.89.6717&rep=rep1&type=pdf> [November 18, 2010].
5. Dario P., Micera S., Menciassi A. et al., *CYBERHAND – a consortium project for enhanced control of powered artificial hands based on direct neural interfaces*, [in:] *33rd Neural Prosthesis Workshop*, Bethesda 2002.
6. Di Pino G., Guglielmelli E., Rossini P.M., *Neuroplasticity in amputees: Main implications on bidirectional interfacing of cybernetic hand prostheses*, "Progress in Neurobiology" 2009, Vol. 88.
7. Edin B.B., Ascari L., Beccai L., Roccella S., Cabibihan J.-J., Carrozza M.C., *Bio-inspired sensorization of a biomechatronic robot hand for the grasp-and-lift task*, "Brain Research Bulletin" 2008, Vol. 75.
8. Herr H., Whiteley G.P., Childress D. *Chapter 5: Cyborg Technology – Biomimetic Orthotic and Prosthetic Technology*. [Online]. Available at: <http://biomech.media.mit.edu/publications/HerrSPIETextbook.pdf> [September 21, 2010].
9. *Jesteśmy bliżej zbudowania sztucznego oka*. [Online]. Protokół dostępu: <http://artykuly.ekologia.pl/Jesteśmy-bliżej-zbudowania-sztucznego-oka,2520.html> [21 września 2010].
10. Kardyń J. *Protezy kończyn górnych*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.inzynieria-biomedyczna.com.pl/biomechanika/97-protezy-konczyn-gornych.html> [21 września 2010].
11. Kruczek M. *Pierwszy Polak z bioniczną dłonią*. [Online]. Protokół dostępu: http://wyborcza.pl/1,75476,5677333,Pierwszy_Polak_z_bioniczna_dlonia.html [10 września 2010].
12. Light C.M., Chappell P.H., *Development of a lightweight and adaptable multiple-axis hand prosthesis*, "Medical Engineering & Physics" 2000, Vol. 22.
13. Mietła A., Waśniowska I. *Implanty ucha środkowego*. [Online] Protokół dostępu: <http://student.agh.edu.pl/~olcia/biomaterialy/Implanty%2520ucha%2520%259crodkowego.ppt> [18 listopada 2010].
14. *Nano Technologists Demonstrate Artificial Muscles Powered By Highly Energetic Fuels*. [Online]. Available at: <http://www.sciencedaily.com/releases/2006/03/060317110801.htm> [October 27, 2010].
15. Pasquina P.F., Bryant P.R., Huang M.E., Roberts T.L., Nelson V.S., Flood K.M., *Limb Deficiency And Prosthetic Management: Focused Review*, [in:] *Advances in Amputee Care*, "Archives of Physical Medicine and Rehabilitation" 2006, Vol. 87, Issue 3.
16. *Power Knee*. [Online]. Available at: <http://www.victhom.com/en/bionic-prosthesis-orthosis/power-knee.php> [September 21, 2010].
17. *Prosthetic knees from Össur*. [Online] Available at: <http://www.ossur.com> [September 10, 2010].

18. Sasaki T., Kawashima K., *Remote control of backhoe at construction site with a pneumatic robot system MYPE*, "Automation in Construction" 2008, Vol. 17.
19. Toporek G. *Inteligentna stopa bioniczna PROPRIO FOOT*. [Online]. Protokół dostępu: <http://www.inzynieria-biomedyczna.com.pl/biomechanika/136-inteligentna-stopa-bioniczna.html> [21 września 2010].

INFORMACJE O AUTORACH

RITA BŁOCIŃSKA – studiowała w Katedrze Rozrodu Zwierząt na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Obecnie doktorantka w Katedrze Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowania badawcze: molekularne mechanizmy folikulogenezy i steroidogenezy jajnikowej oraz cykl estralny u świń, ekspresja receptorów gonadotropowych w tkance jajnikowej, zespół policystycznych jajników.

MAGDALENA HUBALEWSKA-MAZGAJ – absolwentka Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Obecnie doktorantka na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum UJ (II Katedra Chorób Wewnętrznych UJCM w Krakowie). Zainteresowania badawcze: nosicielstwo EBV u ludzi dorosłych oznaczane metodą ilościową, wpływ przetrwałych zakażeń rynowirusowych na metabolizm eikozanoidów u chorych na astmę oskrzelową oraz detekcja rynowirusów w materiale klinicznym.

GRAŻYNA BOCHENEK – doc. dr hab. nauk medycznych, adiunkt Kliniki Pulmonologii, kierownik Pracowni Badań Czynnościowych Płuc na Oddziale Pulmonologicznym I i II, II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, członkini Polskiego Towarzystwa Zwalczenia Chorób Alergicznych. Zainteresowania badawcze: patogeneza i diagnostyka astmy z nadwrażliwością na aspirynę, testy nadreaktywności oskrzeli, patogeneza i leczenie astmy ciężkiej i trudnej.

GRAŻYNA PULKA – doktor nauk medycznych, alergolog, II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowania badawcze: odczulanie na jad owadów błonkoskrzydłych, astma oskrzelowa.

MAREK SANAK – profesor UJ, Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej UJ CM, specjalista chorób dzieci i genetyki klinicznej. Od 15 lat zajmuje się badaniami nad podatnością genetyczną w astmie i chorobach układu krążenia, wpływem oddziaływania środowiska na ekspresję genów i poziom mediatorów uczestniczących w mechanizmach zapalenia. Zajmuje się diagnostyką genetyczną zakrzepicy, hemochromatozy i niedoboru alfa1-antytrypsyny.

BARTŁOMIEJ MATEJKO – mgr inż. biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, student IV roku inżynierii biomedycznej Międzywydziałowej Szkoły Inżynierii Biomedycznej AGH, doktorant Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ (Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych). Zainteresowania badawcze: zastosowanie nowoczesnych technologii w medycynie, w szczególności w leczeniu cukrzycy.

JOANNA GŁADYSZ – studentka Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH oraz Międzywydziałowej Szkoły Inżynierii Biomedycznej AGH. Zainteresowania badawcze: aparatura medyczna oraz wykorzystanie metod analizy pierwiastkowej.

