



Journal of Health Study  
and Medicine

**2016, nr 4**

Redaktor naczelny / Editor in chief  
prof. dr hab. Adam Jaworski

Skład / Adjustment, Typesetting  
Witold Kowalczyk

CC-BY-SA 3.0PL

ISSN 2451-1471

ul. Kilińskiego 109  
90-011 Łódź  
tel./fax: (042) 676 25 29 wew. 339  
e-mail: wydawnictwo@spoleczna.pl

Wersja elektroniczna publikacji jest wersją podstawową, dostępną na stronie:  
[jhsm.san.edu.pl](http://jhsm.san.edu.pl)  
E-version is the original version of the article, available:  
[jhsm.san.edu.pl](http://jhsm.san.edu.pl)

Artykuły recenzowane / All the articles published are subject to reviews.

- 5 **Malwina Radwańska, Zygmunt Derewenda** | *The deadly octet: the structure and function of the Ebola virus proteins*
- 37 **Adam Jaworski, Katarzyna Dudek, Ireneusz Jurczak** | *Struktura i rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka w zdrowiu i w chorobie*
- 63 **Wiesław Barabasz, Anna Pikulicka** | *Syntetyczna biologia od bakteriofaga lambda do syntetycznej bakterii Synthia (*Mycoplasma laboratorium*)*
- 85 **Katarzyna Malinowska, Agnieszka Bocian, Roman Modranka, Ireneusz Majsterek** | *Nutrition of elderly people diagnosed with type 2*
- 99 **Joanna Sułkowska** | *The genesis and development of the Lodz otolaryngology*
- 111 **Ewa Lasota, Sebastian Marszałek** | *Neurobehavioral consequences of cerebral stroke and its influence on rehabilitation*





## The deadly octet: the structure and function of the Ebola virus proteins

Malwina Radwańska<sup>1,2</sup>, Zygmunt Derewenda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia  
School of Medicine, Charlottesville, VA 22908-0736, USA

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Technology, Wrocław

### Abstract

The Ebola hemorrhagic fever epidemic of 2014 is a powerful reminder of the threats posed by viral diseases, as their geographical range and reservoirs are altered by global warming and other factors. Viruses contain very small genomes, encoding only few proteins in the simplest viruses (eight in the case of the Ebola virus), but the multifunctionality of these proteins ensures that the virus can accomplish a multitude of biological functions, including cell entry, membrane fusion, replication, suppression of immune response, packaging of new virions and exit from the cell. In this short review we summarize the recent progress in the understanding of how the eight proteins encoded by the Ebola RNA accomplish these specific functions at the structural level.

### Key words

ebola virus, hemorrhagic fever, protein structure, macromolecular crystallography, structural biology

## Introduction

The Ebola virus (EBOV) causes a horrifying hemorrhagic fever in humans and other primates with fatality rate up to 90% [1]. It was first described in 1976 as a distant cousin of the Marburg virus (MARV) [2], although it has been hypothesized that an outbreak occurred in Athens in 430 BC [3]. In spite of the fact that EBOV is very dangerous, there was only a relatively modest effort over the past decades to elucidate its biology and to design therapeutics or vaccines. This situation was rationalized by the fact that EBOV caused only sporadic and relatively limited epidemics during the last few decades, and all were endemic to some of the poorest countries in the world, in Central and Eastern Africa. Consequently, there was no financial incentive for pharmaceutical companies to develop treatments and vaccines in the absence of a significant market [4]. The perception of EBOV as a limited and endemic threat changed dramatically in early 2014 with the West African outbreak of the disease, notably when a small number of infected individuals traveled to western countries, including the USA, spreading panic [5]. These few cases were prominently featured in the media, overshadowing the real epidemic and the fact that a record 29,000 cases were reported at the end of the outbreak in Africa, with more than 11,000 deaths [6]. The hitherto unanticipated threat to the Western countries stimulated a surge in research and funding opportunities and rapid progress was achieved in the characterization of the virus and its components, in the design of therapeutic antibodies [7] and – most recently – introduction of an effective vaccine [8]. The search for drugs able to deal with the virus after infection is still ongoing.

EBOV has a cylindrical or tubular-shaped, non-segmented morphology, characteristic of all members of *Filoviridae* family [9]. There are five known strains Zaire, Sudan, Taï Forest, Bundibugyo and Reston [10]. EBOV is a single-strand RNA (ssRNA) virus, containing a non-coding (negative) strand, ~19 kB in size. The virus is covered by a lipid envelope with protruding spikes on the surface, as visualized by electron microscopy. The ssRNA is packaged inside the envelope within a helical nucleocapsid, made up of proteins and ssRNA [11].

The life cycle of the EBOV is reasonably well understood. Fruit bats are thought to serve as the primary reservoir for the virus across all tropical areas of the world [12]. They are not harmed by the virus. EBOV also infects other animal species, although the details are still scarce. Eating

bush meat – including bats – is thought to be the principal mechanism for infection of humans [13], with subsequent epidemics resulting from contact with bodily fluids of the infected or dead individuals. Once inside the human body, EBOV targets specific cells, including those in the liver and immune system, as well as endothelial cells. Relatively non-specific receptors on those cells recognize and bind either carbohydrates which decorate the viral surface, or PtdSer (phosphatidylserine) which is an element of the viral envelope [14]. The adherence to cell surface triggers internalization of virus particles through the process of macropinocytosis, as well as clathrin-dependent endocytosis [15]. Once the virus reaches endosomes, it undergoes complex proteolysis of the surface glycoprotein, its membrane fuses with that of the attacked cell and the contents enter the cytoplasm. The replication process involves the synthesis of the positive strand of RNA which serves as a template for new RNA genomes [16]. During transcription, the negative RNA strand is transcribed into seven monocistronic mRNAs, corresponding to the seven genes encoded by the RNA, each capped and polyadenylated. The viral proteins are synthesized by hijacking the ribosome machinery of the infected cells, and accomplish their diverse biological functions owing to exceptional multifunctionality. They are responsible for invasion, membrane fusion, suppression and evasion of the immune response, transcription, replication and packaging of new virions, and exiting the cell. This process is so effective, that a healthy man infected with a single virus can die as a result of internal hemorrhage within 6-16 days of developing symptoms, typically no more than 21 days after infection. At death, the viral titers in blood (viremia) may exceed  $10^9$  copies per ml [17].

This short review summarizes the most important aspects of the recent progress achieved towards the understanding of the structure-function relationships among the proteins encoded by the EBOV viral RNA. Space constraints preclude a fully comprehensive presentation, and our review is by necessity limited to only a fraction of the available material; we apologize for omissions. We start with an overview of the biological functions served by the protein products of the seven EBOV genes.

### **The biological functions of the EBOV proteins.**

The order of the seven genes in the EBOV ssRNA is as follows: NP – VP35 – VP40 – GP – VP30 – VP24 – L (with the exceptions of NP, GP and L, the

genes are denoted as **V**iral **P**rotein (VP) and followed by a number indicating molecular weight) (Fig. 1). Once the virions are packaged, multiple copies of seven of the proteins are included, each found in a distinct location. These proteins are known as 'structural proteins' as they are part of the virus particle. The eighth protein, an alternate product of the GP gene, is secreted by infected cells and not found within the virus; it is the only non-structural protein.

The **glycoprotein (GP)** is the only exposed protein on the viral surface, visible in electron micrographs as 7-10 nm long spikes spaced at approximately 10 nm, and protruding from the lipid bilayer [18]. It mediates attachment to specific cell receptors, and enables the virus to enter the cell through endocytosis into macropinosomes. Interestingly, this is the only gene that has two alternate transcripts; the second transcript leads to the expression of the **soluble GP (sGP)**, the secreted, and non-structural protein [19]. The abundance of this protein, which is similar to GP, confuses the immune responses of the host and acts as a decoy protecting the virus [20].

**VP40** is a matrix protein, linking the inside layer of the membrane with the nucleocapsid, and is one of the most versatile protein in the EBOV proteome. Aside from its structural function, it plays a role in the regulation of transcription, morphogenesis of the virus, as well as packaging and budding of mature virions. It is also implicated in suppression of RNA silencing, although the mechanism is not clear [21].

The remaining 'structural proteins', i.e. nucleoprotein (**NP**), **VP35**, **VP40**, **VP30** and **VP24**, along with the viral **L (large) polymerase**, are contained within the nucleocapsid which also contains helically packaged ssRNA. The regular structure of the nucleocapsid has been elucidated by 3D sub-tomographic analysis [11]. There are nearly equimolar amounts of the VP24, VP30, VP35 and NP proteins in the nucleocapsid. There is evidence that VP24 as well as VP35 interact with NP, and all three proteins are necessary for the formation of the nucleocapsid [11]. The key protein for RNA packaging is the nucleoprotein (NP) [22]. **VP30** protein is a transcription activator, which plays an important role in the virus replication process [23]. In contrast, both **VP24** and **VP35** are intimately involved in blocking the host's interferon-mediated immune response, through several diverse and complementary mechanisms. VP35 inhibits induction of the  $\alpha$  and  $\beta$  interferons by blocking phosphorylation and activation of the



interferon regulatory factor 3 (IRF3), a transcription factor which regulates interferon synthesis [24]. Moreover, VP35 also interferes with the activity of the RIG-I like receptors (retinoic acid inducible gene I receptors), which under normal conditions detect viral RNA during infection and replication, and initiate interferon response [25]. Another immune response pathway blocked by VP35 is mediated by the EIF2AK2/PKR kinase (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2/protein kinase R) [26]. Finally, VP 35 is also a cofactor of the L polymerase, and thus plays a role in transcription and replication [27]. The complementary and independent action of VP24 is to block the already existing interferon response, by binding to karyopherin  $\alpha$ , a nuclear transporter protein, which – when activated by interferon – carries thetyrosine-phosphorylated transcription factor STAT1 (PY-STAT1) to the nucleus, and thus stops the immune response downstream of interferon [28].

Last, but not least, the EBOV ssRNA encodes an RNA dependent **RNA polymerase**, or the **L protein** [29]. The enzyme is multifunctional, with RNA-directed RNA polymerase, mRNA guanylyl transferase, mRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase and poly(A) synthetase activities. It functions either as transcriptase, generating the mRNAs required for protein production, or as replicase, copying the template positive strands into negative strands of RNA. The transcriptase synthesizes subgenomic RNAs, assuring their capping and polyadenylation. The replicase mode is switched on at a particular intracellular concentration of NP. In this mode, the L polymerase replicates the whole viral genome without recognizing the transcriptional signals.

### Structure and mechanism of the EBOV proteins

How are the eight EBOV proteins able to accomplish all their deadly functions? Many of the answers can be deduced from the molecular structures of the proteins, and the structures of their complexes with viral and host partner proteins, and with RNA. We will now review the current state of knowledge of the structural biology of EBOV proteins, mostly derived from X-ray crystallographic studies. Much of the information is very recent, emerging after the 2014 outbreak.

**The EBOV glycoprotein (GP).** GP is a 676-residue class I membrane glycoprotein responsible for viral entry into the cell and fusion with the host

membrane (Fig. 2A). It is not a product of direct transcript of the GP gene; instead, the corresponding mRNA results when the L polymerase stutters on a specific sequence, adding one more adenine and extending the open reading frame past the first 295 residues (there is also a third product, the small soluble GP, which, for lack of space, we do not describe further) [30].

GP is arguably the most complex of all the EBOV proteins. It is expressed in infected cells as a precursor polypeptide (GP0) (Fig. 2B), which is then cleaved by the human furin endoprotease into two disulfide-linked chains: the receptor binding subunit, GP1, residues 1-501 (~130 kDa, when fully-glycosylated) and the fusion subunit GP2, residues 502-676 (~20 kDa, non-glycosylated) (Fig 2A). In the maturing EBOV particles the GP1/2 forms trimers inserted into the membrane; these are the spikes visible in electron micrograph on the viral surface (Fig 2 E-F). The first insight into the atomic structure of this ensemble came from the crystal structure of GP1/2 bound to a Fab fragment of a human antibody, elucidated by X-ray crystallography to a resolution of 3.4 Å [18] (the GP1 in this study was modified to remove the mucin-like domain, MLD, which is heavily glycosylated and interferes with crystallization, as well as the trans membrane helical anchor). Further studies using cryo-electron tomography provided information about the localization of the MLD in the full-length protein [31]. More recently, the structure of the intact sGP dimer in complex with two Fab variable antibody domains were characterized by single-particle cryo-EM methods at 5.5Å resolution (Fig. 2D) [32]. Moreover, these studies revealed the precise domain architecture of the surface glycoprotein spikes and rationalized some of the functions. The biological GP1/2 trimer assumes a chalice-like shape with GP2 serving as the base and GP1 as the cup (Fig 2F). GP2 contains the fusion loop (IFL) which is critical for viral entry into the cytoplasm (see below), but remains hidden on the surface of a free virus; and the C-terminal helical fragment which serves as an anchor in the viral membrane. The GP1 is made up of four distinct domains (Fig. 2A): the globular base, the receptor-binding domain (RBD), the glycan cap and the MLD which is partly disordered and heavily modified by O- and N-linked glycosylation. In contrast, the glycan cap is more structured than MLD, and contains four N-linked glycosylation sites. MLD domains are located at the apex of the GP spikes, and are associated with multiple functions including enhance-

ment of viral attachment to host cell surfaces and protection of GP protein regions from antibody recognition.

After the uptake of the virus into macropinosomes and subsequent transport into endosomes, GP1 undergoes another proteolytic cleavage by the cathepsins B and L proteases (catB/catL). The cleavage site removes the glycan cap as well as the MLD, generating a fusion-competent trimer of heterodimers: the ~19 kDa N-terminal fragment of GP1 and intact GP2 (GPCL). The structure of the GPCL has been recently visualized by X-ray crystallography at 3.3 Å resolution (Fig. 2F) [33]. Proteolysis has no significant impact on the structure of GPCL compared to the pre-cleavage ensemble, but importantly it uncovers a unique binding site in GP1 RBD which allows for recognition of the host endosomal receptor, the Niemann-Pick C1 (NPC1) [34, 35]. Very recently, a single-particle cryo-EM study visualized the molecular basis of the interaction of the GPCL with NPC1 at 6.6 Å resolution [36]. The same study showed that the affinity of GP<sub>CL</sub> for NPC1 is greatly enhanced at pH 6.0 compared to pH 7.5, which explains the binding in the acidic environment of the endosomes [36]. Further atomic details of the interaction were visualized by the crystal structure of GP<sub>CL</sub> bound to the isolated C-domain of NPC1 at 2.3 Å resolution (Fig. 2C) [37]. Following the binding of GPCL to NPC1, the GP2 subunit undergoes a conformational change, leading to exposure of the internal fusion loop (IFL). The loop has an architecture of an anti-parallel,  $\beta$ -stranded scaffold with a centrally located ensemble of hydrophobic residues (Leu529, Trp531, Ile532, Pro533, Tyr534, and Phe535). Studies using nuclear magnetic resonance (NMR) revealed that at low pH (i.e. in endosomes) the fusion loop adopts a conformation in which the above residues become exposed and form a hydrophobic 'fist' that facilitates penetration into the membrane [38, 39]. This event, in turn, initiates fusion of the host and viral membranes, which is catalyzed by the energetically and low-pH favored conformational rearrangement of two  $\alpha$ -helical structural elements of GP2. These helices from the three GP2 units in the trimer come together to form  $6$ -helix bundle stabilized at low pH, overcoming the kinetic energy barrier of fusion of two membranes; with fusion completed, the contents of the viral particle enter the cell cytosol [38, 39].

**The EBOV Matrix Protein (VP40).** This is the most abundant protein in EBOV particles, playing a complex role in assembly and budding of

the virus-like particles (VLPs) from the cell membrane [40]. Like other viral matrix proteins, VP40 provides a link between the lipid membrane and the nucleocapsid core, having the capability to associate with both. This protein does not undergo any proteolytic conversion, but instead is characterized by unique conformational malleability, a prerequisite for formation of diverse oligomeric structures that underlie the protein's multifunctionality [41]. The VP40 is synthesized as a 326 residue long monomer, composed of two loosely associated globular domains (N- and C-terminal domains, i.e. NTD and CTD, respectively) joined by a short flexible linker (Fig. 3A). Both are involved in trafficking to and interactions with membranes [42]. At the very N-terminus, VP40 contains a disordered stretch of ~40 amino acids that contain a PPXY motif and a PTAP motif [43]. Initially, it has been thought that VP40 exists as a monomer in solution, as suggested by the first determined crystal structure [44]. More recent studies generated compelling evidence that the protein is dimeric, and this association is mediated by the NTD (Fig. 3B) [41, 45]. The dimeric structure is required for trafficking of VP40 to the cell membrane. There are two structural features on CTD which are important for association with membrane and subsequent conformational changes that drive VP40 oligomerization. One is the hydrophobic loop composed of Ile293, Leu295 and Val298 residues, which was shown not only to bind to, but actually penetrate the plasma membrane, assisting in the localization of VP40 to the membrane, release of VLPs and exit of viral particle [46]. The other element includes a conserved basic patch (Lys274 and Lys275), located within a disordered loop at the opposite site of the CTD, also shown to mediate VLPs release [41]. In addition, CTD also promotes trafficking of VP40, owing to its interactions with the Sec24C protein, a member of the coat protein complex II (COPII) associated with vesicular transport system [47].

Upon interaction with the membrane VP40 undergoes conformational change resulting in spatial displacement of NTD from CTD, made possible owing to the flexibility of the linker [48]. This leads to the oligomerization of VP40 and formation of linear hexamers. The crystal structure of VP40 hexamer revealed the oligomerization core made up of NTDs derived from four central protomers, flanked by remaining two protomers (Fig. 3C) [41]. At this point, conformational changes trigger displacement of four CTDs from central core in opposing directions (two are

upwards and two are downwards). The VP40 hexamers may further associate through their CTDs, forming long, interrupted filaments [41].

To add to the complexity of the VP40 oligomerization pattern, it was also shown that the protein may octamerize into a ring with RNA-binding properties, notably through the NTD domains (Fig. 3D). This was initially visualized in a crystal structure of an octameric ring of isolated NTD domains with bound RNA trinucleotide [49]. Interestingly, RNA does not appear to be required for this assembly, as evidenced by the latest structure of RNA-free ring of isolated NTDs. The formation of the ring is made possible through a conformational change that involves the displacement of N-terminal 69 residues from dimeric interface, which in turn exposes the RNA-binding site. In this context, RNA plays a critical role in separation of the CTD from NTD that triggers octamerization, but not in the ring assembly itself. The VP40 ring has a role in regulation of viral transcription inside infected cells and this function is dependent on its RNA-binding capability [41].

Finally, VP40 is also known to interact with selected cellular proteins. Two of them, Nedd4 (ubiquitin ligase) and Tsg101 (a regulator of vesicular trafficking), have been found to bind the sequence elements in the N-terminal motif, i.e. PPXY and PT/SAP, respectively [50]. These interactions indicate a complex way in which the budding and exit of EBOV from the cell are regulated. There is currently no structural information about the underlying mechanisms.

**The EBOV nucleoprotein (NP).** NP is a large protein (739 residues) which is critical for ssRNA packaging. Together, NP, VP24 and VP35 are sufficient for the formation of nucleocapsids that are morphologically identical to those formed in infected cells [22]. On the other hand, a complex of ssRNA, NP, VP30 VP35 and the L polymerase constitutes the polymerase complex, sufficient for replication and transcription of the viral RNA.

NP contains two distinct globular domains (Fig. 4A) [22, 51] and is subject to post-translational modifications, i.e. O-glycosylation and sialylation [22]. Significant information has emerged recently about the molecular structures of the two globular moieties within the NP. The isolated RNA-packaging N-terminal domain has been crystallized and the structure was solved at 1.8 Å resolution [52]. The domain shows a dumbbell like structure with the N- and C-terminal lobes separated by a positive-

ly-charged groove that is presumed to constitute the RNA binding site, where the protein binds the phosphate backbone of the helical RNA [52]. However, to date there is no detailed structure known of any complex of EBOV NP with RNA. The independently determined structure of a similar NTD construct in complex with a peptide derived from VP35 (residues 20-48), showed how the latter occludes a large portion of the RNA-binding surface, and prevents newly synthesized NP in the cell from interactions with non-cognate RNA (Fig. 4B) [53]. This explains the regulatory function of the VP35 protein at the molecular level and hints at the possible way the proteins are associated in the replication complex.

The smaller, C-terminal fragment of the EBOV NP is a major antigenic determinant, raising the possibility that it could be effective in virus detection and diagnostics [54]. The isolated C-terminal domain from several strains has been crystallized and the structures were solved at high-resolution (Fig. 4C) [55, 56]. These studies revealed a new fold, hitherto unseen in any protein, although the structure itself did not hint at specific functional properties.

The two globular domains of NP are joined by a disordered and highly flexible linker that endows the protein with plasticity, and serves as an attachment point for other protein. We will discuss this in the section focusing on VP30. The interactions with both VP35 and VP30 point to NP as providing a scaffold for the assembly of the replication complex.

Finally, there is the question of possible interactions of NP with cellular proteins. A recent study of the cellular interactome of EBOV NP strongly hints at a chaperone HSP70, as a protein that modulates stability and NP may assist it in its physiological functions [57]. The structural basis of this interaction are not known.

**The EBOV VP30.** This protein is made up of 288 amino acids, and – like VP40 – has the ability to form oligomers. It contains several motifs important for its physiological function, including a Zn-finger domain (the site for binding  $Zn^{2+}$  ions, essential for the interaction with RNA [58]), a hexamerization domain and a unique, globular C-terminal domain (CTD) which forms a tight dimer in isolation (Fig. 5A). The domain, encompassing residues 114-265, was crystallized and the structure was determined at 2.0 Å resolution [59]. The domain contains a core of six  $\alpha$ -helices; there is an additional, seventh helix which crosses over and ‘embraces’

the second domain in the dimer, ensuring a large interface between monomers (Fig. 5B). Recent studies revealed how this protein is anchored to the nucleocapsid through an interaction with NP, and specifically with a Pro-rich peptide which resides within the linker between the two NP domains [60]. The structures of the Zaire and Sudan VP30 with a bound peptide (residues 602-614) from the NP protein were recently published, and show how the NP peptide is bound within a long, shallow cavity on the face of the monomer distal to the homodimeric interface. The integrity of this interaction was shown to be critical to the regulation of the viral RNA synthesis.

At this moment there is no other structural information about VP30 and in particular there is no structural data on the interaction with viral RNA, except for experimental evidence that a basic sequence residing between residues 26 and 40 is involved in addition to the Zn-finger motif [58]. The interaction between VP30 and RNA is necessary for the activation of transcription [23, 61].

**The VP24.** This is the smallest product of EBOV genome, comprised of 251 residues, folded into a single globular domain (Fig. 6A). Significant information has recently emerged about the structure of VP24 and the structural basis of its interaction with karyopherin- $\alpha$  (KPNA), an interesting protein containing so-called armadillo repeats. Crystal structures of Sudan and Reston VP24 protein revealed a compact, single  $\alpha/\beta$  domain architecture, which is characterized by a unique pyramidal fold (Fig. 6B). There are three distinct faces of this triangular molecular pyramid. The top of the pyramid is made up of several  $\alpha$ -helices and a small, three-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet, encircled by the N-terminus, while the interior contains a five-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet, resting on several more  $\alpha$ -helices that make up the bottom. One of the faces with a distinct hydrophobic characteristics mediates an intimate interaction with the KPNA, as visualized by a crystal structure of the complex of VP24 with the C-terminal domain of KPNA (containing the armadillo repeats 8-10) at 3.15 Å resolution (Fig. 6C) [62]. The consequence of this interaction is that a unique, non-classical nuclear localization signal (ncNLS) binding site, necessary to anchor PY-STAT1 to KPNA, is blocked. Thus, KPNA is rendered incapable of transporting the latter transcription factor to the nucleus, and this stops the signaling pathway that is activated by interferon.

VP24 is also known as the secondary matrix protein, as some of its functions tend to overlap with that of VP40, i.e. it is essential for virion assembly and budding, and has the ability to associate strongly with lipid bilayers. Also, the interaction of VP24 and NP, not yet characterized, is considered to be an important factor in the assembly and function of the viral ribonucleoprotein complex (RNP) in addition to its likely association with membranes. The structural basis for these phenomena is not understood.

**The VP35.** Like VP24, VP35 is the key player in the suppression of the interferon-mediated immune defenses, through a number of mechanisms (see above). VP35 is a 340-residue long protein with three distinct elements: a nucleoprotein targeting N-terminal peptide, a coiled-coil motif responsible for the oligomerization of the protein, and the C-terminal globular domain, responsible for the interferon inhibition, through interaction with dsRNA (double-stranded RNA) (Fig. 7A). Although no structure of the coiled-coil domain from the EBOV VP35 is available, two crystal structures of this domain from the Marburg virus protein have been recently deposited in the Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) (5TOH, 5TOI), although no publication has yet appeared. The structures show a trimeric parallel architecture, as expected from the earlier studies, and explain how the protein oligomerizes. The crystal structure of the C-terminal domain (residues 221-34) has been characterized for the Zaire VP35 [63]. The domain is organized into two modules, or sub-domains, i.e. a four-helix bundle at the N-terminus and a five-stranded  $\beta$ -sheet at the C-terminus. This is a unique, hitherto unseen fold for an RNA binding protein. Importantly, this structure revealed a cluster of basic residues with Arg312, known to be critical for the dsRNA binding. The crystal structure of the complex of two of these domains with an 8-base-pair dsRNA, determined at 2.0 Å resolution, shows exactly how the protein coats the dsRNA, to prevent its recognition by the host proteins (Fig. 7B) [64]. Specifically, one domain binds to the dsRNA backbone through the basic patch, which the other coats the blunt-end of RNA with a hydrophobic patch on its surface (Fig. 7C). The mutual disposition of the two domains is stabilized by a direct interaction between them, involving several conserved polar residues (Fig. 7D).

VP35 also plays a structural role in the assembly of the nucleocapsid through its N-terminal peptide, which binds with high affinity to the N-



-terminal domain of NP [53]. This interaction regulates NP assembly and viral genome binding, as in the absence of VP35 NP undergoes self-assembly.

**The L polymerase.** At the time of the writing of this review, the structure of the L protein, RNA-dependent RNA polymerase from the Ebola virus is still unknown.

### Conclusion

The new wealth of structural information regarding the Ebola virus proteins paves the way for the future development of small molecule drugs that could provide effective antiviral remedies, complementing the vaccines and therapeutic antibodies. The so-called structure-based drug design depends on the availability of high resolution structures of target proteins in the search of small molecules that bind to specific pockets on the surface, inhibiting the function. Many such efforts are underway, targeting a number of viral proteins, including GP [65, 66], VP35 [67] and VP40 [68].

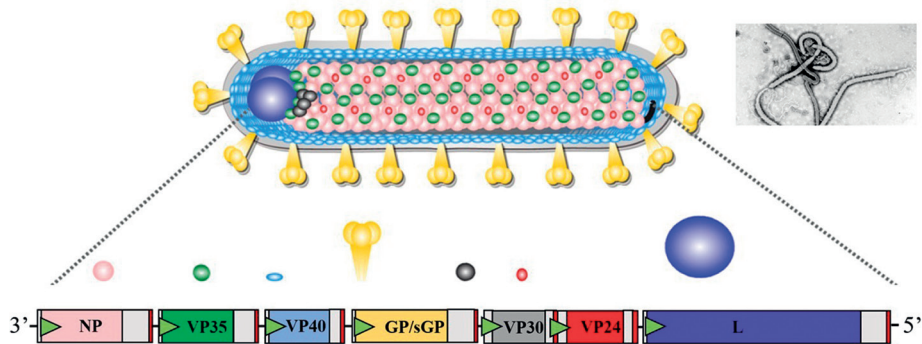


Figure 1. Ebola virus structure and genome organization.

Schematic representation of the Ebola virus and its ssRNA genome with the map of the genes (based on reference [69]). An electron micrograph of the virus is in the upper right corner (reproduced from <http://www.ebolavirusnet.com/ebola-virus.html> with permission). The colors of the open reading frames correspond to the colors used to depict the viral proteins in the diagram. Untranslated regions of the given genes are represented as grey boxes. Transcription start signals are shown as green triangles, while red bars indicate transcription stop signals.

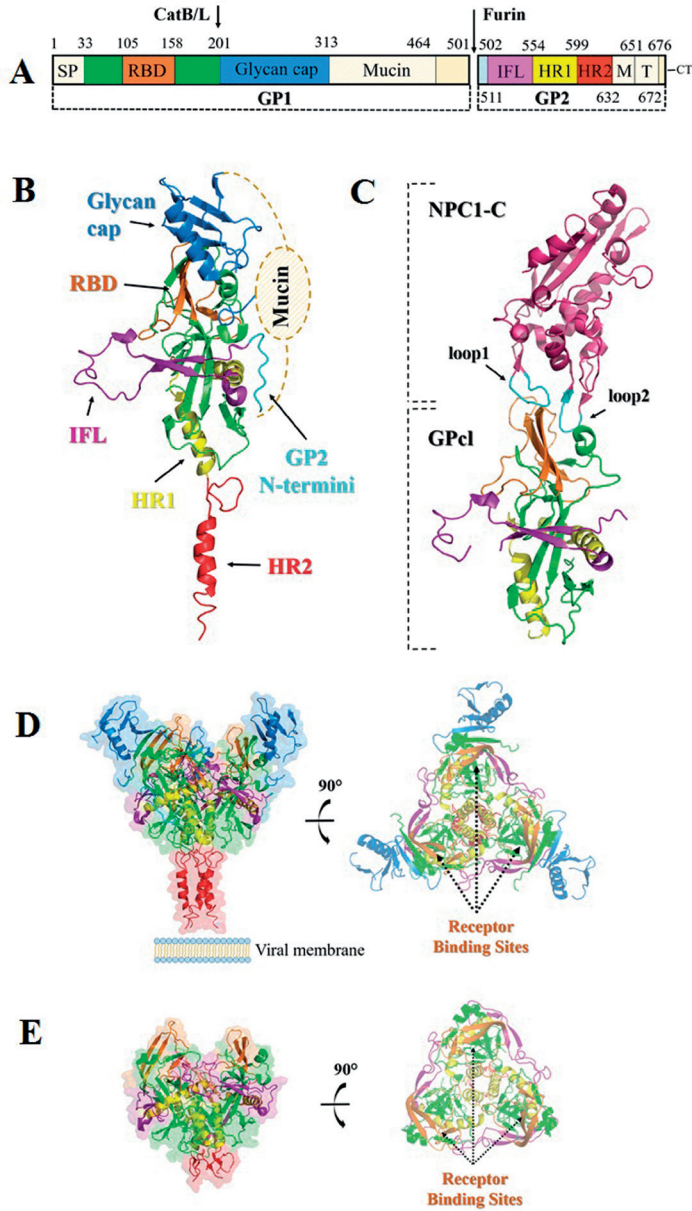


Figure 2. The structure of the EBOV glycoprotein GP

(A) Domain structure of EBOV GP (adapted from reference [31]). Wheat and white regions correspond to disordered or construct-deleted regions respectively. Arrows indicate cleavage sites for furin and cathepsin B/L. Disulfide bonds and glycosylation sites are

omitted for clarity. SP – signal peptide, RBD – receptor binding domain, Mucin – Mucin-like domain (further denoted as MLD); IFL – internal fusion loop, HR1 – first heptad repeat, HR2 – second heptad repeat, M – membrane – proximal external region, T – transmembrane domain, CT – cytoplasmic tail.

(B) Cartoon representation of Zaire EBOV GP<sub>ΔMLDΔTM</sub> GP0 monomer (PDB entry 5JQ3). The structural elements are colored accordingly to the domain scheme in A. Yellow oval corresponds to the mucin domain which was removed in the construct used for crystallization purposes.

(C) The structure of NPC1-C bound to Zaire EBOV GPcl (PDB entry 5F1B). The NPC1-C (colored in raspberry) binds to the RBD of GPcl at a perpendicular angle through its two protruding loops colored in cyan. Structural elements of GPcl are colored as in (B).

(D) Cryo-EM structure of Zaire EBOV sGP dimer in complex with c13C6 and BDBV91 Fabs (PDB entry 5KEM). sGP dimer (sGPA, sGPB) is colored as in (B) with C13C6 Fab in grey and BDBV91 Fab in brown. There are two copies of each Fab bound to the sGP dimer.

(E) Cartoon representation of the biological trimer of Zaire EBOV GP1/2 heterodimers (PDB entry 5JQ3) viewed perpendicular to the threefold axis (left) with a semitransparent surface, and with semitransparent rendering along (right) the threefold axis, towards the viral membrane. The structural elements are colored as in (B). Arrows indicate receptor binding sites.

(F) Receptor binding-competent conformation of Zaire EBOV GPcl (PDB entry 5HJ3) modeled in the same way as (E).

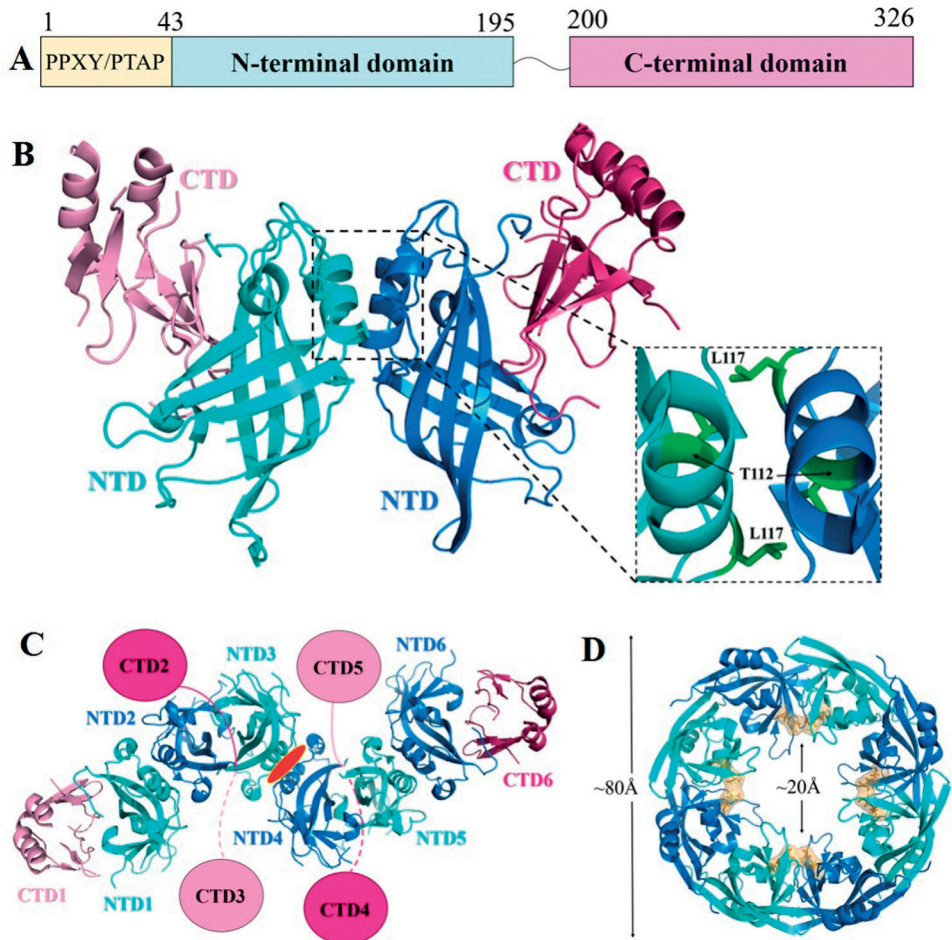


Figure 3. The structure of VP40.

(A) Schematic representation of the EBOV VP40 domain structure showing also the N-terminal stretch of 43 residues containing PPXY/PTAP motifs (yellow) as well as the NTD (cyan) and CTD (pink). Waved line indicates the disordered flexible linker connecting NTD and CTD.

(B) Crystal structure of dimeric Zaire EBOV VP40 $\Delta$ N showing NTD-to-NTD interface (PDB entry 4LDB). NTDs from each protomer are colored cyan or blue and the CTDs colored light pink or raspberry. A dashed box shows close-up view of the dimeric interface, centered on Thr112 and Leu117 residues (green). The construct used for crystallization lacks the first 43 N-terminal residues.

(C) Crystal structure of Zaire EBOV VP40 $\Delta$ N hexamer displayed with the NTDs altered.

nating in colors (cyan or blue) and the CTDs alternate in pink or raspberry (PDB entry 4LDD) and oligomerization interface centered on Trp95 residue (red oval). The NTDs and CTDs are numbered corresponding to the protomer from which they derive. The displaced CTDs are showed as circles (to scale).

(D) Crystal structure of RNA-free Zaire EBOV VP40 octameric ring (PDB entry 4LDM) with NTD protomers colored in alternating cyan and blue. Residue Arg134 is depicted by orange sticks with semitransparent surface.

CC-BY-SA 3.0

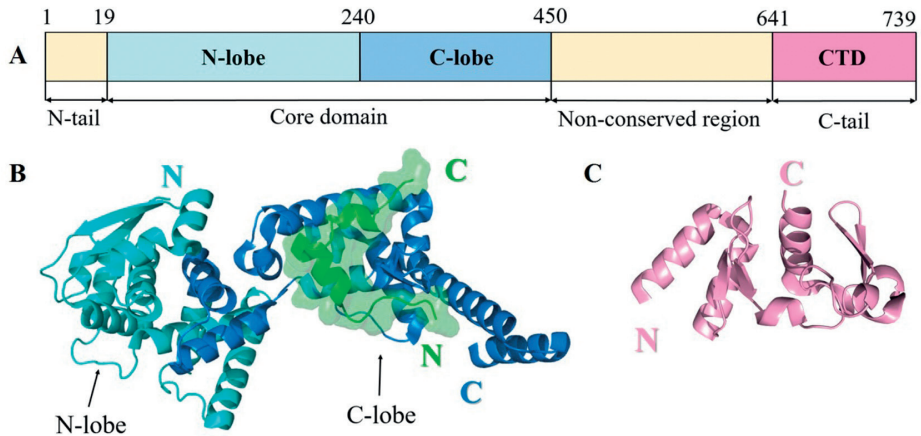


Figure 4. The structure of NP.

(A) Domain architecture of EBOV NP showing the location of the N-terminal core domain with N-lobe and C-lobe colored in cyan and blue, respectively and the CTD colored in pink. The disordered N-terminal peptide and non-conserved regions are colored in yellow.

(B) Crystal structure of Zaire EBOV NP N-terminal core domain ( $\Delta\text{NP}_{\text{NTD}}$ ; residues 39-384) in complex with peptide derived from EBOV VP35 (PDB entry 4YPI). The NP N-lobe (residues 37-146, cyan) contains a flexible hinge region (residues 147-239) that attaches to the 240-285 residues of the C-lobe (blue). The peptide derived from EBOV VP35 (residues 20-48, green) interacts entirely with the binding surface of the NP C-lobe.

(C) Cartoon representation of the structure of Zaire EBOV NP C-terminal domain (PDB entry 4QAZ). The NP CTD (residues 645-739, pink) exhibits a novel protein fold with an architecture distantly resembling that of some members of  $\beta$ -grasp superfamily.

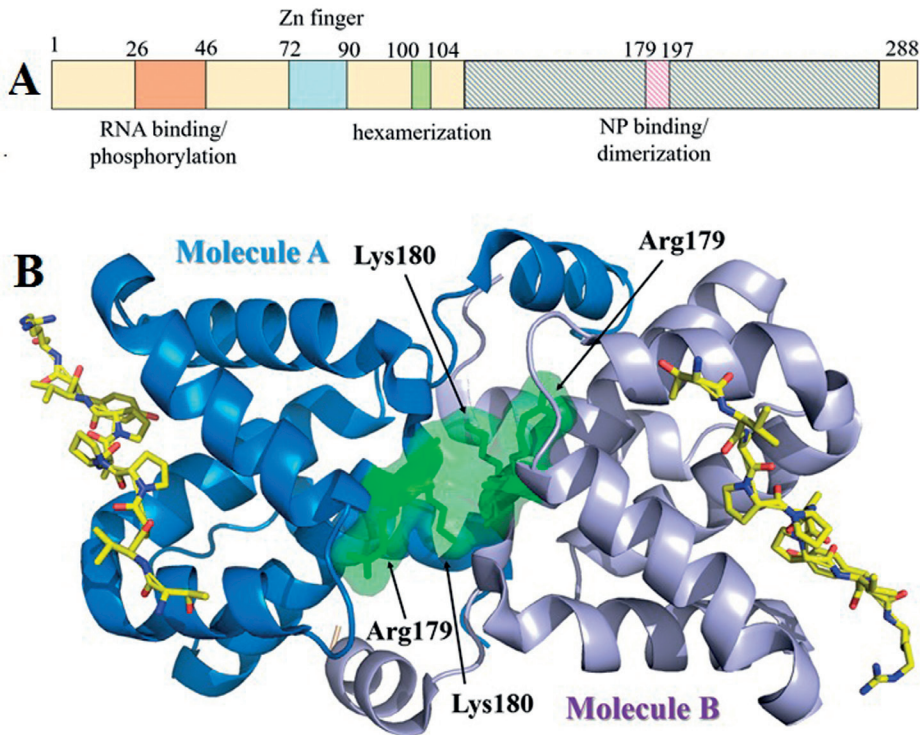


Figure 5. The structure of VP30.

(A) A schematic diagram of the EBOV VP30 gene showing the location of functional regions such as RNA binding/phosphorylation domain (orange box), zinc finger domain (cyan box), the hexamerization motif (green box), as well as region involved in binding to NP and VP30 dimerization (pink box). Hash-marked region correspond to the constructs used for crystallization purposes.

(B) Crystal structure of the Zaire EBOV VP30 C-terminal domain bound to NP (PDB entry 5T3T). In the crystal structure, VP30 CTD (114-265 residues) forms a dimer of two globular domains (Molecule A, blue; Molecule B, light blue) which is shown in cartoon representation. NP (602-614 residues, yellow sticks) binds to the narrow cavity on the VP30 globular domain located onwards the dimeric interface. Two key residues (Arg179, Lys180) of the putative druggable pocket, essential for transcription activation and nucleocapsid association are shown as green sticks with semitransparent surface.



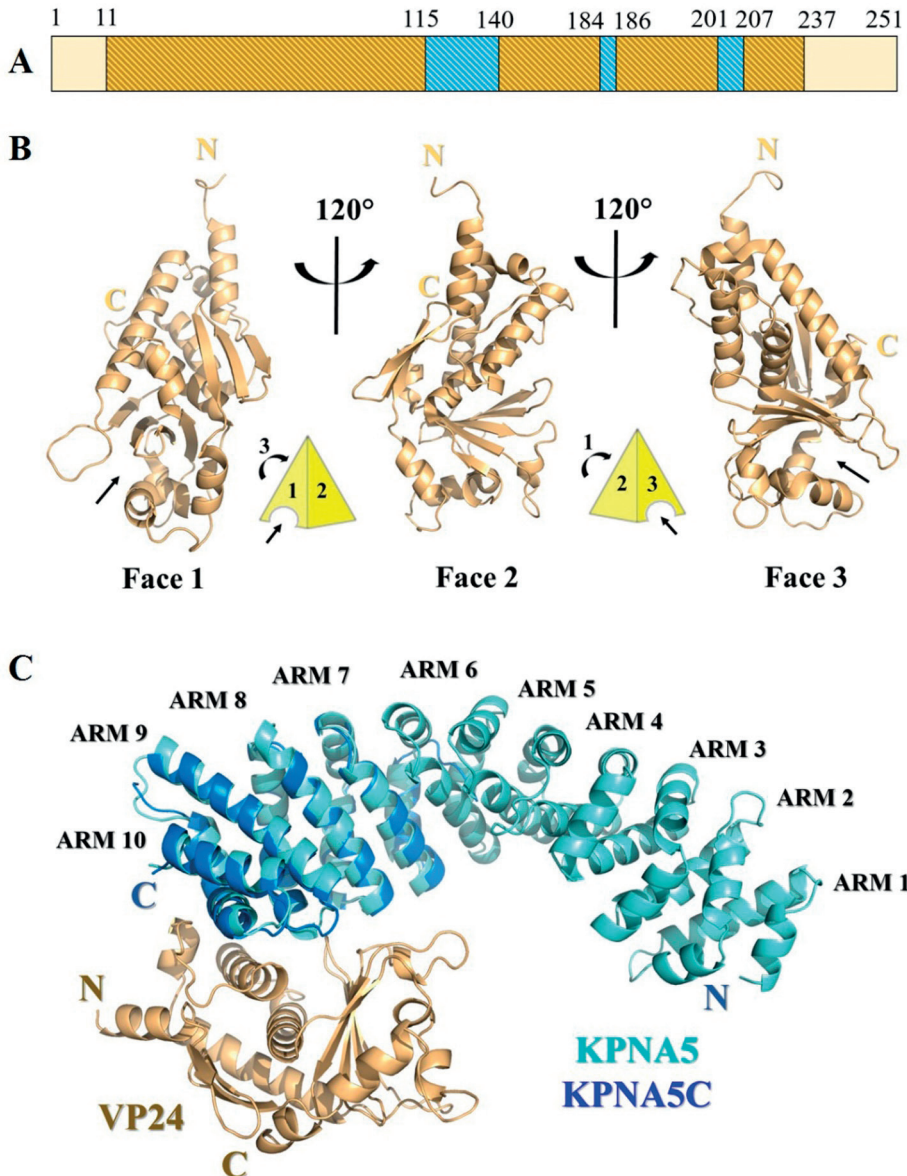


Figure 6. The structure of VP24.

(A) A schematic representation of EBOV VP24 gene. Blue boxes indicate three amino acid clusters that interact with karyopherin  $\alpha$  5 C-terminus (KPNA5C). Hash-marked region correspond to the construct used for crystallization purposes.

(B) Cartoon representation of the crystal structure of Zaire EBOV VP24 (PDB entry 4MOQ). EBOV VP24 (gold) adopts a novel three-sided pyramidal fold with Faces 1, 2 and 3 as illustrated. In the structure, there are two highly conserved pockets located adjacently on the protein surface. The first, hydrophobic pocket lies on the Face 1 and the second, more hydrophilic pocket is located on the Face 3.

(C) Alignment of the crystal structure of Zaire EBOV VP24 in complex with the C-terminal domain of KPNA5 (repeats 8-10) (PDB entry 4U2X) on the structure of full-length KPNA5 (PDB entry 1BK5). VP24 (gold) interacts with KPNA5 8,9,10 armadillo repeats (ARMs; colored blue) which is a specific binding site for KPNA transporters. This interaction has no effect on the overall structure of the full-length KPNA5 (cyan).

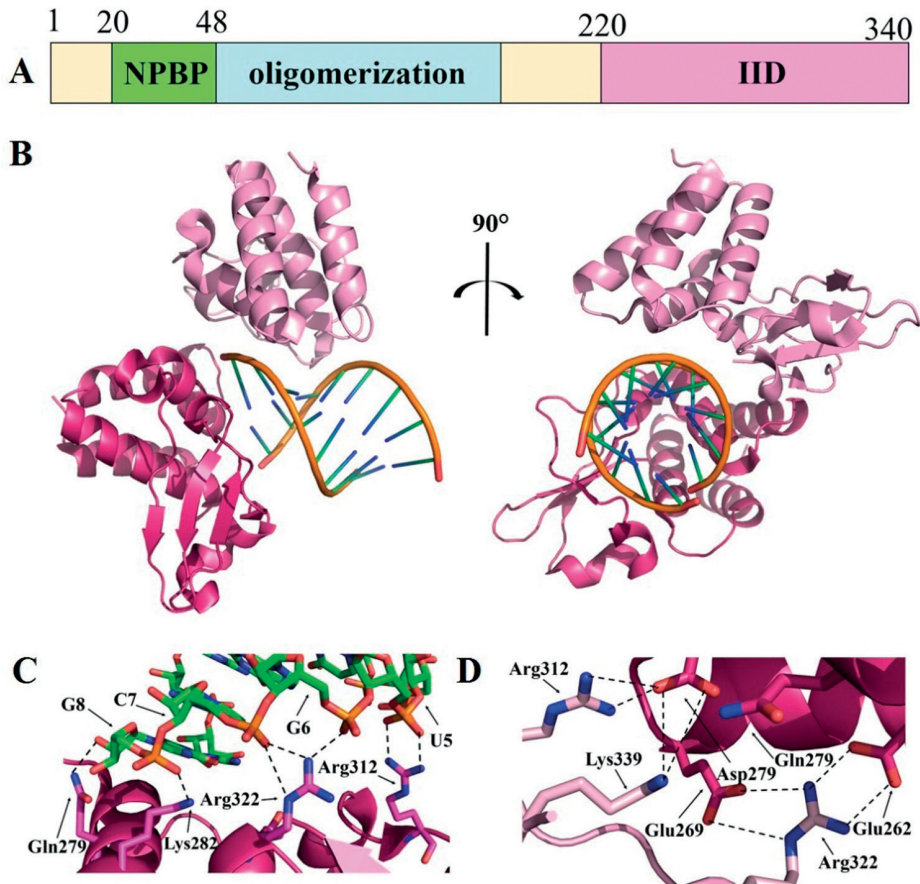


Figure 7. The structure of VP35

(A) A diagram of the EBOV VP35 gene showing the oligomerization domain (cyan box) involved in replication and transcription, and the interferon-inhibitory domain (IID, pink box) which bind dsRNA. There is also a highly conserved region located N-terminally to the oligomerization domain that is known to interact with EBOV NP (NPBP, green box).

(B) Crystal structure of Zaire EBOV VP35 IID bound to the 8 bp dsRNA (PDB entry 3L25). The structure shows how dsRNA recognized by the VP35 IID domain, shown in ribbon representation. The end-capping (initial binding event) VP35 IID monomer is shown in raspberry, whereas the second monomer that binds to the dsRNA backbone (secondary binding event) is shown in light pink. The phosphate backbone of the dsRNA is represented by an orange ribbon and the bases are shown as sticks. There are four VP35 IID molecules bound to dsRNA in the crystallographic asymmetric unit, but only two D molecules are shown for clarity.

(C) The end-capping VP35 IID monomer (raspberry) interacts with the dsRNA in a sequence independent manner. In this case sidechains of Arg312 and Arg322 residues form hydrogen bonds with the dsRNA backbone.

(D) Close-up view on the binding interface between two VP35 IID monomers. The end-capping monomer (raspberry) interacts with ds-RNA backbone binding monomer (light pink) in a head-to-tail orientation, where residues Arg312 and Arg322 form hydrogen bonds with the Asp271 and Glu262 respectively.

## References

1. Baseler L, Chertow DS, Johnson KM, Feldmann H, Morens DM. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annu Rev Pathol* 2016.
2. Rougeron V, Feldmann H, Grard G, Becker S, Leroy EM. Ebola and Marburg haemorrhagic fever. *J Clin Virol* 2015;64:111-9.
3. Kazanjian P. Ebola in Antiquity? *Clin Infect Dis* 2015;61(6):963-8.
4. Sykes C, Reisman M. Ebola: Working Toward Treatments and Vaccines. *PT* 2015;40(8):521-5.
5. Towers S, Afzal S, Bernal G, Bliss N, Brown S, Espinoza B, et al. Mass Media and the Contagion of Fear: The Case of Ebola in America. *PLoS One* 2015;10(6):e0129179.
6. Na W, Park N, Yeom M, Song D. Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus? *Clin Exp Vaccine Res* 2015;4(1):17-22.
7. Qiu XG, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 2014;514(7520):47-+.
8. Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ca Suffit!). *Lancet* 2016.

9. Olejnik J, Ryabchikova E, Corley RB, Muhlberger E. Intracellular events and cell fate in filovirus infection. *Viruses* 2011;3(8):1501-31.
10. Kuhn JH, Bao Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brauburger K, et al. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol* 2013.
11. Booth TF, Rabb MJ, Beniac DR. How do filovirus filaments bend without breaking? *Trends Microbiol* 2013.
12. Leendertz SA, Gogarten JF, Dux A, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. Assessing the Evidence Supporting Fruit Bats as the Primary Reservoirs for Ebola Viruses. *Ecohealth* 2016;13(1):18-25.
13. Mann E, Streng S, Bergeron J, Kircher A. A Review of the Role of Food and the Food System in the Transmission and Spread of Ebolavirus. *PLoS neglected tropical diseases* 2015;9(12):e0004160.
14. Moller-Tank S, Maury W. Ebola virus entry: a curious and complex series of events. *PLoS Pathog* 2015;11(4):e1004731.
15. Aleksandrowicz P, Marzi A, Biedenkopf N, Beimforde N, Becker S, Hoenen T, et al. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis* 2011;204 Suppl 3:S957-67.
16. Muhlberger E. Filovirus replication and transcription. *Future Virol* 2007;2(2):205-15.
17. Faye O, Andronico A, Faye O, Salje H, Boelle PY, Magassouba N, et al. Use of Viremia to Evaluate the Baseline Case Fatality Ratio of Ebola Virus Disease and Inform Treatment Studies: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Med* 2015;12(12):e1001908.
18. Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 2008;454(7201):177-82.

19. Falzarano D, Krokhin O, Wahl-Jensen V, Seebach J, Wolf K, Schnittler HJ, et al. Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of Ebola virus. *Chembiochem* 2006;7(10):1605-11.
20. de La Vega MA, Wong G, Kobinger GP, Qiu X. The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis. *Viral Immunol* 2015;28(1):3-9.
21. Madara JJ, Han Z, Ruthel G, Freedman BD, Harty RN. The multifunctional Ebola virus VP40 matrix protein is a promising therapeutic target. *Future Virol* 2015;10(5):537-46.
22. Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* 2006;80(8):3743-51.
23. Biedenkopf N, Schlereth J, Grunweller A, Becker S, Hartmann RK. RNA Binding of Ebola Virus VP30 Is Essential for Activating Viral Transcription. *J Virol* 2016;90(16):7481-96.
24. Kuhl A, Pohlmann S. How Ebola virus counters the interferon system. *Zoonoses and public health* 2012;59 Suppl 2:116-31.
25. Hausmann S, Marq JB, Tapparel C, Kolakofsky D, Garcin D. RIG-I and dsRNA-induced IFNbeta activation. *PLoS One* 2008;3(12):e3965.
26. Audet J, Kobinger GP. Immune evasion in ebolavirus infections. *Viral Immunol* 2015;28(1):10-8.
27. Prins KC, Binning JM, Shabman RS, Leung DW, Amarasinghe GK, Basler CF. Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function. *J Virol* 2010;84(20):10581-91.
28. Mateo M, Reid SP, Leung LW, Basler CF, Volchkov VE. Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling. *J Virol* 2010;84(2):1169-75.

29. Volchkov VE, Volchkova VA, Chepurinov AA, Blinov VM, Dolnik O, Netesov SV, et al. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* 1999;80 ( Pt 2):355-62.
30. Mehedi M, Falzarano D, Seebach J, Hu X, Carpenter MS, Schnittler HJ, et al. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* 2011;85(11):5406-14.
31. Tran EE, Simmons JA, Bartesaghi A, Shoemaker CJ, Nelson E, White JM, et al. Spatial localization of the Ebola virus glycoprotein mucin-like domain determined by cryo-electron tomography. *J Virol* 2014;88(18):10958-62.
32. Pallesen J, Murin CD, de Val N, Cottrell CA, Hastie KM, Turner HL, et al. Structures of Ebola virus GP and sGP in complex with therapeutic antibodies. *Nat Microbiol* 2016;1(9):16128.
33. Bornholdt ZA, Ndungo E, Fusco ML, Bale S, Flyak AI, Crowe JE, Jr., et al. Host-Primed Ebola Virus GP Exposes a Hydrophobic NPC1 Receptor-Binding Pocket, Revealing a Target for Broadly Neutralizing Antibodies. *MBio* 2016;7(1):e02154-15.
34. Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 2011;477(7364):340-3.
35. Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, Herbert AS, Deffieu MS, Krishnan A, et al. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J* 2012;31(8):1947-60.
36. Gong X, Qian H, Zhou X, Wu J, Wan T, Cao P, et al. Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell* 2016;165(6):1467-78.
37. Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, et al. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1. *Cell* 2016;164(1-2):258-68.

38. Gregory SM, Harada E, Liang B, Delos SE, White JM, Tamm LK. Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(27):11211-6.
39. Gregory SM, Larsson P, Nelson EA, Kasson PM, White JM, Tamm LK. Ebolavirus entry requires a compact hydrophobic fist at the tip of the fusion loop. *J Virol* 2014;88(12):6636-49.
40. Jasenosky LD, Neumann G, Lukashovich I, Kawaoka Y. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 2001;75(11):5205-14.
41. Bornholdt ZA, Noda T, Abelson DM, Halfmann P, Wood MR, Kawaoka Y, et al. Structural Rearrangement of Ebola Virus VP40 Begets Multiple Functions in the Virus Life Cycle. *Cell* 2013;154(4):763-74.
42. Liu Y, Cocka L, Okumura A, Zhang YA, Sunyer JO, Harty RN. Conserved motifs within Ebola and Marburg virus VP40 proteins are important for stability, localization, and subsequent budding of virus-like particles. *J Virol* 2010;84(5):2294-303.
43. Timmins J, Scianimanico S, Schoehn G, Weissenhorn W. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 2001;283(1):1-6.
44. Dessen A, Volchkov V, Dolnik O, Klenk HD, Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *Embo J* 2000;19(16):4228-36.
45. Clifton MC, Bruhn JF, Atkins K, Webb TL, Baydo RO, Raymond A, et al. High-resolution Crystal Structure of Dimeric VP40 From Sudan ebolavirus. *J Infect Dis* 2015;212 Suppl 2:S167-71.
46. Soni SP, Adu-Gyamfi E, Yong SS, Jee CS, Stahelin RV. The Ebola virus matrix protein deeply penetrates the plasma membrane: an important step in viral egress. *Biophys J* 2013;104(9):1940-9.



47. Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich IS, et al. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 2008;3(3):168-77.
48. Adu-Gyamfi E, Digman MA, Gratton E, Stahelin RV. Investigation of Ebola VP40 assembly and oligomerization in live cells using number and brightness analysis. *Biophys J* 2012;102(11):2517-25.
49. Gomis-Ruth FX, Dessen A, Timmins J, Bracher A, Kolesnikowa L, Becker S, et al. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure* 2003;11(4):423-33.
50. Timmins J, Schoehn G, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Rugrok RW, et al. Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* 2003;326(2):493-502.
51. Noda T, Hagiwara K, Sagara H, Kawaoka Y. Characterization of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex. *J Gen Virol* 2010;91(Pt 6):1478-83.
52. Dong S, Yang P, Li G, Liu B, Wang W, Liu X, et al. Insight into the Ebola virus nucleocapsid assembly mechanism: crystal structure of Ebola virus nucleoprotein core domain at 1.8 Å resolution. *Protein Cell* 2015;6(5):351-62.
53. Leung DW, Borek D, Luthra P, Binning JM, Anantpadma M, Liu G, et al. An Intrinsically Disordered Peptide from Ebola Virus VP35 Controls Viral RNA Synthesis by Modulating Nucleoprotein-RNA Interactions. *Cell Rep* 2015;11(3):376-89.
54. Sherwood LJ, Hayhurst A. Ebolavirus nucleoprotein C-termini potentially attract single domain antibodies enabling monoclonal affinity reagent sandwich assay (MARSA) formulation. *PLoS One* 2013;8(4):e61232.
55. Baker LE, Ellena JF, Handing KB, Derewenda U, Utepbergenov D, Engel DA, et al. Molecular architecture of the nucleoprotein C-terminal do-

main from the Ebola and Marburg viruses. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 2016;72(Pt 1):49-58.

56. Dziubanska PJ, Derewenda U, Ellena JF, Engel DA, Derewenda ZS. The structure of the C-terminal domain of the Zaire ebolavirus nucleoprotein. *Acta Cryst D* 2014;70(Pt 9):2420-9.

57. Garcia-Dorival I, Wu W, Armstrong SD, Barr JN, Carroll MW, Hewson R, et al. Elucidation of the Cellular Interactome of Ebola Virus Nucleoprotein and Identification of Therapeutic Targets. *J Proteome Res* 2016;15(12):4290-303.

58. John SP, Wang T, Steffen S, Longhi S, Schmaljohn CS, Jonsson CB. Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol* 2007;81(17):8967-76.

59. Hartlieb B, Muziol T, Weissenhorn W, Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(2):624-9.

60. Kirchdoerfer RN, Moyer CL, Abelson DM, Sapphire EO. The Ebola Virus VP30-NP Interaction Is a Regulator of Viral RNA Synthesis. *PLoS Pathog* 2016;12(10):e1005937.

61. Schlereth J, Grunweller A, Biedenkopf N, Becker S, Hartmann RK. RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30. *RNA Biol* 2016;13(9):783-98.

62. Xu W, Edwards MR, Borek DM, Feagins AR, Mittal A, Alinger JB, et al. Ebola Virus VP24 Targets a Unique NLS Binding Site on Karyopherin Alpha 5 to Selectively Compete with Nuclear Import of Phosphorylated STAT1. *Cell Host Microbe* 2014;16(2):187-200.

63. Leung DW, Ginder ND, Fulton DB, Nix J, Basler CF, Honzatko RB, et al. Structure of the Ebola VP35 interferon inhibitory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(2):411-6.

64. Leung DW, Prins KC, Borek DM, Farahbakhsh M, Tufariello JM, Ramanan P, et al. Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(2):165-72.
65. Basu A, Li B, Mills DM, Panchal RG, Cardinale SC, Butler MM, et al. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses. *J Virol* 2011;85(7):3106-19.
66. Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Roney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Science translational medicine* 2015;7(290):290ra89.

### **Address for correspondence**

prof. Zygmunt Derewenda

Department of Molecular Physiology and Biological Physics,

University of Virginia, 1340 Jefferson Park Avenue, Charlottesville, Virginia,  
22903, United States

email: zsd4n@eservices.virginia.edu





## Struktura i rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka w zdrowiu i w chorobie

Structure and functional capacity of the bacterial human gastrointestinal microbiota in healthy state and variety of disease states

Adam Jaworski<sup>1</sup>, Katarzyna Dudek<sup>1</sup>, Ireneusz Jurczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Społeczna Akademia Nauk

<sup>1</sup> University of Social Sciences, Łódź, Poland

*All disease begins in the gut*

- Hipokrates

*Człowiek jest tym, co je*

- Ludwig Feuerbach

### Streszczenie

W niniejszym artykule przeglądowym przedstawiono dane literatury światowej z ostatnich 10 lat na temat biologii „świata” bakterii zasiedlających ludzki organizm, ich roli biologicznej i znaczenia dla zdrowia każdego człowieka. Uwagę skoncentrowano na bardzo szybko narastającej wiedzy dotyczącej ogromnych i bardzo różnorodnych populacji bakterii przewodu pokarmowego człowieka. W kolejnych rozdziałach artykułu przedstawiono wyniki licznych prac doświadczalnych, a także hipotezy i wnioski z prac poglądowych oraz monografii dotyczące: składu i różnorodności populacji bakterii kolonizujących przewód pokarmowy noworodka, człowieka dorosłego oraz zmian zachodzących w podeszłym wieku, roli biologicznej mikrobioty dla zdrowia człowieka, a także skutków naruszania symbiotycznej równowagi pomiędzy mikrobiotą a go-

spodarzem. W ostatnim rozdziale przedstawiono i omówiono wyniki prac z ostatnich kilku lat na temat dróg i mechanizmów komunikacji pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego człowieka a ośrodkami w mózgu, które wskazują na istotny udział bakterii przewodu pokarmowego w kształtowaniu również zdrowia psychicznego człowieka.

### **Słowa kluczowe**

mikrobiom przewodu pokarmowego, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, neuroprzekaźniki, komunikacja mózg-mikrobiota.

### **Abstract**

*This review article presents data from the world literature in the past ten years on the biology of bacterial "kingdom" inhabiting human organism, its biological role and the importance for human health. Special attention was paid to the rapidly growing knowledge of the enormous and very diverse bacterial population of the digestive tract. In the subsequent chapters there were presented the results of numerous experimental works as well as hypotheses and conclusions from the cognitive works and monographs on the content and the diversity of bacterial populations colonizing the digestive tract of the new born babies and adults as well as changes occurring in the old age, the biological role of this microbiota for human health and the consequences of the disruption of symbiotic host - microbiota equilibrium. The last chapter presents and discusses the results of the past few years experimental works on the pathways and mechanisms of communication between the microbiota of the digestive tract and the brain centers, which shows how significant role bacteria of the digestive tract play in maintaining mental health in humans.*

### **Key words**

*gastrointestinal human microbiome, Clostridium difficile, Bacteroides fragilis, short chain fatty acids, neurotransmitters, microbiota brain communication.*

## Wprowadzenie

Wielu naukowców jeszcze w latach 90. ubiegłego wieku sądziło, że w genomie człowieka funkcjonuje co najmniej 100 tys. genów. Rozszyfrowanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka w 2001 r. i ustalenie, że w genomie człowieka znajduje się tylko około 23 tys. genów kodujących białka i kwasy rybonukleinowe było nawet dla specjalistów dużym zaskoczeniem. Dzisiaj, po 10 latach intensywnych badań, wiemy, że obok 20 tys. genów kodujących różnego rodzaju białka strukturalne i funkcjonalne inne ogromne obszary genomu podlegają aktywnej transkrypcji, a końcowe produkty takie jak RNA rybosomów, tRNA oraz rodziny niedawno wykrytych, krótkich regulatorowych RNA (siRNA, microRNA) pełnią niezwykle ważne funkcje biologiczne w każdej komórce.

Nowe, zaskakujące informacje przynoszą wyniki realizowanego od 2007 r. ogromnego projektu HMP (*Human Microbiom Project*), którego celem jest poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej metagenomu hodowlanej i niehodowlanej biocenozy bakterii kolonizujących człowieka, na poziomie jego metatranskryptomu, metaproteomu i metabolomu. Okazało się, że człowiek jest złożonym i ogromnie skomplikowanym „metaorganizmem”, który ewoluował razem z kolonizującą go symbiotyczną populacją ogromnego świata bakterii [1, 2, 3]. Organizm człowieka zbudowany jest z około  $10^{13}$  komórek somatycznych i rozrodczych, ale w świetle nowych danych zasiedla go 10 razy większa liczba komórek mikroorganizmów ( $10^{14}$ ), należących do ponad 500 gatunków zwanych mikrobiomem lub mikrobiotą (*microbiom, microbiota*). Szacuje się, że liczba genów bakteryjnych w organizmie człowieka jest 50–100 razy większa niż liczba genów w jego własnym genomie [4, 5, 6]. Co najmniej kilka milionów genów bakteryjnych, obecnych w organizmie człowieka, koduje bardzo wiele różnorodnych funkcji biologicznych, które nie są determinowane przez nasz własny ludzki genom. Można bez przesady powiedzieć, że kolektywny genom (metagenom) zasiedlającego nas mikrobiomu jest trzecią, niezwykle ważną częścią naszej informacji genetycznej, obok genomu jądrowego i mitochondrialnego. Zatem z genetycznego punktu widzenia na metagenom człowieka składają się ludzkie geny jądrowe i mitochondrialne, które stanowią zaledwie około 1% ludzkiego metagenomu, a pozostałe 99% to geny populacji mikroorganizmów zasiedlających organizm człowieka. Zdecydowana większość komórek mikrobioty człowieka (10–100 trylionów) zasiedla przewód pokarmowy, a największym

ich ekosystemem jest jelito grube, gdzie w 1 ml treści znajduje się około 10<sup>11</sup>–10<sup>12</sup> komórek bakterii [7], a biomasa bakterii zasiedlających przewód pokarmowy przeciętnego człowieka wynosi około 1 kg. Obecnie na świecie żyje 7 mld ludzi, których zasiedla około 10<sup>24</sup> komórek różnych gatunków drobnoustrojów (*Bacteria* i *Archaea*), z których znaczna część należy jednak do gatunków dotąd niehodowlanych. Z wciąż powiększających się baz danych metagenomiki bakterii przewodu pokarmowego ludzi oraz kalkulacji ekologicznych wynika, że metabakteriom całej ludzkości jest drugim po metabakteriomie oceanów i mórz (10<sup>29</sup>) największym rezerwuarem bakterii na naszej planecie Ziemi [8].

### Taksonomiczna złożoność mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka

Badania struktury i funkcji biologicznej mikrobioty człowieka stały się możliwe dzięki opracowaniu i ciągłemu ulepszaniu technik metagenomiki, transkryptomiki i proteomiki oraz spektrometrii masowej, które pozwalają badać, analizować całe zespoły populacji bakterii, w tym gatunków niehodowlanych, na podstawie ich nukleotydowych sekwencji genomów, transkryptomów, sekwencje aminokwasowe proteomów i syntetyzowane produkty metabolomów. Do 2011 r. w bazach danych zgromadzono sekwencje nukleotydowe ponad 40 tys. podjednostek 16S rRNA mikrobiomów przewodu pokarmowego 139 ludzi żyjących w różnych regionach świata. Do 2015 r. ukazało się ponad 450 znakomitych prac i artykułów na temat struktury i roli biologicznej mikrobioty ludzi różnych ras i grup etnicznych, żyjących w różnych regionach świata i strefach klimatycznych, w tym płodów, niemowląt, dzieci w różnym wieku, ludzi zdrowych i z różnymi chorobami i dolegliwościami, a także ludzkich zwłok w trakcie naturalnego rozkładu.

W świetle uzyskanych wyników okazało się, że spośród ponad 100 znanych typów bakterii żyjących na naszej planecie przewód pokarmowy człowieka kolonizuje zaledwie 10 z nich [9]. Co więcej, 99% biocenozy bakterii żyjących w przewodzie pokarmowym człowieka stanowi zaledwie 5 dominujących filogenotypów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Fusobacteria*. Wśród tych 5 filogenotypów dominującymi (około 90%) są typy *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, których udział w mikrobiomie przewodu pokarmowego zdrowego człowieka wynosi odpowiednio 65% i 25%. Udział pozostałych trzech typów – *Actinobac-*



*teria*, *Proteobacteria* i *Fusobacteria* – wynosi odpowiednio około 5, 8 i 1%. W świetle narastających danych metagenomiki istnieje obecnie przekonanie, że mikrobiota przewodu pokarmowego każdego zdrowego człowieka składa się niejako z dwóch części: pierwsza, to jest w miarę stabilny *core*, stanowi około 70% całej biocenozy bakterii, który dziecko po urodzeniu i w wieku niemowlęcym uzyskuje od matki, a także w wyniku wewnątrzrodzinnej i środowiskowej transmisji. Druga część biocenozy jest zmienna i zróżnicowana u każdego człowieka ze względu na styl życia, wiek, dietę, stan zdrowia oraz sprawność systemu odpornościowego [1, 2, 10, 11]. Obecność i udział procentowy poszczególnych rodzajów i gatunków bakterii zasiedlających różne odcinki przewodu pokarmowego (żołądek, dwunastnica, jelito kręte, jelito cienkie i jelito grube) jest zróżnicowany pod względem jakościowym i ilościowym ze względu na odmienne warunki fizykochemiczne i biologiczne istniejące w tych odcinkach przewodu pokarmowego [9]. Jelito grube człowieka jest najobficiej zasiedlonym ekosystemem na naszej planecie, i to przez najbardziej różnorodną florę bakteryjną – w porównaniu z mikrobiotą skóry, jamy ustnej oraz układu moczowo-płciowego [12, 13]. W jelicie grubym panują bardzo korzystne warunki dla rozwoju różnorodnej flory bakteryjnej, a więc lekko kwaśne pH (w odróżnieniu od bardzo niskiego pH w żołądku), mała zawartość toksycznych kwasów żółciowych (duża odległość od wątroby i trzustki), szeroka, pofałdowana powierzchnia *epithelium* ułatwiająca proces kolonizacji, a także mała liczba komórek Paneta (*Paneth cells*), produkujących peptydy antybakteryjne [8].

### **Proces kolonizacji przez bakterie przewodu pokarmowego noworodka, zmiany w składzie mikrobioty w okresie dorastania i starzenia się oraz konsekwencje tych zmian dla zdrowia człowieka**

Przewód pokarmowy noworodków jest zasiedlany bakteriami w wyniku ich bezpośredniej transmisji od matki przed porodem, w czasie porodu, karmienia piersią i bezpośredniego kontaktu. W czasie naturalnego porodu główka dziecka i twarz ma bezpośredni kontakt z okolicami pochwy i odbytu matki. Stąd w czasie naturalnego porodu dziecko zostaje zaszczepione potężną dawką matczynej mikrobioty. W pierwszej kolejności przewód pokarmowy noworodka kolonizują fakultatywne tlenowce, a następnie beztlenowce. Stabilny skład *core* mikrobioty przewodu pokarmowego zdrowego dziecka urodzonego w sposób naturalny i kar-

mionego piersią ustala się w 2.–3. roku życia. Za optymalny, referencyjny skład mikrobioty przewodu pokarmowego uznaje się ten, który został ukształtowany u człowieka urodzonego w sposób naturalny, karmionego w okresie niemowlęcym piersią do 6 miesięcy, a następnie do 2. roku życia odżywianego dietą suplementowaną mlekiem matki. Opierając się na obecnej wiedzy, można powiedzieć, że dzieci urodzone drogą naturalną są skolonizowane przez gatunki z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*, które należy zaliczyć do bakterii bardzo korzystnych dla zdrowia człowieka (*beneficial bacteria*), a dzieci urodzone po cesarskim cięciu są w dużym stopniu skolonizowane przez mniej korzystną, środowiskową mikrobiotę szpitala położniczego, w którym się urodziły [14]. W literaturze popularno-naukowej można obecnie dość często spotkać się z pojęciem „dobrze urodzeni”, określającym ludzi urodzonych drogą naturalną.

W pierwszym okresie ciąży komórki wyściółki pochwy bardzo zwiększają syntezę glikogenu, który jest łatwo przyswajalnym substratem dla szybkiego rozwoju populacji bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*. Silnie zakwaszone środowisko pochwy stanowi barierę dla rozwoju wielu patogennych bakterii, co stanowi ochronę dla matki i płodu przed bakteriami chorobotwórczymi. W trzecim trymestrze ciąży w przewodzie pokarmowym matki zwiększają się natomiast populacje gatunków należących do typów *Proteobacteria* i *Actinobacteria* zdolnych do fermentacji polisacharydów, które nie są trawione przez enzymy człowieka. Produkty bakteryjnej fermentacji tych polisacharydów są wchłaniane w przewodzie pokarmowym matki i włączane w jej ogólną pulę metabolitów przemiany węglowodanów, co w konsekwencji podnosi, w sposób bardzo znaczący, poziom przyswajalnych źródeł węgla i energii we krwi matki ciężarnej, zabezpieczając w ten sposób także rosnące potrzeby energetyczne i materiałowe rozwijającego się płodu [15].

Ostatnio opublikowane w literaturze światowej zaskakujące wyniki wskazują, że kolonizacja bakteriami przewodu pokarmowego człowieka przebiega pod ścisłą kontrolą molekularnych mechanizmów gospodarza. W bardzo dobrze udokumentowanej pracy wykazano, że komórki nabłonkowe wyściełające jelita zarówno u myszy, jak i u człowieka syntetyzują krótkie, regulatorowe cząsteczki mikroRNA. Cząsteczki te mogą wnikać do wnętrza komórek bakteryjnych kolonizujących przewód pokarmowy gospodarza i poprzez bardzo specyficzny mechanizm interferencji wyciszać ekspresję genów określonych gatunków bakterii, hamu-

jąc w konsekwencji ich rozwój w przewodzie pokarmowym gospodarza. Z opisanych w cytowanej pracy rezultatów wynika, że myszy akseniczne, produkujące mniejszą pulę cząsteczek mikroRNA, zostały skolonizowane przez niekorzystną florę bakteryjną, a skutkiem były stany zapalne jelita grubego i błony śluzowej jelit. Autorzy pracy podają atrakcyjną hipotezę, która zakłada, że system mikroRNA nabłonka jelita ssaków i człowieka ewoluował tak, by kształtować korzystny skład mikrobioty, by selekcjonować pozytywnie, niejako „pielęgnować” w przewodzie pokarmowym te szczepy i gatunki bakterii, które chronią organizm gospodarza przed infekcjami bakteriami patogennymi oraz są dla zdrowia i kondycji psychofizycznej człowieka bardzo korzystne. Autorzy cytowanej pracy sądzą, że system syntetycznych, świadomie zaplanowanych cząsteczek mikroRNA może się stać w przyszłości niezwykle przydatnym narzędziem dla ukierunkowanego kształtowania optymalnej, zdrowej mikrobioty człowieka [16].

Nie ulega dzisiaj żadnej wątpliwości, że karmienie dziecka piersią jest bardzo korzystne dla zdrowia zarówno dziecka, jak i matki. Do niedawna sądzono, że mleko matki jest sterylne. Jednak od 2002 r. ukazują się dobrze udokumentowane prace dowodzące, że mleko matki jest skolonizowane przez wiele szczepów bakterii. Dowiedziono, że w mleku karmiącej kobiety jest obecnych od 2 do 10 szczepów z grupy 200 znanych gatunków, głównie z rodzajów *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Bifidobacterium* [17,18,19].

Obecność tych szczepów w mleku matek karmiących zidentyfikowano, opierając się na analizie i identyfikacji podjednostki 16S RNA. Drogi i mechanizmy kolonizacji przez bakterie mleka matki nie są do końca wyjaśnione. Dyskutowana jest hipoteza endogennej kolonizacji zakładająca, że zmiany hormonalne kobiety w ciąży powodują zmiany przepuszczalności jelit, dzięki czemu bakterie przedostają się do naczyń krwionośnych i wędrują do gruczołów piersiowych. Inna hipoteza zakłada, że bakterie zasiedlające skórę matki przedostają się do gruczołów piersiowych. Dowiedziono także, że dziecko w czasie ssania zakaża mleko matki bakteriami z jamy ustnej. Pierwsze mleko matki, siara, zawiera obfite populacje bardzo korzystnych dla zdrowia dziecka bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, które kolonizują przewód pokarmowy narodzonego dziecka. Ponadto siara jest bogata w matczyne przeciwciała klasy IgA, które chronią nowo narodzone dziecko przed infekcjami bakteriami

chorobotwórczymi, zanim uaktywni ono własny układ odpornościowy i wytworzy własne przeciwciała. Co więcej, sacharydy mleka kobiecego, w tym oligosacharydy, galaktooligosacharydy i fruktooligosacharydy, stanowią trzeci pod względem wielkości składnik mleka, ale nie są trawione przez organizmy niemowląt. Jak się okazało, są to prebiotyki, a więc ich rolą biologiczną nie jest odżywanie dziecka, ale „odżywanie” bakterii łatwo wykorzystujących te oligosacharydy jako źródła węgla i energii. Taką zdolność mają bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Można więc postawić uprawniony wniosek, że oligosacharydy mleka matki karmiącej wzmagają w przewodzie pokarmowym noworodka rozwój populacji tych bardzo korzystnych dla zdrowia dziecka bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Co więcej, noworodek w czasie ssania piersi niejako „pompuje” te bakterie do piersi matki, co chroni sutki piersi matki przed infekcjami patogennymi gronkowcami i paciorkowcami.

W świetle bardzo wiarygodnych wyników przedstawionych w 2014 r. przez zespół Kjersti Aagaard ze znakomitego ośrodka naukowego, jakim jest Baylor College of Medicine w Houston, wynika, że określone gatunki i szczepy bakterii kolonizują już przewód pokarmowy płodu. Dużą liczbę bakterii wykryto bowiem nie tylko w smółkach narodzonych dzieci, ale także w bardzo wielu łożyskach zebranych po porodach oraz w płynach owodniowych. Analiza składu gatunkowego zidentyfikowanych bakterii wskazuje na zaskakujące podobieństwo do składu gatunkowego flory bakteryjnej jamy ustnej matek. Zachodzi ważne pytanie o drogi transmisji bakterii od matki do płodu. Bakterie od matki docierają prawdopodobnie do płodu przez łożysko, z łożyska zaś przenikają do płynu owodniowego, gdzie są połykane przez rozwijające się dziecko. W cytowanych pracach specjaliści dyskutują o bardzo realnej możliwości, że niekorzystna dla zdrowia płodu struktura mikrobioty w łożysku ciężarnych matek i zasiedlanym przez te bakterie jego przewodzie pokarmowym może być istotną przyczyną przedwczesnych porodów. Autorzy cytowanych prac wskazują, że niektóre bakteryjne choroby jamy ustnej i dziąseł u matek w ciąży bardzo znacząco zwiększają ryzyko urodzenia dziecka przed terminem [20, 21, 22].

W wieku dojrzałym skład jakościowy i ilościowy części korowej mikrobioty przewodu pokarmowego zdrowego człowieka jest w miarę stabilny, a opisywane w literaturze różnice pomiędzy analizowanymi ludźmi dotyczą jego części zmiennej i są wynikiem istotnych różnic w diecie,

a także odmiennych, kulturowych nawyków odżywiania się ludzi w różnych krajach i regionach świata. Na strukturę części zmiennej mikrobioty bardzo duży wpływ mają różne czynniki endogenne i środowiskowe takie jak: uwarunkowania genetyczne i fizjologiczne gospodarza, sprawność jego układu odpornościowego, styl życia, środowisko, w którym żyje, dieta, a także choroby genetyczne, metaboliczne i infekcyjne, stosowane leki, w tym antybiotyki, chemioterapeutyki, a także nadmierna konsumpcja alkoholu [1, 6, 23]. Organizm człowieka, jego genotyp, mają istotny wpływ na jakościowy i ilościowy skład mikrobioty przewodu pokarmowego poprzez syntezę i wydzielanie do światła jelit wielu antybakteryjnych peptydów, intelektualny, rezystyny i przeciwciał IgA [24, 25, 26]. Gdy gospodarz traci kontrolę nad składem jelitowej mikrobioty w wyniku choroby, antybiotykoterapii, chemioterapii, alkoholizmu staje się bardziej podatny na zakażenia bakteriami oportunistycznymi i patogenymi. Należy w tym miejscu podkreślić, że powszechne, bardzo często nieuzasadnione względami medycznymi stosowanie antybiotyków stało się w ostatnich latach jedną z głównych przyczyn bardzo niekorzystnych zmian w składzie mikrobioty ludzkiego organizmu, a konsekwencje tych zmian dla zdrowia człowieka przedstawimy w kolejnym rozdziale niniejszego artykułu.

U ludzi starszych, po 65. roku życia, zachodzą w strukturze mikrobioty przewodu pokarmowego istotne zmiany, które pogłębiają się wraz z wiekiem. Publikowane dane na ten temat wskazują, że w tym okresie w mikrobiocie zaczynają dominować niekorzystne grupy bakterii, w tym szczególnie niektóre gatunki i rodzaje bakterii z rodzaju *Firmicutes*. Na podstawie wyników publikowanych w literaturze światowej można najogólniej powiedzieć, że mikrobiota przewodu pokarmowego ludzi starszych staje się z wiekiem coraz mniej zróżnicowana pod względem liczby gatunków w obrębie rodzajów, charakteryzuje się znaczącą redukcją puli korzystnych gatunków bakterii z rodzajów *Bacteroides* i *Bifidobacterium* oraz wzrostem populacji fakultatywnych beztlenowców (enterobakterie, gronkowce, paciorkowce), a także beztlenowców z rodzaju *Clostridium*. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* mają zdolność metabolizowania wielu polisacharydów, w tym nietrawionych przez enzymy człowieka. Dlatego ograniczenie ich liczebności i gatunkowej różnorodności w podeszłym wieku zmniejsza aktywność amylolityczną w jelicie grubym i bardzo znacząco obniża pulę oraz dostępność dla organizmu gospodarza krótko-

łańcuchowych kwasów organicznych SCFAs (*short carboxylic fatty acids*), które spełniają funkcję ważnych energetycznych i sygnałowych metabolitów [27, 28, 29, 30, 31]. Ograniczenie w jelicie grubym liczebności i bioróżnorodności populacji tych bardzo korzystnych dla zdrowia człowieka bakterii, z równoczesnym wzrostem populacji bakterii gnilnych, prowadzi do akumulacji w jelicie grubym ludzi starszych różnych toksycznych i mutagennych produktów: amoniaku, fenoli, siarkowodoru, heterocyklicznych związków chemicznych, toksyn, w tym lipopolisacharydu (LPS) indukującego prozapalne cytokiny, co prowadzi do stanów zapalnych jelit, wątroby oraz nabytej oporności na insulinę [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Najogólniej można stwierdzić, że naruszenie symbiotycznej równowagi pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego i gospodarzem ma poważne konsekwencje w postaci groźnych chorób przewodu pokarmowego, chorób metabolicznych, a także niektórych neurologicznych [38]. Uszkodzenia komórek nabłonka jelit, jako rezultat toksycznego działania lipopolisacharydu (LPS), syntetyzowanego przez gramujemne, oportunistyczne szczepy mikrobioty, prowadzi do toksemii i indukcji prozapalnych cytokin, a w konsekwencji do przewlekłych stanów zapalnych jelit, w tym choroby Leśniowskiego-Crohna [39, 40, 41]. Modyfikacje składu mikrobioty przewodu pokarmowego, niekorzystne dla zdrowia gospodarza, obejmują, między innymi, stosowane w terapii i profilaktyce różnorodne preparaty i leki, w tym antybiotyki, chemioterapeutyki, sterydy, doustne leki antykoncepcyjne, leki hormonalne, środki przeciwbólowe, dieta bogata w tłuszcze zwierzęce oraz węglowodany, a także nadmierna konsumpcja alkoholu. Dobrze udokumentowane prace wskazują, że niektóre choroby uwarunkowane genetycznie, takie jak: alergia pokarmowa (atopia), choroba Leśniowskiego-Crohna, rak jelita grubego, otyłość – mogą także prowadzić do daleko idących, niekorzystnych zmian w składzie mikrobioty i przewlekłego stanu zapalnego jelit [23, 31, 32, 33, 34, 35, 42]. Bardzo groźnym przypadkiem zaburzenia składu mikrobioty przewodu pokarmowego jest grzybica jelit, kiedy dochodzi do dominacji populacji szczepów *Candida albicans*. Grzybicy sprzyjają podeszły wiek i osłabienie układu odpornościowego, długotrwałe terapie antybiotykami o szerokim spektrum działania oraz stosowanie leków immunosupresyjnych, sterydów oraz inhibitorów pompy protonowej, a także nadmierna konsumpcja alkoholu [43]. Innym, bardzo groźnym dla zdrowia, skutkiem długotrwałej antybiotykoterapii, niszczącej fizjologiczną, „zdro-

wą” mikrobiotę przewodu pokarmowego, są przewlekłe, wyniszczające biegunki w wyniku infekcji jelita grubego beztlenowymi laseczkami *Clostridium difficile*. Infekcje te stały się szczególnie groźne dla życia pacjentów po 2000 r., kiedy to w USA i w Kanadzie, a następnie w Europie pojawił się szczególnie groźny, wirulentny szczep tego gatunku oporny na standardowe sulfonamidy: metronidazol i wankomycynę. W tej sytuacji jedynym skutecznym sposobem ratowania życia pacjentów była resekcja jelita grubego. Jednak w 2010 r. opisano nowy skuteczny sposób leczenia tej przewlekłej choroby poprzez przeszczep do jelita grubego pacjentów pełnego (hodowalnego i niehodowalnego) bakteriomu zdrowego człowieka [44, 45]. Autorzy cytowanej pracy stwierdzają, że bakterioterapia, to jest wymiana całej mikrobioty jelita grubego, z wykorzystaniem kału od zdrowego dawcy, stała się skuteczną metodą leczenia i powinna być pierwszym, a nie ostatnim sposobem leczenia ciężkich infekcji patogenną bakterią *Clostridium difficile*. Dowodzą, że w 300 przeprowadzonych zabiegach przeszczepu całej hodowalnej i niehodowalnej mikrobioty przewodu pokarmowego pacjenci po dwóch dniach pozbywali się biegunki; nie odnotowano także ani jednego przypadku nawrotu choroby. Inna bardzo obiecująca strategia skutecznej terapii choroby spowodowanej przez infekcję *Clostridium difficile*, a być może także innych chorób skorelowanych z zaburzeniami mikrobioty przewodu pokarmowego, została zaproponowana w 2015 r. [46, 47]. Wyniki bardzo dobrze opublikowanych prac wskazują, że terapia krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi, produktami degradacji polisacharydów przez bakterie z grupy *Bifidobacterium*, w tym szczególnie maślanem sodu, przyniosła bardzo dobre rezultaty zarówno u pacjentów z infekcjami przewodu pokarmowego, jak i w wypadku zwierząt doświadczalnych.

Bogata literatura światowa dotyczy korelacji pomiędzy składem i funkcją mikrobioty człowieka a cukrzycą typu I i II [48, 49], rakiem jelita grubego [50], chorobami sercowo-naczyniowymi [51], a także otyłością człowieka [52], uznaną obecnie w bogatych krajach za ogromny problem zdrowotny. W niniejszym artykule przytaczamy zaledwie niektóre dane światowego piśmiennictwa z ostatnich lat, które rzucają nowe światło na istotę tej korelacji. Bardzo interesujące wyniki uzyskane na modelu myszy z uwarunkowaną genetycznie otyłością (mutacja w genie *ob*, kodującym syntezę leptyny) dowodzą, że dominującą populacją w przewodzie pokarmowym są bakterie typu *Firmicutes*, a u myszy fenotypu dzi-

kiego (bez mutacji w genie) dominującą populacją jest typ *Bacteroides*. Co więcej, okazało się, że cechę otyłości uwarunkowaną genetycznie można przenieść poprzez przeszczep mikrobioty jelita grubego otyłych myszy do jelita grubego nowo narodzonych myszy (*germ free*), noszących w genomie obie funkcjonalne kopie genu kodującego syntezę leptyny. Nowo narodzone myszy po przeszczepie mikrobioty myszy otyłych szybko przybierały na wadze i nabywały fenotyp myszy otyłych. Metagenomiczna analiza aktywności genów metabolizmu podstawowego mikrobiomu jelita grubego myszy otyłych ujawniła znacznie większą pulę genów zaangażowanych w wykorzystanie różnorodnych, trudno degradowalnych polisacharydów jako źródeł węgla i energii, w porównaniu z populacją bakterii jelita grubego myszy fenotypu dzikiego. W mikrobiocie jelita grubego myszy otyłych syntetyzowane były duże ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, które są bardzo dobrymi substratami dla syntezy energii użytecznej biologicznie, a także dla procesów lipogenezy oraz odkładania się tłuszczu w wątrobie i w tkance tłuszczowej [2, 42, 52, 53].

Komentowane wyniki uzyskane na modelu myszy doświadczalnych są zgodne z rezultatami opisanymi dla mikrobioty przewodu pokarmowego ludzi otyłych. Analiza mikrobioty jelita grubego przeprowadzona wśród 154 otyłych osób ujawniła znaczące ograniczenie bioróżnorodności flory bakteryjnej, z równoczesną redukcją bakterii typu *Bacteroidetes* i istotnym wzrostem bakterii typu *Firmicutes*. Co wydaje się równie ważne, zarówno u myszy z uwarunkowaną genetycznie otyłością, jak i ludzi otyłych zaobserwowano dużą redukcję populacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, które są bardzo korzystne dla zdrowia człowieka. Dla badanej grupy otyłych pacjentów analizę mikrobioty jelita grubego prowadzono systematycznie także po zastosowaniu dla nich długoterminowej, restrykcyjnej diety ubogiej w tłuszcze i węglowodany. Wykazano u wszystkich badanych pacjentów systematyczny spadek wagi ciała, z równoczesnym wzrostem w jelicie grubym populacji bakterii *Bacteroides* i *Bifidobacterium* oraz redukcją populacji bakterii typu *Firmicutes* [2, 42, 52, 53]. Korelacja pomiędzy otyłością a składem mikrobioty przewodu pokarmowego wydaje się oczywista, aczkolwiek trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy zaburzenia składu mikrobioty przewodu pokarmowego są przyczyną, czy też skutkiem otyłości.

Opisane przykłady chorób i dolegliwości człowieka, skorelowane z zaburzeniami składu mikrobioty, wskazują, że przywracanie zdrowia



pacjentów wymaga często nie tylko specjalistycznego leczenia farmakologicznego czy chirurgicznego, ale także przywracania fizjologicznej równowagi w składzie mikrobioty przewodu pokarmowego pacjentów. Inaczej mówiąc, możliwe jest przywracanie zdrowej mikrobioty, poprzez stosowanie odpowiedniej diety, probiotyków i prebiotyków, a niekiedy nawet, w szczególnych przypadkach, poprzez przeszczep całej mikrobioty, to jest zarówno populacji bakterii hodowlanych, jak i niehodowlanych.

W zakończeniu niniejszego rozdziału pragniemy dodać, że w świetle obecnej wiedzy na temat epigenetycznych uwarunkowań cech fenotypowych człowieka składniki pokarmowe, w tym szczególnie zawarte w pożywieniu różnorodne związki organiczne pochodzenia roślinnego, nie tylko mają wpływ na skład mikrobioty człowieka, lecz także bezpośrednio lub pośrednio regulują aktywność wielu genów na poziomie ich transkrypcji i translacji [54]. W jednym z kolejnych numerów „Journal of Health Study and Medicine” zamierzamy opublikować oddzielny artykuł przeglądowy na ten bardzo interesujący i ważny temat.

### **Rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka**

Mikrobiom stanowi bardzo ważny składnik naszego ludzkiego ekosystemu i odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu naszego organizmu. W ostatnich 10 latach bardzo szybko poszerza się wiedza na temat roli biologicznej i znaczenia mikrobioty przewodu pokarmowego dla funkcjonowania całego organizmu człowieka, w tym szczególnie roli niezwykle obfitej i bardzo zróżnicowanej mikrobioty jelita grubego. Z racji dużego udziału mikrobioty w całym metabolizmie i funkcjonowaniu naszego organizmu w „zdrowiu i w chorobie” postuluje się uznanie mikrobioty przewodu pokarmowego za „zapomniany organ ludzkiego organizmu” (*forgotten organ of the human body*) [5, 55, 56]. Najogólniej można powiedzieć, że hodowlana i niehodowlana część mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka spełnia sześć najważniejszych funkcji: uczestniczy w trawieniu nieprzyswajalnych dla człowieka polisacharydów, wytwarza cenne witaminy z grupy B, witaminę K, kwas foliowy i pantotenowy, chroni przed inwazją gatunków bakterii chorobotwórczych, stale pobudza układ odpornościowy, degradowuje i detoksyfikuje w jelicie grubym toksyczne, mutagenne i karcynogenne związki chemiczne takie jak: nitrozoaminy, węglowodory aromatyczne, kwasy żółciowe, ksenobiotyki,

metale ciężkie, a także różne leki, ponadto utrzymuje w świetle kolejnych odcinków przewodu pokarmowego prawidłowy poziom kwasowości. Jelitowa flora bakteryjna na śluzówce jelit tworzy biofilm, który niejako mechanicznie uniemożliwia adhezję drobnoustrojom patogennym, konkurując z nimi o składniki odżywcze i siedlisko w zajmowanej mikroniszy [36, 57]. Różne gatunki mikrobioty, szczególnie grupa bakterii mlekowych, hamują wzrost i namnażanie się patogennych szczepów poprzez wydzielanie antybakteryjnych metabolitów, w tym różnych bakteriocyn o swoistym działaniu na określone patogenne gatunki bakterii [36]. Do innych związków hamujących namnażanie się bakterii patogennych, a produkowanych przez mikrobiotę jelitową, należy zaliczyć: lizozym, krótkołańcuchowe kwasy organiczne (mlekowy, octowy, propionowy, masłowy), aldehyd  $\beta$ -hydroksymasłowy oraz reaktywne formy tlenu [36, 58]. Wiele składników pożywienia jest opornych na działanie ludzkich enzymów trawiennych w żołądku i w jelicie cienkim. Niestrawione, nierozpuszczalne składniki pokarmu takie jak skrobia RS (*resistant starch*), nieskrobiowe polisacharydy (celuloza, pektyny, hemicelulozy, arabinoksyłan,  $\beta$ -gukan, mannan, inulina, lignina) w jelicie grubym są hydrolizowane do przyswajalnych przez człowieka krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs), które są włączane w pulę energetycznych metabolitów organizmu człowieka. Stężenie tych produktów w jelicie grubym może osiągnąć wartość 375  $\mu\text{mol}$  na litr treści. Szacuje się, że około 15% całkowitego zapotrzebowania człowieka na energię biologicznie użyteczną dostarczają konsorcja bakterioty jelita grubego w wyniku hydrolyzy wyżej wymienionych polisacharydów [35]. Opierając się na poznanej pełnej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka, ocenia się, że w całym katabolizm i anabolizm organizmu człowieka zaangażowanych jest około 2 tys. jego własnych białek enzymatycznych. Szacuje się, że bakterie i archeony mikrobioty, zasiedlające organizm człowieka, mają genetycznie uwarunkowane uzdolnienia do syntezy aż ponad 10 tys. białek enzymatycznych, które uczestniczą w różnorodnych biochemicznych reakcjach i szlakach przemiany materii [35,59].

### **Udział cząsteczek sygnałowych syntetyzowanych przez mikrobiotę przewodu pokarmowego w komunikacji z mózgiem człowieka**

Realizowane w ostatnich latach projekty badawcze dotyczące komunikacji mikrobioty przewodu pokarmowego z mózgiem człowieka przyno-

szą bardzo interesujące, by nie powiedzieć zaskakujące wyniki. Dlatego temat ten stał się jednym z bardzo ważnych kierunków współczesnych poszukiwań naukowych w wielu specjalistycznych ośrodkach naukowych świata. Narodowy Instytut Zdrowia USA (National Institute of Health) i inne rządowe instytucje finansujące badania naukowe w USA wydatkowały już na te projekty badawcze ponad 21 mln dolarów, a instytucje europejskie – ponad 14 mln dolarów. Celem kierunkowym prowadzonych badań jest głębsze wyjaśnienie zależności między rozwojem i funkcjonowaniem mózgu a mikrobiotą przewodu pokarmowego człowieka. Ważne pytania dotyczą dróg i molekularnych mechanizmów przekazywania sygnałów pomiędzy mózgiem i mikrobiotem oraz roli chemicznych cząsteczek sygnałowych, metabolitów produkowanych przez populacje bakterii zasiedlające przewód pokarmowy człowieka.

Publikowane w literaturze światowej wyniki wskazują jednoznacznie, że komunikacja mikrobioty przewodu pokarmowego z mózgiem człowieka zachodzi przy udziale wyspecjalizowanych układów i systemów sygnalingu: enteroendokrynnego systemu jelitowego (*enteroendocrine gut peptides system*, ENS), systemowego (*systemic communication*) i neuronalnego (*neural communication*) [39, 40, 60]. Enteroendokrynnne komórki (*L cells*) wydzielają hormony peptydowe GLP-1 i GLP-2 (*glucagon-like peptides*), które stymulują m.in. wydzielanie insuliny i transport glukozy. Odpowiednio wysoki poziom tych hormonów we krwi zapewnia poczucie sytości, a ich deficyt – poczucie głodu. Zmiany składu mikrobioty przewodu pokarmowego, a tym samym zmiany w puli metabolitów bakterii w jelitach regulują poziom sekrecji tych hormonów. Rolę bakteryjnych cząsteczek sygnałowych w tym systemie odgrywają krótkołańcuchowe kwasy organiczne (octan, propionian, maślan), które są produktami rozkładu przez bakterie jelitowe różnych nietrawionych przez człowieka polisacharydów. Dowiedziono, że regulacja sekrecji hormonów w tym systemie zachodzi poprzez receptor (GPR41) zlokalizowany na powierzchni komórek L, rozpoznawany przez wyżej wymienione bakteryjne cząsteczki sygnałowe [61]. Doświadczenia na zwierzętach potwierdzają korelację pomiędzy aktywnością systemu enteroendokrynnego a składem mikrobioty jelit. U szczurów karmionych nietrawionymi przez te zwierzęta prebiotykami (np. oligofruktozą) obserwowano w jelicie grubym zarówno systematyczny wzrost populacji *Bifidobacterium* zdolnych do rozkładu tych polisacharydów, jak i wzrost liczby komórek L, produkujących hor-

mony peptydowe GLP-1 i GLP-2. Podobnie u myszy z uwarunkowaną genetycznie otyłością, karmionych prebiotykami, obserwowano systematyczny wzrost w jelicie grubym zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i towarzyszący mu wzrost poziomu hormonów GLP-1 i GLP-2 [60, 62]. Inną, bezpośrednią, drogę komunikacji pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego i ośrodkiem w mózgu człowieka zapewnia nerw błędny, najdłuższy nerw czaszkowy, który unerwia cały układ jelitowy.

Naruszenie symbiotycznej równowagi pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego i gospodarzem ma poważne konsekwencje nie tylko w postaci wcześniej wspomnianych chorób przewodu pokarmowego i chorób metabolicznych, lecz także niektórych chorób neurologicznych. Stany zapalne jelit człowieka oraz inne choroby i czynniki naruszające tę równowagę mogą manifestować się stanami przygnębienia, a nawet depresji, w wyniku wydzielania cytokin prozapalnych, które mają działanie depresyjne. I odwrotnie, depresje, stresi indukują syntezę kortyzolu zwanego hormonem stresu, mogą także prowadzić do naruszenia tej koniecznej dla zdrowia równowagi [22, 39]. Okazało się, że określone gatunki bakterii, składowe mikrobioty jelitowej, modulują również syntezę i funkcjonowanie przekaźników neurologicznych, neurotransmiterów 5-hydroksytryptofanu i serotoniny. Opublikowane ostatnio wyniki wskazują, że około 95% puli serotoniny jest produkowane w przewodzie pokarmowym, a synteza i sekrecja tego niezwykle ważnego neuroprzekaźnika odpowiedzialnego za komunikację flory jelitowej z mózgiem jest indukowana przez określone populacje bakterii [63, 64]. Stosunkowo dobrze jest udokumentowana także rola bakterii jelitowych, które mają enzymatyczne zdolności do syntezy lub rozkładu aminokwasu tryptofanu, wyjściowego substratu dla syntezy dwóch ważnych neuroprzekaźników, 5-hydroksytryptofanu i serotoniny. Nie tak dawno opublikowano niezwykle interesujące wyniki wskazujące, że bakterie *Bacteroides fragilis* obecne w mikrobiocie jelitowej człowieka są zdolne syntetyzować duże ilości enzymu tryptofanazy, degradującego tryptofan. Obecność dużej populacji bakterii tego gatunku w mikrobiocie jelitowej prowadzi więc do redukcji puli tryptofanu w organizmie człowieka, zatem ogranicza lub uniemożliwia syntezę dwóch niezwykle ważnych neuroprzekaźników 5-hydroksytryptofanu i serotoniny, a tym samym zaburza komunikację pomiędzy mikrobiotą i mózgiem człowie-

ka. Autorzy cytowanych prac sugerują możliwość związku pomiędzy obecnością i aktywnością tych bakterii w przewodzie pokarmowym dzieci z autyzmem [22, 39, 40, 65]. Co więcej, na modelu zwierząt doświadczalnych wykazano wpływ bakterii mikrobioty jelita grubego na anatomiczną budowę i funkcjonowanie mózgu. Zaobserwowano, że gryzoni pozbawione flory bakteryjnej zachowują się tak, jakby nie znały poczucia strachu przed niebezpieczeństwem, a w hipokampie mózgu tych zwierząt ujawniono poważne zmiany anatomiczne, zaburzające reakcję na zagrożenie i stres, wskazujące, że mikrobiota przewodu pokarmowego oddziałuje zarówno na zdrowie fizyczne, jak i psychiczne zwierząt. Opisano także ostatnio wyniki uzyskane w badaniach na modelu myszy (*germ free*) wskazujące, że mikrobiota jelitowa jest niezbędna dla regulacji ekspresji genów związanych z tworzeniem i strukturą mielin w aksonach istoty białej mózgu [66]. Autorzy pracy sugerują, że utrata lub osłabienie osłonki mielinowej aksonów w istocie białej może mieć bezpośredni związek z przewlekłą bezsensownością, świadomością i czujnością, a być może także chorobą Alzheimera. Wyniki opisane w cytowanych pracach, wskazujące, że mikrobiota przewodu pokarmowego człowieka ma bardzo istotny wpływ nie tylko na jego zdrowie fizyczne, lecz także psychiczne stały się impulsem do podjęcia w wielu ośrodkach naukowych świata wielokierunkowych badań poznawczych w tej ważnej dla zdrowia człowieka dziedzinie.

### Podsumowanie

Prowadzone od 2007 r. w wielu krajach świata liczne projekty badawcze dotyczące symbiotycznej mikrobioty zasiedlającej ludzi przynoszą nowe, ważne, a często zaskakujące wyniki na temat roli biologicznej mikroorganizmów dla zdrowia człowieka. Szybko poszerzająca się wiedza na ten temat przybliży realizację kierunkowych celów nakreślonych w 2007 r., kiedy to podejmowano ogromny projekt badawczy *Human Microbiome Project* (HMP). W świetle obecnej wiedzy można sądzić, że założone wówczas cele kierunkowe: opracowanie nowych testów diagnostycznych, nowych biomarkerów zdrowia człowieka, a także nowych prebiotyków modyfikujących w pożądanym kierunku skład i funkcję mikrobioty jelitowej, poznanie i zrozumienie mechanizmów działania bakteryjnych cząsteczek sygnałowych oraz sposobów modulowania przez bakterie neuroprzekazników zostaną zrealizowane w niedalekiej przyszłości.

Można mieć także nadzieję, że zgromadzona wiedza umożliwi decydującym i konsumentom lepiej zrozumieć fizjologiczne potrzeby pokarmowe ludzi, co przełoży się na opracowanie i ustalenie nowych zaleceń i regulacji dotyczących produkcji żywności, jej dystrybucji oraz konsumpcji. „Tajemnica zdrowia człowieka tkwi w bardzo dużej części nie w materiale genetycznym, lecz w regulacji jego aktywności. DNA jest jak scenariusz, ale w zależności od reżysera, aktorów oraz ich zamysłów nawet identyczny scenariusz może być bardzo różnie realizowany” [67], a składniki naszej diety w świetle współczesnej wiedzy są ważnymi epigenetycznymi regulatorami aktywności genów od poczęcia aż do śmierci człowieka.

*If you have alternation in the brain, you will almost certainly have altered output to the gut because the two organs are that closely connected. Conversely, feedback signals from the gut to the brain go well beyond obvious hungry-versus-full message; abnormalities in the digestive system can directly shape both cognitive and emotional state*  
– dr Emeran Mayer, University of California, Los Angeles.

## Piśmiennictwo

1. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449(7164): 804-810.
2. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 1(6): 6ra14.
3. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320(5883): 1647-1651.
4. Gillet LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 2006; 106(2): 253-276.
5. Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C, Fiorentini C. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37(1): 1-14.

6. Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol Res* 2015; 37(2): 223-236.
7. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312(5778): 1355-1359.
8. Candela M, Turroni S, Centanni M, et al. Relevance of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* plasminogen binding activity in the human gastrointestinal microenvironment. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(19): 7072-7076.
9. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 2008; 3(6): 417-427.
10. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(16): 7503-7508.
11. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenkov T, et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe* 2010; 8(3): 292-300.
12. Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 2009; 324(5931): 1190-1192.
13. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 2009 ; 19(4): 636-643.
14. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 2015; 5(17): 690-703.
15. Gao J, Wu H, Liu J. Importance of gut microbiota in health and diseases of new born infants. *Exp Ther Med* 2016; 12(1): 28-32.

16. Liu S, da Cunha AP, Rezende RM, et al. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA. *Cell Host Microbe* 2016; 19(1): 32-43.
17. Qian L, Song H, Cai W. Determination of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in breast milk of healthy women by digital PCR. *Benef Microbes* 2016; 7(4): 559-569.
18. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol* 2013; 13:116.
19. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodríguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 2007; 98 (1): 96-100.
20. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008; 3(8): 3056.
21. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6(237): 237ra65.
22. Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* 2014; 20(9): 509-518
23. Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, et al. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2012; 302(9): 966-978
24. Blaser MJ. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. *EMBO Rep* 2006; 7(10): 956-960.
25. Cho I, Blaser MJ. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13(4): 260-270.



26. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010; 139(6): 1844-1854.
27. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490(7418): 55-60.
28. Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigid P. Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr)* 2012; 34(1): 247-267.
29. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 2005; 40(1): 28-37.
30. Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(10): 6113-6122.
31. Salazar N, Arboleya S, Valdés L, et al. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet* 2014; 5: 406.
32. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5): 313-323.
33. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(43): 16731-16736.

34. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2009; 20(10): 743-752.
35. Candela M, Maccaferri S, Turrone S, Carnevali P, Brigidi P. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *Int J Food Microbiol* 2010; 140(2-3):93-101.
36. Fiedurek J. Mikrobiom a zdrowie człowieka. Wydawnictwo UMCS Lublin. 2014.
37. Latorre M, Krishnareddy S, Freedberg DE. Microbiome as mediator: Do systemic infections start in the gut? *World J Gastroenterol* 2015; 21(37): 10487-10492.
38. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015; 31(1): 69-75.
39. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 2014; 34(46): 15490-15496.
40. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014; 20(39): 14105-14125.
41. Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014 Jul 21;20(27):8886-8897.
42. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56(5): 305-309.
43. Zdolińska I. Zaburzenia mikroflory jelitowej, „Żyjmy dłużej”, 2007, 2, 14-15.

44. Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(8): 562-566.
45. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016; 535(7610): 85-93.
46. Yamada T, Shimizu K, Ogura H, et al. Rapid and sustained long-term decrease of fecal short-chain fatty acids in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *JPEN* 2015;39: 569-577.
47. Latorre M, Krishnareddy S, Freedberg DE. Microbiome as mediator: Do systemic infections start in the gut? *World J Gastroenterol* 2015; 21(37): 10487-10492.
48. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455(7216): 1109-1113.
49. Vogensen FK, van den Berg F, Nielsen DS., et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5(2): 1-10.
50. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(2): 501-518.
51. Haghikia A, Landmesser U. Emerging role of the gut microbiome for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2015; 36(45): 3130-3132.
52. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444(7122): 1027-1031.
53. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26(1): 5-11.

54. Spork P. Drugi Kod. Epigenetyka, czyli jak możemy sterować własnymi genotypami. Wyd. W.A.B., 2011.
55. Marchesi JR. Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut. *Adv Appl Microbiol* 2010; 72: 43-62.
56. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7(7): 688-693.
57. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016; 535(7610): 75-84.
58. Boder P, Chcialowski A. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009; 3(1): 58-64.
59. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136(1): 65-80.
60. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(43): 16767-16772.
61. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(6): 729-734.
62. Sherman PM, Cabana M, Gibson GR, et al. Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic summit meeting, New York City, June 27-28, 2008. *J Pediatr* 2009; 155(5): 61-70.
63. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 2015; 161(2): 264-276.
64. Eisenstein M. Microbiome: bacterial broadband. *Nature* 2016; 533(7603): 104-106.

65. El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Front Microbiol* 2014; 5: 146.
66. Kelly JR, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. *Ann Epidemiol* 2016; 26(5): 366-372.
67. Carrey N. *The Epigenetics Revolution: how modern biology is rewriting our understanding of genetics, disease, and inheritance.* 2012.

**Adres do korespondencji**

prof. dr hab. Adam Jaworski  
Społeczna Akademia Nauk  
ul. Gdańska 121, 90-519 Łódź  
email: adam@biol.uni.lodz.pl





## Syntetyczna biologia od bakteriofaga lambda do syntetycznej bakterii Synthia (*Mycoplasma laboratorium*)

Synthetic biology from bacteriophage lambda to synthetic bacteria Synthia (*Mycoplasma laboratorium*)

Wiesław Barabasz<sup>1</sup>, Anna Pikulicka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Agricultural University in Kraków

### Streszczenie

Biologia syntetyczna (*SynBio*) to nauka, która zajmuje się tworzeniem syntetycznych układów biologicznych, zdolnych wykonywać określone, zaprogramowane funkcje. Biologia syntetyczna łączy w sobie wiele różnych dziedzin, takich jak inżynieria genetyczna, biofizyka, biologia molekularna, biotechnologia, a także informatyka i modelowanie matematyczne. Biologia syntetyczna kładzie duży nacisk na takie modelowanie procesów zachodzących w komórce, aby można dokładnie przewidzieć, jak będzie działał projektowany układ, zanim jeszcze się go skonstruuje. Biologia syntetyczna daje potencjalną możliwość tworzenia mikroorganizmów, które całkowicie stworzone w warunkach laboratoryjnych mogłyby wytwarzać wszelkiego rodzaju nowe farmaceutyki, wykrywać substancje toksyczne, rozkładać zanieczyszczenia, niszczyć komórki rakowe, produkować biopaliwa dla pojazdów przyszłości czy nawet naprawiać uszkodzone geny. Celem biologii syntetycznej jest m.in. projektowanie i budowa nowych elementów biologicznych, takich jak enzymy, układy genetyczne i komórki, a także przebudowa istniejących systemów biologicznych. Duże znaczenie w powodzeniu biologii syntetycznej i jej działań będzie miało modelowanie matematyczne, które umożliwi przewidywanie niektórych cech nowych układów, co może posłużyć do ich

udoskonalania w celu wyeliminowania wad lub wprowadzenia pewnych usprawnień. Biologia syntetyczna zapowiada uzyskanie znacznych korzyści dla zdrowia, środowiska, zasobów żywnościowych i skutków ekonomicznych. Biologia syntetyczna może przynieść znacznie więcej korzyści, które swą wartością przewyższą obecne dylematy moralne i etyczne związane z tą nowoczesną dziedziną nauk biologicznych i medycznych. Biologia syntetyczna jest dyscypliną naukową o krok bardziej zaawansowaną niż biotechnologia i nie powinniśmy się obawiać jej niewłaściwego wykorzystania.

### **Słowa kluczowe**

biologia syntetyczna (SynBio), modelowanie procesów, bioinformatyka, sztuczne bakterie

### **Summary**

*Synthetic Biology (SynBio) is the science that deals with the creation of synthetic biological systems, able to perform certain programmed functions. Synthetic biology combines many different fields, such as genetic engineering, biophysics, molecular biology, biotechnology, and information technology and mathematical modeling. Synthetic biology puts a strong emphasis on modeling of processes in the cell, so that you can predict exactly how it will work designed system before it construct. Synthetic biology provides the potential to create microorganisms that are fully developed in the laboratory could produce all kinds of new pharmaceuticals, detect toxic substances decompose pollutants, destroy cancer cells, to produce biofuels for vehicles of the future, or even repair damaged genes. The aim of synthetic biology is, among other things, the design and construction of new biological elements, such as enzymes, genetic circuits and cells, as well as the reconstruction of existing biological systems. Of great importance in the success of synthetic biology and its actions will have a mathematical modeling, which allows to predict certain features of the new systems, which can be used to improve them in order to eliminate defects or introduce some improvements. Synthetic biology promises to achieve significant benefits to health, the environment, food resources and the economic impact. Synthetic biology can bring much more benefits that exceed the value of their present moral dilemmas and ethical issues related to the modern field of biological and medical sciences. Synthetic biology*



*is a scientific discipline one step more advanced than biotechnology and we should not fear its misuse.*

**Key words**

*Synthetic Biology (SynBio), process modeling, bioinformatics, artificial bacteria*

**Wprowadzenie**

Idea stworzenia „sztucznego życia” dla współczesnych biologów jest, co prawda, fascynująca, należy jednak postawić pytanie, czy w drugiej dekadzie XXI w. można zaprojektować i stworzyć nowy organizm w warunkach laboratoryjnych. Organizm nie bardzo skomplikowany, ale stosunkowo prosty, sztuczny system biologiczny, np. wirusa czy bakterię [1,2]. Okazuje się, że ostatnie osiągnięcia z zakresu biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwalają mieć nadzieję, że taki organizm można będzie w niezbyt odległym czasie „stworzyć” w warunkach laboratoryjnych. Jego „rodzicami” będą komputer oraz „narzędzia” nowej dyscypliny nauki, nazwanej przez profesora Wacława Szybalskiego, biologią syntetyczną. Biologia syntetyczna jest połączeniem biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, a kierunkowym celem tej dyscypliny jest projektowanie i konstruowanie sztucznych systemów biologicznych wzorowanych na naturalnych, ale tych, które nie istnieją w naturze [3, 4,5,6,7].

Według Wacława Szybalskiego biologia syntetyczna (*SynBio*) jest dyscypliną naukową o krok bardziej zaawansowaną niż biotechnologia, bowiem wykracza zdecydowanie poza ramy „typowej” biotechnologii [8]. Biologia syntetyczna to nauka, która zajmuje się tworzeniem syntetycznych układów biologicznych zdolnych wykonywać określone, zaprogramowane funkcje. Mówi się o konstruowaniu „biologicznych maszyn”, ponieważ można by tak zmodyfikować prosty organizm, np. bakterię *Escherichia coli*, aby reagowała w określony sposób na różne bodźce [9, 10]. Biologia syntetyczna łączy w sobie wiele różnych dziedzin takich jak inżynieria genetyczna, biofizyka, biologia molekularna, biotechnologia, a także informatyka i modelowanie matematyczne. Biologia syntetyczna kładzie duży nacisk na takie modelowanie procesów zachodzących w komórce, aby można dokładnie przewidzieć, jak będzie działał pro-

projektowany układ, zanim jeszcze się go skonstruuje. Naukowcy sądzą, że prowadząc badania w tej dziedzinie, zbliżają się do rozwiązania problemów fundamentalnych, takich jak ten, czym jest i jaka jest istota życia, a także do poszukiwania odpowiedzi na pytanie o początki życia na Ziemi i rozważań, czy gdzieś we wszechświecie może istnieć życie „skonstruowane” inaczej, oparte na innych zasadach niż na Ziemi. Interesująca jest także potencjalna możliwość tworzenia mikroorganizmów, które – całkowicie stworzone w warunkach laboratoryjnych – mogłyby wytwarzać wszelkiego rodzaju nowe farmaceutyki, wykrywać substancje toksyczne, rozkładać zanieczyszczenia, niszczyć komórki rakowe, produkować biopaliwa dla pojazdów przyszłości czy nawet naprawiać uszkodzone geny [11,12]. Ważnym aspektem jest też dążenie do standaryzacji biologicznych części, czyli tworzenia najprostszych „klocków”, tj. „biocegiełek”, syntetycznych elementów genetycznych (*BioBrick*), z których budować się będzie projektowane nowe układy biologiczne [13, 14, 15, 16]. Dzięki standaryzacji poszczególnych elementów układu możliwe będzie ich zastąpienie przez inne części w szybki i łatwy sposób. Oczywiście w biologii nie dysponujemy pełną wiedzą na temat działania wszystkich elementów biologicznych, ale wprowadzając coraz to nowe elementy do układów już działających, możemy poznać ich funkcję i procesy przez nie przeprowadzane. Standardowe części biologiczne można pozyskać z żywych organizmów w procesie powielania wybranej sekwencji DNA techniką nazywaną „PCR” [17, 18].

Zgromadzona dotychczas wiedza z zakresu nanotechnologii, genomiki, biologii molekularnej i technologii genomowej stworzyła realną szansę na dynamiczny rozwój syntetycznej biologii w najbliższej przyszłości. Każdy gen jest przecież specyficznym odcinkiem nici DNA, a jego sekwencje umiemy teraz szybko „czytać i pisać”, to znaczy sekwencjonować i syntetyzować w laboratorium! Ponadto zsekwencjonowanie genomu ludzkiego nie tylko pobudziło naszą wyobraźnię (np. medycyna personalna), lecz także pozwoliło postawić nowe ważne pytanie. Co dalej?

W 1974 r. profesor Wacław Szybalski, odpowiadając na pytanie „Co dalej?”, wprowadził do słownictwa naukowego termin biologia syntetyczna: „Aż do teraz pracowaliśmy nad opisową fazą biologii molekularnej. Jednakże prawdziwym wyzwaniem jest wkroczenie do fazy badań obejmujących biologię syntetyczną. Będziemy wymyślać nowe elementy kontrolne i wprowadzać je do genomów lub tworzyć od podstaw nowe

genomy. Będzie to pole do popisu o niczym nieograniczonym potencjale badawczym i praktycznie braku żadnych ograniczeń względem tworzenia «nowych, lepszych układów regulacyjnych» i w końcu... całych „syntetycznych” organizmów na podobieństwo «nowych, lepszych myszy»... Nie mam obaw co do tego, że da to początek ekscytującym, nowatorskim ideom w dziedzinie całej biologii syntetycznej”.

Należy w tym miejscu przypomnieć czytelnikom, że profesor Wacław Szybalski jest wybitnym polskim uczonym, biologiem molekularnym i genetykiem, szanowanym profesorem na Uniwersytecie Wisconsin-Madison w USA. Jego nazwisko kojarzone jest w świecie z bardzo różnorodnymi badaniami, ale przede wszystkim z tymi, które pozwoliły na opracowanie rewolucyjnych metod transformacji i transfekcji, tj. wprowadzania materiału genetycznego do komórek ludzkich. Wcześniej uważano, że transformować można obcym DNA wyłącznie proste komórki bakteryjne. Profesorowi Szybalskiemu i jego żonie Elżbiecie udało się wprowadzić obce DNA do komórek ludzkich i w ten sposób został on „ojcem chrzestnym” transformacji (transfekcji) zarówno komórek ludzkich, jak i innych komórek eukariotycznych [8, 19]. Waga tego odkrycia była na miarę Nagrody Nobla. Metody, które opracował, umożliwiły profesorowi otrzymanie w 1963 r. pierwszych hybrydomów, a także ponad 10 lat później (1975 r.) umożliwiły produkcję przeciwciał monoklonalnych przez komórki mysie (za co Nagrodę Nobla w 1984 r. otrzymali Georges Köhler i Cesar Milstein). Przeciwciała monoklonalne są niezwykle ważnymi narzędziami w diagnostyce i leczeniu wielu chorób. Badania prowadzone przez profesora Wacława Szybalskiego przyczyniły się także do powstania nowej dziedziny medycyny, ciągle jeszcze w fazie eksperymentalnej, ale obiecującej – terapii genowej [20]. Światowy rozgłos przyniósł prof. Szybalskiemu badania nad bakteriofagiem lambda [21, 22]. Spowodowały one przełom w biologii molekularnej. Profesor Wacław Szybalski odkrył, że informacja genetyczna zawarta w DNA tego ważnego wirusa bakteryjnego czytana jest w specyficzny sposób z obu nici DNA. Były to pierwsze doświadczenia wykazujące transkrypcyjną kontrolę rozwoju organizmu. Jego uwagi i hipotezy posłużyły innym i zostały wykorzystane w pracach uhonorowanych później Nagrodą Nobla. To właśnie profesor Wacław Szybalski jako pierwszy zaproponował zastosowanie wspomnianego faga lambda w klonowaniu genów, co potem pomogło innym amerykańskim badaczom w opracowaniu strategii klonowania fragmen-

tów DNA, co zostało uhonorowane Nagrodą Nobla [23]. Przeprowadzone w jego laboratorium doświadczenia lub stawiane przez niego hipotezy naukowe poprzedziły także inne wielkie odkrycia, takie jak odkrycie intronów i exonów czy też odkrycie u wirusów specyficznego enzymu odwrotnej transkryptazy.

### **Biologia syntetyczna – cele i kierunki poszukiwań naukowych**

W odróżnieniu od klasycznej inżynierii genetycznej i biologii molekularnej w biologii syntetycznej kładzie się duży nacisk na racjonalne projektowanie nowych systemów biologicznych oraz wykorzystanie technik modelowania matematycznego w taki sposób, aby można było przewidzieć zachowanie się nowego układu oraz tak pokierować jego metabolizmem, aby jego działanie przebiegało w zamierzonym kierunku. Biologia syntetyczna różni się zatem zdecydowanie od inżynierii genetycznej i biotechnologii, które zajmują się modyfikacjami genów i genomów. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej oraz bioinformatyki, do którego doszło pod koniec XX w., stworzył solidne podstawy biologii syntetycznej. Kompletnie poznane genomy bardzo wielu organizmów oraz stworzone matematyczne modele opisujące interakcje genów i regulację ich ekspresji stworzyły podstawę rozwoju tej nowoczesnej dyscypliny. Ostatecznym celem konstruowania i badania syntetycznych cząsteczek i układów biologicznych ma być uzyskanie *ab initio* całych, prawidłowo funkcjonujących komórek, tkanek i organizmów syntetycznych. Naukowcy zajmujący się tworzeniem „syntetycznego życia”, wykorzystują techniki sekwencjonowania genów, syntezy DNA oraz modelowania matematycznego [24, 25, 26, 27]. Metody komputerowe pozwalają projektować i symulować sztuczne systemy biologiczne. Istotną rolę odgrywają także zaawansowane metody analizy komórkowej, stosowane w celu wykrycia zjawisk towarzyszących zmienionym szlakom bądź interakcjom, jakie mogą się pojawić w nowych, stworzonych w laboratoriach układach biologicznych.

Bardzo często uwaga biologów syntetycznych skupia się na wykorzystaniu naturalnych systemów biologicznych lub ich uproszczonych analogów jako komponentów nowo tworzonych układów syntetycznych. Najlepszym tego przykładem jest „syntetyczna komórka” Craiga Ventera, o której doniesienia obiegły cały świat, wzbudzając zarówno zachwyty, jak i kontrowersje w wymiarze etycznym [28, 29]. Skonstruowana przez zespół Craiga Ventera komórka to w istocie naturalna komórka *Mycopla-*

*sma bacterium*, do której wprowadzono syntetyczny genom, zmieniając w ten sposób określony, naturalny gatunek bakterii *Mycoplasma genitalium* w inny, noszący syntetyczny genom. Sztucznie stworzony genom, tj. chromosom o wielkości ponad 50000 pz, to najdłuższy odcinek DNA, jaki udało się wyprodukować w warunkach laboratoryjnych. Craig Venter, znany w świecie uczony, dzięki swojej roli w poznaniu sekwencji nukleotydowej ludzkiego genomu w ramach projektu *Human Genome Project* (1990–2003), jest obecnie jednym z najbardziej wpływowych naukowców zajmujących się biologią syntetyczną i życiem syntetycznym [30, 31]. Ponadto zespół kierowany przez Craiga Ventera postawił w 2005 r. ważne pytanie, ile z 482 genów *Mycoplasma genitalium* można usunąć, aby upośledzony organizm zachować przy życiu (w laboratorium). Okazało się, że wystarczą zaledwie 382 geny, które są absolutnie niezbędne do życia tak zmienionej bakterii [32]. Prowadzi się obecnie badania w ramach różnych projektów kreowania sztucznych systemów biologicznych, np. mikroorganizmów, które będzie można wykorzystać w medycynie, przemyśle, produkcji żywności czy ochronie środowiska [33, 34].

Duże znaczenie w powodzeniu biologii syntetycznej i jej działań będzie miało modelowanie matematyczne. Badania nad zachowaniem się układów biologicznych odgrywać będą bardzo ważną rolę w biologii syntetycznej. Wiele metod matematycznych znalazło zastosowanie do symulowania zachowania działania badanych układów syntetycznych. Często stosowane są implementacje teorii grafów, algebry Boole'a, układy zwyczajnych równań różniczkowych, stochastyczne równania różniczkowe oraz procesy Markowa. Ponieważ rozpatrywane systemy biologiczne mieszczą się w matematycznej definicji układu dynamicznego, to do ich badania można będzie stosować zasadniczo wszystkie techniki rozwinięte przez teorię układów dynamicznych. Dostępnych jest wiele narzędzi programistycznych umożliwiających prowadzenie takich symulacji, a także racjonalne projektowanie obwodów genetycznych, z czego wiele jest już dostępnych za darmo [35, 36].

Tworzenie matematycznych modeli opisujących projektowane układy pozwala na przewidzenie niektórych cech, co może posłużyć do ich udoskonalania w celu wyeliminowania wad lub wprowadzenia pewnych usprawnień. Obecnie zostały rozwinięte wielkoskalowe modele sieci genetycznych tworzone z myślą o zastosowaniach w biologii syntetycznej. Pozwalają one na odtwarzanie podstawowych procesów biologicznych

takich jak transkrypcja, translacja oraz wpływ czynników transkrypcyjnych oraz sygnałów środowiskowych na działanie obwodów genetycznych.

Niestety wraz ze wzrostem złożoności układu drastycznie narasta złożoność obliczeniowa symulacji oraz stopień nieprzewidywalności zachowania się układu. Dodatkowym utrudnieniem w tworzeniu poprawnie działających modeli jest duża liczba czynników zewnętrznych, które zakłócają jego działanie, a często nie są należycie uwzględniane (bądź nie są znane) podczas konstruowania nowych modeli biologicznych.

Jak pisze profesor Magdalena Fikus: „Idea syntetycznej biologii jest to, żeby życie wokół nas bardziej przystosować do potrzeb człowieka, bo wiem przystosowanie świata do człowieka nie jest celem ewolucji” [37].

### **Od inżynierii genetycznej do biologii syntetycznej**

Postęp cywilizacji dokonał się dzięki zmieniającym się i udoskonalanym technologiom oraz ciągłym poszukiwaniu lepszych aspektów i warunków życia ludzkiego. Dla biologów ważny okazał się rok 1953, kiedy to poznaliśmy strukturę DNA, czyli związku chemicznego obecnego w chromosomach, w którym zakodowany jest komplet informacji genetycznej żywego organizmu (Watson i Crick, *Nature*). Dalsze badania nad strukturą i funkcją biologiczną DNA pozwoliły na rozwój nowych dziedzin nauki, jakimi były biologia molekularna, genetyka molekularna, inżynieria genetyczna czy biotechnologia. Dokładna znajomość budowy oraz sekwencji DNA jest obecnie niezbędna do prowadzenia badań w zakresie biologii molekularnej i syntetycznej. Rozwój technik sekwencjonowania znacznie przyspieszył rozwój współczesnej biologii [38, 39]. Wprowadzanie licznych usprawnień technicznych oraz lepszych i szybszych metod bioinformatycznej obróbki danych znacznie przyspieszyło proces sekwencjonowania całych genomów, transkryptomów i proteomów człowieka oraz bardzo wielu innych organizmów. Biolodzy syntetyczni wykorzystują sekwencjonowanie do kilku celów. Po pierwsze, zakrojone na szeroką skalę projekty badania całych genomów pozwalają na lepsze zbadania naturalnie organizmów występujących na naszej planecie. Dokładna znajomość naturalnych genomów jest konieczna do ich modyfikowania bądź projektowania ich sztucznych odpowiedników. Innym celem sekwencjonowania jest ustalenie poprawności skonstruowanych sieci genetycznych i wykluczenie obecności przypadkowych mutacji, które mogłyby zaburzyć ich

działanie. W związku z tym pojawiło się ważne pytanie, czy można „podmienić” genom bakterii.

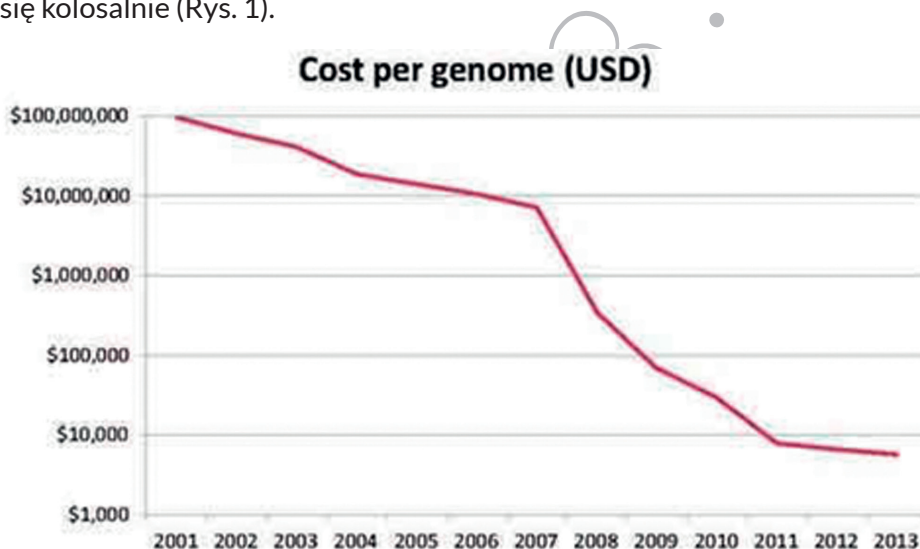
Najogólniej można powiedzieć, że obecne działania biologów syntetycznych zmiierają w dwóch kierunkach [40]:

- projektowanie i budowa nowych biologicznych części, urządzeń i systemów, które nie istnieją w świecie przyrody,
- rekonstrukcji (*re-design*), czyli ponownego projektowania istniejących naturalnych systemów biologicznych wykorzystywanych do celów użytecznych.

Pierwsza grupa badaczy wykorzystuje nienaturalne cząsteczki, próbując naśladować naturalne molekuly w celu stworzenia „sztucznego życia” lub zupełnie nowych elementów biologicznych, które służyć mogą do spełniania określonych pożytecznych funkcji. Mogą to być sztucznie syntetyzowane sekwencje DNA, które wcześniej nie istniały, albo syntetyczne substytuty nukleotydów czy substytuty aminokwasów itp. Druga grupa badaczy wykorzystuje naturalne cząsteczki i montuje je w systemy, które działają nienaturalnie i są wykorzystywane do budowy nowych układów biologicznych. Ogólnym celem jest poznanie, poprzez analizę i obserwację w warunkach laboratoryjnych, efektów działania takich skonstruowanych, nowych modeli. Do tej pory, dzięki biologii syntetycznej, udało się wyprodukować np. testy diagnostyczne dla chorób takich jak HIV oraz wirusów zapalenia wątroby [41].

Celem biologii syntetycznej jest m.in. projektowanie i budowa nowych elementów biologicznych takich jak enzymy, układy genetyczne i komórki, a także przebudowa istniejących systemów biologicznych. Biologia syntetyczna opiera się na postępie w biologii molekularnej komórki i biologii systemów. Elementem, który odróżnia biologię syntetyczną od tradycyjnej biologii, biologii molekularnej i komórkowej, jest możliwość projektowania i budowy najważniejszych elementów żywych komórek, tj. części enzymów, układów genetycznych, szlaków metabolicznych itd., które mogą być modelowane i dostosowane do spełniania określonych zadań. Te skonstruowane mniejsze elementy można następnie wykorzystywać do konstrukcji większych zintegrowanych systemów zdolnych do rozwiązywania konkretnych problemów. Podobnie jak inżynierowie projektowali układy scalone na podstawie znanych właściwości fizycznych materiałów, a następnie wytwarzali funkcjonujące obwody i całe procesory (o stosunkowo wysokiej niezawodności), syntetyczni biolodzy

wkrótce zapewne będą mogli projektować i budować systemy biologiczne. Należy jednak pamiętać o tym, że w przeciwieństwie do wielu innych dziedzin inżynierii biologia jako taka i jej procesy są mniej przewidywalne, a wynika to stąd, że mamy mniejszą wiedzę o elementach biologicznych wchodzących w skład komórki (sekwencje genów, właściwości białka, układy biologiczne) i ich zależnościach oraz bardzo złożonych interakcjach. Być może podejmowane próby „manipulowania” systemami życia na poziomie molekularnym doprowadzą jednak do lepszego zrozumienia i nowego podejścia do systemów biologicznych, tym bardziej że koszty sekwencjonowania DNA, RNA i białek w ciągu kilkunastu lat zmniejszyły się kolosalnie (Rys. 1).



Rysunek 1. Spadek kosztów sekwencjonowania ludzkiego genomu

Źródło: [www.BuildingBiotechnology.com](http://www.BuildingBiotechnology.com)

Syntetyczna biologia oferuje nowe możliwości tworzenia nowych gałęzi przemysłu z ważnymi skutkami ekonomicznymi i gospodarczymi. Jak postęp w dziedzinie chemii syntetycznej miał poważny wpływ na kształtowanie nowoczesnych struktur społecznych i gospodarczych w wiekach XIX i XX, tak biologia syntetyczna zapowiada uzyskanie znacznych korzyści dla zdrowia, środowiska, zasobów żywnościowych i skutków ekonomicznych. Wielu ludzi nie zdaje sobie sprawy ze stopnia zaawansowania dzisiejszych technologii ani z faktu, że takie modyfikacje są niezwykle precyzyjne. Biologia syntetyczna może przynieść znacznie więcej korzy-



ści, które swą wartością przewyższą obecne dylematy moralne i etyczne związane z tą bardzo nowoczesną dziedziną nauk biologicznych i medycznych.

Warto wspomnieć, że w czasopiśmie „Science” (2016 r.) znalazła się informacja, że zespół George’a Churcha z Harvard Medical School w Bostonie chce tak „przeprogramować” DNA bakterii *Escherichia coli*, aby było ono inne niż DNA wszystkich organizmów zamieszkujących Ziemię. Oznacza to konieczność dokonania ponad 62 tys. zmian w genomie bakterii. Oczywiście tak dużych zmian nie można dokonać klasycznymi molekularnymi metodami, w związku z tym zaprojektowano syntetyczny genom na komputerze i zsyntetyzowano go, fragment po fragmencie (każdy z nich liczył około 2 tys. par zasad). Krótkie odcinki zostały następnie połączone w dłuższe fragmenty DNA, po mniej więcej 50 tys. par zasad, a docelowo genom ma mieć wielkość 4 mln nukleotydów. Najpierw jednak naukowcy wypróbowują działanie poszczególnych segmentów syntetycznej bakterii, włączając je do genomów żywych bakterii i usuwając odpowiadającą im sekwencję. Na razie udało się znaleźć i naprawić 13 błędów skutkujących śmiercią bakterii; prace prawdopodobnie zostaną zakończone w ciągu kilku miesięcy. Nie będzie to jednak pierwsza sztuczna bakteria, bo podobną „skonstruowałam”, jak wspominałam wcześniej, zespół z Instytutu Craiga Ventera w La Jolla, ale ich syntetyczna bakteria ma genom skrajnie uproszczony. Natomiast obecnie zsyntetyzowana, zmodyfikowana bakteria *Escherichia coli* to projekt znacznie bardziej skomplikowany. Od naturalnych szczepów *Escherichia coli* będzie lepsza, będzie się różnić pod wieloma względami. Ma być odporna na wszelkie wirusy, niezdolna do wymiany genów z innymi organizmami i wytwarzająca białka, jakie nie występują w naturze. Zwykłe białka zbudowane są z 20 naturalnych aminokwasów. W wypadku udoskonalonej bakterii białka będą zawierać nowe aminokwasy syntetyczne. Co ważne, bez jednego z nich nie będą się mogły rozwijać w środowiskach naturalnych, toteż nie powinna sprawiać problemów, jeśli wydostanie się z laboratorium.

Oprócz nadziei i opisanych w artykule zalet biologii syntetycznej zgłaszane są także poważne naukowe wątpliwości związane z tworzeniem nowych komórek biologicznych, syntetycznych genów i genomów oraz ich potencjalnym wpływem na środowisko, ochronę przyrody, zrównoważone użytkowanie roślin w rolnictwie, różnorodność biologiczną

i zdrowie ludzkie. Prewencyjne podejście uregulowane ustawowo przez zobowiązania międzynarodowe oraz unijne ma zapobiec ewentualnemu zmniejszeniu różnorodności biologicznej przez produkty będące wytworem biologii syntetycznej.

### **Biologia syntetyczna w medycynie, przemyśle i w produkcji żywności**

Zarówno w Polsce, jak i w innych krajach rozwiniętych mamy do czynienia ze starzeniem się społeczeństwa. Ponadto jesteśmy świadkami nowej sytuacji, w której obserwuje się olbrzymi ruch ludności przemieszczającej się z obszarów wiejskich do miast. Nastąpił wzrost chorób zakaźnych spowodowany przez pojawienie się oporności na leki, a także ogólny wzrost chorób nowotworowych, otyłości, cukrzycy i chorób serca. Jest to poważny problem, który wymaga szybkiego rozwiązania i wyraźnie wskazuje, że musimy poprawić naszą zdolność do interwencji poprzez zastosowanie nowoczesnych metod diagnostyki, epidemiologicznego monitorowania chorób, leczenia, opieki i zapobiegania. Biologia syntetyczna stwarza możliwości opracowywania tanich, czułych testów w wypadku chorób zakaźnych, genetycznych i neurodegeneracyjnych. Bardzo znaczącym wkładem biologii syntetycznej wydaje się odkrywanie i poszukiwanie nowych skutecznych leków, w tym nowych antybiotyków [42]. Główne problemy w produkcji przemysłowej dotyczą dostaw surowców, kosztów produkcji i funkcjonalności przetworzonych materiałów [27, 43]. Surowce i produkcja są kosztowne ze względu na niedobór nakładów energii i wymogów kapitałowych oraz mogą być niebezpieczne dla pracowników i środowiska naturalnego. Materiały, które produkujemy, mają ograniczenia w ich funkcji i właściwościach. Materiały biologiczne są niedrogie, obfite i mają nowe funkcje takie jak samonaprawa, wytwarzane z niskim nakładem energetycznym w czystej produkcji. Biologia syntetyczna pozwoliłaby zmniejszyć zużycie energii, kosztów i negatywnego wpływu na środowisko, zapewniając przy tym lepsze właściwości nowym produktom. Lepsze właściwości mogą obejmować wytrzymałość, o czym świadczy np. produkcja nici pajęczej z wykorzystaniem zmodyfikowanych bakterii do tworzenia silniejszych materiałów włóknistych. Inne nowatorskie materiały obejmują materiały akrylowe produkowane z użyciem bakterii. To procesy, które zmniejszają zależność od dostaw ropy naftowej, a także emisję gazów cieplarnianych. W produkcji chemicznej są

opracowywane nowe biokatalizatory, które zmniejszają koszty i emisję szkodliwych dla środowiska produktów ubocznych. Niezwykle ważne wyzwanie dla biologii syntetycznej jest związane z zastosowaniem nowych źródeł energii. Zapotrzebowanie na energię nadal szybko rośnie z powodu rosnącej globalnej populacji i rozwijającego się świata. Duże ilości ropy i gazu należą do nielicznej grupy krajów, w tym niestabilnych politycznie. Kluczowe możliwości biologii syntetycznej w energetyce są związane z zastąpieniem paliw kopalnych biopaliwami, a także z poprawą wydajności i zmniejszeniem zanieczyszczenia. Obecnie trwają intensywne badania naukowe i prace wdrożeniowe nad optymalizacją procesów metabolicznych bakterii i zwiększenie produkcji etanolu. Paliwa drugiej generacji byłyby ekologiczne i zupełnie nieszkodliwe dla środowiska. Jako alternatywę dla istniejących, kopalnych źródeł energii proponuje się masową produkcję etanolu z celulozy; biopaliwa charakteryzującego się bardzo niską emisją dwutlenku węgla. Z kolei konstruowane nowe bakterie prośrodowiskowe będą mogły być szeroko wykorzystane do przeciwdziałania skutkom postępującego zanieczyszczenia środowiska naturalnego [44, 45]. Już w niedalekiej przyszłości globalne zwiększanie się populacji ludzkiej, wobec ograniczonej dostępności gruntów rolnych i ich ciągłego ubywania, a także wobec zachodzących zmian klimatycznych spowodują, że światowa produkcja żywności będzie musiała być coraz większa, bardziej efektywna i mniej podatna na działanie czynników zewnętrznych i dostępna przez cały rok [43]. Najnowsze osiągnięcia naukowe biologii syntetycznej mogą nam umożliwić tworzenie nowych, złożonych systemów biologicznych, które bez problemu będą mogły produkować w dużych ilościach dowolne białka jako produkt naturalny. Może to mieć rewolucyjny wpływ na nasze życie i sposób odżywiania, bowiem deficyt białka jest coraz bardziej dotkliwym problemem w krajach rozwijających się. Ponadto należy zaznaczyć, że w rolnictwie wprowadzanie nowych technologii jest często ograniczone względami bezpieczeństwa lub obawami o ich nadużycie. Biologia syntetyczna podejmuje to wyzwanie, bowiem ma olbrzymi potencjał do wzbogacenia zasobów żywności i może złagodzić niedobory żywności spowodowane przez rosnący popyt na żywność na całym świecie. Co prawda, mamy żywność GMO, ale ze względu na obawy o jej bezpieczeństwo, potęgowane przez organizacje ekologiczne i media, społeczeństwa wielu krajów sprzeciwiają się jej produkcji i dystrybucji. Przykładem zastosowania biologii syntetycznej do

rozwiązywania tych problemów jest już dzisiaj chociażby użycie drożdży piekarskich do masowej produkcji witamin i białek.

### **Obawy i zagrożenia**

Dynamiczny rozwój biologii syntetycznej zainicjował serię pytań dotyczących etyki, zagrożenia biologicznego, medycyny oraz ochrony własności intelektualnej. Podobnie jak podczas wcześniejszych debat na temat biotechnologii powstało wiele obaw związanych z niewłaściwym wykorzystaniem nowych odkryć i technologii będących owocami biologii syntetycznej [46]. Przykładem może być teoretyczna możliwość otrzymania patogennych mikroorganizmów na skutek zaistnienia nieznanymi wcześniej efektów wywołanych przez wprowadzenie obcych układów regulujących ekspresję genów. Badania przeprowadzone przez J. Craig Venter Institute, MIT oraz CSIS w 2007 r. miały na celu naukową ocenę niebezpieczeństwa takich badań i konstruowanych syntetycznych bakterii. Ponadto pojawiło się też kilka innych inicjatyw, których celem jest współpraca organizacji rządowych i naukowców nad krytyczną analizą możliwych zagrożeń wynikających z wprowadzania wielkoskalowych modyfikacji genetycznych organizmów. Przedstawiony w 2008 r. raport IASB „Technical solutions for biosecurity in synthetic biology” wyrósł z wcześniejszych propozycji wprowadzenia usprawnień technicznych, zapewniających większe bezpieczeństwo w zakładach przemysłowych i laboratoriach wykorzystujących osiągnięcia biologii syntetycznej [47]. Ponadto duże kontrowersje wzbudzają spory dotyczące praw patentowych do określonych sekwencji DNA lub białek [48].

Nie trzeba wielkiej fantazji, żeby wyobrazić sobie także rozmaite możliwe przykłady wykorzystania nowych metod nie dla pożytku ludzkości, ale wręcz przeciwnie – dla jej zagłady. Jeśli możliwe jest tworzenie mikroorganizmów, które będą „pracować” na rzecz człowieka, możliwe staje się tworzenie nowych chorobotwórczych drobnoustrojów jako złowrogiej broni biologicznej o nieznanym dotąd możliwościach. Takie dylematy towarzyszą naukowcom, pojawia się też wiele międzynarodowych inicjatyw mających na celu wypracowanie metod kontroli nad laboratoriami genetycznymi i zakładami, które wykorzystują osiągnięcia inżynierii genetycznej i biologii syntetycznej. Procedury związane z syntezą fragmentów DNA są wykonywane w laboratoriach coraz sprawniej i ta-

niej, dlatego tak ważne jest powołanie organów złożonych z naukowców i ekspertów rządowych, aby możliwa była kontrola tych prac.

W świetle ogromnych, często zaskakujących odkryć i dokonań XX i XXI w. w dziedzinie biologii i genetyki molekularnej, inżynierii genetycznej i biologii syntetycznej należy postawić także ważne pytanie: „Czego najbardziej się obawiamy i dlaczego?”

Prof. Magdalena Fikus, podsumowując nasze obawy, stwierdza, że: „możliwości ludzkiej ingerencji w przyrodę były od dawna bardzo imponujące – np. roślina, z której wyprowadzono kukurydzę – to dzika trawa. Jednak – dodała – była to zasługa „biotechnologii” klasycznej, gdzie nie zmieniano w sposób zamierzony określonych genów. Nieco bardziej zaawansowana biotechnologia pozwoliła na dodawanie do roślin pojedynczych genów z innych gatunków, które zmieniły ich cechy. Przykładem techniki GMO jest modyfikacja rośliny uprawnej poprzez dodanie białka produkowanego przez bakterię. Ochroniło to przed uszkodzeniem rośliny przez larwy szkodnika – omacnicy prosowianki”.

Badania genetyczne, inżynieria genetyczna, możliwości klonowania stoją już na tak wysokim poziomie rozwoju, że od tych zaawansowanych eksperymentów genetycznych nie ma odwrotu. Wizje i idee, które nam mogą się wydawać czystym science fiction, czystą abstrakcją, zaprzęają najtęższe mózgi świata. Na razie rzecz dzieje się przede wszystkim na poziomie najmniejszych, najprostszych organizmów – i tak pewnie będzie jeszcze przez długie lata. Myśląc optymistycznie, nie powinniśmy się zbyt obawiać. Możemy i chcemy mieć nadzieję na opracowanie nowych, bezpiecznych szczepionek, lepszych, skutecznych leków ratujących zdrowie i życie ludzkie, na zdrową żywność, a także konstrukcję zmodyfikowanych drobnoustrojów, „zaprzęganych” do przemysłowych procesów biotechnologicznych, unieszkodliwiania wszelkiego rodzaju środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych czy zdolnych do naprawiania uszkodzonych genów.

Nieuchronnie pojawił się cały szereg pytań i poważnych wątpliwości dotyczących niewłaściwego wykorzystania tych nowych, fascynujących osiągnięć nauki. [1, 49, 50, 51]. Dyskutowane wątpliwości, obawy i możliwe zagrożenia dotyczą następujących pytań i problemów:

1. Bioterroryzm – teoretyczna możliwość wykorzystania patogennych mikroorganizmów jako broni biologicznej o nieznanym dotąd właściwościach.

2. Czy próby zsyntetyzowania sztucznego życia są etyczne i moralne?
3. Czy „manipulowanie genami” to nie ingerencja w „naturalny porządek” świata ożywionego i w naturę przyrody?
4. Czy syntetyczne organizmy nie wyeliminują jakiegoś ważnego biologicznego ogniwa w jakimkolwiek ekosystemie?
5. Czy potrafimy powstrzymać rozmnażanie się źle skonstruowanego organizmu, który uwolnił się przypadkowo do otoczenia i może zagrażać ludzkości i całej biosferze?
6. Czy powinna istnieć jakaś nieprzekraczalna granica ingerencji człowieka w otaczającą przyrodę?
7. Czy stworzone nowe organizmy mogą przekazywać swoje nowe nabyte cechy horyzontalnie i wertykalnie? Czy będą podlegać naturalnej zmienności i ewolucji?

### Podsumowanie

Jako podsumowanie niniejszego artykułu pozwalamy sobie zacytować mało optymistyczną wypowiedź wybitnej uczonej, biologa i biotechnologa molekularnego z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, prof. dr hab. Magdaleny Fikus na temat braku rozumienia w Polsce zarówno wyzwań, jak i światowych osiągnięć współczesnej biologii syntetycznej:

„W internecie są dostępne poważne raporty międzynarodowe, przygotowane dla parlamentów i rządów przez zespoły naukowców. Kiedy dwa lata temu w Wielkiej Brytanii ukazał się raport dotyczący biologii syntetycznej, tamtejszy odpowiednik naszego ministerstwa nauki przyznał 6 mln funtów na założenie zespołu pracującego nad tą dziedziną. To była decyzja z dnia na dzień; takie decyzje w Polsce nie zapadają. Chciałabym dożyć takiej chwili, kiedy rząd i parlament polski będą chciały się dowiedzieć czegoś od grupy specjalistów na tematy, które na pewno pojawią się w życiu społecznym. Ale ludzie, którzy rządzą krajem, nie chcą wiedzieć o sprawach ważnych dla nauki, podobno nie mają na to czasu. Z tego powodu w dyskusji na temat GMO jesteśmy spóźnieni już o mniej więcej 20 lat. Na świecie nikt już o tym nie mówi, teraz dyskutuje się na temat biologii syntetycznej, o której wielu z naszych polityków nie ma żadnego pojęcia – nie będę mówiła, o co jestem gotowa się założyć” – oceniła prof. Fikus.

## Piśmiennictwo

1. Calvert J. Synthetic biology: constructing nature? *The Sociological Review* 2010; 58: 95-112.
2. Żylicz M. Biologia syntetyczna: jak powstało życie na Ziemi? *Nauka* 2013; 4: 7-18.
3. Szybalski W. In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription, Page 405. In: A. Kohn and A. Shatky (Eds.), *Control of Gene Expression*, pp. 23-4, and Discussion pp. 404-5 (Szybalski's concept of Synthetic Biology), 411-2, 415-7. New York: Plenum Press, 1974
4. [https://pl.wikipedia.org/wiki/Biologia\\_syntetyczna](https://pl.wikipedia.org/wiki/Biologia_syntetyczna)
5. <http://dolinabiotechnologiczna.pl/nowe-doniesienia/biotechnologia-nowosci/czym-jest-biologia-syntetyczna/>
6. <http://www.poradnia.pl/biologia-syntetyczna-do-czego-sluzzy.html>
7. <https://www.synberc.org/what-is-synbio>
8. Szybalski W. History of synthetic biology: Witnessing molecular biology from its beginnings. *Proceedings of The Fourth International Meeting on Synthetic Biology (SB 4.0)*, Hong Kong University of Science and Technology, The BioBrick Foundation, Oct. 10-12, 2008, pp. 48 - 50.
9. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 2000; 403 (6767): 339-342.
10. Leyskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, et al. Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* 2005 ; 441-442.
11. Borman S. Designed Pathways and Microbes. Hong Kong. Synthetic biology aims to generate biofuels, medicines, and novel organisms. *Chem Eng News* 2008; 86/46: 62-66.

12. Brune KD, Bayer TS. Engineering microbial consortia to enhance biomineralization and bioremediation. *Frontiers in Microbiology* 2012; 3: 203-207.
13. Calvert J. Ownership and sharing in synthetic biology: A 'diverse ecology' of the open and the proprietary? *BioSocieties* 2012; 7(2): 169-187.
14. Dana GV, Kuiken T, David Rejeski D, Allison A, Snow A A. Four Steps to Avoid a Synthetic-Biology Disaster. *Nature* 2012; 483: 29-31.
15. Lesiak JM, Stachowiak R, Bielecki J. Biologia syntetyczna jako nowa aplikacyjna dziedzina nauk ścisłych. *Post Mikrobiol* 2010; 49 (4): 233-237.
16. Moreno E. Design and Construction of "Synthetic Species". *PLoS ONE* 2012; 7: 1-6:
17. <http://syntheticbiology.northwestern.edu/>
18. <http://pubs.acs.org/journal/asbcd6>
19. Wieland M, Fussenegger M.: Engineering Molecular Circuits Using Synthetic Biology In Mammalian Cells. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2009; 3: 209-234.
20. Szybalski W. Synthetic biology and gene therapy (In Weigl's steps beyond his vaccine). in: Abstracts. 3rd Ukrainian-Polish Weigl Conference, Microbiology on service for human. pp. 26-27, Odesa National Mechnykov University, Odesa, Ukraine, 14-17 Sept. 2009.
21. Szybalski W. Genetic and molecular map of Escherichia coli bacteriophage lambda ( $\lambda$ ). In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. Fasman, G.D., Ed. 3rd Ed., Nucleic Acids, Vol. II. CRC Press, Cleveland, 1976, pp. 677-685.
22. Szybalska EH, Szybalski W. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 1979; 7: 217-270.



23. Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C, Venter JV. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (26): 15440-15445.
24. Bennett G, Gilman N, Stavrianakis A, Rabinow P. From synthetic biology to biohacking: are we prepared? *Natural Biotechnology* 2009; 27(12): 1109-1111.
25. Chopra P, Kamma A. Engineering life through Synthetic Biology. In *Silico Biology*, 2008; 6-9.
26. Jankowska E, Szczepaniak K, Sabat D. Biologia syntetyczna: budowanie funkcjonalnych układów. *Studia i Materiały Informatyki Stosowanej* 2013; 5(10): 22-28.
27. Wellhausen R, Mukunda G. Aspects of the political economy of development and synthetic biology. *Systems and Synthetic Biology* 2009; 3: 115-123.
28. Dormitzer PR, Suphaphiphat P, Gibson DG, et al. Synthetic Generation of Influenza Vaccine Viruses for Rapid Response to Pandemics. *Science: Translational Medicine* 2013; 5(185): 185-188.
29. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Science* 2008; 319: 1215-1220.
30. [https://en.wikipedia.org/wiki/Craig\\_Venter](https://en.wikipedia.org/wiki/Craig_Venter)
31. <https://www.theguardian.com/science/2013/oct/13/craig-ventner-mars>
32. Glass JI, Smith HO, Hutchinson CA, Alperovich N, Assad-Garcia N. (Inventors). J. Craig Venter Institute, Inc. (Assignee). Minimal bacterial genome. United States Patent Application 20070122826. 2007

33. Ledakowicz S. Od inżynierii metabolicznej przez biologią systemów do inżynierii biologicznej. *Inż Ap Chem* 2009; 48 (3): 17-20.
34. Legocki AB. Aplikacyjne perspektywy biologii ery postgenomowej. *Biotechnologia* 2008; 80: 9-14.
35. Marchisio MA, Stelling J. Computational design of synthetic gene circuits with composable parts. *Bioinformatics* 2008; 1903-1910.
36. Kaznessis YN. Models for Synthetic Biology". *BMC Systems Biology* 2007; 1: 47-49.
37. [http://www.pol-nord.eu/wypowiedzi/Magdalena\\_Fikus\\_o\\_patentach\[1\].pdf](http://www.pol-nord.eu/wypowiedzi/Magdalena_Fikus_o_patentach[1].pdf)
38. Drmanac R. Sequencing by hybridization (SBH): advantages, achievements, and opportunities. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2002; 77: 75-10.
39. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 2011; 3-11.
40. Church GM, Elowitz MB, Smoke CD, Voigt CV, Weiss R. Realizing the potentiation of synthetic biology. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 2014; 15: 289-293.
41. <https://www.ibiology.org/ibioeducation/taking-courses/synthetic-biology-course.html>
42. Peplow M. News: Malaria drug made in yeast causes market ferment. *Nature* 2013; 494, (7436): 160-161.
43. Porcar M, Pereto J. Are we doing synthetic biology? *Systems and Synthetic Biology* 2012; 6: 79-83.
44. Oldham P, Hall S, Burton G. Synthetic Biology: Mapping the Scientific Landscape. *PLoS ONE* 2012; 7(4): e34368.

45. Schmidt M, de Lorenzo V. Synthetic constructs in/for the environment: Managing the interplay between natural and engineered biology. *FEBS Letters* 2012; 586: 2199-2206.
46. Wright O, Stan GB, Ellis T. Building-in Biosafety for Synthetic Biology. *Microbiology* 2013; 159: 1221-1235.
47. <https://www.bio.org/articles/synthetic-biology-explained>
48. Schmidt M. Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety. *Systems and Synthetic Biology* (online first) DOI 10.1007/s11693-008-9018-z 2008.
49. Couzin J. Virology. Active poliovirus baked from scratch. *Science* 2002; 174-175.
50. de Lorenzo V. Environmental biosafety in the age of Synthetic Biology: Do we really need a radical new approach? *BioEssays* 2010; 32: 926-931.
51. Goldbla J.: The Biological Weapons Convention - An overview, *International Review of the Red Cross*, No. 318. 1997.

### **Adres do korespondencji**

prof. dr hab. Wiesław Barabasz  
Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy  
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków  
e-mail: rrbaraba@cyf-kr.edu.pl





## Nutrition of elderly people diagnosed with type 2 diabetes

Katarzyna Malinowska<sup>1</sup>, Agnieszka Bocian<sup>2</sup>,  
Roman Modranka<sup>3</sup>, Ireneusz Majsterek<sup>1F</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Clinical Biochemistry, Medical University of Lodz,

<sup>2</sup> Regional Centre for Diabetes and Metabolic Diseases in Lodz,  
the Specialist Hospital M. Pirogov Lodz,

<sup>3</sup>Chair of Cosmetology, University of Social Sciences, Warsaw

### SUMMARY

Diabetes is a disorder resulting from both genetic predispositions and unfavorable environmental factors. It is characterized by altered metabolism of carbohydrates, fats and proteins, whose cause is absolute or relative deficiency of insulin secretion and varying degrees of insulin resistance. Literature suggests that diet in diabetes is not much different from the rules of proper nutrition for healthy people. It is of paramount importance in maintaining a healthy body weight, normal blood glucose levels and optimal serum lipids.

The growing elderly population and the incidence of diabetes increasing in this group forced to take into account their specific needs. Since adequate nutrition is essential for the proper conduct and self-treatment of diabetes, the recommendation should be adapted to the nutritional habits of the elderly. Rating nutrition of people with type 2 diabetes should be comprehensive and take into account the unique nutritional needs of each patient.

The aim of the study was to assess dietary habits among elderly people suffering from type 2 diabetes and to compare the diets of older people with type 2 diabetes with nutritional recommendations of the Polish Diabetes Association.

**Key words**

diabetes, diet, therapy

**TYPE 2 DIABETES**

The etiology of type 2 diabetes is not fully explained. The major reason is the reduced sensitivity to insulin (insulin resistance) and impairment of  $\beta$ -cell function, which in turn leads to extensive metabolic and clinical onset of the disease [1,2,3,4]. Initially, the clinical symptoms are less marked, and therefore a diagnosis of the disease occurs when there already are complications. Insulin resistance, which affects the occurrence of diabetes, decreases the effectiveness of the biological activity of insulin on glucose metabolism. The end result of insulin resistance is reduction of the ability of the hormone to inhibit hepatic glucose production and increase of glucose uptake by muscle and fat. To compensate for the phenomenon of insulin resistance, the secretion increases to maintain a normal glucose level. In individuals predisposed to type 2 diabetes the  $\beta$ -cells are unable to compensate for long-term hyperglycemia and reach the concentration of glucose in the blood after meals. Disorders of insulin secretion are progressive and can lead to a fasting hyperglycemia [5,6].

The main predisposing factors for type 2 diabetes:

Insulin resistance is increased by the presence of genetic factors in families, high compatibility of occurrence in monozygotic twins and high prevalence in certain ethnic groups (e.g. Piam Indians) [7,8] and environmental factors associated with lifestyle and diet (high caloric diet, obesity, avoidance of physical exertion), differences in the incidence of similar populations living in different geographical areas (e.g. Asians in the US), aging and reduction of the delay in insulin secretion, delayed absorption of food [7].

The characteristics of the type 2 diabetes is the age over 30, often insidious onset with a few selected symptoms of rarely occurring ketoacidosis, no association with histocompatibility (HLA) genes, the incidence of diabetes in the family, compatibility of monozygotic twins, the ability to control the disease with diet and oral antidiabetic drugs – insulin treatment may also be necessary in coexistence of insulin resistance and relative deficit of glucose, and very often accompanying obesity [9].

The basic symptoms of diabetes include:

- a. thirst,
- b. polyuria, urinary frequency,
- c. the fatigue and malaise,
- d. skin and genitourinary infections (e.g. fungal),
- e. visual disturbance - transient myopia disorders,
- f. weight loss,
- g. complications: hypoglycemia, coma; chronic retinopathy, nephropathy, neuropathy, diabetic foot; changes in large vessels, cardiovascular disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease,
- h. mental disorders [7,10]

Treatment of type 2 diabetes consists of applying a proper diet, anti-diabetic drugs and/or insulin and moderate physical activity – a healthy lifestyle.

### THE ELDERLY DIABETES PATIENTS

The simplest definition of the elderly is based on the criterion of age. It is 65 years of age as the time in which a person enters into the old age. In practice, also other data such as information on the activity in life, intellectual and physical fitness, mental status, and comorbidities should be taken into account. Old age brings a lot of health problems such as cardiac and skeletal muscles, blurred vision, memory disorders or cardiovascular diseases [11].

Developing a diagnostic and therapeutic plan needs to take into account patient's current somatic state, assessment of the social, functional and approximate determination of survival. Among the risk factors for diabetes, the age extends in the foreground. Other factors that influence the glucose metabolism disorders in the elderly include changes in diet, decreased physical activity, decreased muscle mass, decreased insulin secretion and insulin resistance [11,12,13]. The development of glucose intolerance is a recognized metabolic change that occurs in the aging process, and a degree of glucose intolerance later in life is a common phenomenon occurring in healthy people. Within each decade of life after reaching 30, the auxiliary blood glucose increased on average of 5.3 mg/dl and fasting 1-2 mg/dl. A typical regimen of diabetes, including dietary restrictions, increased physical activity and pharmacologic interven-

tions, can lead to additional health risks in the elderly. Unwanted weight loss, decreases in the levels of glucose and downs contribute to adverse health effects. Nutritional intervention in older people is extremely important because it can prevent such risks [14]. Elderly patients tend to change dietary habits and reduce carbohydrates, which in the long term can predispose to glucose intolerance [15]. A diet that contains the right amount of carbohydrates improves the sensitivity of peripheral tissues to insulin in the elderly. An important factor in reducing insulin resistance and improving glucose tolerance is increasing physical effort, which often decreases with age [16,17].

## 2. TREATMENT OF DIABETES

In treatment of people diagnosed with diabetes it is necessary to recognize which type of diabetes we have to face. Depending on the type of diabetes, drug treatment, diet and controlled physical activity are used.

### 2.1. DIETARY TREATMENT

Dietary treatment is an integral part of the treatment of diabetes, which results in metabolic control. It takes into account the individual objectives of the treatment, the patient's energy requirement, which depends on the age and type of work [18].

Proper nutrition is of particular importance in diabetes, proper selection of foods can regulate sugar levels in the blood. In any case, it does not mean starvation or surrender of many favorite dishes. The diet should be varied, preferably based on organic food and similar to the physiological diet, but it should limit or completely eliminate sugar. There are important principles, compliance with which allows you to keep fit and maintain proper blood sugar levels [19]:

1. The standardization of body weight in diabetes is often accompanied by overweight and obesity. Overweight and obese people should be encouraged to limit calories. All overweight (BMI 25 to 29.9 kg/m<sup>2</sup>) or obese adults (BMI  $\geq$  30.0 kg/m<sup>2</sup>) are recommended to introduce lifestyle changes, which include reducing calorie intake and/or increased physical activity; a moderate reduction in caloric balance (500-1000 KCl/d), most patients on a weight loss diet should provide their bodies with at least 1000-1200 kcal/d in the case of women and 1200- 1600 kcal/d for men [20,21].



2. Several small meals throughout the day – right planned nutrition is best divided into 5- 6 small meals throughout the day. Monitoring the total carbohydrate content of the diet (use of carbohydrate replacement – 1 chocolate bar is about 10-12g carbohydrates), calculating the glycemic index of the products to prevent sudden surges in blood glucose and maintaining it at a constant level [22].

### **Carbohydrates**

Diabetic diet should consist of 40-50% of energy from carbohydrates with a low glycemic index (GI less than 50). The glycemic index of foods affects the content of simple sugars, their preparation, the fragmentation of food, fruit maturity and the use of fats. In addition to the glycemic index found in products we also distinguish glycemic load of the products. In 1997 the concept of glycemic load (GL) was introduced. It is a numeric value, taking into account both the quality and the amount of carbohydrates in the product. It is calculated by multiplying the quantity of the carbohydrates contained in food in grams. The result should then be divided by 100. The higher the product's GL, the greater the increase in concentration of glucose can be expected after ingestion. Glycemic load values: a low glycemic load of 10 or less, the average glycemic load between 11-19, the high glycemic index of 20 or less [1]. One gram of carbohydrates provides 4 kcal. Patients with diabetes should eat complex sugars – polysaccharides. Complex sugars are those which include: starch – present in large quantities in rice, cereals, potatoes, legumes, root vegetables, dextrin – obtained from hydrolysis of starch, glycogen – contained in the liver and muscles, cellulose and pectin – indigestible sugar contained in plant food [23]. Monosaccharides should be subject to restrictions. These include monosaccharides – glucose present in fruit, fructose in honey, ripe fruit, galactose – derived from lactose hydrolysis, and disaccharides – sucrose contained in beet and cane sugar, lactose present in milk and maltose derived from starch hydrolysis [23,24]. The recommended intake of disaccharides by diabetics should not exceed 5-10% of the total energy supply. Sucrose as a sweetener should not exceed 20 gm/day. In patients with diabetes with insulin deficiency and impaired hepatic glycogen synthesis the glucose and fructose caused hyperglycemic effect.

A diet rich in fibers improves glucose tolerance and decreases the secretion of insulin. In addition, a high intake of dietary fiber can improve other

metabolic parameters, may protect against the onset of cancer lesions and diverticulosis of the colon. The fiber contained in food is a heterogeneous group of complex polysaccharides that are resistant to digestive enzymes of the gastrointestinal tract. There is fiber soluble and insoluble in water. Cellulose, hemicellulose and lignin bind water and toxic metal ions and are insoluble in water (products, wheat and bran) [10,25,26].

### Fats

Fats should provide 30-35% of the energy value of the diet. 1 g of fat is 9 kcal. Saturated fats should be less than 10% of the energy value of the diet. In patients with elevated LDL-C  $\geq 100$  mg/dl fats should be less than 7%. Monounsaturated fats should provide 10-15% of the energy value of the diet. Polyunsaturated fats should constitute approximately 6-10% of the energy diet including omega-6 fatty acid: 5-8%, and omega-3 fatty acid: 1-2%. The cholesterol content in the diet should not exceed 300 mg/d. In patients with elevated LDL-C  $\geq 100$  mg/dl, this amount should be reduced to 200 mg/d. To lower LDL cholesterol levels, reduce the share of saturated fat in the diet and/or replace them with carbohydrates with a low IG index and/or monounsaturated fats [20]. The intake of trans fatty acids should be minimized.

Saturated fats are also found in palm oil and coconut. A diet high in saturated fat promotes the development of atherosclerosis by an increase in total cholesterol and LDL [23,27].

Unsaturated fats are of plant origin and comprise of mono and polyunsaturated fatty acids. A diet rich in monounsaturated fatty acids (MUFA), most often used in the form of olive oil, may improve insulin sensitivity, glycemic control and the level of HDL cholesterol and may reduce the level of triglycerides in the serum. Therefore, in accordance with the position of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), diabetics can consume monounsaturated fats without restrictions.

A diet rich in polyunsaturated fats (PUFA) found in corn oil: sunflower and saffron, lowers total cholesterol and LDL cholesterol while lowering HDL.

Polyunsaturated fatty acids of the omega-3 are contained in fish oil, and effectively reduce the risk of coronary heart disease in diabetic patients through [23];

- a. reducing the production of VLDL,
- b. decrease in blood pressure,
- c. reducing platelet aggregation
- d. prolongation of bleeding time.

### **Proteins**

The proportion of energy derived from protein in the diet should be 15-20% with the ratio of animal protein to vegetable protein of 1:1. Proteins are made up of amino acids linked by peptide bonds and provide about 4 kcal/g [20].

Animal proteins have high biological value, because they contain a suitable amount of essential amino acids, in contrast to vegetable protein characterized by low biological value [28].

### **Vitamins and minerals**

Supplementation with vitamins and micronutrients in patients in whom there was no deficiency is not advisable [15].

### **Alcohol**

Alcohol consumption by diabetic patients is not recommended. First, the patient should be advised that alcohol inhibits the release of glucose from the liver and therefore its consumption can promote the development of low blood sugar (hypoglycemia). Allowed standard consumption of pure ethanol (converted) is in an amount not greater than 20 g/d. for women and 30 g/d for men. It is forbidden for patients with dyslipidemia (hypertriglyceridemia) to consume alcohol, because it increases the disorder of lipid and fatty liver disease, neuropathy, and pancreatitis. Alcohol provides about 7 kcal/g of substance, not food, but it is an additional source of energy that must be taken into account when laying nutritional plan [28-30].

### **Sodium in the diet**

No more than 5000-6000 mg/d should be consumed by healthy people, by people with moderate hypertension  $\leq$  4800 mg/d, and by people with hypertension and nephropathy  $\leq$  4000 mg/d [20,31].

### Sweeteners

In patients with type 2 diabetes the maximum sucrose intake is 20 g/day, so as not to worsen the metabolic control. Patients especially obese, with hypertriglyceridemia, or poorly compensated metabolic diabetes should avoid eating large amounts of sucrose [32]. Fructose has been prohibited by the PTB from use by diabetic patients, due to the addition by the producers of glucose-fructose syrup in many products.

Xylitol is the alcohol obtained from the xylose present in vegetables and fruits. It provides about 4 kcal/g. It is absorbed slowly and does not increase the blood glucose and triglyceride levels.

Sorbitol (mannitol) is an alcohol obtained by the reduction of glucose or fructose. It provides 4 kcal/g. It is slowly absorbed. Sometimes induces an increase in blood glucose in patients with metabolic misalignment.

Saccharine is a sweetener, which is used mostly for patients with no calories, it is changed in the body and is expelled unchanged with the urine.

Cyclamates are thirty times sweeter than sucrose. They are devoid of the caloric content.

Aspartame is a sweetener a hundred times sweeter than sucrose. It provides about 4 kcal/g substance. However, it is unstable in solution and when heating food. Safe dose of aspartame is 50µg/kg/day. An important factor affecting the proper nutrition in diabetes, especially in overweight people, is to modify their behavior. Diet alone is often associated only with food ration on the plate. It includes, however, besides ration, the suitable culinary treatments and technology in food preparation and proper eating.

## 2.2 DIETARY TREATMENT OF ELDERLY PATIENTS

Institute of Medicine (IOM) published a list of references for nutrients in people aged 51-70 and over 70 years. The current recommended protein intake for adults is 0.8 g/kg per day. It also recommended the intake of 1.0-1.6 g/kg per day, and even 25-30 g of high-quality protein at every meal in the elderly [14,33].

Regarding the percentage of carbohydrates and fats in the diet of elderly, they are the same as in younger adults [14].

The recommended intake of fiber in patients aged >50 years is greater than in the above-mentioned group. Some older people avoid pro-

ducts with high fiber because of the difficulty in chewing and digestion. If the demand for dietary fiber in an amount of 21 g/day in women aged more than 50 years and 30 g/day in men aged more than 50 years is not satisfied, you should gradually increase it, eliminating intolerance symptoms: increased amount of gas, bloating, abdominal pain and diarrhea [34].

The recommended fluid intake in adult men and women does not change with age. Fluid intake should be monitored for proper hydration and prevention of hyperosmotic syndrome. Problems concerning the movement and use of toilets may discourage people to reach for fluids. However, modifications to the above guidelines may be necessary, if there are coexisting diseases such as e.g. presence of nephropathy [14].

A significant difference in terms of the nutritional objectives concerns the reduction of body weight in younger people who are overweight and obese, and the elderly. In the latter an aggressive weight loss treatment is not recommended. Older people with diabetes should not be encouraged to reduce body weight and introduce calorie restriction diet [14,22].

In the elderly the nutritional habits have long been shaped. Dietary recommendations, which lead to a reduction in choice of foods, or use long methods and conditions for preparing and eating meals can be rejected [26,25,27]. For the elderly the meals may be the greatest pleasure in the everyday routine. Therefore, drastic changes in the current feeding of the patient should not be made

## SUMMARY

Diabetes is a disease whose symptoms may initially be invisible and undetectable. Type 2 diabetes is also called adult-onset diabetes. According to physicians, the main reason for its occurrence is an unhealthy lifestyle, and above all obesity.

The elderly are characterized by the presence of metabolic disorders which are affected by body fat, insulin resistance, hypertension, and disorders of water. The basis for the treatment of type 2 diabetes is a behavioral treatment aimed at proper diet and exercise. Behavioral treatment of elderly people with type 2 diabetes can sometimes prove to be a serious obstacle. Elderly patients often have fixed habits and food preferences. Eating foods may also be one of the greatest pleasures in the daily

routine of life of older people. You should also keep in mind that too much restriction in the diet can lead to skipping meals and, consequently, lead to malnutrition.

## Literature

1. Merez A, Markiewicz L, Sliwinska A, Kosmalski M, Kasznicki J, Drzewoski J, Majsterek I. Analysis of oxidative DNA damage and its repair in Polish patients with diabetes mellitus type 2: Role in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Adv Med Sci* 2015; 60(2): 220-30.
2. Szostak BW, Cichocka A, Szostak-Węgierek D. Leczenie niefarmakologiczne cukrzycy. Leczenie dietą chorych na cukrzycę [w] Sieradzki J. (red.): *Cukrzyca*, Gdańsk: Via Medica, 2006. str. 396-406.
3. Belfiore F, Iannello S. Etiologiczna klasyfikacja, patofizjologia i rozpoznanie [w] Sieradzki J. (red.): *Nowe poglądy na cukrzycę i jej leczenie*, Kraków: Wydawnictwo Przegląd Lekarski 2002. str. 1- 14.
4. Weber KS, Strassburger K, Pacini G, Nowotny B, Müssig K, Szendroedi J, Herder C, Roden M. German Diabetes Study group. Circulating adiponectin concentration is inversely associated with glucose tolerance and insulin secretion in people with newly diagnosed diabetes. *Diabet Med* 2016; doi: 10.1111.
5. Kasznicki J, Sliwinska A, Kosmalski M, Merez A, Majsterek I, Drzewoski J. Genetic polymorphisms (Pro197Leu of Gpx1, +35A/C of SOD1, -262C/T of CAT), the level of antioxidant proteins (GPx1, SOD1, CAT) and the risk of distal symmetric polyneuropathy in Polish patients with type 2 diabetes mellitus. *Adv Med Sci* 2016; 61(1): 123-9.
6. John S. Complication in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndr* 2016;10(4):247-249.
7. Campbell IW, Lebovitz H. *Cukrzyca – fakty*. Gdańsk: Wydawnictwo Medyczne Via Medica, 2003. str. 1- 19.

8. Brookes AP. Jak poprawić przestrzeganie zaleceń lekarskich (compliance) wśród chorych na cukrzycę?. Forum Diabetologiczne 2005; 8: 3- 6.
9. Russell D, White, MD. Ćwiczenia w leczeniu cukrzycy. Medycyna po Dyplomie 2000; 2 (51): 124- 133.
10. Adamska Edyta, Górńska Maria, Indeks i ładunek glikemiczny diety w leczeniu cukrzycy, Diabetologia na co dzień 2008; 4 (13): 7-12.
11. Strojek K. Cukrzyca u osób w wieku podeszłym [w] Sieradzki J. (red.): Cukrzyca, Gdańsk: Via Medica; 2006. str. 610-616.
12. Steven R, Gambert T. Narastająca epidemia: cukrzyca a podeszły wiek: demografia, czynniki ekonomiczne i patofizjologia. Diabetologia po dyplomie 2007; 4 (1): 10-18.
13. Suhl E. Nauka samokontroli w cukrzycy dla osób w podeszłym wieku: podstawowe zasady i podejście praktyczne. Diabetologia po dyplomie 2007; 4 (1): 26-33.
14. Stanley K. Problemy związane z żywieniem w rosnącej populacji starszych chorych na cukrzycę. Diabetologia po dyplomie 2014; 11 (1): 32.
15. Kokoszka-Paszkot J. Cukrzyca u osób w podeszłym wieku- spojrzenie geriatry. Geriatria Polska 2006; 1: 41-47.
16. Ciborowska H, Rudnicka Anna. Dietetyka. Żywienie zdrowego chorego człowieka. Warszawa: PZWL; 2004. str. 392-393.
17. Czech Anna. Zasady i metody edukacji terapeutycznej osób z cukrzycą. Medycyna Metaboliczna. 2006; 2: 15-20.
18. Tatoń J. Leczenie za pomocą modyfikacji sposobu odżywiania: cele i zasady [w] Tatoń J. (red.): Diabetologia, Warszawa: PZWL ; 2001: 233-240.

19. Włodarek D. Niewłaściwe modyfikacje diety. *Diabetologia po dyplomie* 2105; 12 (1): 40-43.
20. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego: Terapia behawioralna. Zalecenia żywieniowe dla chorych na cukrzycę. *Diabetologia Praktyczna* 2014, 3 suplement A: A10- A11.
21. Watkins JP, ABC Cukrzycy. Gdańsk: Wydawnictwo Medyczne Via Medica; 2004. Str. 10- 21.
22. Knap M, Maciąg D. Pielęgniarka wobec edukacji pacjenta z cukrzycą [w] Abramczyk A., Pruska W., Panaszka B. (red.) *Cukrzyca problem społeczny XXI wieku* Wrocław: „ARGI”, 2003. Str. 201- 209
23. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB, Corresponding. Sugar-Sweetened Beverages and Risk of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33(11): 2477-2483.
24. Jabłoński E, Kaźmierczak U, Cypryk K. Leczenie dietetyczne chorych na cukrzycę przy współistnieniu innych schorzeń i dolegliwości. *Diabetologia Polska* 2004; 1 (11): 44- 49.
25. Gromadzka- Ostrowska J, Włodarek D, Toeplitz Z. Edukacja prozdrowotna, Warszawa: SGGW; 2003. str. 28- 31; 152- 162.
26. Klupa T. Dieta cukrzycowa wczoraj i dziś. *Diabetologia na co dzień* 2006; 3: 16-18.
27. McBrien K, Rabi DM, Campbell N, Barnieh L, Clement F, Hemmelgarn BR, Tonelli M, Leiter LA, Klarenbach SW, Manns BJ. Intensive and Standard Blood Pressure Targets in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Intern Med* 2012;24; 172(17): 1296-303.



28. Tatoń J, Czech A, Biernas M. Eksperymentalne badania wpływu programów edukacji terapeutycznej na osiągnięcie celów leczenia cukrzycy. *Medycyna Metaboliczna* 2006; 2: 68- 77.
29. Tatoń J. Edukacja i psychologia terapeutyczna- nowy kierunek ulepszania wyników leczenia i jakości życia przewlekle chorych. *Medycyna Metaboliczna* 2005; 3:3- 7.
30. Tatoń J. Uzdrawiający potencjał osobowości i uczuć w postępowaniu z osobami cukrzycy. *Medycyna Metaboliczna* 2005; 2: 23- 31.
31. Tatoń J. *Filozofia w medycynie*, Warszawa: PZWL, 2003. str. 175- 180.
32. Szczeklik- Kumala Z. Psychologia cukrzycy. *Medycyna Metaboliczna* 2006; 2: 43-47.
33. Sieradzki J. Współczesne wytyczne i zasady postępowania z chorym na cukrzycę typu 2. *Terapia* 2005, 7-8 (168-169): 62- 67.
34. Kocemba J, Grodzicki T. *Zarys Gerontologii Klinicznej*, Medyczne Centrum Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków: 2000.

### **Address for correspondence**

Katarzyna Malinowska, PhD  
Department of Chemistry and Clinical Biochemistry  
Medical University of Lodz  
Pl. Haller 1 90-647 Łódź  
e-mail: modmal@wp.pl





## The genesis and development of the Lodz otolaryngology

Joanna Sułkowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Social Sciences, Poland

### Summary

The purpose of this article is to outline the circumstances of the origins and the development of the school of Lodz otolaryngology. The origins of otolaryngology treatment in Lodz date back to the early years of the twentieth century. The following years resulted in the creation of four centers of research and teaching. They derive from a common root, which was the Department of Medicine of Ear, Nose, Throat and Larynx, University of Lodz (today 1<sup>st</sup> Department of Otolaryngology of Medical University of Łódź, Clinic of Otolaryngology and Laryngological Oncology, Norbert Barlicki Medical University Hospital No. 1) founded in 1945. The dynamic development of the institutional and scientific Lodz otolaryngology stems from the process of increasing specialization in medical disciplines, as well as getting a better access to treatment and science, which happily became the participation of contemporary Poles. The history of Lodz otolaryngology is inextricably intertwined with the development of our city and the beginnings of insurance treatment in Poland (Kasa Chorych, Ubezpieczalnia Społeczna), with further changes in the functioning of social welfare.

### Key words

history of otolaryngology, Lodz laryngology treatments, history of Lodz otolaryngology

*So, what brings profit to contemporary people monumental meditation on the past, dealing with the classicism of earlier times? It adds that the size of which existed once, in any case possible once was, and so once again it will be possible; boldly walks his way, because now doubt that it fell on weaker hours, if not demands can impossibility, she had to resign from the field.*  
– Friedrich Nietzsche [1]

## Introduction

Medicine is a science based on experience, is empirical, meaning that all hypotheses and theories that scientists set themselves, are verified. Huge is also the importance of practical medical disciplines. This begs the question of whether today's doctors with access to the latest discoveries in biology, genetics, biophysics, biochemistry, and genetic engineering, using medical robots as an aid in surgical procedures in the field of multi-specialty physician, like: cardiac surgery, neurosurgery, orthopedics, otorhinolaryngology need historical analysis [2]. It seems that today's physician does not need to know the history of their own discipline to be a good specialist, effectively diagnose and treat their patients. The contradiction to this thesis, however, is expressed by many scientists and practitioners in the field of medicine. Almost all the works of medics begin with a look at the past. The analysis of historical development and institution building is undoubtedly useful for the modern doctors, since it allows faster and better understanding of the problem [3]. Knowledge of the achievements of their field gives the possibility of setting new paths for explorative research. Today's medicine presents us with a number of very complex ethical issues [4]. It is hard to imagine today a discussion about equal access to medical services, the problems of birth control, abortion, in vitro methods supporting infertility treatment, or euthanasia without reference to the opinion of seniors who are a kind of oracle for our conduct [5]. For Władysław Kopaliński ethos is „the guiding criteria, ideals, bothering a group of community” [6]. The authority of scientific ethos was formed, which consists of patterns of honest, competent and professional occupation [7]. Otorhinolaryngology (Greek *ous* - ear, *rhinos* - nose, *larynx* - voice box, *logos* - science), the word is a relatively young medical specialty dedicated to the diagnosis and treatment of diseases of the nose (rhinology), pharynx, larynx and ears (otology). In the mainstream of its interests is also phoniatics whose domain are disorders of voice and speech and audiology focused on

physiology of the sense of hearing and the diagnosis and rehabilitation of hearing disorders, laryngological oncology [8]. Also, the surgical treatment in the specialty including surgery of ear, salivary glands, nose and paranasal sinuses, tongue, throat, larynx, and esophagus, reconstructive surgery, skull base surgery [9]. Lodz academic otolaryngology has turned seventy. Its development resulted in the birth of four leading centers of research and academic teaching, which are derived from a common trunk, Department of Medicine Ear, Nose, Throat and Larynx of University of Lodz (today 1<sup>st</sup> Department of Otolaryngology Medical University, Clinic of Otolaryngology and Laryngological Oncology, Norbert Barlicki Medical University Hospital No.1) founded in 1945. In 1958 the Department of Otolaryngology, Military Medical Academy has been created (now 2<sup>nd</sup> Department of Otolaryngology, Medical University of Lodz, Department of Otolaryngology, Oncology, ENT, Audiology and Phoniatrics located in the University Clinical Hospital No 2. Military University Central Hospital) [10]. In 1970 the Institute of Pediatric ENT Department of Pediatrics, Medical University of Łódź (since 2002 Department of Otolaryngology, Audiology and Phoniatrics Institute of Medical University) was established. In 1987 a unit for children was created by the Department of Polish Mother's Memorial Hospital (since 1998 Otolaryngology ICZMP). Creators and medical staff of these centers were the staff and students of the Department of Ear, Nose, Throat and Larynx Lodz, then Medical Academy and the University of Lodz. Polish Society of Otolaryngology has been running for almost a hundred years. It was created in 1921. It was the ninth medical scientific society in Poland. The first one was created in 1820 as Polish Medical Association [11]. Since 1992, the full name of the association is the Polish Society of Otolaryngologists - Head and Neck Surgeons (PTORL). Academic achievements, research, transfer of knowledge and experience and uniting the ENT environment deserve immense respect and recognition [12]. Lodz branch operates dynamically as Otolaryngologists Society gathering most of ENT from the province for meetings, conferences and conventions concentrated on learning and disseminating the new diagnostic and therapeutic methods, improving their medical knowledge, which is a required procedure for every doctor. Polish otolaryngology for children began to grow up early, as early as 1895 with a foundation of the first 7-bed pediatric otorhinolaryngology department in Warsaw Children's Hospital [13]. Lodz otolaryngology for children represented by

the Clinic of Otolaryngology, Audiology and Phoniatics of Medical University, as well as municipal wards proudly maintains the traditions of care for children with upper respiratory tract and ears diseases [14]. Birth of Lodz otolaryngology The origins of ENT treatment in Lodz date back to the early years of the twentieth century. According to the department address calendar „Residents of Lodz” in 1900 practiced 5 and in 1913 - 11 ENTs [15]. They exercised care of the sick mostly on an outpatient basis. One of them was Jerzy (Uri) Rosenblatt (b. 1872), the Vice-President of the City Council of Lodz, member of the State of the Polish Kingdom, one of the founders of the Lodz Jewish Charity Association, Society of Music and Literary, conducting from the 1899 study at Piotrkowska 35 [16]. Difficult conditions of ENT treatment were associated with the lack of staff of this specialty not only in Lodz, but in the whole Polish territory. In 1917, the territory of the Polish Kingdom was populated with 12 000 000 inhabitants and there were only 57 beds in otolaryngology (50 in Warsaw and only 7 in hospitals outside the capital). In Lodz in 1917 Poznanski's Hospital offered only 4 ENT and ophthalmology beds, and the Children's Hospital of Anna Maria (now Janusz Korczak, on Pilsudski 71 Street) had only 3 beds of that profile [17]. In 1906 the Ears and Throat Outpatient with subdivision of otorhinolaryngology in the aforementioned Anna Maria hospital was established. The first heads of the unit in 1913 were - Dr. Jan Pieńiązek (1871-1943) and Dr. Bruno Czaplicki (1884-1964). In 1919, Dr. B. Czaplicki organized and for many years managed the 4th Otolaryngology Division of District Military Hospital (now Clinical Hospital WAM, Żeromskiego 113), a branch that was associated for many years, managed by Dr. Daniel David Helman (1875-1942), one of the few otiatric specialists in Poland. He announced in Polish and German the pioneering work in this field of medicine: "Some remarks about the role of the organism in crude green in inflammation of primary external auditory meatus and the case of subacute mastoiditis cured by Bierła". In the interwar period they created new branches of otolaryngology. In 1925, at the Leonia and Izrael Poznanski Hospital Foundation the „Jewish” Department of Surgery with the subdivision of ofotorhinolaryngology was established. The head physician was Dr. Dawid Rabinovich (1870-1942) [18]. He collaborated earlier with laryngologist - Dr. Ludwik Przedborski (1857 - 1911), one of the initiators of the construction of a hospital for the mentally ill, the chairman of the Section of Education Department of Lodz, Warsaw Society of Hygiene, vice

president of the Museum of Science and Art, of which he was also a patron. In 1931 there also functioned a 30-bed Otolaryngology Unit of President Moscicki Sickness Hospital for Lodz City (now Norbert Barlicki Medical University Hospital, Kopcińskiego 22 Street). The head physician of this unit was Dr. Jozef Imich [19]. Dr. Benedykt Dylewski who came from Stefan Batory University of Vilnius - headed the unit in the years 1936 - 1939. The department was founded by Dr. Weissbrum as the Division of Public Otolaryngology Municipal Hospital in Radogoszcz, Zgierska 170 Street. Dr. B. Dylewski also conducted educational activities [20]. In the 30s of the twentieth century the otolaryngologist Dr. Albert (Abram) Mazur (b. 1893), a graduate of the Universities of Prague, Vienna and Graz, one of the organizers „Ezras Ilmim” Lodz Society for Helping Deaf worked in Lodz [16]. According to the Yearbook of Medicine for the years 1933/1934 nineteen doctors specializing in ENT practiced in Lodz (tab. I) [21].

TAB. I. ENT doctors practicing in Lodz in 1933 -1934.

Doctor	Place of practice
Altenberger OttonGustaw	Cegielniana 47 Street
Bronikowski Kalikst	Ewangelicka 17 Street
Czaplicki Bruno	Piotrkowska 120 Street
Fuks Fred Zenon	Piotrkowska 200 Street
Helman Daniel (Dawid)	Piotrkowska 68 Street
Icykson Józef	Południowa 9 Street
Imich Józef	Moniuszki 1 Street
Klaczko Majer	Piotrkowska 99 Street
Liberski Józef Marjan	Pomorska 78 Street
Małowist Szymon	Gdańska 37 Street
Mazur Albert (Abram)	Piłsudskiego 65 Street
Neuman Jakób	Zachodnia 57 Street
Rabinowicz Dawid	Zielona 3 Street
Rakowski Zygmunt	11-go Listopada 9 Street
Rosenblatt Jerzy	Piotrkowska 35 Street
Rozenfeld Izaak	Zawadzka 8 Street
Weissbrum Dawid	Śródmiejska 7 Street
Wołyński Abram	Piotrkowska 121 Street
Żebrowski Aleksander	Pusta 13 Street

Own study based on the Yearbook of Medicine of the Republic of Poland 1933 / 34.

In November 1924 upon the initiative of Dr. Jan Pieniżek the Section of Otolaryngology Society was established in Lodz. It initially counted 10 members, and the board members in the years 1924-1926 were: Chairman Dr. Dawid Rabinowicz, vice-chairman, Dr. Brunon Czaplicki, secretary Dr. Kalikst Bronikowski, Treasurer Dr. Dawid Weissbrum. The society held meetings every two months to read papers on the experience in the diagnosis and treatment of ENT patients, discuss news in the literature, including the Polish ENT Review, subscription to which was mandatory for all members. In the years 1926-1928 Dr. Dawid Helman chaired the society (1875-1942). He was a doctor in the 31 Kaniowski Rifle Regiment, head of the Department of Otolaryngology District Hospital in Lodz. From 5 November 1939 Dr. D. Helman was a member of the Council of Elders in the Lodz ghetto, he headed the Municipal Department of Health, was also deputy supervisor of the Eldest of the Jews - Ch. M. Rumkowski.

With the development of Lodz hospitals, they created new centers of otolaryngology which employed doctors who were members of the Society. In the pre-war period many interesting scientific works have been published, whose authors were specialists from Lodz [22]. Ravages of war interrupted the work of the Society, but the tradition of meetings and exchange of experiences between professionals survived. Lodz Branch of the Polish Otolaryngology Society was reactivated as the initiative of the members of the team, just four months after the creation of the Department. The first meeting took place on 5 February 1946. The inaugural session was attended by 15 people. They chose the Main Board: Chairman: Prof. Dr. H. Lewenfisz-Wojnarowski, Vice-Chairmans: Prof. Dr. B. Dylewski, Dr. B. Czaplicki, Secretary: Dr. W. Łukomski, treasurer Dr. St. Kmita [23]. The creation of the Department of Otolaryngology in Lodz at the end of the Second World War, November 15, 1945 was established in the Department of Ear, Nose, Throat and Larynx Medicine, University of Lodz [24]. Its first headquarters was the hospital of Bonifraters, Kosynierów Gdyńskich 61 Street. Prof. Dr. Henryk Lewenfisz - Wojnarowski (1894-1956) who arrived from Warsaw was the organizer and first director in the years 1945-1952 [25]. He co-organized the Department with a prominent nose and throat specialist, former Professor of Stefan Batory University in Vilnius, Dr. Jan Szmurło (1867-1952). He was balneologist, historian of medicine, and also director of the Library of Medical University of Lodz and head



of the Department of History of Medicine and the Medical University of Lodz and Medical University [26]. The first seat of the Department of Ear, Nose, Throat and Larynx was Hospital of Bonifraters located on the Kosynierów Gdyńskich 61 Street. The Hospitaller Order of St. John of God, in Latin *Hospitalarius Ordo Sancti Joannis de Deowas*, founded by Saint John of God in 1540 in Granada, in 1571, was approved by Pope Pius V. From in 1586 one of the vows made by the monks is to serve the sick. The Order was brought to Poland in 1609. The first Polish Bonifraters monastery was founded in Cracow, where the Cracow merchant Valerian Montelupi offered a tenement for the needs of the convent. The first 12 hospital beds and a church were created there [27]. The idea of the hospital of Bonifraters was born in Lodz in 1924, when the Provincial Jan Misiak turned to the Curia for a consent to build a hospital. After obtaining the approval on 24 November 1924 the monks bought from Julia and Tomasz Dębowski grounds at Kosciuszko 4 Street on Chojny (today's Kosynierów Gdyńskich 61). On August 26, 1928 bishop Wincent Tymieniecki (1871 - 1934) dedicated the cornerstone of the emerging building [28]. The architectural design was done by a well-known architect Jozef Kaban. The resulting building was supposed to host hospital with outpatients: dental, surgery, GP, laryngology, pediatric and maternity clinic. Eventually, the building was opened in 1935 [15]. Its construction took more than 10 years and was funded by contributions from workers, sales and support headquarters bricks convent. Similar treatment centers operated then in Krakow and Katowice. The monks' motto was to „serve the poorest in accordance with the principles and rules of the Order” [29]. After the outbreak of World War II, the hospital was taken over by Germans, and from 1945 it served the needs of the city, and soon received the name of Dr. Jozef Brudziński. On the World Day of the Sick, February 11, 1996 on the occasion of 500 anniversary of the birth of St. John the Divine and the 70 anniversary of the Order of Bonifraters hospital in Lodz was restored to its pre-war name and character. In December 1945 it held the first lecture for the students given by prof. Dr. H. Lewenfisz - Wojnarowski „The importance of the knowledge of otolaryngology for each physician and individual specialists.” Clinical library was created, the beginning of which were gifts from private individuals ( Dr. Mieczyslaw Mazur and widow of Dr. Kalikst Bronikowski) and German books. Also in 1946 upon the initiative of Clinic employees, Łódź Branch of the Polish Otolaryngology Society was reactivated [30]. In

1947 the clinic was moved to a modernly equipped rooms on the second floor of the hospital building (now Clinical Hospital No. 1, Medical University, Kopciński 22 Street) [31]. The hospital was created upon the initiative of prof. Dr. Vincent Tomaszewicz (1876-1965) [32]. It was built by the Regional Association of Health Funds (Kasa Chorych) in Lodz and opened by the President of Polish Republic Ignacy Moscicki on April 25, 1930. At that time it was the most modern inpatient care center in Poland. The author of the hospital buildings was the architect of the city - engineer Wieslaw Lisowski (1884-1954), and its construction was entrusted to Nestler and Ferrebach [33]. The U-shaped building facade faces the street and its two side wings extend into the courtyard. In less than two years in the hospital building there were 420 beds, it run the departments: of surgery, headed by acting director of the hospital, Prof. Dr. W. Tomaszewicz; internal, chief of which was associate professor Solomon Mine; neurological led by a colonel, associate professor Wladyslaw Dzierżyński; gynecological managed by physician Dr. Franciszek Ksawery Gawroński; laryngological, the head physician was Dr. Jozef Imich and optical under the direction of Dr. Ryszard Sokolowski; and a reconnaissance, designed for uninsured people who required specialist diagnosis in the hospital. Laboratory of radiation was led by Dr. Stefan Keilson, bacteriological and anatomopathologic laboratory was managed by Dr. Rafalina Ściesińska and dissecting laboratory – by Dr. Kazimierz Ściesiński [15]. Medical staff were graduates of medical faculties from Krakow, Warsaw and other academic centers of the country. The idea of the creators of the hospital was his „classlessness”. All hospitalized, regardless of religion and social status, were offered the same conditions of stay and treatment [34]. Despite its size, the hospital was still not able to accommodate all those in need. After the establishment of the Social Insurance in 1937, it was decided to build a new south wing of the building. Its opening took place on 1 June 1938. The hospital had 690 beds then. The first director of the hospital was the initiator of its construction, prof. Dr. Wincent Tomaszewicz, who held the office from May 1930 to May 1933. Then, the hospital directors were as follows: 1933-1934 by Col. Dr. Stefan Miłodrowski, 1934-1936 Dr. Stanislaw Marian Gąsiorowski, 1936-1938 Dr. Stefan Bujalski, and at the outbreak of the World War II, Dr. Jerzy Edmund Suffczyński. In 1938, the hospital employed 361 people, including 43 doctors, 121 nurses, 12 administrative employees, 185 technical and physical employees. It was the largest inpatient resort, out of the 19 bran-

ches of the Social Insurance in Poland [33]. After the liberation of Lodz on January 19, 1945 the hospital became again an institution of the Social Insurance and received a new patron, Norbert Barlicki (1880-1941), an activist of the Polish Socialist Party [35]. On the basis of the Regulation of the Minister of Health of 10 December 1955, concerning the teaching hospitals it became a subdivision of the Medical University of Lodz, and received the name: Norbert Barlicki Clinical Hospital No. 1. (Clinical Hospital No. 1), and, since 2003 Lodz Norbert Barlicki Medical University Hospital No. 1, located on Kopcińskiego 22 Street. From the creation of the Department of Ear, Nose, Throat and Larynx Faculty of Medicine, University of Lodz its staff were doctors, whose aim was to save the life and health of patients, as well as concern for the scientific development of this field of medicine.

### **Summary**

Fast institutional and scientific development of Lodz otolaryngology stems from the process of increasing specialization of medical disciplines. The complexity of the subject of study requires the creation of centers of research and teaching focused on specific issues. The history of Lodz otolaryngology is inextricably intertwined with the development of the industrial city, of tying the beginning of treatment and insurance in Poland (Kasa Chorych, Ubezpieczalnia Społeczna) with dynamic industrialization. Lodz, not having a pre-war tradition of academic scientific achievements created it in close connection with the practice. The creation of the University of Lodz, the Medical Academy and the Medical University of Lodz, led to the creation of research centers in the field of otolaryngology. The process of development of scientific research and implementation of new diagnostic and therapeutic methods made possible by science, which bound to the center of Lodz.

### **Bibliography**

1. Nietzsche F. Niewczesne rozważania, [w:] O historii, pod red. A. Łaskiego, Oficyna Naukowa, Warszawa 2001, s. 97.
2. Szczeklik A. Katharsis, Wyd. Znak, Kraków, 2002, s. 58.

3. Imiela J. *Medycyna, moja miłość*, Wydawnictwo Literackie, Warszawa, 2012, s.47.
4. Wulff. HR, Pendersen SA, Rosenberg R. *Filozofia medycyny*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1993, s. 13.
5. Piątkowski J. *Etyczne problemy w medycynie a biologiczna natura człowieka*, Farenheit, 2006, 50, s.17.
6. Kopaliński W. *Słownik wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych*, Wydawnictwo Muza SA, Warszawa, 2000, s. 159.
7. Janczewski G. *Problemy medyczo – prawne otolaryngologa pełniącego ostry dyżur*, [w:] *Ostry dyżur. Otolaryngologia*, Wyd. Alfa - medica press, Bielsko – Biała 2003, s. 8 – 14.
8. *Wielki Słownik Medyczny*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1996, s. 954.
9. Olejniczak I, Bojanowska- Poźniak K, Gryczyński M. *Zarys rozwoju otolaryngologii w medycynie*. *Otolaryngologia* 2006; 5(2): 71-75.
10. Olszewski J. *Jubileusz 55-lecia Klinii Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej z Zespołem Pracowni Audiologicznych i Foniatrycznych. Jubileusz 10.lecia II katedry Otolaryngologii UM w Łodzi*, *Magazyn Otolaryngologiczny* 2014; T.13,1, (49): 5-10.
11. Gierek T. *Przemówienie Przewodniczącej Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Otolaryngologów Chirurgów Głowy i Szyi na uroczystości otwarcia XXXVIII Zjazdu PTORL*. *Otolaryngologia Polska* 1999; 53(30): 37.
12. Cieszyńska J, Tretiakow D, Kuczkowski J, Siebiert B. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2014; 8(5): 25.
13. Gryczyńska D. *Laryngologia dziecięca*, [w:] *Zarys historii otolaryngologii polskiej 1879-1995*, pod red. B. Latkowskiego, Wyd. AM w Łodzi, Łódź 1996, s.133-134.

14. Gryczyńska D. Otolaryngologa dziecięca, Wydawnictwo Alfa-mediacapress, Bielsko- Biała, 2007, s.9
15. Fijałek J, Indulski J. Opieka zdrowotna w Łodzi do roku 1945. Studium organizacyjno-historyczne, ss. 118, 377, 346.
16. Kempa A, Szukalak M. Żydzi dawnej Łodzi. Słownik biograficzny. Tom I. Oficyna Bibliofilów, 2001, s. 75 - 130.
17. Hertz M. Sprawa oddziałów oto-laryngologicznych w szpitalach miejskich, Medyczna Kronika Lekarska 1917; T. 52, nr 30.: 382-383.
18. Kierzek A. Otorinolaryngologia w okresie zaborów-Lwów, Poznań, Łódź, Magazyn Otorinolaryngologiczny 2016; T.15, 3 (59): 103.
19. Barciński J. Oddziały i lecznictwo ambulatoryjne – Łódź, [w:] Zarys historii otolaryngologii polskiej w latach 1879-1995, op. cit., s. 27.
20. Kurnatowski A. Profesorowie i docenci wydziałów medycznych Uniwersytetu Łódzkiego i Akademii Medycznej w Łodzi 1945 - 1964, Wyd. UM w Łodzi, Łódź, 2003, s. 52..
21. Konopka S. Rocznik Lekarski Rzeczypospolitej Polskiej, 1933/34. Zakład Graficzny DRUKPRASA, Warszawa, 1933, s. 419 – 443.
22. Czaplicki B. Wspomnienia o działalności Sekcji Łódzkiej Polskiego Towarzystwa Oto – Laryngologicznego w okresie 1921 – 1939, z archiwum dr Anny Pajor.
23. Protokoły posiedzeń Oddziału Łódzkiego PTORL – materiały wewnętrzne.
24. Sułkowska J, Gryczyński M. Z historii łódzkiej otolaryngologii. Otolaryngologia Polska 2004; T.58, 6: 12221 – 1226.
25. Janczewski G. Tworzyli polską laryngologię Henryk Lewenfisz – Wojnarowski. Magazyn Otolaryngologiczny 2004; T. 3, nr 10: 36.

26. Zabłocki S. Otolaryngolodzy polscy – uczestnicy Powstania Warszawskiego, *Magazyn Otolaryngologiczny* 2004; 6: 24.
27. Historia chrześcijaństwa, pod red. T.Dowley'a, Oficyna Wydawnicza „Vocatio”, Warszawa, 2002, s. 550.
28. Budziarek M. Łodzianie, *Wyd. Literatura, Łódź*, 2000, s. 32 – 35.
29. List Konwentu O.O. Bonifratrów do Rady Miejskiej w Łodzi z dnia 1.10.1930 podpisał przeor Konwentu OO Bonifratrów O. Eustachy Miłkołajewski, Akta m. Łodzi, sygn. 18766.
30. Katedra i Klinika Otolaryngologiczna, „*Annales Academiae Medicae Lodzensis*”, 1970, T.13, supl. 6, s. 335-344.
31. Sylwanowicz L, Latkowski B. *Kronika Kliniki Otolaryngologicznej w Łodzi część I. Lata 1946 – 1973.*
32. Sadowska A. Wybitny chirurg pierwszy dziekan. Życie i działalność prof. dr med. Wincentego Tomaszewicza, op. cit., s. 41-42.
33. Goldstein J, Fijałek J, Sadowska A. Historia Szpitala Klinicznego Nr 1 im. Norberta Barlickiego, „*Annales Academiae Medicae Lodzensis*”, 1980; 21(20): 33-42.
34. Noszczyk W. *Zarys dziejów chirurgii polskiej*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1989, s. 307.
35. Albert A. *Najnowsza historia Polski 1914 – 1993*, Wydawnictwo „Świat Książki”, Warszawa, 1995, s. 185.

### **Address for correspondence**

dr n. med. Joanna Sułkowska  
University of Social Sciences,  
Gdańska 121 Street, Lodz  
email: jsulkowska15@wp.pl



## Neurobehavioral consequences of cerebral stroke and its influence on rehabilitation

Ewa Lasota<sup>1,2</sup>, Sebastian Marszałek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Social Sciences, Łódź, Poland

<sup>2</sup> Department of Rehabilitation, Regional Hospital to them. Pope John Paul II in Belchatow,

### Abstract

The consequences of stroke pose serious social and economical problems and are the leading cause of disability and inability to live independently without support as adults in developed countries. As a result of population ageing this number will probably increase steadily in the next decades. At the same time, due to better acute treatment, case fatality rate is declining. The most common neurobehavioral disorders include cognitive impairments and neuropsychiatric syndromes such as depression, apathy and angst/anxiety.

### Key words

stroke, psychopathology, cognitive impairments, neurorehabilitation

### Introduction

Consequences of stroke are a serious social and economic problem; they are the main cause of disability and an inability to exist unaided of adults in developed countries [1, 2, 3, 4]. Stroke is the second most frequent cause of death in the world, after cardiovascular diseases [5, 6], and in Poland the third one after cardiovascular diseases and tumors [7]. 60,000 people suffer a stroke in Poland each year. Since the population is aging, this number will probably increase steadily in the next decades. At the same time, case fatality rates are declining due to better acute treatment of stroke [5]. Forecasting and prognosis depend on the localisation and

focus of stroke, comorbidities, patient's prior stroke condition, nursing and rehabilitation quality in the first days of hospitalisation [8, 9].

The signs of stroke, among movement syndromes, sensory syndromes, speech and sight difficulties commonly associated with the cerebral event, also include neuropsychological symptoms, whose occurrence requires specialist procedures, and their omission may result in no effects in the rehabilitation process. The most common impairments after stroke are neurobehavioral disorders which include cognitive impairments and neuropsychiatric syndromes (among others depression, apathy, fear [10, 11].

Psychopathological syndromes are common complications after stroke, and they may occur both in the early and late phase of stroke [12, 13, 14, 15].

The occurrence of the below given syndromes present in the neurobehavioral syndromes have an impact on the rehabilitation process;

- memory impairments (eg. short and long-term, semantic, episodic),
- attention deficit,
- executive disfunctions,
- perception disturbances,
- restlessness and motor drive lowering,
- abstract thinking impairment,
- judgment impairment.

These symptoms may be accompanied by: aphasia, apraxia, agnosia, alexia, acalculia, anosognosia [3, 16, 17]. The occurrence of the symptoms mentioned here makes the therapy longer and a late recovery, yet, on the other hand, their presence has raised the awareness amongst therapists of the quiddity of the neurocognitive dysfunctions and the need for their improvement. A model of conduct with a stroke patient has been worked out, in which there are diagnostic and treatment procedures and also rehabilitation procedures carried out at the same time. Early rehabilitation after stroke should be carried out as early as possible (1-2 days after the appearance of the condition). The procedures are defined in Helsingborg Declaration, which assumes that all patients in the acute phase of stroke have the right to access the rehabilitation services, without a pre-selection [7]. According to the WHO definition, rehabilitation is a complex set of measures that assist individuals, who experience physical or mental



disability, which aims to achieve and maintain optimum functioning, participation in the labour market, and civic life [4].

The term neurorehabilitation includes a wide range of revalidation procedures with patients with disabilities of the central nervous system [3]. This definition was popularised in the 80s of the last century when a significant progress took place in the basic and clinical sciences of CNS diseases. The development of modern medical techniques and research progress in neurobiology, neuropsychology are the basis for new strategies, including rehabilitational ones with neurogenic dysfunction patients. The theoretical basis of brain damage patient rehabilitation, regardless of the initial cause, is the brain plasticity.

### **Neuroplasticity**

The term neuroplasticity was introduced into physiology by Polish scientist Jerzy Konorski in his monograph published in 1948. He understood this notion as an ability of neurons to undergo permanent changes during the learning process [18]. Fundamental mechanisms of biological nature have been recognised (relating to structural and functional changes in the CNS) as responsible for lessening the signs of the disease in the process of convalescence and therapy. Spontaneous wearing off of the deficits after some time after a stroke very often arises from the compensational neuroplasticity mechanism [19]. It includes the functional and structural changes, which are the basis for the compensation processes of disorders results. The withdrawal of the diaschisis symptoms, normalisation of biochemical changes (among others completing the missing neurotransmitters), the restoration of blood flow (reperfusion) in the ischemic area (penumbra) are listed among the functional changes [19]. The structural changes include the regeneration of the connections between neurons (synaptogenesis) and the growth of new axons (neurogenesis) [19]. Apart from a spontaneous dynamics of compensational neuroplasticity mechanisms, a process of modification of the condition of the neural network caused by behavioral influences is also triggered [20].

The recovery processes taking place in the brain sped up by the neurological treatment and the functional and structural changes being the effect of the neuropsychological activities interact. They create a possibility for the improvement in the patient's functioning thanks to the restoration and substitution of the disturbed functions, activation of extra

afferentations, rebuilding of functions, reintegration of neural connections, switching on new ways of brain reserves use and optimisation of the neural network activity [20].

The body's reactions to the changes taking place in the environment are modified by the experience acquired throughout personal life. Two processes serve it – learning and memory. Both of the phenomena, as defined by neurobiology, may occur only in the nervous system [21, 22]. Learning is acquiring new information, that is creating an inner representation of experiences in the nervous system; whereas memory means retaining these representations in time with a possibility of using them in the neural processes [22, 23].

The processes of learning and memory are one of the most crucial expressions of the nervous system abilities to undergo plastic structural and functional changes. The effectiveness of these processes decreases with age, yet it does not disappear. Memory may be understood in categories of a specific group of neurons producing impulses according to the same pattern each time when activated. It is created due to a long-term potentiation [LTP]. It is a process, in which each time a given sequence of neurons produces an impulse, the connections between these neurons are strengthened. It is a result of the Hebbian Learning Rule: if an A cell axone constantly takes part in a B cell stimulation creating its activation, it makes a metabolic change in one or in both cells leading to the increase in the activation efficiency of B by A [24, 25]. A range of kinds of memory has been distinguished and it is known that certain brain areas are more important for creation of a given kind of memory, and others less [22, 26]. We may consider memory in relation to the length of period for which memories are stored (immediate, operational, short-term, long-term), what kind of information one must remember (semantic, episodic, procedural), in relation to modality (verbal, visual), the method of information storing and updating, and the level of involvement of awareness at the retrieval stage (declarative and nondeclarative) [27, 28]. The above classifications have been created by psychologists [22]. Short-term memory, from the perspective of neurochemists, lasting from a few to several dozen minutes, does not depend on protein syntheses and may be disrupted by electrical shocks. Long-term memory, dependent on protein syntheses, follows short-term memory and is not disturbed by electrical shocks [19].

Due to the brain tissue damage with various factors the motory, sensory and cognitive deficits are created. According to the clinical experience, persons with cognitive impairments are very often more helpless than motor deficit persons. The assumption that the brain of an adult is characterised by a certain degree of plasticity ensuring at least a partial reconstruction of the impaired functions is the basis for realistic therapeutic optimism [29]. Poststroke cognitive impairments may accompany motor deficits, but they are very frequently the leading symptom of post-stroke psychopathological disorders [23, 13, 14].

### **Poststroke neurobehavioral disorders**

The signs of cognitive behavioral disorders resulting from brain dysfunctions are commonly of a chronic character; they may have a sudden onset, or grow slowly in a little specific way [30]. The brain damage consequences, mainly of a focal origin (stroke), present themselves in the following domains [31, 10, 32, 33].

1. Memory disorders (difficulties in remembering, storing and retrieving of information, confabulations).
2. Attention disorders (paying, splitting, selecting, processing speed).
3. Orientation disorders (difficulties in relating to time, space, self-being).
4. Learning, comprehending and judgement disorders (depleted thinking, imprecise thinking, lack of planing and predicting capabilities, disorders in understanding abstract concepts).
5. Emotion control weakening (pathological laughter, cry, extreme emotions).
6. Social competence deficits (recognising emotions, empathy).
7. Apathy and shallowing of emotions (limited experiencing of all emotions).
8. Behavioral initiation disorders (disorders of executive function, planning and decision taking, working memory, thinking flexibility).
9. Situation appropriateness assessment disorders and conduct adequacy disorders (lowering of personal appearance standards, keeping hygiene, sexual behaviour, language).
10. Difficulty to comprehend and formulate messages (aphasia).

11. Visual-spatial processing disorders (difficulties in visual-motor integration, graphomotor skills disorders, constructive skills disorders, praxia, gnosia).

The cognitive behavioral disorders, neuropsychiatric syndromes and neuropsychological disorders [31] have appeared in the DSM-V classification in a new category under the name “neurocognitive disorders”. The new terminology replaces “organic psychic disorders” in the DSM-III-R, and, respectively, “dementia, delirium, amnesia and other cognitive disorders” in the DSM-IV. It is worth considering that the word “organic” has been omitted in the DSM IV classification since it assumes incorrectly that “non-organic” psychic disorders have no biological basis [34]. The neurocognitive disorders include a group of which are clinically manifested in an acquired damage to the cognitive functions. These include [10]:

- delirium,
- deep neurocognitive impairment syndromes (among others impairments caused by dementia, by a brain injury, by HIV virus infection, by pharmaceutical drugs),
- mild cognitive impairments syndromes (other cognitive disturbances).

Acute mental disorder which could appear both in the early and late phase of stroke, being the so-called acute condition in medicine, is delirium [13].

The symptoms of delirium are:

- decrease of attention sustainability in relation to external stimuli, focus of attention continual change with inadequate alternating attention,
- abnormal thinking, disorderly and disconnected speech,
- decrease of a wakefulness level, disorders of sleep-wake schedule,
- perception disorders, false interpretations, illusions, hallucinations,
- motor anxiety or decrease of motor drive,
- time and place disorientation, people’s misrecognition,
- memory impairment, inability to learn new material and to retrieve past events.

The disorders show soon, usually within a few hours or days; they have a variable intensity in twenty-four hours, with a frequent exacerbation of symptoms at night [30]. There are three types of delirium: hyperactive

delirium (psychotic symptoms where hyperactivity prevails), hypo-active delirium, which may be incorrectly interpreted as depression (sedation prevails), and mixed delirium (hypo- and hyperactive) [35, 10].

Delirium frequently occurs in hospitalised patients and ranges from 10% to 30 in hospitalised patients [30, 13, 36], and from 10% to 48% in patients in the acute phase of stroke [37]. Delirium patients have almost a 5 times higher risk of mortality within 12 months; they require a longer hospitalisation period, and are more likely to be discharged to long-term care institutions. Compared to non-delirious stroke patients, delirious patients have lower quality of life and a higher risk of developing dementia within two years after the stroke [37].

The delirium predisposing factors are: older age, presence of dementia, organic and mental illnesses [36]. There are numerous causes for delirium: infection, high fever, metabolic disorders, liver and kidney failures, endocrine disorders, thiamine deficiency, psychoactive substances poisoning, or caused, by their withdrawal, the substance withdrawals, significant blood loss, post-operative conditions, cardiac arrhythmia and heart failure, malignant hypertension, head injuries, convulsions, adverse drug reactions, focal brain damages [30]. The risk factors for acute phase stroke delirium are: older age, specific post-stroke syndromes (aphasia, neglect syndrome, dysphagia), visual disturbances, elevated cortisol level and the influence of anticholinergics [35].

Delirium, as a medicine acute condition, requires a quick identification of its cause and implementation of management. The course of delirium most frequently is turbulent, but it sometimes happens that it disappears by itself. If untreated, it may lead to death or permanent dementia. Casual treatment generally brings a quick recovery, yet deficits sometimes remain [30, 13].

Dementia is another disorder (associated with stroke) of a global character [5, 38, 39]. Dementia is characterised by a gradual decline in intellectual functions leading to social and professional disturbances. Memory, orientation, abstract thinking, ability to learn, visual-spatial perception, language functions, constructive praxy, and upper executive functions – such as planning, organisation and action sequencing are impaired in the state of dementia. Unlike delirium patients, dementia patients have retained consciousness until the late stages of the condition [30]. Delirium is most frequently associated with a systemic illness

or drug poisoning, while dementia is caused by a primary degenerative or structural brain disease.

Dementia, which develops after a stroke, called poststroke dementia (clinical name) is any kind of dementia appearing after a stroke regardless of its probable cause [5]. Vascular dementia is not synonymous with poststroke dementia, but merely one of its probable causes and is responsible only for some poststroke dementia cases. According to various authors, the development of poststroke dementia is determined by: age, lower education, diabetes, cardiac arrhythmia, a prior ischemic stroke, aphasia, and a more serious neurological deficit upon hospital admission, lower intellectual capacity prior to a stroke, cerebral atrophy, changes in the white matter [5, 39]. Some poststroke dementia patients are characterised by a gradual development of dementia syndromes, which suggests a degenerative basis of dementia. There is an increasing number of reports concerning numerous, well-recognized risk factors of atherosclerosis and stroke which are diagnosed also in degenerative dementia persons. They include, among others: older age, hypercholesterolemia, arterial hypertension, cigarette smoking, atrial fibrillation, diabetes, the APOE gene polymorphism [39].

The clinical data shows that medium-sized strokes in the caudate nucleus, thalamus, hippocampus, and the Sylvian fissure area on the dominant side worsen cognitive functions in the disease picture [12, 14]. Most authors consider the changes in the white matter, including the paraventricular one, or semioval centres, to be crucial to diagnose vascular dementia [12]. The presence of other changes, such as: numerous micro myocardial infarctions detected in the MRI examination, the hyperintensive foci in the white matter, or the presence of a large (strategic) stroke focus are not considered as typical for the pure cerebrovascular disease, and are not typical of vascular dementia.

The key symptom of dementia (massively important in the rehabilitation aspect) is the short-term and long-term memory impairment. Difficulty reproducing names of three objects after five minutes is a sign of a short-term memory impairment, an inability to learn new material. A patient's difficulty in remembering data of their own past, both the nearest and distant – what they did the previous day, if they remember the dates of historical events and commonly known facts – is a sign of a long-term memory impairment [30].

Deterioration in cognitive functions mostly lessens after a few weeks, yet in some patients the cognitive deficit remains. The present data shows that in 25% to 30% of ischemic stroke patients sudden or late vascular cognitive disorders or vascular dementia develop [2, 6].

Summing up, both vascular changes in the brain and neurodegenerative diseases contribute to poststroke dementia. Their mutual inclinations will be frequently found in clinical use. The published clinical research does not provide encouraging information on possibilities of pharmacological prevention of poststroke dementia [5]. The risk factors control of vascular diseases and secondary preventive medicine of cerebral strokes are the key to the reduction of disorders and poststroke dementia.

In the 70s, for the first time, attention was paid to the fact that post-stroke patients hospitalised in rehabilitation departments suffer more frequent and more severe symptoms of depression than patients after orthopaedic surgeries [14]. Further research has proven that depression is the most common psychiatric complication in post-stroke patients. Depression is common after stroke, with rates, according to various authors, of 29-33% in patients within the first year after stroke [37]. Based on the review of the latest literature [5], approximately a third of stroke patients suffer depression within the first three months after the vascular event. Studies based on the extended observations has demonstrated that poststroke depression (PSD) is frequently a chronic disease with a remission-recurrent pattern [5].

PSD patients have a worse recovery prognosis, a higher risk of cognitive disorders development, which influences participation in rehabilitation in a negative way [6]. According to the biopsychosocial model, PSD is caused by biological factors (base pathophysiology of the brain and vessels), and by psychological ones, as a secondary reaction to physical, cognitive and social consequences of a stroke [6].

Early studies implied that PSD is mainly associated with the left hemisphere lesions, however, a recent review of studies and meta-analysis have found no support for this "location hypothesis" [5]. Other researchers suggest that lesions in fronto-subcortical regions are involved in developing PSD. They are often accompanied by impairments in executive functioning. Current interests of researchers in the role of the PSD base mechanisms are focused on the biological markers, e.g. the CRP level, neopterin concentration, homocysteine level, deficiency of monoamine

neurotransmitters, folic acid and B12 vitamin deficiency [5]. Other factors which can cause the PSD development include cognitive disorders, physical disability, communication problems, anxiety, lower quality of life, low social support. The study conducted by van Mierlo *et al.* [5] has revealed a wide range of psychological factors worsening depressive disorders including: passive way of coping with stress, hopelessness, nonacceptance, inability to see advantages – catastrophisation. Risk factors predisposing to PSD are also: prior strokes and depression episodes, female gender, living alone, stressful social factors appearing prior to stroke [14, 26].

Most authors believe that the basic symptoms of PSD are: depressed mood, reduced appetite or weight loss, energy loss, insomnia and social withdrawal. Yet, thought disorder, guiltiness and lowered self-esteem, emotional oversensitivity and daily mood swings appear less often. The PSD occurrence is linked to a higher mortality rate (in the acute phase of stroke) and suicidal thoughts [14].

Since the occurrence of PSD symptoms influences the patient's health in a negative way, it is recommended to start antidepressant therapy as soon as possible after the symptoms have been confirmed. So far it has not been established unequivocally which group of antidepressants is more effective in treating PSD.

Anxiety disorders are the second most frequent psychiatric stroke disorder [5]. According to various authors the percentage of patients with anxiety disorders ranges from 18-25% [37]. Research has shown that depression and anxiety are often treated as natural psychological reactions after stroke and require no treatment [40]. Thus, from the perspective of long-term outcome of stroke patients, systematic screening is essential.

The most common clinical syndromes include: anticipatory anxiety, concern, energy loss and increased muscle tone. Anxiety disorders can co-occur with depressive disorders; some authors associate it with stroke cortical lesions. Others prove that anxiety disorders in the acute phase of stroke may precede PSD symptoms later [40]. Anxiety disorders more frequently occur in patients who abused alcohol in the past [14].

Benzodiazepines are the medications most commonly used in treating anxiety disorders, treatment which should be time-limited due to their quick psychic and physical dependence. Similar efficacy to diazepam when treating PSD disorders has been proven with buspirone or with SSRI group antidepressants therapy [14].



Emotional lability is a disorder which involves the lessening of control over emotions, so that an individual suffering from it finds themselves crying uncontrollably at something that is only moderately sad (or not sad at all), or laughing in an uncontrolled way when a situation is not objectively humorous. Pathological crying results in stereotypical outbursts of crying in response to various emotional stimuli, such as joy, excitement, sadness or social situations. A sudden onset of crying or laughing occurring in response to external stimuli (eg. a physician asking about general feeling) or internal stimuli (eg. thinking about something sad or funny) in an inappropriate context [5]. There have been reports of emotional lability following a variety of central nervous system disorders (eg. multiple sclerosis, Parkinson's disease), but the condition most often follows stroke [5]. Research indicates that emotional lability syndromes such as pathological crying or laughter appear in 15% of acute phase stroke patients. According to the recent meta-analysis, among 15 individuals, 1-5 patients experienced emotional lability one month prior stroke [5].

Most researchers consider pathological crying as a sign of serotonin conduct disorders and SSRIs are used in treatment. The literature data suggests that the use of antidepressants reduces the frequency and severity of uncontrolled outbursts of crying or laughter in poststroke emotional lability.

Apathy has been defined as deep disorders of motivational aspect of any conscious goal-oriented behaviour [41]. In the literature descriptions of these symptoms have appeared in the past under different names: the loss of psychic autoactivation (LPA), psychic akinesia, aboulia, akinetic mutism, frontal adynamia, depression, dementia, etc. In 1990 Martin suggested the term *apathy or indifference syndrome* to describe disorders in the field of a broadly understood behavioral sphere, whose cause lies in the primary motivating factor deficit [5, 41]. The term has been already used widely in the subject literature (it was used earlier also in psychiatry to describe negative symptoms in patients with no brain structural lesions, eg. Schizophrenia).

Poststroke apathy occurs in 34.6% of patients within 4 months following stroke [5]. A review of current literature associates motivational deficiency disorder in behaviour with dysregulation of one or a few existing cortical-subcortical functional systems regardless of the fact which

circuit has been damaged. Three circuits, particularly significant in behaviour regulating are anatomically organised to arise and finish in different parts of the prefrontal cortex, excluding from the system the basal ganglia and thalamus. The most important for the motivating factor, thus also for initiating of any goal-oriented and conscious behaviour, is the so-called limbic circuit arising in the cingulate cortex and further including the ventral striatum part, ventral globus pallidus part and also medial dorsal thalamus parts, which give rise to projections back to the frontal part of the cingulate cortex. The limbic structures of the striatum and of the globus pallidus play a particularly important role in the neural system initiating (motivating) behaviour, and here it is important that they receive afferent information from the amygdala (engaged in emotional marking of sensory stimuli) and from the hippocampal formation responsible for, among other things, comparing new stimuli with previous experience and giving rise to projections to the basal ganglia, among other things, engaged in initiation of motor behaviour [5, 41].

Neurorehabilitation of an apathy syndrome patient causes numerous difficulties already at the therapy developing stage in relation to the essence of deficit. Apathy – especially severe – may lead to therapeutic helplessness and – apart from cognitive disorders, depression and pain – is a factor especially hindering a patient's rehabilitation process [41, 42].

From the theoretical point of view, the following can be included in the group of medications positively influencing apathy: monoamines, their precursors and antagonists of receptors for monoamines, and also medications increasing their concentration [42].

### **Cognitive rehabilitation**

The therapy of cognitive functions disorders is based on the general assumption that the improvement of cognitive functions is a condition of reducing general disability following brain damage [33]. Good effect of treating speech disorders has been known for years [17]. The verbal communication improvement is very important, but rehabilitational interventions must be expanded including other areas of cognitive functioning, such as: attention, perception, thinking, constructing, programming, intellectual activity controls. The group of these effects is named cognitive rehabilitation therapy (CRT) and neuropsychologists play the leading role in this therapy. Their role is to establish the existing neurocognitive

deficits and to develop procedures aiming at restitution of functions or compensation-adaptation actions [32, 43].

Modern technical equipment with suitable computer software lends itself to cognitive rehabilitation [9, 21, 29, 44, 45]. It results from the clinical practice perspective that awareness of one's deficits is a crucial factor determining success in rehabilitation [16]. Without realising and understanding abnormalities in one's functioning, a patient does not make an effort to correct errors, does not focus on exercise, which usually creates no expectations to reorganise the disabled activity. It can be really easily observed in patients with asonognosia the hemineglect syndrome, sensory aphasia or with the conduct and behaviour programming disorder due to frontal lesions [29].

### Summary

Stroke is the second most common cause of death and the leading cause of acquired disability in adults in the developed countries (WHO) [1]. Stroke most often affects the motor functions. The neurocognitive disorders, including neuropsychiatric disorders are common and permanent poststroke consequences. They influence quality of life and long-term prognosis in a big extent. Depression occurs more frequently in poststroke patients than in general population [5]. Anxiety is also common following stroke [5], similarly to apathy syndrome [37]. The origin of these syndromes is unknown, but their prevalence suggests common base mechanisms, that is fluctuations of neurotransmitters, inflammations or disturbed links with the limbic system. Poststroke cognitive functions disturbances are often overlooked due to the dominant character of the other 'vascular' deficits, such as: hemiparesis, hemianopsia, at least at the initial phase of disability [2, 32, 33]. It results from the clinical experience that cognitive functions disorder patients are more helpless than patients with a motor deficit who, with suitable organisation of life, can become relatively independent and, most of all, they do not lose mental and emotional attention. However, difficulties in verbal communication, reading and writing disorders, inability to remember current information or retrieve past information, difficulties in logical reasoning, inadequate emotional reactions, reduced capacity for higher-level emotions, and limited awareness of one's deficits create considerable disruptions in social functioning and in the circle of

the closest people. The awareness of the cognitive deficits rehabilitation necessity is on the rise among patients, both in the medical society and among patient's families [4, 23]. The improvement of the cognitive functioning is not the only form of psychological aid to a poststroke patient. The professional psychotherapy aimed at support, alleviating pathological emotional behaviour, insight improvement, relaxation training, patient and their relatives' psychoeducation are an essential element of the improvement process [14, 26]. Psychotherapy and cognitive therapy should not be treated just as a luxurious extra to rehabilitation, but as an integral element of comprehensive rehabilitation to improve poststroke patients' quality of life since, quoting Howard A. Rusk *We have learned to add years to human life, so we are responsible for adding life to those years...*

Neurorehabilitation is a complex process requiring comprehensive measures on various levels. Identifying, control and modification of risk factors of neurocognitive impairment patients is crucial [2, 3, 4]. It is important to introduce pharmacological and non-pharmacological forms of treatment as soon as possible. Further research on neurophysiological processes undergoing in brain injury patients and analysis of the effectiveness of employed therapeutic strategies are needed.

## References

1. Bembenek J. Przewczaszkowa stymulacja magnetyczna po udarze. *Neurol Dypl* 2016; 11(5): 7-13.
2. Burton L, Tyson SF. Screening for cognitive impairment after stroke: a systematic review of psychometric properties and clinical utility. *J Rehabil Med* 2015; 47: 193-203.
3. Ganguly K, Byl NN, Abrams GM. Neurorehabilitation: Motor Recovery After Stroke as an Example. *Annals of Neurology* 2013; 74: 373-381.
4. Reinkensmeyer DJ, Burdet E, Casadio M, et al. Computational neurorehabilitation: modeling plasticity and learning to predict recovery. *J Neuroeng Rehabil* 2016; 13: 42.

5. Douven E, Schievink SH, Verhey FR, et al. The Cognition and Affect after Stroke - a Prospective Evaluation of Risks (CASPER) study: rationale and design. *BMC Neurology* 2016; 16:65.
6. Chen CN, Tsai CC, Chung CY, Chen CL, Wu K, Chen HC. Potential predictors for health-related quality of life in stroke patients undergoing inpatient rehabilitation. *Health Qual Life Outcomes* 2015; 13:118.
7. Malczewski D. Wczesna rehabilitacja i profilaktyka powikłań po udarze mózgu. *Terapia* 2006; 10: 22-25.
8. Laidler P. Rehabilitacja po udarze mózgu. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1996.
9. Rejzner C, Gustyn T, Stelmasiak Z. Rehabilitacja osób z naczyniowym uszkodzeniem mózgu. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1998.
10. Diagnostic and statistical manual of mental disorders – fifth edition (DSM-V). Arlington: American Psychiatric Association; 2013.
11. Hommel M, Carey L, Jaillard A. Depression: Cognition relations after stroke. *Int J Stroke* 2015; 10: 893-896.
12. Knopman DSK. Ołepienie i choroba naczyniowa mózgu. *Neurol Dypl* 2006; 2: 24-33.
13. McManus J, Pathansali R, Steward R. Zespól majaczeniowy u pacjentów z udarem mózgu. *Neurol Dypl* 2008; 1: 30-36.
14. Man GJM, Hafsteinsdóttir TB, Lindeman E, Geerlings M, Grobbee DE, Schuurmans MJ. Clinical Manifestation of Depression after Stroke: Is It Different from Depression in Other Patient Populations? *PloS ONE* 2015; 10(12).
15. Pobielska M, Pobielski J. Terapia zaburzeń psychicznych po udarach mózgu. *Terapia* 2008; 1: 2-25.

16. Orfei MD, Robinson RG, Prigatano GP, et al: Anosognosia for hemiplegia after stroke is a multifaceted phenomenon: a systematic review of the literature. *Brain* 2007; 130: 3075-3090.
17. Warren JE, Crinion JT, Ralph MLR, Wise RJS. Anterior temporal lobe connectivity correlates with functional outcome after aphasic stroke. *Brain* 2009; 132: 3428-3442.
18. Kossut M. Mechanizmy plastyczności mózgu. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN;1994.
19. Kossut M. Plastyczność mózgu po udarze - mechanizmy neuronalne. *Neurol Neuroch Pol* 2008; 42 /Supl/4: 290.
20. Herzyk A. Wprowadzenie do neuropsychologii klinicznej. Warszawa: Scholar; 2009.
21. Dimitrijević MR. Plastyczność układu nerwowego w procesie przywracania funkcji ruchowych u ludzi. *Neurol Neurochir Pol* 1996; 30 / Supl./: 9-15
22. Mak M. Neurorehabilitacja jako forma oddziaływania terapeutycznego w chorobach psychicznych. *Terapia* 2008; 1: 46-49.
23. Wall KJ, Isaacs ML, Copland DA, Cumming TB. Assessing cognition after stroke. Who misses out? A systematic review. *World Stroke Organization* 2015; 10: 665-671.
24. Thompsn M, Thompson L. Neurofeedback, Wrocław: Biomed Neurotechnologie; 2012.
25. Seniów J, Członkowska A. Poznawcze i emocjonalne konsekwencje udaru mózgu w aspekcie rehabilitacji. *Rehabil Med* 2003; 7: 9-14.
26. Baddeley AD, Kopelman MD, Wilson BA. *The Handbook of Memory Disorders*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2002.

27. Wilson B. Memory rehabilitation: Integrating theory and practice. New York: The Guilford Press; 2009.
28. Seniów J. Rehabilitacja neuropsychologiczna chorych z zaburzeniami poznawczo-behawioralnymi po uszkodzeniu mózgu. *Neurol Neurochir Pol* 2005; 39 (supl. 3): 747-750.
29. Kaplan HI, Sadock BJ, Sadock VA. *Psychiatria kliniczna*. Wrocław: Wydawnictwo Urban & Partner; 2012.
30. Carson RC, Butcher JN, Mineka S. *Psychologia zaburzeń*. Sopot: GWP; 2003.
31. Jokinen H, Melkas S, Ylikoski R, et al. Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery. *Eur J Neurol* 2015; 22: 1288–1294.
32. Zucchella C, Capone A, Codella V, et al. Assessing and restoring cognitive functions early after stroke. *Funct Neurol* 2014; 29(4): 255-262.
33. Diagnostic and statistical manual of mental disorders – fourth edition (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association; 2005.
34. Carin-Levy G, Mead GE, Nicol K, Rush R, Wijck van F. Delirium in acute stroke: screening tools, incidence rates and predictors: a systematic review. *J Neurol* 2012; 259: 1590–1599.
35. Smith PJ. Delirium affects length of hospital stay after lung transplantation. *J Crit Care* 2015; 30: 126–129.
36. Klimiec E, Dziedzic T, Kowalska K, et al. Prospective Observational Polish Study on post-stroke delirium (PROPOLIS): methodology of hospital-based cohort study on delirium prevalence, predictors and diagnostic tools. *BMC Neurology* 2015; 15: 94.
37. Pendlebury ST. Stroke-related dementia: Rates, risk factors and implications for future research. *Maturitas* 2009; 64: 165-171.

38. Pendlebury ST, Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology* 2009; 8: 1006–18.
39. Sagen U, Finset A, Moum T, et al. Early detection of patients at risk for anxiety, depression and apathy after stroke. *Gen Hosp Psychiatry* 2010; 32: 80–85.
40. Seniów J, Komajda R, Zaborski J. Zespół apatii w konsekwencji uszkodzenia mózgu – trudny problem neurorehabilitacji. *Rehabil Med* 2005; 9(2): 15-19.
41. Bembenek J, Szutkowska-Hoser J. Zespół apatii po udarze niedokrwiennym mózgu – prezentacja przypadku i przegląd piśmiennictwa. *Post Psychiatr i Neurol* 2011; 20(4): 297–301.
42. Chen P, Hartman AJ, Galarza PC, DeLuca J. Global Processing Training to Improve Visuospatial Memory Deficits after Right-Brain Stroke. *Arch Clin Neuropsych* 2012; 27: 891–905.
43. Jokinen H, Melkas S, Ylikoski R, et al. Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery. *Eur J Neurol* 2015; 22: 1288–1294.
44. Krekora K, Czernicki J. Biologiczne sprzężenie zwrotne w rehabilitacji chorych po udarze mózgu. *Rehabil Med* 2005; 3: 32-37.
45. Seniów J, Członkowska A. Poznawcze i emocjonalne konsekwencje udaru mózgu w aspekcie rehabilitacji. *Rehabil Med* 2003; 7: 9-14.

**Adress for coresspondence:**

mgr Sebastian Marszałek

Department of Rehabilitation, Regional Hospital to them. Pope John Paul II in Bełchatów,

Czapliniecka 123 St., 97-400 Bełchatów

email: mers2@wp.pl

phone number: 44 6358332