



Journal of Health Study
and Medicine

2017, nr 2

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

E-version is the original version of the article, available:
jhsm.san.edu.pl

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

- 5 **Kinga Ostrowska** | *Persister Cells Generation and their Role in Recalcitrance of Biofilms Towards Antibiotics (Part 1)*
- 23 **Kinga Ostrowska** | *Persister Cells Generation and their Role in Recalcitrance of Biofilms Towards Antibiotics (Part 2)*
- 39 **Sebastian Marszałek, Ewa Lasota** | *Neuropsychological Sequelae of Out-Of Hospital Cardiac Arrest (Case Study)*
- 55 **Dominik M. Matusiak** | *Zagrożenia wynikające z obecności drobnoustrojów chorobotwórczych i ich toksyn w produktach mlecznych*
- 77 **Monika Morąg, Agnieszka Burza** | *Budowa, właściwości i funkcje kolagenu oraz elastyny w skórze*
- 101 **Anna Pieniążek, Mariusz Pietrzak** | *Halitoza – etiologia, metody diagnostyki i leczenie*



Persister Cells Generation and their Role in Recalcitrance of Biofilms Towards Antibiotics (Part 1)

Kinga Ostrowska¹

¹Laboratory of Clinical and Transplant Immunology and Genetics,
Comprehensive Oncology and Traumatology Centre,
Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland

Summary

In all environments nature provide evidences that two is much more than one, and that strength lies in integrity and unity. Highly complex and well organized communities formed by aggregated bacterial cells surrounded by a hydrated, self-produced matrix of extracellular polymeric substances are commonly known as the biofilms. The specific biofilm lifestyle confers on the associated bacteria a measurable decrease in susceptibility to antimicrobial agents. Once the complex structure of biofilm is established resident bacteria are able to survive after diverse types of physical and chemical aggression such as UV, heavy metals or phagocytosis. It is now clear that biofilm bacteria exhibit a characteristic ability to withstand the antibiotics killing mode of action, being directly responsible for difficulties and failures in therapeutic and clinical settings.

Key words

persister cells, bacterial biofilm, antibiotic resistance, SOS response

Introduction

Despite the passage of time, acute bacterial infections, life-threatening diseases caused by microbial pathogens such as *Yersinia pestis* or *Vibrio cholerae* are still a weak point of the mankind. Initially, due to discovery of antibiotics, vaccines and hygiene rules application, a significant reduction of lethal incidents related to bacterial infections was observed [1,2]. However, the golden age of antibiotics did not solve such challenges as occurrence of antibiotic-resistant microbes together with still rising level of chronic bacterial infections difficult to eradicate [3].

At the same time the progressive research conducted by environmental microbiologists confirmed prevalence of bacterial biofilm conglomerates in all types of natural niches and ecosystems [4]. Soon clear became the fact, that bacterial biofilms display specific biological properties in comparison to their planktonic counterparts [5]. First data pointing out the direct correlation between persistent infections and bacterial biofilm development came from J.W., Costerton and N. Hoiby during their research of *Pseudomonas aeruginosa* colonization model on the lungs of CF patients [6]. Since then, a significant role of bacterial biofilms in the pathophysiology of tissue-related infections has been widely confirmed and proved.

Whilst the planktonic bacteria can be easily eradicated by diverse antimicrobial drugs, a subset of biofilm bacteria highly tolerant to antibiotics survives the treatment and becomes a cause of infection recurrence [7]. The ability of bacterial biofilms to withstand harmful bactericidal antibiotic activity, even when these bacteria are susceptible to such antimicrobial agents is called “recalcitrance of biofilm bacteria towards antibiotics” [3, 8]. Among many suggested reasons potentially able to explain the above mentioned recalcitrance phenomenon, the presence of an isogenic subpopulation of “persister cells” is now considered as the most important one [9].

Biofilm as an ancient survival strategy

In all environments nature provides evidence that two is much more than one, and that strength lies in integrity and unity. The classic view on bacterial biofilms defines those structures as highly complex and organized bacterial communities attached to a biotic or abiotic surface formed by aggregated bacterial cells surrounded by hydrated, self-produced matrix

of extracellular polymeric substances (EPS) [10, 11, 12, 13]. The first evidence of existence of those bacterial conglomerates occurred in the 17th century through simple microscopic dental plaque analysis conducted by Anton van Leeuwenhoek [14]. The first definition of biofilm describing it as a well-organized structure of bacterial cells arose in 1987 by Costerton et al [15]. Biofilm formation has been demonstrated for considerable number of microorganisms and is considered as an ancient prokaryotic mode of adaptation and a key factor allowing for survival in diverse, often hostile environments [16]. The formation of matrix-enclosed bacterial accretions does not only protect bacteria from the unfavorable environmental conditions but also due to various dispersal mechanism allows bacteria to efficiently colonize new niches [17].

Although surface-associated bacterial biofilm communities are widespread in all natural habitats, where they play an important positive role, mostly they are known for their negative and harmful activity, in particular including biofilm-related infections. Unlike natural biofilms, which usually are multispecies structures, pathological biofilms are mostly created by a single species of bacteria [13]. Based on the phenomenon of *Pseudomonas aeruginosa* lungs tissue colonization observed in cystic fibrosis patients, J.W. Costerton with N. Høiby and their collaborators were the very first researchers to point out a direct correlation between persistent infections and biofilm development [3, 18]. The next decades of research were about to confirm the crucial role of biofilms in the pathophysiology of tissue-related infections [19]. The direct link between microorganism living on the surfaces and human infections development became clear and rose to final estimation that 65% to 80% of infectious diseases were correlated with bacterial biofilms [3]. The specific properties of bacterial biofilms are highly problematic and posing an ever increasing problem mainly because of their enhanced tolerance to multiply in unfavorable conditions including high concentrations of antibacterial agents such as antibiotics.

The architecture of bacterial biofilms: three-dimensional structures formation step by step

The unique form of existence presented by bacterial populations living on surfaces was pointed out in the 20th century by pioneering studies of Henrici and further by Costerton and collaborators. Virulent biofilms for-

med on multiple types of surfaces are biological phenomenon associated with diverse infections and illnesses such as native valve endocarditis, oral diseases or nosocomial infections [20].

Biofilm formation is a complex process arising as a combination of physiological and molecular events. It can be classified into five stages including: (a) surface film development, (b) cells attachment to the surface, (c) microcolonies formation, (d) differentiation and maturation of the biofilm along with expression of matrix polymers and (e) finally dispersal of bacterial cells from biofilm structure [21].

The first and crucial stage in the biofilm formation process involves attachment/adhesion. It occurs in two steps: initial, weak and fully reversible attachment and strong permanent irreversible adhesion of bacterial cells to a surface. Reversible attachment to a surface might be a response to the absence of nutrient availability, also due to the impact of hydrodynamic forces and usage of different diverse appendages and structures, such as extracellular organelles including outer membrane proteins, curli fibers, flagella, intimins, invasins, fimbriae and pili. Microbial cells adsorb irreversibly due to specific binding of their adhesins to the ligands present on the solid surface, then replicate and form microcolonies with physical dimensions equal to tens or hundreds of microns in diameter [12, 22]. When bacterial biofilm is formed inside macroorganism (*in vivo*) a significant role in this process play the extracellular matrix proteins (ECM). Many of bacteria like Gram-positive *Staphylococcus aureus* possess on their surface adhesins for ECM, included in the microbial surface components recognizing adhesive matrix (MSCRAMMs). Attached irreversibly to the solid surface, bacterial cells secrete an extracellular polymeric substance (EPS) which forms a physical barrier (hydrogel layer) between bacterial community and extracellular environment. Highly hydrated (98% water) EPS consisting of lipids, proteins, lipopolysaccharides and DNA provide the structure and the matrix that define a biofilm as a structure extremely heterogeneous, both over time and in space [22, 23]. The composition of the EPS is different and depends on growth conditions, species and, moreover, chemical interaction between bacterial cells within the biofilm that stimulate its secretion and formation [24]. One of the widely described type of chemical communication is Quorum sensing (QS). This specific type of chemical interaction is crucial phenomenon in biofilm formation and a central mechanism used by bacteria to query extracellular environ-

ment [12]. Quorum sensing modulates various cellular functions such as motility, pathogenesis, conjugation or nutrient exposition [25]. As bacterial cells replicate and the EPS accumulate, the microbial community arises into a three-dimensional structure and matures into a biofilm. Biofilm resident bacterial cells are bonded together by the EPS, which provides structural stability, protection against antimicrobials, immune effectors, phagocytosis and other clearance mechanisms [26]. Moreover EPS “glues” bacterial cells together, thereby protecting bacterial community against detachment from the surface [27]. The last but not least step for biofilm propagation and self-renewal of the microbial community is bacterial cells detaching and dispersing into the bulk fluid. Microbial cells detached from some regions of biofilm structure may attach to the solid surface within new environmental niches and give rise to new biofilms [15].

Extracellular polymeric substances (EPS)

Biofilms are well organized multicellular conglomerates encased in an extracellular polymeric substances (EPS). The EPS are extremely important for the biofilm communities since their unique biochemistry promotes recalcitrance to antimicrobial agents such as antibiotics and plays a crucial role in the resistance phenotype of the biofilm conglomerates [28]. Moreover, as the EPS encase the bacterial cells, they become the first line of interaction with the human immune system [29, 30, 31]. Mutants unable to produce EPS are not capable to create a stable and sustainable biofilm [32, 33, 34]. The EPS production depends on multiple important factors, which include growth phase, nitrogen and carbon sources together with their ratio, role of such nutrients as phosphorus, micronutrients/trace elements or vitamins, also impact of pH, temperature, metals, growth conditions (anaerobic versus aerobic) or type of bacterial culture (pure versus mixed culture) [35]. The EPS may influence the physicochemical properties of the cells, such as polymeric features or hydrophobicity [36]. Depending on the bacteria that initiate formation of the EPS, their composition may be very diverse, but most are comprised of polysaccharides, extracellular DNA (eDNA), bacterial proteins and phospholipids.

Polysaccharides constitute the largest part of the EPS matrix and mediate adhesion and cohesion, play crucial role in stabilization of biofilm structure. The Gram-negative bacteria like *Providencia* typically produce

negatively charged polysaccharides due to the presence of such compounds in their sugar backbone as uronic acids, phosphate and sulfate groups or pyruvate. Negative charge of the surface permits binding of calcium and magnesium cations, which by the cross-linking binding with the polymer chains stabilize the structure of the biofilm [12]. Polysaccharide complexes are composed of long and thin chains connected together and with the bacterial cells by means of electrostatic and hydrogen bonds (an alternative way of binding to bacterial cells may also occur by lipids). There are diverse classifications of polysaccharides produced within the matrix according to which we can distinguish homopolysaccharides, heteropolysaccharides and their linear, branched or cyclic counterparts. An important group of polysaccharides presents the capsular (cell-associated) and slime (not cell-linked) form [37].

Most Gram-negative bacteria produce the outer membrane vesicles (OMVs) containing diverse groups of molecules, which oversee courses of different biological processes. For instance the bacterial OMVs can enable transport of molecules to other microbial cells within their environment. Experimental studies revealed that OMVs are components of the nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm EPS [35, 38, 39]. Although the OMVs role in modulating EPS either biofilm structure has not been fully evaluated, mutant organisms able to modulate both NTHI and *Escherichia coli* OMV biogenesis have been identified [40].

Despite the fact that the number of proteins in the matrix is approximately 5 times lower than the polysaccharides, those compounds are recognized for their increasing importance in bacterial biofilm function and structure. Large-scale proteomic analyses performed on NTHI and *Pseudomonas aeruginosa* EPS showed abundance of both outer membrane proteins and type IV pili. Matrix proteins include motility organelles, secreted proteins as well as components of adhesins [41,42]. The participation of two classes of proteins, which are lectins and lyases, is discussed in the formation of the matrix. Lectins are named to be a carbohydrate-binding proteins, occurring mostly on outer membrane of Gram-negative bacteria, also peptidoglycan and fimbrias [37]. This molecule abundance plays a mediating role in adhesion process between macroorganism cells and bacterial cells. Lectin may be also responsible for binding cells with EPS and cell co-aggregation, thereby enables the biofilm formation

[43]. One of the best and most widely studied proteins are lectins LecA and LecB produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Both lectins are carbohydrate-binding proteins committed in biofilm formation process [24, 44]. Moreover, among others well known proteins we can name large surface protein BapA, associated with robust biofilm formation in Gram-negative *Salmonella* species [45]. The biofilm EPS promotes the recalcitrance toward antibiotics and limited killing by innate immune components. Negatively affected by the EPS are also such processes as opsonization by immunoglobulins and complementation. It is widely accepted that resident biofilm bacteria respond by producing components and factors which significantly limit the non-oxidative and oxidative powers of phagocytic cells succor survival abilities of bacteria [46].

Resistance and tolerance: dangerous composition leading to biofilm recalcitrance phenomenon

The biofilm lifestyle confers on the associated bacteria a measurable decrease in susceptibility to antimicrobial agents. Once the complex structure of biofilm is established, the resident bacteria are capable of surviving the diverse types of physical and chemical aggression, such as heavy metals, modulation in salinity, phagocytosis, UV light or acidity [3, 47, 48]. It is now clear that biofilm bacteria reveal characteristic ability to withstand killing mode of action mediated by antibiotic, which is directly responsible for difficulties and failures in the manner of therapeutic and clinical settings.

Nowadays it is obvious that wide-studied mechanisms involved in antibiotic resistance, like for instance modifying enzymes or efflux, play no more than marginal role in the abilities of bacterial biofilms to survive conventional antibiotics [3, 49]. Bacterial cells embedded in a biofilm are capable to partially withstand high dosage of antibiotics, even when these microorganisms are completely susceptible to those antibiotic under planktonic life conditions. This complex phenomenon is called “recalcitrance of biofilm bacteria towards antibiotics” and is due to many mechanisms including resistance and tolerance [10]. *In vitro* studies of how planktonic bacterial cells can escape and survive antibiotic treatment brought scientist to the two concepts of tolerance and resistance.

Resistance is simply defined as the ability of bacterial cells to survive (multiply) in the presence of both bacteriostatic and bactericidal an-

antimicrobial agent [50, 51, 52]. Typically resistance phenomenon is tested by evaluation of minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial compound. Many mechanisms stand behind resistance, including reduced permeability to antimicrobial agents (antibiotics), efflux pump or enzymes destroying antibiotics. Moreover, it is important to realize that resistance is very often genetically inherited and hence transmitted between bacterial generation, or it also can be acquired through horizontal gene transfer [3].

Unlike resistance, tolerance is only associated with usage of bactericidal antimicrobial agents, that is to say an antimicrobial agent kills at least 99.9% of bacterial cells within 12 hours [51]. According to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the lowest concentration of antimicrobial agent capable to reach this killing threshold is hereafter named minimal bactericidal concentration (MBC) [51]. In other words, the definition of tolerance can be expressed as the absence of growth, but the presence of microorganisms survival in the presence of a bactericidal antimicrobial agent. Two types of tolerance have been distinguished. First the genotypic one in which presence of a genetic alterations and modifications lead to ability of the antimicrobial agent to kill bacterial cells to be reduced, moreover can be transferred to the next generation cells. Diverse examples have been described e.g. in small colony variants of Gram-positive *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pneumoniae* [3, 53]. In the case of phenotypic tolerance the environment leads to decreased capacity of antibiotics to kill. However, noteworthy is the fact that this type of tolerance is fully reversible once returned to a growth-promoting growth media [54].

Study of bacterial biofilms has offered at least several physiological explanations of the recalcitrant nature of those bacterial conglomerates. Despite the fact that recalcitrance can be defined as a combination of tolerance and resistance, biofilm phenotype is more prone to tolerance rather than resistance [55, 56]. Biofilm recalcitrance phenomenon in most of the cases is non-inherited and can be reversed when biofilm structure is disrupted and microorganisms return to a planktonic form [57].

Antibiotic penetration and drug indifference

Bacterial biofilm recalcitrance is a multifactorial and thus extremely complex phenomenon. Moreover, depending on the type of antibiotics used it

involves diverse mechanisms like drug indifference or impaired antibiotic diffusion [3].

Bacterial biofilms are sessile communities of cells resided in a matrix consisting of extracellular polymeric substances (EPS). Historically, it was postulated that the intrinsic antimicrobial resistance in biofilms is caused by self-produced and adhesive matrix, which was proposed to be the main culprit responsible for biofilm recalcitrance phenomenon [48]. Many data suggest that physicochemical properties of the EPS can retard or delay penetration of multiple diverse compounds, including antibiotics and antiseptics. The activity of an antibiotic can be reduced by adsorption on the matrix due to electrical interactions with polymers that surround bacteria within the biofilm [58]. Moreover, penetration of positively charged aminoglycosides is also slowed by polymers of the biofilm matrix which are negatively charged [59]. Observation of antibiotic diffusion through cardiac vegetation in endocarditis indicated that diffusion gradient is possible in the case of penicillin and glycopeptides – teicoplanin [60]. Conversely, Hoyle et al. revealed that EPS of *Pseudomonas aeruginosa* were capable of binding tobramycin, thereby exhibit delayed and reduced diffusion of this antibiotic *in vitro*. Moreover, it was indicated that planktonic cells were 15-fold more susceptible to this antibiotic than their biofilm counterparts. Other studies showed that diffusion of chlorine, a commonly used antiseptic was also reduced in the case of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [61, 62]. *Staphylococcus aureus* [63, 64] and *Staphylococcus epidermidis* [65] slime remarkably decrease the activity of the vancomycin. Moreover, the efficacy of such antimicrobial agents as: cloxacillin, imipenem, cefpirome, erythromycin, roxithromycin, clindamycin, fusidic acid, trimethoprim, doxycycline, gentamicin, netilmicin, isepamicin or ofloxacin, also has been negatively affected by the EPS of *Staphylococcus epidermidis*. Moreover, the penetration profile was suggestive of a substrate being consumed within the matrix of the biofilm. Other studies by Suci et al. [66] revealed a reduced rate of ciprofloxacin transport to colonized surface compared with a transport to a sterile surface, suggesting that ciprofloxacin was captured and bonded to the components of biofilm matrix. In the light of foregoing studies, the chemical structure of the biofilm matrix is clearly significant and has been proved that, depending from the type of single pathogen, different types of exopolysaccharides can

be involved, due to the environment immediately surrounding the cells within a biofilm [3, 67].

Nevertheless, the biofilm recalcitrance towards antimicrobial agents cannot be fully explained by reduction or handicap of antibiotic penetration. Mathematical models suggest that for many groups of antimicrobial agents there should be no barrier preventing their diffusion inside a biofilm structure. Such antibiotics as for example ampicillin or gatifloxacin are capable of strong penetration through the biofilm matrix, even though they miss to kill the whole population of biofilm bacteria [68, 69]. Even in the case of antibiotics that slowly diffuse through the biofilm matrix, a significant percentage of them finally reach all biofilm resident bacteria [8, 69]. Furthermore, delayed and retarded antibiotic diffusion through biofilm may have significant consequences in the physiology of bacterial cell, which can adapt to the presence of antimicrobial compounds. Moreover, a very dangerous trend associated with slow or limited diffusion is the transient exposition of biofilm bacteria to subinhibitory concentrations of antibiotics. It is also very likely that limited diffusion protects the biofilm structure from destructive activity of antimicrobials.

Drug indifference together with alteration with microenvironment is another serious problem in the biofilm recalcitrance phenomenon. Most antimicrobial agents is known to be more active against metabolically active microorganism. Microenvironment within deep layers of the biofilm due to a lack of nutrients, pH, or just anoxia can simply have antagonistic influence on antibiotic activity [70]. This problem is particularly conspicuous in the case of β -lactam antibiotics, which are active and fully effective only in combating metabolically active and dividing bacteria. Analogous other physico-chemical characteristic like low oxygen concentration prevailing within the deep layers of the biofilm reduce the bactericidal effect of such antibiotics like tobramycin or ciprofloxacin of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [71].

Literature

1. Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; 49: 3858-3867.

2. Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol* 2012; 20: 577-585.
3. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance towards antibiotics. *Microb Mol Biol Rev* 2014; 3: 510-543.
4. Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf M, et al. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science* 2013; 340: 1583-1587.
5. Dong Y, Chen S, Wang Z, Peng N, Yu J. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 816-826.
6. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, et al. High level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 231-238.
7. Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, et al. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1172-1180.
8. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1980; 28:546-556.
9. Bradshaw JH, Puntis JW. Taurolidine and catheter-related bloodstream infection: a systematic review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47:179-186.
10. Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 2015; 7: 1-7.
11. Balcazar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilm as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microb* 2015; 6: 1216.

12. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Cli Microb Rev* 2002; 15: 167-193.
13. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro* 2004; 2: 95-108.
14. McCarty S, Woods E, Percival S. Biofilms: from the concept to reality. *Biofilms in infection prevention and control: A healthcare handbook* 2014; p.143-158.
15. Costerton JW, Cheung, KJ, Greesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms In nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 4: 435-464.
16. Mai-Prochnow A, Lucas-Elio P, Egan S, Thomas T, Webb JS, Sanchez-Amat, A., Kjelleberg S. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 2008; 190: 5493–5501.
17. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microb* 2005; 1: 7-10.
18. Murillo O, Garrigos C, Pachon ME, et al. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ant Agents Chemother* 2009; 53: 4252-4257.
19. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *PLoS Pathog* 2013; 2: 288-356.
20. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog* 2012; 8(4): e1002623.

21. Abdullahi UF, Igwenagu E, Mu'azu A, Aliyu S, Umar MI. Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine. *Vet World* 2016; 9(1): 12-18.
22. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 2011; 36(5): 347-355.
23. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9): 623-633.
24. Borlee B, Goldman A, Murakami K, Samudrala R, Wozniak D J, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2010; 75: 827-842.
25. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59(3): 253-68.
26. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the outside matters: The role of extracellular polymeric substance of Gram-negative biofilms in evading host immunity and as a target for therapeutic intervention. *JBC Papers in Press* 2016; doi/10.1074/jbc.R115.707547.
27. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in changing world. *Nature* 2007; 449(7164): 804-810.
28. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295: 1487.
29. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol* 2009; 155: 3500-3508.
30. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 310-347.

31. Leid, JG, Shirtliff M, Costerton JRW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to penetrate and respond to *Staphylococcus aureus* biofilm. *Infect Immun* 2002; 70: 6339-6345.
32. Berleman JE, Zemla M, Remis JP, et al. Exopolysaccharides microchannels direct bacterial motility and organize multicellular behavior. *ISME J* 2016; doi: 10.1038/ismej.2016.60
33. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
34. Sutherland I. Biofilm exopolysacchrides: a strong and sticky framework. *Microbiol* 2001.
35. More TT, Yadav JS, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J Environ Manage* 2014; 1: 144:1-25.
36. Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A, Hirata A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 223:287-292.
37. Starkey M, Gray K, Chang S, Parsek M. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. *Microbial Biofilms*, ASM Press. 2004, 174-192.
38. Hong W, Pang B, West-Barnette S, Swords WE. Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J Bacteriol* 2007; 189: 8300-8307.
39. Schooling S R, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 2006; 188: 5945-5957.
40. Roier S, Zingl FG, Cakar F, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun* 2016; doi:10.1038/ncomms10515.

41. Wu S, Baum M, Kerwin, J, et al. Biofilm-specific extracellular matrix proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Pathog Dis* 2015; 72: 143-160.
42. Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res* 2012; 11: 4906-4916
43. Fiorina J, Weber M, Block J. Occurrence of lectins and hydrophobicity of bacteria obtained from biofilm of hospital catheters and water pipes. *J App Microbiol* 2000; 89: 494-500.
44. Imberty A, Wimmerova M, Mitchell E, Gilboa-Garner N. Structures of the lectins 8 from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microb Infect* 2004; 6: 221-228.
45. Crawford R W, Reeve KE, Gunn JS. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol* 2010; 192: 2981-2990.
46. Limoli DH, Rockel AB, Host KM, Jha A, Kopp BT, Hollis T, Wozniak DJ. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog* 2014; 10 (4): 10e1004083.
47. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(5): 972-989.
48. Donlan RM. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Health Care Epidemiol* 2001; 33:1387-1392.
49. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1955-1958.
50. Poole K. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbes Environ* 2008; 3:179-185.

51. Del Pozo JL, Garcia Cenoz M, Hernaez S. Effectiveness of teicoplanin versus vancomycin lock therapy in the treatment of port-related coagulase-negative staphylococci bacteraemia: a prospective case-series analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:482–485.
52. Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:90–94.
53. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, et al. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr(-/-)* mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3677–3687.
54. Hoyle BD, Alcantara J, Costerton JW. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2054–2056.
55. Aggarwal S, Stewart PS, Hozalski RM. Biofilm cohesive strength as a basis for biofilm recalcitrance: are bacterial biofilms overdesigned?. *Microbiol Insights* 2015; 8: 29-32.
56. Turakhia MH, Cooksey KE, Characklis WG. Influence of a calcium-specific chelant on biofilm removal. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46:1236–1238.
57. Ueda A, Attila C, Whiteley M, Wood TK. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microb Biotechnol* 2009; 2: 62-74.
58. Amato SM, Brynildsen MP. Nutrient transitions are a source of persisters in *Escherichia coli* biofilms. *PLoS One* 2014; 9:e93110. 10.1371.

59. Barras A, Martin F, Bande O, et al. Glycan-functionalized diamond nanoparticles as potent *E. coli* anti-adhesives. *Nanoscale* 2013; 5:2307-2316.
60. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2010; 192:6191-6199.
61. Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 2013; 503:365-370.
62. Thien-Fah C, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-39.
63. Mathur T, Singhal S, Khan S. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:353-7.
64. Costenko V, Ceri H, Martinuzzi RJ. Increased tolerance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in viscous media. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51:277-88.
65. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:939-41.
66. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2125-2133.
67. Attila C, Ueda A, Wood TK. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 82:525-533.
68. Lee YS, Han CH, Kang SH, et al. Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. *Int J Urol* 2005; 12:383-389.

69. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 2005; 187:1799-1814.

70. Gomes DL, Peixoto RS, Barbosa EA, et al. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol* 2013; 62:754-760.

71. Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S, Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. *J Oral Implantol* 2003; 29:80-85.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Kinga Ostrowska
Pracownia Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im.
M. Kopernika
ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź
tel. (42) 689 52 80
e-mail: ostrowska.uni.lodz@wp.pl



Persister Cells Generation and their Role in Recalcitrance of Biofilms Towards Antibiotics (Part 2)

Kinga Ostrowska¹

¹Laboratory of Clinical and Transplant Immunology and Genetics,
Comprehensive Oncology and Traumatology Centre,
Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland

Summary

All pathogenic bacteria produce a small fraction of dormant cells that are highly tolerant to antibiotics called „persister cells” or „persisters”. Unlike resistant mutants, persister cells do not proliferate in the presence of an antibiotics and this phenotypic tolerance is not correlated with any genetic alterations or modifications. The presence of these isogenic subpopulations of tolerant cells is a form of insurance strategy at the population level and is considered to be the most appropriate theory to explain the biofilm recalcitrance toward antibiotics. Several number of factors and mechanisms are believed to be involved in generation of persister cells that appear through a phenotypic switch: dormancy, toxin-anti-toxin modules, nutrient limitation or stringent response.

Key words

persister cells; bacterial biofilm; antibiotic resistance; SOS response

Introduction

Despite the passage of time, acute bacterial infections, life-threatening diseases caused by microbial pathogens such as *Yersinia pestis* or *Vibrio cholerae* are still weak point of the mankind. Initially, due to discovery of antibiotics, vaccines and hygiene rules application, a significant reduction of lethal incidents related to bacterial infections was observed [1,2]. However, the golden age of antibiotic did not solve such challenges as occurrence of antibiotic-resistant microbes together with still rising level of chronic bacterial infections difficult to eradicate [3].

At the same time the progressive research conducted by environmental microbiologists confirmed prevalence of bacterial biofilm conglomerates in all types of natural niches and ecosystems [4]. Soon clear became the fact, that bacterial biofilms display specific biological properties in comparison to their planktonic counterparts [5]. First data pointing out the direct correlation between persistent infections and bacterial biofilm development came from J.W., Costerton and N., Hoiby during their research of *Pseudomonas aeruginosa* colonization model on the lungs of CF patients [6]. Since then, a significant role of bacterial biofilms in the pathophysiology of tissue related infections has been widely confirmed and proved.

Whilst the planktonic bacteria can be easily eradicated by diverse antimicrobial drugs, a subset of biofilm bacteria highly tolerant to antibiotics survives the treatment and becomes a cause of infection recurrence [7]. The ability of bacterial biofilms to withstand harmful bactericidal antibiotic activity, even when these bacteria are susceptible to such antimicrobial agents is called "recalcitrance of biofilm bacteria towards antibiotics" [3,8]. Among many suggested reasons potentially able to explain the above mentioned recalcitrance phenomenon, the presence of an isogenic subpopulation of "persister cells" is now considered as the most important one [9].

Persister cells generation

Although there are many attractive hypotheses for biofilm-induced recalcitrance towards antibiotics, they cannot fully explain the phenomenon of biofilm recalcitrance. The best example came from fluoroquinolones – a class of antibiotics that are able to kill non-dividing bacterial cells due to lax diffusion through biofilm matrix, but still not capable to fully eradicate bacterial biofilms [10].

The inherence of stochastically formed dormant persisters in microbial populations has been known since the beginning of the antibiotic era. The very first data describing persistence phenomenon came in 1944 when Joseph Bigger studies revealed presence of persister cell population, survived as dormant, non-dividing cells, completely different from classical and well known antibiotic resistance mechanisms [11, 12, 13]. Bigger described the phenomenon when addition of a lethal amount of penicillin into exponentially growing population of *Staphylococcus aureus* often failed and resulted in survivor colonies. These subpopulations were fully capable of regrowing once the antibiotic level dropped. It is now well known that all pathogenic bacteria produce a small fraction of dormant cells that are highly tolerant to antibiotics called “persister cells” or “persisters” [9,14].

Recently, it has been found, that persister cells are responsible for the high tolerance of bacterial biofilms to antibiotics [15]. In a variety of bacterial species, the level of persister cells increased proportionally with the density of the culture [11], reaching 1% in stationary phase or in a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* [16], *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*.

Persisters are a group of generated cells being phenotypic variants of wild type cells, characterized by the surviving abilities in the presence of lethal levels of bactericidal antibiotics. Persistence occurs in subpopulations of slow or non-dividing bacteria, whereas drug indifference concerns the entire population. It is very important to distinguish that bacterial persistence is distinct from antibiotic resistance. Unlike resistant mutants, persister cells do not proliferate in the presence of the antibiotic and this phenotypic tolerance is not correlated with any genetic alterations or modifications. Once the antibiotic is removed, persisters resume growth and give rise to a population that displays an original non-persister antibiotic tolerance profile and produce small proportion (1%

of population) of persister cells. This observation proved that conversely to resistance, persistence is a non-inherited phenomenon. Moreover, it was observed that persisters can arise in response to multiple environmental factors including oxidative stress, presence of antibiotics, SOS response or limitation of nutrient components like carbon.

The presence of these isogenic subpopulation of tolerant cells is a form of insurance strategy at the population level and nowadays it is considered to be the most appropriate theory to explain the biofilm recalcitrance towards antibiotic [3]. Both *in vitro* and *in vivo* studies clearly showed the presence of persister cells in biofilm formed by Gram-negative bacteria [17, 18]. The capacity of a biofilm to limit the access of the immune system agents, together with the ability of persisters to sustain an antibiotic activity account for the recalcitrance of infections *in vivo*. Clinical image in the case of catheter-related bloodstream infections (CRBSI), showed that even after 14-day treatment with significant concentrations of antimicrobial agents, over 20% of infections relapse, mainly because survival abilities of persister cells reside inside the biofilm [3]. When bacterial community experiences intense stress, persister cells may survive, thereby providing survival of the whole community. Moreover, it is possible that persisters are fully capable to escape antibiotic-induced programmed cell death (PCD) [19].

Genes and mechanisms affecting persistence and tolerance towards antibiotics

There are many pathways that may potentially lead to persisters formation. As these dormant cells are present prior to the antibiotics occurrence, they are believed to preside as the result of phenotypic switch [20]. Several mechanisms are believed to be involved in generation of persister cells such as dormancy, toxin-antitoxin modules, nutrient limitation or SOS response. Several genes strongly affecting the level of persistence have been described and screened for the first time by Moyed and Bertrand [21]. Some environmental factors, stochastic gene expression or some passive and active mechanisms are potentially related to the presence of persister cells in bacterial populations. To date, screening of *Escherichia coli* mutant libraries has released no single mutants completely lacking persisters [22, 23]. Under particular conditions toxins from chromosomally encoded toxin-antitoxin (TA) modules have important

roles in the physiology of bacterial cells including functions during the biofilm formation together with multidrug resistance [24,25,26]. Originally TA genes were identified on plasmids where they proclaim a maintenance mechanism. Usually the toxin is a protein that regulates a crucial cellular function such as translation or replication, and forms a non-active complex with the antitoxin. TA systems are also frequently found on bacterial chromosomes, but their role is still unclear and unknown [11]. Despite the fact that molecular nature of TA evolves from RNA molecules to protein, TA modules in general consist of usually stable toxin which disrupts an essential cellular process and unstable, degradable antitoxin being remedy for the effect of the toxin activity, and most often encoded in an operon, resulting in co-translation and co-transcription of both toxin and antitoxin [27]. Toxin is a component that is responsible for inhibiting crucial cellular functions like replication or translation [28]. Degradation-prone antitoxin through formation of idle complex, antagonizes the effect of the toxin compound. Moreover, toxins seem to be attractive effectors of the switch to the persister mode as they stop growth and reduce the activity of the antibiotic target as well [29]. Toxin-antitoxin systems are remarked as a genetic basis in the transformation process of persisters from normal cells and have further been approved by mutagenesis studies [30, 31]. TA modules are widely spread in bacterial genome, at least 37 putative TA systems have been described in genome of *Escherichia coli* and around 65 in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [32]. TA systems are involved in persister formation in *Escherichia coli*. Moreover, the examination of TA systems in *Mycobacterium* was proved to increase the abilities of entering the persistence state, and resulting in multidrug resistance [33].

Deletion of such operons as *hipA*, *tisB* or *mqsR* has a dramatic effect on the persistence level [34]. The first locus identified to have an impact on persister formation was *hip* ("higher persister"). Overexpression of *HipA* is highly toxic and halts cell division and is considered as locus that carries a toxin/antitoxin module [3]. According to Chaignon *et al.* *HipA* was initially the locus to phosphorylate translation factor EF-Tu, directly being a cause of persistence due to cell stasis [35]. Recent data point out that most likely variant is that *HipA* inhibits glutamyl-tRNA Synthetase (*GltX*) via phosphorylation and triggers the synthesis of ppGpp [3, 15]. The *hipA7* mutant is a result of a double mutation and has alike effects

as overexpression of HipA [36]. In this particular *hipA* mutant the level of persister is increased 1000-fold compared to the wild-type, with simultaneously increased degree of tolerance to such groups of antibiotics as aminoglycosides, β -lactams and fluoroquinolones [37]. Deletion of *hipB* is lethal for bacterial cell, because of strong toxicity effect of HipA, which may suggest that HipB is the native repressor of the operon. On the other hand, the deletion of *hip* locus has absolutely no impact on frequency of persister cells during the exponential phase of growth. Keren *et al.*, by using a *hipA7* *E. coli* mutant have confirmed that overexpression of *relE* lead directly to growth setback with simultaneous increase in the level of persisters cells [11]. Deletion of the *hipBA* locus has no impact on persister formation in a growing culture but leads to a decrease of persisters level in the stationary phase bacterial culture [3, 38]. Interestingly, deletion of other TA modules seemed to have no influence on persisters level in stationary microbial culture, which gave beginning to the redundancy hypothesis. Further experiments conducted by Maisonneuve *et al.*, confirmed redundancy by showing that single mutation of 10 TA modules had completely no impact on persister occurrence, while combination of mutations significantly increased susceptibility towards ciprofloxacin and ampicillin [39]. Afterwards, the same group proved that *E. coli* cells with low ribosomal activity are enriched in persisters. The gene expression studies confirmed overexpression of *dinJ*, *yefM* and *yoeB* (known TA systems) but moreover also part of the *ygiUT* operon takes after a TA module. Important observation was that overexpression phenomenon of *ygiU* directly caused inhibition of growth together with increasing the tolerance level towards such antibiotics as cefotaxime and ofloxacin [3, 40].

Another well-characterized TA system important to persistence is MqsR/Mqs [41]. MqsR is an RNase toxin, which cleaves almost all mRNA [42]. Overproduction of MqsR was proven to significantly increase persistence (Kwan, B.W., *et al.*, 2013) while the deletion of *mqsR* resulted in decreased persistence phenomenon, which was the very first data showing that the absence of a toxin affects persistence. Another similar observation was made with TisB/IstR-1; a TA system where the toxin, TisB, decreases ATP levels, and induces the *tisB* transcription via the SOS response increasing persistence [30]. Currently, a novel TA module, type V, has been correlated with persistence in *Escherichia coli* cells, composed of

GhoS anti-toxin and GhoT toxin module. GhoS conceals toxicity of GhoT via peculiar cleavage of *ghoT* mRNA and prevents the synthesis [43].

The term SOS response, known also as the DNA damage response, refers to repair process of the DNA in bacterial cells [44]. The SOS genetic network gathers diverse molecular mechanisms activated by genomic DNA damage caused by such conditions as oxidative radicals, ultraviolet radiation (UV) or mutagens (including quinolone antibiotics). This set of co-regulated genes is widespread in microorganisms and promotes survival of bacterial cells by repairing damage of the DNA. In gram-negative pathogen *E. coli* the SOS system consists of more than 40 genes characterized by different functions depending from the DNA damage type, including halt of cell division, translesion DNA replication, excision repair of nucleotides or homologous recombination [45]. The SOS system is regulated by the LexA repressor protein which downregulates the expression of other SOS genes, includes *lexA* itself and thereby controls the whole SOS network. Following ssDNA or dsDNA damage, the RecA nucleoprotein promoters assemble into filaments along stretches of ssDNA near arrested replication forks. The activated RecA together with the LexA repressor activates autocleavage of the LexA, what results in relieving repression of the SOS system. Inactivation of the LexA repressor leads to synthesis of Sula protein, which by binding to the protein responsible for division ring formation (FtsZ) completely halts cell division. Once the DNA-damaging exposure period ends, the Sula accumulates and completely inhibits bacterial cell division. On the other hand, upon DNA repair protein Sula is degraded by the Lon protease, maintaining continuity of cell division. Within the SOS regulon are also genes responsible for nucleotide-excision repair (*uvrABC*), genes required for recombination (*recA*) and also genes responsible for encoding DNA polymerases (*dinA*, *umuDC*, *dinB*) [46].

In 2004, scientists have established a correlation between the SOS network and tolerance [47]. The authors demonstrated that inactivation of penicillin-binding protein 3, caused by β -lactams-induced SOS in pathogenic gram-negative *Escherichia coli* via DpiBA system. The above mentioned phenomenon temporarily stops division of bacterial cells and enables survival upon other lethal antibiotic exposure. In 2013 Bernier *et al.*, proved that nutrition limitation together with the SOS response can induce high biofilm specific tolerance toward antibiotic ofloxacin [48].

SOS-dependent biofilm specific ofloxacin tolerance is independent of toxin-antitoxin systems induced by the SOS response and previously associated with bacterial persistence. Consistently, we observed that SOS dependent ofloxacin tolerance increases with biofilm age. Recently more attention is paid to how starvation and SOS response could induce biofilm tolerance to ofloxacin [48]. Bernier *et al.*, by performing experiments on modified strain of *E. coli*, characterized by strong abilities to form biofilms with higher tolerance upon antibiotics, have identified amino acid auxotrophs with strong tolerance towards antibiotics while starvation. Another significant observation was that *recA* together with other SOS genes were extremely induced in mature biofilms in comparison with planktonic cells [49].

The genetic heterogeneity of bacterial biofilms, which may arise through mutations, local nutrient limitations or stochastic gene expression, could be the milestone on the road to drug indifference. The importance of starvation and nutrient limitation seemed to be confirmed in the late stationary phase of growth when the level of persisters increases to finally reach the maximum [11]. Conversely, when bacterial culture is constantly kept at exponential phase, where constant dilution and medium renewal occur, persister cells disappear.

Other significantly important locus affecting cell survival is *relA*. In situation when nutrients become limited for growth, *Escherichia coli* cells switch their gene expression program from supporting growth to allowing for prolonged survival in stationary phase. Slow rate of growth lead to activation of RelA-dependent synthesis of ppGpp, which is responsible for inhibition of anabolic processes in microbial cells [50]. In most of bacterial species, a crucial point of this switch is the accumulation of the alarmone guanosine 5',3' bispyrophosphate (ppGpp) [51]. This ppGpp-mediated stringent response induced in nutrient limitation conditions for many years was postulated to have major role in phenotypic switch of persister cells. Finally the overexpression of ppGpp in *Escherichia coli* was described not only to increase level of antibiotic tolerance, but also to halt phospholipids and peptidoglycan synthesis ipso facto showing a link between antibiotic tolerance, the stringent response and starvation [3, 52].

Concluding notes

Biofilm recalcitrance phenomenon towards antibiotics and antiseptics is one of the main reasons responsible for most of the difficulties in the treatment of biofilm-related infections. Despite the fact, that major advances have been made in the characterization of factors associated with this problematic biofilm property, still little is known about nature of persisters. Recognition of the precise role played by persister cells and identification of molecular mechanisms involved in the persisters formation could be the key to developing a new promising antibiofilm strategies, thus novel approaches in treatment of chronic biofilm-based infections.

Literature

1. Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; 49: 3858-3867.
2. Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol* 2012; 20: 577-585.
3. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance towards antibiotics. *Microb Mol Biol Rev* 2014; 3: 510-543.
4. Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf, et al. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science* 2013; 340: 1583-1587.
5. Dong Y, Chen S, Wang Z, Peng N, Yu J. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 816-826.
6. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, et al. High level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 231-238.

7. Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, et al. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1172-1180.
8. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1980; 28:546-556.
9. Bradshaw JH, Puntis JW. Taurolidine and catheter-related bloodstream infection: a systematic review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47:179-186.
10. Turakhia, M.H., Cooksey, K.E., Characklis, W.G. Influence of a calcium-specific chelant on biofilm removal. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46:1236-1238
11. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 230 (1): 13-18.
12. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* II. 1944, 497-500.
13. Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2014; 831, DOI 10.1007/978-3-319-09782-4_1.
14. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; 211:121-33.
15. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 2013; 339: 1213-1216.

16. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183: 6746-6751.
17. Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R, Slatculescu C, Colavita A, Mah TF. Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS One* 2013; 8:e61625. 10.1371.
18. Salminen A, Loimaranta V, Joosten JA, Khan AS, Hacker J, Pieters RJ, Finne J. Inhibition of P-fimbriated *Escherichia coli* adhesion by multivalent galabiose derivatives studied by a live-bacteria application of surface plasmon resonance. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:495-501. 10.1093.
19. Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:90-94.
20. Craig WA, Redington J, Ebert SC. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 (Suppl C): 29-40.
21. Moyed HS, Bertrand KP, Hip A, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of mu-rein synthesis. *J Bacteriol* 1983; 155: 768-775.
22. Spoering A. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006; 188: 5136-5144.
23. Hansen S, Lewis K, Vulic M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; 52: 2718-2726.
24. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000317.

25. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 103-123.
26. Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microb* 2011; 9: 779-790.
27. Wen Y, Behiels E, Devreese B. Toxin-antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis* 2014; 70(3): 240-249.
28. Gethin G, Cowman S. Manuka honey vs. hydrogel - a prospective, open label, multicentre, randomised controlled trial to compare desloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. *J Clin Nurs* 2009; 18:466-474.
29. Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* 2002; 45: 501-510.
30. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2013: 2-20.
31. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64:357-372.
32. Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou H-Y, Rajakumar K, Deng Z. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 606-611.
33. Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000767.
34. Kim Y, Wood TK. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 209-213.

35. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75: 125-132.
36. Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* 2003; 50: 1199-1213.
37. Feng J, Kessler DA, Ben-Jacob E, Levine H. Growth feedback as a basis for persister bistability. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2014; 111: 544-549.
38. Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ, Moyed HS. Structure and organization of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* 1991; 173: 5732-5739.
39. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:13206-13211.
40. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* 2006; 6: 53.
41. Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol* 2012; 5: 509-522.
42. Yamaguchi Y, Park, J-H, Inouye M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2009; 284: 28746-28753.
43. Wang X, Lord DM, Cheng HY, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol* 2013; 8:855-861.

44. Friedman N, Vardi S, Ronen M, Alon U, Stavans J. Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biology* 2005; 3(7): 238.
45. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 2014; 12: 465-478.
46. Schlacher K, Goodman M F. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 587-594.
47. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 2004; 305:1629-1631.
48. Bernier SP, Lebeauz D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppee J-Y, Ghigo J-M, Beloin C. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genetics* 2013; 9(1): e1003144
49. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 2004; 51: 659-674.
50. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
51. Traxler MF, Summers SM, Nguyen H-T, Zacharia VM, Hightower GA, Smith JT, Conway T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2008; 68(5): 1128-1148.
52. Rodionov DG, Ishiguro EE. Direct correlation between overproduction of guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177: 4224-4229.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Kinga Ostrowska
Pracownia Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki
Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im.
M. Kopernika
ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź
tel. (42) 689 52 80
e-mail: ostrowska.uni.lodz@wp.pl

CC-BY-SA 3.0 PL



Neuropsychological Sequelae of Out-Of Hospital Cardiac Arrest Case Study

Sebastian Marszałek², Ewa Lasota^{1,2}

¹ University of Social Sciences, Łódź, Poland

² Department of Rehabilitation, Pope John Paul II Regional Hospital in Belchatow,

Abstract

This paper presents a case of a 63-year old patient after OHCA (out-of-hospital cardiac arrest), who was admitted for rehabilitation in the neurology department. About half of out-of-hospital cardiac arrest survivors experience secondary anoxic brain damage. Neurological outcome can be influenced by rehabilitative treatment approaches, but the nature and severity of persistent disabilities remain unclear. The aim of the study was to explore neuropsychological symptoms, general functioning and life situation of this lady. Function was investigated by clinical rating scales, neuropsychological standard tests, and clinical psychological inventories. Family members were asked about the quality of life before and after OHCA. We presented predictors of outcome and frequency of neuropsychological sequelae.

Key words

cardiac arrest, neuropsychology, cognitive and behavior impairments, neurorehabilitation

Introduction

Out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) is an important cause of death in developed countries, but the advances in emergency healthcare have increased the percentage of cardiac arrest survivors [18]. In Europe the incidence of sudden cardiac arrest in 1980-2004 was estimated to be 38 per 100,00 person/year with a survival rate of 10.7% [1,7]. In Poland, the reported incidence rate of OHCA is 55.6/100,00 inhabitants/year [25]. About 80% of cardiac arrests occur at home, for which the rate of death is at least 90% [1,25]. More than a half of the survivors have permanent brain damage of varying degrees [31]. The use of an implantable cardioverter defibrillator in selected patients and the availability of public-access defibrillators have improved survival with an acceptable quality of life [1,7,39]. In-hospital arrests have slightly better outcomes than those that occur outside the hospital, with restoration of circulation in 44% of patients and survival to discharge in 17% of patients [2]. Two randomized, controlled trials showed a positive effect of hypothermia on mortality and morbidity after cardiac arrest [39].

The human brain has a constant requirement for oxygen to meet energy demands. When oxygen delivery is disrupted, a series of cerebral homeostatic and vascular mechanisms is activated, directed toward maintaining oxygen supply [1,5]. This autoregulation maintains cerebral blood flow against abrupt blood pressure change within a certain range (about 50 – 150 mm Hg) and maintains delivery and utilization of oxygen despite fluctuations in the supply [5,23]. Therefore, even though the brain does not store oxygen, oxygen deprivation must be sustained in order to render cerebral autoregulatory mechanisms effectual and for the brain not to become injured. A period longer than 4 to 8 min is said usually to produce cerebral infarction and disseminated cell death [5,18]. The mechanisms which cause anoxic damage are both complex and diverse. They comprise of a cascade of time-dependent alterations in neuronal function, metabolism and morphology [5,11,13]. The first concerns the distribution and disposition of cerebral blood vessels so that those portions of the supply territory that lie in the fringes of supply of the major cerebral arteries are the first to experience reductions in blood flow [5,13]. Second, the specific metabolic and biochemical properties of the involved structures are such that the higher the metabolic demand of a given area the more likely it is to be affected by oxygen deprivation [5,11,31].

Predictors of Outcome

Most studies that have assessed predictors of outcome in patients with anoxic ischemic encephalopathy have the reliable prediction of an outcome no better than a vegetative state or severe disability with total dependency at 3 to 6 months after arrest as their prime objective. They are shown below [12,13,39].

1. The absence of a pupillary reaction to light suggests a poor prognosis but has unclear specificity when assessed early after a cardiac arrest. All patients whose pupillary reactions were absent at day 3 after cardiac arrest had poor outcomes.
2. The motor response to noxious stimuli also provides useful prognostic information. Prospective studies showed that a motor response to noxious stimuli that was no better than extensor posturing (i.e., a decerebrate response or no response) at 72 hours was associated with a poor outcome.
3. The corneal reflex is tested by touching the cornea with a gauze or cotton swab and looking for contraction of the orbicularis oculi on either side. In two prospective studies, the absence of a corneal reflex at 72 hours was associated with a poor outcome.
4. The absence of eye movements in response to irrigation of the ear canals with ice water at 72 hours is another indicator of poor outcome. However, the caloric response can be blunted by many sedative drugs. To avoid the confounding effects of cumulative or large doses of sedative, anesthetic, and analgesic drugs, it is best to put off testing until there is ample evidence that they have been cleared from the circulation.
5. Myoclonic status epilepticus (bilaterally synchronous twitches of limb, trunk, or facial muscles) is likewise a marker of a poor outcome.
6. Electrophysiological Signs and the measurement of somatosensory evoked potentials (SSEPs), especially the response from the primary somatosensory cortex (assessed 20 msec after electrical stimulation of the median nerve at the wrist), has emerged as the most accurate predictor of a poor outcome in patients with anoxic ischemic encephalopathy.
7. Neuroimaging computed tomographic (CT) images are usually normal immediately after a cardiac arrest, but by day 3 they often

show brain swelling and inversion of the gray-white densities (with the use of quantitative measures) in patients with a poor outcome. Further study is needed to assess the clinical use of these findings in establishing a prognosis.

Many patients who do not have the abovementioned unfavorable clinical features still have poor outcomes. The brain stem is more resistant to anoxic ischemic damage than the cerebral cortex; thus, compromise of brain-stem reflexes suggests that the cortex must be severely damaged. However, preserved brain-stem reflexes do not imply intact cortical function [5,39].

Neuropsychological Sequelae of Anoxic Episodes

OHCA survivors show no fixed pattern of cognitive and neurological consequences of brain injury [25]. Most neurologists encounter these patients during the early phases of coma and confusional states [18]. The symptoms depend on the degree of brain damage, which is proportional to the duration of OHCA [18,27]. The most common cognitive disorders range from minor disability to no conscious cognitive activity due to severe arousal disturbances, limited awareness and attention, and higher-level cognitive dysfunctions. The latter commonly include memory and executive disturbances [14,18] and personality abnormalities [9, 12, 25].

An amnesic syndrome was reported in 54% cases, while memory disturbance without accompanying cognitive change was identified in 19% of them [5]. The amnesia was said to be characterized by intact registration, severely depressed free recall, less depressed recognition memory, and greater than normal susceptibility to interference. The precise nature of the memory disturbance in anoxic patients most likely depends on which brain structures are affected and to what extent. Mackenzie Ross and Hodges [5] found well preserved knowledge of famous people in the context of profound impairment of personally relevant autobiographical memory, which they suggested may be attributable to the multifocal neocortical damage sustained by this patient, who presented generalized intellectual impairment and marked deficits in frontal executive function in addition to the memory deficit [5]. An association between amnesic disorders and the structures of the mesial temporal region, in particular the hippocampus, has long been established [40]. However, the phenomenon of amnesia has not been associated exclusively with the hippo-

campus, and post-anoxic amnesia has not invariably been associated with hippocampal changes [40]. Experimental evidence has demonstrated that lesions to the anterior thalamic nuclei, the fornix and the hippocampus can all produce comparable memory deficits [5,40]. It has also been suggested that there may be a characteristic memory deficit associated with lesions of the dorsolateral prefrontal cortex and caudate nucleus [5]. Unlike amnesic syndromes associated with lesions of the hippocampus or thalamus, frontal amnesic deficits are characterized by poor recall with relative preservation of recognition abilities. Cummings [5] has argued that the reason for this is that the frontal subcortical circuits mediate memory activation and search functions rather than storage; lesions produce deficits of information retrieval with relatively preserved recognition [5]. The precise nature of the memory disturbance in anoxic patients most likely depends on which brain structures are affected and to what extent.

Changes in personality and behavior, or in some aspect of executive function, were noted in 46.2% of individual cases under review [5]. The most frequently reported change in personality was either emotional lability and impulsivity, or alternatively a lack of emotional expression. Both of these were often associated with lack of concern [5]. Reich et al. [5] reported 6 survivors of cardiac arrest who suffered from only mild cerebral impairment, manifested primarily in personality changes and behavioral symptoms. The patients were distractible, irritable, and disinhibited, with disturbances of impulse control and loss of judgment. On mental status examination they showed bland or labile affect, rigid thought patterns, and major disturbances of insight, empathy, and self-awareness. In each case the symptoms were initially mistaken for depression. [5]. Lezak described a reduced capacity for planning, initiating and carrying out activities in association with anoxia, changes in executive function have attracted little attention in this etiology. Reduced executive function in this context refers to distractibility and difficulty with multiple tracking, impaired planning, and poor abstraction [17]. Behavioral changes associated with lesions of the prefrontal region have been amply demonstrated [5]. They include changes in such capacities as the orderly planning and sequencing of complex behaviors, the ability to attend to several components simultaneously or to alter flexibly the focus of concentration, the capacity to grasp the context and gist of a complex

situation, the ability to follow multistep instructions, the inhibition of immediate but inappropriate response tendencies, and the ability to sustain behavioral output without perseveration [5]. Similar behavioral changes including disorders of executive function, personality changes, and mood disturbances are found in patients with lesions in other brain regions, most notably the basal ganglia [5]. The most commonly reported changes associated with basal ganglia lesions include loss of motivation and initiative, loss of cognitive flexibility, reduction in both mental and behavioral activities, blunting of affect, and reduced or altered verbal output [5]. This phenomenon has been explained on the basis of the connectivity between separate regions of the basal ganglia, each of which projects to a different part of the frontal lobes [5,14].

Visuospatial or, less frequently, visual recognition problems were noted in 31% individual cases reviewed [5]. Complex visuospatial deficits are usually associated with lesions of the lateral occipitoparietal cortex bilaterally, an area that is thought to be particularly vulnerable in anoxic encephalopathy [5]. In most reported cases this has resulted in less profound perceptual disturbances than either a visual object agnosia or a Balint's syndrome [5].

Language has generally been considered to be preserved in anoxia [5,40]. Although language has not been examined extensively, in a number of studies it has been reported to be normal. For instance, Volpe et al. [5] reported normal performance on the controlled word association test, preserved capacity to paraphrase proverbs and perfect performance on the Token Test in their participants. Zola-Morgan et al. [40] tested case R.B. with Boston Naming and a screening aphasia battery and found no abnormalities other than an amnesic syndrome.

Case presentation

13. 06. 2016r. A 63-year-old female (retired engineer with a university degree) fell in front of the house after leaving the car. She suffered from hypertension, hypercholesterolemia and panhisterectomy in April 2016. Passer-by (former international mission soldier) stated lack of pulse and started effective cardiopulmonary resuscitation. Emergency ambulance was called. Resuscitation lasted 10 min. Resuscitation was continued in the emergency department after sudden cardiac arrest in ventricular fibrillation. The intubated patient with assisted respiration was trans-

ferred to a cardiologist. She underwent coronary angiography and aspiration thrombectomy. The head neurotransmission (CT) test revealed discrete subclavian ischemic lesions in both hemispheres of the brain. On the third day, the patient was extubated. In the following days, a gradual improvement of general condition was observed. Five days after cardiac arrest, the neuropsychological deficits and lack of motor deficits were identified in the neurological consultation. An amnesic syndrome was diagnosed in the psychiatric consultation. Three weeks after OHCA, the patient was discharged home. A month later, she was admitted to a neurological rehabilitation unit. On reception in preserved verbal-logical contact. Properly oriented in time and place. During the interview, she complained about retrograde amnesia (3 months before OHCA) and anterograde amnesia (1.5 months after OHCA). Pharmacotherapy has been coordinated by a cardiologist. She was included in neurorehabilitation in this particular neuropsychology training and occupational therapy.

Our interest in the presented case is due to the dynamics of the observed neurobehavioral changes due to unfavorable initial prognosis after OHCA and improved outcomes. The cardiological and neurological condition was initially severe. The patient was effectively diluted three days after OHCA. Previous attempts failed. Cardiological treatment was prolonged and stabilized after 3 weeks and ended in therapeutic success.

Methods

Neuropsychological assessment was based on cognitive screening in three measurements [35]. Screening was performed using Addenbrookes Cognitive Examination-Revised (ACE-III), which covers orientation, attention, memory, verbal fluency, language and visuospatial ability [17,32]. The first measurement was done one month after the event, the second one was extended with other neuropsychological tests after three months, and the third screening after nine months after the OHCA. The detection and quantification of acquired neuropsychological deficits rests upon the comparison of an individual's current cognitive functioning with an estimate of their premorbid ability [19,33,37]. We use Wechsler Adult Intelligence Scale IQ (WAIS-R PL). More comprehensive cognitive examinations included [32]:

- attention: Color Trails Test (CTT),
- memory and learning: California Verbal Learning Test (CVLT), Reys

Complex Figure Test (ROCF);

- executive functions: Tower of London(TOL), Verbal Fluency,
- language: spontaneous speech and Token Test (TT),
- visuospatial skills and motor performance: Clock Drawing Test (CDT), Performance IQ (WAIS – R PL),
- personality: observation, behavior screen ECAS, Background Questionnaire – Adult [32].

We collected information on demographic factors and lifestyle characteristics.

Result

The results of the neuropsychological testing are summarized in table 1, which include clinical analysis of test results, evaluation of the severity level (mild, moderate, severe, or very severe) of the cognitive disorders.

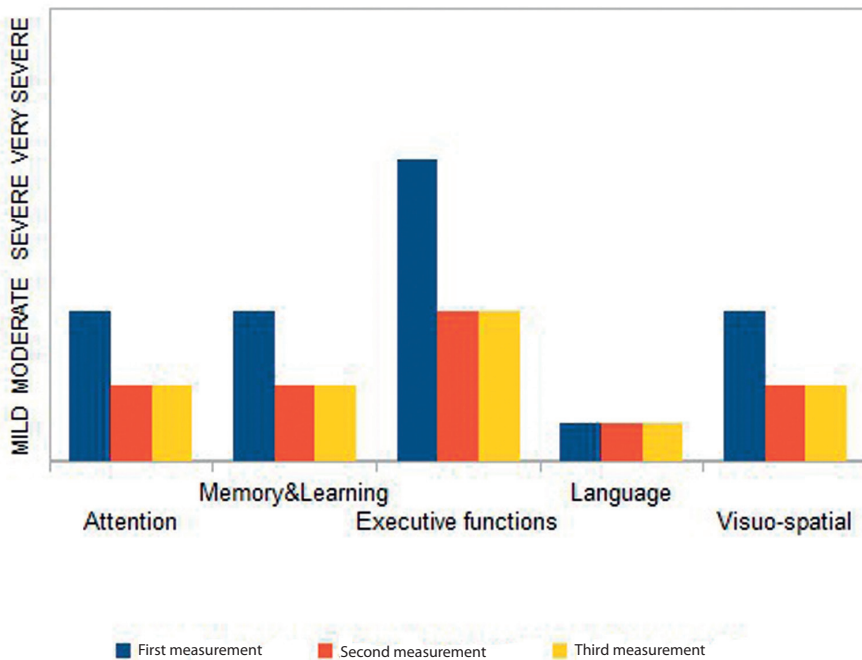


Table 1. Presentation of results

The results of the subsequent measurements revealed the weakest performance in the first study. Depth of cognitive disorders was at me-

dium and deep levels (executive functions). In the subsequent studies the results were better. There were no differences between the second and third measurements (mild cognitive impairment). Language assessment didn't show aphasia (despite mild naming difficulties) and linguistic impairments. Based on the results of the WAIS-R (PL) test, a high level of premorbid ability is estimated. Full Scale (FSIQ WAIS-R PL) is a high-intelligence intellectualized test. The VERBAL VIQ scores are above average, while Performance PIQs indicate a high level of performance. The highest test scores were obtained in the following sub-subjects: Similarities, Picture Completion, Digit Symbol. They indicate a high premorbid ability. Attention should be paid to the answer given in the Comprehension (question about the fire in the cinema). Giving responses reveals a tendency to impulsive reactions. WAIS-R PL factor analysis reveals a reduction in processing speed. It is clear from the qualitative interpretation of the task that the patient is able to solve the visuospatial tasks (most sensitive to brain damage) but due to the psychomotor slowdown most often exceeded the set time limit.

Based on clinical observation of our patient we identified some type of behavioral and/or emotional dysfunction. These are impulsiveness, self-awareness disorders and childlike behavior. We didn't find symptoms of depression and generalized anxiety disorder. Family was reporting changes in behavior and personality. We collected information in interviews with her husband and daughter. They have observed the repetitive, irresistible urge to perform an action, the experience of loss of voluntary control over this intense urge and the tendency to perform repetitive acts in a habitual or stereotyped manner, for example buying many unnecessary things. She was characterized with the tendency to act prematurely without foresight, resulting in behavioral disinhibition.

The neuropsychological assessment of the person with OHCA performed in the hospital showed impairment recovery in a wide spectrum of cognitive and behavioral functions other than memory. Memory disturbance is the most frequently reported neuropsychological impairment after a cardiac anoxic event [3,4,8,15,16,19]. Our measured cognitive impairments were classified as minor cognitive impairments. This result shows importance of educational level and including aspects of high premorbid ability [19]. In this case study our patient didn't show memory disturbance, however she showed executive and personality

dysfunction. Our findings confirm processing speed impairment [1,22]. Executive and personality dysfunction and frontal lobe affection are also frequently reported and our results support this finding [5, 24]. This behavior is sometimes difficult to distinguish from compulsivity due to their phenomenological similarities [24]. Frontal syndrome can often occur following infarction [6,11,18]. This syndrome is characterized by disinhibition and actions without foresight of the consequences, such as increased risk-taking behavior [24,29] and sometimes compulsions with the inability to inhibit repetitive, irresistible urges to perform action [24]. Frontal syndrome is associated with structural lesions in the frontal brain areas [24] or with connectivity between separate regions of the basal ganglia, each of which projects to a different part of the frontal lobes [5].

Discussion

The presented study provides three major points. First, fast effective cardio-pulmonary resuscitation minimizes the extent of brain damage. Secondly, the dynamic improvement of the neurological state in the first days after resuscitation is expected to return to full recovery. Thirdly, high premorbid ability resources affect the quality of life in the future [39]. Our data confirm the results of a previous study [25,34].

Mild cognitive deficits are common in OHCA survivors with a high functional premorbid status [34,36]. OHCA survivors are heterogeneous in terms of clinical status [6,26]. Earlier studies demonstrated that the functional consequences of brain injury range from complete recovery to mild cognitive deficits to severe cognitive-behavioural and motor impairments, minimally conscious state (MCS) or even permanent vegetative state (VS) [5,10,20]. Although massive and variable impairments usually occur early after OHCA [22,39], the most frequent in the post-acute phases are memory and executive abnormalities, sometimes coupled with subtle motor deficits [6,40]. In contrast, aphasia and perceptual impairments are rare [5,13,23]. The dynamics of cognitive and neurological symptoms in successive phases of post-cardiac arrest syndrome remain poorly understood [25]. Despite studies of early [18] or chronic stage impairments after OHCA [22,30], little is known about the natural course of recovery, patterns of chronic impairment, rehabilitation needs, or the effectiveness of therapies [25,26].

It has been postulated that rehabilitation should be modelled on principles established for other sudden brain injuries [21,26]. Accordingly, rehabilitation should be comprehensive, conducted in specialized units and started early post-injury when the patient is stable [1,18]. For patients with consciousness disorders, environmental management, passive physiotherapy, and sensory stimulation are provided [26]. For less severely impaired patients, progressive training addresses impaired cognitive and sensorimotor functions, and compensatory techniques, occupational therapy, environmental modifications and behavioral adaptation are recommended [1,21,26]. Pharmacotherapy may be useful, but the data is limited [25].

In our patient, behavioral observation and neuropsychological tests results suggested that post-anoxic cognitive decline caused the reduction of awareness. This fact must not be neglected in studies on emotional situation and quality of life in brain-damaged patients. Thus, with regard to the permanent cognitive limitations caused by cerebral anoxia, families and society have to accept that despite optimal acute and rehabilitative treatment the overall goal of rehabilitation cannot be complete recovery, but only optimal adaptation and compensation hopefully leading to independence in ADLs and social competence.

Our patient is in a group with mild cognitive impairment. But this condition is not satisfactory for the family, which expects further improvement and return of premorbid function. Family help was offered to improve internal communication and to better understand mutual problems.

References

1. Al-Khatib SM. 2016 AHA/ACC Clinical Performance and Quality Measures for Prevention of Sudden Cardiac Death. *Journal of the American College of Cardiology* 2017; 69:712-744.
2. Azeli Y, Barbería E, Jiménez-Herrera M, et al. The ReCaPTa study - a prospective out of hospital cardiac arrest registry including multiple sources of surveillance for the study of sudden cardiac death in the Mediterranean area. *Scandinavian Journal of Trauma Resuscitation and Emergency Medicine* 2016; 24:127.

3. Beck IR, Gagneux-Zurbriggen A, Berres M, et al. Comparison of Verbal Episodic Memory Measures: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease—Neuropsychological Assessment Battery (CERAD-NAB) versus California Verbal Learning Test (CVLT). *Archives of Clinical Neuropsychology* 2012; 27: 510–519.
4. Brian L. Brooks BL, Ploetz DM. Embedded Performance Validity on the CVLT-C for Youth with Neurological Disorders. *Archives of Clinical Neuropsychology* 2015; 30: 200–206.
5. Caine D, Watson JDG. Neuropsychological and neuropathological sequelae of cerebral anoxia: A critical review. *Journal of the International Neuropsychological Society* 2000; 6: 86-99.
6. Centofanti P, Barbero C, MD, D'Agata F, et al. Neurologic and cognitive outcomes after aortic arch operation with hypothermic circulatory arrest. *Surgery* 2016; 160(3): 796-803.
7. Cheng-Yu Ch, Yi-Chia S, Chi-Chun L, et al. Is 15minutes an appropriate resuscitation duration before termination of a traumatic cardiac arrest? A case-control study. *American Journal of Emergency Medicine* 2016; 34: 505–509.
8. DeJong TJ, Donders J. Cluster subtypes on the California Verbal Learning Test–Second Edition (CVLT-II) in a traumatic brain injury sample. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 2010; 32 (9) 953–960.
9. Donnino MW, Rittenbergerb JC, Gaieskid D, et al. The development and implementation of cardiac arrest centers. *Resuscitation* 2011;82: 974– 978.
10. Fuenmayor AJ, Fuenmayor AM. Cardiac arrest following holiday heart syndrome. *International Journal of Cardiology* 1997; 59: 101–103.

11. Garcia – Molina A, Roig – Rovira T, Ensen At- Cantallops A, et al. Neuropsychological profile of persons with anoxic brain injury: Differences regarding physiopathological mechanism. *Brain Injury* 2006; 20(11): 1139–1145.
12. Gerdes JS, Walther EU, Jaganjac S, et al. Early Detection of Widespread Progressive Brain Injury after Cardiac Arrest: A Single Case DTI and Post-Mortem Histology Study. *PLoS ONE* 2014; 9: 1-5.
13. Herrmann, M, Ebert AD, Galazky I, et al. Neurobehavioral Outcome Prediction After Cardiac Surgery Role of Neurobiochemical Markers of Damage to Neuronal and Glial Brain Tissue. *Stroke* 2000; 31:645-650.
14. Hill BD, Alosco M, Bauer L, et al. The Relation of Executive Functioning to CVLT-II Learning, Memory, and Process Indexes. *Applied Neuropsychology Adult* 2012;19: 198–206.
15. Jacobs ML, Jacobus D. Criterion validity of the California Verbal Learning Test-Second Edition (CVLT-II) after traumatic brain injury. *Archives of Clinical Neuropsychology* 2007; 22: 143–149.
16. Lebowitz BK, Touradji P, Lynn J, et al. Neuropsychology Executive Control and Learning Pattern on the CVLT Executive Control and Learning Pattern. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 2006; 28:1208–1217.
17. Lezak MD, Howison DB, Bigler ED, et al. *Neuropsychological Assessment*. New York: Oxford University Press; 2012.
18. Lim C, Alexander MP, LaFleche G, et al. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology* 2011; 63: 1773-1779.
19. McCrea SM. Measurement of Recovery after Traumatic Brain Injury: A Cognitive-Neuropsychological Comparison of the WAIS-R with the Cognitive Assessment System (CAS) in a Single Case of Atypical Language Lateralization. *Applied Neuropsychology* 2007;14(4): 296–304.

20. Moriwaki Y, Sugiyama M, Yamamoto T, et al. Outcomes from Prehospital Cardiac Arrest in Blunt Trauma Patients. *World Journal Surgery* 2011; 35:34–42.
21. Nelson DV, Esty MC. Neurotherapy as a catalyst in the treatment of fatigue in breast cancer survivorship. *Neurotherapy of Fatigue* 2016; 12(4): 246–249.
22. Orboa M, Aslaksenb PM, Larsbyd K, et al. Alterations in cognitive outcome between 3 and 12 months in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2016; 105: 92–99.
23. Peskine A, Picqo Ch, Pradat-Diehl. Cerebral anoxia and disability. *Brain Injury* 2004; 18: 1243–1254.
24. Polak AR, Paardt JW, Figeel M, et al. Compulsive carnival song whistling following cardiac arrest: a case study. *Psychiatry* 2012; 12: 71:75.
25. Polanowska KE, Sarzyńska-Długosz IM, Paprot AE. Neuropsychological and neurological sequelae of out-of-hospital cardiac arrest and the estimated need for neurorehabilitation: a prospective pilot study. *Kardiologia Polska* 2014; 9: 814–822.
26. Pußwald G, Fertl E, Faltl M, et al. Neurological rehabilitation of severely disabled cardiac arrest survivors. Part II. Life situation of patients and families after treatment. *Resuscitation* 2000; 47: 241–248.
27. Reich DL, Uysal S, Sliwinski M, et al. Neuropsychologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest in adultt. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1998; 117: 156–163.
28. Rozenn NL, Kingb LB, Sotoodehnia N, et al. Endogenous red blood cell membrane fatty acids and sudden cardiac arrest. *Metabolism Clinical and Experimental* 2010; 59: 1029–1034.

29. Sesok S, Bolle N, Kobal J, et al. Cognitive function in early clinical phase Hantinfon Disease after rivastigmine treatment. *Psychiatria Danubina* 2014; 26: 239-248.
30. Shah R, Faruqui RA. Delusional jealousy and person directed hostility: 5-year follow-up of a patient after anoxic brain injury. *Brain Injury* 2013; 27: 1719–1722.
31. Steinberg Ch, Pelletier MJ, Perron J, et al. Sudden Cardiac Arrest Due to Subtotal Absence of Left-sided Pericardium—Case Report and Review of the Literature. *Congenit Heart Dis.* 2013; 8:E92–E98.
32. Strauss W, Sherman EMS, Spreen O. *A Compendium of Neropsychological Tests.* New York: Oxford Univerity Press; 2006.
33. Thiruselvam I, Vogt EM, Hoelzle JB. The Interchangeability of CVLT-II and WMS-IV Verbal Paired Associates Scores: A Slightly Different Story. *Archives of Clinical Neuropsychology* 2015; 30: 248–255.
34. Torgersen J, Strand K, Bjelland TW. Cognitive dysfunction and health-related quality of life after a cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2010; 54: 721–728.
35. Valenstein W, Heilman KM. *Clinical Neuropsychology.* New York: Oxford Univerity Press; 2012.
36. Vogels RLC, Oosterman JM, Harten B, et al. Profile of Cognitive Impairment in Chronic Heart Failure. *The American Geriatrics Society* 2007; 55:1764–1770.
37. Wahlin TBR, Larsson MU, Luszcz MA. WAIS-R Features of Preclinical Huntington's Disease: Implications for Early Detection. *Dement and Geriatric Cognition Disorders* 2010;29:342–350.
38. Winarnia TI, Mundhofira FEP, Ediati A, et al. The fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS) in Indonesia. *Clinical Genetics* 2013; 83: 263–268.

39. Young BG. Neurologic Prognosis after Cardiac Arrest. *N Engl J Med* 2009;361:605-611.

40. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human Amnesia and the Medial Temporal Region: Enduring Memory Impairment Following a Bilateral Lesion Limited to Field CA1 of the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 1986; 6(10): 2950-2967.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Sebastian Marszałek

Oddział Rehabilitacji, Szpital Wojewódzki im. Jana Pawła II w Bełchatowie

ul. Czaplinska 123, 97-400 Bełchatów

e-mail: mers2@wp.pl

tel. 44 6358332



Zagrożenia wynikające z obecności drobnoustrojów chorobotwórczych i ich toksyn w produktach mlecznych

Threats from the presence of pathogenic microorganisms and their toxins in dairy products

Dominik M. Matusiak¹

¹Pracownia Mikrobiologii Ogólnej Zakładu Biologii Bakterii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

¹ Section of Biology of Bacteria

Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz
Banacha 12/16 St., 90-231 Lodz,

Abstract

Consumption of raw milk (and its derivatives) from dairy animals (e.g. cattle, goats, sheep) is related to human diseases, such as food poisonings and gastro-intestinal tract infections. These illnesses are caused mainly by *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*. Raw milk may also contain *L. monocytogenes* – a causative agent of listeriosis. Listeriosis poses a significant threat during pregnancy, because it can lead to premature delivery, miscarriage, stillbirth and neonatal infections. Tick-borne encephalitis (caused by *TBEV*), tuberculosis (*M. bovis*) and other diseases related to raw milk consumption were also reported. Pathogens in dairy products may be zoonotic or come from environment (e.g. *B. cereus*), people (e.g. *Salmonella* spp., *Shigella* spp., HAV carriers) or industrial installations. Milk pasteurization or sterilization (UHT) greatly reduces the number of foodborne infections. Also proper conditions of animal breeding and milking, milk transport, storage and processing are important factors. Possible dairy products contaminations of microbial origin also include mycotoxins (primarily AFM_1). AFM_1 is a hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic and heat-stable aflatoxin; it is a 4-hydroxylated metabolite of B_1 mycotoxin

(produced mainly by *A. flavus* and *A. parasiticus* molds), frequently detected in a feed. Toxic and carcinogenic effect of AFM_1 on humans and animals has not yet been fully studied. The maximum permissible concentration of this mycotoxin in milk differ in particular countries (e.g. EU – 0,05 $\mu\text{g/l}$, USA – 0,5 $\mu\text{g/l}$).

Key words

milk, cheese, pathogens, mycotoxins, zoonoses

Wykaz skrótów

AFB_1 – aflatoxin B_1 , aflatoksyna B_1

AFM_1 – aflatoxin M_1 , aflatoksyna M_1

BCG – Bacille Calmette Guérin

C3 – trzeci składnik dopełniacza

CDT – cytolethal distending toxin, toksyna cytoletalna

CF – clumping factor, czynnik zlepnący

CHIPS – chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus*, białko *S. aureus* hamujące chemotaksję

CJT – *Campylobacter jejuni* exotoxin, egzotoksyna *Campylobacter jejuni*

ECM – extracellular matrix, macierz zewnątrzkomórkowa

EHEC – enterohemorrhagic *E. coli*, enterokrwotoczne *E. coli*

EU – European Union, Unia Europejska

FAME – fatty acid modifying enzyme, enzym modyfikujący kwasy tłuszczowe

FC – fragment crystallizable, fragment zdolny do krystalizacji

HAV – hepatitis A Virus, wirus zapalenia wątroby typu A

HUS – hemolytic-uremic syndrome, zespół hemolityczno-mocznicowy

Ig – immunoglobulina

LLO – listeriolizyna O

MOTT – *Mycobacteria other than tuberculosis*, prątki inne niż gruźlicze

MTB – *Mycobacterium tuberculosis complex*, kompleks *Mycobacterium tuberculosis*

NETs – neutrophil extracellular traps, zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PFT – pore-forming toxin, toksyna tworząca pory w komórce

PVL – Pantón-Valentine leukocidin, leukocydyna Pantóna-Valentine'a

SEA – staphylococcal enterotoxins A, gronkowcowa enterotoksyna A

- SOD – *superoxide dismutase*, dysmutaza ponadtlenkowa
SLT – *Shiga-like toxin*, toksyna Shiga-podobna
ssRNA – *single stranded RNA*, jednoniciowe RNA
ST – *Shiga toxin*, toksyna Shiga
TBEV – *tick-borne encephalitis virus*, wirus odkleszczowego zapalenia mózgu
TTP – *thrombotic thrombocytopenic purpura*, małopłytkowa plamica zakrzepowa
TSST-1 – *toxic shock syndrome toxin 1*, toksyna powodująca zespół wstrząsu toksycznego 1
UHT – *ultra-high temperature*, bardzo wysoka temperatura
VT – *verotoxin*, werotoksyna
VTEC – *verotoxigenic E. coli*, werotoksyczne *E. coli*
YOP – *Yersinia outer proteins*, zewnętrzne białka *Yersinia*
ZOMR – zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych

I. Wstęp

Wiele tysięcy lat temu człowiek udomowił bydło, kozy i owce. Od tamtej pory wykorzystuje mleko tych zwierząt w celach spożywczych. Produkty mleczne spożywane są na całym świecie przez ludzi w różnym wieku. W surowym, niebadanym pod względem mikrobiologicznym i toksykologicznym mleku (i w produktach spożywczych na bazie takiego mleka) obecne mogą być drobnoustroje chorobotwórcze lub warunkowo patogene (np. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) [1-12], jak również toksyczne substancje pochodzenia bakteryjnego (enterotoksyny) czy grzybiczego (mikotoksyny) [1, 6, 13-18]. Spożycie takiego mleka lub jego przetworów może wywierać niekorzystny wpływ na zdrowie, szczególnie u osób z obniżoną odpornością organizmu. W niniejszym artykule zostaną opisane wybrane patogeny wykrywane w mleku pochodzącym od najczęściej hodowanych zwierząt mlecznych, tj. krów, kóz i owiec. Omówione zostaną również mikotoksyny najczęściej wykrywane w produktach mlecznych.

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne mleka mogą mieć charakter pierwotny (odzwierzęcy) i wtórny. Pierwotne zanieczyszczenie stanowią patogeny powodujące choroby u zwierząt (w tym zapalenie gruczołów mlecznych) lub drobnoustroje obecne na skórze, sierści lub w jelitach zwierząt (mikroflora). Z kolei zanieczyszczenia wtórne powstają podczas pozyskiwania mleka, jego transportu, przetwarzania i magazynowania. W tym wypadku źródłem patogenów mogą być: człowiek (np. różne bakterie jelitowe, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, HAV – *Hepatitis A Virus*, wirus polio), środowisko (np. *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) czy urządzenia przemysłowe. Kałowe zanieczyszczenie mleka (odzwierzęce lub pochodzące od człowieka) stanowią np. bakterie *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Shigella* spp. i *Salmonella* spp. (bezwzględnie chorobotwórcze dla człowieka), *Enterococcus* spp. (sporadycznie wywołują choroby u człowieka), *Vibrio cholerae* (rzadkie zanieczyszczenie). Przykładowe gatunki drobnoustrojów powodujących stany zapalne gruczołów mlecznych (wymion) u zwierząt to: *Streptococcus agalactiae* (kolonizują również układ pokarmowy i moczowo-płciowy człowieka, powodują infekcje u noworodków – m.in. sepsę i ZOMR), *S. zooepidemicus* i *S. pyogenes* (rzadkie przypadki), *Nocardia asteroides* i *N. brasiliensis* (promieniowce, sporadycznie chorobotwórcze dla człowieka), *Arcanobacterium pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Leptospira* spp.,

Brucella spp., *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *C. perfringens*. Na jakość gotowych produktów mlecznych w wymierny sposób wpływają warunki sanitarne w mleczarniach oraz podczas hodowli zwierząt i ich dojenja. Nieprawidłowe warunki transportu lub przechowywania mleka mogą umożliwić wzrost drobnoustrojów uprzednio obecnych w mleku lub stanowić wtórne źródło kontaminacji produktu. Niewłaściwie przeprowadzony proces pasteryzacji lub sterylizacji mleka (suboptymalna temperatura lub czas) jest kolejną przyczyną zakażeń u ludzi spożywających produkty mleczne [2, 5, 7, 9, 10–12, 19–24]. W mleku oraz w produktach mlecznych niejednokrotnie wykrywane są również toksyny grzybicze o właściwościach hepatotoksycznych, karcynogennych oraz teratogennych (uszkodzających płód). Substancje te stanowią metabolity toksyn występujących w skażonej paszy dla zwierząt [1, 6, 12–18].

Drobnoustroje obecne w surowym mleku (i w przetworach na bazie takiego mleka) mogą powodować różne choroby – najczęściej infekcje lub zatrucia pokarmowe (np. *Salmonella* spp., *Campylobacter*, *E. coli*, *S. aureus*), a także np. uszkodzenie płodu i poronienie (*Listeria monocytogenes*), ZOMR i zapalenie mózgu (TBEV – *tick-borne encephalitis virus*, *L. monocytogenes*), gruźlicę (*Mycobacterium* spp.), gorączkę Q (*Coxiella burnetii*). Zagrożeniu związanym ze spożyciem surowego mleka można w znacznym stopniu zapobiec, poddając produkt obróbce termicznej, edukując społeczeństwo (zwłaszcza producentów mleka) oraz zakazując obrotu detalicznego niepasteryzowanego lub niesterylizowanego mleka [2, 5, 7, 9, 10, 11, 20, 21, 25, 26].

II. Patogeny w mleku oraz w produktach mlecznych

II. 1. Bakterie

Najczęściej wykrywanymi drobnoustrojami chorobotwórczymi w surowym mleku (oraz w produktach na bazie takiego mleka) są bakterie: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*. Drobnoustroje te zostaną opisane w dalszej części rozdziału.

Campylobacter spp. to Gram-ujemne, mikroaerofilne, nieprzetrwalniujące pałeczki. Komórki tych bakterii są cienkie i długie (średnica 0,2–0,5 μm , długość do 8 μm), zakrzywione lub spiralne. Charakteryzują się małą aktywnością metaboliczną. Wykazują zdolność do ruchu. Występują w środowisku (jednakże są wrażliwe na wysychanie) oraz stanowią

naturalną florę układu pokarmowego zwierząt i ludzi. Mogą również powodować choroby – kamylobakteriozy. *Campylobacter* spp. (głównie *C. jejuni*, rzadziej *C. coli* i *C. fetus*) stanowią jedną z najczęstszych przyczyn nieżyty jelit u człowieka. Inkubacja choroby trwa 2–5 dni, po czym pojawiają się objawy takie jak: biegunka (możliwe, że z domieszką żółci lub krwi), bóle brzucha, gorączka, nudności (ale rzadko wymioty). Opisywane bakterie niekiedy powodują sepsę, ZOMR, zapalenie dróg żółciowych, wsierdza, stawów oraz poronienia. Bakterie te wywołują również choroby u krów, owiec czy kóz. Diagnostyka mikrobiologiczna kamylobakterioz jest problematyczna ze względu na trudności w hodowli opisywanych drobnoustrojów. *C. jejuni* wytwarza ciepłochwiejną enterotoksynę CJT (*Campylobacter jejuni* exotoxin) oraz toksynę Cdt (*cytolethal distending toxin*, niektóre szczepy) [2–5, 7, 9–11, 21, 22, 27–29].

Salmonella spp. to Gram-ujemne, mikroaerofilne, nieprzetrwalnikujące, urzęsione perytrychalnie pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Wykazują wzrost w szerokim zakresie temperatur (5–49°C). Charakteryzują się opornością na wysuszenie. W glebie mogą przeżyć nawet kilka lat. Bakterie te są bezwzględnie chorobotwórcze dla człowieka. Powodują toksykoinfekcje u ludzi, szczególnie w krajach rozwijających się. Mogą stanowić odzwierzęce zanieczyszczenie mleka i serów, a także pochodzić od człowieka. *Salmonella enterica* serovar *Typhi* powoduje dur brzuszny (tyfus brzuszny). Choroba ta występuje jedynie u człowieka. Po 7–28 dniach inkubacji pojawiają się następujące objawy: wysoka gorączka (związana z bakteriecią), osłabienie, zamroczenie, wysypka (różyczka durowa), wymioty, biegunka lub zaparcie. *S. Paratyphi* powoduje łagodniejszą formę duru brzusznego (u zwierząt możliwe nosicielstwo). Serotypy *S. enterica* występujące u bydła (np. *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *Bovismorbificans*) i owiec (np. *S. Abortusovis*, *S. Dublin*, *S. Typhimurium*) również są chorobotwórcze dla człowieka. Bakterie te powodują toksykoinfekcje (salmonellozy) o łagodniejszym przebiegu od dury brzusznego. Czas inkubacji salmonelloz jest krótszy i wynosi od 5 godz. do 6 dni. Biegunka zwykle ustępuje samoistnie po 24–48 godz. Po przebyciu choroby możliwy jest stan długotrwałego nosicielstwa opisywanych bakterii. *Salmonella* spp. wykazują właściwości inwazyjne i zdolność do przeżywania wewnątrz makrofagów. Ważnym czynnikiem patogenności tych bakterii jest też LPS (endotoksyna) [4, 5, 7–11, 20–22, 29–32].

Escherichia coli (pałeczka okrężnicy) to Gram-ujemne, mikroaerofilne, ruchliwe (urzęsione perytrychalnie), nieprzetrwalnikujące, krótkie pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Bakterie te występują w środowisku oraz stanowią naturalną florę układu pokarmowego ludzi i zwierząt. Mogą być warunkowo chorobotwórcze dla człowieka. Znane są też serotypy bezwzględnie patogenne. W surowym mleku pochodzącym od bydła (oraz w serach na bazie takiego mleka – szczególnie typu camembert i brie) obecne mogą być enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC – *enterohemorrhagic E. coli*) oraz szczepy STEC (*Shiga-toxigenic E. coli*). Wtórny źródłem zanieczyszczenia żywności może być też człowiek. EHEC nazywane są również szczepami werotoksycznymi (VTEC – *verotoxigenic E. coli*). Dominującym serotypem opisywanych szczepów jest O157:H7, a ich głównym czynnikiem wirulencji – zewnątrzkomórkowa cytotoksyna Shiga (ST-1, ST-2) lub Shiga-podobna (SLT-1/VT-1, SLT-2/VT-2). EHEC/VTEC i STEC powodują toksykoinfekcje – zapalenie jelita grubego z trwającą kilka dni krwawą biegunką. Powikłaniem zakażenia (2–7% przypadków) może być zespół hemolityczno-mocznicy (HUS – *haemolytic-uraemic syndrome*), dotyczący głównie dzieci i osób starszych. W chorobie tej dochodzi do ostrej niewydolności nerek (i ich uszkodzenia), niedokrwistości hemolitycznej oraz małopłytkowości (trombocytopenii). Choroba kończy się śmiercią w 3–10% przypadków. EHEC/VTEC i STEC mogą powodować również zespół małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP – *thrombotic thrombocytopenic purpura*). Choroba rozwija się głównie u osób dorosłych. Obserwuje się objawy neurologiczne, anemię, trombocytopenię oraz zmiany zakrzepowe w naczyniach krwionośnych trzustki, serca, nerek, nadnerczy i mózgu (prowadzące do uszkodzenia tych narządów). Do 30% przypadków małopłytkowej plamicy zakrzepowej kończy się śmiercią [4, 5, 7–12, 20, 22, 29–32].

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnie, halotolerancyjne (do 10% NaCl), względnie beztlenowe, nieprzetrwalnikujące, ruchliwe (w 20–30°C) pałeczki. Są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Występują w glebie, wodach (w tym ściekach), gnijących roślinach, przewodzie pokarmowym ssaków (prawie wszystkich), ptaków. Często są wykrywane również w surowym mleku (od bydła, owiec, kóz) czy w serach na bazie takiego mleka. 1–10% populacji ludzi jest nosicielami tej bakterii (bez objawów chorobowych). *L. monocytogenes* wykazują dużą oporność na niesprzyjające czynniki środowiskowe. Są zdolne do wzrostu w szerokim

zakresie temperatur (1–45°C, optimum 30–37°C). Opisywane bakterie są warunkowo chorobotwórcze względem ludzi i zwierząt (oportunistyczne). Szczególnie groźne są dla kobiet w ciąży. Mogą powodować poronienie, przedwczesny poród, obumarcie płodu, powstawanie rozległych ropni (szczególnie w wątrobie czy śledzionie) i zapalenie płuc u płodu. Grupę ryzyka stanowią również osoby z obniżoną odpornością, w młodym lub podeszłym wieku (powyżej 60. roku życia). Do zakażenia u człowieka dochodzi najczęściej drogą pokarmową; rzadziej przez kontakt ze zwierzęciem (infekcje skóry i oczu u lekarzy weterynarii). Objawy choroby obejmują m.in. wodnistą i krwawą biegunkę, bóle brzucha, głowy, mięśni i stawów, nudności, nieżyt żołądka i jelit, gorączkę. *L. monocytogenes* powodują również ZOMR i mięszkowe zapalenie mózgu (o wysokiej śmiertelności – 22%), sepsę, zapalenie wsierdza, węzłów chłonnych, szpiku i kości. Okres inkubacji choroby wynosi zwykle 10–70 dni. Opiswane bakterie wykazują naturalną oporność na cefalosporyny. Mogą się namnażać w komórkach nabłonkowych jelit, monocytach i makrofagach, fibroblastach, komórkach śródbłonna naczyń. *L. monocytogenes* wytwarzają adhezyny (internaliny A, B i C, p60 / Iap), listeriolizynę O (LLO, tworzy kanały w błonie fagosomu i umożliwia uwolnienie bakterii do cytoplazmy), fosfolipazę C (również uszkodza błonę fagosomu), lecytynazę, metaloproteazy, katalazę i dysmutazę ponadtlenkową (SOD – *Superoxide dismutase*) chroniące przed wolnymi rodnikami. W procesie rozprzestrzeniania bakterii uczestniczy białko Act A, powodujące polimeryzację aktyny w komórkach makroorganizmu [2, 4, 5, 7, 9, 11, 21, 33, 44].

Inne gatunki bakterii występujące w mleku oraz w produktach mlecznych
Brucella spp to małe, Gram-ujemne, nieruchliwe, tlenowe, auktotroficzne (o dużych wymaganiach odżywczych) i wysoce zaraźliwe (dla zwierząt i ludzi) pałeczki. Bakterie te wykazują małą aktywność metaboliczną oraz długą przeżywalność w środowisku. Są względnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Wykazują zdolność do namnażania się w makrofagach i monocytach. Do czynników patogenności *Brucella* spp. zaliczane są: LPS, białka szoku cieplnego, SOD, monofosforanowe adeninowe i guaninowe inhibitory funkcji makrofagów. Gatunek *B. abortus* powoduje zakaźne poronienia u bydła. *B. melitensis* (pałeczka maltańska) występuje głównie u owiec i kóz (też u bydła), a *B. ovis* – u owiec. Człowiek może się zarazić *Brucella* spp. poprzez kontakt z chorym zwierzęciem, jedząc

surowe mięso, pijąc skażone mleko lub spożywając sery. Wśród trzech wymienionych gatunków najbardziej chorobotwórczy dla człowieka jest *B. melitensis*. Brucelozą jest chorobą zawodową lekarzy weterynarii oraz hodowców bydła i występuje w wielu regionach świata. Polska obecnie jest krajem wolnym od tej choroby. Do eradykacji tej zoonozy przyczyniła się skuteczna szczepionka opracowana dla zwierząt hodowlanych. U człowieka brucelozą objawia się falującą gorączką (narastającą i spadającą), osłabieniem, bólami mięśni. Choroba jest długotrwała i wyniszczająca, skutkująca powstawaniem zmian patologicznych w wielu narządach [5, 7, 9–11, 20–22, 27, 34, 35].

Coxiella burnetii to małe, Gram-ujemne, tlenowe pałeczki będące obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Bakterie te występują na całym świecie. Zaliczane są tradycyjnie do riketsji i wywołują u ludzi gorączkę Q. *C. burnetii* występują u zwierząt hodowlanych (np. bydło, owce, kozy) i dziko żyjących. Między zwierzętami przenoszone są przez kleszcze. Człowiek może się zarazić tymi bakteriami poprzez kontakt z chorym zwierzęciem, drogą inhalacyjną lub pokarmową (spożycie surowego mleka i przetworów na bazie takiego mleka). *C. burnetii* wykazują zdolność do namnażania wewnątrz makrofagów i monocytów. Infekcja u ludzi zwykle przebiega bezobjawowo. Mogą jednakże wystąpić: gorączka, osłabienie, bóle głowy, objawy grypopodobne. Niekiedy dochodzi do atypowego, śródmiąższowego zapalenia płuc, zapalenia wątroby lub wsierdza [3, 9–11, 21, 22, 25, 36, 37].

Yersinia enterocolitica i *Y. pseudotuberculosis* to gatunki Gram-ujemnych, ruchliwych, mikroaerofilnych pałeczek należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Bakterie te występują w środowisku oraz u dzikich i hodowlanych zwierząt (szczególnie u świń, gryzoni, ale też u zwierząt mlecznych). Mogą również stanowić fekalne zanieczyszczenie mleka. Bakterie te powodują różne rzadkie choroby, ogólnie nazywane jersiniozami. Są to np. infekcje jelitowe (objawiające się bólami brzucha, biegunką, wymiotami, gorączką), zapalenie węzłów chłonnych krezki (przypominające zapalenie wyrostka robaczkowego), zapalenie gardła, mięszu nerek, zespół hemolityczno-mocznicy, choroba wysypkowa podobna do płonicy, sepsa, reaktywne zapalenie stawów. Infekcje z udziałem *Yersinia* spp. mogą również skutkować powstawaniem rozsianych ropni w różnych narządach. Do czynników patogenności *Yersinia* spp. należy zespół białek YOP (*Yersinia* outer proteins). Białka te wykazują różne właściwości i funkcje

(cytotoksyczne, adhezyjne, odgrywają też rolę w transporcie żelaza, hamowaniu agregacji płytek krwi, ochronie przed fagocytozą). *Y. enterocolitica* wytwarzają również ciepłostabilną enterotoksynę YeST [2, 10, 22, 31, 32, 38].

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) to Gram-dodatnie, tlenowe (rosnące również w warunkach beztlenowych), halotolerancyjne (do 7,5% NaCl), nieruchliwe i nieprzetrwalnikujące bakterie o morfologii ziarniaków. Wykazują wzrost w zakresie temperatur 7–48°C (optimum 37°C). Charakteryzują się wysoką patogennością (największą spośród wszystkich gatunków gronkowców) oraz dużą opornością na czynniki środowiskowe. Są chorobotwórcze względem ludzi oraz zwierząt. Powodują m.in. stany zapalne wymion u bydła, owiec, kóz i w związku tym mogą być obecne w surowym mleku pochodzącym od chorych zwierząt. *S. aureus* może stanowić wtórne zanieczyszczenie produktów mlecznych, gdyż występuje np. w powietrzu, kurzu i u ludzi (kolonizuje m.in. przedsionek nosa u 20–40% populacji ludzkiej). Gronkowiec złocisty może infekować praktycznie każdą tkankę oraz narząd. Powoduje m.in. choroby skóry i tkanek miękkich, kości i stawów, mięśni, serca, płuc, mózgu; często również zakażenia szpitalne i sepsę. Bakterie te wytwarzają bardzo wiele czynników patogenności (w tym enzymów i toksyn). Są to np. koagulaza wolna i związana (CF – *clumping factor*) powodujące wykrzepianie osocza, receptory wiążące macierz zewnątrzkomórkową (ECM; rola w adhezji bakterii do tkanek), hemolizyny (α , γ , δ – PFT, β – sfingomielinaza), leukocydyna PVL (*Panton-Valentine leukocidin*), toksyny epidermolityczne (eksfoliatyna 1 i 2 – uszkodzają naskórek), TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin 1* – toksyna pirogenna, superantygen, występuje u 1% szczepów), enterotoksyny. Ponadto: powierzchniowe białko A (blokuje wiązanie przeciwciał do komórek bakterii, wiążąc się z fragmentem Fc immunoglobulin), fibrynolizyna (stafylokinaza – rozpuszcza skrzepy krwi), hialuronidaza (rozkłada kwas hialuronowy w tkance łącznej i ułatwia rozprzestrzenianie bakterii), lipaza, DNaza (uwalnia bakterie z NETs), proteazy, FAME (*fatty acid modifying enzyme*), ureaza (u części szczepów), stafyloferyna (siderofor). Enterotoksyny wytwarzane przez *S. aureus* stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi. Znanych jest co najmniej 21 (A-U) odmian tych termostabilnych, pirogennych (superantygeny) toksyn. Większość zatruc pokarmowych jest powodowana przez enterotoksynę SEA (*Staphylococcal enteroto-*

xins A). Enterotoksyny *S. aureus* mogą być obecne w różnych produktach spożywczych, w tym w produktach mlecznych (w razie nieprawidłowego przechowywania surowego mleka). Objawy zatrucia występują po 2–8 godz. od spożycia i obejmują silne wymioty, skurcze brzucha i czasami biegunkę. Choroba zwykle ustępuje samoistnie po 24–48 godz. [2, 5, 7–11, 19, 22–24, 30, 39–40].

Mycobacterium spp. (prątki) to gatunek Gram-dodatnich, tlenowych, auksotroficznych, nieruchliwych i nieprzetrwalnikujących bakterii. Komórki prątków są proste lub lekko zakrzywione. Występują powszechnie w środowisku jako saprofity (np. w wodzie i glebie). Część gatunków jest chorobotwórcza dla człowieka i zwierząt. Prątki bardzo słabo barwią się metodą Grama ze względu na dużą zawartość lipidów (kwasów mikołowych, wosków, glikolipidów) w ścianie komórkowej – do 60% suchej masy komórki. W celach diagnostycznych prątki rutynowo barwi się metodą Ziehla-Neelsena. *Mycobacterium* spp. wykazują również małą wrażliwość na wysychanie i detergenty oraz naturalną oporność na penicylinę. Cechą charakterystyczną prątków jest powolny wzrost na podłożach sztucznych. Chorobotwórcze dla człowieka są głównie gatunki: *M. tuberculosis* (prątek gruźlicy / Kocha), *M. bovis* (prątek bydłęcy), *M. africanum*. Gatunki te zaliczane są do grupy MTB (*Mycobacterium tuberculosis complex*). Do zakażenia człowieka prątkami dochodzi drogą kropelkową, przez kontakt z drugą osobą lub zwierzęciem. Także po spożyciu surowego mleka od chorych zwierząt. W produktach mlecznych obecne mogą być np. *M. bovis*, *M. avium* (prątek ptasi, chorobotwórczy też dla bydła), *M. scrofulaceum*. Wtórne źródło kontaminacji produktów spożywczych może stanowić również osoba chora na gruźlicę, pracująca w przemyśle przetwórstwa mlecznego. *M. bovis* występuje u bydła, także np. u owiec i kóz. W odróżnieniu od *M. tuberculosis* i *M. avium* prątki bydłce są grubsze i krótsze. Gruźlica u bydła występuje częściej u starszych zwierząt (cielęta są mniej wrażliwe). U owiec zakażenie dotyczy głównie przewodu pokarmowego, a u kóz obejmuje często wymię. *M. avium* i *M. scrofulaceum* zaliczane są do prątków atypowych (MOTT – *Mycobacteria other than tuberculosis*). U człowieka *M. bovis* i *M. avium* powodują gruźlicę, której objawy są bardzo podobne do tej wywołanej przez prątek Kocha. Objawy gruźlicy płuc obejmują m.in. kaszel, gorączkę, utratę masy ciała. Gruźlica jest przewlekłą chorobą człowieka i obejmuje najczęściej układ oddechowy. Może również do-

tyczyć układu pokarmowego (np. przy spożyciu produktów mlecznych), moczowo-płciowego, kości i stawów, skóry, opon mózgowych (ZOMR). Czas inkubacji choroby jest długi i wynosi od kilku tygodni do kilku lat. Opracowano szczepionkę BCG (*Bacille Calmette Guérin*), która częściowo chroni przed tą chorobą. Infekcje z udziałem *M. avium* dotyczą głównie osób z upośledzoną odpornością. *M. scrofulaceum* to gatunek warunkowo patogenny dla człowieka, powodujący głównie zapalenie węzłów chłonnych u dzieci [9–11, 20, 22, 30, 41–43]. Większość chorobotwórczych gatunków prątków (poza *M. ulcerans*) namnaża się wewnątrz komórek gospodarza. Prątki wykazują zdolność do przeżywania i namnażania się w makrofagach, hamując powstawanie fagolizozomu (rola glikoproteiny 19 kDa, sulfatydów i manolipoarabinomannanu w ścianie komórkowej). Ochronne działanie przed wolnymi rodnikami wykazują enzymy: katalaza, peroksydaza oraz SOD. Prątki wytwarzają również nitroreduktazę (umożliwiającą pozyskiwanie energii w warunkach beztlenowych), hemaglutyninę (wiąże heparynę, odgrywa też rolę w rozprzestrzenianiu bakterii w organizmie), siderofory (mikobaktyna, karboksymikobaktyna) oraz czynnik sznurowy (6',6'-dimikolan trehalozy – rola w tworzeniu ziarniników w tkankach) [41, 43].

Corynebacterium ulcerans są to Gram-dodatnie, tlenowe, auksotroficzne, nieruchliwe oraz nieprzetrwalnikujące pałeczki (maczugowce), występujące na skórze bydła i innych zwierząt hodowlanych. Bakterie te powodują u zwierząt zapalenie gruczołów mlecznych i mogą być obecne w surowym mleku. U człowieka natomiast wywołują błonicopodobne zapalenie gardła o łagodniejszym przebiegu niż w wypadku choroby wywołanej przez *C. diphtheriae* [7, 44–45].

II. 2. Pierwotniaki

Cryptosporidium parvum to gatunek pierwotniaka występującego na całym świecie (*Protista*), będącego pasożytem zwierząt (w tym bydła, owiec, kóz) i ludzi. *C. parvum* może stanowić fekalne zanieczyszczenie wód (np. ścieków, wód pitnych i basenowych), również mleka. Spożyte oocysty tego organizmu przedostają się do jelit, gdzie pasożyt ten przechodzi kilka faz rozwojowych. Zarażenie tym organizmem może być bezobjawowe lub skutkować obumieraniem enterocytów i biegunką (u osób immunokompetentnych zwykle krótkotrwałą, samoograniczającą) [10, 29–30, 46–48, 51].

Toxoplasma gondii to bezwzględnie wewnątrzkomórkowy pasożyt (pierwotniak), szeroko rozpowszechniony wśród dzikich, hodowlanych i domowych zwierząt na całym świecie. Zwierzęta takie jak owce i kozy często są nosicielami *T. gondii*; rzadziej zarażone jest bydło. Organizm ten występuje również u człowieka. Żywicielem ostatecznym tego pierwotniaka są koty, które po zarażeniu wydalają oocysty *T. gondii* (zawierające od kilku do 10 tys. bradyzoitów) przez okres kilku tygodni. Człowiek może się zarazić tym pasożytem, spożywając warzywa i owoce (skażone kałem kocim), surowe lub niedogotowane mięso (zarażonych zwierząt hodowlanych), pijąc surowe mleko (od chorych kóz i owiec), a także poprzez kontakt z kocimi odchodami – np. w glebie podczas pracy w polu czy w ogrodzie. Po dostaniu się oocyst do układu pokarmowego pasożyt ten rozwija się w jelitach, w kolejnym etapie rozwoju przedostaje się do krwi, a następnie przechodzi do mięśni. Miejscem docelowym osiedlenia może być także ośrodkowy układ nerwowy (OUN) i oczy. Powstające cysty tkankowe (zawierające liczne bradyzoity otoczone grubą ścianą) nie wywołują w swoim otoczeniu reakcji zapalnej. Stymulują również rozwój trwałej odporności u makroorganizmu. Zarażenie *T. gondii* utrzymuje się przez całe życie. Większość inwazji pasożytniczych jest bezobjawowa i nie wymaga leczenia. Opisywany pierwotniak jest szczególnie groźny dla kobiet w ciąży, ale tylko przy pierwotnym kontakcie matki z pasożytem. Zarażenie transplacentarne (przez łożysko) może spowodować wewnątrzmaciczne obumarcie płodu, poronienie. Może skutkować również wadami wrodzonymi płodu (np. wodogłowie, małogłowie, zwapnienia śródczaszkowe, uszkodzeniem mózgu). *T. gondii* jest również czynnikiem etiologicznym zapalenia naczyń i siatkówki u noworodków. Triada objawów Sabina-Pinkertona u noworodków (charakterystyczna dla toksoplazmozy wrodzonej) obejmuje zapalenie siatkówki i naczyń, poszerzenie układu komorowego mózgu oraz zwapnienia śródczaszkowe. Toksoplazmoza u osób dorosłych czasami może dawać objawy przypominające mononukleozę albo objawiać się gorączką, bólami głowy, znacznym osłabieniem, powiększeniem węzłów chłonnych (szczególnie szyjnych, karkowych, potylicznych). *T. gondii* u dorosłych pacjentów niekiedy powoduje zapalenie mózgu lub zapalenie naczyń i siatkówki [7, 9, 11, 30, 47–50, 52, 53].

II. 3. Wirusy

TBEV jest to wirus ssRNA (*single stranded RNA*), powodujący odkleszczowe zapalenie mózgu u ludzi, należący do rodziny flawiwirusów. Znanne są co najmniej cztery podtypy tego wirusa. TBEV infekuje zwierzęta i ludzi na różnych kontynentach. Jednakże zwierzęta domowe takie jak krowy, owce, kozy nie chorują na zapalenie mózgu, mimo że patogeny te mogą być obecne w ich krwi (i przenikać do ich mleka). Zakażenie u ludzi (odkleszczowe lub po spożyciu mleka) może przybierać postać oponową (ZOMR), mózgową lub krwotoczną. Inkubacja choroby u człowieka trwa od 2 do 28 dni. Objawy obejmują m.in. bóle głowy i stawów, gorączkę, światłowstręt, podwójne widzenie, paraliż, zaburzenia psychiczne. Rokowania są pomyślne (śmiertelność 2% lub 10%), jednakże okres rekonwalescencji trwa długo. Brakuje leczenia przyczynowego dla tej choroby. Dostępne są szczepionki chroniące przed tym wirusem. Spokrewniony antygenowo z TBEV jest wirus choroby skokowej owiec i kóz (zapalenia mózgu). Ten flawiwirus również przenoszą kleszcze. Przedostaje się do mleka w trakcie trwającej u zwierząt wiremii [21, 54–56].

Wirus pryszczycy (*Aphthovirus*) jest to mały wirus ssRNA, należący do rodziny pikornawirusów. Charakteryzuje się względnie dużą opornością na czynniki środowiskowe. Pryszczycza stanowi wysoce zaraźliwą chorobę bydła, owiec, kóz, świń; rzadziej człowieka. Do zakażenia u ludzi dochodzi przez kontakt bezpośredni z chorym zwierzęciem lub przez picie surowego mleka. Choroba objawia się powstawaniem bolesnych pęcherzyków na wargach, dziąsłach, policzkach, języku. Zazwyczaj dochodzi do samowyleczenia. Pryszczycza występuje endemicznie w różnych rejonach w świata. Na skutek wprowadzenia skutecznej szczepionki dla zwierząt obszar Europy został uznany za wolny od tej choroby [20, 22, 55].

III. Mikotoksyny w mleku

Nie ma informacji na temat zachorowań u ludzi na grzybice układowe po spożyciu surowego mleka zanieczyszczonego grzybami mikroskopowymi (np. *Candida* spp.) występującymi u zwierząt hodowlanych. Jednakże w mleku i w produktach mlecznych (np. w serach, jogurcie, maśle, śmietanie) obecne mogą być mikotoksyny będące produktami metabolizmu wtórnego grzybów mikroskopowych. Substancje te wykazują właściwości toksyczne i mogą przenikać do mleka, gdy zwierzęta karmione są ska-

żoną paszą. Mogą być również wytwarzane przez grzyby zanieczyszczające produkty spożywcze (np. w trakcie magazynowania).

Najlepiej zbadaną mikotoksyną w produktach mlecznych jest aflatoksyna M_1 (AFM_1). Aflatoksyny stanowią grupę co najmniej 18 niskocząsteczkowych, heterocyklicznych, termostabilnych (niewrażliwych na wysoką temperaturę) oraz nieimmunogennych związków. Są wytwarzane głównie przez wszechobecne pleśnie z rodzaju *Aspergillus* (kropidlak). Najczęściej są to gatunki: *A. flavus* i *A. parasiticus*. W wypadku *A. flavus* aflatoksyny wytwarzane są w największych ilościach w temperaturze 24°C (optymalna temperatura wzrostu drobnoustroju to 29–35°C). Aflatoksyny wykazują właściwości hepatotoksyczne, karcynogenne (powodują raka wątroby i gruczolakoraka jelit) i teratogenne (uszkadzają płód). Mogą także zaburzać działanie układu odpornościowego u ludzi i zwierząt. Niejednokrotnie toksyny te są wykrywane w paszy dla zwierząt. Aflatoksyna B_1 (AFB_1) – spożywana przez zwierzęta mleczne wraz z zanieczyszczoną paszą – metabolizowana jest przez kompleks enzymów cytochromu P450 w wątrobie i wydalana z mlekiem pod postacią 4-hydroksy-pochodnej (AFM_1). AFM_1 pojawia się w mleku w ciągu kilku godz. (lub wg innego źródła w czasie 12–24 godz.) od czasu spożycia przez zwierzę skażonego pokarmu i jest wydalana przez okres 3–4 dni. Ilość wydzielanej aflatoksyny M_1 do mleka obejmuje zakres 0,3–6,2% (lub wg innego źródła 1–2%) spożytej przez zwierzę dawki AFB_1 i jest uwarunkowana m.in. gatunkiem zwierzęcia (np. krowy: 0,35–3%, owce: 0,08–0,33%), jego cechami osobniczymi, ilością spożytej paszy i stopniem jej zanieczyszczenia toksynami. Mleko owcze i kozie zawiera mniej aflatoksyny M_1 niż mleko krowie. Więcej tej mikotoksyny może się znajdować w mleku od detalicznych producentów niż od dużych przedsiębiorstw (dywersyfikacja dostaw od różnych gospodarstw) [1, 6, 13–18]. Dostępne są rozbieżne dane na temat trwałości AFM_1 w mleku i w produktach mlecznych. Według niektórych źródeł pasteryzacja mleka obniża (np. o 12% lub 7,62%) zawartość tej toksyny; także warunki chłodnicze (np. spadek stężenia o 40% po czterech dniach w 4°C). Według innych autorów obróbka cieplna wywiera niewielki wpływ na tę substancję. Stężenie AFM_1 w produktach powstałych na bazie mleka (np. w serze) może być zróżnicowane, co jest uwarunkowane m.in. różnymi technologiami produkcji i rodzajem wykorzystywanego mleka. Niektóre dane wskazują, że zawartość aflatoksyny M_1 w serach jest mniejsza od wyjściowego

stężenia tej toksyny w mleku. Według innych autorów obserwuje się odwrotne zjawisko. Stopień karcynogenności oraz znaczenie toksyny M_1 dla zdrowia człowieka i zwierząt mlecznych nie są w pełni zbadane. W różnych krajach obowiązują odmienne normy dopuszczalnego stężenia AFM_1 w produktach mlecznych, np. w EU – 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produktu (0,05 ppb), podczas gdy w USA norma ta jest dziesięć razy mniej restrykcyjna (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ = 0,5 ppb) [1, 6, 14–18].

IV. Podsumowanie

W surowym mleku oraz w produktach powstałych na bazie takiego mleka obecne mogą być drobnoustroje chorobotwórcze lub oportunistyczne (powodujące infekcje u osób z obniżoną odpornością). Są to najczęściej *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*. Patogeny te mogą mieć pochodzenie odzwierzęce lub stanowić wtórne zanieczyszczenie produktu. Prawidłowo przeprowadzony proces pasteryzacji lub sterylizacji mleka stanowi ważny czynnik ograniczający opisane zagrożenie. Wprowadzenie prawnego obowiązku obróbki cieplnej mleka w krajach uprzemysłowionych w istotnym stopniu ograniczyło liczbę przypadków zachorowań u ludzi. W mleku obecne mogą być również rakotwórcze oraz szkodliwe dla wątroby mikotoksyny. Najczęściej wykrywaną toksyną pozostaje AFM_1 , która jest metabolitem aflatoksyny B_1 często obecnej w paszy dla zwierząt. Poziom karcynogenności oraz znaczenie AFM_1 dla zdrowia człowieka i zwierząt nie są w pełni zbadane.

Piśmiennictwo

1. Piotrkowska M, Żakowska Z. Mikotoksyny w żywności, zagrożenia zdrowotne. W: Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z (red.). Mikrobiologia techniczna tom 2. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, str. 289-303.
2. Nowak A, Oltuszek-Walczak E, Świtoniak T. Zatrucia i zakażenia pokarmowe. W: Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z (red.). Mikrobiologia techniczna tom 2. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, str. 265-88.

3. Mungai EA, Behravesh CB, Gould LH. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. *Emerg Infect Dis* 2015;21:119-22.
4. CDC. Raw milk know the raw facts. Źródło: <https://www.cdc.gov/food-safety/pdfs/raw-milk-infographic2-508c.pdf>, dostęp: 19.05.2017.
5. Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE. Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws – United States, 1993-2006. *Emerg Inf Dis* 2012;18:385-91.
6. Mulunda M, Ngoma L, Nyirenda M, Motsei L, Bukunzi F. A decade of aflatoxin M₁ surveillance in milk and dairy products in developing countries (2001-2011): a review. W: Makun H (red.). *Mycotoxin and food safety in developing countries*. Rijeka: InTech, 2013, str. 39-60. DOI: 10.5772/53286.
7. Sharp JCM. Milk-borne infection. *J Med Microbiol* 1989;29:239-42.
8. Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* 2001;67:1-17.
9. Dhanashekar R, Akkinapalli S, Nelluta A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs* 2012;2(3):101-9.
10. Claeys WL, Cardoen S, Daube G et al. Raw or heated milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 2013;31:251-62.
11. Bryan FL. Epidemiology of milk-borne diseases. *J Food Prot* 1982;46:637-49.
12. Valentine S, Eddy WD, Palombo EA. Examination of the behaviour of bacterial pathogens in raw milk. W: Méndez-Vilas A (red.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex; 2013, str. 1633-8.

13. Macura AB. Mykotoksyny i mykotoksykozy. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). *Mikrobiologia lekarska*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 423-5.
14. Mohammadi H. A review of aflatoxin M₁, milk, and milk products. W: Makun H (red.). *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*. Rijeka: InTech, 2013, str. 397-414. DOI: 10.5772/53286.
15. Iha MH, Barbosaa CB, Okada IA, Trucksess MW. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control* 2013;29:1-6.
16. Kang'ethe EK, Lang Ka. Aflatoxin B₁ and M₁ contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. *Afr Health Sci* 2009;9(4):218-26.
17. Fontaine K, Passero E, Vallone L et al. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M₁ mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control* 2015;27:634-40.
18. Campagnollo FB, Ganev KC, Khaneghah AM et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: A review. *Food Control*;68:310-29.
19. Kręgiel D, Piątkiewicz A, Żakowska Z, Kunicka-Styczyńska A. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne surowców. W: Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z (red.). *Mikrobiologia techniczna tom 2*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, str. 235-52.
20. Żmudziński J. Choroby bydła. W: *Choroby zakaźne zwierząt domowych z elementami zoonoz*. Winiarczyk S, Grądzi Z (red.). II wyd. Lublin: Wydaw. Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, 2002, str. 11-99.
21. Winiarczyk S. Choroby małych przeżuwaczy. W: *Choroby zakaźne zwierząt domowych z elementami zoonoz*. Winiarczyk S, Grądzi Z (red.). II wyd. Lublin: Wydaw. Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, 2002, str. 101-62.

22. Larski Z, Trusczyński M. Zarys mikrobiologii weterynaryjnej. II wyd. Olsztyn: Wydawnictwo ART; 1992.
23. Szewczyk EM. Ziarenkowce gramdodatnie – *Staphylococcus*, *Streptococcus* i inne. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005. str. 19-40.
24. Żawlińska M. Ziarenkowce Gram-dodatnie. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 100-13.
25. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis* 2005;4:619-21.
26. Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simetinger M, Grgič-Vitek M, Gubensëk J, Natek V, Kraigher A, Strle F, Avšič-Žypanc T. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis* 2013;19:806-8.
27. Stypułkowska-Misiurewicz H. Pozostałe pałeczki Gram-ujemne: *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Francisella*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 170-82.
28. Szewczyk EM. *Campylobacter* i *Helicobacter*. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 138-42.
29. Robinson TJ, Scheftel JM, Smith KE. Raw Milk Consumption among patients with non-outbreak-related enteric infections, Minnesota, USA, 2001–2010. *Emerg Infect Dis* 2014;20:38-44.
30. Irving W, Boswell T, Ala'Aldeen D, Szewczyk EM, red. Krótkie wykłady mikrobiologia medyczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2008.

31. Szewczyk EM. Pałeczki jelitowe – *Enterobacteriaceae*. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 111-31.
32. Stypułkowska-Misiurewicz. Pałeczki Gram-ujemne: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 137-57.
33. Szarapińska-Kwaszewska J. Pałeczki gramodatnie – *Listeria* i inne. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 62-7.
34. Lisiecki P. Tlenowe, auksotroficzne pałeczki – *Brucella*, *Legionella* i inne. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 87-100.
35. Ramos JM, Bernal E, Esguevillas T, Lopez-Garcia P, Gaztambide MS, Gutierrez F. Non-imported brucellosis outbreak from unpasteurized raw milk in Moroccan immigrants in Spain. *Epidemiol Infect* 2008;136:1552-5.
36. Bulanda M. Inne bakterie – *Rickettsiaceae*, *Anaplasmatacae* i *Coxiellaceae*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 229-36.
37. Lisiecki P. Riketsje. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 187-92.
38. Pärn T., Hallanvuori S, Salmenlinna S et al. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 infection associated with raw milk consumption, Finland, spring 2014. *Euro Surveill* 2015;20(40):1-7.
39. Argudín MA, Mendoza MC, Ridicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Toxins* 2010;2:1751-73.

40. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki H, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003;130:33-40.
41. Szarapińska-Kwaszewska J. Prątki. W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005, str. 168-76.
42. Kahla B, Boschiroli ML, Cherif N et al. Isolation and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* from raw milk in Tunisia. *Afr Health Sci* 2011;11:2-5
43. Zwolska Z. Prątki *Mycobacterium*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 192-200.
44. Martirosian G. Laseczki Gram-dodatnie niewytwarzające spor. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 120-6.
45. Szarapińska-Kwaszewska J. Bakterie z grupy maczugowate (*Coryneform*). W: Szewczyk EM (red.). Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2005. str. 41-52.
46. Paul M. *Cryptosporidium* spp. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 519-21.
47. James R. Protozoologia lekarska. W: Virella G, Heczko P, (red.). Mikrobiologia i choroby zakaźne. Wrocław: Elsevier Urban & Partner, 1999, str. 415-58.
48. Eckert J. Pierwotniaki. W: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel M, Heczko PB, Pietrzyk A (red.). Mikrobiologia lekarska. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007, str. 475-502.

49. Dubey JP, Verma SK, Ferreira LR, Oliveira S, Cassinelli AB, Ying Y, Kwok OCH, Tuo W, Chiesa OA, Jones JL. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *J Food Prot* 2014;77:1747-53.
50. Rocha DS, Moura RLS, Maciel BM, Guimarães LA, O'dwyer HNS, Munhoz AD, Albuquerque GR. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. *GMR* 2015;14(3):8658-62.
51. Harper CM. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *CDI* 2002;26:449-50.
52. Paul M. *Toxoplasma gondii*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). *Mikrobiologia lekarska*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 515-9.
53. Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. *Food Safety* 2012;55:845-51.
54. Kańtoch M, Blaškovič D. *Wirusologia lekarska*. III wyd. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich; 1991.
55. Krzemiński Z. *Zarys wirusologii lekarskiej*. Łódź: Dział wydawnictw i Poligrafii Akademii Medycznej w Łodzi; 1997.
56. Wróblewska M. *Flawiwirusy*. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A (red.). *Mikrobiologia lekarska*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, str. 360-1.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Dominik M. Matusiak

Pracownia Mikrobiologii Ogólnej Zakładu Biologii Bakterii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-231 Łódź

tel. 48 42 635 44 69

e-mail: matusiak@acer.biol.uni.lodz.pl



Budowa, właściwości i funkcje kolagenu oraz elastyny w skórze

Structure, Properties and Functions of Elastin and Collagen in the Skin

Monika Morąg¹, Agnieszka Burza¹

¹ Społeczna Akademia Nauk, Wydział Nauk Medycznych w Warszawie

¹ University of Social Sciences, Faculty of Medical Sciences, Warsaw

Abstract

The structural basis of the dermis constitute two proteins: collagen and elastin. Their structure and properties are considered to be unique in the world of proteins, which is the subject of ongoing research. Their structure guarantees the specific physical and biological properties of the skin. They are the main structural element of the dermis protecting it, among others, against the harmful effect of mechanical factors. Collagens are a group of proteins that differ in their structure and purpose in the body. Up to now, 29 types of this protein have been discovered and classified. Elastin, unlike collagen, it occurs in only one genetic type, but its fibers, in addition to amino acids, include microfibrils made up of glycoproteins. Both collagen and elastin are fibrillary proteins produced by connective tissue cells that build up the dermal layer - fibroblasts. Structures responsible for their production are mostly rough endoplasmic reticulum along with ribosomes and Golgi apparatus. Collagen and elastin preforms are transported outside the cell to the extracellular matrix (ECM), where their final processing and fiber formation takes place. Mature filaments of these proteins in the extracellular matrix adopt a characteristic spatial grid system, which allows to perform the intended function (such as maintenance of the structural integrity and elasticity of tissues, tensile strength), and are biodegradable by means of enzymes from the group of metalloproteinases (eg. Collagenase, elastase). The imbalance between the process of biosynthesis and biodegradation

of one of them results in abnormalities in the functioning of the skin, as well as the appearance of visible signs of intrinsic and extrinsic aging of the skin.

Key words

collagen, elastin, skin

Streszczenie

Strukturalną podstawę budowy skóry właściwej stanowią dwa białka: kolagen i elastyna. Ich budowa i właściwości uchodzą za wyjątkowe w świecie białek, przez co są przedmiotem ciągłych badań. Ich struktura gwarantuje specyficzne właściwości fizyczne i biologiczne skóry. Są one głównym elementem strukturalnym skóry właściwej zabezpieczającym ją m.in. przed szkodliwym działaniem czynników mechanicznych. Kolageny to grupa białek, które różnią się między sobą budową i przeznaczeniem w organizmie. Do chwili obecnej odkryto i sklasyfikowano 29 typów tego białka. Elastyna w odróżnieniu od kolagenu występuje tylko w jednym typie genetycznym, ale w skład jej włókien – oprócz aminokwasów – wchodzi mikrofibryle zbudowane z glikoprotein. Zarówno kolagen, jak i elastyna to fibrylarne białka wytwarzane przez komórki tkanki łącznej właściwej, budującej warstwę skóry właściwej – fibroblasty. Struktury odpowiadające za ich produkcję to głównie retikulum endoplazmatyczne szorstkie wraz z rybosomami i aparat Golgiego. Proformy kolagenu i elastyny są transportowane na zewnątrz komórki, do macierzy pozakomórkowej (ECM, extracellular matrix), gdzie zachodzi ich ostateczna obróbka i formowanie włókien. Dojrzałe włókna tych białek w macierzy pozakomórkowej przyjmują charakterystyczny układ przestrzennej siatki, który pozwala pełnić im przeznaczone funkcje (m.in. utrzymanie integralności strukturalnej i sprężystości tkanek, wytrzymałość na rozciąganie), a następnie ulegają biodegradacji przy udziale enzymów z grupy metaloproteinaz (np. kolagenazy, elastazy). Zaburzenie równowagi pomiędzy procesem biosyntezy i biodegradacji któregoś z nich przekłada się na zaburzenia w funkcjonowaniu skóry, a także powstawanie widocznych oznak starzenia wewnątrz- i zewnątrzpochodnego skóry.

Słowa kluczowe

kolagen, elastyna, skóra

Wstęp

Skóra to największy narząd organizmu zwierzęcego stanowiący barierę pomiędzy wnętrzem ustroju a środowiskiem zewnętrznym. Strukturalną podstawę skóry stanowią głównie dwa białka: kolagen i elastyna, które odgrywają kluczową rolę w procesie starzenia się skóry. Zaburzenia w procesie syntezy lub degradacji tych związków skutkują nie tylko utratą młodego wyglądu, ale mogą także prowadzić do upośledzenia funkcji skóry.

Budowa molekularna kolagenu

Mianem kolagenu określa się grupę białek, które powszechnie występują w ludzkim organizmie. Kolagen zlokalizowany jest głównie w tkance łącznej i stanowi około 25% wszystkich białek zawartych w ciele człowieka. Jego głównym zadaniem jest zapewnienie tkance wytrzymałości mechanicznej. Jest to możliwe dzięki specyficznej budowie molekularnej cząsteczki [1, 2].

Polipeptydowy łańcuch kolagenu składa się w około 30% z glicyny. Wysoką zawartością cechują się także alanina, prolina i hydroksyprolina. Nieco rzadziej występującymi, ale charakterystycznymi dla kolagenu aminokwasami są lizyna oraz jej pochodna – hydroksylizyna, które biorą udział w tworzeniu wysoko zorganizowanych struktur tego białka. Zawartość poszczególnych aminokwasów kolagenu w ludzkiej skórze prezentuje tabela nr 1 [3, 4].

Oprócz wysokiej zawartości glicyny i swoistych aminokwasów białko kolagenowe różni się od innych obecnością regularnej sekwencji w łańcuchu polipeptydowym. Blisko co trzecią resztę stanowi glicyna, po której zazwyczaj występuje prolina. Za proliną często zlokalizowana jest hydroksyprolina lub – nieco rzadziej – alanina. Ta zależność powoduje, że w kolagenie można wyróżnić powtarzającą się sekwencję aminokwasów Gly-Pro-Hyp oraz Gly-Pro-Ala, a to schematyczne ułożenie aminokwasów przekłada się na utworzenie charakterystycznej struktury przestrzennej kolagenu [2, 4].

Pojedyncze łańcuchy, u człowieka liczące od 662 do 3152 reszt aminokwasowych, samorzutnie przyjmują formę lewoskrętnej alfa-helisy, którą stabilizują mostki wodorowe. W wyniku dalszych agregacji pojedynczych łańcuchów powstaje podstawowa jednostka strukturalna typowej cząsteczki kolagenowej, tzw. tropokolagen, czyli fragment złożo-

ny z trzech polipeptydowych, lewoskrętnych łańcuchów alfa, które łączą się ze sobą wiązaniami wodorowymi i tworzą prawoskrętną, potrójną helisę zwaną też superhelisą. Postać superhelisy jest wyjątkowa w świecie białek zwierzęcych, a jej występowanie gwarantuje kolagenowi odporność na działanie większości proteaz (np. trypsyny, pepsyny). Zdolność degradacji trójhelikalnych form kolagenu mają jedynie kolagenazy [2, 5, 6, 7].

Aktualne badania nad kolagenem dowiodły, że istnieje sześć typów podjednostek alfa, które różnią się między sobą zawartością i sekwencją aminokwasów. Agregują one ze sobą, tworząc superhelisę, która może zawierać trzy identyczne (homotrimer), trzy różne lub dwie takie same i jedną inną podjednostkę alfa (heterotrimer). Powstały w ten sposób tropokolagen to podstawowa forma budowy cząsteczki, jednak nie stanowi on 100% każdego z kolagenów. Istnieją pewne typy kolagenu z tzw. przerywaną strukturą superhelisy, w których pomiędzy trójhelikalnymi domenami występują także fragmenty niehelikalne. Ma to wpływ na formowanie się struktur wyższych rzędów tego białka (kolagen niefibrylarny) [2, 6].

Makrocząsteczka kolagenu złożona z tropokolagenu i niehelikalnych fragmentów nie jest ostateczną formą białka. Końcowa forma jest bardziej złożona i zależy od jego rodzaju. W skórze najpowszechniej występują kolagen I i III, które należą do białek fibrylarnych. Po zakończeniu syntezy cząsteczki, w wypadku kolagenu fibrylarnego, molekuły prokolagenu trafiają do macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie zostają poddane ostatecznej obróbce i ponownie ulegają agregacji. W wyniku fuzji przeciwrównoległych i bocznych tworzą się fibryle, które łączą się ze sobą w włókna kolagenu [4,7,8].

Właściwości fizykochemiczne kolagenu

Nietypowa budowa cząsteczki kolagenu wpływa na jego fizykochemiczne właściwości, z których najważniejszą jest duża wytrzymałość na rozciąganie i urazy mechaniczne. Jego wytrzymałość mechaniczna jest około 20-krotnie większa aniżeli wytrzymałość elastyny. Charakterystyczne ułożenie cząsteczek i duża liczba wiązań (głównie wodorowych i kowalencyjnych) powodują, że do „zburzenia” struktury kolagenu potrzebna jest duża ilość energii. Pojedyncze wiązanie wodorowe ma energię od kilku do 40 kcal/mol. Nie jest to duża ilość energii jak na wiązanie chemicz-

ne, jednak każda cząsteczka kolagenu zawiera kilkaset takich wiązań. Nawet jeżeli pewna liczba mostków wodorowych ulegnie rozerwaniu pod wpływem czynnika mechanicznego, to pozostała ich część utrzymuje strukturę w stabilnej formie, dzięki czemu zniszczone wiązania będą mogły odtworzyć się w krótkim czasie [7, 9, 10, 11].

Wyjątkowa struktura superhelisy w cząsteczce białka kolagenu powoduje, że jest on związkiem nierozpuszczalnym lub słabo rozpuszczalnym w wodzie. Ta właściwość powoduje, że proteazy, które działają tylko w środowisku wodnym, nie są w stanie trawić wiązań kolagenu. Enzymami, które mają zdolność degradacji kolagenu fibrylarnego, są kolagenazy. Dopiero po wstępnym rozcięciu włókien rozpuszczalne już frakcje kolagenu mogą być strawione przez nieswoiste proteazy [2, 6, 12].

Obecnie odkryto i sklasyfikowano 29 typów kolagenu. Różnią się one między sobą budową, właściwościami i umiejscowieniem w organizmie. Dla ułatwienia białka kolagenowe klasyfikuje się, biorąc pod uwagę ich wspólne cechy budowy. Przyjmując takie kryterium podziału wyróżnia się:

- kolagen fibrylarny,
- kolagen niefibrylarny:
 - kolagen błony podstawnej,
 - kolagen kotwiczący,
 - kolagen tworzący mikrowłókna,
 - kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe,
 - kolagen zawierający domeny transbłonowe MACITs,
 - kolagen typu FACITs,
 - kolagen typu MULTIPLEXINs [6].

W tabeli nr 2 przedstawiono typy kolagenu oraz jego występowanie w organizmie ssaków.

Kolagen fibrylarny jest głównym przedmiotem zainteresowań badaczy. Kolagen tworzący włókna – w tym kolagen typu I, II, III, V, XI, XXIV i XXVII – stanowi około 90% masy kolagenu w organizmie człowieka. Ma charakterystyczną strukturę trzech spiralnie zwiniętych łańcuchów polipeptydowych zawierających swoiste fragmenty (złożone z ponad tysiąca reszt aminokwasów) zlokalizowane w części środkowej łańcuchów. Sekwencje te są otoczone krótkimi (około 20-aminokwasowymi), niehelikalnymi fragmentami zwanymi telopeptydami. W skórze występuje kolagen typu I, III i IV [4, 9, 14, 15, 16].

Kolagen niefibrylarny, na który składają się typy: IV, VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXV, XXVI, XXVIII, XXIX, jest podzielony na kilka różnych grup:

- kolagen błony podstawnej (typ IV),
- kolagen kotwiczący (typ VII),
- kolagen tworzący mikrowłókna (typy: VI, XXVIII, XXIX),
- kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe (typy: VIII, X),
- kolagen zawierając domeny transbłonowe MACITs (typy: XIII, XVII, XXIII, XXV),
- kolagen typu FACITs (typy: IX, XII, XIV, XVI, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI),
- kolagen typu MULTIPLEXINs (typy: XV, XVIII).

Mimo tak dużej różnorodności kolagen niefibrylarny stanowi zaledwie 10% masy kolagenu organizmu zwierzęcego. Jest jednak bardzo ważnym elementem budowy narządów takich jak wątroba, mózg czy oczy. W skórze występuje kolagen typu: IV, VI, VII, VIII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XIX oraz XXIX [6, 7, 13].

Biosynteza i biodegradacja kolagenu

Około 40% całego kolagenu organizmu znajduje się w skórze, gdzie stanowi blisko 70% masy wszystkich białek skóry. Większość zlokalizowana jest na poziomie skóry właściwej, gdzie znajdują się fibroblasty odpowiedzialne za jego syntezę i rozkład. Zachowanie odpowiedniej proporcji pomiędzy syntezą a degradacją kolagenu jest istotne dla prawidłowej funkcji tkanki łącznej. Jej zachwianie może prowadzić m.in. do nieprawidłowego procesu gojenia ran [17].

Synteza kolagenu to proces wieloetapowy. Pierwszy etap przebiegający na terenie jądra komórkowego związany jest z produkcją transkryptu, który zostaje przekazany do cytoplazmy komórkowej, gdzie stanowi matrycę do syntezy łańcuchów polipeptydowych kolagenu. Drugi etap to synteza łańcuchów peptydowych w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej. Powstałe cząsteczki prokolagenu trafiają następnie do macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie osiągają pełną dojrzałość i przyjmują swoją ostateczną formę [15, 18].

Pierwotny łańcuch aminokwasowy kolagenu (pre-prokolagen) przyjmuje samorzutnie drugorzędową strukturę w formie lewoskrętnej alfa helisy (łańcuchy pre- α 1 - pre- α 6). Taka cząsteczka ulega potranslacyjnej

obróbce wewnątrz szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Zachodzą tu różne reakcje, które są niezbędne, aby białko mogło przyjąć prawidłową strukturę i należycie pełnić swoje funkcje [5, 19].

W wypadku kolagenu można wyróżnić trzy etapy obróbki potranslacyjnej w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej. Początkowo za pomocą peptydazy sygnałowej zostaje usunięty sygnał peptydowy, który znajduje się na N-terminalnym końcu (koniec łańcucha, gdzie znajduje się aminokwas z wolną grupą aminową). Drugi etap to reakcje hydroksylacji proliny i lizyny. Jest on niezwykle ważny, ponieważ obecność tych aminokwasów gwarantuje trzeciorzędową, charakterystyczną strukturę kolagenu. Hydroksylizyna i hydroksyprolina nie są wbudowywane bezpośrednio do szeregu aminokwasów w procesie translacji. W ich miejsce dołączane są odpowiednio prolina lub lizyna, a dopiero w drugim etapie obróbki potranslacyjnej, za pomocą enzymów: hydroksylazy lizyny, prolilo-4-hydroksylazy i prolilo-3-hydroksylazy następuje hydroksylacja tych aminokwasów i w efekcie powstają docelowo: 5-hydroksylizyna, 4-hydroksyprolina oraz 3-hydroksyprolina. Do prawidłowej funkcji hydroksylaz niezbędne są też kofaktory: kwas askorbinowy, alfa-ketoglutaran, tlen cząsteczkowy oraz jony żelaza (II) [20, 21, 22].

Bezpośredni wpływ na potrójną helisę ma też ostatni etap modyfikacji w retikulum – reakcja glikozylacji reszt hydroksylizyny. W jej przebiegu dołączane są dwa rodzaje monosacharydów: galaktoza i glukoza. Przyłączenie galaktozy katalizuje galaktozylotransferaza, a za związanie glukozy odpowiada glukozylotransferaza. Po takiej modyfikacji białka trzy łańcuchy spontanicznie zaczynają się do siebie dopasowywać, tworząc wiązania wodorowe (co umożliwia obecność hydroksyproliny i hydroksylizyny) oraz mostki dwusiarczkowe. Ta pierwotna forma superhelisy nazywana jest prokolagenem [17, 23].

Po modyfikacji w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej prokolagen transportowany jest do aparatu Golgiego, gdzie zachodzi ostateczny etap modyfikacji cząsteczki przed opuszczeniem komórki. W wyniku glikozylacji, do cząsteczki prokolagenu dołączane są oligosacharydowe reszty. Tak przekształcone cząsteczki prokolagenu trafiają do pęcherzyków sekrecyjnych i na drodze egzocytozy są „wyrzucane” z komórki do macierzy pozakomórkowej [22].

Cząsteczka prokolagenu, która trafia do macierzy pozakomórkowej składa się z trzech skręconych ze sobą łańcuchów alfa. Zarówno na koń-

cu N-, jak i C-terminalnym znajdują się krótkie propeptydy, które bezwzględnie są usuwane przez peptydazy prokolagenowe (N-proteinazę i C-proteinazę). W ten sposób cząsteczka prokolagenu przekształcana jest w tropokolagen [24].

Do macierzy pozakomórkowej zostaje wydzielonych wiele cząsteczek prokolagenu, po modyfikacji w tropokolagen zaczynają spontanicznie reagować ze sobą i łączyć się podłużnie, w sposób antyrównoległy, tworząc fibryle. Są to zorganizowane struktury, w których każda pojedyncza nić tropokolagenu ma swoje określone miejsce. W typowej fibryli cząsteczki tropokolagenu przesunięte są względem siebie o 67 nm (tzw. okres prążkowania), a pomiędzy jedną a drugą cząsteczką, których końce znajdują się obok siebie, występuje przerwa 35 nm. Takie struktury szybko agregują ze sobą w naturalnym środowisku w jeszcze większe cząsteczki, znane jako włókna kolagenu. W zależności od rodzaju białka ich długość i średnica są różne. W badaniach wykazano, że włókna z warstwy brodawkowatej skóry mają średnio 56,2 nm grubości, a średnica włókna z warstwy siateczkowatej zazwyczaj wynosi około 62,8 nm [4, 8, 25].

Stworzenie trwałej struktury włókna kolagenowego nie jest możliwe bez obecności oksydazy lizylowej. Ten enzym umożliwia powstanie wiązań krzyżowych pomiędzy składowymi włókna kolagenowego. Jej działanie uzależnione jest od jonów miedzi, które wchodzi w skład budowy tego enzymu oraz od lizylo-tyrozylochinonu (kofaktor). Oksydaza lizylowa katalizuje reakcję, w której grupa aminowa lizyny lub hydroksylizyny przekształcana jest w grupę aldehydową. Do jej przebiegu niezbędna jest również woda i tlen cząsteczkowy. W wypadku kolagenu I na C-terminalnym końcu telopeptydu zachodzą dwie takie reakcje (w łańcuchach alfa1), na końcu zaś N-terminalnym telopeptydu – trzy. Ostateczna stabilizacja cząsteczki kolagenu zachodzi poprzez wykształcenie wiązań krzyżowych kowalencyjnych, które znajdują się pomiędzy grupami aldehydowymi lub pomiędzy grupą aldehydową a aminową lizyny bądź hydroksylizyny. Tak wykształcony kolagen może doskonale odgrywać swoją rolę [26].

Za rozkład białek w organizmie odpowiedzialne są enzymy proteolityczne (proteazy), które mają zdolność trawienia wiązań peptydowych. Skomplikowana struktura kolagenu sprawia, że jest on odporny na działanie nieswoistych peptydaz, dlatego fibroblasty syntezują specjalne, wysoce swoiste enzymy, które mają zdolność degradacji wysoko zorganizowanego kolagenu.

wanych struktur kolagenu. W organizmie zwierzęcym wyróżnia się dwie drogi biodegradacji białek kolagenowych: drogę zewnątrz-i wewnątrzkomórkową [27].

Zewnątrzkomórkowy szlak degradacji kolagenu opiera się na działaniu enzymów zwanych metaloproteinazami macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Jest to grupa enzymów, w której wyróżnia się: koleganazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny, metaloproteinazy błonowe oraz inne metaloproteinazy. Przynależność do tej grupy jest uwarunkowana kilkoma czynnikami. Przede wszystkim udokumentowano, że każdy z tych enzymów w swojej budowie zawiera atom cynku (stąd nazwa) oraz ma zdolność degradacji przynajmniej jednego z elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Na uwagę zasługuje też fakt, że aktywność każdej metaloproteinazy jest hamowana przez tzw. endogenne inhibitory tkankowe (TIMP). Charakterystyczny dla MMP jest również fakt, że wydzielane są jako wrażliwe na pH proenzymy, które ulegają aktywacji w określonym środowisku [28].

Każda metaloproteinaza ma zdolność trawienia tylko określonych białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces degradacji cząsteczek kolagenu zapoczątkowują metaloproteinazy, które należą do kolagenaz (MMP-1, MMP-8, oraz MMP-13), żelatynaz (MMP-2 i MMP-9), stromelizyn (MMP-10), matrylizyn (MMP-7) oraz innych metaloproteinaz (MMP-14, MMP-15 i MMP-16), a każdy z tych enzymów trawi tylko określone typy białka. Udowodniono też, że niektóre metaloproteinazy pełnią też funkcję aktywatora dla innych enzymów z tej grupy (np. MMP-2 odpowiada za aktywację MMP-1 i MMP-9) [28, 29, 30].

Zewnątrzkomórkowa proteoliza wymaga aktywnej formy konkretnej metaloproteinazy. W wypadku proenzymu z atomem cynku związanym jest cysteina N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego. Aktywacja enzymu polega na rozerwaniu tego wiązania (tzw. aktywacja *cystein-switch*). Wywołuje to kaskadę kolejnych reakcji, które prowadzą do zmian przestrzennych w budowie enzymu. Efektem tych zmian jest odsłonięcie miejsca aktywnego metaloproteinazy i obniżenie jej masy cząsteczkowej. Taka forma związku może z powodzeniem odgrywać przeznaczoną jej rolę, jednak jej zawartość jest ściśle regulowana przez organizm. Na poziomie aktywacji *cystein-switch* zdolności enzymatyczne metaloproteinaz zależą m.in. od: pH środowiska, innych enzymów proteolitycznych (w tym także aktywnych już metaloproteinaz), oksydantów,

jonów metali, a także detergentów, ilości danego substratu oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz [31].

Aktywna kolagenaza ma zdolność degradowania potrójnej helisy kolagenu. Rozrywa ona wiązanie pomiędzy glicyną a izoleucyną lub leucyną (w zależności od typu łańcucha), co powoduje rozpad cząsteczki kolagenowej na dwie duże molekuly, z których pierwsza stanowi około 75%, druga zaś 25% pierwotnego związku. Z tego wynika, że degradacja rozpoczyna się od zerwania wiązania, które położone jest w odległości około $\frac{3}{4}$ całej długości cząsteczki. Produkty tego rozpadu nie mają już właściwości pierwotnej struktury i stają się mniej odporne na działanie różnego rodzaju czynników. Pod wpływem temperatury ciała zaczynają ulegać denaturacji, co prowadzi do zburzenia ich struktury superhelisy. Zyskują także zdolność rozpuszczania w wodzie, a to z kolei umożliwia dalsze trawienie łańcucha białkowego przez nieswoiste proteazy aż do uwolnienia krótkich peptydów lub pojedynczych aminokwasów [2, 32].

Alternatywną formą rozkładu cząsteczek kolagenu jest szlak wewnątrzkomórkowy, który ma zdecydowanie mniejszy udział w biodegradacji kolagenu. Za prawidłowy przebieg degradacji w tym szlaku są odpowiedzialne receptory na powierzchni komórek, które wiążą się z cząsteczką kolagenu. W ten sposób komórka dostaje sygnał o zapoczątkowaniu procesu degradacji. Na drodze endocytozy molekula kolagenowa zostaje wchłonięta do komórki i trafia do lizosomów. W wyniku kwaśnego pH następuje denaturacja kolagenu, a więc zburzenie jego struktury trójhelikalnej, dzięki czemu cząsteczka staje się substratem łatwym do strawienia przez obecne w lizosomach enzymy proteolityczne (np. katepsyny) [27].

Funkcje kolagenu w skórze

Specyficzna budowa kolagenu determinuje funkcje biologiczne cząsteczki. Białka strukturalne, do których należą także kolageny, charakteryzuje wysoka odporność głównie na czynniki mechaniczne, ale także fizyczne i chemiczne. Dzięki temu kolagen jako jeden z podstawowych budulców tkanki łącznej na poziomie komórkowym może spajać ze sobą wszystkie elementy strukturalne. Pełni funkcję swego rodzaju „biologicznego kleju”, który spaja ze sobą poszczególne elementy tkanki, zapewniając jej całkowitą integralność. Powyższa funkcja kolagenu jest przez niego spełniana również na wyższych poziomach organizacji komórkowej. Organy

mogą się składać z różnych tkanek, czego przykładem jest skóra. Skóra właściwa, złożona z tkanki łącznej od strony środowiska zewnętrznego pokryta jest naskórkiem, który histologicznie jest tkanką nabłonkową. Integralność tych dwóch tkanek zapewnia również białko kolagenowe. Kolagen jako „klej biologiczny” gwarantuje zatem spójność całego organizmu i umożliwia mu prawidłowe funkcjonowanie. Ta cecha oraz wyjątkowa wytrzymałość mechaniczna i elastyczność kolagenu powodują, że jest to białko, które zabezpiecza strukturę skóry właściwej przed urazami mechanicznymi. Włókna kolagenu tworzą uporządkowaną sieć przestrzenną, do której przyłączone są (np. za pomocą receptorów) inne elementy macierzy pozakomórkowej. W momencie zadziałania bodźca mechanicznego owa sieć się odkształca, jednak gdy czynnik przestaje działać, cząsteczki mogą wrócić na „swoje miejsce”. Dzięki zdolności do odkształcania się sieci kolagenowej wszystkie elementy, które są bezpośrednio przyłączone do włókien kolagenu lub znajdują się w jej bliskim sąsiedztwie, nie ulegają uszkodzeniu pod wpływem ucisku i mogą nieprzerwanie prawidłowo pełnić swoje funkcje [15, 17].

Ważną cechą kolagenu jest też zdolność wiązania wody. Dzięki odpowiedniemu nawodnieniu włókna białkowe skóry właściwej zachowują swoją strukturę i właściwości. Skóra jest wtedy napięta i sprężysta, a to gwarantuje jej odporność na działanie czynników mechanicznych i pozwala spełniać funkcję bariery ochronnej. Wysoka zawartość wody w naskórku i skórze właściwej jest kluczem do jej prawidłowego funkcjonowania, ponieważ większość reakcji biochemicznych zachodzi w środowisku wodnym. W przesuszonej skórze obserwuje się spadek metabolizmu, a w konsekwencji cały organ nie może prawidłowo odgrywać swojej roli [18].

Badania pokazują, że cząsteczki kolagenu mają zdolność wiązania cytokin, co pozwala przypuszczać, że odgrywają ważną rolę w procesie proliferacji komórek. W skórze stymulacja podziałów komórkowych jest szczególnie ważna w procesie regeneracji jej ubytków, dlatego ta funkcja kolagenu jest równie ważna, co funkcja budulcowa i podporowa [15].

Powyższe argumenty nie pozostawiają wątpliwości, że kolagen to jedno z najważniejszych białek organizmu zwierzęcego. Umożliwia on tworzenie wysoce wyspecjalizowanych struktur tkankowych, zapewnia integralność składowych narządów i dzięki temu pozwala im pełnić swoją funkcję, tak więc pośrednio uczestniczy w procesach obronnych organizmu i pomaga utrzymać jego homeostazę [33].

Budowa molekularna elastyny

Elastyna, podobnie jak kolagen, należy do grupy białek strukturalnych i szeroko występuje w organizmie zwierzęcym. Cechuje ją wysoka odporność na rozciąganie, pracę jej włókien porównuje się do sprężyny, która pod wpływem czynnika się napina, a po jego ustaniu wraca do swojej poprzedniej postaci. Wraz z kolagenem odpowiada ona za jędrność, sprężystość i wytrzymałość mechaniczną skóry [1].

Budowa molekularna elastyny jest znacznie mniej skomplikowana aniżeli budowa kolagenu. Przybiera ona określoną formę przestrzenną, która determinowana jest przez kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i stabilizowana głównie przez wiązania wodorowe. Pod względem ilościowym aminokwasów pierwsze miejsce w łańcuchu zajmuje glicyna (około 30%), a na kolejnych plasują się: alanina (około 24%), walina (około 15%) i prolina (około 11%). Te cztery aminokwasy budują około 75–80% całego białka elastynowego [34, 35].

Elastyna syntezowana jest w komórkach skóry właściwej – fibroblastach – a jej cząsteczki wydzielane są do macierzy zewnątrzkomórkowej. Tuż po wydzieleniu elastyna ma formę nieusieciowaną i nosi nazwę tropoelastyny (elastyny niedojrzałej). W odróżnieniu od tropokolagenu, nie ma ona na końcu telomerów, dzięki czemu jej zewnątrzkomórkowa obróbka przebiega znacznie sprawniej [34, 36].

Ostateczne włókna elastynowe nie są złożone z samej elastyny. Białko to formuje centralną część włókna – tzw. rdzeń, który pokryty jest otoczką złożoną z mikrofibryli. Wiele takich włókien połączonych jest pomiędzy sobą wiązaniami krzyżowymi, dzięki czemu powstaje przestrzenna struktura, która w razie zadziałania siły rozciągnie się i umożliwi powrót do pierwotnego kształtu po zaprzestaniu działania bodźca [33].

Trójwymiarowe struktury złożone z włókien kolagenu lub elastyny w skórze mogą być ze sobą połączone. Proces wytwarzania wiązań pomiędzy elastyną a kolagenem zachodzi w macierzy pozakomórkowej i jest kontrolowany przez oksydazę lizylową i hydroksylazę lizyny. Dzięki ściśłemu połączeniu pomiędzy tymi dwoma białkami możliwa jest ich wzajemna kontrola w funkcji – wytrzymałość kolagenu nie pozwala elastynie zbyt mocno się rozciągać, a sprężystość elastyny chroni włókna kolagenu przed destrukcją wskutek nadmiernego rozciągnięcia. Wykształcona w ten sposób struktura złożona z włókien kolagenu i elastyny stanowi

odporne na uszkodzenia mechaniczne (zarówno ucisk, jak i rozciąganie) rusztowanie skóry właściwej [17, 37, 38].

Właściwości fizykochemiczne elastyny

Ze względu na dużą zawartość aminokwasów hydrofobowych elastyna jest białkiem całkowicie nierozpuszczalnym w wodzie. Dzięki tej właściwości włókna sprężyste nie mogą stanowić substratu dla proteaz, które działają tylko w środowisku wodnym. Enzymy, które mają zdolność trawienia włókien elastynowych, to metaloproteiny oraz produkowane głównie przez komórki krwi i fibroblasty elastazy. Elastyna nie jest jedynym substratem elastaz. Wykazują one aktywność w stosunku do wielu związków, co powoduje, że trawienie włókien elastynowych jest rozciągnięte w czasie. Wyjątek stanowi niewykorzystana przez organizm tropoelastyna, która ze względu na brak usieciowania ulega szybkiej degradacji [29, 34].

Odporność na rozciąganie to najważniejsza cecha włókien sprężystych. Dzięki niej mogą one pełnić swoją podstawową funkcję, zapewniając w ten sposób prawidłowe funkcjonowanie wielu narządów w całym organizmie. Elastyna jako jedyna w wyniku zadziałania siły potrafi się rozciągnąć nawet do 200% bez uszkodzania swojej struktury i powrócić do formy pierwotnej. Zawdzięcza to swojej postaci bezładnie ukształtowanych przestrzennie włókien. Czyni to z niej białko o wybitnej sprężystości, która jest około 300-krotnie większa niż ta, którą cechuje się kolagen [10].

Biosynteza i biodegradacja elastyny

Procesy biosyntezy i biodegradacji elastyny przebiegają wolniej aniżeli w wypadku kolagenu, lecz równowaga pomiędzy nimi jest niezwykle ważna dla zachowania integralności całej tkanki, z której składa się skóra [38].

Proces biosyntezy elastyny rozpoczyna się w jądrze komórkowym, gdzie następuje przepisanie informacji z DNA na mRNA (transkrypcja) po wydzieleniu mRNA do cytoplazmy, za pomocą rybosomów i innych struktur, odbywa się synteza łańcucha polipeptydowego (translacja), a następnie w wyspecjalizowanych organellach komórkowych zachodzi posttranslacyjna obróbka białka i uformowanie przestrzennej struktury. W trakcie tej obróbki dochodzi do hydroksylacji niektórych reszt

proliny (do 20% reszt), a powyższą reakcję katalizuje prolilohydroksylaza. W aparacie Golgiego następuje połączenie cząsteczek tropoelastyny z tzw. czynnikiem opiekuńczym, którego zadaniem jest zablokowanie przedwczesnej wewnątrzkomórkowej agregacji cząsteczek we włókna [18].

Kompleks tropoelastyna – czynnik opiekuńczy jest wyrzucany z komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie znajdują się mikrofibryle, do których przyłączone są cząsteczki galaktozy. Gdy czynnik opiekuńczy znajdzie się w pobliżu takiej cząsteczki cukrowej, łączy się z nią i jednocześnie traci powinowactwo do tropoelastyny, która zostaje całkowicie uwolniona [35].

Mikrofibryle, które biorą udział w uwolnieniu tropoelastyny, wchodzi w skład włókien sprężystych. Zbudowane są one głównie z glikoprotein: fibryliny-1 i fibryliny-2, które w obecności jonów wapnia przybierają kształt pręta. Dodatkowe komponenty tych struktur stanowią inne glikoproteiny i białka związane z mikrofibrylami. Mikrofibryle stanowią swego rodzaju „rusztowanie” dla cząsteczek tropoelastyny, które układają się wzdłuż nich, a pomiędzy pojedynczymi molekułami białka zaczynają się wytwarzać wiązania. W przestrzeni te dwa komponenty włókien układają się w taki sposób, aby rdzeń włókna stworzony był głównie z elastyny, a na zewnątrz, w formie otoczki, ułożone były mikrofibryle. W ten sposób formuje się włókno elastynowe [33].

W procesie formowania włókien sprężystych pomiędzy cząsteczkami tropoelastyny powstają wiązania krzyżowe, a w ich wytwarzaniu bierze udział oksydaza lizylowa, której prawidłowe działanie zapewnia obecność jonów miedzi. Podobnie jak w wypadku kolagenu w macierzy zewnątrzkomórkowej przeprowadzana jest reakcja katalizowana przez ten enzym, a w jej wyniku grupy aminowe lizyny przekształcane są w grupy aldehydowe. Kiedy cztery reszty lizyny lub allizyny z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych znajdują się w swoim sąsiedztwie, to w następstwie samorzutnych reakcji powstają poliaminokwasy – desmosyna lub izodesmosyna, które pełnią funkcję wiązań krzyżowych [34, 39].

Biodegradacja elastyny może przebiegać w dwóch różnych mechanizmach: zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowo. Zewnątrzkomórkowa degradacja elastyny możliwa jest dzięki specjalnym enzymom, które mają zdolność trawienia nierozpuszczalnej elastyny. Głównie są to elastazy,

które trawią ogólnie występujące w białkach wiązania peptydowe pomiędzy małymi aminokwasami (takimi jak: glicyna, alanina czy seryna). W organizmie występuje jednak wiele białek, w których budowie można wyróżnić takie wiązania, dlatego elastazy, oprócz rozkładu elastyny, katalizują też wiele innych reakcji, a to wpływa na relatywnie powolny rozkład dojrzałej elastyny wewnątrz organizmu [34, 36, 38].

Wpływ na pozakomórkową degradację dojrzałej elastyny – choć w znacznie mniejszym stopniu – mają też metaloproteinazy, które zaangażowane są głównie w rozkład kolagenu. Z 26 metaloproteinaz zdolność rozkładu elastyny mają tylko dwie: MMP-3 oraz MMP-12 [28, 29, 31].

Elastyna zawarta w skórze w pewnych warunkach może zostać wchłonięta ponownie do fibroblastów i strawiona we wnętrzu komórki. Na drodze endocytozy białko zostaje pochłonięte i trafia do lizosomów, gdzie w wyniku ekspozycji na działanie kwaśnego pH, jakie panuje w lizosomach, ulega denaturacji i w takiej formie jest trawione poprzez lizosomalne proteazy – np. katepsynę K [40].

Funkcje włókien elastynowych w skórze

Elastyna jest białkiem wyjątkowo odpornym na rozciąganie, a jej działanie porównuje się najczęściej do sprężyny lub gumy. Sieć białka elastynowego w stanie spoczynku przypomina ściśniętą sprężynę, która pod wpływem mechanicznego bodźca może się swobodnie rozciągnąć (nawet do 200%), zachowując w pełni budowę molekularną. Po ustaniu działania tego bodźca wraca ona do swojej pierwotnej postaci. Ponadprzeciętna sprężystość elastyny sprawia, że jej podstawowa rola sprowadza się do nadania elastyczności i sprężystości tkankom i organom, w których występuje w znaczących ilościach. Odpowiednia rozciągliwość struktury ma często kluczowe znaczenie dla jej prawidłowego funkcjonowania. Podobnie jest ze skórą – sprężystość, którą gwarantuje prawidłowa budowa i zawartość włókien elastynowych, jest bardzo ważnym czynnikiem, który pomaga skórze spełniać jej podstawowe zadania [35].

W celu lepszego odzwierciedlenia wartości, jaką ma elastyna zawarta w skórze, warto przybliżyć problem elastozy, czyli nagromadzenia się dużych ilości włókien elastynowych o nieprawidłowej budowie. W wypadku elastozy dochodzi do degradacji fibryliny, która jest komponentem włókien sprężystych, w związku z czym tracą one swoją strukturę, ulegają fragmentacji i nie mogą odgrywać swojej roli. W wyglądzie zewnętrz-

nym objawia się ona w postaci utraty jędrności skóry oraz powstających zmarszczek [41, 42].

Właściwości elastyny oraz jej wyjątkowe połączenie z kolagenem stanowiącym „rusztowanie” struktury skóry właściwej sprawiają, że obecność tego białka jest fundamentalna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, a dodatkowo przekłada się na jędrną, zdrową skórę, co pozytywnie wpływa na funkcjonowanie psychiki człowieka [35, 37, 43].

Podsumowanie

Skóra składa się z wielu różnych związków, a najważniejszymi komponentami białkowymi są kolagen i elastyna, które należą do białek strukturalnych i są produkowane przez komórki naszego organizmu w wielu różnych strukturach. Biosynteza i biodegradacja kolagenu oraz elastyny to skomplikowane procesy, które nieustannie zachodzą w naszym organizmie, a ich wzajemny stosunek decyduje o wytrzymałości struktury organizmu (jeżeli przeważa biodegradacja, to wytrzymałość struktury spada). Do ich prawidłowego przebiegu niezbędny jest cały szereg dodatkowych związków takich jak enzymy czy kofaktory, które usprawniają, a wręcz umożliwiają przebieg kaskady reakcji biochemicznych w wyniku których syntezowane lub degradowane są białka.

Zarówno kolagen, jak i elastyna wyróżniają się w świecie białek budową molekularną i właściwościami fizykochemicznymi, a w szczególności odpornością na działanie bodźców mechanicznych, dlatego ich głównym zadaniem jest chronić tkanki przed uszkodzeniami ze strony czynników mechanicznych, jednakże nie jest to ich jedyna rola. Kolagen odgrywa rolę m.in. w bliznowaceniu ran, pomaga zapewnić odpowiednie środowisko dla reakcji biochemicznych, a także gwarantuje integralność wielu struktur naszego organizmu.

Powyższe argumenty bezspornie pokazują, że kolagen i elastyna to związki o wyjątkowej budowie i właściwościach, które sprawiają, że stanowią one bardzo ważny element budulcowy całego organizmu, umożliwiając mu prawidłowe funkcjonowanie.

Tabela 1. Zawartość poszczególnych aminokwasów w łańcuchu alfa na 1000 reszt aminokwasowych [4]

Table 1. Content of individual amino acids in the alpha chain per 1000 amino acid residues

Aminokwas	Liczba reszt na 1000 reszt w łańcuchu
Alanina	114,5
Glicyna	324,4
Walina	24,5
Leucyna	28,8
Izoleucyna	10,4
Prolina	125,1
Fenylalanina	12,6
Tyrozyna	3,5
Seryna	36,9
Treonina	18,3
Metionina	7,0
Arginina	49,0
Histydyna	5,4
Lizyna	26,6
Kwas asparaginowy	47,2
Kwas glutaminowy	77,7
Hydroksyprolina	90,9
Hydroksylizyna	5,9

Źródło: Wybór W., Zaborski M. Budowa i właściwości kolagenu oraz żelatyny, Polimery 2000, 45(1): 10-21.

Tabela 2. Występowanie kolagenu i podział ze względu na jego budowę [13].

Table 2. Occurrence of collagen and division due to its structure

Typ kolagenu	Rodzina/Podrodzina	Miejsce występowania w organizmie ssaka
Kolagen I	Kolagen fibrylarny	Skóra, kości, więzadła, ścięgna, rogówka
Kolagen II	Kolagen fibrylarny	Chrzątka, ciało szkliste
Kolagen III	Kolagen fibrylarny	Skóra, naczynia, macica, jelito
Kolagen IV	Kolagen niefibrylarny/ kolagen błony podstawnej	Błony podstawne (także w skórze)
Kolagen V	Kolagen fibrylarny	Skóra, kości, rogówka, łożysko
Kolagen VI	Kolagen niefibrylarny/ kolagen tworzący mikrowłókna	Skóra, naczynia, kości, rogówka, chrzątka
Kolagen VII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen kotwiczący	Skóra, śluzówka, pępowina, owodnia, pęcherz
Kolagen VIII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe	Skóra, mózg, serce, nerki, naczynia, kości, chrzątka
Kolagen IX	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Chrzątka, rogówka, ciało szkliste
Kolagen X	Kolagen niefibrylarny/ kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe	Chrzątka
Kolagen XI	Kolagen fibrylarny	Chrzątka, ciało szkliste
Kolagen XII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Skóra, chrzątka, ścięgna
Kolagen XIII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen zawierający domeny transbłonowe MACITs	Skóra, mięśnie szkieletowe, oko
Kolagen XIV	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Skóra, naczynia, nerwy, oko, ścięgna, chrzątka, kości
Kolagen XV	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu MULTIPLE-XINs	Skóra, łożysko, nerka, serce, naczynia

Kolagen XVI	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Skóra, mięśnie gładkie, serce, nerki
Kolagen XVII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen zawierający domeny transbłonowe MACITs	Skóra
Kolagen XVIII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu MULTIPLE- XINs	Wątroba, nerki, płuca
Kolagen XIX	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Skóra, błony podstawne mięśni szkieletowych, nerki, wątroba, prostata, łożysko
Kolagen XX	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Rogówka
Kolagen XXI	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Serce, naczynia, nerki, łożysko, mięśnie szkiele- towe
Kolagen XXII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Połączenia tkankowe
Kolagen XXIII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen zawierający domeny transbłonowe MACITs	Serce, siatkówka
Kolagen XXIV	Kolagen fibrylarny	Kości, rogówka
Kolagen XXV	Kolagen niefibrylarny/ kolagen zawierający domeny transbłonowe MACITs	Serce, mózg, oko, jądra
Kolagen XXVI	Kolagen niefibrylarny/ kolagen typu FACITs	Jajniki, jądra
Kolagen XXVII	Kolagen fibrylarny	Chrzątka
Kolagen XXVIII	Kolagen niefibrylarny/ kolagen tworzący mi- krowłókna	Neurony
Kolagen XXIX	Kolagen niefibrylarny/ kolagen tworzący mi- krowłókna	Skóra

Źródło: Brinckmann J., Notbohm H., Müller P. K., Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly, Spinger, Berlin, New York 2005.

Piśmiennictwo

1. Solomon E. P., Berg L. R., Martin D. W. *Biologia*. MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2007.
2. Żelaszczyk D, Waszkielewicz A., Marona H. Kolagen – struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetol Med. Kosmetol* 2012; 2(1): 14-20.
3. Rodwell V. W. Budowa oraz funkcje białek i enzymów. (w) *Biochemia Harpera*, Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 35-70.
4. Wybór W. Zaborski M. Budowa i właściwości kolagenu oraz żelatyny. *Polimery* 2000; 45(1): 10-21.
5. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(1): a004978.
6. Czubak K. A., Żbikowska H.M. Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów, *Annales Academiae Medicae Silesiensis* 2014; 68(4): 245-254.
7. Banaś M, Pietrucha K. Typy i struktura białka kolagenowego. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej. Technologia i Chemia Spożywcza*, 2009; 73: 93-103.
8. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, et al. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996; 316 (1): 1-11.
9. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens – structure, function and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(12): 1531-1546.
10. Witkiewicz W, Gnus J, Hauzer W. i wsp. Charakterystyka właściwości biomedycznych ścian aorty brzusznej. *Acta Angiol* 2007; 13(3): 122-129.

11. Desiraju GR, Steiner T. The weak hydrogen bond: In Structural Chemistry and Biology. Oxford University Press 2001.
12. Gauza M, Kubisz L, Przybylski J. Właściwości preparatów kolagenowych ze skór ryb pozyskiwanych metodą kwaśnej hydratacji. *Nowiny Lekarskie* 2010; 79(3): 157-162.
13. Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK. Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly. Springer, Berlin, New York 2005.
14. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929-958.
15. Fratzl P. Collagen. Structure and Mechanics. Springer, New York 2008.
16. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, et al. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 2004; 279(51): 53331-53337.
17. Baticzko SA, Liedzjewirow AM. Kolagen. Nowa strategia zachowania zdrowia i przedłużenia młodości. Wyd. Kejtii, Koleczkowo 2010: 44-53.
18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, et al. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York 2008.
19. Granner DK. Synteza białek i kod genetyczny. (w) *Biochemia Harpera*, Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell V. W. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 491-507.
20. Kivirikko KI, Myllyla R, Pihlajaniemi T. Hydroxylation of proline and lysine residues in collagens and other animal and plant proteins. (w) *Post-Translational Modifications of Proteins*. Harding JJ, Crabbe MJC, CRC Press: Boca Raton, Florida, 1992: 1-22.
21. Kivirikko KI, Myllyla R. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit, *Matrix Biol* 1998; 16(7): 357-368.

22. Stryer L. *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
23. Luther KB, Hülsmeier AJ, Schegg B, et al. Mimivirus Collagen Is Modified by Bifunctional Lysyl Hydroxylase and Glycosyltransferase Enzyme *J Biol Chem* 2011; 286(51): 43701-43709.
24. Prockop DJ, Sieron AL, Li S. W. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol* 1998; 16(7): 399-408.
25. McKleroy W, Lee TH, Atabai K. Always cleave up your mess: targeting collagen degeneration to treat tissue fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 304(11): 709-721.
26. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 2012; 52: 113-133.
27. Wagenaar-Miller R. A., Engelholm L. H., Gevard J., et al. Complementary Roles of Intracellular and Pericellular Collagen Degradation Pathways In Vivo. *Mol Cell Biol* 2007; 27(18): 6309-6322.
28. Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Zoch-Zwierz W, i wsp. Rola metaloproteinaz (MMP) i ich tkankowych inhibitorów (TIMP) w nefrologii. *Przegl Lek* 2009; 66(9): 485-490.
29. Lipka D, Boratyński J. Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Hig Med Dosw* 2008; 62: 328-336.
30. Kuna J, Kuna A, Dziedzic M, i wsp. Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w mechanizmach uszkodzeń narządowych w przebiegu sepsy. *Diagn Lab* 2015; 51(2): 131-138.
31. Śliwowska I, Kopczyński Z. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczenia u chorych na raka piersi. *Współ Onkol* 2005; 9(8): 327-335.

32. Wysocka A, Giziński S, Lechowski R. Metaloproteinazy macierzy – ich struktura oraz znaczenie. *Życie Weterynaryjne* 2014; 89(3): 223-227.
33. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth A. Elastic fibers. *J Cell Sci* 2002; 115(14): 2817-2828.
34. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 1998; 258: 1-18.
35. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(2): 261-272.
36. Rodwell VW, Murray RK, Keetey FW. Białka kurczliwe i strukturalne (w) *Biochemia Harpera*, Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell V. W. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 794-817.
37. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123 (24): 4195-4200.
38. Lu P, Takai K, Weaver VM, et al. Extracellular Matrix Degradation and remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(12): a005058.
39. Rosenbloom J, Abrams WR. Elastin and the Microfibrillar Apparatus (in) *Connective Tissue And Its Heritable Disorders. Molecular, Genetic, And Medical Aspects*. Royce PM, Steinmann B, Wiley-Liss, Inc., New York 2002: 249-270.
40. Codriansky KA, Quintanilla-Dieck MJ, Gan S., et al. Intracellular degradation of elastin by cathepsin K in skin fibroblast – a possible role in photoaging. *Photochem Photobiol* 2009; 85(6): 1356-1363.
41. Olek-Hrab K, Hawrylak A, Czarnecka-Operacz M. Wybrane zagadnienia z zakresu starzenia się skóry. *Post Dermatol Alergol* 2008; XXV(5): 226-234.

42. Rotsztein H. Procesy starzenia skóry nasilające się w okresie menopauzy. *Prz Menopauz* 2004; 3: 63-65.

43. Pełka M, Broniarczyk-Dyła G. Wpływ menopauzy na strukturę i procesy fizjologiczne skóry. *Prz Menopauz* 2008; 6: 319-322.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Monika Morąg

Spółeczna Akademia Nauk

ul. Łucka 11, 00-842 Warszawa

e-mail: mmorag@spoleczna.pl

tel. +48 501 033 306



Halitoza – etiologia, metody diagnostyki i leczenie

Halitosis – etiology, methods of diagnosis and treatment

Anna Pieniążek¹, Mariusz Pietrzak²

¹ Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

¹ Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, Lodz

² MAR-DENT, Kuciny 16, 99-205 Dalików

² MAR-DENT, Kuciny 16, 99-205 Dalikow

Abstract

Halitosis, bad breath or oral malodour all are the synonyms for the same pathology. The definition includes the presence of halitosis bad breath associated with the presence of various chemical compounds (mainly volatile sulfur compounds) in exhaled air from the mouth. The present study characterized the causes of halitosis with particular regard the various compounds produced in the mouth.

Furthermore it has been characterized the most commonly used diagnostic methods for identification of bad breath. The paper describes organoleptic and halimetric method, gas chromatography, BANA test, determination of β -galactosidase activity, saliva incubation test, measuring of ammonia concentration and the ninhydrin method.

In the description of halitosis treatment the most attention has been focused on chemicals aiming to masking and/or reducing bad breath. The paper characterized chemical and mechanical methods of reducing the level of microorganisms colonizing mouth and provides some examples of uses herbs in preventing the formation of bad breath.

Key wards

halitosis, diagnostics methods of halitosis, treatment of halitosis, chemical compounds responsible for halitosis

Streszczenie

Halitoza, nieświeży oddech, cuchnący oddech i wiele podobnych zwrotów są synonimami tego samego stanu patologicznego. Definicja halitozy obejmuje występowanie nieprzyjemnego zapachu z ust związanego z obecnością różnych związków chemicznych (przede wszystkim lotnych związków siarki) w powietrzu wydychanym z ust.

W niniejszej pracy opisano przyczyny powstawania halitozy ze szczególnym uwzględnieniem różnych związków chemicznych powstających w jamie ustnej. Ponadto scharakteryzowano najczęściej stosowane metody diagnostyczne wykorzystywane do identyfikacji nieświeżego oddechu. Opisano metodę organoleptyczną, halimetryczną, chromatografię gazową, test BANA, oznaczanie aktywności β -galaktozydazy, test z inkubacją śliny, pomiar stężenia amoniaku oraz metodę ninhydrynową.

W opisie terapii halitozy największą uwagę skupiono na związkach chemicznych maskujących i/lub redukujących nieprzyjemny zapach z ust. Scharakteryzowano chemiczną i mechaniczną metodę redukcji poziomu mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną oraz przedstawiono przykłady zastosowania ziół w zapobieganiu powstawania nieświeżego oddechu.

Słowa kluczowe

halitoza, metody diagnostyki halitozy, metody leczenia halitozy, związki chemiczne odpowiedzialne za halitozę

1. Wstęp

Stan chorobowy związany z obecnością nieprzyjemnego zapachu z ust, znany w medycynie pod nazwą halitoza, to problem dotyczący ludzi różnych środowisk niezależnie od płci. W łacinie istnieje kilka innych terminów odpowiadających halitozie m.in. *bromopnoe*, *bromopnoea*, *fetor ex ore*. W latach 20. ubiegłego stulecia na potrzeby kampanii reklamowej płynu do dezynfekcji jamy ustnej wprowadzono pojęcie halitozy [1]. Z czasem termin ten został przyjęty w medycynie do określenia stanu chorobowego związanego z występowaniem nieprzyjemnego zapachu z jamy ustnej. Obecnie halitoza znana jest dość powszechnie za sprawą mediów, które reklamują preparaty zapobiegające lub maskujące nieświeży oddech.

Historia medycyny opisuje problem występowania nieprzyjemnego zapachu z ust od niepamiętnych czasów. Hipokrates (460 r. p.n.e. – 377 r. p.n.e) w celu odświeżenia oddechu zalecał płukanie ust ziołami, winem, żucie anyżku lub nasion kopru [2, 3]. W początkach chrześcijaństwa za grzeszne uważano osoby z cuchnącym oddechem, a zapach siarki w średniowieczu kojarzony był z diabłem. W Księdze Hioba można znaleźć cytaty, w którym opisano stosunek społeczeństwa do osób z nieprzyjemnym zapachem z ust: „żonie mój oddech niemiły i cuchnę własnym dzieciom” [19, 17]. Prawo talmudyczne pozwalało na rozwód z kobietą, której oddech był nieprzyjemny. Ponadto prawo to zabraniało odprawiania nabożeństw przez kapłanów, których oddech był nieświeży [5]. W hinduizmie usta są „drzwiami wejściowymi” do ciała i z tego powodu utrzymanie ich w czystości jest bardzo ważne. Również w buddyzmie powszechnie zalecane było oczyszczenie ust przez modlitwą [3].

Występowanie halitozy może skutkować negatywnymi relacjami w stosunkach społecznych i prowadzić do różnych zaburzeń afektywnych, a niekiedy nawet do izolacji społecznej.

2. Halitoza

Definicja halitozy obejmuje występowanie nieprzyjemnego zapachu z ust związanego najczęściej z obecnością w wydychanym powietrzu lotnych związków siarki.

Międzynarodowe Towarzystwo ds. Badania Odoru Oddechowego charakteryzuje trzy główne typy tej choroby: halitozę prawdziwą, pseudohalitozę i halitofobię (Rys. 1).



Rysunek 1. Klasyfikacja halitozy wg Murata i wsp. [4]

Figure 1. The classification of halitosis by Murata et al. [4]

Halitoza prawdziwa (fizjologiczna i patologiczna) cechuje się obecnością nieświeżego oddechu wyczuwalnego zarówno przez osobę nim dotkniętą, jak i ludzi znajdujących się w jej towarzystwie. Fizjologicznymi przyczynami nieświeżego oddechu są najczęściej procesy gnilne resztek pokarmów zachodzące w jamie ustnej. Ten typ halitozy stanowi mniej więcej 90% wszystkich przypadków. Wynika to prawdopodobnie ze wzmożonej aktywności metabolicznej bakterii zasiedlających jamę ustną [6]. Z kolei podstawą halitozy patologicznej są najczęściej zaburzenia prawidłowych funkcji tkanek jamy ustnej. Jej przyczynami są przede wszystkim choroby przyzębia lub próchnica. Zaburzenia prawidłowej funkcji nerek lub wątroby mogą być przyczyną halitozy patologicznej pochodzenia pozaustnego [6].

Pseudohalitozę charakteryzuje stan, w którym pacjent uskarża się na występowanie nieprzyjemnego zapachu, który jednak nie jest wyczuwalny dla osób trzecich. Halitofobia jest z kolei stanem, w którym pacjent poddany wcześniej leczeniu halitozy prawdziwej jest obsesyjnie przekonany, że nadal ma nieprzyjemny oddech pomimo jakichkolwiek realnych dowodów.

Szacuje się, że występowanie przykrego zapachu z ust jest trzecim co do częstości powodem wizyty w gabinecie stomatologicznym zaraz po próchnicy i chorobach przyzębia [7]. Dane literaturowe wskazują, że częstość występowania nieświeżego oddechu dotyczy nawet 60% populacji światowej [7, 8]. Ponadto wykazano, że problem ten częściej dotyczy osób powyżej 60. roku życia. Ponadto stwierdzono, że problemy z zapachem z ust częściej dotyczą mężczyzn niż kobiet [9]. Różnice te, jak wyka-

zały badania ankietowe, wynikają przede wszystkim z większej staranności w utrzymaniu prawidłowej higieny jamy ustnej wśród kobiet [9].

3. Etiologia halitozy

Jak napisano wcześniej, to problemy stomatologiczne mają największy udział w powstawaniu nieprzyjemnego zapachu z ust. Coraz większe znaczenie w etiologii halitozy przypisuje się powstawaniu nalotu na języku. Osad tworzony jest przede wszystkim przez złączające się komórki nabłonka, resztki pokarmowe, białka śliny, kawę, herbatę, nikotynę oraz bakterie. Wszystkie wymienione czynniki są źródłem procesów gnilnych i częstą przyczyną przykrego zapachu z ust [10]. Aktywacja procesów gnilnych zależy w dużej mierze od stopnia higieny jamy ustnej. Bornstein i wsp. wykazali korelację pomiędzy obecnością nalotu na języku a halitozą [11]. Jak sugerują doniesienia literaturowe, występowanie kamienia nazębnego, przewlekłe zapalenie przyzębia, próchnica oraz przewlekłe infekcje nosowo-gardłowe w tym zapalenie migdałków również mają niebagatelne znaczenie w powstawaniu nieprzyjemnego zapachu [12, 13, 14].

Powstawanie nieświeżego oddechu może mieć różne podłoże w zależności od czynników indukujących jej powstawanie. Lee i wsp. przedstawili klasyfikację i etiologię halitozy wynikającą z miejsca jej powstawania [8] (Tab. 1).

Tabela 1. Klasyfikacja i etiologia halitozy wg Lee i wsp. [2]

Table 1. Classification and etiology of halitosis by Lee et al. [2]

Przyczyny egzogenne (charakteryzujące halitozę prawdziwą) <ul style="list-style-type: none"> nieświeży oddech spowodowany spożywaniem surowej cebuli, czosnku, przypraw, produktów mlecznych, pićem alkoholu, paleniem tytoniu, nieświeży oddech występujący rano po przebudzeniu.
Przyczyny endogenne (charakteryzujące halitozę prawdziwą) <ul style="list-style-type: none"> wynikające z procesów trawiennych zachodzących w jamie ustnej, wynikające z terapii farmakologicznej, wynikające z różnych chorób organizmu.
Przyczyny psychiczne <ul style="list-style-type: none"> pseudohalitoza (pacjent odczuwa u siebie nieświeży oddech, ale nie jest on wyczuwalny dla innych), halitofobia (przesadna obawa przed nieświeżym oddechem).

Przyczyny powstawania nieświeżego oddechu znajdują się, jak już wcześniej wspomniano, nie tylko w jamie ustnej. Problem nieświeżego oddechu może powstawać w konsekwencji wielu pozornie niemających związku dolegliwości ogólnoustrojowych. W tabeli 2 przedstawiono listę niektórych ogólnoustrojowych przyczyn sprzyjających powstawaniu halitozy [8].

Tabela 2. Ogólnoustrojowe przyczyny halitozy wg Lee i wsp. [2]

Table 2. Systemic causes of halitosis by Lee et al. [2]

Ogólnoustrojowe przyczyny nieświeżego oddechu
<ul style="list-style-type: none"> • wysoka gorączka • infekcja górnych dróg oddechowych • infekcja bakteriami <i>Helicobacter pylori</i> • infekcja uchyłka gardłowo-przełykowego • refluks żołądkowo-przełykowy • zwężenie lub obliteracja w odźwierniku dwunastnicy • niewydolność wątroby (<i>hepaticus fetor</i>) • niewydolność nerek (końcowe stadium) • cukrzycowa kwasica ketonowa • białaczka • trimethylaminuria – TMAU (zespół zepsutej ryby) • hypermethioninaemia – MET (zaburzenia metabolizmu aminokwasów) • menstruacja

4. Bakterie odpowiedzialne za halitozę

Największym siedliskiem bakterii w jamie ustnej jest błona śluzowa trzonu języka. Jak wynika z doniesień naukowych, bakterie zasiedlające tylną część języka mają szczególny udział w wytwarzaniu substancji zapachowych [14, 15]. W tabeli 3 przedstawiono wybrane gatunki bakterii odpowiedzialne za powstawanie lotnych związków siarki w jamie ustnej.

Z badań naukowych wynika, że przykry zapach w 90% przypadków wywoływany jest przez czynne proteolitycznie beztlenowe bakterie Gram-ujemne [12, 15]. Wszystkie wymienione w tabeli 3 bakterie metabolizują wolne aminokwasy z wytworzeniem lotnych związków siarki.

Tabela 3. Bakterie odpowiedzialne za powstawanie lotnych związków siarki na podstawie Bruziewicz-Mikłaszewska i wsp. [16].

Table 3. The bacteria responsible for the formation of volatile sulfur compounds according to Bruziewicz-Mikłaszewska et al. [16].

H_2S z cysteiny	CH_3SH z metioniny	H_2S z surowicy	CH_3SH z surowicy
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peptostreptococcus anaerobicus</i> • <i>M. prevotii</i> • <i>Eubacterium limosum</i> • <i>Bacteroides</i> spp. • <i>Centipedia periodontii</i> • <i>Selenomonas artermidis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusobacterium nucleatum</i> • <i>Fusobacterium periodonticum</i> • <i>Eubacterium</i> spp. • <i>Bacteroides</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Prevotella intermedia</i> • <i>Prevotella loeschii</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Treponema denticola</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Treponema denticola</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Porphyromonas endodontalis</i>

5. Związki chemiczne odpowiedzialne za halitozę

Badania dotyczące halitozy wykazały, że może się do niej przyczyniać ok. 600 związków chemicznych. Niemniej tylko kilkanaście z nich odgrywa kluczową rolę w powstawaniu nieświeżego oddechu (Tab. 4). Odczucie zapachu, jaki towarzyszy każdemu z tych związków, jest zależne między innymi od stężenia, a jego ocena jest subiektywna. Woń towarzysząca niskim stężeniom może być obojętna, a w niektórych wypadkach nawet przyjemna. Z kolei w wysokich stężeniach te same związki mogą się charakteryzować nieprzyjemnym, cuchnącym fetorem. W tabeli 4 przedstawiono podział związków chemicznych mających największy udział w powstawaniu nieświeżego oddechu [17].

Tabela 4. Lotne związki przyczyniające się do powstawania przykrego zapachu z ust w oparciu Bollen i Beikler [16]

Table 4. The volatile compounds that contribute to make the formation of malodour based on Bollen i Beikler [16]

Kategoria	Związek
lotne związki siarki (LZS)	merkaptan metylowy: CH_3SH siarkowodór: H_2S siarczek metylu: $(\text{CH}_3)_2\text{S}$
aminy	putrescyna: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ kadaweryna: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ trimetyloamina: $\text{N}(\text{CH}_3)_3$
krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	kw. masłowy: $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}$ kw. walerianowy: $\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}$ kw. propionowy: $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$
pochodne fenylu	indole: $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}$ skatole: $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}$ pirydyny: $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$
alkohole	1-propoksy-2-propanol
związki azotowe	mocznik: $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ amoniak: NH_3
ciała ketonowe	aceton: $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ kw. acetylooctowy: $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ kw. β -hydroksymasłowy: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$

Lotne związki siarki

Lotne związki siarki charakteryzuje niska masa cząsteczkowa oraz obecność atomu siarki w strukturze. Ich woń najczęściej charakteryzowana jest jako zapach gotowanej kapusty, zgniłych jaj czy nawet kału [18]. Siarkowódor powstaje w organizmie podczas metabolizmu cysteiny i metioniny w procesach enzymatycznych. Redukcja łańcuchów bocznych tych aminokwasów przy udziale β -syntazy cystationinowej oraz liazy beta-cystationinowej może prowadzić do powstania siarkowodoru i merkaptanu metylowego. Mimo że stężenia powstającego siarkowodoru w organizmie nie przekraczają wartości mikromolarnych, to jego woń jest bardzo intensywna. Z drugiej strony wykazano, że siarkowódor może mieć właściwości przeciwutleniające i kardioprotekcyjne, rozszerzające naczynia krwionośne [19]. Z kolei inne badania wykazały, że siarkowódor poprzez oddziaływanie z neurotransmiterami w mózgu przyczynia się do uczucia zmęczenia, osłabienia pamięci oraz występowania zawrotów głowy [20].

Aminy

W wyniku dekarboksylacji lizyny i ornityny powstają w organizmie kadmeryna i putrescyna. Obie diaminy charakteryzują się silnie nieprzyjemnym zapachem często kojarzonym z wonią rozkładających się zwłok [13].

Nieco odmienną budową chemiczną charakteryzuje się trimetyloamina powstająca w przemianach metabolicznych choline. W organizmie osób z trimetyloaminurią obserwuje się podwyższone stężenie trimetyloaminy (TMA). Zapach towarzyszący powstawaniu tego związku określany jest mianem „zespołu odoru rybnego” [15, 21].

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe zawierają nie więcej niż osiem atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym. Oprócz naturalnego występowania w organizmie mogą one również powstawać w procesach metabolicznych lipidów. Za nieświeży oddech odpowiedzialne są głównie kwasy: propionowy, masłowy oraz walerianowy. Zapach tych związków przypomina woń psujących się tłuszczów, np. zjełzłego masła.

Pochodne fenylu

Produktami metabolizmu tryptofanu w organizmie mogą być związki zwane indolami lub skatolami. Z chemicznego punktu widzenia są to

pochodne fenylu, których zapach przypomina brudną toaletę. Jednym z takich związków jest pirydyna naturalnie występująca w kościach. Pierścień pirydynowy występuje między innymi w budowie witamin PP i B6 oraz innych związków organicznych. Podwyższony poziom pirydyny obserwuje się u osób z chorobami przyzębia. Jej specyficzny kwaśny zapach może powodować bóle głowy, nudności i wymioty.

Ciała ketonowe

Do najczęściej występujących ciał ketonowych należą aceton, kwas acetylooctowy i kwas β -hydroksymaśtowy. Zapach tych związków kojarzy się z wonią wydzielaną przez sfermentowane owoce. Ciała ketonowe są produktami utleniania kwasów tłuszczowych powstającymi alternatywnie w stosunku do produktów β -oksydacji podczas metabolizmu lipidów.

Związki azotowe

Nadmiar azotu z organizmu usuwany jest przede wszystkim przez nerki w postaci mocznika. Azot w organizmie pochodzi przede wszystkim z przemian metabolicznych aminokwasów oraz rozkładu zasad pirymidynowych do amoniaku i dwutlenku węgla. Mikrobiologiczne ureazy mają zdolność hydrolizy mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Podwyższony poziom amoniaku w organizmie może skutkować wydalaniem go poprzez skórę z potem oraz jamę ustną i przyczyniać się do powstawania nieświeżego oddechu.

Alkohole

Metaboliczny rozkład spożywanego alkoholu przez dehydrogenazę alkoholową prowadzi do powstawania aldehydu octowego. Nadmiar tego ostatniego przedostaje się do płuc, a następnie wydalanany jest z wydychanym powietrzem. Zapach z ust towarzyszący wydychaniu aldehydu octowego jest najczęściej chwilowy i zanika po jego usunięciu i przywróceniu prawidłowego metabolizmu. Dodatkowo bakterie zasiedlające jamę ustną posiadają metaboliczną zdolność do rozkładu związków alkoholowych, co również może prowadzić do powstania nieprzyjemnego zapachu.

6. Diagnostowanie nieświeżego zapachu z ust

Nieświeży oddech jest dość trudny do diagnozowania, ponieważ większość osób jest słabymi sędziami zapachu własnego oddechu i nie ma świadomości istnienia tego problemu. W chwili obecnej dostępnych jest kilka metod pomiaru substancji lotnych w wydychanym powietrzu, do których należą między innymi: chromatografia gazowa, metoda halimetryczna, test BANA (benzoil-DL-arginino-L-naftylamid) lub inne testy. Najczęściej jednak na początku stosowana jest metoda organoleptyczna polegająca na ocenie zapachu z ust przez lekarza stomatologa. W następnym etapie diagnostyki podejmuje się badania bardziej szczegółowe metodami obiektywnymi.

Metoda organoleptyczna

Najłatwiejszym, choć subiektywnym sposobem diagnozowania nieświeżego oddechu jest metoda organoleptyczna. Polega ona na powolnym wydychaniu powietrza przez pacjenta, najlepiej przez rurkę zapobiegającą rozrzedzeniu się tego powietrza, i ocenie jego zapachu przez badającego eksperta [22]. Bardzo istotnym czynnikiem w tej metodzie jest odległość z jakiej ekspert dokonuje oceny zapachu. Sugeruje się, aby badanie przeprowadzić w odległości ok. 10 cm.

Najczęściej stosowana skala intensywności zapachu wydychanego powietrza została opracowana przez Rosenberg'a [23]. W tabeli 5 przedstawiono system punktowania intensywności zapachu według tej skali.

Tabela 5. Organoleptyczna ocena zapachu wydychanego powietrza na podstawie pracy Rosenberg'a [23]

Table 5. Organoleptic assessment of the smell of exhaled air on the basis of Rosenberg'a [23]

Punkty	Ocena
0	zapach niewyczuwalny
1	zapach ledwie wyczuwalny, na progu wyczuwalności, trudny do określenia
2	nieznaczny, ale wyraźnie wyczuwalny zapach
3	zapach umiarkowany, zdecydowanie wyczuwalny
4	silny nieprzyjemny zapach
5	mocno cuchnący zapach

Chromatografia gazowa

Bardzo dobrą techniką umożliwiającą identyfikację związków chemicznych występujących w wydychanym powietrzu jest chromatografia gazowa. Metoda ta umożliwia dokładne oznaczenie stężenia poszczególnych związków oraz ustalenie ich składu procentowego. Pozwala na identyfikację kilkuset różnych związków, niejednokrotnie wykazujących jedynie niewielkie różnice w budowie chemicznej. Chromatografia gazowa jednak rzadko stosowana w diagnostyce ze względu na wysokie koszty. Większe zastosowanie ma jako metoda badawcza.

Metoda halimetryczna

W badaniach nad halitozą szeroko rozpowszechnioną, szybką i łatwą do analizy jest metoda halimetryczna. Halimetr jest urządzeniem pozwalającym na pomiar stężenia lotnych związków siarki, które mają największy udział w powstawaniu nieświeżego oddechu. Urządzenie to jednak podaje całkowity poziom lotnych związków siarki bez ich identyfikacji. Halimetr ponadto nie rejestruje obecności innych związków odpowiedzialnych za halitozę [21]. Pacjent przed badaniem powinien przez ok. 5 minut oddychać wyłącznie przez nos. Następnie przez rurkę wydycha powietrze z ust, którego skład jest analizowany w detektorze. Natężenie prądu elektrycznego generowanego podczas reakcji elektrochemicznych związków zawierających siarkę jest wprost proporcjonalne do ich stężenia [22, 24]. Wyniki otrzymujemy w jednostkach ppb (*parts per billion*), określających ilość cząsteczek związku chemicznego przypadającą na 1 mld cząsteczek rozpuszczalnika. Jak do tej pory brak wyraźnych wytycznych od producentów halimetrów co do tego, jaką ilość lotnych związków siarki w wydychanym powietrzu należy uznać za halitozę. W publikacjach naukowych jako dolną granicę halitozy przyjęto wartość 75 ppb [14, 25].

Test BANA

Zasiedlające jamę ustną bakterie Gram-ujemne mają zdolność syntezy enzymów odpowiedzialnych za rozkład białek i kwasów tłuszczowych o krótkich łańcuchach węglowodorowych. Wysoki poziom tych bakterii może się przyczyniać do powstawania halitozy. Ich obecność w jamie ustnej można wykrywać pośrednio poprzez oznaczenie obecności enzymów metabolizujących kwasy tłuszczowe w teście BANA (benzoil-DL-argini-

no-L-naftyamid) [22]. Test ten, bardzo łatwy w użyciu, wykonuje się na paskach bibułowych nasączonych substratem dla enzymów. W obecności enzymów paski zmieniają kolor na niebieski. Brak niebieskiego koloru „0” wskazuje na ujemny wynik testu. Słabo dodatni wynik „1” charakteryzuje kolor jasnoniebieski, natomiast wynik zdecydowanie pozytywny „2” charakteryzuje barwa intensywnie niebieska [26]. Słaba reakcja enzymatyczna (ocena 1) odzwierciedla około 10^4 – 10^5 jednostek tworzących kolonie bakteryjne, a silna reakcja enzymatyczna (ocena 2) odzwierciedla około 10^6 lub więcej jednostek tworzących kolonie bakteryjne [26]. Wyniki testu BANA pozytywnie korelują z testem organoleptycznym, natomiast z testem halimetrycznym – zdecydowanie słabiej. Poważną wadą testu BANA jest brak możliwości oceny gatunkowej bakterii [12, 14, 27].

Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy

β -galaktozydaza jest enzymem obecnym w ślinie, odpowiedzialnym za proces deglikacji glikoprotein. Proces deglikacji białek został uznany za jeden z pierwszych etapów powstawania halitozy. Aktywność tego enzymu można łatwo ocenić przy użyciu chromatografii bibułowej z zaabsorbowanym jego substratem. Podobnie jak w wypadku testu BANA powstający produkt reakcji powoduje zmianę barwy bibuły z bezbarwnej na niebieską: 0 – brak zabarwienia; 1 – kolor jasnoniebieski; 2 – ciemnoniebieski kolor paska bibuły [28]. Aktywność tego enzymu jest wprost proporcjonalna do poziomu nieświeżego oddechu.

Test z inkubacją śliny

Inkubacja śliny pacjenta z podejrzeniem halitozy odbywa się w komorze (37°C) zawierającej 80% azotu, 10% dwutlenku węgla i 10% wodoru przez kilka godzin. Następnie oceny zapachu próbki dokonuje doświadczony ekspert [29]. Na wynik tego badania niewielki wpływ mają czynniki zewnętrzne (palenie papierosów, picie kawy, jedzenie czosnku, cebuli, stosowanie intensywnie pachnących kosmetyków), co jest niewątpliwą zaletą tej metody. Test z inkubacją śliny daje bardziej wiarygodne wyniki aniżeli metoda organoleptyczna.

Pomiar stężenia amoniaku

W powstawaniu przykrego zapachu z ust, poza lotnymi związkami siarki, duży udział ma również poziom amoniaku. Jego stężenie w wydychanym

powietrzu mieści się w granicach 50–2000 ppb [30]. Jedną z metod pozwalającą ocenić jego poziom jest analogiczna do testu halimetrycznego. Podczas badania pacjent wydycha powietrze do rurki, a następnie trafia ono do odpowiedniego detektora. Poziom amoniaku produkowanego przez bakterie obecne w jamie ustnej odczytywany jest bezpośrednio z detektora na odpowiednim urządzeniu. Dostępna literatura nie podaje dolnej granicy poziomu amoniaku wskazującej na halitozę.

Metoda ninhydrynowa

Metoda ninhydrynowa pozwala na oznaczenie poziomu amin obecnych w ślinie pacjenta. Bakterie gnilne zasiedlające jamę ustną mają zdolność do hydrolizy wiązań peptydowych w białkach. Powstające wolne aminokwasy mogą ulegać dekarboksylacji, w której wyniku powstają aminy. Oznaczenie poziomu niskocząsteczkowych amin pozwala na określenie halitozy wywołanej obecnością bakterii gnilnych w jamie ustnej [29]. W wyniku reakcji ninhydryny z grupami aminowymi powstają barwne związki. Ich poziom można oznaczyć spektrofotometrycznie. W badaniach dotyczących oceny nieświeżego oddechu zaobserwowano znaczącą korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą ninhydrynową i organoleptyczną [31].

7. Leczenie halitozy

Pierwszym krokiem po zdiagnozowaniu nieprzyjemnego zapachu z ust pacjenta jest opracowanie planu leczenia. Leczenie ma na celu wyeliminowanie przyczyn oraz poprawę stanu jamy ustnej. Sformułowano kilka zasad postępowania podczas leczenia halitozy: 1) dokładna instrukcja higieny jamy ustnej; 2) usuwanie kamienia nazębnego oraz czyszczenie języka; 3) płukanie jamy ustnej; 4) porady dietetyczne; 5) regularne kontrole zapachu z ust.

W leczeniu halitozy najważniejsze jest ustalenie przyczyn oraz ich wyeliminowanie. Podczas leczenia zalecane jest unikanie palenia tytoniu oraz unikanie spożywania pokarmów zawierających składniki odpowiedzialne za nieświeży oddech (czosnek, cebula oraz różnego typu przyprawy itp.).

Produkty maskujące halitozę

Stosowanie dostępnych na rynku produktów maskujących nieświeży oddech nie rozwiązuje problemu halitozy. Produkty służące do maskowania

halitozy zawierają związki o przyjemnym smaku i zapachu, jednak efekt ich działania jest bardzo krótkotrwały. Takie substancje zawierają pasty do zębów, spraye, płyny do płukania ust czy gumy do żucia. Ich stosowanie pozwala wpłynąć na lepsze samopoczucie osoby z nieświeżym oddechem [27].

Mechaniczna redukcja mikroorganizmów i ich substratów

Redukcja ilości mikroorganizmów odpowiedzialnych za halitozę wymaga dużej samodyscypliny pacjenta. Może być ona osiągnięta poprzez regularne spożywanie solidnego śniadania (w celu zwiększenia wydzielania śliny), czyszczenie zębów, języka, używanie wykałaczek i nici dentystycznych oraz regularną opiekę zdrowotną.

Do najpopularniejszych metod stosowanych w higienie jamy ustnej należy mycie zębów. Wykazano, że szczotkowanie zębów i nitkowanie przestrzeni międzyzębowych znacząco się przyczynia do spadku liczby bakterii w jamie ustnej [32]. Od pewnego czasu popularną metodą dbałości o czystość jamy ustnej stało się również czyszczenie języka. Czynność ta ma za zadanie usunięcie z języka potencjalnych substratów procesów gnilnych [33].

Chemiczna redukcja mikroorganizmów

Podstawowym zadaniem chemicznej terapii halitozy jest zredukowanie flory bakteryjnej w jamie ustnej. Najczęściej stosowane do tego celu preparaty powinny zawierać specjalnie opracowane środki farmakologiczne. Należą do nich między innymi: chlorheksydyna, olejki eteryczne, triclosan i chlorek cetylopirydyniowy.

Chlorheksydyna ma bardzo szerokie spektrum działania – wykazuje silny efekt bakterioobójczy w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także dużą skuteczność w eliminowaniu zakażeń grzybiczych. Stosowana jest najczęściej w postaci glukonianu lub octanu.

W leczeniu halitozy stosowane są również olejki eteryczne w postaci roztworów wodno-alkoholowych. W płynach do płukania ust stosuje się między innymi: tymol, mentol, eukaliptol oraz salicylan metylu. Związki te mają działanie bakterioobójcze, szczególnie w stosunku do bakterii Gram-ujemnych.

Składnikiem wielu dostępnych past do zębów jest triklosan. Jest on związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach o bardzo dużej aktywności antibakteryjnej w stosunku do bakterii Gram-ujemnych [34].

Chlorek cetylopirydyniowy jest czwartorzędowym związkami amoniowym o silnym działaniu antybakteryjnym. Przeprowadzone badania wykazały, że codzienne płukanie jamy ustnej dwufazowym płynem zawierającym chlorek cetylopirydyniowy zmniejsza występowanie przykrego zapachu z ust w ciągu 6-tygodniowego okresu terapii w porównaniu z wynikami otrzymanymi po zastosowaniu płynu niezawierającego chlorku cetylopirydyniowego [35].

Poza opisanymi dotąd istnieje również cały szereg innych związków chemicznych mających działanie bakteriobójcze. Wśród najbardziej obiecujących i znajdujących zastosowanie w redukcji mikroorganizmów znajdują się: trifluorometionina oraz kwas dehydroaskorbinowy [27,36]. Trifluorometionina hamuje wzrost bakterii *Porphyromonas gingivalis* odpowiedzialnych za powstawanie merkaptanu metylu, natomiast kwas dehydroaskorbinowy wykazuje silne właściwości przeciwutleniające i powoduje spadek poziomu lotnych związków siarki (LZS).

Chemiczna neutralizacja związków odpowiedzialnych za halitozę

Chemiczna neutralizacja nieświeżego oddechu polega głównie na stosowaniu substancji czynnych reagujących z lotnymi związkami siarki lub innymi związkami powodującymi halitozę z wytworzeniem związków bezwonnych. Związki chemiczne zawarte w pastach do zębów, płynach do płukania jamy ustnej, drażetkach mogą spełniać te funkcje. W tych produktach zawarte są różne utleniacze i/lub jony metali. Jony cynku, sodu, cyny czy magnezu bardzo łatwo wchodzi w interakcję z jonami siarki, co prowadzi do powstania bezwonnych, nierozpuszczalnych siarczków.

Bardzo użyteczne w leczeniu halitozy są sole cynku, które charakteryzują się niską toksycznością, a ponadto nie powodują przebarwień zębów. Wykazano, że zastosowanie 1-proc. roztworu octanu cynku znacząco wpływało na redukcję lotnych związków siarki w jamie ustnej [37]. Ponadto do leczenia halitozy z dużym powodzeniem można zastosować chlorek cynku, cytrynian cynku oraz azotan cynku [38]. W wypadku tego typu terapii dyskomfort powoduje jednak metaliczny posmak, który można neutralizować środkami maskującymi. Obecnie prowadzone badania skupiają się w dużej mierze nad łączeniem różnych związków chemicznych w celu uzyskania ich wielopłaszczyznowego działania, a tym samym większej skuteczności w leczeniu halitozy [27].

W Ameryce Północnej i w Japonii do neutralizacji nieprzyjemnego zapachu z ust stosowany jest wodorowęglanu sodu (soda oczyszczona). Wykazano, że pasty do zębów zawierające powyżej 20% sody znacząco się przyczyniają do obniżenia skutków halitozy [36].

Bardzo silnym utleniaczem o aktywności bakteriobójczej jest nadtlenek wodoru. Reakcja pomiędzy nadtlenkiem wodoru a związkami zawierającymi siarkę powoduje utlenianie tych ostatnich. Wykazano istotny spadek poziomu lotnych związków siarki w grupie 10 wolontariuszy, u których do mycia zębów zastosowano pastę zawierającą 0,67% nadtlenu wodoru i 5,48% wodorowęglanu sodu. Badania te jednak nie wykazały, który ze składników miał większy udział w neutralizacji lotnych związków siarki [27].

Zastosowanie ziół w zapobieganiu powstawania nieprzyjemnego oddechu

Istnieje wiele, mniej lub bardziej skutecznych metod jego łagodzenia lub leczenia nieprzyjemnego zapachu z ust. Wykazano, że żucie liści pieprzu żuwnego (*Piper betel*) może powodować redukcję merkaptanu metylu, ponieważ zawarte w liściach tej rośliny związki fenolowe mają właściwości przeciwbakteryjne [39]. Związki fenolowe takie jak katechiny i resweratrol również wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przez co wpływają na redukcję nieświeżego oddechu. Zarówno katechiny, resweratrol, jak i kwas fitynowy zostały wyekstrahowane między innymi z lukrecji (*Glycyrrhiza lepidota*), kamelii (*Camellia spp.*), akacji (*Acacia catechu*), rdestu (*Polygonum spp.*), miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba*), bodziszku (*Geranium*), lawendy (*Lavandula angustifolia*) i wielu innych roślin [40]. Wiele z tych ekstraktów często staje się składnikiem past do zębów.

8. Podsumowanie

Pomimo szerokich badań dotyczących przyczyn nieświeżego oddechu oraz metod jego leczenia problem ten jest wciąż bardzo aktualny.

W XXI w., gdzie troska o prawidłową higienę jamy ustnej jest nieodłącznym elementem codziennego życia, występowanie halitozy może nieść ze sobą bardzo poważne konsekwencje społeczne prowadzące do wykluczeń środowiskowych, a niekiedy nawet do depresji. Z tego powodu badania skupiające się na przyczynach nieświeżego oddechu oraz metodach zapobiegania mu są ciągle bardzo aktualne i potrzebne w celu podnoszenia komfortu życia pacjentów dotkniętych halitozą.

Piśmiennictwo

1. Odai CD, Azodo CC, Osazuwa-Peters N, Obuekwe ON. Characteristics and treatment outcome of patients with halitosis at a suburban health facility. *Int J Biomed Hlth Sci* 2010;6:181-190.
2. Lee SS, Zhang W, Li Y. Halitosis update: a review of causes, diagnoses, and treatments. *J Calif Dent Assoc* 2007;35:258-8.
3. Elias MS, Ferriani MG. Historical and social aspects of halitosis. *Rev Lat Am Enfermagem* 2006;14:821-3.
4. Murata T, Yamaga T, Iida T, Miyazaki H, Yaegaki K. Classification and examination of halitosis. *Int Dent J* 2002;Suppl 3:181-6.
5. Shifman A, Orenbuch S, Rosenberg M. Bad breath--a major disability according to the Talmud. *Isr Med Assoc J* 2002;4:843-5.
6. Scully C. and Greenman J. Halitosis (breath odor). *Periodontology* 2000, 2008;48:66-75.
7. Paradowska A, Marczewski B, Pawłowska-Cierniak E: Self-perception of halitosis among students of Wrocław Medical University. *Adv Clin Exp Med* 2007;16:543-8.
8. Lee PP, Mak WY, Newsome P. The etiology and treatment of oral halitosis: an update. *Hong Kong Med J* 2004;10:414-8.
9. Almas K, Al-Hawish A, Al-Khamis W. Oral hygiene practices, smoking habit, and self-perceived oral malodor among dental students. *J Contemp Dent Pract* 2003;4:77-90.
10. Kislig K, Wilder-Smith CH, Bornstein MM, Lussi A, Seemann R. Halitosis and tongue coating in patients with erosive gastroesophageal reflux disease versus nonerosive gastroesophageal reflux disease. *Clin Oral Investig* 2013;17:159-65.

11. Bornstein MM, Kislig K, Hoti BB, Seemann R, Lussi A. Prevalence of halitosis in the population of the city of Bern, Switzerland: a study comparing self-reported and clinical data. *Eur J Oral Sci* 2009;117:261-7.
12. Porter SR, Scully C. Oral malodour (halitosis). *BMJ*. 2006;333:632-5.
13. Sroczyk Ł, Kawala B. Halitoza – przegląd piśmiennictwa. *Dent Med Probl* 2011;48:255–60.
14. Rosing CK, Loesche W. Halitosis: an overview of epidemiology, etiology and clinical management. *Braz Oral Res* 2011;25:466-71.
15. Braksator M, Paradowski L. Halitoza – etiologia, diagnostyka i leczenie. *Gastroenterologia Polska* 2009;16:239-243.
16. Bruziewicz-Mikłaszewska B, Urbanowicz I, Owczarek H. Microbiological aspects of halitosis. *Dent Med Probl* 2003;40:117–20.
17. Bollen CML, Beikler T. Halitosis: the multidisciplinary approach. *Int J Oral Sci* 2012;4:55-63.
18. Chomyszyn-Gajewska M. Współczesne poglądy na temat etiologii i patogenezы halitozy. *Przeł Lek* 2012;69:1293-6.
19. Lefer DJ. A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:17907-8.
20. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16:1066-71.
21. Scully C, Greenman J. Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). *Oral Dis*. 2012;18:333-45.
22. Mrówka-Kata K, Namysłowski G, Czecior E, Banert K, Scierski W. Cuchnienie z ust. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2008;2:208–11.

23. Rosenberg M. Clinical assessment of bad breath: current concepts. *J Am Dent Assoc* 1996;127:475-82.
24. van den Broek AM, Feenstra L, de Baat C. A review of the current literature on aetiology and measurement methods of halitosis. *J Dent* 2007;35:627-35.
25. Iwanicka-Grzegorek E, Michalik J, Kepa J, Wierzbicka M, Aleksinski M, Pierzynowska E. Subjective patients opinion and evaluation of halitosis using halimeter and organoleptic scores. *Oral. Dis.* 2005;11:86-8.
26. Andrade JA, Feres M, Figueiredo LC, Salvador SL, Cortelli SC. The ability of the BANA Test to detect different levels of *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia*. *Braz Oral Res* 2010;24:224-30.
27. van den Broek AM, Feenstra L, de Baat C. A review of the current literature on management of halitosis. *Oral Dis* 2008;14:30-9.
28. Yoneda M, Masuo Y, Suzuki N, Iwamoto T, Hirofuji T. Relationship between the β -galactosidase activity in saliva and parameters associated with oral malodor. *J Breath Res* 2010;4:017108.
29. Aylıkci BU, Colak H. Halitosis: From diagnosis to management. *J Nat Sci Biol Med* 2013;4:14-23.
30. Aguilar AD, Forzani ES, Nagahara LA, Amlani I, Tsui R, Tao NJ. A breath ammonia sensor based on conducting polymer nanojunctions. *IEEE Sensors Journal* 2008;8: 269-73.
31. Iwanicka-Grzegorek K, Lipkowska E, Kepa J, Michalik J, Wierzbicka M. Comparison of ninhydrin method of detecting amine compounds with other methods of halitosis detection. *Oral Dis* 2005;11:37-9.
32. Tanaka M, Anguri H, Nishida N, Ojima M, Nagata H, Shizukuishi S. Reliability of clinical parameters for predicting the outcome of oral malodor treatment. *J Dent Res* 2003;82:518-22.

33. Quirynen M, Avontroodt P, Soers C, Zhao H, Pauwels M, van Steenberghe D. Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *J Clin Periodontol*. 2004;31:506-10.
34. Brading MG, Cromwell VJ, Green AK, DeBrabander S, Beasley T, Marsh PD. The role of Triclosan in dentifrice formulations, with particular reference to a new 0.3% Triclosan calcium carbonate-based system. *Int Dent J* 2004;54:291-8.
35. Kozlovsky A, Goldberg S, Natour I, Rogatky-Gat A, Gelernter I, Rosenberg M. Efficacy of a 2-phase oil: water mouthrinse in controlling oral malodor, gingivitis, and plaque. *J Periodontol* 1996;67:577-82.
36. Lourith N, Kanlayavattanakul M. Oral malodour and active ingredients for treatment. *Int J Cosmet Sci*. 2010;32:321-9.
37. Young A, Jonski G, Rölla G. Inhibition of orally produced volatile sulfur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride-effect of concentration. *Eur J Oral Sci* 2003;111:400-4.
38. Kleinberg I, Codipilly DM. Cysteine challenge testing: a powerful tool for examining oral malodour processes and treatments in vivo. *Int Dent J* 2002;52:221-8.
39. Ramji N, Ramji N, Iyer R, Chandrasekaran S. Phenolic antibacterials from Piper betle in the prevention of halitosis. *J Ethnopharmacol* 2002;83:149-52.
40. Sterer N, Nuas S, Mizrahi B, Goldenberg C, Weiss EI, Domb A, Davidi MP. Oral malodor reduction by a palatal mucoadhesive tablet containing herbal formulation. *J Dent* 2008;36:535-9.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Anna Pieniżek

Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

e-mail: anna.pieniazek@biol.uni.lodz.pl

tel: 42 635 44 10

CC-BY-SA 3.0 PL