

Załącznik 2

Autoreferat

(opis osiągnięcia naukowego i dorobku)

Dr Agnieszka Torzewska

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

2015

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Torzewska
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne- z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.
 - dyplom doktora biologii w zakresie biologii, 2001, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, praca nt: „Polisacharydy O-swoiste *Proteus vulgaris* – swoistość serologiczna i znaczenie w powstawaniu kamieni moczowych”
 - dyplom magistra biologii w specjalności mikrobiologia, 1997, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, praca nt:” Warunki działania chemotaktycznego FMLP i estru metylowego FMLP na migrację makrofagów myszy C57BL/6”
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:
 - adiunkt, Zakład Immunobiologii Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki- od 2001 r. do chwili obecnej
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.):

Tytuł osiągnięcia naukowego:

”Mechanizm powstawania i czynniki wpływające na rozwój kamicy moczowej w wyniku zakażenia *Proteus mirabilis*”

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Prywer J., **Torzewska A.**: Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. Cryst. Res. Technol. 2010, 45, 1283-1289
2. Prywer J., **Torzewska A.**, Płociński T.: Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus mirabilis*. Urol. Res. 2012, 40, 699-707
3. Prywer J., **Torzewska A.**: Effect of curcumin against *Proteus mirabilis* during crystallization of struvite from artificial urine. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012, no 862794, 1-7
4. **Torzewska A.**, Różalski A.: *In vitro* studies on the role of glycosaminoglycans in crystallization intensity during infectious urinary stones formation. APMIS, 2014, 122, 505–511

5. **Torzewska A.**, Różalski A.: Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. *Microbiol. Res.*, 2014, 169, 579-584
6. **Torzewska A.**, Budzyńska A., Białczak-Kokot M., Różalski A. *In vitro* studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microb. Pathogenesis*, 2014, 71-72, 25-31
7. **Torzewska A.**, Różalski A. Various intensity of *Proteus mirabilis*-induced crystallization resulting from the changes in the mineral composition of urine. *Acta Biochim. Pol.*, 2015, 62, 127-132

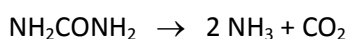
Dane bibliometryczne ww. publikacji (IF, pkt. MNIŚZW) zamieszczono w Załączniku 3. Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac w Załączniku 5

I. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

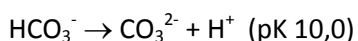
I.1 . Wprowadzenie

Za rozwój kamicy moczowej odpowiada wiele czynników takich jak: nieprawidłowa dieta, warunki środowiska, rasa, nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu dróg moczowych, zaburzenia metaboliczne, otyłość oraz infekcje bakteryjne (Knoll i wsp., 2010). Kamienie powstające w wyniku zakażeń dróg moczowych stanowią 10-15% wszystkich kamieni moczowych. Od innych kamieni moczowych odróżnia je skład chemiczny, gdyż są one zbudowane z fosforanu amonowo-magnezowego (struwitu) oraz węglanu fosforowo wapniowego (węglanu apatytu) oraz szybki czas wzrostu – nawet 4-6 tygodnie są wystarczające do ich wykształcenia. Pomimo małej częstości ich występowania, infekcyjna kamica moczowa stanowi poważny problem zdrowotny ze względu na bardzo wysoką nawrotowość (50%) i przewlekłość. Drobnoustrojami najczęściej powodującymi rozwój infekcyjnej kamicy moczowej są: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* oraz *Ureaplasma urealyticum* (Bichler i wsp. 2002). Spośród wymienionych bakterii, *P. mirabilis* jest najczęściej izolowany z tego typu kamieni, stanowiąc nawet 70% wszystkich izolatów. *P. mirabilis* to bakterie warunkowo – chorobotwórcze, powodujące głównie zakażenia dróg moczowych u osób z nieprawidłowościami w budowie i funkcjonowaniu układu moczowego, ze słabą odpornością czy też poddanych długotrwałemu cewnikowaniu. Infekcje wywoływane przez *P. mirabilis* są często długotrwałe i trudne do wyleczenia (Różalski i wsp., 1997). Za patogenność tych pałeczek odpowiadają liczne czynniki chorobotwórczości takie jak: ureaza,

proteazy, fimbrie i inne adhezyny, lipopolisacharyd oraz zdolność tych bakterii do intensywnego poruszania się, inwazji komórek gospodarza, czy też tworzenia biofilmu na tkankach i powierzchniach abiotycznych (Różalski i wsp., 2007). Mechanizm tworzenia kamieni moczowych wciąż nie jest do końca poznany. Istnieje kilka teorii pierwszego etapu tego procesu czyli powstawania kryształów, w tym „free particle theory” teoria zakładająca powstawanie kryształów na drodze homogennej nukleacji w przesyconym roztworze soli oraz „fixed particle theory” zakładająca udział w krystalizacji czynników makroorganizmu lub bakterii (Evan i wsp., 2010). Bakterie to jedne z liczniejszych grup organizmów które biorą udział w biomineralizacji. Drobnoustroje mogą kontrolować proces krystalizacji jak również indukować ten proces. W przypadku infekcyjnej kamicy moczowej można wnioskować o aktywnym udziale *P. mirabilis* w całym procesie tworzenia kamieni gdyż drobnoustrój ten był obecny zarówno w strefie peryferycznej jak i rdzeniowej kamieni moczowych. Powstawanie kamieni moczowych wiąże się zawsze z krystalizacją bądź wytrącaniem mineralnych składników moczu spowodowane nadmiernym ich stężeniem w stosunku do rozpuszczalności w moczu, a w dalszym etapie następuje agregacja powstałych kryształów, zatrzymanie ich w drogach moczowych i tworzenie coraz to większych złogów. W przypadku infekcyjnej kamicy moczowej za wszystkie procesy odpowiadają bakterie (Torzewska i wsp., 2014b). Za przesylenie moczu i krystalizację mineralnych składników moczu odpowiada bakteryjna ureaza. Nie bez znaczenia jest, to iż 99% szczepów *P. mirabilis* wytwarza ureazę o dużej aktywności. Naturalny moczu ma pH lekko kwaśne (około 5), jest on buforowany przez fosforany i organiczne składniki moczu. W takim pH sole magnezu i wapnia są rozpuszczalne i łatwo wymywane wraz z moczem. W wyniku aktywności ureazy dochodzi do hydrolizy mocznika wg ogólnego równania:



Produkty rozpadu mocznika łącząc się z wodą, tworzą jon amonowy NH_4^+ i anion HCO_3^- . pK następującej reakcji $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ wynosi 9,0 co powoduje, że pH moczu wzrasta. Równocześnie wytwarzają się jony węglanowe w reakcji:



W moczu o odczynie lekko zasadowym większość fosforanów występuje w postaci anionu HPO_4^{2-} zaś jon PO_4^{3-} występuje w takich warunkach w niewielkich ilościach. Alkalizacja moczu i reakcje zachodzące w wyniku hydrolizy mocznika powodują wzrost stężeń jonów: NH_4^+ , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} co w obecności wapnia i magnezu w moczu, nawet w normalnych stężeniach, powoduje precipitację fosforanów tych jonów i sprzyja krystalizacji struwitu ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) i węglanu apatyty ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \times \text{CO}_3$) (Torzewska, 2003). Powstałe kryształy mogą ulegać agregacji wraz z bakteriami lub/i bakteryjnymi polisacharydami, składnikami makroorganizmu uwalnianymi w wyniku reakcji zapalnej w coraz to większe złogi. Bakteryjne polisacharydy mają również wpływ na intensywność krystalizacji

soli mineralnych. Naładowane ujemnie zewnątrzkomórkowe polisacharydy otoczki czy części O-swoistej lipopolisacharydów mogą wiązać kationy wapnia i magnezu. Wpływa to na nagromadzenie kationów budujących kryształy w środowisku otaczającym bakterie i przyspiesza krystalizację struwitu i apatytu (Torzewska i wsp., 2003). Jak już wspomniano kamica moczowa to choroba uporczywa, przewlekła, z dużą skłonnością do nawrotów. Leczenie obejmuje usunięcie złogów i długotrwałą terapię antybakteryjną dostosowaną do lekowrażliwości bakterii, w przypadku *P. mirabilis* często stosowane są chemioterapeutyki z grupy flurochinolonów. W celu przeciwdziałania nawrotom próbuje się zakwaszać mocz podając pacjentowi metioninę, kwas askorbinowy, lub też zmniejszać wydalanie fosforanów stosując wodorotlenek glinu oraz podawać kwas acetohydroksamowy jako specyficzny inhibitor aktywności ureazy (Sayer i wsp., 2010). Jak do tej pory nie udało się opracować skutecznej metody leczenia i zapobiegania nawrotom infekcyjnej kamicy moczowej. Wymaga to poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu powstawania kamieni moczowych indukowanego przez bakterie ureolityczne zwłaszcza głębszego poznania początkowej fazy procesu tworzenia kamieni moczowych czyli zjawiska przesycenia moczu oraz krystalizacji soli wapnia i magnezu. Ważne jest również poszukiwanie nowych związków działających jako inhibitory krystalizacji bądź też związki hamujące aktywność bakteryjnej ureazy.

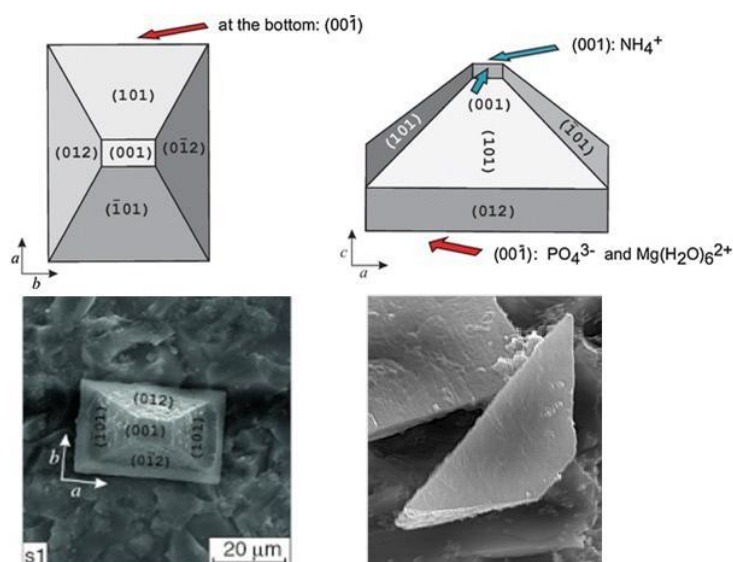
I. 2. Cel naukowy

Powiązanie bakterii ureazo-dodatnich z procesem powstawania kamieni moczowych zostało już dawno zbadane, ale procesy prowadzące do utworzenia złogów w drogach moczowych i udział w nich czynników bakteryjnych i makroorganizmu są wciąż mało znane. Z tych względów celem badań była szczegółowa analiza procesu krystalizacji powodowanego przez bakterie z rodzaju *Proteus* wraz z analizą wpływu czynników pochodzenia bakteryjnego i makroorganizmu na ten proces. Ze względu na napotymane trudności w leczeniu podjęto również próbę wskazania substancji hamującej krystalizację struwitu i apatytu.

I. 3. Charakterystyka wzrostu i morfologii kryształów struwitu powstających w obecności bakterii z rodzaju *Proteus*

Wpływ różnych czynników na tworzenie kamieni moczowych można obserwować w początkowym etapie, czyli podczas powstawania poszczególnych kryształów. Określenie czasu pojawienia się pierwszych kryształów oraz ich morfologii pozwala na szczegółową analizę wpływu czynników

środowiska na proces krystalizacji, w tym również czynników pochodzenia bakteryjnego. Zaproponowany w prezentowanych badaniach model *in vitro* naśladujący warunki naturalne pozwolił na otrzymanie kryształów w syntetycznym moczu w obecności bakterii *Proteus mirabilis*. Otrzymane kryształy zostały poddane analizie pod kątem chemicznym i porównywane ze standardowymi kryształami struwitu. Zarówno uzyskane widma dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD) jak i mikroanaliza rentgenowska (EDX) określająca skład chemiczny jakościowo i ilościowo potwierdziła, że kryształy otrzymywane w zaproponowanych warunkach doświadczalnych są kryształami struwitu (**Prywer i Torzewska, 2010**). Powstawanie kryształów jest ściśle związane ze zmianami pH moczu powodowanymi przez drobnoustroje. Zmiany pH mają duży wpływ nie tylko na indukcję krystalizacji ale także na modulowanie intensywności tego zjawiska. Analizując kinetykę krystalizacji zaobserwowano, że pierwsze kryształy w warunkach *in vitro* w obecności bakterii pojawiają się po około 3,5 godz. (pH około 8,5) inkubacji i posiadają typową morfologię dla tego kryształu przypominającą wieko od trumny. Wraz z czasem inkubacji pojawia się ich coraz więcej i osiągają coraz większe rozmiary nawet około 60 μm . Po około 6 godzinie gdy pH moczu wzrasta do wartości powyżej 9 pojawiają się duże struktury krystaliczne zwane dendrytami. Dendryty ze względu na duże rozmiary i rozgałęzioną strukturę stanowią dodatkowe zagrożenie, gdyż trudniej usuwane są z dróg moczowych i mogą powodować uszkodzenia nabłonka, a to co z kolei sprzyja adhezji kryształów i dostarcza nowych miejsc zarodkowania dla nowych kryształów (**Prywer i Torzewska, 2010; Prywer i wsp., 2012**). W typowym kryształce struwitu możemy wyróżnić podstawowe ściany zaprezentowane na Ryc. 1. Układ ścian, ich wielkość i wewnętrzna struktura kryształu nadaje struwitowi hemimorficzną naturę objawiającą się różnicami w symetrii. Szczególną uwagę zwracają naprzeciwległe ściany (00 $\bar{1}$) i (001), które różnią się od siebie znacznie wielkością. Ściana (00 $\bar{1}$) jest zwykle największą ze wszystkich, a różnice w wielkości wynikają z różnej szybkości ich wzrostu, co również związane jest z odmienną strukturą molekularną. Grupy NH_4^+ usytuowane są na powierzchni (001) natomiast PO_4^{3-} i $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ na naprzeciwległej powierzchni (00 $\bar{1}$). Kryształ może więc mieć właściwości polarne, a różne ugrupowania chemiczne obecne w ścianach wiążąc składniki pochodzące z otaczającego środowiska (**Prywer i Torzewska, 2010**).



Ryc.1 Schemat budowy i zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego kryształów struwitu powstających w obecności *P. mirabilis* (Prywer i wsp., 2012, po modyfikacji)

Patrząc w dużym powiększeniu na powierzchnię ściany kryształu uformowanego w obecności pałeczek *P. mirabilis* można zaobserwować, że składa się ona z regularnych podjednostek o średniej wielkości 1-3 μm . W kryształach struwitu otrzymanym bez udziału bakterii takich struktur nie zaobserwowano, co sugeruje udział czynników bakteryjnych w powstawaniu tej podjednostkowej struktury. Czynnikiem odpowiedzialnym za to mogą być makrocząsteczki budujące komórki bakteryjne takie jak składniki ściany komórkowej: lipopolisacharyd, peptydoglikan, lub też inne składniki komórki, w tym wydzielane do środowiska wzrostu białka. Ze względu na wykazaną podjednostkowość powierzchni kryształu postanowiono sprawdzić czy cały kryształ struwitu nie jest agregatem nanocząstek. Wykonano w tym celu przekrój poprzeczny kryształu i obserwowano go w skaningowym mikroskopie jonowym (FIB). Analiza przekroju co prawda nie potwierdziła jego podjednostkowej struktury, jednak zaobserwowano głębokie kanały biegnące do wnętrza kryształu (Prywer i wsp., 2012). Poznanie tej unikalnej struktury zewnętrznej i wewnętrznej struwitu potwierdziło, że kryształy te mogą stwarzać dobre warunki do kolonizacji bakterii. Porowata powierzchnia sprzyja adhezji bakterii, a zasiedlenie przestrzeni pomiędzy podjednostkami warunkuje większe szanse na przeżycie. Ponadto przesycony mocz może swobodnie wpływać do istniejących kanałów w strukturze wewnętrznej kryształów, powodując adsorpcję czynników wpływających na dalszą krystalizację poprzez wzmaganie wzrostu kryształu bądź agregowanie kryształów w większy złoż.

Badania te pozwoliły z jednej strony na wykazanie różnic pomiędzy kryształami struwitu powstającymi w obecności bakterii i bez nich, co wskazuje na aktywny udział czynników bakteryjnych w tworzeniu struktury kryształu. Z drugiej strony poznanie morfologii kryształu i warunków ich krystalizacji daje wiele możliwości praktycznego zastosowania np. określenia szybkości krystalizacji, wytrzymałości, rozpuszczalności kryształów oraz badania wpływu substancji o potencjalnym działaniu inhibitoryjnym na proces krystalizacji.

I.4. Rola czynników makroorganizmu w krystalizacji soli mineralnych w moczu przebiegającej podczas infekcji bakteriami z rodzaju *Proteus sp.*

Intensywność krystalizacji struwitu i apatyty indukowana przez *P. mirabilis* nie zależy tylko od czynników bakteryjnych, ale również mogą na nią wpływać czynniki pochodzące ze środowiska układu moczowego. Nie dotyczy to tylko stężenia składników mineralnych biorących udział w tworzeniu struktury kryształów czyli jonów wapnia, magnezu oraz fosforanów, ale także makrocząsteczek obecnych stale w organizmie lub też występujących w moczu czasowo ze względu na przebiegającą infekcję. Jednymi z częściej wymienianych makrocząsteczek mających wpływ na krystalizację mineralnych składników moczu są glikozaminoglikany (GAG). Ich rolę w krystalizacji określono w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo*. Stwierdzono, że związki te mogą hamować krystalizację zarówno na etapie nukleacji kryształów, jak i w tworzeniu większych złogów poprzez hamowanie agregacji kryształów i ich wzrostu. Są one określane jako wysokocząsteczkowe modulatory krystalizacji i w przeciwieństwie do cząstek o małej masie mogą wpływać na krystalizację już w bardzo niskich stężeniach. Wykazano, że większą aktywność inhibitoryjną mają glikozaminoglikany modyfikowane chemicznie z podstawioną większą liczbą grup siarczanowych (Cao i wsp., 1997). Jednakże wszystkie wspomniane badania dotyczyły kamicy szczawianowo-wapniowej, która powstaje w wyniku zaburzeń metabolicznych. Jak dotychczas, nie wiadomo jaka rolę pełnią glikozaminoglikany w krystalizacji struwitu. W drogach moczowych zdrowych osób występują takie glikozaminoglikany jak: siarczan chondroityny (ChS, stanowiąc 55 %), siarczan heparanu (HS, 20 %) i kwas hialuronowy (HA, 4-10 %) oraz pozostałe w mniejszym procencie (Baba i wsp., 1983). Stężenie glikozaminoglikanów w moczu jest cechą osobniczą i może ulegać zmianie w wyniku przebiegających chorób układu moczowego. Na przykład u osób ze stwierdzoną kamicą metaboliczną w moczu obserwuje się znacząco niższy poziom glikozaminoglikanów w porównaniu z grupą osób zdrowych. Natomiast ich stężenie wzrasta w czasie przebiegającej infekcji dróg moczowych, gdyż w tym przypadku jest to naturalny mechanizm obronny makroorganizmu zapobiegający adhezji

mikroorganizmów do nabłonka (Akçay i wsp., 1999). Analizując obecność glikozamioglikanów w macierzy kamieni moczowych pobranych od pacjentów stwierdzono, że największa ich ilość występuje w kamieniach infekcyjnych. Z pośród poznanych glikozaminoglikanów kwas hialuronowy i siarczan chondroityny C (ChSC) były najczęściej izolowane z kamieni złożonych ze struwitu i apatytu, natomiast siarczan heparanu nie występował w ogóle (Nishio i wsp., 1985). Obecność glikozaminoglikanów oraz specyficzność występowania określonych związków sugeruje aktywny ich udział w formowaniu kamienia moczowego. Jak już wcześniej wspomniano rola glikozaminoglikanów w kontekście rozwoju infekcyjnej kamicy moczowej jest mało znana i celem podjętych badań było określenie wpływu wybranych związków na pierwsze etapy procesu powstawania kamieni moczowych, czyli na tworzenie pierwszych kryształów, ich wzrost i agregację (**Torzewska i Różalski, 2014a**). Do badań wybrano: siarczan heparanu (HS), kwas hialuronowy (HA) oraz siarczany chondroityny A, B i C (ChSA, B i C). Powstawanie kryształów struwitu i apatytu monitorowano w syntetycznym moczu o ściśle zdefiniowanym składzie chemicznym, zakażonym wybranym szczepem *P. mirabilis*, w obecności badanych glikozaminoglikanów. Intensywność krystalizacji określano poprzez bezpośrednią obserwację w mikroskopie kontrastowo-fazowym oraz poprzez oznaczenie liczby i wielkości kryształów stosując licznik mikrocząstek (Coulter Multisizer). Krystalizacja w takim układzie doświadczalnym analizowana była po 5 godz. inkubacji. Zarówno w próbie kontrolnej bez glikozaminoglikanów, jak i w przypadku wszystkich związków badanych obserwowane były kryształy w wielkości od 2 do 20 μm . We wszystkich próbach ponad 80% kryształów miało wielkość w zakresie 2-5 μm . Większe kryształy były rzadko obserwowane ich udział procentowy nie przekraczał 1%. Jedynie w przypadku próby zawierającej ChSC obserwowano więcej kryształów o średnicy przekraczającej 5 μm . Porównując ogólną liczbę kryształów przypadająca na mililitr moczu stwierdzono, że w obecności wspomnianego związku powstaje największa liczba kryształów w porównaniu z kontrolą i w próbach w obecności innych badanych glikozaminoglikanów. Uzyskane wyniki wskazują, że żaden z badanych glikozaminoglikanów nie hamuje krystalizacji struwitu, większość z nich nie ma wpływu na proces nukleacji i wzrostu kryształów. Jedynie ChSC intensyfikuje krystalizację, powodując powstawanie liczniejszych i większych kryształów. Obserwując powstałe kryształy w mikroskopie kontrastowo-fazowym można stwierdzić, iż w każdym przypadku kryształy te mają morfologię typową dla struwitu i nie wykazują różnic w morfologii w stosunku do układu kontrolnego. Co istotne, nie zaobserwowano agregowania kryształów w obecności wszystkich badanych glikozaminoglikanów. Glikozaminoglikany mogą brać również udział w adhezji kryształów do nabłonka dróg moczowych. Zjawisko to jest istotnym etapem procesu powstawania kamieni moczowych, gdyż powoduje zatrzymanie kryształów w drogach moczowych, które mogą tworzyć coraz to większe złoży. Glikozaminoglikany, będąc zarówno na powierzchni nabłonka dróg

moczowych jak i w moczu, mogą modulować ten proces hamując go lub wspomagając. W przypadku kamicy struwitowej w obecności *P. mirabilis* wcześniej nie badano tego zjawiska. W zaproponowanym doświadczeniu badano *in vitro* adhezję do komórek prawidłowego nabłonka nerki, moczowodu i pęcherza moczowego stosując odpowiednio linie tkankowe HRPTEC, Hu609 oraz HCV29 (Torzewska i Różalski, 2014a). W celu określenia intensywności adhezji kryształy wyznakowano izotopem ^{45}Ca , dzięki czemu można ilościowo oznaczyć stopień adhezji kryształów, nie tylko tych zawierających wapń jak apatyt, ale również struwitu z którym apatyt jest połączony wraz z bakteriami. Zawiesinę kryształów z i bez obecności glikozaminoglikanów dodawano do hodowli linii tkankowych. Po czasie przeznaczonym na adhezję nie związane kryształy odpłukiwano a liczbę kryształów obecnych na nabłonku określano poprzez oznaczenie poziomu radioaktywności. Adhezję do nabłonka potwierdzano również poprzez obserwację pod mikroskopem kontrastowo-fazowym. Stwierdzono, że obecność glikozaminoglikanów zwiększa stopień adhezji kryształów do nabłonka dróg moczowych. W przypadku linii Hu609 i HRPTEC w obecności wszystkich badanych związków adhezja kryształów była większa w porównaniu z układem kontrolnym bez glikozaminoglikanów. Natomiast HS i ChSB nie wpływały na interakcję kryształów z linią HCV29. Spośród wszystkich analizowanych związków siarczan chondroityny A najbardziej wzmacniał adhezję kryształów do nabłonka, nawet pięciokrotnie więcej kryształów obecnych było na komórkach nabłonka moczowodu (Hu609), a czterokrotnie więcej na komórkach nabłonka przejściowego nerki (HRPTEC), w porównaniu do próby kontrolnej. Podsumowując, glikozaminoglikany nie hamują krystalizacji struwitu i apatytu zachodzącej w trakcie infekcji *P.mirabilis*. Dwa związki, siarczan chondroityny A i C intensyfikują ten proces, ChSC wzmacnia proces tworzenia i wzrostu kryształów, a ChSA adhezję powstających kryształów do nabłonka dróg moczowych. Przyspieszenie krystalizacji przez ChSC może polegać na wiązaniu przez ten związek na zasadzie elektrostatycznych oddziaływań kationów, zwłaszcza wapnia. Związanie kationów wapnia powoduje zmniejszenie jego stężenia w otaczającym środowisku i preferencyjne wiązanie fosforanów z kationami magnezu, co w dalszej konsekwencji prowadzi do krystalizacji w większej ilości struwitu (Torzewska i Różalski, 2014a). Potwierdzają to badania Le Corre i wsp. (2005), w których wykazano, iż zwiększenie stężenia wapnia powoduje zahamowanie krystalizacji struwitu, kryształy rosną wolniej i mają zmienioną morfologię. Nie można również wykluczyć innego mechanizmu działania GAG, opartego na łączeniu się glikozaminoglikanów z powierzchnią już powstałych kryształów, co blokuje ich dalszy przyrost. Nie został jednak do tej pory poznany mechanizm interakcji glikozaminoglikanów z kryształami infekcyjnymi. Jak wcześniej wspomniano ChSA wzmacnia adhezję kryształów struwitu i apatytu do nabłonka dróg moczowych. Na tym etapie trudno stwierdzić dlaczego ChSC wzmacnia tylko krystalizację, a ChSA wpływa z kolei wyłącznie na adhezję kryształów do nabłonka. Ten różny efekt działania glikozaminoglikanów może

być związany z ich strukturą chemiczną, a przede wszystkim z konformacją łańcucha polisacharydowego i związanym z tym umiejscowieniem w obrębie cząsteczki grup karboksylowych i siarczanowych.

Określono również na ile zmiany w składzie chemicznym moczu mają wpływ na intensywność krystalizacji powodowanej przez *P. mirabilis* (Torzewska i Różalski, 2015). W zaproponowanym modelu badawczym *in vitro* zastosowano syntetyczny mocz, którego skład chemiczny był ściśle zdefiniowany i dawał możliwość dowolnej chemicznej modyfikacji. Krystalizacja indukowana była w każdym doświadczeniu poprzez dodanie bakterii do moczu. Zmiany w intensywności krystalizacji w stosunku do układu kontrolnego którym był mocz o prawidłowym składzie określano poprzez analizę spektrofotometryczną, chemiczną analizę z zastosowaniem spektroskopii absorpcji atomowej i metod kolorymetrycznych. Ponadto w każdym z układów obserwowano morfologię kryształów która jak już wspomniano przynosi istotne informacje o warunkach i szybkości wzrostu kryształów. Modyfikacje moczu polegały na zmianie stężeń mineralnych związków budujących kryształy jak: wapń, magnez, fosforany oraz takich o których wiadomo że ich stężenie wpływa na krystalizację towarzyszącą powstawaniu metabolicznych kamieni moczowych: cytryniany, szczawiany. Początek krystalizacji widoczny jest jako zwiększenie stopnia zmętnienia zawiesiny dlatego łatwo monitorować moment rozpoczęcia się krystalizacji oraz jej intensywność przez pomiar absorbancji. Określono w ten sposób krystalizację w moczu w szerokim spektrum stężeń badanych składników zarówno poniżej jak i powyżej prawidłowych stężeń występujących w moczu. Zwiększenie wszystkich jonów tworzących kryształy struwitu i apatytu tzn. wapnia, magnezu i fosforanów spowodowało znaczne nasilenie krystalizacji natomiast zmniejszenie tych ilości do poziomu zdecydowanie niższego od fizjologicznie prawidłowego nie powoduje zmian w stopniu krystalizacji w porównaniu z układem kontrolnym. W dalszym etapie badań wybrano takie stężenia od których następowały wyraźne zmiany w stopniu krystalizacji i z nimi wykonano doświadczenie w większej objętości, co pozwoliło na dokładną analizę chemiczną powstającego krystalizatu i ocenę takich parametrów jak pH, liczbę bakterii w mililitrze oraz ocenę morfologii i wielkości powstających kryształów. Żaden z badanych związków nie wpłynął na żywotność bakterii a pH moczu w 5 godz. jeszcze zróżnicowane wahające się w zależności od badanej próbki moczu od 8.07 to 8.96 (gdzie najniższą wartość osiąga w moczu ze zwiększoną ilością wapnia) natomiast po 24 godz. wartość ta jest zbliżona w pomiędzy próbkami i wynosiła 9.4 - 9.66. Analizując intensywność krystalizacji jako ilość kationów wapnia, magnezu i fosforanów stwierdzono, jej najwyższy poziom w przypadku podwyższonego stężenia wapnia i magnezu. Zwiększenie stężenia fosforanów również wpłynęło na intensywność krystalizacji ale już nie w takim stopniu. Co ciekawe zwiększenie stężenia cytrynianów, które są uważane za inhibitor krystalizacji nie wpłynęło znacząco na poziom krystalizacji powodowanej przez *P. mirabilis*. Podobną

sytuację zaobserwowano dla zwiększonego stężenia szczawianów. Jak wspomniano, kształt i wielkość kryształów struwitu świadczy o szybkości i warunkach ich wzrostu. Dla każdej próby oceniano w mikroskopie kontrastowo-fazowym wygląd kryształów. Porównując kryształy we wszystkich badanych próbach największe kryształy struwitu były obserwowane w moczu ze zwiększoną ilością magnezu, ale w próbie tej widoczne były nieliczne kryształy apatyty. Odwrotna sytuacja jest w moczu ze zwiększoną ilością wapnia, gdzie w przewodzie powstają kryształy apatyty, a struwitowe widoczne są w późniejszym czasie. Różnice widoczne były w przypadku kryształów powstających w moczu z nadmiarem szczawianów i cytrynianów. W obydwu przypadkach kryształów było mniej i miały zmienioną morfologię. Kryształy były mniejsze i wydłużone w porównaniu z kryształami powstającymi w prawidłowym moczu. Inhibicyjne działanie cytrynianów do tej pory potwierdzono w stosunku do kamicy szczawianowej oraz struwitowo/apatytowej. W przypadku przedstawionych badań nie wykazano znaczącego wpływu cytrynianów na krystalizację co można również wytłumaczyć zdolnością bakterii do wykorzystywania cytrynianów jako źródła węgla i energii. Do badań wybrano mocz ze zwiększoną ilością szczawianów wapnia, gdyż jak podają źródła literaturowe często kamicy infekcyjnej towarzyszy hyperoksaluria (Segma i wsp., 1981). W tym przypadku może zachodzić konkurencja o kationy wapnia między fosforanami a szczawianami. Jednak tego zjawiska nie potwierdzono w prezentowanych badaniach. Zwiększone stężenie szczawianów tylko w małym stopniu wpływa na krystalizację struwitu i apatyty. Widoczne to było tylko w morfologii powstających kryształów gdyż poziom oznaczonych jonów nie różnił się znacząco od próby kontrolnej zarówno w krótkim jak i długim czasie inkubacji. Wyniki tych doświadczeń (Torzewska i Różalski, 2015) wskazują, że pomimo infekcyjnego pochodzenia tego typu kamicy moczowej środowisko krystalizacji wpływa znacząco na intensywność krystalizacji. Zwiększenie stężenia podstawowych jonów budujących kryształy nasila poziom krystalizacji indukowanej przez bakterie ale również istotne jest wzajemne relacje pomiędzy poszczególnymi jonami obecnymi w moczu. Dla przykładu wykazano wpływ obecności wapnia w stosunku do magnezu na krystalizację struwitu. Przy zwiększonym stężeniu kationów wapnia w stosunku do kationów magnezu (już od dwukrotnie większego) następuje ograniczenie krystalizacji struwitu na korzyść fosforanów wapnia. Związki mineralne obecne w moczu ze względu na posiadany ładunek mogą wpływać na oddziaływania elektrostatyczne oraz siłę jonową. Te parametry wpływają nie tylko na krystalizację w tym na nukleację czyli zapoczątkowanie krystalizacji ale również na agregację powstałych kryształów i ich zatrzymanie w drogach moczowych. W oparciu o tego typu wyniki badań, możliwe jest zaplanowanie odpowiedniej diety, która będzie wspomagać proces leczenia infekcyjnej kamicy moczowej.

Badania te wykazały, że glikozaminoglikany których stężenie wzrasta w trakcie infekcji mogą przyspieszać proces krystalizacji powodowany przez bakterie. W dalszym etapie badań planuje się poznanie molekularnej interakcji glikozaminoglikanów i związków pochodnych z kryształami struwitu i apatyty oraz metod zahamowania ich wpływu na adhezję i nukleację kryształów.

Stwierdzono, że zwiększenie stężenia wszystkich jonów budujących kryształy wzmacnia znacznie intensywność krystalizacji struwitu i apatyty powodowanej przez bakterie ureazo-dodatnie

I. 5. Wpływ związków fenolowych na krystalizację powodowaną przez *P. mirabilis*

Poza poznaniem mechanizmu powstawania infekcyjnych kamieni moczowych, podjęto również próbę wskazania związków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu i profilaktyce tej choroby. Główną rolę w zapoczątkowaniu krystalizacji soli w moczu i rozwoju kamicy moczowej ma podwyższenie pH moczu, za które odpowiada bakteryjna ureaza. W związku z tym największą uwagę skupiono wokół odnalezienia specyficznego inhibitora aktywności bakteryjnej ureazy. W podjętych badaniach poszukiwano tego typu związku spośród związków fenolowych występujących naturalnie w roślinach. Związki te zgodnie z wcześniejszymi badaniami innych autorów wykazują bardzo różnorodne działanie zarówno w stosunku do bakterii, jak i komórek organizmów wyższych. Na bakterie mogą działać bakteriobójczo i bakteriostatycznie, ale również mogą modulować ich patogenność, poprzez wpływ na posiadane przez bakterie czynniki chorobotwórczości (Daglia i wsp., 2011).

Początkowo badania wykonano z zastosowaniem kurkuminy (Prywer i Torzewska, 2012). Określono wpływ tego związku na żywotność bakterii, aktywność ureazy, intensywność krystalizacji, ale co istotne analizowano również jej wpływ na proces krystalizacji, w tym na czas pojawienia się pierwszych kryształów (nukleacji), intensywność wzrostu kryształów struwitu, ich morfologię i kształt. Doświadczenie to wykonywano w warunkach *in vitro*, gdzie do syntetycznego moczu dodawano bakterie *P. mirabilis* a proces krystalizacji badano do 8 godz., w odstępach godzinnych i po 24 godz. Od 3 godz. inkubacji pH roztworu wzrasta i zaczynają pojawiać się pierwsze kryształy. Na początku mają one typową morfologię dla tego typu kryształów z charakterystyczną jedną płaszczyzną nazywaną jako „coffin-lid shape” o maksymalnej wielkości 55-60 μm . Z czasem pH rośnie osiągając wartość najwyższą 9,5 w 8 godz. inkubacji, a kryształy osiągają już bardzo duże rozmiary widoczne gołym okiem i formę dendrytów. Ze względu na bardzo wysokie pH w tej godzinie inkubacji brak jest już żywych bakterii. W obecności kurkuminy (1mM) pierwsze kryształy pojawiają się później (po 4 godz. inkubacji) w porównaniu z układem kontrolnym i mają mniejszą wielkość około 25 μm .

Ponieważ kurkumina w tym stężeniu nie działa bakteriobójczo, więc wolniejszy wzrost pH w stosunku do kontroli można tłumaczyć wpływem tego związku na aktywność ureazy *P. mirabilis*. Nie stwierdzono różnic w morfologii i kształcie powstałych kryształów w obecności i bez kurkuminy. Wyznaczono również czas pojawienia się pierwszych kryształów w moczu z i bez kurkuminy poprzez pomiar absorbancji, wzrost absorbancji w stosunku do moczu nie zakażonego świadczy o tworzeniu pierwszych kryształów. Na podstawie tych pomiarów stwierdzono, że kurkumina wydłuża ten czas w stosunku do kontroli. Opóźniając krystalizację i wpływając na jej intensywność, kurkumina może być rozpatrywana jako potencjalny inhibitor krystalizacji struwitu. Jednak jego zastosowanie w praktyce może mieć ograniczenia ze względu na małą rozpuszczalność kurkuminy, napotkaną już w warunkach badań *in vitro*.

Biorąc pod uwagę pozytywny wpływ kurkuminy na krystalizację struwitu w dalszym etapie badań postanowiono badaniami objąć więcej związków z grupy polifenoli (**Torzewska i Różalski, 2014b**). Do badań wybrano 11 związków o różnej strukturze chemicznej będących zarówno flawonoidami jak i związkami nieflawonoidowymi. W pierwszym etapie sprawdzono wpływ tych związków na wzrost bakterii, aktywność ureazy i intensywność krystalizacji w opracowanej do tych badań mikrometodzie, opartej na pomiarze spektrofotometrycznym przy różnej długościach fali. Badanie te prowadzono na większej grupie szczepów *P. mirabilis*, które izolowane były z kamieni moczowych i inkrustowanej powierzchni cewników pobranych od pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej WAM i Przychodni Przychodni Urologicznej w Łodzi. Spośród wszystkich badanych związków tylko resweratrol, gallusan epigallokatechiny, peralgonidyna, oraz kwasy wanilinowy i kawowy w zakresie stężeń 250-1000 µg/ml zahamowały zarówno aktywność ureazy, jak i krystalizację mineralnych składników moczu. We wszystkich przypadkach stężenie hamujące aktywność ureazy blokowało również krystalizację. Jednak tylko w przypadku jednego związku – kwasu wanilinowego efekt hamujący był widoczny dla wszystkich badanych szczepów. W związku z tym, w dalszym etapie zbadano kinetykę oddziaływania kwasu wanilinowego na bakterie *P. mirabilis* i krystalizację oraz porównano jego działanie z innymi znanymi inhibitorami: kwasem acetohydroksamowym – inhibitorem ureazy oraz pirofosforanem sodu – wcześniej opisanym jako inhibitor krystalizacji struwitu i apatytu. W badaniach tych w warunkach *in vitro* określano w ciągu 24 godz.: pH, żywotność bakterii, aktywność ureazy i stopień krystalizacji w moczu bez dodatku inhibitorów i w obecności wspomnianych związków w stężeniach 0,5, 2,5 i 5 mg/ml. Kwas wanilinowy już w stężeniu 0,5 mg/ml powodował zahamowanie aktywności ureazy *P. mirabilis*, a co za tym idzie wzrost pH następował znacznie wolniej w porównaniu z układem kontrolnym (bez dodatku inhibitorów). W wyższych stężeniach związek ten zahamował całkowicie aktywność ureazy i krystalizację struwitu i apatytu. W stężeniu najwyższym po 1 godz. inkubacji działał bakteriobójczo.

Porównując wpływ kwasu wanilinowego z pozostałymi badanymi inhibitorami wykazano, że kwas acetylohydroksamowy hamuje aktywność ureazy i żywotność bakterii, ale efekt ten jest widoczny przy wyższych stężeniach, niż dla kwasu waniliowego. Natomiast pirofosforan sodu nie wpływa ani na żywotność ani na aktywność bakteryjnej ureazy, jedynie hamuje krystalizację struwitu, kryształy apatyty widoczne były nawet przy stężeniu 5 mg/ml. Dodatkową zaletą kwasu wanilinowego jest jego mała toksyczność, wszystkie do tej pory poznane inhibitory aktywności ureazy, łącznie z kwasem acetylohydroksamowym, okazały się silnie toksyczne i ich zastosowanie w profilaktyce i leczeniu pacjentów z infekcyjną kamicą moczową jest ograniczone. Ponadto kwas wanilinowy jest związkiem dobrze rozpuszczalnym oraz łatwo dostępnym. Pochodzenie tego związku w organizmie może być endo i egzogenne. Jest on produktem przemiany metabolicznej noradrenaliny i adrenaliny, u osób zdrowych z prawidłową dietą jego stężenie może osiągać 65 nmol/mg kreatyniny (Rios i wsp., 2003). Uwalniany jest w wyniku rozkładu innych związków polifenolowych pochodzących ze spożytej żywności lub też można go dostarczyć bezpośrednio z produktami pochodzenia roślinnego zawierającego kwas waniliowy. Jego stężenie w moczu jest wyższe po spożyciu zwłaszcza zielonej herbaty, kawy czy wanilii, jest on głównym metabolitem (do 73%) tych produktów wydalany z moczem (Pietta i wsp., 1998; Rosen i wsp., 1962; Rios i wsp., 2003; Rechner i wsp., 2001).

W wyniku prowadzonych badań wskazano na efektywny i mało toksyczny związek powstrzymujący krystalizację struwitu i apatyty w obecności bakterii ureazo-dodatnich. W dalszych badaniach planuje się określić mechanizm działania kwasu waniliowego i związków pochodnych na bakterie, sprawdzenie stabilności tego związku i jego działanie in vivo.

I. 6. Wewnątrzkomórkowa krystalizacja przyczyną przewlekłej i nawrotowej kamicy moczowej powodowanej przez pałeczki *Proteus mirabilis*

Jak wcześniej wspomniano, bakterie z rodzaju *Proteus* są najczęściej izolowane z kamieni moczowych. Zasadlając układ moczowy bakterie te ze względu na aktywność ureazy podnoszą w otaczającym je środowisko pH. Skutkuje to krystalizacją, która może zachodzić zarówno w moczu, na nabłonku dróg moczowych, wewnątrz komórek nabłonkowych i w strukturach bakteryjnych. W związku z tym posługując się modelem *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowych wyprowadzonych z prawidłowego nabłonka moczowodu (Hu609) i pęcherza moczowego (HCV29)

człowieka sprawdzono jaką rolę odgrywają interakcje gospodarz – uropatogen w rozwoju infekcyjnej kamicy moczowej (**Torzewska i wsp., 2014**). Do doświadczenia wybrano szczepy izolowane z różnych źródeł: z kamieni moczowych, z powierzchni inkrustowanych cewników urologicznych, moczu od pacjentów z zakażeniami dróg moczowych, ale też z wymazów z ran. Doświadczenie to przeprowadzono ze szczepami *P. mirabilis* zarówno ureazo-dodatnimi, jak i nie wykazującymi tej aktywności. Ponadto ze względu na wciąż niejasny udział innych uropatogenów w rozwoju kamicy moczowej doświadczenie to wykonano również w obecności *Klebsiella pneumoniae* oraz szczepów *Escherichia coli*. Linie nabłonkowe zakażano bakteriami w mieszaninie podłoża hodowlanego z syntetycznym moczem. Po 3 godz. inkubacji zabijano bakterie zewnątrzkomórkowe, inkubując próby w podłożu z dodatkiem amikacyny i poddawano dalszej inkubacji w podłożu hodowlanym z dodatkiem moczu w obecności amikacyny o takim stężeniu, które zapobiega wzrostowi bakterii zewnątrzkomórkowych. Ze względu na fakt, że infekcyjne kamienie moczowe złożone są z fosforanów wapnia i magnezu, stopień krystalizacji i jego zmiany w czasie określono dodając do mieszaniny $^{45}\text{CaCl}_2$. W różnych punktach czasowych od 3 do 72 godz. inkubacji określano liczbę bakterii wewnątrzkomórkowych oraz stopień krystalizacji (od 24 do 72 godz.) poprzez wyznaczenie ilości izotopu wapnia (^{45}Ca). Stwierdzono, że badane szczepy bakterii posiadają zdolność inwazji prawidłowego nabłonka dróg moczowych. Liczba bakterii wewnątrz komórek jest jednak różna w zależności od szczepu bakterii i zastosowanych do badań komórek. Zdecydowanie wyższą inwazję zaobserwowano w przypadku linii Hu609, niż miało to miejsce dla komórek pęcherza moczowego (HCV 29). Spośród badanych bakterii *P. mirabilis* wykazywał największą zdolność wnikania do komórek linii Hu609 oraz utrzymywania się wewnątrz nich przez cały czas trwania doświadczenia. Zarówno *K. pneumoniae* jak i *E. coli* wnikały w tych warunkach doświadczalnych słabo, a do 72 godz. w ogóle ich nie obserwowano w badanych komórkach. Bakterie bytując wewnątrz komórek mogą powodować w bliskim im środowisku krystalizację soli mineralnych obecnych w moczu. Analizując ilość izotopu wapnia świadczącego o wykrystalizowaniu fosforanów wapnia stwierdzono, że tylko w przypadku *P. mirabilis* wartość ta jest podwyższona w stosunku do układu kontrolnego, który stanowiły komórki niezakażone bakteriami. Poziom wykrystalizowanych soli rośnie po 24 godz. wraz z czasem inkubacji. Co ciekawe, w przypadku szczepów *K. pneumoniae*, które wytwarzają ureazę o aktywności zbliżonej do badanych szczepów *P. mirabilis*, nie zaobserwowano zachodzącej krystalizacji (**Torzewska i wsp., 2014**). Wykazano we wcześniej przeprowadzonych badaniach przez innych autorów, że *K. pneumoniae* i *E. coli* mają zdolność inwazji nabłonka dróg moczowych, a co więcej tworzenia w nich struktur wielokomórkowych przypominających biofilm (Justice i wsp., 2004; Rosen i wsp. 2008). W badaniach prowadzonych w tej pracy (**Torzewska i wsp., 2014**) tego zjawiska nie zaobserwowano. Kryształy w takich warunkach tworzą się zarówno wewnątrz komórek jak

i w bliskim sąsiedztwie – związane w różnym stopniu z powierzchnią komórki. Uwidoczniono to na zdjęciach po wybarwieniu fosforanów wapnia metodą van Kossa. Porównując aktywność ureazy badanych szczepów, stopień inwazji i krystalizacji w warunkach doświadczalnych wykazano, że wewnątrzkomórkowa krystalizacja w większym stopniu jest uzależniona od liczby bakterii będących w komórkach, niż od aktywności ich ureazy. Szczepy, które w największym stopniu powodowały krystalizację związaną z komórkami nabłonkowymi wykazywały aktywność ureolityczną i utrzymywały się w komórkach w dużej liczbie przez cały okres trwania doświadczenia. Badania te pokazały, że bakterie z rodzaju *Proteus* posiadają zdolność przeżywania w komórkach dróg moczowych oraz unikania działania czynników antybakteryjnych i mechanizmów układu odpornościowego gospodarza, powodują powstawanie mikrokryształów, które są zaczątkiem do odkładania się kolejnych precypitatów soli mineralnych bakterii czy składników makroorganizmu, tworząc kamień moczowy. Dodatkowo wewnątrzkomórkowe bakterie są źródłem nawracających infekcji. Te dwa zjawiska prawdopodobnie odpowiedzialne są za nawrotowość i przewlekłość infekcyjnej kamicy moczowej powodowanej przez pałeczki *Proteus*. W przypadku innych uropatogenów takich jak *E. coli* czy *K. pneumoniae* nie stwierdzono krystalizacji związanej z nabłonkiem dróg moczowych i aktywnej roli w powstawaniu kamieni moczowych (**Torzewska i wsp., 2014**). Potwierdzają to również dane kliniczne. *E. coli* czy *K. pneumoniae* są drobnoustrojami izolowanymi z kamieni moczowych, ale z większą częstością z kamieni zawierających szczawiany i fosforany wapnia (Tavichakortrakool i wsp., 2012). Obecność tych bakterii zwłaszcza w części peryferycznej kamieni może wynikać z faktu, że powierzchnia kamienia moczowego jest zwykle porowata, co sprzyja adhezji bakterii. Natomiast w przypadku kamieni struwitowych z wyraźnie wyższą częstością są izolowane bakterie z rodzaju *Proteus*.

*Poznanie zjawiska powstawania kryształów wewnątrz komórek nabłonka dróg moczowych w wyniku obecności bakterii przyczyniły się do udowodnienia, że spośród uropatogenów izolowanych z kamieni moczowych tylko *P. mirabilis* aktywnie bierze udział w tworzeniu kamienia moczowego. Ponadto wyniki tych badań poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmów zachodzących w trakcie powstawania kamieni moczowych w wyniku infekcji *Proteus* sp. co może skutkować również wprowadzeniem zmian lub też uzupełnieniem schematu leczenia infekcyjnej kamicy moczowej.*

Literatura:

Akçay T., Konukoglu D., Dincer Y. (1999) Urinary glycosaminoglycan excretion in urolithiasis. Arch Dis Child; 80: 271-72.

Baba S., Nakazawa K., Odazima K., Fujjoka T., Nakamura H. (1983) Observation on urinary glycosaminoglycan excretion in patients with urinary calculus in relation to the nature of organic matrix of calculi. Jap J Urol; 74: 608-12.

Bichler K.H., Eipper E., Naber K., Braun V., Zimmermann R., Lahme S. (2002) Urinary infection stones. Int J Antimicrob Agents; 19: 488-498.

Cao L.C., Boeve E.R., de Bruijn W.C., Kok D.J., de Water R., Deng G., Schröder F.H. (1997) Glycosaminoglycans and semisynthetic sulfated polysaccharides: an overview of their potential application in treatment of patients with urolithiasis. Urology; 50:173-83

Daglia M. (2011) Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotech; 23: 1-8.

Evan A.P. (2010) Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. Pediatr Nephrol; 25(5): 831-841.

Justice S.S., Hung C., Theriot J.A., Fletcher D.A., Anderson G.G., Footer M.J., Hultgren S.J. (2004) Differentiation and development pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. PNAS; 101: 1333-1338.

Knoll T., Schubert A.B., Fahlenkamp D., Leusmann D.B., Wendt-Nordahl G., Schubert G. (2011) Urolithiasis through the ages: data on more than 200,000 urinary stone analyses. J Urol; 185: 1304-1311.

Le Corre K.S., Valsami - Jones E., Hobbs P., Jefferson B., Parsons S.A. (2005) Impact of calcium on struvite crystal size, shape and purity. J Cryst Growth; 283: 514-522.

Nishio S., Abe Y., Wakatsuki A., Iwata H., Ochi K., Takeuchi M., Matsumoto Y. (1985) Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. J Urol; 134: 503-505.

Pietta P.G., Simonetti P., Gardana C., Brusamolino A., Morazzoni P., Bombardelli E. (1998) Catechin metabolites after intake of green tea infusions. BioFactors; 8: 111-118.

Prywer J. and Torzewska A. (2010) Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. Cryst Res Technol; 45: 1283-1289.

Prywer J., Torzewska A., Płociński T. (2012) Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus mirabilis*. Urol Res; 40: 699-707.

Prywer J.; Torzewska A. (2012) Effect of curcumin against *Proteus mirabilis* during crystallization of struvite from artificial urine. Evid Based Complement Alternat Med; no 862794.

Rechner A.R., Spencer J.P.E., Kuhnle G., Hahn U., Rice-Evans C.A. (2001) Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. Free Radical Bio Med; 30: 1213-1222.

Rios L.Y., Gonthier M-P., Remesy Ch., Mila I., Lapierre C., Lazarus S.A., Williamson G., Scalbert A. (2003) Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acid in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr*; 77: 912-918.

Rosen D.A., Pinkner J.S., Jones J.M., Walker J.N., Clegg S., Hultgren S.J. (2008) Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infect Immun*; 76(7): 3337–3345.

Rosen L., Goodall McC. (1962) Identification of vanillic acid as a catabolite of noradrenaline metabolism in the human. *PSEM*; 110: 767-769.

Różalski A., Kwil I., Torzewska A., Baranowska M., Staczek P. (2007) Bakterie z rodzaju *Proteus* – cechy i czynniki chorobotwórczości. *Postepy Hig Med Dosw*; 61:204-19.

Różalski A., Sidorczyk Z., Kotełko K. (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev*; 61(1): 65–89.

Segma J.W., Erickson S.B., Wilson D.M., Van der Berg C.J., Smith L.B.(1981) Infected renal lithiasis: results of long-term surgical and medical management. In *Urolithiasis*, Smith LH, ed, p 195. Plenum, New York

Sayer J.S., Moochala S.H., Thomas D.J. (2010) The medical management of urolithiasis. *Brit J Med Surg Urol*; 3: 87-95.

Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sungkeeree S, Saisud P, Sribenjalux P, Pimratana C, Bovornpadungkitti S, Sriboonlue P, Thongboonkerd V. (2012) Extensive characterizations of bacteria isolated from catheterized urine and stones matrices in patients with nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant*; 27: 4125-30.

Torzewska A. (2003) Udział drobnoustrojów w powstawaniu kamieni moczowych. *Post. Mikrobiol*; 42: 39-53.

Torzewska A., Budzyńska A., Białczak-Kokot M., Różalski A. (2014) *In vitro* studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microb Pathogenesis*; 71-72: 25-31.

Torzewska A., Różalski A. (2014a) *In vitro* studies on the role of glycosaminoglycans in crystallization intensity during infectious urinary stones formation. *APMIS*; 122: 505–511 .

Torzewska A., Różalski A. (2014b) Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. *Microbiol Res*; 169: 579-584.

Torzewska A., Różalski A. (2015) Various intensity of *Proteus mirabilis*-induced crystallization resulting from the changes in the mineral composition of urine. *Acta Biochim Pol*; 2015, 62, 127-132

Torzewska A., Staczek P., Różalski A. (2003) Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. *J Med Microbiol*; 52: 41-47.

II. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

II. 1. Biomineralizacja powodowana przez nanobakterie

Po zakończeniu doktoratu rozpoczęłam również badania nad charakterystyką nanobakterii i ich rolą w rozwoju kamicy moczowej i innych zwapnień tworzących się w organizmie ludzkim. Nanobakterie (NB, zwapniate nanocząstki) początkowo uznano za żywe organizmy. Te mineralne formy jako pierwsi zaobserwowali E.O Kajander i N. Ciftcioglu w 1998 r. w surowicy bydłowej i ludzkiej, później również w płytkach miażdżycowych, kamieniu moczowym i nazębnym u człowieka. Za główne cechy charakterystyczne i wyróżniające je od do tej pory znanych drobnoustrojów uznano bardzo małe rozmiary (od 50 do 800 nm) oraz zdolność do aktywnego odkładania apatyty na swojej powierzchni. To przede wszystkim ostatnia wymieniona cecha, czyli mineralizacja powodowana przez te formy skłoniła mnie do podjęcia badań nad nanobakteriami. W podjętych przeze mnie badaniach najpierw wyizolowano z surowic bydłowych i ludzkich kamieni moczowych 31 izolatów, które rozpoznano jako nanobakterie po porównaniu wyników testu immunologicznego Dot blot, mikroskopii elektronowej, chemicznej analizy rentgenowskiej i bezpośredniej obserwacji hodowli wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Opracowano własny test immunoenzymatyczny pozwalający na badania surowic oraz zdeminerlizowanych kamieni moczowych w kierunku poszukiwania antygenów nanobakterii. Podjęto też badania polegające na poznaniu budowy nanobakterii obejmująca np. analizę białek, kwasów nukleinowych czy też składników ściany komórkowej. Wymagało to opracowania metody izolacji białek z hodowli nanobakterii, obejmującej sonikację w obecności EDTA i inhibitorów proteaz (PMSF). Białka te posłużyły jako antygen do immunizacji myszy w celu uzyskania poliklonalnej surowicy odpornościowej. W otrzymanej w ten sposób surowicy określono poziom swoistych przeciwciał, a także reaktywność z wszystkimi do tej pory namnożonymi nanobakteriami i innymi bakteriami. Dostępne komercyjnie przeciwciała (Nanobac Oy, mAb G1-B8) zastosowane w moich badaniach rozpoznają epitopy zlokalizowane w białku porynowym nanobakterii, sprawdzono ich reaktywność w ELISA z antygenami powierzchniowymi innych bakterii często izolowanych z kamieni moczowych lub/i powodujących zakażenia dróg moczowych np. *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus sp.* *Staphylococcus sp.* i nie wykazano żadnych reakcji krzyżowych, co świadczy o zupełnie odmiennej budowie tego składnika ściany komórkowej nanobakterii. Pomimo zastosowanych różnych znanych metod izolacji DNA nie udało się potwierdzić obecności materiału genetycznego w prowadzonych hodowlach.

Podjęto również próbę sprawdzenia czy nanocząstki posiadają aktywność metaboliczną. Do pomiaru wydzielanego ciepła posłużono się metodą skaningowej mikrokalorymetrii. Badania te wykonano we współpracy z Katedrą Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii UŁ. Ze względu na fakt, że uważano je za wolno-rosnące drobnoustroje o bardzo małych rozmiarach komórek postanowiono określać spadek wydzielanego ciepła przez te mikroorganizmy w wyniku działania na nie czynnika bójczego. Do tych analiz wybrano jako czynnik działający bójczo jeden z chelatorów wapnia – EDTA. Wstępne wyniki były bardzo obiecujące, wyznaczono czas po którym stwierdzono całkowity spadek aktywności metabolicznej. Niestety zastosowanie już innych warunków tego doświadczenia nie pozwoliło na potwierdzenie uzyskanych wyników w związku z tym należy je traktować jako wstępne.

Żywe organizmy charakteryzuje również wrażliwość na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego, w związku z tym sprawdzono stosując różne warunki hodowli. Hodowle prowadzono w różnej temperaturze, przy dostępie lub bez CO₂ i wilgotnej atmosfery, w podłożu z dodatkiem surowicy cielęcej o różnym pH, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Badaniom poddano 10 różnych izolatów pochodzących z surowicy cielęcej dostępnej w handlu jako dodatek do podłoży do hodowli tkankowych, z surowic ludzkich oraz NB wyizolowanych z ludzkich kamieni moczowych. Przez okres 6 tygodni monitorowano zmiany w stopniu zmętnienia podłoża mierząc absorbancję przy λ 620 nm. Wykazano, że w przypadku wszystkich użytych zwapniałych nanocząstek nie następował wzrost absorbancji w temperaturze 4 i 60°C, a także w pH 3 i 5. Najbardziej sprzyjającą temperaturą była 37°C i to bez względu na stopień wilgotności i dostęp tlenu. Wpływ dodatku surowicy był zarówno pozytywny, jak i negatywny w zależności od zastosowanej surowicy cielęcej, co może wynikać z obecności w surowicach inhibitorów krystalizacji lub chelatorów wapnia. We wszystkich przypadkach gdzie zaobserwowano wzrost absorbancji widoczne było zróżnicowanie jego intensywności zależne od użytych izolatów.

Wykazano cytotoksyczne działanie tych zwapniałych nanocząstek na komórki układu moczowego *in vitro*. Działanie to badano na normalnych komórkach układu moczowego takich jak: nabłonek pęcherza moczowego, moczowodu i nerki. Efekt ten polegał zarówno na obniżeniu aktywności metabolicznej jak i odklejania się komórek nabłonka od podłoża. Stopień cytotoksyczności był bardzo zróżnicowany od 25 do 70% i zależny od zastosowanej hodowli NB jak i rodzaju komórek nabłonkowych. Najślabej efekt cytotoksyczny był widoczny dla komórek nabłonka moczowodu najsilniej w stosunku do komórek nabłonka kanalików nerkowych.

Do tej pory nie udało się potwierdzić, że nanobakterie to żywe organizmy, a uzyskane w ostatnich latach wyniki badań raczej temu zaprzeczają. Na chwilę obecną jako przyczynę zwapnień

upatruje się raczej udział białek obecnych we krwi silnie wiążących kationy wapnia np. fetuinę. Wyniki moich badań zostały przedstawione na trzech konferencjach naukowych o zasięgu krajowym, na sesjach plakatowych (3 plakaty) doniesieniu ustnym oraz opublikowane w recenzowanych materiałach konferencyjnych (Załącznik 3, pkt. II B, poz.15)

W mojej opinii wciąż nie ma wiarygodnego wyjaśnienia zjawiska biomineralizacji przypisywanej poprzednio żywym organizmom nazwanymi nanobakteriami lub obecnie fizykochemicznej interakcji białek z jonami wapnia. Bez względu na kontrowersje czy obserwowana mineralizacja może zachodzić w wyniku działania żywych organizmów czy też na skutek obecności nieożywionych nanocząstek jej dalsza charakterystyka pozwoli zrozumieć mechanizmy tworzenia patologicznych zwapnień w organizmie człowieka i zwierząt.

II. 2. Badania immunochemiczne antygenów O (polisacharydów O-swoistych) bakterii należących do *Providencia sp.* i *Proteus sp.*

Badania dotyczące poznania struktury chemicznej oraz determinant antygenowych polisacharydów O-swoistych (antygenów O) bakterii rozpoczęłam już w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Po uzyskaniu stopnia doktora ten nurt badań nadal kontynuuję. Początkowo badaniami objęto antygeny O szczepów *P. vulgaris* pochodzące z Narodowej Czeskiej Kolekcji Kultur Typowych Instytutu Mikrobiologii i Epidemiologii w Pradze, później szczepy *Providencia sp.* (obejmujących gatunki *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* oraz *P. rustigianii* należących do 59 serogrup O) uzyskane z kolekcji węgierskiej (Hungarian National Collection of Medical Bacteria). Struktura chemiczna wszystkich badanych O-PS została określona dzięki współpracy z zespołem prof. Y. Knirela w Moskwie (N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences). Identyfikacja rodzaju reszt cukrowych wchodzących w skład powtarzających się podjednostek, ich anomerii jak i typu wiązań pomiędzy cukrami było możliwe przy zastosowaniu chromatografii gazowej i spektrometrii masowej GC/MS oraz metod spektralnych jak ^1H -, ^{13}C - , ^{31}P – NMR (Nuclear Magnetic Resonance- magnetyczny rezonans jądrowy), COSY (Correlated Spectroscopy- spektroskopia korelacji), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy- spektroskopia korelacji całkowitej), NOESY (NOE - Spectroscopy- dwuwymiarowa spektroskopia jądrowego efektu Overhausera) oraz HMQC (Heteromolecular Multiple Quantum Coherence - heterojądrowa spektroskopia wykorzystująca korelację multikwantową).

W chwili obecnej zarówno antygeny O szczepów *Providencia* i *Proteus* należących do wszystkich serogrup z wyżej wymienionych kolekcji szczepów zostały zbadane. Analizując strukturę chemiczną antygenów O szczepów *Proteus sp.* i *Providencia sp.* stwierdzono, że są one heteropolisacharydami, zbudowanymi z liniowo lub w bocznych rozgałęzieniach połączonych podjednostek cukrowych. Pojedyncze podjednostki zbudowane są z 3-5 cukrów. Polisacharydy te mają charakter kwaśny (90%) lub w mniejszym stopniu obojętny lub amfoteryczny. Poza składnikami cukrowymi często występującymi w części O-swoistej lipopolisacharydu wszystkich *Enterobacteriaceae* np. glukoza, galaktoza, kwas glukuronowy czy kwas galakturonowy stwierdzono też składniki rzadko występujące w tych strukturach bakteryjnych jak: chinowoza, 6-deoksy-taloza, kolitoza, Kdo, kwas N-acetyloneuraminowy i N-acetyloizomuraminowy kwas asparaginowy oraz alanopina. W przypadku szczepów reprezentujących 14 badanych serogrup *Providencia* nie udało się wyizolować polisacharydu O-swoistego, co może sugerować, że szczepy te produkują formę szorstką LPS (R LPS) a w przypadku 4 innych serogrup stwierdzono wytwarzanie przez bakterie wysokocząsteczkowego polisacharydu, który nie jest połączony z lipidem A (tak jak jest to w przypadku antygeny K) i ma odmienną budowę chemiczną od pozostałych antygenów O. Poza określeniem struktury chemicznej sprawdzono również reakcje krzyżowe pomiędzy LPS *Providencia sp.* i *Proteus sp.* oraz innymi gatunkami bakterii w których w antygenie O stwierdzono podobne składniki chemiczne. Badania te prowadzono z użyciem poliklonalnych surowic króliczych skierowanych przeciwko określonym antygenom O w technice Western blot i ELISA. W przypadku antygenów O *Proteus sp.* zaobserwowano bardzo liczne reakcje krzyżowe z surowicami skierowanymi przeciwko antygenom o podobnej strukturze chemicznej. Jednym z najczęściej rozpoznanych wspólnym składnikiem był disacharyd N-acetylo-fukozaminy i N-acetylo-glukozaminy (α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc) który jest obecny u 6 serogrup *Proteus* O6, O8, O12, O39, O67 i O68. W przeciwieństwie do polisacharydów O-swoistych *Proteus sp.* w obrębie badanych polisacharydów *Providencia sp.* wykazano tylko nieliczne reakcje krzyżowe przeciwciat skierowanych przeciwko badanemu antygenowi z polisacharydami O-swoistymi o podobnej budowie. Przykładowo stwierdzono reakcje krzyżowe we wspomnianych układach pomiędzy antygenami serogrup O14, O23 i O25 gdzie za reakcje odpowiada wspólny składnik amid alanino lizyny z kwasem uronowym. Wykazano również wspólne epitopy odpowiedzialne za reakcje krzyżowe surowicy anty O *Providencia* z LPS szczepów należących do innych gatunków bakterii jak *Proteus*, *Morganella*, *Escherichia*, *Shigella* i *Salmonella*. Podobieństwo może obejmować całą podjednostkę polisacharydu O np. *Providencia alcalifaciens* O47 ma identyczną strukturę antygeny O co *Shigella boydii* O5. Poznanie struktury chemicznej polisacharydów O-swoistych przyczyniło się do ustalenia molekularnych podstaw klasyfikacji serologicznej tych drobnoustrojów oraz daje możliwość

określenia zależności struktury chemicznej od aktywności biologicznej tej części lipopolisacharydu np. ich udziału w krystalizacji i agregacji kryształów w formowaniu kamieni moczowych, tworzeniu macierzy biofilmu czy roli w adhezji. Rozpoczęta w 2008 r. współpraca z TEDA School of Biological Sciences and Biotechnology Nankai University, Tianjin, ChRL pozwoli również na poznanie u badanych bakterii genów kodujących tą część lipopolisacharydu i mechanizmów ich ekspresji. Mój udział w badaniach immunochemicznych polisacharydów O-swoistych bakterii *Providencia sp.* i *P. vulgaris* polegał na otrzymywaniu lipopolisacharydów oraz surowic odpornościowych dla części badanych serogrup, koncepcja i wykonanie badań serologicznych a w późniejszym etapie badań ich koordynacja. Prace te finansowane były z 2 grantów MNiSzW których byłam wykonawcą i zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych jak i zagranicznych (z moim udziałem łącznie 16) oraz opublikowane w czasopiśmie z JCR w tym z moim współautorstwem - 26 (Załącznik 3, pkt. IB, poz. 1,2, 4-7, pkt. IC, poz. 1-3, 6-21 i 23)

II.3. Badania czynników chorobotwórczości bakterii z rodzaju *Proteus* i *Providencia*

Od czasu realizacji pracy doktorskiej i w trakcie dalszej pracy badałam również wybrane czynniki chorobotwórczości pałeczek z rodzaju *Proteus* i *Providencia*. W badaniach zastosowano zarówno szczepy pochodzące z kolekcji szczepów typowych odpowiednio czeskiej i węgierskiej oraz szczepy kliniczne. Szczepy kliniczne izolowane były z moczu pacjentów z zakażeniem dróg moczowych leczonych w Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, a także z kamieni moczowych oraz z powierzchni cewników urologicznych pobranych od pacjentów długotrwale cewnikowanych będących pod opieką dwóch urologicznych przychodni w Łodzi. Ta ostatnia wymieniona kolekcja zawiera szczepy należące nie tylko do gatunków *Proteus* i *Providencia* ale także innych uropatogenów jak: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* czy *Staphylococcus*. Uczestniczyłam w izolowaniu bakterii z cewników urologicznych i charakteryzowaniu wszystkich tych szczepów. Badania początkowo polegały na określeniu gatunkowo i ilościowo bakteryjnej flory na cewnikach urologicznych typu Foley oraz na oznaczeniu profilu ich lekowrażliwości. Szczepy izolowane z cewników stanowiły ważne źródło informacji o czynnikach chorobotwórczych bakterii bytujących w biofilmie. Zbadano w warunkach *in vitro* ekspresję takich czynników u szczepów *P. mirabilis* jak aktywność ureazy, wzrost rozpełzły, hydrofobowość powierzchni, obecność fimbrii MR/K, MR/P i MS i porównując je ze szczepami izolowanymi z zakażeń układu moczowego. Stwierdzono u szczepów tworzących biofilm statystycznie istotnie większą hydrofobowość

powierzchni i aktywność ureazy, a zdecydowanie niższą ekspresję pozostałych cech tych uropatogenów. Ponadto w zaproponowanych przeze mnie warunkach *in vitro* imitujących warunki naturalne stwierdzono, że cechy te predysponują szczepy izolowane z cewników do zasiedlania tego typu powierzchni oraz powodowania inkrustacji cewników, co w warunkach naturalnych powoduje zatrzymanie moczu oraz poważne powikłania i pacjentów cewnikowanych. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych (12 plakatów i 2 doniesienia ustne) i zagranicznych (5 plakatów) oraz opublikowane (1 publikacja z listy JCR, Zał. 3, pkt. I C, poz.31).

Agnieszka Torzevska