

# Interdyscyplinarne problemy zdrowia i choroby

TOM V



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Zakład Higieny, Epidemiologii i Ergonomii

*Monografia naukowa dla studentów uczelni  
medycznych i pracowników ochrony zdrowia*

# **Interdyscyplinarne problemy zdrowia i choroby**

**Tom V**

*Praca zbiorowa pod redakcją*

Małgorzaty Żendzian-Piotrowskiej

Dominiki Malinowskiej

Mateusza Maciejczyka

**Białystok 2026**

## **Recenzenci**

Barbara Choromańska, Justyna Dorf, Karolina Gerreth,  
Katarzyna Guzińska-Ustymowicz, Małgorzata Knaś-Dawidziuk,  
Elżbieta Supruniuk, Magdalena Świdorska, Anna Zalewska

## **Skład**

Gabriela Wanczeska, Renata Mowel

**ISBN – 978-83-68761-48-1**

Wydanie I

Białystok 2026

# Spis treści

<b>Nowe strategie terapeutyczne wielolekoopornych pałeczek Enterobacterales – kierunki rozwoju i implikacje kliniczne</b> New therapeutic strategies for multidrug-resistant <i>Enterobacterales</i> – development directions and clinical implications .....	4
<b>Lekooporność bakterii- mechanizmy, diagnostyka mikrobiologiczna i profilaktyka w oddziałach szpitalnych</b> Bacterial Antibiotic Resistance – Mechanisms, Microbiological Diagnostics and Prevention in Hospital Wards .....	34
<b>Badanie wpływu eugenolu na skuteczność antybiotyków wobec wielolekoopornych szczepów <i>Enterobacter cloacae</i> Complex</b> Evaluation of the effect of eugenol on the efficacy of antibiotics against multidrug-resistant <i>Enterobacter cloacae</i> Complex .....	50
<b>Synergizm działania olejku z drzewa herbacianego i wybranych antybiotyków wobec klinicznych szczepów <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i></b> Synergy of tea tree oil and selected antibiotics against clinical isolates of <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> .....	73
<b>Amyloidoz serca w praktyce klinicznej</b> Cardiac amyloidosis in clinical practice .....	97
<b>Endometrioza jako przyczyna niepłodności: mechanizmy, wyzwania diagnostyczne i strategie terapeutyczne</b> Endometriosis as a cause of infertility: mechanisms, diagnostic challenges, and therapeutic strategies .....	113
<b>Tlenek azotu – wróg czy przyjaciel w gojeniu złamań kości?</b> Nitric Oxide – Friend or Foe in Bone Fracture Healing? .....	126
<b>Wybrane markery uszkodzeń oksydacyjnych w przebiegu złamań kości części twarzowej czaszki</b> Selected Biomarkers of Oxidative Damage in Patients with Facial Skeleton Fractures .....	142
<b>Charakterystyka kliniczna i wybrane parametry diagnostyczne ropowicy głowy i szyi</b> Clinical Characteristics and Selected Diagnostic Parameters of Head and Neck Phlegmon.....	159

# NOWE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE WIELOLEKOOPORNYCH PAŁECZEK ENTEROBACTERALES – KIERUNKI ROZWOJU I IMPLIKACJE KLINICZNE

New therapeutic strategies for multidrug-resistant *Enterobacterales* – development directions and clinical implications

**Łukasz Korczak<sup>1</sup>, Piotr Majewski<sup>1\*</sup>, Łukasz Koliński<sup>1</sup>, Elżbieta Tryniszewska<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; piotr.majewski@umb.edu.pl (\*autor korespondencyjny)

## WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich dekad antybiotykooporność bakterii stała się jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla światowego zdrowia publicznego. Corocznie odnotowywany jest stały wzrost liczby szczepów bakteryjnych opornych na liczne grupy leków przeciwdrobnoustrojowych, a skala problemu narasta. [1] Wielolekkooporność drobnoustrojów stanowi wyzwanie zarówno w leczeniu zakażeń szpitalnych, jak i środowiskowych, prowadząc do wydłużenia czasu hospitalizacji, wzrostu kosztów ponoszonych przez podmioty lecznicze oraz zwiększonej ilości powikłań i śmiertelności. [2]

Jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za rozwój i rozprzestrzenianie się lekooporności są Gram-ujemne pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacterales*, do których zaliczają się m.in. *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* czy *Klebsiella pneumoniae*. Drobnoustroje te wykazują złożone i szybko ewoluujące mechanizmy nabywania oporności, które umożliwiają im przeżycie nawet, gdy w ich środowisku znajdują się cząsteczki antybiotyków. Szczepy te wykazują oporność zarówno na standardowe leki

przeciwdrobnoustrojowe, jak i tzw. „leki ostatniej szansy” – cefalosporyny III generacji, karbapenemy, kolistynę i tigeicyklinę. Taka sytuacja może skutkować wyczerpaniem dostępnych opcji terapeutycznych oraz brakiem możliwości wyleczenia zakażeń. Co więcej, szczepy te są nie tylko coraz powszechniejsze w środowisku szpitalnym, ale także stanowią zagrożenie w środowiskach pozaszpitalnych. [3]

Niezwykła zdolność adaptacyjna bakterii Gram-ujemnych, plastyczność genomu bakteryjnego oraz procesy horyzontalnego transferu genów (HGT – ang. *horizontal gene transfer*) stanowią mechanizmy nabywania oporności. Kumulacja mechanizmów oporności, takich jak produkcja beta-laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ESBL – ang. *extended-spectrum beta-lactamases*), karbapenemaz oraz modyfikacja porin i aktywacja pomp efflux prowadzą do powstawania szczepów wielolekoopornych, które mogą się rozprzestrzeniać w wielu środowiskach. [4] W obliczu stale rosnącego zagrożenia dla zdrowia publicznego, rośnie zainteresowanie nowymi metodami leczenia zakażeń wywołanych przez wielolekooporne bakterie. Szczególną uwagę zwracają zarówno innowacyjne strategie farmakologiczne, jak i naturalne opcje terapeutyczne, które mogą wspierać lub zastępować klasyczne antybiotyki.

Celem niniejszego manuskryptu jest przegląd aktualnych mechanizmów oporności występujących u pałeczek *Enterobacterales* oraz przedstawienie najnowszych kierunków strategii terapeutycznych stosowanych w ich leczeniu. Szczególnie istotne jest przedstawienie możliwości praktycznego wykorzystania wybranych naturalnych substancji oraz synergizm terapii skojarzonych, wraz z ich aspektem klinicznym i epidemiologicznym.

## **Oporność bakterii na antybiotyki – narastający problem**

### *Definicja oporności i wielolekooporności*

Leki przeciwdrobnoustrojowe zmieniły oblicze współczesnego leczenia

zakażeń. Pomimo szerokiego wachlarza dostępnych środków, coraz więcej bakterii staje się niewrażliwa na ten najskuteczniejszy element terapii. Lekooporność to zdolność bakterii do przetrwania i namnażania się mimo obecności antybiotyku w środowisku komórek bakteryjnych, który w normalnych warunkach powinien zahamować ich wzrost lub prowadzić do śmierci komórki. [5]

Oporność możemy podzielić na:

- Oporność naturalną (wrodzoną) – jest charakterystyczna dla danego gatunku drobnoustroju oraz wynika z konkretnych cech strukturalnych oraz metabolicznych (np. wrodzona oporność *Pseudomonas aeruginosa* na wiele antybiotyków beta-laktamowych). [5]
- Oporność nabytą – jest wywołana przez różne zmiany w komórce bakteryjnej, takie jak mutacje w materiale genetycznym lub nabycie genów oporności od innych drobnoustrojów, najczęściej na drodze horyzontalnego transferu genów. [6]

Ważnym aspektem jest klasyfikacja wielolekooporności, która została opracowana w celu ujednoczenia terminologii w badaniach naukowych oraz praktyce klinicznej. Wielolekooporność (MDR, z ang. *multidrug-resistant*) definiowana jest jako oporność bakterii na co najmniej jedną substancję z trzech lub więcej różnych klas antybiotyków. Rozszerzona oporność (XDR – z ang. *extensively drug resistant*) oznacza oporność na wszystkie, poza jedną lub dwiema klasami antybiotyków, które w warunkach naturalnych są skuteczne wobec danego mikroorganizmu, natomiast całkowita oporność (PDR – z ang. *pan-drug resistance*) oznacza oporność na wszystkie dostępne leki przeciwdrobnoustrojowe. [7] Rozróżnienie terminologii ma zasadnicze znaczenie w kontekście terapii oraz klasyfikacji drobnoustrojów, ponieważ każda klasa oporności znacząco ogranicza dostępne opcje terapeutyczne.

### Pałeczki *Enterobacterales* – rozprzestrzenianie i zagrożenia

Różnice między opornością naturalną oraz nabytą są fundamentalne.

Oporność naturalna wynika z specyfiki gatunkowej i jest stabilna, natomiast oporność nabyta pojawia się wskutek adaptacji bakterii do np. niekorzystnych warunków środowiskowych (takich jak pojawienie się cząsteczek antybiotyków w środowisku). Ponadto w niektórych środowiskach (takich jak środowiska szpitalne) oporność bakterii może się szybko rozprzestrzeniać, zwłaszcza wskutek presji selekcyjnej. [5] Jedną z grup drobnoustrojów pojawiających się szeroko w różnych środowiskach i odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne jest rodzina pałeczek jelitowych *Enterobacterales*. W obrębie tej rodziny najbardziej istotnymi w kontekście klinicznym są szczepy *E. coli* produkujące enzymy ESBL, *K. pneumoniae* z rosnącą liczbą szczepów wytwarzających karbapenemazy oraz *Enterobacter* spp. wykazujące coraz większą oporność na antybiotyki o szerokim spektrum substratowym, takie jak cefalosporyny III generacji i karbapenemy. [8]

Wieloletni wzrost częstotliwości występowania szczepów MDR *Enterobacterales* wiąże się z istotnymi konsekwencjami klinicznymi i terapeutycznymi. Ograniczenie skutecznych opcji terapeutycznych prowadzi często do konieczności stosowania leków o większej toksyczności, zwiększonych kosztów leczenia, wydłuża hospitalizację oraz zwiększa ryzyko niepowodzenia terapii i śmiertelności. Zjawisko to występuje na całym świecie i dotyczy szczególnie środowisk szpitalnych, gdzie pacjenci są poddawani różnym procedurom medycznym, który zwiększa ryzyko zakażenia tego typu drobnoustrojami. [4]

Rozprzestrzenianie się szczepów wielolekoopornych z rodziny *Enterobacterales* stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny, wymuszając konieczność opracowywania nowych strategii terapeutycznych i pogłębionej analizy mechanizmów oporności, które umożliwiają przetrwanie drobnoustrojów w obecności coraz szerszego spektrum antybiotyków.

### *Epidemiologia oporności na antybiotyki – Polska, Europa, świat*

Antybiotykooporność (AMR – ang. *antimicrobial resistance*) stanowi

jedno z największych zagrożeń zdrowia publicznego na świecie. Według najnowszych prognoz, do 2050 roku liczba zgonów spowodowana wyczerpaniem dostępnych opcji terapeutycznych przewyższy liczbę zgonów spowodowanych przez nowotwory. Według najnowszych prognoz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – ang. *World Health Organization*) zakażenia wywołane szczepami lekoopornymi mogą być bezpośrednią przyczyną nawet 39 milionów zgonów na świecie w okresie od 2025 do 2030 roku. [9] W 2019 roku oszacowano, iż AMR odpowiadała za ponad 1 milion zgonów rocznie oraz przyczyniała się do 5 milionów zgonów na świecie. Szczególnie dotknięte problemem lekooporności są kraje nisko- i średnio rozwinięte, które nie przeznaczają wystarczających środków na diagnostykę oraz leczenia zakażeń. W kolejnych latach przewiduje się wzrost liczby zakażeń i zgonów wywołanych przez AMR. Najszybsze wzrosty dotyczą Gram-ujemnych pałeczek, w tym *Enterobacterales* (szczególnie szczepów ESBL+ oraz produkujących karbapenemazy). Głównymi czynnikami napędzającymi AMR są nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, niedostępność nowych leków w niektórych regionach oraz migracje. [9]

W krajach europejskich sytuacja również ulega pogorszeniu – według Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC – z ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*) każdego roku ponad 30 tysięcy osób umiera wskutek zakażeń wywołanych przez odporne bakterie. [10] Dodatkowo cała sytuacja generuje wielomiliardowe koszty leczenia. Największe zagrożenie wśród bakterii stanowią *E. coli* oraz *K. pneumoniae*, u których gwałtownie rośnie odsetek szczepów opornych na kluczowe antybiotyki o szerokim spektrum działania – karbapenemy oraz cefalosporyny trzeciej generacji. Z raportu ECDC wynika, iż w krajach Unii Europejskiej w latach 2019 – 2023 nastąpił wzrost liczby bakterii wywołanych przez karbapenemazo-dodatnią *K. pneumoniae* o ponad 50% (wzrost z 2,52 do 3,97 na 100 000 mieszkańców). [3,11] Podobne wzrosty odnotowuje się wśród *E. coli* i *K. pneumoniae* opornych na cefalosporyny. Największy odsetek zakażeń wywołanych przez szczepy MDR odnotowuje się w krajach Europy

Południowej i Środkowo-Wschodniej – Grecji, Włoszech, Rumunii, Bułgarii, Polsce, ale także w Niemczech. Sytuacja ta może mieć związek z konsumpcją antybiotyków w danych krajach, która przewyższa średnią europejską. [3]

W Polsce epidemiologia narasta spójnie z trendami europejskimi, z kilkoma czynnikami przyspieszającymi cały proces. Problem dotyczy również narastania oporności wśród pałeczek *Enterobacterales*, przede wszystkim *E. coli* oraz *K. pneumoniae*. Najnowsze dane Narodowego Instytutu Leków (NIL) oraz Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORDL) potwierdzają wysoką częstość szczepów ESBL-dodatnich oraz *Enterobacterales* produkujących karbapenemazy (CPE – ang. *carbapenemase-producing Enterobacterales*). [12] Raport NIL potwierdza, iż w niektórych regionach (w szczególności wysoko zaludnionych) ponad 10% szczepów *K. pneumoniae* to szczepy CPE, a udział szczepów ESBL-dodatnich szacuje się na około 40%. Raporty KORDL podają, że ponad 30% izolatów *E. coli* oraz 40% izolatów *K. pneumoniae* to szczepy ESBL-dodatnie, ponadto obserwuje się sukcesywny wzrost ognisk epidemicznych związanych z CPE w szpitalach, w szczególności na oddziałach intensywnej terapii oraz neonatologii. [12] Te oddziały są szczególnie predysponowane, ze względu na fakt hospitalizacji pacjentów z grup ryzyka, poddawanych inwazyjnym procedurom medycznym oraz w immunosupresji. Tak samo jak w innych krajach europejskich odnotowuje się korelację między zmianami trendów oporności a wysoką konsumpcją antybiotyków.

## **Molekularne podstawy wielolekooporności *Enterobacterales***

### *Produkcja enzymów inaktywujących antybiotyki*

Wielolekooporność pałeczek *Enterobacterales* jest zjawiskiem wynikającym z współwystępowania wielu mechanizmów molekularnych, które umożliwiają przetrwanie bakterii w trudnych dla nich warunkach środowiskowych (takich jak obecność licznych klas antybiotyków w środowisku komórki bakteryjnej). [9] Zdolność ta jest efektem zarówno umiejętności

dostosowywania się bakterii do panujących warunków, wysokiej plastyczności genomu bakterii Gram-ujemnych oraz nadużywania leków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie, weterynarii oraz środowisku naturalnym. Wśród *Enterobacterales* szczególnie istotne są mechanizmy warunkujące szerokie spektrum oporności na antybiotyki oraz ich szybkie rozprzestrzenianie pomiędzy różnymi gatunkami za pomocą mobilnych elementów genetycznych, takich jak np. plazmidy, transpozony i integrony. [4]

Jednym z najistotniejszych i najczęściej występujących mechanizmów molekularnych prowadzących do wielolekooporności wśród pałeczek *Enterobacterales* jest produkcja enzymów zdolnych do inaktywacji szerokiego wachlarza antybiotyków. Z klinicznego punktu widzenia najważniejszymi z nich są trzy grupy enzymów: beta-laktamazy o szerokim spektrum substratowym (ESBL), cefalosporynazy AmpC oraz karbapenemazy. [5,6]

ESBL należą do najważniejszych i najczęstszych mechanizmów oporności wśród szpitalnych i środowiskowych izolatów *Enterobacterales*. Enzymy te hydrolizują antybiotyki beta-laktamowe, takie jak penicyliny, większość cefalosporyn (poza cefamycynami) i monobaktamy. Mechanizm działania opiera się na rozcinaniu pierścienia beta-laktamowego, który jest kluczowym elementem strukturalnym w cząsteczkach hydrolizowanych antybiotyków, co prowadzi do utraty ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. [13] Na przestrzeni lat udało się wykryć różne typy i rodziny należące do ESBL. Wśród licznych rodzin, kluczową rolę kliniczną i epidemiologiczną odgrywają:

1. CTX-M – obecnie najczęściej występująca rodzina ESBL na świecie. Enzymy te wywodzą się z chromosomalnych beta-laktamaz i zostały przeniesione na plazmidy. Hydrolizują cefalosporyny, przede wszystkim cefotaksym. Rodzina CTX-M dzieli się na ponad 150 podtypów, pogrupowanych w pięć grup filogenetycznych: CTX-M-1, -2, -8, -9, -25. Najczęstszym podtypem w Europie pozostaje CTX-M-15, a jego odsetek

u szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* rośnie. Często towarzyszy im oporność na aminoglikozydy, fluorochinolony oraz trimetoprim/sulfametoksazol.

2. TEM – najwcześniej opisana rodzina ESBL, odkryta u pałeczek *E. coli* w Grecji oraz Francji. Podtypy TEM-1 i TEM-2 hydrolizują głównie penicyliny, natomiast wskutek mutacji punktowych w genach doszło do rozszerzenia oporności na cefalosporyny, które zauważalne jest w podtypie TEM-3 i kolejnych. [13]
3. SHV – odkryta po raz pierwszy u *K. pneumoniae*. Pierwotnie hydrolizowała penicyliny, jednakże wskutek mutacji rozwinęła się zdolność do rozkładania cefalosporyn – podtyp SHV-2 i pochodne. Występuje najczęściej u *K. pneumoniae*. [13]

Główną przyczyną rozprzestrzeniania się ESBL jest obecność genów na mobilnych elementach (takich jak plazmidy, transpozony, integrony). Umożliwia to transfer genów między wieloma szczepami bakteryjnymi, w wielu środowiskach, przede wszystkim w środowisku szpitalnym. Mobilne elementy mogą zawierać dodatkowo inne geny oporności (np. związane z opornością na aminoglikozydy lub chinolony), które sprzyjają wykształcaniu fenotypu MDR/XDR u bakterii. [3,13]

Odsetki zakażeń wywołanych przez szczepy ESBL-dodatnie są jednymi z najwyższych w Europie (i Polsce), szczególnie wśród *E. coli* i *K. pneumoniae*. Szczepy te są odpowiedzialne za większość groźnych zakażeń szpitalnych, takich jak bakteremia, zakażenia układu moczowego (ZUM), zakażenia ran oraz zapalenia płuc. Ponadto obserwuje się występowanie tych szczepów w środowiskach pozaszpitalnych. Diagnostyka wymaga stosowania testów fenotypowych, a leczenie powinno być poparte antybiogramem.

Karbapenemazy to grupa beta-laktamaz, które wykazują zdolność do hydrolizy karbapenemów – antybiotyków o szerokim spektrum substratowym, stosowanych w sytuacjach, gdy inne opcje terapeutyczne są wyczerpane. Leki

te są często określane „lekami ostatniej szansy” w terapii ciężkich i wielolekoopornych zakażeń bakteryjnych. Pojawienie się karbapenemaz u *Enterobacterales* jest jednym z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. [12] Karbapenemazy działają poprzez rozkład pierścienia beta-laktamowego karbapenemów, neutralizując ich działanie przeciwbakteryjne. [14] Karbapenemazy dzieli się na kilka głównych klas według klasyfikacji Amblera, która opiera się na różnicach w budowie molekularnej i mechanizmie działania tych enzymów:

1. Klasa A są to serynowe beta-laktamazy, których najbardziej znanym przedstawicielem jest KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Enzymy te potrafią rozkładać szeroki wachlarz antybiotyków beta laktamowych, w tym karbapenemy oraz wykazują oporność na inhibitory beta-laktamaz, takie jak kwas klawulanowy i tazobaktam. KPC jest szeroko rozpowszechniony przede wszystkim w Ameryce i Europie, a jego obecność na plazmidach umożliwia szybkie rozprzestrzenianie się tego mechanizmu wśród różnych gatunków z rodziny *Enterobacterales*. [3,14]
2. Klasa B to metalo-beta-laktamazy (MBL), które do swojego działania wymagają jonów metali, głównie cynku. Najbardziej znaną z tej grupy jest NDM (z ang. *New Delhi Metallo-beta-lactamase*), której wykrycie zapoczątkowało dyskusje na temat lekooporności bakterii. Rozprzestrzenianie NDM jest globalne, obecnie najczęstsze rejony, w których wykrywany jest ten fenotyp stanowią Azja Południowa, Afryka i Europa. Najczęściej wykrywany wariant to NDM-1, ale opisano ponad 20 podtypów. Inne istotne klinicznie MBL to: VIM (z ang. *Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase*) oraz IMP (z ang. *Imipenemase*). VIM jest szeroko rozpowszechniony w Europie, głównie w środowiskach szpitalnych, gdzie najczęściej wykrywa się podtyp VIM-2, dominujący u Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących. Podtyp ten bywa również wykrywany u *Enterobacterales*. IMP został pierwotnie

wykryty w Japonii, obecnie opisano ponad 80 podtypów tego enzymu. Najczęściej wykrywany jest w Azji. [12,14]

3. Klasa D jest to grupa oksycylinaz (OXA). Beta-laktamazy tej grupy cechuje mechanizm serynowy, lecz struktura miejsca aktywnego różni się w innych klasach. Najważniejszym przedstawicielem jest OXA-48, który został po raz pierwszy opisany w Turcji, a obecnie jest rozpowszechniony w Europie i Afryce. OXA-48 skutecznie hydrolizuje karbapenemy, ale wykazuje słabą aktywność wobec cefalosporyn. Ponadto szczepy posiadające ten mechanizm dość często posiadają inne mechanizmy oporności, takie jak np. AmpC (chromosomalna cefalosporynaza), co dodatkowo ogranicza dostępne opcje terapeutyczne. [14]

Zakażenia wywołane przez bakterie produkujące karbapenemazy, takie jak CPE, mogą prowadzić do poważnych utrudnień w leczeniu z powodu ograniczenia dostępnych opcji terapeutycznych. Oporność na karbapenemy wymusza stosowanie leków starszej generacji lub leków o wyższej toksyczności (np. kolistyny). Wczesna diagnostyka i identyfikacja karbapenemaz jest kluczowa nie tylko w kontekście klinicznym, ale także epidemiologicznym, umożliwiając wdrożenie odpowiedniej terapii oraz działań zapobiegawczych w placówkach szpitalnych.

AmpC beta-laktamazy to ważna grupa enzymów, która hydrolizuje antybiotyki beta-laktamowe. Występuje u wielu gatunków *Enterobacterales*. [15] Enzymy AmpC należą do klasy C w klasyfikacji Amblera i są serynowymi beta-laktamazami. Odpowiadają głównie za hydrolizę penicylin, cefalosporyn II i III generacji oraz cefamycyn. Ich aktywność nie obejmuje karbapenemów, co jest cechą różnicującą te enzymy od karbapenemaz. [15] Geny kodujące AmpC mogą być chromosomalne (indukowalne) oraz plazmidowe (o stałej ekspresji). [14] Chromosomalne AmpC jest powszechnie występujące u *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, a ich ekspresja może być indukowana pod wpływem beta-laktamów. Plazmidowe

AmpC jest nabyte i występuje głównie u *E. coli* oraz *K. pneumoniae*. [14,15] Występowanie genów na plazmidach umożliwia ich szybkie przenoszenie za pomocą HGT między bakteriami. Rozprzestrzenianie się plazmidowych AmpC może spowodować wysokie wskaźniki oporności na cefalosporyny III generacji u *E. coli* i *K. pneumoniae* w warunkach klinicznych. Szczepy produkujące AmpC, często jednocześnie wykazują oporność na inne grupy leków, co jest efektem współwystępowania innych genów oporności na plazmidzie i w konsekwencji wykształceniem fenotypu MDR. W Europie i Polsce narasta wykrywalność *Enterobacterales* z AmpC, zwłaszcza w zakażeniach układu moczowego, układu oddechowego i bakteremiach. [11,12] Problem ten dotyczy zarówno środowisk szpitalnych, jak i pozaszpitalnych, co wiąże się z szeroką presją antybiotykową i dynamicznym HGT. Wykrywanie AmpC w testach klasycznych może być niewystarczające, dlatego wymagane są badania fenotypowe i genotypowe. [14] Szczep, który wykazuje oporność na cefalosporyny III generacji oraz niewrażliwość na inhibitory beta-laktamaz sugeruje obecność AmpC. Diagnostyka i wykrywanie AmpC (szczególnie plazmidowych) stanowi wyzwanie w zwalczaniu wielolekooporności w szpitalach i środowisku. Skuteczne procedury kontroli zakażeń powinny być wdrożone, aby móc ograniczyć presję selekcyjną i dynamiczne rozprzestrzenianie tych genów.

### *Zaburzenia w przepuszczalności błony zewnętrznej*

Błona zewnętrzna (OM – ang. *outer membrane*) u bakterii Gram-ujemnych stanowi podstawową linię obrony, działając jako mechaniczna i fizjologiczna bariera przed szkodliwymi warunkami środowiska. OM chroni komórkę bakteryjną przed antybiotykami, środkami dezynfekcyjnymi, białkami i innymi potencjalnie szkodliwymi czynnikami. [1] Poriny to struktury, które odpowiadają za transport substancji o niskiej masie (do 600 Da). Wśród pałeczek *Enterobacterales* poriny produkowane są głównie przez *E. coli*, *E. cloacae* oraz *K. pneumoniae*. Jednym z kluczowych mechanizmów oporności jest modyfikacja porin lub ich utrata, co skutkuje zmniejszeniem

przepuszczalności błony zewnętrznej dla różnych substancji. *E. coli* syntetyzuje poriny OmpC i OmpF, natomiast *K. pneumoniae* – OmpK35 i OmpK36. [16] Zmiany ilościowe (utrata porin) lub jakościowe (mutacja, modyfikacja strukturalna) powodują ograniczenie przenikania antybiotyku do przestrzeni periplazmatycznej i wnętrza komórki bakteryjnej. Zjawisko to dotyczy przede wszystkim beta-laktamów, chinolonów oraz niektórych aminoglikozydów. [16] Utrata OmpK35 zwiększa oporność na cefalosporyny, natomiast dodatkowa utrata lub mutacja w OmpK36 prowadzi do ograniczenia wnikania karbapenemów, w szczególności, gdy współistnieje z produkcją AmpC lub karbapenemaz. Takie zjawisko obserwowane jest wśród szpitalnych szczepów z rodziny *Enterobacterales*, przede wszystkim u *K. pneumoniae*. [16,17] Ten mechanizm oporności jest trudny do przełamania, nawet przy zastosowaniu nowoczesnych antybiotyków i znacznie ogranicza możliwości terapii. Ponadto ten mechanizm może występować z innymi, prowadząc do wytworzenia fenotypu MDR/XDR.

#### *Aktywne usuwanie leku z komórki – pompy efflux*

Pompy efflux to białka, których zadaniem jest aktywne usuwanie substancji szkodliwych dla komórki bakteryjnej do środowiska. Ich zasadnicza rola polega na aktywnym usuwaniu dużej grupy szkodliwych substancji, takich jak antybiotyki, toksyczne metabolity komórkowe, toksyny, metale ciężkie, środki antyseptyczne, dezynfekcyjne i konserwanty. [4] Do działania pomp efflux wymagana jest energia, najczęściej w postaci ATP. Cały proces sprawia, że stężenie leku przeciwdrobnoustrojowego w komórce bakteryjnej jest niższe od poziomu terapeutycznego i umożliwia przetrwanie bakterii mimo obecności czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Ponadto pompy te związane są z wytwarzaniem biofilmu bakteryjnego. [4] Pompy efflux są szeroko rozpowszechnione u pałeczek *Enterobacterales*, stanowiąc jeden z kluczowych nienabytych mechanizmów wielolekooporności. Dzielą się na 5 rodzin, z których kluczowe są rodziny RND (z ang. *Resistance-Nodulation Division*) oraz MFS (z ang. *Major Facilitator Family*). Najlepiej poznaną pompą

z rodziny RND jest pompa AcrAB-TolC, która jest obecna m.in. u *E. coli* i *K. pneumoniae*, ale może być obecna także u *E. cloacae*, w związku z ich bliskim pokrewieństwem. [4,18] System ten składa się z trzech białek: pompy wbudowanej w błonę cytoplazmatyczną (AcrB), kanału błony zewnętrznej (TolC) oraz białka łączącego peryplazmę (AcrA). Układ pompy pozwala na bezpośrednie usuwanie leków z komórki do środowiska, z pominięciem przestrzeni periplazmatycznej. Pompy efflux mają szerokie spektrum transportowanych związków, który obejmuje m.in. niektóre beta-laktamy, chinolony, chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, barwniki, sole żółciowe i detergenty. [16] Ponadto pompy mogą usuwać „leki ostatniej szansy”, takie jak karbapenemy, kolistynę i tigecyklinę przy współwystępowaniu innych mechanizmów oporności, co skutkuje wyzwaniem w leczeniu zakażeń takim szczepem bakteryjnym. [4]

Pompy efflux u *Enterobacterales* może być zarówno wrodzona (naturalnie występująca u niektórych gatunków), jak i nabyta. Nabywanie tego mechanizmu opiera się na kilku ścieżkach, które prowadzą do zwiększonej ekspresji genów lub aktywności pomp. [19]

1. Bakterie mogą nabyć mutacje w obszarach regulatorowych genów kontrolujących ekspresję pomp efflux. Przykładami takich genów są *marR*, *soxS*, *ramA* lub *acrR*, które działają jako represory lub aktywatory szlaków ekspresji systemów z rodziny RND. Mutacje dezaktywujące represory mogą skutkować w niekontrolowanej nadekspresji pompy, a efekt ten utrzymuje się bez presji antybiotyków. Takie szczepy bardzo szybko przenoszą się klonalnie w środowiskach szpitalnych. [4]
2. Część genów kodujących systemy efflux znajdują się na mobilnych elementach genetycznych (takich jak plazmidy, transpozony, integrony). Plazmidy mogą być przekazywane w obrębie szczepów i gatunków *Enterobacterales* na drodze koniugacji, rzadziej przez transformację i transdukcję. W rezultacie fenotyp oporności

wywołanej przez systemy efflux łatwo mogą rozprzestrzeniać się w środowisku szpitalnym, podatnym na kontakt drobnoustrojów wielolekoopornych. [16]

3. Ekspozycja bakterii na subinhibicyjne (mniejsze, niż stężenie terapeutyczne) dawki antybiotyków, środków dezynfekcyjnych, metali ciężkich czy innych toksyn prowadzi do wytworzenia presji selekcyjnej. Bakterie, które cechuje wyższa ekspresja pomp efflux potrafią szybciej się namnażać. Ponadto obecność innych antybiotyków w środowisku komórki bakteryjnej lub obecność innych środków niebędących antybiotykami (takimi jak środki czyszczące) może indukować zwiększoną ekspresję genów systemów efflux, co promuje rozwój tego typu mechanizmu oporności. [16]
4. Zwiększona ekspresja pomp może przebiegać razem z innymi mechanizmami, takimi jak produkcja beta-laktamaz czy zmiany w porinach błon zewnętrznych bakterii. Złożone mobilne elementy genetyczne mogą przenosić wiele genów związanych z mechanizmami oporności, co skutkuje w wytworzeniu fenotypów MDR/XDR. Dodatkowo, niektóre mutacje związane z pompami efflux mogą promować oporność na środki dezynfekcyjne, co zwiększa przeżywalność bakterii w trudnych warunkach środowiskowych. [4]

W praktyce klinicznej nadekspresja pomp efflux wykrywana jest często u *K. pneumoniae* i *E. coli* wykazujących oporność na chinolony oraz tetracykliny. [17] Sam fenotyp oporności jest niezwykle trudny do wykrycia za pomocą rutynowych testów mikrobiologicznych. Nie istnieją obecnie referencyjne testy pozwalające na szybkie i bezpośrednie wykrycie tego mechanizmu oporności u bakterii. W laboratoriach badawczych można przeprowadzić testy fenotypowe (polegające na dodaniu inhibitora pomp efflux do szczepu badanego hodowanego z antybiotykiem) lub testy genotypowe (reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR lub real-time PCR z oceną ekspresji genów w materiale genetycznym). Obecnie nie stosuje się jednak żadnych komercyjnych testów rutynowo wykrywających systemy efflux w standardowej

diagnostyce mikrobiologicznej.

### *Modyfikacje miejsca docelowego działania antybiotyku*

Mechanizm modyfikacji docelowego miejsca działania leku to jeden z istotnych mechanizmów oporności, który umożliwia bakteriom przetrwanie w obecności leków przeciwdrobnoustrojowych. [6] Mechanizm ten może występować u pałeczek *Enterobacterales* i polega przede wszystkim na zmianie docelowego miejsca wiązania antybiotyków beta-laktamowych, czyli białka PBP (z ang. *penicillin-binding protein*) oraz antybiotyków działających na syntezę bakteryjnego DNA (np. chinolonów). [20] Białka PBP znajdują się w błonie komórkowej bakterii i pełnią kluczową rolę w syntezie peptydoglikanu – głównego budulca ściany komórkowej. Beta-laktamy wiążą się z białkiem PBP, blokując ich działanie oraz hamując powstawanie ściany komórkowej. Mutacje punktowe, delecje lub insercje w genach kodujących PBP mogą spowodować zmiany konformacyjne miejsca aktywnego białka. [21] W rezultacie powinowactwo beta-laktamów do białka maleje, a antybiotyk nie jest w stanie zahamować aktywności PBP, co skutkuje przeżyciem bakterii i wykształceniem fenotypu oporności na tę klasę antybiotyków. W rodzinie pałeczek *Enterobacterales* obserwuje się przede wszystkim mutacje w genach kodujących białka PBP, których znaczenie narasta w kontekście zwiększonej presji antybiotyków. [21]

Kolejną istotną modyfikacją są mutacje dotyczące enzymów biorących udział w replikacji i naprawie DNA, takich jak topoizomeraza II i IV. Chinolony hamują funkcję tych enzymów, uniemożliwiając bakteriom podziały i przetrwanie. Mutacje w genach *gyrA* (kodującym topoizomerazę II) i *parC* (kodującym topoizomerazę IV) zmieniają strukturę docelową dla antybiotyku, w wyniku czego nie dochodzi do zahamowania podziałów bakteryjnych. Ten mechanizm oporności jest najczęstszym warunkującym oporność na chinolony, a jego współwystępowanie z innymi mechanizmami może promować powstawanie fenotypu MDR/XDR u bakterii. [21]

Modyfikacje miejsc docelowych mogą powodować brak działania nawet najnowszych antybiotyków beta-laktamowych oraz chinolonów, w szczególności w współwystępowaniu tych mechanizmów wraz z innymi. W praktyce klinicznej pojedyncze mutacje nie wywołują wysokiego poziomu oporności na daną klasę antybiotyków, jednakże w połączeniu z innymi mechanizmami mogą prowadzić do wytworzenia fenotypów wielolekooporności i narastania niepowodzeń terapii.

### *Rola horyzontalnego transferu genów w kształtowaniu wielolekooporności*

Horyzontalny transfer genów to kluczowy mechanizm umożliwiający szybkie szerzenie się mechanizmów oporności na antybiotyki wśród bakterii. Z pomocą HGT bakterie mogą pozyskiwać geny oporności często od niespokrewnionych szczepów czy też gatunków, co przyspiesza rozprzestrzenianie się oporności w środowisku. Do głównych mechanizmów HGT zaliczamy koniugację, transformację oraz transdukcję. [4]






Koniugacja to najważniejszy proces przekazywania materiału genetycznego występującego u bakterii. Koniugacja to również najważniejszy mechanizm szerzenia oporności wśród pałeczek *Enterobacterales*. Polega na bezpośrednim przekazaniu plazmidu z komórki dawcy do komórki biorcy poprzez specjalne struktury (pili płciowe). Plazmidy często zawierają wiele genów kodujących różne mechanizmy oporności i mogą być sprawnie przekazywane w warunkach szpitalnych, które są bardzo sprzyjające dla tego procesu (wysokie zagęszczenie bakterii, obecność bakterii wytwarzających biofilm na sprzęcie medycznym, długotrwała antybiotykoterapia, stosowanie środków dezynfekcyjnych). Koniugacja umożliwia powstawanie tzw. „superplazmidów”, czyli struktur kodujących wiele różnych determinant oporności (np. ESBL, KPC, dodatkowe mechanizmy), co w praktyce klinicznej może oznaczać pojawienie się szczepów bakteryjnych niepodatnych nawet na leki „ostatniej szansy”. [4,22]

Transformacja to proces, w którym bakteria pobiera wolne DNA z

otoczenia i wbudowuje go do swojego genomu. Transformacja rzadziej występuje u *Enterobacterales*, natomiast częściej u bakterii Gram-dodatnich, ale może być istotna w miejscach, gdzie dochodzi do uszkodzeń komórek i uwolnienia materiału genetycznego do środowiska (np. podczas antybiotykoterapii). [22]

W mechanizmie transdukcji dochodzi do przenoszenia fragmentów DNA za pomocą bakteriofagów. Bakteriofagi mogą przenosić geny oporności między komórkami i powodować wytworzenie fenotypu MDR/XDR. Transdukcja ma mniejsze znaczenie, w porównaniu do koniugacji, jednakże może brać udział w rozprzestrzenianiu się determinant oporności. [22]

Efektom HGT jest szybkie i powszechne rozprzestrzenianie się wielolekooporności, zwłaszcza w środowiskach szpitalnych oraz w populacjach bakteryjnych poddanych silnej presji selekcyjnej (np. stosowanie antybiotyków, środków dezynfekcyjnych). Dzięki HGT pałeczki jelitowe mogą wykształcać fenotyp wielolekooporności, dzięki nabywaniu licznych genów kodujących mechanizmy oporności. [4] Kontrola HGT należy do fundamentalnych elementów polityki przeciwdziałania narastaniu wielolekooporności. Kluczowe jest ograniczenie nieuzasadnionej antybiotykoterapii, monitoring ognisk epidemicznych, skuteczna izolacja pacjentów oraz poszukiwanie i wdrażanie nowych strategii terapeutycznych.

Mechanizm/ Kryterium	Opis mechanizmu	Przykłady	Klasy antybiotyków objęte działaniem	Lokalizacja genetyczna	Częstość występowania	Możliwość wykrycia
 Produkcja enzymów inaktywujących antybiotyki	Hydroliza antybiotyków beta-laktamowych, które nie wykazują aktywności	ESBL (CTX-M, TEM, SHV), AmpC, KPC, NDM, OXA-48	Penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy (w zależności od danego enzymu)	Plazmidy, chromosom bakteryjny	Powszechne występowanie (zwłaszcza ESBL, AmpC)	Badania fenotypowe, PCR, sekwencjonowanie
 Zmniejszenie przepuszczalności błony zewnętrznej	Zmiana przepuszczalności błony zewnętrznej – ograniczenie przenikania antybiotyku	Poriny OmpF, OmpC, OmpK35, OmpK36	Beta-laktamy, chinolony	Chromosom bakteryjny	Coraz powszechniejsze w szczepach szpitalnych	Analiza ekspresji białek, real-time PCR, sekwencjonowanie genów
 Pompy efflux	Aktywne wypompowywanie antybiotyków z komórki bakteryjnej	Pompy z rodzin RND, MFS, MATE, SMR, ABC	Beta-laktamy, chinolony, tetracykliny, makrolidy, inne leki (w tym „ostatniej szansy”)	Plazmidy, chromosom bakteryjny	Rzadsze występowanie, występuje częściej w szczepach MDR	Testy fenotypowe z inhibitorami pomp efflux, PCR
 Modyfikacja miejsca działania antybiotyku	Zmiana struktury miejsca działania antybiotyku oraz zmniejszenie powinowactwa antybiotyku	Mutacje w genach pbb, gyrA, parC	Beta-laktamy, fluorochinolony	Chromosom bakteryjny	Występuje rzadziej niż enzymatyczna oporność	Sekwencjonowanie genów
 Horyzontalny transfer genów	Transfer genów oporności znajdujących się na plazmidach, transpozonach, integronach za pomocą procesów: koniugacji, transmisji, transdukcji	Plazmidy z genami ESBL, karbapenemaz, pomp efflux	Wiele klas	Mobile elementy genetyczne	Powszechne występowanie w środowisku szpitalnym	Analizy molekularne

Rycina 1. Najczęściej występujące mechanizmy oporności u pałeczek *Enterobacterales*

## Nowe opcje terapeutyczne w leczeniu lekoopornych *Enterobacterales*

### Nowe antybiotyki z inhibitorami beta-laktamaz

W ostatnich latach nowe połączenia antybiotyków z inhibitorami beta-laktamaz zyskują na znaczeniu. Międzynarodowe agencje leków, takie jak amerykańska FDA (ang. *Food and Drug Administration*) lub europejska EMA (ang. *European Medicines Agency*) w ostatnich 10 latach zatwierdzają nowe połączenia leków z inhibitorami, między innymi do leczenia MDR Gram-ujemnych. Celem takich terapii jest przełamanie oporności warunkowanej obecnością szeroko rozpowszechnionych enzymów, które hydrolizują antybiotyki (np. ESBL, MBL, karbapenemazy).

Cefiderokol to jeden z nowszych antybiotyków z grupy cefalosporyn, który budową zbliżony jest do ceftazydymu oraz cefepimu. Mechanizm działania opiera się na tzw. metodzie „konia trojańskiego”, która polega na chelatowaniu żelaza przez cząsteczkę leku, która wykorzystuje specyficzne transportery żelaza w drobnoustrojach do przejścia przez błonę zewnętrzną.

[23] Nowa struktura cząsteczki cefiderokolu wykazuje zwiększoną stabilność wobec beta-laktamaz, co skutkuje wysoką aktywnością wobec wielu mechanizmów oporności bakterii, takich jak KPC, NDM, OXA oraz VIM. [23] Oprócz działania na enzymy rozkładające beta-laktamazy, lek wykazuje wysokie powinowactwo do białek wiążących penicylinę (białka PBP), zarówno u pałeczek *Enterobacterales* oraz Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących (takich jak np. *Pseudomonas aeruginosa*). Preparat zawierający cefiderokol został zatwierdzony przez EMA w kwietniu 2020 roku oraz przez FDA w listopadzie 2019 roku. [23]

Imipenem/relebactam to połączenie antybiotyku z grupy karbapenemów oraz nowoczesnego inhibitora beta-laktamaz. Mechanizm działania jest połączeniem mechanizmu obu substancji – dochodzi do zakłócenia syntezy białek PBP w ścianie komórkowej bakterii oraz hamowania enzymów, które mogłyby rozkładać ten lek. [24] Skuteczność dotyczy głównie szczepów ESBL-dodatnich oraz KPC-dodatnich, a także niektórych szczepów AmpC-dodatnich. Ponadto wykazano, iż relebactam jest dezaktywowany przez metalo-beta-laktamazy klasy B, takie jak IMP, NDM, VIM oraz wykazuje ograniczone działanie wobec szczepom wytwarzającym OXA-48. [24,25] Imipenem/relebactam został zatwierdzony przez EMA w lutym 2020 roku, a przez FDA w lipcu 2019 roku.

Azteonam-avibactam to obecnie opracowywana kombinacja, która zawiera aztreonam – antybiotyk beta-laktamowy odporny na działanie enzymów MBL, ale podatny na degradację przez inne enzymy, takie jak ESBL, KPC lub AmpC oraz avibactam – skuteczny wobec beta-laktamaz serynowych, lecz nie działający na MBL. [25] Połączenie pokonuje niemalże wszystkie mechanizmy oporności enzymatycznej, umożliwiając leczenie zakażeń szczepami CPE. Kliniczne badania III fazy wykazały 97% skuteczność wobec szczepów MDR/XDR, a sam lek jest rekomendowany do leczenia lekoopornych szczepów, zarówno szpitalnych jak i środowiskowych. [25] Dzięki zadowalającym wynikom badań, FDA zaakceptowała ten lek w

lutym 2025 roku, natomiast EMA zatwierdziła lek w kwietniu 2024 roku.

Sulbactam/durlobactam został zatwierdzony w maju 2023 roku przez FDA, natomiast EMA jeszcze go nie zatwierdziła. Połączenie obu substancji opiera się na kombinacji jednego ze starszych antybiotyków beta-laktamowych – sulbactamu oraz durlobactamu – jednego z nowszych inhibitorów beta-laktamaz. Połączenie to zostało opracowane przede wszystkim w celu leczenia wielolekoopornych *Acinetobacter baumannii* – Gram-ujemnej, często wielolekoopornej pałeczki, wobec której również istnieje możliwość wyczerpania dostępnych opcji terapeutycznych. [25] Sulbactam wykazuje aktywność wobec *A. baumannii*, jednakże potencjał leku jest ograniczony przez aktywność beta-laktamaz. Durlobactam to silny inhibitor beta-laktamaz klasy A, C i D, który chroni sulbactam przed degradacją oraz hamuje większość mechanizmów oporności enzymatycznej. [25] W badaniach porównujących działanie tej kombinacji oraz kolistyny – jednego z leków „ostatniej szansy” wykazano wyższą skuteczność na korzyść połączenia surbactam/durlobactam oraz niższą nefrotoksyczność. [25] Mimo faktu, iż SUL/DUR działa słabo na *Enterobacterales*, jest to jeden z pierwszych leków celowanych i zatwierdzonych do leczenia konkretnego rodzaju bakterii.

Nowoczesne połączenia antybiotyków i inhibitorów może stanowić jeden z głównych aspektów walki z narastającą lekoopornością wśród *Enterobacterales*. Użycie tych leków oparte na zasadach racjonalnej antybiotykoterapii oraz odpowiedniej diagnostyce mikrobiologicznej wraz z interpretacją mechanizmów oporności może umożliwić skuteczne leczenie zakażeń, które były uznawane wcześniej za trudne lub niemożliwe do wyleczenia.

### *Terapia bakteriofagowa – nowa nadzieja w leczeniu*

Terapia bakteriofagowa stanowi jedną z najciekawszych i najszybciej postępujących alternatyw wobec klasycznego leczenia za pomocą antybiotyków, szczególnie w kontekście narastającej lekooporności zarówno u

*Enterobacterales*, ale także u *A. baumannii* oraz *P. aeruginosa*. Bakteriofagi są wirusami bakteryjnymi, które mogą infekować i niszczyć bakterie, dzięki czemu mogą służyć jako specyficzne narzędzie skierowane przeciwko czynnikowi etiologicznemu zakażenia. [26] Bakteriofagi działają na zasadzie rozpoznania konkretnej komórki bakteryjnej i adsorpcji do specyficznych receptorów komórkowych na powierzchni. Następnie wstrzykiwany jest materiał genetyczny bakteriofaga oraz przeprowadzany cykl lityczny, którego efektem końcowym jest rozpad (liza) komórki bakteryjnej. Jedną z największych zalet tej metody jest wysoka swoistość wobec celu oraz zdolność namnażania bakteriofaga w środowisku konkretnej bakterii, bez zaburzania mikrobiomu. [26]

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania kliniczne dotyczące terapii bakteriofagowej. Obecnie na platformie ClinicalTrials.gov zarejestrowanych jest ponad 100 badań klinicznych z udziałem bakteriofagów, które dotyczą przede wszystkim zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi. W retrospektywnych analizach ponad 100 przypadków wykazano poprawę w ponad 77% przypadków oraz eradykację patogenu w 61%. [26] Interesującym aspektem jest najwyższa skuteczność przy stosowaniu bakteriofagów w połączeniu z antybiotykami. Działanie bakteriofagów może przyczynić się do przywrócenia wrażliwości bakterii na antybiotyki, poprzez selekcję mutantów z nadekspresją niektórych mechanizmów oporności (takich jak pompy efflux lub receptory na powierzchni komórek).

Kluczowym wyzwaniem terapii bakteriofagowej pozostaje konieczność doboru odpowiedniego faga do danego szczepu bakteryjnego (personalizacja), ryzyko szybkiego rozwinięcia oporności na fagi oraz problem z szeroką dystrybucją preparatów. Mimo powstałych ograniczeń, badania kliniczne dotyczące terapii bakteriofagami są ciągle prowadzone oraz ich liczba stale rośnie. [26] Bakteriofagi mogłyby być stosowane w zakażeniach miejscowych (zakażenia ran, odleżyny), dożylniej oraz wziewnej (zapalenie płuc związane z wentylacją mechaniczną). W najbliższych latach kluczowe

kroki to: standaryzacja leczenia, rozprzestrzenianie się ośrodków oferujących terapię fagową oraz rozwój baz fagowych, które obejmować będą szczepy wielolekooporne.

### Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP – z ang. *antimicrobial peptides*) to małe oligonukleotydy, które występują naturalnie, odpowiadając za reakcje obronne gospodarza m.in. u człowieka, roślin i zwierząt. AMP wykazuje szerokie spektrum przeciwdrobnoustrojowe, obejmujące bakterie, grzyby, wirusy i pasożyty. [27] W ostatnich latach stanowią przedmiot badań jako potencjalna alternatywa lub uzupełnienie standardowej antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń wywołanych m.in. przez MDR/XDR *Enterobacterales*. AMP działają poprzez interakcję z błoną bakteryjną, prowadząc do destabilizacji, tworzenia porów i w konsekwencji lizy komórki bakteryjnej. Część peptydów może stymulować układ immunologiczny gospodarza, neutralizować endotoksyny lub ułatwiać fagocytozę. [27] Peptydy przeciwdrobnoustrojowe można podzielić ze względu na ich pochodzenie i strukturę – do najważniejszych należą defensyny, katelicydyny oraz peptydy bakteryjne (takie jak nizyna oraz gramicydyna). Obecnie 10 peptydów zostało zatwierdzonych do użytku klinicznego, głównie jako środki miejscowe. [27] Spośród dziesięciu zatwierdzonych środków, tylko trzy są aktywne wobec bakterii Gram-ujemnych, w tym *Enterobacterales*. Polimyksyna B i polimyksyna E (kolistyna) mają aktywność wobec Gram-ujemnych, jednakże są określane jako leki „ostatniej szansy” i nie powinny być stosowane rutynowo w leczeniu zakażeń. [28] Dodatkowo w stężeniach terapeutycznych mogą działać nefrotoksycznie. Gramicydyna D wykazuje działanie wobec bakterii Gram-ujemnych, jednakże jest głównie przeznaczona do leczenia zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi, co więcej toksyczność tego peptydu jest również wysoka.

Badania wykazały, iż połączenie AMP z wybranymi antybiotykami może

efektywnie obniżyć wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC – z ang. *minimal inhibitory concentration*) oraz minimalizować ryzyko selekcji szczepów opornych. Obecnie około 15 peptydów wykazujących szerokie spektrum działania jest używane w badaniach klinicznych, w szczególności do leczenia zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi. Obecnie syntetyczny peptyd PL-5 jest w III fazie badań klinicznych, wykazując działanie w formie aerozolu stosowanego na rany (np. u pacjentów ze stopą cukrzycową). [28]

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią jedną z alternatyw przy narastającym problemie lekooporności bakterii. AMP mogą znaleźć zastosowanie jako preparaty miejscowe (np. aerozole, opatrunki) oraz w terapiach skojarzonych. Najistotniejszym wyzwaniem jest obserwowana toksyczność AMP i ich stabilność, która nie jest w pełni satysfakcjonująca.

### *Fitoterapia – wspomaganie leczenia zakażeń*

Związki pochodzenia roślinnego od wieków stanowią źródło leków i są wykorzystywane zarówno w lecznictwie tradycyjnym, jak i w ramach tradycyjnej fitoterapii. W obliczu narastającego problemu lekooporności bakterii Gram-ujemnych związki naturalne mogą mieć znaczenie jako potencjalne narzędzia wspomagające leczenie zakażeń bakteriami MDR. Najistotniejszymi klasami związków roślinnych, które mają udokumentowane potencjalnie działanie przeciwdrobnoustrojowe to m.in.: alkaloidy, flawonoidy, fenole, taniny, terpeny, a także olejki eteryczne (jak np. eugenol). Związki naturalne mogą działać na wielu płaszczyznach, takich jak: destabilizacja i rozszczelnianie błony komórkowej bakterii, dezorganizacja ściany komórkowej, hamowanie ekspresji genów kodujących mechanizmy oporności, dezaktywacja biofilmu bakteryjnego, dezaktywacja enzymów bakteryjnych, synergizm z antybiotykami. [29]

Flawonoidy to liczna grupa związków polifenolowych obecnych w wielu roślinach. Do flawonoidów najczęściej rozpatrywanych w kontekście działania przeciwdrobnoustrojowego możemy zaliczyć m.in. hesperydynę, kwercetynę

czy katechinę. Mechanizm działania opiera się na destabilizacji błony komórkowej, zwiększania jej przepuszczalności, hamowania syntezy kwasów nukleinowych, enzymów oraz hamowania ekspresji genów oporności. Dodatkowo mogą wykazywać synergizm z innymi antybiotykami, zwłaszcza z beta-laktamami i chinolonami. W badaniach *in vitro* ekstrakty zawierające flawonoidy wykazały aktywność przeciwdrobnoustrojową – katechol i hesperydyna pochodzące z fasoli czerwonej wykazały działanie na MDR *Enterobacterales* będąc w niskich stężeniach. [29]

Taniny i fenole to związki wykazujące silne właściwości ściągające, dodatkowo pełnią funkcje ochronne w roślinach. Związki te mogą działać głównie na Gram-ujemne poprzez denaturację białek błonowych oraz hamowanie syntezy ściany komórkowej. Fenole (w tym eugenol) odpowiadają za zaburzenie struktur błonowych, stres oksydacyjny w komórce bakteryjnej i blokowanie cyklu komórkowego bakterii. [29]






Eugenol jest głównym składnikiem olejków eterycznych z goździka (z łac. *Syzygium aromaticum*), ale obecny jest także w cynamonowcu i bazylii będąc jednym z najlepiej przebadanych związków roślinnych aktywnych wobec bakterii Gram-ujemnych (w tym *Enterobacterales*). Działanie eugenolu opiera się na: uszkodzeniu błony cytoplazmatycznej i zaburzeniu jej przepuszczalności, hamowaniu tworzenia biofilmu (jest to kluczowy mechanizm w zakażeniach szpitalnych opornych na leczenie), hamowaniu ekspresji genów *mcr-1*, które odpowiadają za oporność na kolistynę oraz zmniejszenie aktywności pomp efflux. [29] Ponadto eugenol działa synergistycznie z antybiotykami, powodując obniżenie wartości MIC wielu leków przeciwdrobnoustrojowych. [29] Eugenol wykazuje silne działanie wobec szczepów ESBL-dodatnich oraz CPE *E. coli* i *K. pneumoniae*. W badaniach *in vitro* wykazano, że eugenol w niskich stężeniach (4-8 µg/ml) może być skuteczny wobec szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* opornych na kolistynę (jeden z leków „ostatniej szansy”). Ponadto kombinacja eugenolu z aminoglikozydami, cefalosporynami i kolistyną prowadzi do przywrócenia

wrażliwości bakterii na antybiotyki. Badania potwierdzono w modelu *in vivo*, w którym eugenol okazał się nietoksyczny dla komórek jądrazstych w stężeniach terapeutycznych. [29]

Terpeny to związki, które są obecne np. w olejku cytrynowym, goździkowym i lawendowym, które wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe poprzez zaburzenie integralności błony komórkowej, hamowanie syntezy peptydoglikanu, dezorganizację biofilmu. Mechanizm działania jest niezwykle ważny w zakażeniach przewlekłych ran i na powierzchni materiałów medycznych. [29]

Miód cechuje wielokierunkowe działanie przeciwdrobnoustrojowe, które wynika z zawartości wielu związków chemicznych w jego składzie. [30] Wysoka skuteczność miodu, która obejmuje zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne wynika przede wszystkim z synergistycznego działania wielu mechanizmów, takich jak: niskie pH, które hamuje wzrost i rozwój bakterii; obecność nadtlenku wodoru, który wykazuje silne działanie bakteriobójcze; związki fenolowe i flawonoidy uszkodzające błony komórkowe i zaburzające procesy komórkowe bakterii oraz pszczele peptydy przeciwdrobnoustrojowe, takie jak defensyna-1 i lizozym, które wykazują działanie bakteriolityczne. [30] Szczególnym typem miodu, który wykazuje silne i udokumentowane działanie przeciwdrobnoustrojowe jest miód manuka, który pochodzi z Nowej Zelandii. Miód manuka zawiera bardzo wysokie stężenia metyloglioksalu (MGO), organicznego związku z grupy aldehydów, który wykazuje działanie przeciwko bakteriom lekoopornym, takim jak MRSA, ESBL. Działanie miodu manuka opiera się na wysokich stężeniach MGO oraz nadtlenku wodoru, które zapewniają efekt bakteriostatyczny. [30] W praktyce klinicznej i badaniach *in vitro* miód manuka jest stosowany do wspomaganie leczenia ran, owrzodzeń oraz oparzeń, w szczególności tych, które są trudne do wyleczenia. Miód manuka jest składnikiem opatrunków i preparatów wspomagających leczenie zakażeń miejscowych, co czyni go cennym składnikiem nowoczesnej fitoterapii.

Inne substancje naturalne o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które są wykorzystywane od wieków w medycynie, jak i współczesnych badaniach nad alternatywami dla antybiotyków syntetycznych obejmują: czosnek (głównym składnikiem jest allicyna, która działa na szerokie spektrum bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych); imbir (substancja aktywna – gingerol, który działa przeciwbakteryjnie, przeciwzapalnie i przeciwutleniająco); tymianek (tymol i karwakrol silnie działają na drobnoustroje Gram-ujemne); oregano; goździki (zawierają eugenol); kurkuma (substancją aktywną jest kurkumina, która działa przeciwbakteryjnie, antyoksydacyjnie i przeciwzapalnie) oraz żurawina (flawonoidy obecne w żurawinie działają poprzez hamowanie adhezji np. bakterii *E. coli* do nabłonka dróg moczowych). [29,30] Większość tych substancji została przebadana w warunkach *in vitro* lub *in vivo* na modelach zwierzęcych, dlatego wymaga dalszych badań klinicznych. Środki naturalne mogą być stosowane w terapii wspomagającej klasyczną antybiotykoterapię, stanowiąc istotne narzędzie w walce z lekoopornymi szczepami bakteryjnymi.

Strategia terapeutyczna/ Kryterium	Mechanizm działania	Przykłady	Spektrum działania	Zalety	Wyzwania	Stan kliniczny
 <b>Nowe antybiotyki</b>	Bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe	Cefiderokol, erawacyklina	Wielolekooporne Enterobacterales, Pseudomonas, Acinetobacter	Szerokie spektrum działania, możliwość leczenia szczepów MDR/XDR	Dostępność, wysokie koszty, oporność	Zatwierdzone do użytku klinicznego, niektóre w fazie badań klinicznych
 <b>Nowe połączenia antybiotyków z inhibitorami</b>	Inhibicja aktywności beta-laktamaz, zwiększenie aktywności beta-laktamów	IMI-REL, ATM-AVI, SUL-DUR	ESBL (+), KPC (+), OXA-48(+)	Szerokie spektrum działania, efektywność wobec enzymów bakteryjnych	Brak skuteczności wobec MBL, selekcja szczepów opornych	Zatwierdzone do użytku klinicznego, niektóre w fazie badań klinicznych
 <b>Terapia bakteriofagowa</b>	Przylączenie się bakteriofagów do powierzchni konkretnych szczepów bakteryjnych	Personalizowane koktajle fagowe	Szczepy MDR/XDR, zakażenia ogólnoustrojowe i miejscowe	Terapia precyzyjna, synergizm z antybiotykami	Dobór odpowiednich fagów, potencjalna oporność, wysokie koszty	Badania kliniczne
 <b>Peptydy przeciwdrobnoustrojowe</b>	Uszkodzenie błon bakteryjnych, nasilenie odpowiedzi immunologicznej	Polimyksyna B, polimyksyna E (kolistyna), gramicydyna D	Szczepy lekooporne, Gram (-) i Gram (+)	Szybkie działanie, niska selekcja oporności	Toksyczność	Zastosowane w preparatach miejscowych, badania kliniczne
 <b>Flawonoidy, tanniny, fenole</b>	Destabilizacja błon komórkowych, hamowanie enzymów, biofilmu, pomp efflux	Hesperydyna, kwercetyna, tanniny	MDR Enterobacterales, Gram (-)	Naturalne pochodzenie, szerokie spektrum aktywności	Konieczność dalszych badań, niska biodostępność	Preparaty dodatkowe, badania <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>
 <b>Eugenol</b>	Uszkodzenie błon, hamowanie biofilmu, pomp efflux	Eugenol znajdujący się m.in w goździkach i cynamonie	MDR Enterobacterales, Acinetobacter, Pseudomonas	Niski koszt, wysoki potencjał w wspomaganiu leczenia	Brak standaryzacji, mało bakterii ma określone wartości terapeutyczne, ryzyko toksyczności	Badania <i>in vitro</i> , terapia wspomagająca
 <b>Terpeny</b>	Zaburzenie błon komórkowych	Karwakrol, tymol	Szerokie spektrum działania	Naturalne pochodzenie	Niska biodostępność	Badania <i>in vitro</i>
 <b>Miód</b>	Działanie poprzez nadciśnienie wodoru, niskie pH, flawonoidy i terpeny, metylogliksat	Miód manuka	Bakterie lekooporne powodujące zakażenia ran, owrzodzenia	Kompleksowy mechanizm działania	Brak standaryzacji składu	Zastosowanie w preparatach na zakażenia miejscowe

**Rycina 2.** Nowe strategie terapeutyczne w leczeniu zakażeń lekoopornymi *Enterobacterales*

## PODSUMOWANIE

Narastająca oporność bakterii Gram-ujemnych, w szczególności *Enterobacterales*, stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny, skutecznie ograniczając dostępne opcje terapeutyczne. Choć pierwsze antybiotyki zostały odkryte niecałe 100 lat temu, obecnie problem z opracowywaniem nowych substancji przeciwdrobnoustrojowej skutkuje brakiem przełomu w leczeniu szczepów MDR. Ograniczenie możliwości leczenia powoduje m.in. zwiększoną śmiertelność, wydłużoną hospitalizację oraz zwiększone koszty leczenia zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki są złożone i obejmują mechanizmy enzymatyczne (produkcja ESBL, karbapenemaz), zmiany w przepuszczalności błon komórkowych, czy nadekspresję pomp efflux. Kluczową rolę w rozprzestrzenianiu tych mechanizmów stanowi horyzontalny transfer genów, który umożliwia szybkie narastanie oporności bakterii w różnych środowiskach. W ostatnich latach obserwowany jest dynamiczny rozwój nowoczesnych opcji terapeutycznych, które obejmują nowe generacje połączeń antybiotykowych z inhibitorami beta-laktamaz, terapie bakteriofagowe oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Niezwykle obiecującą opcją okazują się naturalne związki, które mogą wspierać antybiotykoterapię i działać na bakterie MDR/XDR. Warto podkreślić znaczenie substancji, takich jak eugenol czy produktów, takich jak miód manuka, które mogą wspierać leczenie przewlekłych zakażeń ran. Przyszłość walki z antybiotykoterapią powinna opierać się przede wszystkim na precyzyjnej diagnostyce mikrobiologicznej, a także w uzasadnionych przypadkach analizach molekularnych. Podejście integrujące precyzyjną diagnostykę mikrobiologiczną z konsekwentnym stosowaniem zasad racjonalnej antybiotykoterapii może spowolnić, a nawet odwrócić narastający problem lekooporności bakterii Gram-ujemnych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Majewski P, Wieczorek P, Ojdana D, Sienko A, Kowalczyk O, Sacha P, i in. Altered outer membrane transcriptome balance with AmpC overexpression in carbapenem-resistant enterobacter cloacae. *Front Microbiol.* 2016;7(DEC). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066375/>, data dostępu [23 December 2016]
2. Lye DC, Earnest A, Ling ML, Lee TE, Yong HC, Fisher DA, i in. The impact of multidrug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gram-negative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):502–8. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21851482/>, data dostępu [May 2012]
3. European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm; 2023.
4. Korczak L, Majewski P, Iwaniuk D, Sacha P, Matulewicz M, Wieczorek P, i in. Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among Enterobacterales. *Front Cell Infect Microbiol.*;14:1289396. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38655285/>, data dostępu [9 April 2024]
5. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol [Internet].*;9(NOV):426686. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555448/>, data dostępu [30 November 2018]
6. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6604941/>, data dostępu [26 June 2018]
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, i in. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.*;18(3):268–81. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>, data dostępu [March, 2012]
8. Tangsawad W, Kositamongkol C, Chongtrakool P, Phisalprapa P, Jitmuang A. The burden of carbapenem-resistant Enterobacterales infection in a large Thai tertiary care hospital. *Front Pharmacol.*;13:972900. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36120317/>, data dostępu [2 September 2022]
9. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024- Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization. 2024;1–72. Dostępne na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf>, data dostępu [2024]
10. Antimicrobial resistance - European Commission.. Dostępne na: [https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance\\_en](https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance_en), data dostępu [2025]
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2023. Stockholm; 2024. Dostępne na: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-annual-epidemiological-report-EARS-Net-2023.pdf>, data dostępu [2024]
12. Narodowy Instytut Leków. Pałeczki Enterobacterales wytwarzające karbapenemazy (CPE). Epidemiologia, diagnostyka, leczenie i profilaktyka zakażeń. Warszawa; 2022. Dostępne na: [https://korld.nil.gov.pl/wp-content/uploads/2023/03/Rekomendacje-Paleczki-Enterobacterales\\_2023.21.02-1.pdf](https://korld.nil.gov.pl/wp-content/uploads/2023/03/Rekomendacje-Paleczki-Enterobacterales_2023.21.02-1.pdf), data dostępu [21 February 2023]
13. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist* 3(3). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34286272/>, data dostępu [1 September 2021]

14. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*;20(3):440–58. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630334/>, data dostępu [July 2007]
15. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. styczeń 2009;22(1):161–82. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136439/>, data dostępu [January 2009]
16. Masi M, Réfregiers M, Pos KM, Pagès JM. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol*.;2(3). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28224989/>, data dostępu [22 February 2017]
17. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*.;4(2):107–18. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302790/>, data dostępu [15 February 2013]
18. Thakur V, Uniyal A, Tiwari V. A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. *Eur J Pharmacol [Internet]*.;903. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33964293/>, data dostępu [15 July 2021]
19. González-Villarreal JA, González-Lozano KJ, Aréchiga-Carvajal ET, Morlett-Chávez JA, Luévanos-Escareño MP, Balagurusamy N, i in. Molecular mechanisms of multidrug resistance in clinically relevant enteropathogenic bacteria (Review). *Exp Ther Med*.;24(6):753. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9748766/>, data dostępu [8 November 2022]
20. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 sierpień 2016;6(8). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329032/>, data dostępu [1 August 2016]
21. Sethuvel DPM, Bakthavatchalam YD, Karthik M, Irulappan M, Shrivastava R, Periasamy H, i in.  $\beta$ -Lactam Resistance in ESKAPE Pathogens Mediated Through Modifications in Penicillin-Binding Proteins: An Overview. *Infect Dis Ther*.;12(3):829–41. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36877435/>, data dostępu [1 March 2023]
22. Tokuda M, Shintani M. Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microb Biotechnol*.;17(1). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38226780/>, data dostępu [1 January 2024]
23. Wang C, Yang D, Wang Y, Ni W. Cefiderocol for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Systematic Review of Currently Available Evidence. *Front Pharmacol*. ;13. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35496290/>, data dostępu [12 April 2022]
24. Tehrani KHME, Martin NI.  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: an update. *Medchemcomm*. ;9(9):1439. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6151480/>, data dostępu [2018]
25. Alarcia-Lacalle A, Canut-Blasco A, Solinís MÁ, Isla A, Rodríguez-Gascón A. Clinical efficacy, safety and pharmacokinetics of novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: a systematic review. *JAC Antimicrob Resist*.;7(3). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40583996/>, data dostępu [1 June 2025]
26. Palma M, Qi B. Advancing Phage Therapy: A Comprehensive Review of the Safety, Efficacy, and Future Prospects for the Targeted Treatment of Bacterial Infections. *Infect Dis Rep*. ;16(6):1127–81. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39728014/>, data dostępu [1 December 2024]
27. Yadav N, Chauhan VS. Advancements in peptide-based antimicrobials: A possible option for emerging drug-resistant infections. *Adv Colloid Interface Sci*. ;333. Dostępne na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868624002057>, data dostępu [1 November 2024]
28. Barreto-Santamaría A, Arévalo-Pinzón G, Patarroyo MA, Patarroyo ME. How to Combat Gram-Negative Bacteria Using Antimicrobial Peptides: A Challenge or an Unattainable Goal? *Antibiotics*.;10(12):1499. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8698890/>, data dostępu [1 December 2021]
29. Alam M, Bano N, Ahmad T, Sharangi AB, Upadhyay TK, Alraey Y, i in. Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial

- Strains Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Antibiotics*.;11(7):855. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9312036/>, data dostępu [1 July 2022]
30. Stan D, Enciu AM, Mateescu AL, Ion AC, Brezeanu AC, Stan D, i in. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. *Front Pharmacol.*;12:723233. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34552489/>, data dostępu [6 September 2021]

# LEKOOPORNOŚĆ BAKTERII- MECHANIZMY, DIAGNOSTYKA MIKROBIOLOGICZNA I PROFILAKTYKA W ODDZIAŁACH SZPITALNYCH

Bacterial Antibiotic Resistance – Mechanisms, Microbiological  
Diagnostics and Prevention in Hospital Wards

**Emilia Skrodzka<sup>1\*</sup>, Roman Cemaga<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pro-Medica" Sp. z o.o., Elk, emilia.skrodzka.priv@gmail.com (\*autor korespondencyjny)

<sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe „Biochemii Chorób Cywilizacyjnych”, Zakład Higieny,  
Epidemiologii i Ergonomii, ul. Mickiewicza 2C 15-022, Białystok, Uniwersytet Medyczny w  
Białymstoku

## WPROWADZENIE

Odkrycie i wprowadzenie do praktyki klinicznej antybiotyków zrewolucjonizowało współczesną medycynę i nieodzownie zmieniło wzorce terapeutyczne na całym świecie. Leki przeciwbakteryjne są jednym z najważniejszych odkryć, które zmieniły jakość życia człowieka poprzez zapobieganie zagrażającym życiu infekcjom [1].

Leczenie chorób z wykorzystaniem drobnoustrojów produkujących antybiotyki sięga tysiącleci. Leczenie otwartych ran za pomocą okładów ze spleśniałego chleba stosowano już ponad 2 000 lat temu. Najstarszym zachowanym dokumentem o charakterze medycznym jest Papirus Ebera z 1550 r. p.n.e., w którym znaleźć można takie „medykamenty” jak ziemia lecznicza i spleśniały chleb [2]. Jednakże koncepcja chemioterapii leżąca u podstaw leków przeciwinfekcyjnych przypada na 1910 rok, kiedy to odkryto pierwszy syntetyczny antybiotyk – salwarsan. Od tego czasu, dzięki wprowadzeniu antybiotyków, średnia długość życia człowieka wydłużyła się o 23 lata. „Złoty wiek” odkrywania antybiotyków jako produktów naturalnych rozpoczął się 1928 roku, kiedy nastąpiło odkrycie penicyliny. Jego szczyt

przypada jednak na połowę lat pięćdziesiątych XX wieku. Po tym czasie zaobserwowano stopniowy spadek nowych odkryć leków przeciwdrobnoustrojowych [2].

Poza leczeniem chorób zakaźnych antybiotyki stosowane są także w zapobieganiu zakażeń u chorych na raka, podczas operacji czy u chorych z przeszczepami narządów [1]. Niestety, zwiększająca się ilość stosowanych antybiotyków w sektorach zdrowia i rolnictwa uwarunkowała pojawienie się oporności na te środki [3]. Lekooporność bakterii występuje najczęściej w placówkach opieki zdrowotnej i dotyczy głównie pacjentów z niedoborem odporności, osoby starsze oraz osoby wymagające regularnej opieki medycznej. Zjawisko to zagraża skutecznemu leczeniu, a tym samym zdrowiu ludzkiemu, w szczególności krytycznie chorych pacjentów [3].

W ciągu ostatnich dekad zaobserwowano spadek liczby nowych antybiotyków, głównie ze względu na rosnące koszty ich rozwoju i trudności w identyfikacji nowych związków. Obecnie występuje wysoki poziom oporności na wiele dostępnych antybiotyków, co prowadzi do pojawienia się bakterii wielolekoopornych, szerokolekoopornych i ogólnolekoopornych. Przykładami takich bakterii są *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, które wykazują oporność na liczne antybiotyki. Światowa Organizacja Zdrowia oszacowała, że do roku 2050 może nastąpić 10 milionów zgonów z powodu wzrostu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, co stanowi jeden z głównych problemów i zagrożeń zdrowia publicznego obecnych czasów [3].

Biorąc pod uwagę narastające zagrożenie spowodowane lekoopornością bakterii niezbędne jest zrozumienie genetycznych i biochemicznych podstaw tych mechanizmów oraz wykształcenie strategii dla przeciwdziałania narastającej oporności i ochrony zdrowia publicznego.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wybranych mechanizmów lekooporności bakterii powszechnie wywołujących infekcje zagrażające życiu pacjentów; przedstawienie genetycznych i biochemicznych podstaw tych mechanizmów; nakreślenie konsekwencji wynikających z narastającej

lekooporności bakterii oraz aktualnych strategii zapobiegania lekooporności w oddziałach szpitalnych.

## MECHANIZMY NABYCIA OPORNOŚCI

Opornością na antybiotyki nazywamy mechanizm obronny mikroorganizmów na działanie konkretnych środków. Zależy ona od miejsca docelowego oraz charakteru i rodzaju leku, który zakłóca określony szlak. W konsekwencji patogeny aktywują alternatywny mechanizm, aby uniknąć bakteriostatycznego lub bakteriobójczego działania antybiotyku [1]. Aspekty oporności możemy podzielić na biochemiczne i genetyczne [3].

Do biochemicznych aspektów oporności należą:

1. **Inaktywacja antybiotyków**, czyli proces, w którym cząsteczka antybiotyku jest dezaktywowana przez enzymy opornych komórek patogenów. Wskutek działania enzymów zachodzi inaktywacja hydrolizy, przeniesienie grup lub proces redoks. Przykładem inaktywacji hydrolizy jest zniszczenie pierścienia  $\beta$ -laktamowego penicyliny przez bakterie wytwarzające  $\beta$ -laktamazę, takie jak *E. coli* lub *K. pneumoniae*. Strategia wykorzystująca proces redoks polega na inaktywacji cząsteczki leku przez utlenienie lub redukcję [3].
2. **Zmniejszona penetracja antybiotyków**, która została nabyta przez bakterie w wyniku zmniejszenia przepuszczalności błony komórkowej. Za przykład może posłużyć komórka *Mycobacterium tuberculosis*, której zewnętrzna warstwa ściany komórkowej jest zbudowana z długołańcuchowych kwasów mykoloowych, dzięki czemu jest wyjątkowo lipofilna. Leki hydrofilne penetrują natomiast komórkę przez kanały typu poryn, które występują w niskim stężeniu, co spowalnia przenikanie leków. Zatem ściana komórkowa prątków zmniejsza przepuszczalność antybiotyków, jednocześnie umożliwiając nabycie naturalnej oporności [3].

3. **Aktywacja pompy wypływowej**, za pomocą, której wydalane są z komórki toksyczne dla niej związki, w tym antybiotyki. Pompy efluksowe to białka transportowe zlokalizowane w błonie ściany komórkowej, które mogą być specyficzne dla jednego antybiotyku oraz wielu jednocześnie. Znane grupy antybiotyków usuwane w ten sposób to makrolidy, fluorochinolony, oksazolidynony,  $\beta$ -laktamy, cefalosporyny oraz karbapenemy czwartej generacji. Inną rolą pompy wypływowej jest transport składników odżywczych [3].
4. **Obejście celu**, czyli wytworzenie alternatywnych białek przejmujących rolę innego, funkcjonalnego białka, aby wytworzyć oporność na antybiotyk. Za przykład może posłużyć gen *mecA* kodujący białko wiążące penicylinę - PBP-2A, które u *S. aureus* umożliwia oporność na metycylinę. W porównaniu do PBP nowe białko charakteryzuje się niskim powinowactwem do metycyliny. *MecA* zawiera również struktury genów, które odpowiadają za oporność na inne antybiotyki niż  $\beta$ -laktamowe [3].

Do genetycznych aspektów oporności zalicza się oporność mutacyjną i poziomy transfer genów [3]. Do oporności mutacyjnej należą:

1. **Spontaniczna mutacja** spowodowana najczęściej ingerencją w replikację DNA. Za przykład może posłużyć oporność na ryfampicynę, występująca w genie *rpoB* kodującym polimerazę DNA u *M. tuberculosis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Są to najczęściej mutacje jedno- i wielokrotne nukleotydów, zawierające insercje i delecje. Mogą powodować różne spektrum oporności i wpływać na szybkość działania leku [3].
2. **Hipermutacja** odgrywająca istotną rolę w rozwoju oporności na antybiotyki, co ma negatywny wpływ na leczenie przeciwdrobnoustrojowe. Hipermutatory to mikroorganizmy charakteryzujące się zwiększoną skłonnością do przechodzenia przez spontaniczne mutacje z powodu wad w naprawie DNA lub błędów w

systemie unikania. Wyższy współczynnik mutacji umożliwia bakteriom szybkie dostosowywanie się do środków przeciwdrobnoustrojowych, pasożytów wirusowych lub odporności gospodarza. Udowodniono, że hipermutacja przynosi ewolucyjne korzyści w przystosowaniu bakterii do nowego środowiska. Przykładowo hipermutacja umożliwia *P. aeruginosa* wywołanie infekcji płuc poprzez szereg adaptacji fenotypowych, w tym tworzenie biofilmu i mutacje genetyczne zapewniające długotrwałe przetrwanie [3].

3. **Mutacja adaptacyjna**, jest jednym z głównych źródeł oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w środowisku klinicznym. Cechą charakterystyczną tej mutacji jest jej występowanie w mikroorganizmach, które nie dzielą się i są narażone na nieśmiercionośną presję selekcyjną, taką jak warunki odżywcze, stan wzrostu oraz subinhibicyjne poziomy antybiotyków. Mutacja ta ma również przejściowy charakter, co oznacza, że może powrócić do pierwotnego stanu, gdy czynniki wyzwalające przestaną działać. Dlatego mutacja adaptacyjna jest znana również jako mutacja kierunkowa, mutacja indukowana selekcją lub mutacja w fazie stacjonarnej. Udowodniono, że adaptacyjna mutacja jest regulowana przez reakcję na uszkodzenie DNA, która powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego, zwiększoną naprawę DNA i pojawienie się oporności. Adaptacyjne mutacje przyczyniają się również do znacznego wzrostu liczby szczepów MDR (*multidrug-resistant*, wielolekooporne) i XDR (*extensively drug-resistant*, szerokolekooporne) *M. tuberculosis* podczas leczenia infekcji [3].

Innym dobrze zbadanym mechanizmem oporności na antybiotyki jest poziomy **transfer genów**, zwany również transferem bocznym. Transfer boczny może zachodzić między różnymi prokariotami lub między eukariontem a prokariotem. Przenoszenie genów oporności między różnymi genomami odbywa się zwykle poprzez transformację, koniugację lub transdukcję.

Przykładowo gen odpowiedzialny za oporność na metycylinę, *mecA* rozprzestrzenia się zwykle poprzez koniugację, transformację lub transdukcję u wrażliwych na metycylinę *S. aureus*, co prowadzi do powstania MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* oporne na metycylinę). Stwierdzono również, że MRSA nabywa geny oporne na wankomycynę poprzez koniugację z VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*, enterokoki oporne na wankomycynę) podczas współzakażenia [3].

## CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH MECHANIZMÓW LEKOOPORNOŚCI BAKTERII

### ***Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase (KPC)***

Enzym KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*; karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae*) po raz pierwszy wykryto w 1996 roku w Stanach Zjednoczonych. Od tamtej pory, występowały regionalne ogniska *K. pneumoniae* wytwarzającego KPC, które rozprzestrzeniły się na całym świecie [4]. KPC jest jednym z głównych czynników oporności *K. pneumoniae* na karbapenemy i może szeroko się rozprzestrzeniać dzięki obecności na różnych plazmidach. Enzymy KPC należą do głównej rodziny karbapenemaz serynowych klasy A, produkowanych głównie przez *K. pneumoniae*. W rzeczywistości, KPC jest najczęstszym powodem oporności na karbapenemy wśród *Enterobacteriaceae* [5].

Za globalne rozpowszechnienie KPC jest odpowiedzialny gen oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe *bla<sub>KPC</sub>*, zatem szczepy posiadające ten gen są głównym źródłem obaw dla systemów opieki zdrowotnej na całym świecie [6]. Rozprzestrzenianie się genu *bla<sub>KPC</sub>* obejmuje zarówno poziomy transfer genów i plazmidów *bla<sub>KPC</sub>*, jak i rozprzestrzenianie się klonalne. Międzynarodowe rozprzestrzenianie się *K. pneumoniae* produkującej KPC ma znaczenie epidemiologiczne i jest głównie związane z jednym typem sekwencji multilocus - ST258 i jego pokrewnymi wariantami. Niemniej jednak,

molekularne czynniki przyczyniające się do sukcesu ST258 pozostają w dużej mierze niejasne [5,6].

Szczepy produkujące KPC są nie tylko zdolne do hydrolizy karbapenemów, ale są również odporne na różne antybiotyki  $\beta$ -laktamowe oraz nie- $\beta$ -laktamowe [6].

### ***Oxacillinase-48 (OXA-48)***

OXA-48 (*Oxacillinase-48*; oksacylina-48) należy do enzymów klasy  $\beta$ -D-laktamaz według klasyfikacji Amblera. Została po raz pierwszy opisana w izolacie *K. pneumoniae* z Turcji w 2001 roku [7]. Pierwszy opis izolatów z genami  $\beta$ -laktamazy OXA-48-like (*bla*<sub>OXA-48-like</sub>) w Stanach Zjednoczonych pochodzi z badania obserwacyjnego przeprowadzonego w 2013 roku [8].

Enzym OXA-48 skutecznie hydrolizuje penicyliny, powoli karbapenemy, a słabo cefalosporyny o rozszerzonym spektrum. Nie jest hamowany przez tazobaktam, sulbaktam ani kwas klawulanowy. Rezerwuary OXA-48 zidentyfikowano u wielu gatunków *Enterobacteriaceae* poza *K. pneumoniae*, w tym *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *K. oxytoca*, *Serratia marcescens* oraz *Providencia rettgeri*. Oprócz OXA-48 opisano kilka jego wariantów o podobnych profilach enzymatycznych, przy czym każdy różni się od OXA-48 jedynie kilkoma aminokwasami [7,9].

### ***New Delhi Metallo-beta-laktamase (NDM)***

NDM (*New Delhi Metallo-beta-laktamase*; metalo- $\beta$ -laktamaza z New Delhi) to enzym wyizolowany po raz pierwszy w 2008 roku, który zdolny jest do hydrolizy niemal wszystkich  $\beta$ -laktamów. Do tej pory zidentyfikowano dwadzieścia cztery warianty NDM w 11 rodzinach bakterii, z których kilka wykazuje zwiększoną aktywność karbapenemazy. *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* są głównymi nosicielami genu *bla*<sub>NDM</sub>, a niektóre typy sekwencji są szczególnie powszechne, np. dla *K. pneumoniae* są to ST11,

ST14, ST15 i ST147; dla *E. coli*, ST167, ST410 i ST617. Szczepy dodatkowo pod względem NDM zostały wykryte na całym świecie. Większość plazmidów przenoszących gen *bla<sub>NDM</sub>* należy do ograniczonych typów replikonów, takich jak IncX3, IncFII oraz IncC, odgrywających ważną rolę w transporcie różnych genów oporności wielolekowej między gatunkami bakterii [10,11].

### ***Extended-Spectrum Beta-lactamase (ESBL)***

ESBL (*Extended-Spectrum Beta-lactamase*;  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum) są główną przyczyną oporności na  $\beta$ -laktamy u pałeczek Gram-ujemnych [12]. ESBL to grupa enzymów kodowanych przez plazmidy, które hydrolizują penicyliny, cefalosporyny o rozszerzonym spektrum oraz aztreonam [12]. ESBL są wynikiem produkcji enzymów SHV, TEM i CTX-M, które są kodowane przez geny *blaSHV*, *blaTEM* i *blaCTX-M*. Opisano prawie 300 różnych wariantów ESBL. Wśród *Enterobacteriaceae*, ESBL występują głównie u *Klebsiella spp.* i *Escherichia coli*, a także w innych rodzinach *Enterobacteriaceae*, takich jak *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Salmonella spp.* i *Serratia spp.* [13,14]. Bakterie Gram-ujemne produkujące ESBL powodują częstsze stosowanie innych, droższych środków przeciwdrobnoustrojowych (takich jak karbapenemy), co wydłuża pobyt w szpitalu i zwiększa zachorowalność, śmiertelność oraz koszty opieki zdrowotnej. Bakterie produkujące ESBL mogą kolonizować przewód pokarmowy dzieci i są związane z infekcjami zarówno u dorosłych, jak i dzieci, w tym zakażeniami dróg moczowych, jamy brzusznej i krwi [15,16].

### ***Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)***

*S. aureus* stanowi jedną z najczęstszych przyczyn infekcji u ludzi. Historycznie, oporność *S. aureus* pojawiła się zaledwie 2 lata po wprowadzeniu penicyliny. Pod koniec lat pięćdziesiątych XX wieku opracowano półsyntetyczny antybiotyk, metycylinę, a w 1960 roku zidentyfikowano MRSA [17].

Zakażenia wywołane przez metycylinooporne szczepy *S. aureus* wiążą się z wyższą śmiertelnością niż te wywołane przez szczepy wrażliwe na metycylinę. Ponadto, prowadzą one do wydłużenia pobytu w szpitalu i zwiększonych kosztów opieki zdrowotnej [17,18]. Szczepy MRSA produkują zmienione białko PBP (*Penicillin binding proteins*, białko wiążące penicylinę), które ma mniejsze powinowactwo do większości półsyntetycznych penicylin. To białko jest kodowane przez nabyty gen *mecA*, który znajduje się na ruchomym elemencie genetycznym zwanym kasetą chromosomalną *mec*. Pojawienie się szczepów MRSA wynika z nabycia i integracji tych ruchomych elementów genetycznych do chromosomów wrażliwych szczepów [19].

W większości przypadków MRSA odpowiada za co najmniej 25-50% zakażeń *S. aureus* w warunkach szpitalnych. Stanowią one poważny problem ze względu na wysoką zachorowalność i śmiertelność oraz oporność na wszystkie dostępne penicyliny i większość innych leków  $\beta$ -laktamowych, z wyjątkiem ceftaroliny i ceftobiprolu [17].

### ***Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE)***

Szczególnym wyzwaniem w leczeniu w warunkach szpitalnych jest VRE. *Enterokoki* to fakultatywne beztlenowe bakterie Gram-dodatnie, które tworzą pary lub łańcuchy i żyją w przewodzie pokarmowym, zwykle będąc komensalami ludzi. Mogą jednak wywoływać różne infekcje, najczęściej zakażenia dróg moczowych, zakażenia wewnątrzbrzuszne, bakteriemię czy zapalenie wsierdza. Dodatkowo, *Enterococcus* oporny na wankomycynę często występuje jako kolonizujący organizm, który nie zawsze prowadzi do infekcji, co utrudnia określenie, kiedy i jak leczyć te zakażenia. Mimo tych trudności wykazano, że infekcje wywołane przez *Enterococcus* oporny na wankomycynę zwiększają koszty oraz śmiertelność w porównaniu z izolatami wrażliwymi na wankomycynę [20,21].

*Enterokoki* wykształciły różnorodne mechanizmy oporności na wiele antybiotyków, takich jak aminoglikozydy,  $\beta$ -laktamy, tetracykliny, chinolony

oraz wankomycyna (glikopeptyd). Oporność *Enterococcus* na wankomycynę wynika głównie ze zmian w budowie peptydoglikanu, który tworzy ścianę komórkową bakterii. W normalnych warunkach wankomycyna wiąże się z końcem D-Ala-D-Ala prekursorów peptydoglikanu. Oporność pojawia się, gdy ten koniec ulega zmianie na D-Ala-D-mleczan, co zmniejsza powinowactwo wankomycyny. Zmiany te są kodowane przez geny oznaczane literami od *VanA* do *VanG*. Najczęstsze są genotypy *VanA* i *VanB* przenoszone przez plazmidy, a następnie chromosomalne fenotypy *VanD* i *VanC*. *Enterococcus* odporny na aminoglikozydy, z wyjątkiem streptomycyny, wykazuje oporność głównie z powodu inaktywacji enzymu 2"-fosfotransferazy-6'-acetylotransferazy, natomiast oporność na streptomycynę wynika z produkcji adenylotransferazy streptomycyny [22–24].

## DIAGNOSTYKA MIKROBIOLOGICZNA MECHANIZMÓW LEKOOPORNOŚCI BAKTERII

Zgodnie z EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości) zalecane metody wykrywania mechanizmów lekooporności obejmują przede wszystkim metodę dyfuzyjno-krażkową i e-test oraz metody molekularne, takie jak PCR (*polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowej polimerazy), PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*, reakcja łańcuchowej polimerazy - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), RT-PCR (*reverse-transcription polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowej polimerazy w której pierwszy etap jest przeprowadzany przez odwrotną transkryptazę) sekwencjonowanie Sangera, Western Blot, mikromacierze [25,26].

Metoda dyfuzyjno-krażkowa, znana także jako metoda Kirby-Bauera, to rutynowe badanie umożliwiające zaklasyfikowanie badanego szczepu jako wrażliwy, średnio wrażliwy lub odporny na dany antybiotyk. W tej metodzie na agarową płytkę nanosi się zawiesinę bakterii o stężeniu 0,5 MacFarlanda i

umieszcza krążki nasączone antybiotykiem. Wynik odczytuje się po 18 godzinach inkubacji. Metoda jest zalecana dla szybko rosnących drobnoustrojów. [26]

E-test to metoda ilościowo-jakościowa bazująca na dyfuzji antybiotyku z paska, który uwalnia antybiotyk w gradientach stężeń. Po 18 godzinach inkubacji tworzy się eliptyczna strefa zahamowania wzrostu, a granica tej strefy przecinająca pasek pozwala wyznaczyć MIC (*minimum inhibitory concentration*, minimalne stężenie hamujące) [27].

W diagnostyce oporności na leki stosuje się także metody molekularne, wykrywające zmiany na poziomie DNA, RNA i ekspresji genów. Do kluczowych metod należą: PCR, PCR-RFLP, RT-PCR, sekwencjonowanie Sangera, Western Blot oraz mikromacierze. PCR to metoda analizy DNA, szczególnie użyteczna przy znanych mechanizmach oporności. Modyfikacje PCR obejmują PCR-RFLP, gdzie amplifikowany DNA jest trawiony enzymami restrykcyjnymi, pozwalając na identyfikację mutacji punktowych. Sekwencjonowanie Sangera umożliwia odczyt sekwencji DNA poprzez kopiowanie katalizowane przez polimerazę DNA. RT-PCR i qPCR oceniają ekspresję RNA. Western Blot i mikromacierze analizują białka; Western Blot wykorzystuje elektroforezę i przeciwciała, mikromacierze hybrydują sekwencje DNA lub cDNA z fluorochromami do analizy genów [25,26,28].

## **KONSEKWENCJE WYNIKAJĄCE Z NARASTAJĄCEJ LEKOOPORNOŚCI BAKTERII**

Narastająca lekooporność drobnoustrojów wywołuje istotne konsekwencje kliniczne, epidemiologiczne, mikrobiologiczne, ekonomiczne i społeczne [29]. Z punktu widzenia klinicznego oporność ogranicza efektywność terapii zwiększając ryzyko poważnych powikłań oraz zmuszając do stosowania mniej efektywnych terapii ratunkowych. Przemieszczanie się ludzi i towarów w związku z globalizacją nasila ten problem. Dane epidemiologiczne sugerują, że do 2050 roku śmiertelność spowodowana przez

bakterie antybiotykooporne może przekroczyć liczbę ofiar chorób nowotworowych [29].

Diagnostycznie, wykrywanie lekooporności wymaga zastosowania zaawansowanych metod analitycznych, zwiększając koszty i czas oczekiwania na wyniki, a także podkreśla potrzebę badań molekularnych, których dostępność w Polsce jest ograniczona.

Z ekonomicznego punktu widzenia zwiększona lekooporność generuje dłuższe pobyty w szpitalu oraz większe koszty leczenia [29].

Společnie, lekooporność bakterii wywołuje lęk pacjentów i ich rodzin, obawy związane z powrotem do zdrowia i utratą kariery zawodowej, oraz problemami z przyjęciem do placówek medycznych [29].

## **AKTUALNE STRATEGIE ZAPOBIEGANIA LEKOOPORNOŚCI W ODDZIAŁACH SZPITALNYCH**

Oporność na antybiotyki stanowi światowy kryzys zdrowotny, który poważnie zagraża nowoczesnej medycynie. Konieczne jest natychmiastowe wdrożenie skutecznych środków prewencyjnych, aby zapobiec powstawaniu i szerzeniu się oporności na antybiotyki. Aktualne strategie zapobiegania lekooporności w oddziałach szpitalnych w Polsce można znaleźć w rekomendacjach Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków. Program ten oferuje szczegółowe wytyczne dotyczące profilaktyki, diagnostyki i terapii zakażeń, zwłaszcza w oddziałach intensywnej terapii (OIT), gdzie problem lekooporności jest szczególnie nasilony [30].

Główne elementy strategii obejmują profilaktykę zakażeń, racjonalizację stosowania antybiotyków, szkolenie personelu oraz monitoring i kontrolę zakażeń. Oznacza to, że kluczowe jest wdrażanie ścisłych procedur higienicznych, izolacji pacjentów zakażonych lekoopornymi drobnoustrojami oraz stosowanie środków dezynfekcyjnych przeciwko opornym patogenom. Kolejnym ważnym elementem jest ograniczenie nadużywania antybiotyków

poprzez precyzyjną diagnostykę i stosowanie terapii zgodnej z aktualnymi wytycznymi. Istotne jest również unikanie niepotrzebnych antybiotykoterapii, co pomaga zmniejszyć selekcję opornych szczepów. Ważną rolę odgrywa szkolenia personelu - program przewiduje regularne warsztaty i szkolenia dla medyków w celu podnoszenia świadomości i umiejętności w zakresie zapobiegania i kontrolowania zakażeń. Ostatnim z elementów programu jest monitoring i kontrola przypadków zakażeń lekoopornych oraz analiza danych epidemiologicznych do oceny skuteczności wprowadzonych strategii [30].

## PODSUMOWANIE

Lekooporność bakterii uważana jest za jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego o wymiarze globalnym:

- Oporność bakterii na antybiotyki pojawia się na skutek mutacji oraz poziomego transferu genów. Mechanizmy oporności obejmują inaktywację antybiotyków, zmniejszenie ich penetracji, aktywację pomp wyływowych oraz zmiany w miejscu docelowym działania leku. Bakterie mogą nabywać geny oporności poprzez transformację, koniugację i transdukcję.
- Wśród mechanizmów oporności których zrozumienie jest kluczowe dla opracowania strategii zapobiegania i leczenia infekcji można wymienić: karbapenemazy KPC produkowane przez *K. pneumoniae*,  $\beta$ -laktamazy OXA-48, metalo- $\beta$ -laktamazy NDM,  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum, metycylinooporne szczepy *S. aureus* oraz *Enterococcus* oporny na wankomycynę.
- Diagnostyka mechanizmów lekooporności obejmuje metody takie jak: dyfuzyjno-krażkową (metoda Kirby-Bauera), E-test oraz metody molekularne - PCR, RT-PCR, sekwencjonowanie Sangera i Western Blot.
- Oporność na antybiotyki prowadzi do zwiększonej śmiertelności i powikłań terapeutycznych, wymaga zaawansowanych metod diagnostycznych, zwiększając koszty i czas oczekiwania na wyniki, generuje wyższe koszty leczenia i straty wydajności, co może wpłynąć na globalny PKB.

- Kluczowe elementy aktualnej strategii zapobiegania lekooporności w oddziałach szpitalnych to profilaktyka zakażeń, racjonalne stosowanie antybiotyków, szkolenie personelu oraz monitoring i kontrola zakażeń.
- Narodowy Program Ochrony Antybiotyków w Polsce zawiera szczegółowe wytyczne w tej dziedzinie, skupiające się przede wszystkim na oddziałach intensywnej terapii.

Powyższe wnioski podkreślają złożoność i powagę problemu lekooporności oraz potrzebę skutecznych interwencji zaradczych na poziomie zarówno lokalnym jak i globalnym.

## PIŚMIENNICTWO

1. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>.
2. Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019;51:72–80. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.10.008>.
3. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *Eur J Pharm Sci* 2022;170. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106103>.
4. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014;22:686–96. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2014.09.003>.
5. Cornaglia G, Rossolini GM. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:99–101. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2009.03114.X>.
6. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228–36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).
7. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597–606. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS121>.
8. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:130–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.01686-12>.
9. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, et al. Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol* 2016;54:2832–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01175-16>.
10. Hoang CQ, Nguyen HD, Vu HQ, Nguyen AT, Pham BT, Tran TL, et al. Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and

- Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study. *Biomed Res Int* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9757625>.
11. Yao Y, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Chakraborty T. New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacterales Bacteria. *Emerg Infect Dis* 2022;28:265. <https://doi.org/10.3201/EID2801.212106>.
  12. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology* 2015, Vol 17, Pages 11-22 2014;17:11–22. <https://doi.org/10.21775/CIMB.017.011>.
  13. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000;38:542–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.542-546.2000>.
  14. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
  15. Hsu AJ, Tamma PD. Treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections in children. *Clin Infect Dis* 2014;58:1439–48. <https://doi.org/10.1093/CID/CIU069>.
  16. Dotis J, Printza N, Marneri A, Gidaris D, Papachristou F. Urinary tract infections caused by extended-spectrum betalactamase-producing bacteria in children: a matched casecontrol study. *Turkish Journal of Pediatrics* 2013.
  17. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.
  18. Antonanzas F, Lozano C, Torres C. Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacoeconomics* 2015;33:285–325. <https://doi.org/10.1007/S40273-014-0242-Y>.
  19. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1549–55. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000>.
  20. Kampmeier S, Kossow A, Clausen LM, Knaack D, Ertmer C, Gottschalk A, et al. Hospital acquired vancomycin resistant enterococci in surgical intensive care patients - a prospective longitudinal study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7. <https://doi.org/10.1186/S13756-018-0394-1>.
  21. Vehreschild MJGT, Haverkamp M, Biehl LM, Lemmen S, Fätkenheuer G. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection* 2019;47:7–11. <https://doi.org/10.1007/S15010-018-1202-9>.
  22. [22] Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Knelson LP, Sickbert-Bennett EE, Chen LF, et al. Enhanced disinfection leads to reduction of microbial contamination and a decrease in patient colonization and infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39:1118–21. <https://doi.org/10.1017/ICE.2018.165>.
  23. Kreidl P, Mayr A, Hinterberger G, Berktold M, Knabl L, Fuchs S, et al. Outbreak report: a nosocomial outbreak of vancomycin resistant enterococci in a solid organ transplant unit. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7. <https://doi.org/10.1186/S13756-018-0374-5>.
  24. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear TP, Howden B. Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microb Genom* 2019;5. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000283>.
  25. eucast: Resistance mechanisms n.d. [https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms) (accessed May 14, 2025).
  26. Rekomendacje EUCAST – Korld n.d. <https://korld.nil.gov.pl/rekomendacje/rekomendacje-eucast/> (accessed May 14, 2025).
  27. Bakterie antybiotyki lekooporność - Kwiatkowski Zbigniew A., Zdzisław Markiewicz (Książka) - Księgarnia PWN n.d. [https://ksiegarnia.pwn.pl/Bakterie-antybiotyki-lekoopornosc,68956994,p.html?srsId=AfmBOoo-5EIHM1gPoCEerUAXDROoT3xaxFXLYpP8RDdYv\\_j8C-jEIsX9](https://ksiegarnia.pwn.pl/Bakterie-antybiotyki-lekoopornosc,68956994,p.html?srsId=AfmBOoo-5EIHM1gPoCEerUAXDROoT3xaxFXLYpP8RDdYv_j8C-jEIsX9) (accessed May 14, 2025).

28. Techniki molekularne wykorzystywane w diagnostyce lekooporności związanej z n.d. <https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=89762> (accessed May 22, 2025).
29. Mazińska B, Hryniewicz W. Antimicrobial Resistance: Causes And Consequences. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology* 2020;59:249–57. <https://doi.org/10.21307/PM-2020.59.3.18>.
30. Szpitalna polityka antybiotykowa – Narodowy program ochrony antybiotyków n.d. <https://antybiotyki.edu.pl/rekomendacje/szpitalna-polityka-antybiotykowa/> (accessed May 19, 2025).

# BADANIE WPŁYWU EUGENOLU NA SKUTECZNOŚĆ ANTYBIOTYKÓW WOBEC WIELOLEKkoopORNYCH SZCZEPÓW *ENTEROBACTER CLOACAE* COMPLEX

Evaluation of the effect of eugenol on the efficacy of antibiotics against multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* Complex

Łukasz Korczak<sup>1\*</sup>, Anita Bałdyga<sup>2</sup>, Natalia Bagińska<sup>2</sup>, Eryk Cimochoński<sup>2</sup>, Klaudia Dadura<sup>2</sup>, Piotr Majewski<sup>1</sup>, Dominika Chludzińska<sup>1</sup>, Elżbieta Tryniszewska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; lukasz.korczak@umb.edu.pl (\*autor korespondencyjny)

<sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## WPROWADZENIE

*Enterobacter cloacae* – istotny czynnik zakażeń szpitalnych i środowiskowych

Bakterie z gatunku *Enterobacter* to Gram-ujemne, nieprzetrwalnikiujące, względnie beztlenowe ruchliwe pałeczki. *Enterobacter cloacae* jest powszechnie występującym drobnoustrojem środowiskowym, który stanowi także element naturalnego mikrobiomu jelitowego człowieka i zwierząt. [1] Mimo to może pełnić rolę czynnika etiologicznego licznych zakażeń, w tym zakażeń oportunistycznych, takich jak zapalenie płuc, zakażenia dolnych dróg moczowych, cewki moczowej, skóry i tkanek miękkich, a także zakażenia wewnątrznaczyniowe. [1] Szczególnie często *E. cloacae* jest odpowiedzialny za zakażenia szpitalne, w tym ogniska epidemiczne na oddziałach intensywnej terapii (OIT). Patogen ten wykazuje wysoką zdolność przetrwania w środowisku szpitalnym, w tym na powierzchniach i sprzętach medycznych, co

ułatwia kolonizację i przenoszenie się pomiędzy pacjentami. [1] *E. cloacae* może również cechować się tolerancją na wybrane środki dezynfekcyjne, a zdolność do tworzenia biofilmu oraz obecność mechanizmów oporności warunkują trudności w eliminacji tej bakterii w warunkach szpitalnych. [2] Szczególne ryzyko zakażenia dotyczy pacjentów uprzednio poddanych antybiotykoterapii oraz osób z osłabioną odpornością, takich jak noworodki, wcześniaki, osoby starsze, pacjenci po przeszczepach, z cukrzycą, rozległymi oparzeniami czy licznymi urazami, zwłaszcza hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii. [3] Bakteria ta jest szeroko rozpowszechniona w środowisku naturalnym – występuje w glebie, wodzie, roślinach, ściekach oraz odchodach zwierzęcych. *E. cloacae* jest znana również jako fitopatogen, powodujący choroby roślin. [1] Pod względem oporności naturalnej wykazuje niewrażliwość na ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefalotynę oraz cefoksytynę, natomiast około połowa szczepów zachowuje wrażliwość na ureidopenicyliny i karboksypencyliny. [1]

*E. cloacae* zaliczany jest do grupy bakterii, która może wykształcać fenotyp wielolekooporności (MDR – ang. *multidrug resistance*). [4] Występowanie zakażeń bakteryjnych wywoływanych przez szczepy wielolekooporne (MDR) stale wzrasta, stanowiąc poważny problem o skali globalnej i istotnie obciążając systemy ochrony zdrowia. Zjawisko wielolekooporności u *E. cloacae* wynika przede wszystkim z wysokiej zdolności adaptacyjnej tej bakterii do środowiska szpitalnego, jak również z efektywnego nabywania i transferu genów oporności oraz wirulencji za pośrednictwem plazmidów, transpozonów i innych elementów ruchomych. [1]

Charakterystyczną cechą bakterii wykazujących oporność wielolekową jest skrajnie niska, często krytycznie ograniczona wrażliwość na antybiotyki. Z tego powodu drobnoustroje MDR stały się globalnie jednym z najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych, zwłaszcza w oddziałach intensywnej terapii. [5] Do rozwoju i rozprzestrzeniania się zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne dochodzi szczególnie u

pacjentów poddawanych długotrwałej hospitalizacji, narażonych na inwazyjne procedury, takie jak cewnikowanie, intubacja czy dializoterapia, oraz przy wyższej ekspozycji na antybiotyki o szerokim spektrum działania. [4] Kombinacja tych czynników prowadzi do zwiększonego ryzyka nabycia i selekcji szczepów MDR. *E. cloacae* posiada zdolność modulowania i nabywania różnych mechanizmów oporności, m.in. poprzez transfer genów oporności, aktywację pomp efflux czy zmiany ekspresji białek błonowych, co stanowi istotne wyzwanie terapeutyczne. [1]

### *Mechanizmy oporności występujące u E. cloacae*

Wśród bakterii Gram-ujemnych *E. cloacae* należy do najczęściej zgłaszanych gatunków wykazujących zdolność produkcji karbapenemaz typu KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). [1] W przypadku szczepów, u których dominuje nadmierna produkcja  $\beta$ -laktamaz typu AmpC, karbapenemy pozostają skuteczną opcją terapeutyczną, choć ich efektywność może być stopniowo ograniczana przez nabyte mechanizmy oporności. [6] Imipenem przez długi czas był uważany za najbardziej efektywny lek z grupy karbapenemów stosowany wobec *E. cloacae*. Niestety, w ostatnich latach coraz częściej identyfikuje się szczepy zdolne do produkcji karbapenemaz – także innych niż KPC – co skutkuje narastaniem oporności na imipenem i znacznym ograniczeniem dostępnych strategii leczenia zakażeń wywołanych przez MDR *E. cloacae*. [6]

W trakcie antybiotykoterapii  $\beta$ -laktamami może nabywać zdolność derepresji genu chromosomowego, prowadząc do nadmiernej produkcji  $\beta$ -laktamaz typu AmpC. Enzymy te efektywnie hydrolizują cefalosporyny trzeciej generacji, istotnie ograniczając możliwości terapeutyczne. Oporność może być także nabyta poprzez obecność genu AmpC przenieszonego na plazmidach, co ułatwia poziomy transfer tej cechy w obrębie populacji bakteryjnej. [6] Szacuje się, że produkcja  $\beta$ -laktamaz AmpC odpowiada nawet za 50% przypadków oporności *E. cloacae* na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, będąc głównym

mechanizmem lekooporności tego gatunku. [1] Co istotne, ten typ oporności często współwystępuje z wytwarzaniem  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum (ESBL – ang. *extended-spectrum beta lactamase*), co dodatkowo komplikuje leczenie zakażeń szczepami MDR. W fenotypie MDR istotną rolę odgrywają mechanizmy oporności związane ze zmniejszoną przepuszczalnością błony komórkowej, defektami porin oraz zwiększoną aktywnością pomp wypływowych. [6] Regulacja stężenia antybiotyków przez te mechanizmy przyczynia się do wysokiej oporności wśród bakterii wielolekoopornych. Takie bariery stanowią szczególne zagrożenie dla pacjentów, ponieważ mogą prowadzić do aktywacji dodatkowych mechanizmów, takich jak mutacje w białkach docelowych czy zwiększona ekspresja enzymów oporności.

*E. cloacae* posiada w swoim arsenale mechanizmów oporności m.in. pompy efflux, czyli wielolekowe transportery wypływowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie bakteryjnej. [1] Mogą one funkcjonować jako monomery lub dimery i odpowiadają za usuwanie leków znajdujących się w cytoplazmie do przestrzeni periplazmatycznej. Szczególnie istotny jest kompleks RND (ang. *Resistance-Nodulation-Division*), będący trójdziałnym systemem wypływowym złożonym z transportera błony wewnętrznej, białka adaptorowego przestrzeni periplazmatycznej oraz kanału błony zewnętrznej. [7] Pozwala on na efektywne usuwanie substancji szkodliwych, takich jak antybiotyki czy detergenty, do środowiska zewnętrznego. Przykładem pompy efflux jest system OqXAB, który odpowiada za zmniejszenie wrażliwości bakterii na chinolony poprzez wypompowywanie tych leków poza komórkę bakteryjną. [1]

#### *Dostępne opcje terapeutyczne w leczeniu zakażeń *E. cloacae**

Oporność wielolekowa nie jest jedynym fenotypem obserwowanym wśród bakterii. Oprócz MDR wyróżnia się także rozszerzoną lekooporność (XDR – ang. *extensively drug-resistant*) oraz pan-oporność (PDR – ang. *pan-drug resistance*). [8] Rosnąca częstość występowania szczepów opornych na

wiele leków znacznie ograniczyła możliwości obecnie dostępnych terapii, narażając pacjentów na dłuższą hospitalizację, zwiększone koszty leczenia i powikłania wynikające z opóźnionego wdrożenia skutecznej antybiotykoterapii. [9] Sytuacji nie poprawia wolne tempo pojawiania się nowych leków przeciwbakteryjnych oraz coraz częstsza konieczność sięgania po antybiotyki „ostatniej szansy”.

W leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy MDR bakterie Gram-ujemne, stosuje się m.in. kolistynę – antybiotyk, który działa przez uszkodzenie błony komórkowej i prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. [10] Niestety, terapia kolistyną obarczona jest znacznym ryzykiem toksyczności, zwłaszcza nefrotoksyczności, dlatego wymaga starannej oceny korzyści i ryzyka przy jej stosowaniu. Wzrost rozpowszechnienia szczepów MDR *E. cloacae* stanowi poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego w skali globalnej. [11] Standardowe antybiotyki, niegdyś skuteczne w leczeniu zakażeń tym patogenem, coraz częściej zawodzą, a złożoność postępowania terapeutycznego prowadzi do wydłużania czasu leczenia i sprzyja adaptacji bakterii do środowiska szpitalnego. Sytuacja ta wymusza konieczność opracowania nowych, skutecznych i jednocześnie bezpiecznych strategii terapii, dostosowanych do dynamicznie zmieniających się warunków epidemiologicznych.

### *Antybiotyki szerokospektralne w leczeniu zakażeń szczepami MDR*

Antybiotyki o szerokim spektrum działania pozostają kluczowym elementem terapii zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne, zwłaszcza w warunkach szpitalnych, gdzie szybkie leczenie empiryczne musi uwzględniać wysokie ryzyko oporności. Ich zastosowanie powinno opierać się na aktualnym profilu wrażliwości patogenu, lokalnej epidemiologii i ocenie ryzyka występowania mechanizmów oporności, aby zbalansować skuteczność kliniczną z ograniczeniem dalszej selekcji opornych szczepów.

Połączenie sulfametoksazolu i trimetoprimu wykazuje szerokie spektrum

aktywności *in vitro* wobec wielu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w tym wybranych szczepów *E. cloacae*. [12] Antybiotyk ten jest szeroko stosowany w leczeniu zakażeń układu moczowo-płciowego, oddechowego, pokarmowego, pneumocystozy, zapalenia ucha środkowego u dzieci oraz infekcji wywołanych przez pałeczki *Shigella*. [12] W terapii zakażeń *E. cloacae* jest skuteczny wobec wrażliwych szczepów, choć narastająca oporność ogranicza jego powszechne zastosowanie. Lek ten wykazuje działanie synergistyczne i bakteriobójcze oraz ma zdolność do hamowania rozwoju oporności. Jest relatywnie dobrze tolerowany u pacjentów bez zaburzeń odporności i często preferowany u osób uczulonych na penicyliny lub zakażonych szczepami produkującymi  $\beta$ -laktamazy. [12] Do najczęstszych działań niepożądanych zalicza się zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz wysypki skórne, które pojawiają się zazwyczaj w ciągu pierwszych dwóch tygodni terapii.

Imipenem i meropenem to antybiotyki z grupy karbapenemów, które działają poprzez wiązanie się z białkami wiążącymi penicylinę (PBP - ang. *Penicillin Binding Proteins*), co prowadzi do zakłócenia syntezy i integralności ściany komórkowej bakterii, skutkując śmiercią komórki. [13] Karbapenemy charakteryzują się bardzo szerokim spektrum aktywności wobec bakterii beztlenowych i Gram-ujemnych w porównaniu z innymi antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi oraz wykazują stabilność wobec ESBL. [13] Do najczęstszych działań niepożądanych należą reakcje w miejscu podania oraz dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. Imipenem wykazuje skuteczność wobec paciorkowców, metycylinowrażliwych gronkowców, bakterii z rodzajów *Neisseria* i *Haemophilus*, beztlenowców oraz wielu najczęstszych tlenowych patogenów szpitalnych Gram-ujemnych, w tym *E. cloacae*. Ponadto wykazuje działanie hamujące na enterokoki. [14] Meropenem jest szczególnie aktywny wobec bakterii Gram-ujemnych, również niefermentujących oraz wykazuje szerokie spektrum działania podobne do imipenemu. Z powodu rosnącej liczby szczepów wielolekoopornych, w tym *E. cloacae* produkujących karbapenemazy (CPE – ang. Carbapenemase-producing *Enterobacterales*),

karbapenemy stały się jednymi z antybiotyków „ostatniej szansy” w leczeniu ciężkich zakażeń szpitalnych. [13] Światowa Organizacja Zdrowia umieściła szczepy CPE w najwyższej kategorii priorytetów jako jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego, ze względu na skrajną oporność na antybiotyki, potencjalne wyczerpanie dostępnych opcji terapeutycznych oraz szybkie rozprzestrzenianie w warunkach szpitalnych. Mimo skuteczności, pojawiające się mechanizmy oporności stanowią poważne wyzwanie terapeutyczne i wymagają ciągłego poszukiwania nowych strategii przeciwdziałania zakażeniom wywołanym przez szczepy MDR.

Cefepim to cefalosporyna IV generacji z grupy  $\beta$ -laktamów, o szerokim spektrum aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Stosuje się go w leczeniu zapalenia płuc (szpitalnego i związanego z wentylacją mechaniczną), powikłanych i niepowikłanych zakażeń dróg moczowych, zakażeń skóry i tkanek miękkich oraz jako terapię empiryczną gorączki neutropenicznej. [15] Ze względu na stabilność wobec wielu  $\beta$ -laktamaz i dobrą penetrację do tkanek, cefepim bywa wykorzystywany w ciężkich zakażeniach szpitalnych, zwłaszcza gdy etiologia pozostaje nieustalona. Mechanizm działania cefepimu jest typowy dla  $\beta$ -laktamów: lek wiąże się kowalencyjnie z białkami PBP, co prowadzi do zaburzeń integralności ściany, aktywacji autolizyn i lizy komórki bakteryjnej. W porównaniu z cefalosporynami niższych generacji cefepim wykazuje większą aktywność wobec pałeczek Gram-ujemnych oraz lepszą stabilność wobec chromosomalnych  $\beta$ -laktamaz AmpC. [15] W kontekście *E. cloacae* cefepim ma istotne znaczenie kliniczne, ponieważ wiele szczepów konstytutywnie lub indukcyjnie produkuje AmpC, które hydrolizują liczne cefalosporyny III generacji. Cefepim, dzięki większej stabilności wobec AmpC, może zachowywać aktywność przeciwko części szczepów *E. cloacae*, o ile nie współwystępują dodatkowe mechanizmy oporności. Najczęstsze działania niepożądane cefepimu obejmują dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, odczyny w miejscu podania oraz wysypki skórne. U pacjentów z ciężką niewydolnością nerek i przy braku dostosowania dawki opisywano

ryzyko neurotoksyczności (encefalopatia, drgawki), dlatego kluczowe jest monitorowanie czynności nerek i modyfikacja dawkowania w tej grupie chorych. [15]

Ceftazydym to cefalosporyna trzeciej generacji o wyraźnej aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych, w tym licznych przedstawicieli rodziny *Enterobacterales* oraz niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych (zwłaszcza *Pseudomonas aeruginosa*). W porównaniu z innymi cefalosporynami III generacji ceftazydym cechuje się słabszą aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich, co ogranicza jego zastosowanie w zakażeniach z przewagą tej flory. Farmakokinetycznie jest eliminowany głównie przez nerki, dlatego wymaga modyfikacji dawkowania u pacjentów z niewydolnością nerek. Mechanizm działania ceftazydymu jest podobny do innych  $\beta$ -laktamów. Klinicznie stosuje się go m.in. w leczeniu zapalenia płuc (w tym szpitalnego i u pacjentów wentylowanych mechanicznie), powikłanych zakażeń dróg moczowych, zakażeń skóry i tkanek miękkich, zakażeń jamy brzusznej (z odpowiednim skojarzeniem) oraz jako element terapii empirycznej w wybranych sytuacjach, gdy podejrzewa się udział pałeczek Gram-ujemnych, zwłaszcza *P. aeruginosa*. [16]

W kontekście *E. cloacae* skuteczność ceftazydymu może być ograniczona ze względu na ryzyko derepresji/indukcji chromosomalnych  $\beta$ -laktamaz AmpC oraz możliwe współwystępowanie ESBL, które hydrolizują cefalosporyny trzeciej generacji. Z tego powodu wybór ceftazydymu przeciw *E. cloacae* powinien być oparty na antybiogramie oraz ocenie ryzyka mechanizmów oporności (AmpC/ESBL), a w razie ich podejrzenia powinno rozważyć się alternatywy o większej stabilności wobec tych enzymów. [1] Profil bezpieczeństwa ceftazydymu jest zbliżony do innych cefalosporyn. Najczęstsze działania niepożądane obejmują dolegliwości żołądkowo-jelitowe, odczyny w miejscu podania oraz wysypki skórne. U pacjentów z ciężką niewydolnością nerek i bez dostosowania dawki istnieje ryzyko neurotoksyczności (np. splątanie, drgawki), co uzasadnia ściśle monitorowanie

funkcjonowania nerek i odpowiednią modyfikacją dawkowania. [16]

Norfloksacyna należy do grupy fluorochinolonów, jest pochodną kwasu nalidyksowego, o silnej aktywności przeciwko tlenowym bakteriom Gram-ujemnym, w tym przedstawicielom rodziny *Enterobacterales* (także szczepom opornym na gentamycynę) oraz *P. aeruginosa*, a ponadto wobec *Neisseria gonorrhoeae* opornych na penicylinę. Wykazuje skuteczność przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* (wrażliwym i opornym na metycylinę), choć jej aktywność wobec większości innych tlenowych bakterii Gram-dodatnich jest słabsza. Mechanizm działania polega na hamowaniu gyrazy DNA (topoizomerazy II) i topoizomerazy IV, co zaburza replikację i naprawę DNA, prowadząc do śmierci komórki bakteryjnej. [17] Oporność na norfloksacynę zwykle nie jest plazmidowa; wynika najczęściej z mutacji w genach kodujących docelowe topoizomerazy lub z mechanizmów zmniejszonej penetracji czy pomp efflux i rozwija się rzadziej niż w przypadku kwasu nalidyksowego. [18] Farmakokinetycznie norfloksacyna jest eliminowana głównie przez nerki, co uzasadnia modyfikację dawkowania w niewydolności nerek. Klinicznie stosuje się ją przede wszystkim w terapii niepowikłanych i powikłanych zakażeń dróg moczowych oraz w leczeniu rzeżączkowego zapalenia cewki moczowej. W kontekście *E. cloacae* norfloksacyna wykazywać aktywność wobec wrażliwych szczepów, jednak narastająca oporność wśród pałeczek Gram-ujemnych ogranicza jej zastosowanie. Działania niepożądane są na ogół dobrze tolerowane i rzadko wymagają przerwania leczenia; najczęściej dotyczą dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego i ośrodkowego układu nerwowego o łagodnym nasileniu. [17]

### *Eugenol – związek o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym*

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie naturalnymi metodami leczenia. Rośliny lecznicze, znane z medycyny tradycyjnej, stanowią bogate źródło związków biologicznie czynnych i inspirują do

poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Eugenol (4-alilo-1-hydroksy-2-metoksybenzen) to naturalny fenol monoterpenu, który pozyskiwany jest z pąków kwiatowych goździkowca (*Syzygium aromaticum*, dawniej *Eugenia caryophyllus*), ale występuje również w bazylii (*Ocimum basilicum*), cynamonie (*Cinnamomum verum*), gałce muszkatolowej (*Myristica fragrans*) oraz liściu laurowym (*Laurus nobilis*). [19] Eugenol znajduje szerokie zastosowanie praktyczne: w stomatologii jako środek o działaniu znieczulającym i antyseptycznym, w przemyśle perfumeryjnym jako składnik kompozycji zapachowych, a w rolnictwie jako środek owadobójczy. Związek ten wykazuje ponadto właściwości przeciwzapalne, przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne. Został uznany przez Światową Organizację Zdrowia za niemutageny; wykazano również jego cytotoksyczne działanie wobec komórek nowotworowych m.in. czerniaka, raka jelita grubego i raka piersi. [20]

Eugenol, dzięki obecności wolnej grupy hydroksylowej w cząsteczce, wykazuje potencjał przeciwdrobnoustrojowy m.in. wobec *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *E. coli*. Ze względu na hydrofobowy charakter łatwo przenika przez osłony komórkowe bakterii, docierając do cytoplazmy, gdzie może zaburzać integralność błon, oddziaływać z białkami i innymi strukturami wewnątrzkomórkowymi, co prowadzi do destabilizacji funkcji komórkowych i ostatecznie do śmierci komórki. Eugenol szybko wchłania się po podaniu doustnym, osiągając maksymalne stężenie w surowicy około 4 godziny po przyjęciu; jego okres półtrwania wynosi 14–18 godzin. Związek łatwo rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, a podanie w postaci kapsułki żelowej poprawia jego stabilność i trwałość. [20]

W badaniach przeprowadzonych na szczurach dawka śmiertelna (LD50) eugenolu wynosiła około 2,650 mg/kg. Toksyczność jest zależna od dawki: w niskich stężeniach eugenol wykazuje działanie antyoksydacyjne, natomiast w wysokich – prooksydacyjne, z potencjalnym działaniem hepatotoksycznym. Objawy zatrucia obejmują m.in. kwasicę metaboliczną, drgawki, uszkodzenie wątroby oraz zaburzenia krzepnięcia. Eugenol jest także silnym alergenem

kontaktowym i może powodować podrażnienie błon śluzowych, oczu i skóry. Eugenol poprzez swoje rozległe działanie może również m.in. hamować tworzenie biofilmu oraz działać synergistycznie z antybiotykami, co sprawia, iż eugenol jest rozpatrywany jako potencjalny środek wspomagający terapię przeciwdrobnoustrojową. [20]

## CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu roztworu eugenolu na stosowane antybiotyki szerokospektralne wobec klinicznych szczepów MDR *E. cloacae* z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej. Oceniono wpływ eugenolu na przedstawicieli cefalosporyn (cefepim, ceftazydym), karbapenemów (imipenem, meropenem), fluorochinolonów (norfloksacyna) oraz antybiotykami sulfonamidowymi (trimetoprim-sulfametoksazol).

## MATERIAŁY I METODY

### *Pochodzenie szczepów E. cloacae*

W badaniu wykorzystano 30 szczepów MDR *E. cloacae* wyizolowanych w latach 2014-2024 od pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku, w trakcie rutynowych czynności związanych z diagnostyką mikrobiologiczną. Pochodzenie szczepów oraz rodzaj materiału klinicznego z którego zostały wyizolowane są zebrane w Rycinie. Wszystkie próbki zostały zabezpieczone i zamrożone w temperaturze - 80°C w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB) z dodatkiem 30% gliceryny. Do przeprowadzenia identyfikacji biochemicznej oraz badania wrażliwości na antybiotyki (AST – ang. antimicrobial susceptibility testing) wykorzystano system VITEK 2 (bioMérieux SSC, Francja), który opiera się na analizie automatycznej badanej próbki, jej identyfikacji i lekowrażliwości.

### *Badanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową*

W pierwszym etapie badań, szczepy zostały wysiane na podłoże MacConkeya (OXOID LTD., Basingstoke, Wielka Brytania) – podłoże

selektywno-różnicujące do hodowli Gram-ujemnych drobnoustrojów. W kolejnym etapie przeprowadzono AST z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej (Kirby-Bauera). Metoda polega na uzyskaniu inokulum bakteryjnego o gęstości optycznej równej 0,5 w skali McFarlanda i posiewie powierzchniowym badanego szczepu na podłożu Mueller-Hintona (OXOID LTD., Basingstoke, Wielka Brytania), które jest podłożem referencyjnym do badania lekowrażliwości. Następnie umieszczano bibułowe krążki antybiotykowe zawierające: cefepim (FEP 30 µg), ceftazydym (CAZ 10 µg), imipenem (IPM 10 µg), meropenem (MEM 10 µg), norfloksacynę (NOR 10 µg) oraz trimetoprim-sulfametoksazol (SXT 1,25/23,75 µg). Krążki antybiotykowe zostały zakupione w firmie OXOID (OXOID LTD., Basingstoke, Wielka Brytania). Kolejnym etapem było przeprowadzenie AST z zastosowaniem roztworu 99% eugenolu (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz antybiotyków wymienionych powyżej. Na krążki bibułowe zawierające antybiotyki w podanych stężeniach aplikowano 10 µl roztworu eugenolu. Hodowla drobnoustrojów oraz AST zostało przeprowadzone w temperaturze 35-37°C, czasie 16-18 h i w warunkach tlenowych. Po wymaganym czasie inkubacji dokonano pomiarów stref zahamowania wzrostu (SZW) dla antybiotyków w monoterapii oraz z dodatkiem eugenolu. Kryteria interpretacyjne, którymi posługiwano się w trakcie przeprowadzonych badań pochodziły z oficjalnych rekomendacji Europejskiego Komitetu do spraw badania lekowrażliwości (EUCAST – ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

### *Analiza statystyczna danych*

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu STATA 17 (Stata Corp., 2023). W celu zobrazowania działania eugenolu na SZW antybiotyków obliczono podstawowe miary statystyczne (średnia, mediana, odchylenie standardowe, wartości minimalne oraz maksymalne) oraz użyto testów statystycznych – Shapiro-Wilka do oceny normalności rozkładu wyników. W przypadku potwierdzenia rozkładu normalnego stosowano test t dla prób sparowanych, zaś w przypadku rozkładu różnego od normalnego

stosowano test Wilcoxona dla par zależnych. Celem testów było określenie istotności statystycznej otrzymanych wyników.

## WYNIKI

Wśród badanych szczepów 90% (27/30) spełniało kryteria MDR, wykazując oporność na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej grup. Statystyka opisowa objęła, dla każdego antybiotyku, wyliczenie średniej, mediany, odchylenia standardowego oraz wartości minimalnej i maksymalnej zarówno dla stref zahamowania wzrostu (SZW) w monoterapii, jak i po dodaniu eugenolu, a także dla różnicy tych wartości. W monoterapii najwyższe średnie SZW uzyskano dla meropenemu (20,90 mm) i imipenemu (19,33 mm), najniższe zaś dla ceftazydymu (6,00 mm) oraz trimetoprimu-sulfametoksazolu (7,37 mm). Niskie średnie odnotowano także dla norfloksacyny (10,03 mm) i cefepimu (11,97 mm).











Po dodaniu eugenolu średnie SZW wzrosły istotnie we wszystkich grupach. Najwyższe wartości średnie uzyskano dla meropenemu (30,77 mm), imipenemu (29,17 mm) i cefepimu (24,03 mm), a najniższe dla trimetoprimu-sulfametoksazolu (19,07 mm), ceftazydymu (19,67 mm) oraz norfloksacyny (22,13 mm). Procentowy wzrost średniej obliczono jako różnicę wartości średnich (po dodaniu eugenolu minus monoterapia) podzieloną przez średnią w monoterapii i pomnożoną przez 100%. Największy wzrost uzyskano dla ceftazydymu (227,8%), trimetoprimu-sulfametoksazolu (158,7%) i norfloksacyny (120,6%), a najniższy dla meropenemu (47,2%), imipenemu (50,9%) oraz cefepimu (100,8%).

Analiza median, odchyłeń standardowych oraz zakresów (min–max) potwierdza wyraźny, powtarzalny wzrost SZW po zastosowaniu eugenolu, widoczny zarówno w antybiotykach o wyjściowo wysokiej aktywności (karbapenemy), jak i w cefalosporynach, gdzie w przypadku cefepimu mediana po dodaniu eugenolu wskazuje na odzyskanie wrażliwości przez większość szczepów. W pozostałych grupach konsekwentny wzrost SZW

również sugeruje przywracanie wrażliwości drobnoustrojów. Zestawienie wszystkich podstawowych miar statystycznych przedstawiono na Rycinie 1.

**Rycina 1.** Podstawowe wskaźniki statystyczne (średnia, mediana, odchylenie standardowe, wartości minimalne, maksymalne) oraz różnice między średnimi dla badanych antybiotyków w grupach z eugenolem oraz w monoterapii

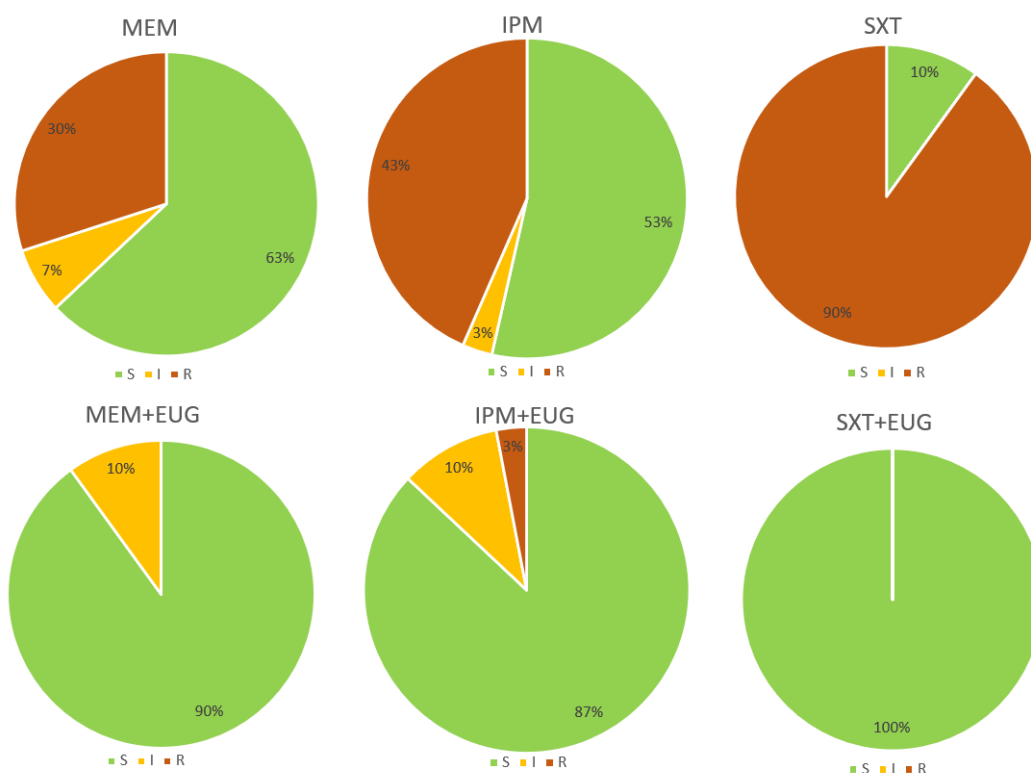
W monoterapii najwyższe odsetki oporności obserwowano dla ceftazydymu (100%), norfloksacyny (97%), cefepimu (93%) i trimetoprimu-sulfametoksazolu (90%), podczas gdy karbapenemy (imipenem i meropenem)

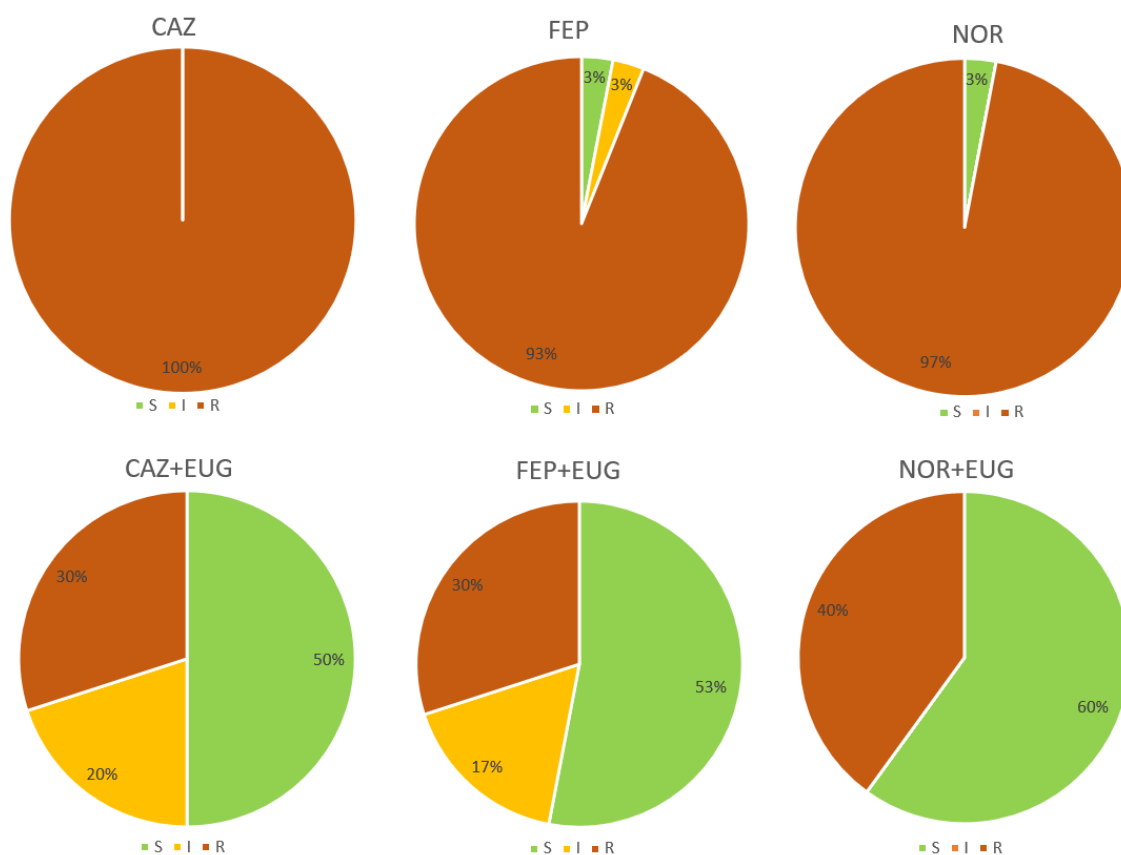
Wskaźnik statystyczny		CAZ [mm]	FEP [mm]	IMP [mm]	MEM [mm]	NOR [mm]	SXT [mm]
 monoterapia	 Średnia	6,00	11,97	19,33	20,90	10,03	7,37
	 Mediana	6,00	10,00	22,00	24,00	6,00	6,00
	 Odchylenie st.	0	6,26	6,78	8,26	6,16	4,37
	 Min	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	 Max	6,00	25,00	29,00	37,00	24,00	23,00
 eugenol	 Średnia	19,67	24,03	29,17	30,77	22,13	19,07
	 Mediana	21,50	24,50	29,50	30,50	24,00	19,00
	 Odchylenie st.	3,74	5,37	5,80	7,82	5,75	3,93
	 Min	10,00	13,00	18,00	16,00	10,00	14,00
	 Max	24,00	35,00	40,00	44,00	37,00	30,00
 Różnica średnia (eugenol-monoterapia)	13,67	12,07	12,07	9,87	12,10	11,70	

wykazywały wyraźnie korzystniejszy profil wrażliwości (odpowiednio: 53% i 63% szczepów wrażliwych, przy 43% i 30% opornych oraz niewielkim odsetku średniowrażliwych). Po dodaniu eugenolu odnotowano jednoznaczną poprawę we wszystkich grupach: dla trimetoprimu-sulfametoksazolu uzyskano pełną wrażliwość (100%), dla meropenemu i imipenemu udział wrażliwych wzrósł odpowiednio do 90% i 87% przy znikomej lub bardzo niskiej oporności, a w grupie cefalosporyn zaobserwowano istotne przesunięcie w kierunku wrażliwości (dla cefepimu 53% wrażliwych, 17% średniowrażliwych i 30% opornych; dla ceftazydymu 50% wrażliwych, 20% średniowrażliwych i 30% opornych). W przypadku norfloksacyny odsetek wrażliwych wzrósł z 3% do 60%, co potwierdza znaczące, choć niepełne, przywrócenie wrażliwości.

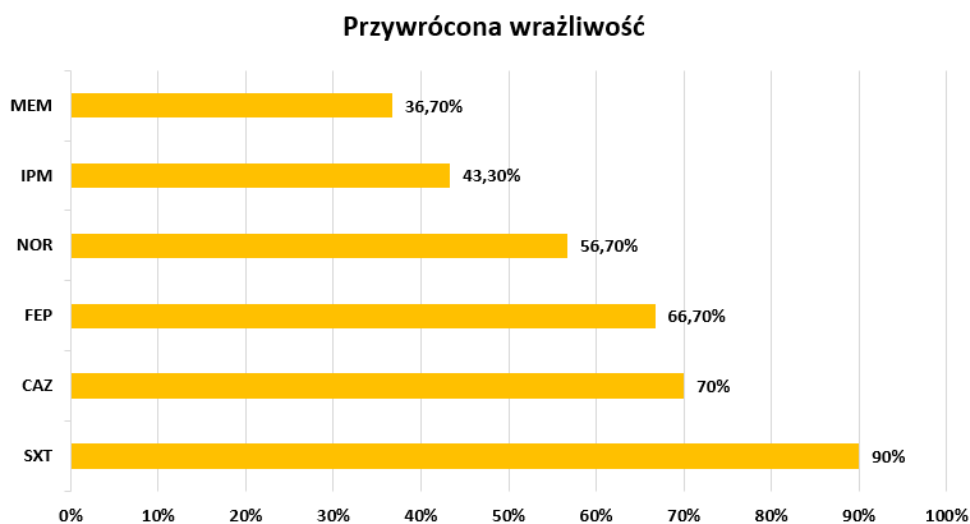
Całościowo, dodatek eugenolu skutkowało wyraźnym i powtarzalnym zwiększeniem odsetka szczepów wrażliwych w porównaniu z monoterapią, przy szczególnie dużych korzyściach w grupach o najwyższej wyjściowej oporności. W przypadku użycia kombinacji antybiotyku z eugenolem oporność wykazało 30%, wrażliwość wykazało 50% natomiast średniowrażliwość wykazało 20% badanych szczepów. Wykresy kołowe podsumowujące wskaźniki wrażliwości szczepów w monoterapii oraz z dodatkiem eugenolu przedstawiono na Rycinie 2 oraz Rycinie 3. Wskaźniki przywróconej wrażliwości na antybiotyki po dodaniu eugenolu znajdują się na Rycinie 4.

**Rycina 2.** Wskaźniki lekowrażliwości drobnoustrojów na podstawie wytycznych EUCAST w monoterapii oraz po dodaniu eugenolu. S – szczep wrażliwy na antybiotyk; I – szczep średniowrażliwy; R – szczep oporny. IPM – imipenem; MEM – meropenem; SXT – trimetoprim-sulfametoksazol.





**Rycina 3.** Wskaźniki lekowrażliwości drobnoustrojów na podstawie wytycznych EUCAST w monoterapii oraz po dodaniu eugenolu. S – szczep wrażliwy na antybiotyki; I – szczep średniowrażliwy; R – szczep oporny. CAZ – ceftazydym; FEP – cefepim; NOR – norfloksacyna.



**Rycina 4.** Procentowa ilość przywróconej wrażliwości na antybiotyki po dodaniu eugenolu. MEM – meropenem; IPM – imipenem; NOR – norfloksacyna; FEP – cefepim; CAZ – ceftazydym; SXT – trimetoprim-sulfametoksazol.

Do oceny istotności wpływu eugenolu na wielkość stref zahamowania wzrostu zastosowano test t dla prób sparowanych w przypadkach, gdy rozkład różnic (z eugenolem oraz bez eugenolu) był zbliżony do normalnego, co weryfikowano testem Shapiro–Wilka. Dla ceftazydymu (CAZ), gdzie rozkład różnic odbiegał od normalnego, użyto nieparametrycznego testu Wilcoxon dla par zależnych. Test t dla prób sparowanych jest testem parametrycznym, który ocenia, czy średnia różnica między dwoma pomiarami wykonanymi na tych samych szczepach różni się istotnie od zera. Z kolei test Wilcoxon porządkuje bezwzględne różnice, nadaje im rangi z uwzględnieniem znaków i sprawdza, czy medianowa różnica odbiega istotnie od zera, raportując statystykę W oraz *p*-value. We wszystkich analizowanych antybiotykach z rozkładem różnic akceptowalnym dla założeń testu t (FEP, IPM, MEM, NOR, SXT) otrzymane *p*-value były niższe od poziomu istotności ( $p < 0,05$ ), co potwierdza istotny statystycznie wpływ eugenolu na wzrost SZW. W grupie CAZ, analizowanej testem Wilcoxon, *p*-value również było mniejsze niż 0,05, wskazując na istotny efekt eugenolu.

Antybiotyk	Test	Statystyka	<i>p</i> -value	Istotność statystyczna
CAZ	Wilcoxon	0,00	$p < 0,001$	Istotny
FEP	T-sparowany	12,91	$p < 0,001$	Istotny
IPM	T-sparowany	12,55	$p < 0,001$	Istotny
MEM	T-sparowany	11,08	$p < 0,001$	Istotny
NOR	T-sparowany	10,38	$p < 0,001$	Istotny
SXT	T-sparowany	15,62	$p < 0,001$	Istotny

**Rycina 5.** Wyniki przeprowadzonych testów statystycznych Wilcoxon oraz t – sparowanego. CAZ – ceftazydym; FEP – cefepim; IPM – imipenem; MEM – meropenem; NOR – norfloksacylna; SXT – trimetoprim-sulfametoksazol.

## DYSKUSJA

Wyniki badania potwierdzają pozytywny wpływ połączenia naturalnych środków z tradycyjną antybiotykoterapią w celu przewyciężania oporności i wzmacniania skuteczności leczenia. W literaturze opisywano synergizm eugenolu z różnymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi, co jest zgodne z obserwacjami przedstawionymi w niniejszej pracy. Przykładowo, w badaniu z 2023 roku przeprowadzonym przez Konga i wsp., obejmującym szczepy *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* wykazano, że dodatek eugenolu przywraca wrażliwość izolatów opornych na kolistynę oraz dodatkowo wzmacnia jej działanie wśród szczepów wyjściowo wrażliwych, co potwierdza efekt synergistyczny tej kombinacji. [21] W analizie synergizm stwierdzono w 12 z 14 przypadków (85%), podczas gdy w prezentowanym przez nas zbiorze danych odsetek synergistycznych interakcji wyniósł 105 na 360 kombinacji (29%), co różnicuje siłę efektu między pracami, ale nie podważa kierunku zjawiska. Istotną implikacją kliniczną, którą podkreślają autorzy cytowanego badania, jest możliwość obniżenia dawek kolistyny przy zachowaniu skuteczności dzięki synergii z eugenolem, potencjalnie ograniczając toksyczność tego antybiotyku — czynnik o udokumentowanym znaczeniu dla bezpieczeństwa terapii. [21]

W badaniu z 2018 roku autorstwa Wanga i wsp. wykazano, że eugenol nasila działanie kolistyny zarówno wobec szczepów opornych, jak i wrażliwych klinicznych izolatów *E. coli*, gatunku należącego do rodziny pałeczek jelitowych *Enterobacterales*, podobnie jak *E. cloacae* analizowana w niniejszej pracy. [22] Autorzy użyli zestawu 14 klinicznych szczepów, w tym izolatów opornych na kolistynę, a synergizm oceniano metodą checkerboard (metoda ilościowa, która determinuje wskaźnik FICI – ang. *fractional inhibitory concentration index*), uzupełnioną o oznaczenia MIC i analizy ekspresji genu *mcr-1*; synergistyczne działanie odnotowano w 8/14 przypadków, a w pozostałych obserwowano efekt częściowy, bez śladów antagonizmu między eugenolem i antybiotykiem. Wynikom towarzyszyły również dodatkowe

obserwacje - istotne obniżenie ekspresji mcr-1 oraz przesłanki bezpośredniej interakcji eugenolu z białkiem MCR-1. [22] Na tym tle rezultaty naszych wyników badań w niniejszej pracy, mimo różnic w doborze gatunków, panelu leków i kryteriach klasyfikacji pozostają zbieżne kierunkowo, potwierdzając potencjał eugenolu jako adiuwanta zwiększającego skuteczność terapii wobec drobnoustrojów wielolekoopornych.

Praca Ferrando i wsp. oceniła eugenol jako adiuwant dla siedmiu antybiotyków testowanych przeciwko czternastu gatunkom bakterii, wykazując, że dodatek tej naturalnej substancji szeroko wzmacnia aktywność leków w układach *in vitro*. [23] Wyniki autorów potwierdzają, że eugenol może pełnić rolę skutecznego modulatora odpowiedzi drobnoustrojów, co pozostaje zbieżne z doniesieniami o synergii eugenolu z antybiotykami raportowanymi w innych pracach i kierunkowo wspiera obserwacje przedstawione w niniejszym badaniu. Interesującym uzupełnieniem wniosków jest zwrócenie uwagi na potencjalnie korzystniejszy profil bezpieczeństwa eugenolu względem wybranych antybiotyków w kontekście zastosowań jako adiuwant, co przy zachowanej skuteczności może otwierać możliwość redukcji dawek antybiotyków i ograniczania ryzyka działań niepożądanych, choć wymaga to dalszej walidacji w modelach *in vivo* i badaniach klinicznych. [23]

Zainteresowanie łączeniem substancji naturalnych z antybiotykami pozostaje aktualne, co potwierdzają tegoroczne doniesienia z marca, w których oceniano działanie olejków eterycznych z goździków i cynamonu w połączeniu z ciprofloksacyną oraz wankomycyną wobec *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella enterica* i *K. pneumoniae*. [24] Trzy z tych gatunków należą do rodziny *Enterobacterales*, podobnie jak *E. cloacae* analizowany w niniejszym badaniu, co ułatwia kontekstowe porównanie. Szczególnie istotne jest zastosowanie olejku goździkowego, którego głównym składnikiem czynnym jest eugenol (analogiczny do użytej przez nas substancji), ponieważ autorzy odnotowali synergiczne działanie jego połączenia z wankomycyną względem wszystkich

badanych szczepów poza *S. enterica*. Połączenia z olejkiem istotnie wzmacniały aktywność antybiotyków, a autorzy wskazali, że obserwowana synergia może uzasadniać strategię łączenia konwencjonalnej antybiotykoterapii z wybranymi związkami naturalnymi. [24] Z praktycznego punktu widzenia takie podejście może umożliwić redukcję dawek antybiotyków przy zachowaniu skuteczności, sprzyjając ograniczeniu działań niepożądanych, choć wnioski te wymagają dalszej walidacji.

W badaniu Dhara i wsp. oceniano kliniczne izolaty *E. coli* oraz *K. pneumoniae* wytwarzające ESBL i oporne na chinolony, stosując metodę mikrorozcieńczeń do analizy wpływu eugenolu na aktywność cefotaksymu i ciprofloksacyny. [25] W przypadku kombinacji z cefotaksymem synergizm odnotowano u 21,6% szczepów *E. coli* oraz 18,2% szczepów *K. pneumoniae*, przy czym redukcja wartości MIC w obecności eugenolu sięgała nawet ponad 1000-krotności, co wskazuje na silny potencjał adiuwantowy. Dla połączenia z ciprofloksacyną odsetek synergii był niższy u *K. pneumoniae* (6,1%) i porównywalny z cefotaksymem u *E. coli* (21,6%). Zestawiając te obserwacje z uzyskanymi wynikami, warto podkreślić, że oceniane przez nas cefalosporyny (cefepim, ceftazydym) oraz chinolon (norfloksacyna) należały do grup o największych bezwzględnych przyrostach stref zahamowania wzrostu po dodaniu eugenolu, co kierunkowo współgra z doniesieniami Dhara i wsp. Jednocześnie do pełnej oceny klinicznego potencjału takich skojarzeń konieczne są dalsze badania ilościowe lekowrażliwości (np. MIC, FICI) oraz walidacja w modelach *in vivo*, aby przełożyć obserwowaną synergję na rekomendacje terapeutyczne. [25]

## PODSUMOWANIE

Konfrontacja uzyskanych wyników z doniesieniami innych autorów wskazuje, że eugenol oraz inne preparaty naturalne, w których stanowi główny składnik czynny może pełnić rolę wartościowego adiuwanta antybiotykoterapii, wzmacniając aktywność leków i sprzyjając przełamaniu oporności.

Szczególnie istotny jest kontekst kolistyny, uznawanej za lek „ostatniej szansy”: mimo narastającej globalnie oporności oraz ograniczeń bezpieczeństwa związanych z toksycznością, łączenie kolistyny z eugenolem było wielokrotnie opisywane jako strategia przywracająca wrażliwość części izolatów oraz potencjalnie umożliwiającą redukcję dawki antybiotyku przy zachowaniu skuteczności, co ma istotne znaczenie kliniczne. W przedstawionej pracy zjawisko synergii nie ograniczało się wyłącznie do kolistyny: obserwowano je również dla innych antybiotyków o szerokim spektrum działania, takich jak: cefepim, ceftazydym, imipenem, meropenem, norfloksacyny oraz trimetoprimu-sulfametoksazolu, gdzie po dodaniu roztworu eugenolu szczepy wyjściowo odporne wykazywały odzyskanie wrażliwości. Z perspektywy praktycznej taki profil działania eugenolu wspiera kierunek badań nad terapiami skojarzonymi, które mogą jednocześnie zwiększać skuteczność leczenia i ograniczać ryzyko działań niepożądanych poprzez modyfikację ekspozycji na antybiotyk; wymaga to jednak dalszej pracy w ujednoczonych modelach ilościowych oraz oceny w badaniach *in vivo* i klinicznych, aby przełożyć obserwowaną synergję na bezpieczne rekomendacje terapeutyczne dla pacjentów w przyszłości.

## PIŚMIENICTWO

1. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2025 Aug 27];32(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315895/>
2. Korczak L, Majewski P, Iwaniuk D, Sacha P, Matulewicz M, Wieczorek P, et al. Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among Enterobacterales. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14.
3. Ioannou P, Vamvoukaki R, Kofteridis DP. Infective endocarditis by Enterobacter cloacae: a systematic review and meta-analysis. J Chemother [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 27];34(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34369324/>
4. Pal N, Sharma P, Kumawat M, Singh S, Verma V, Tiwari RR, et al. Phage therapy: an alternative treatment modality for MDR bacterial infections. Infect Dis (Lond) [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 27];56(10):785–817. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39017931/>
5. Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: How to treat and for how long. Int J Antimicrob Agents. 2010 Dec;36(SUPPL. 2).
6. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol [Internet]. 2012 Jul [cited 2025 Aug 27];7(7):887–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827309/>
7. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. Indian Journal of Medical Research. 2019 Feb 1;149(2):129–45.
8. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: Current and emerging therapeutic approaches. Expert Opin Pharmacother. 2014;15(10):1351–70.
9. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2012 [cited 2025 Aug 5];18(3):268–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>
10. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. Infect Drug Resist [Internet]. 2019 [cited 2025 Aug 28];12:965. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6519339/>
11. Korczak L, Majewski P, Iwaniuk D, Sacha P, Matulewicz M, Wieczorek P, et al. Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among Enterobacterales. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2024 [cited 2025 Jun 7];14:1289396. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11035753/>
12. COCKERILL FR, EDSON RS. Trimethoprim-sulfamethoxazole. Mayo Clin Proc [Internet]. 1991 [cited 2025 Aug 27];66(12):1260–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1749295/>
13. Zhanell GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. Drugs [Internet]. 2007 [cited 2025 Aug 27];67(7):1027–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17488146/>
14. HELLINGER WC, BREWER NS. Imipenem. Mayo Clin Proc [Internet]. 1991 [cited 2025 Aug 27];66(10):1074–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1921491/>
15. Pais GM, Chang J, Barreto EF, Stitt G, Downes KJ, Alshaer MH, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cefepime. Clin Pharmacokinet [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Aug 27];61(7):929–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35764774/>
16. Yost RL, Ramphal R. Ceftazidime review. Drug Intell Clin Pharm [Internet]. 1985 [cited 2025 Aug 27];19(7–8):509–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3896712/>

17. Rowen RC, Michel DJ, Thompson JC. Norfloxacin: clinical pharmacology and clinical use. *Pharmacotherapy* [Internet]. 1987 [cited 2025 Aug 27];7(4):92–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3317294/>
18. Belay WY, Getachew M, Tegegne BA, Teffera ZH, Dagne A, Zeleke TK, et al. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Front Pharmacol*. 2024 Aug 16;15:1444781.
19. Fajdek-Bieda A, Wróblewska A. Eugenol: związek pochodzenia naturalnego o wielu zastosowaniach. *Przemysł Chemiczny*. 2021;T. 100, nr 11(11):1077–83.
20. Tavvabi-Kashani N, Hasanpour M, Baradaran Rahimi V, Vahdati-Mashhadian N, Askari VR. Pharmacodynamic, pharmacokinetic, toxicity, and recent advances in Eugenol's potential benefits against natural and chemical noxious agents: A mechanistic review. *Toxicon*. 2024 Feb 1;238:107607.
21. Kong J, Wang Y, Yao Z, Lin Y, Zhang Y, Han Y, et al. Eugenol works synergistically with colistin against colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by enhancing membrane permeability. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2023 Oct 17 [cited 2025 Aug 28];11(5):e03666-22. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10581171/>
22. Wang Y ming, Kong L cong, Liu J, Ma H xia. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2018 Jan 29 [cited 2025 Aug 28];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29423192/>
23. Ferrando N, Pino-Otín MR, Terrado E, Ballesteros D, Langa E. Bioactivity of Eugenol: A Potential Antibiotic Adjuvant with Minimal Ecotoxicological Impact. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 Aug 28];25(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39000177/>
24. El Baz S, Soulaïmani B, Abbad I, Azgaou Z, Lotfi EM, Malha M, et al. Antimicrobial Activity and the Synergy Potential of *Cinnamomum aromaticum* Nees and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry Essential Oils with Antimicrobial Drugs. *Microbiology Research* 2025, Vol 16, Page 63 [Internet]. 2025 Mar 10 [cited 2025 Aug 28];16(3):63. Available from: <https://www.mdpi.com/2036-7481/16/3/63/html>
25. Dhara L, Tripathi A. The use of eugenol in combination with cefotaxime and ciprofloxacin to combat ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Aug 28];129(6):1566–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502298/>

# SYNERGIZM DZIAŁANIA OLEJKU Z DRZEWA HERBACIANEGO I WYBRANYCH ANTYBIOTYKÓW WOBEC KLINICZNYCH SZCZEPÓW *E. COLI* I *S. AUREUS*

Synergy of tea tree oil and selected antibiotics against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Łukasz Korczak<sup>1\*</sup>, Martyna Kukuć<sup>2</sup>, Oliwia Cwalina<sup>2</sup>, Hanna Budnik<sup>2</sup>, Weronika Czygier<sup>2</sup>, Piotr Majewski<sup>1</sup>, Dominika Chludzińska<sup>1</sup>, Elżbieta Trynieszewska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; lukasz.korczak@umb.edu.pl (\*autor korespondencyjny)

<sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## WPROWADZENIE

*Oporność na antybiotyki – narastający problem*

Jednym z problemów, z którymi zmagają się dzisiejszy system opieki zdrowotnej jest rosnąca oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR - ang. *antimicrobial resistance*). [1] Mimo tego, że bakterie są naturalnie odporne na niektóre antybiotyki, to oporność nabyta odpowiada za wykształcenie fenotypu wielolekowej oporności (MDR - ang. *multidrug resistance*). Wielolekooporność bakterii wynika w dużej mierze z niewłaściwego stosowania antybiotyków, obejmującego zarówno nadmierne ich stosowanie, jak i używanie w przypadkach, gdy terapia antybiotykowa nie jest wskazana, na przykład w infekcjach wirusowych. [2] Dodatkowym problemem jest nieprzestrzeganie zaleceń dotyczących dawkowania i długości terapii, co sprzyja selekcji szczepów opornych. Na rozwój oporności istotnie wpływa

również stosowanie antybiotyków w hodowli zwierząt, rolnictwie oraz dostępność leków przeciwdrobnoustrojowych bez recepty w niektórych krajach. [3] W konsekwencji ekspozycji na antybiotyki bakterie adaptują się do środowiska obecności tych substancji poprzez szereg mechanizmów oporności. Obejmują one modyfikacje struktury ściany komórkowej, syntezę enzymów neutralizujących działanie antybiotyków, jak również nabywanie oraz przekazywanie genów oporności na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT - ang. *horizontal gene transfer*). [4] Ponadto, bakterie mogą wykazywać mutacje w genach kodujących docelowe miejsca wiązania antybiotyku, co prowadzi do zmniejszenia jego skuteczności. Dodatkowo, produkcja specjalistycznych białek zdolnych do rozkładania i inaktywacji cząsteczek antybiotyków jest istotnym sposobem ograniczania ich funkcji terapeutycznej przez bakterie. [3]

Mechanizmy oporności na antybiotyki występują szczególnie często u bakterii Gram-ujemnych. [5] Wynika to ze specyficznej budowy ich ściany komórkowej, która – oprócz typowej błony cytoplazmatycznej i cienkiej warstwy mureiny – posiada dodatkową, zewnętrzną błonę komórkową. Struktura ta stanowi barierę utrudniającą przenikanie wielu antybiotyków do wnętrza komórki bakterii, zwiększając ochronę przed działaniem substancji przeciwdrobnoustrojowych. Co więcej, bakterie Gram-ujemne często wyposażone są w dodatkowe mechanizmy oporności, takie jak produkcja beta-laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ESBL – ang. *extended spectrum beta-lactamases*), czy karbapenemaz, takich jak KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), co znacznie ogranicza skuteczność leczenia antybiotykami i przyczynia się do rozprzestrzeniania opornych szczepów. Problem AMR jest poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego w przyszłości oraz często określany jest jako „cicha pandemia”. [5]

*Escherichia coli i Staphylococcus aureus – rola w kształtowaniu lekooporności*

*Escherichia coli* to Gram-ujemna, względnie beztlenowa pałeczka z rodziny *Enterobacterales*, cechująca się dużą różnorodnością genetyczną. Choć naturalnie występuje jako komensal w przewodzie pokarmowym człowieka, nawet pojedynczy transfer genów może przekształcić ją w patogen zdolny do wywoływania różnych zakażeń, obejmujących zarówno infekcje jelitowe, jak i pozajelitowe, takie jak zakażenia dróg moczowych, bakteriemie czy zapalenia ośrodkowego układu nerwowego, w szczególności u pacjentów z grup ryzyka. [6] Wyróżniono osiem podtypów *E. coli*, z których każdy posiada specyficzne czynniki wirulencji odpowiadające jego środowisku infekcji. Zakażenia tymi patogenami mają charakter powszechny i stanowią istotne obciążenie zdrowotne na całym świecie. [6]

Warto podkreślić, iż przedstawiciele rodziny *Enterobacterales* często wykazują tendencję do rozwijania fenotypu MDR, co jest związane z obecnością licznych mechanizmów oporności, takich jak produkcja ESBL, karbapenemaz oraz obecności pomp efflux, które mogą aktywnie usuwać antybiotyków z komórki bakteryjnej. [7] Ta zdolność do nabywania i przekazywania genów oporności utrudnia leczenie zakażeń wywołanych tymi bakteriami, stanowiąc poważne wyzwanie kliniczne i epidemiologiczne. Problem wielolekooporności pałeczek jelitowych spowodował, że rodzina *Enterobacterales* została umieszczona na liście priorytetowych patogenów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), ze względu na ich potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego wynikające z ryzyka wyczerpania się dostępnych opcji terapeutycznych. [5]

*Staphylococcus aureus* to Gram-dodatni ziarniak, który jest jednym z powszechnie występujących drobnoustrojów bakteryjnych na świecie. Wytwarza szeroki zakres czynników wirulencji oraz toksyn, co czyni go częstą przyczyną zakażeń u ludzi. Odpowiada zarówno za miejscowe infekcje skóry i tkanek podskórnych, takie jak czyraki i zapalenia tkanek miękkich, jak i za poważne zakażenia ogólnoustrojowe, m.in. septyczne zapalenie stawów, bakteriemię czy pozaszpitalne martwicze zapalenie płuc. Ponadto *S. aureus*

powoduje zakażenia miejsc operowanych, infekcje górnych dróg oddechowych oraz zapalenia spojówek. [8]

Naturalnie gatunek ten jest wrażliwy na większość dostępnych antybiotyków, jednak zdolność do nabywania genów oporności sprawiła, że może nabyć fenotyp MDR. Szczególnym problemem klinicznym jest oporność na metycylinę (MRSA - ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), która eliminuje skuteczność powszechnie stosowanych antybiotyków beta-laktamowych w leczeniu zakażeń powodowanych przez ten drobnoustrój. [9] Oporność wielolekowa *S. aureus* wynika zarówno z mechanizmów genetycznych, takich jak nabywanie genów kodujących modyfikacje białek wiążących penicyliny (PBP2a), jak i z aktywności pomp efflux oraz enzymów rozkładających antybiotyki. Ta zdolność adaptacyjna skutkuje pojawianiem się szczepów opornych także na inne klasy leków, co znacząco komplikuje terapię i wymaga stosowania zaawansowanych strategii leczniczych oraz kontroli zakażeń. [8,9]

W leczeniu zakażeń bakteryjnych, w tym wywołanych przez szczepy lekooporne, wciąż stosuje się szerokie spektrum antybiotyków. W przypadku *E. coli*, dobór leków zależy od lokalizacji infekcji, a najczęściej wykorzystywane są beta-laktamy, fluorochinolony, aminoglikozydy oraz wybrane tetracykliny. Natomiast w terapii zakażeń wywołanych przez *S. aureus* powszechnie stosuje się glikopeptydy (np. wankomycynę), linkozamidy oraz tetracykliny. Często stosowane są również połączenia antybiotyków z inhibitorami beta-laktamaz, takie jak amoksycylina z kwasem klawulanowym. Mimo to, z uwagi na narastającą antybiotykooporność, skuteczność tych terapii jest coraz częściej ograniczona, co utrudnia skuteczne leczenie zakażeń. [5,9]

*Olejek eteryczny z drzewa herbacianego – potencjalne wsparcie w terapii przeciwdrobnoustrojowej*

W obliczu rosnącego zainteresowania naturalnymi metodami leczenia,

również w mikrobiologii coraz częściej rozważane jest stosowanie substancji pochodzenia naturalnego jako wspomagające w terapii antybiotykowej. Przykładem takich substancji są olejki eteryczne, w tym olejek z drzewa herbacianego (TTO – ang. *tea tree oil*), pozyskiwany głównie z australijskiej rośliny *Melaleuca alternifolia*. [10] Olejek charakteryzuje się szerokim spektrum właściwości biologicznych, w tym przeciwbakteryjnymi, przeciwwirusowymi, przeciwgrzybiczymi oraz przeciwzapalnymi. [11]. W niższych stężeniach wykazuje działanie bakteriostatyczne. Chemicznie TTO składa się przede wszystkim z węglowodorów terpenowych, takich jak monoterpeny i seskwiterpeny, oraz związków alkoholowych powiązanych z tymi grupami. Ze względu na silnie niepolarny charakter i słabą rozpuszczalność w wodzie, badania nad jego mechanizmami działania są utrudnione. [10]

Badania wykazały, że olejek z drzewa herbacianego działa bakteriobójczo na różne bakterie, m.in. na komensalne gronkowce, gatunki *Micrococcus* obecne na skórze, *Enterococcus faecalis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Zaobserwowano również minimalne stężenia hamujące (MIC) przeciwko szczepom *S. aureus* MRSA. Dodatkowo, odparowany TTO wykazuje zdolność hamowania wzrostu bakterii takich jak *Mycobacterium avium*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumoniae*. [10] Olejek z drzewa herbacianego jest powszechnie wykorzystywany jako składnik wielu preparatów do miejscowego stosowania, zwłaszcza w leczeniu infekcji skórnych. Mechanizm jego działania opiera się na zwiększaniu przepuszczalności układów liposomalnych, gdzie zawarte w nich substancje powodują naruszenie integralności strukturalnej i funkcjonalnej błon komórkowych bakterii. [10] W przypadku *S. aureus* olejek wywołuje wyciek jonów potasu i hamuje proces oddychania komórkowego, co prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. Podobne efekty obserwuje się w odniesieniu do *E. coli*, u której TTO zaburza gospodarkę potasu oraz proces oddychania. [10] Te właściwości sprawiają, iż olejek z drzewa herbacianego staje się istotnym kandydatem na naturalną substancję wspomagającą walkę z

bakteriami wielolekoopornymi.

## CEL PRACY

Celem pracy jest ocena potencjalnego synergizmu olejku z drzewa herbacianego z wybranymi antybiotykami wobec klinicznych szczepów *E. coli* i *S. aureus* z zastosowaniem metody dyfuzyjno-krażkowej. Wobec *E. coli* zastosowano antybiotyki z grupy fluorochinolonów (lewofloksacynę), cefalosporyny (ceftazydym), penicylin (piperacylinę w połączeniu z tazobaktamem i tikarcylinę w połączeniu z kwasem klawulanowym) w monoterapii oraz ich kombinacje z olejkiem. Wobec szczepów *S. aureus* zastosowano antybiotyki z grup fluorochinolonów (lewofloksacyna), makrolidów (erytromycyna), aminoglikozydów (gentamycyna) i cefalosporyn (cefoksytyna).

## MATERIAŁY I METODY

### *Pochodzenie i identyfikacja szczepów bakteryjnych*

W badaniu wykorzystano łącznie 60 klinicznych szczepów bakteryjnych – 30 szczepów *E. coli* oraz 30 szczepów *S. aureus*. Materiał stanowiły szczepy bakteryjne pochodzące z różnych materiałów klinicznych wyizolowanych od pacjentów hospitalizowanych w klinikach Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku w trakcie rutynowego procesu diagnostyki mikrobiologicznej. Wszystkie badane szczepy zostały poddane hodowli w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 18 do 20 godzin. Pochodzenie materiału klinicznego oraz jego rodzaj zostało przedstawione w Rycinie 1 dla *E. coli* oraz w Rycinie 2 dla *S. aureus*.



Rycina 1. Pochodzenie szczepów *E. coli* oraz materiały, z których je wyizolowano



Rycina 2. Pochodzenie szczepów *S. aureus* oraz materiały, z których je wyizolowano

Identyfikację poszczególnych drobnoustrojów przeprowadzono z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu VITEK 2 (bioMérieux, Francja), zgodnie z wytycznymi producenta. System ten opiera się na automatycznej analizie biochemicznej przeprowadzanej za pomocą specjalistycznych kart

testowych. Karty identyfikacyjne zawierają wiele różnorodnych substratów enzymatycznych, które umożliwiają ocenę aktywności metabolicznej bakterii, co pozwala na precyzyjne określenie gatunku drobnoustroju. Dodatkowo stosowane są karty AST (ang. *Antimicrobial Susceptibility Testing*), które służą do oceny wrażliwości izolowanych drobnoustrojów na różne stężenia antybiotyków. Wyniki testów AST pozwalają na szybkie i dokładne określenie profilu oporności bakterii, co ma kluczowe znaczenie dla doboru odpowiedniej terapii przeciwdrobnoustrojowej.

### *Metoda dyfuzyjno-krażkowa i badanie synergizmu olejku*

Wrażliwość badanych izolatów na wybrane antybiotyki oznaczono metodą dyfuzyjno-krażkową (Kirby-Bauera) na podłożu Mueller-Hintona (MH), które jest standardowym, nieselektywnym środowiskiem powszechnie stosowanym w badaniach AST. Metoda Kirby-Bauera jest standardem do oceny wrażliwości bakteryjnej ze względu na prostotę, powtarzalność oraz szerokie zastosowanie diagnostyczne, co pozwala na wiarygodne porównania skuteczności działania leków w badanych izolatach. Podłoże MH umożliwia wzrost szerokiego spektrum bakterii, co czyni je idealnym do oceny skuteczności działania antybiotyków. Interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z aktualnymi wytycznymi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), wersja 15.0 obowiązującą w roku prowadzenia badań. [12]

Procedura badawcza rozpoczęła się od pobrania kolonii bakteryjnych, które wyrosły na agarze MacConkeya - selektywnym podłożu do izolacji Gram-ujemnych pałeczek oraz agarze Chapmana - selektywnym podłożu dla gronkowców, za pomocą jałowej wymazówki, które następnie zawieszono w jałowej soli fizjologicznej do uzyskania mętności odpowiadającej 0,5 w skali McFarlanda. Mętność zawiesin określano metodą turbidymetryczną, co umożliwiło standaryzację ilości bakterii w inokulum. Następnie przygotowane zawiesiny wysiewano na powierzchnię podłoża MH, zapewniając równomierne

rozprowadzenie inokulum.

Na przygotowanych płytkach umieszczano krążki nasączone wybranymi antybiotykami. Dla szczepów *S. aureus* zastosowano krążki z antybiotykami: lewofloksacyną (LEV, 5 µg), cefoksytiną (FOX, 30 µg), gentamycyną (CN, 10 µg) oraz erytromycyną (E, 15 µg). Natomiast w przypadku izolowanych szczepów *E. coli* analizowano skuteczność następujących leków: ceftazydym (CAZ, 10 µg), lewofloksacynę (LEV, 5 µg), tikarcylinę w połączeniu z kwasem klawulanowym (TIM, 75/10 µg) oraz piperacylinę z tazobaktamem (TZP, 30/6 µg). Krążki antybiotykowe zostały zakupione od firmy OXOID (OXOID, Basingstoke, Wielka Brytania). Po inkubacji w warunkach tlenowych przez 16–18 godzin w temperaturze  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków antybiotykowych. Wyniki interpretowano zgodnie z kryteriami EUCAST, umożliwiając klasyfikację izolowanych szczepów jako wrażliwe, średniowrażliwe lub odporne na dane antybiotyki.

W celu zapewnienia wiarygodności wyników badania oraz oceny wpływu olejku z drzewa herbacianego, początkowo przeprowadzono testy z zastosowaniem samego antybiotyku oraz antybiotyku z olejkiem eterycznym z drzewa herbacianego, w celu oceny wpływu każdej z tych substancji na analizowane szczepy bakteryjne. Olejek eteryczny z drzewa herbacianego (Etja s.c., Elbląg, Polska) наносono bezpośrednio w ilości 10 µl za pomocą automatycznej pipety na bibułowy krążek nasączony antybiotykiem, który został uprzednio zaaplikowany na powierzchnię inokulowanego podłoża. Płytki inkubowano przez 16–18 godzin w temperaturze  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Po zakończeniu inkubacji dokonywano wizualnej oceny i pomiaru średnic stref zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków z antybiotykami zarówno w obecności, jak i w braku olejku eterycznego. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie wrażliwości szczepów zgodnie ze standardami EUCAST, klasyfikując je jako wrażliwe, średniowrażliwe lub odporne. Kryteria wrażliwości zostały zebrane w Rycinie 3. Ponadto przeprowadzono ocenę efektu synergistycznego między zastosowanym olejkiem a antybiotykami.

<b>S. aureus</b>		Wartość graniczna strefy zahamowania wzrostu [mm]		
Nazwa antybiotyku oraz skrót	Stężenie antybiotyku [µg]	S ≥	I	R <
		Cefoksytyna (FOX)	30	22
Erytromycyna (E)	15	21	-	21
Gentamycyna (CN)	10	18	-	18
Lewofloksacyna (LEV)	5	50	23-49	22

<b>E. coli</b>		Wartość graniczna strefy zahamowania wzrostu [mm]		
Nazwa antybiotyku oraz skrót	Stężenie antybiotyku [µg]	S ≥	I	R <
		Ceftazydym (CAZ)	10	22
Lewofloksacyna (LEV)	5	23	20-22	19
Piperacylina-tazobactam (TZP)	30/6	20	-	20
Tikarcylina-kwas klawulanowy (TIM)	75/10	23	21-22	20

**Rycina 3.** Kryteria wrażliwości bakterii na antybiotyki w metodzie dyfuzyjno-krażkowej. Litera S oznacza szczep wrażliwy na stosowany antybiotyk; literą I oznaczono szczep średniowrażliwy, zaś literą R szczep oporny.

### *Analiza statystyczna wyników*

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą oprogramowania STATA 17 (Stata Corp., 2021). Analiza statystyczna danych została przeprowadzona przy użyciu testów nieparametrycznych oraz podstawowych wskaźników opisowych. Na początkowym etapie oceniono normalność rozkładu zmiennych za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ponieważ większość danych nie spełniała założeń rozkładu normalnego, do porównań między grupami zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya, który umożliwia ocenę istotności różnic pomiędzy dwiema niezależnymi próbami. Dodatkowo obliczono podstawowe wskaźniki statystyczne opisujące badaną zmienność, takie jak średnia, mediana i odchylenie standardowe wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla poszczególnych antybiotyków, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po dodaniu olejku eterycznego. Wszystkie analizy wykonano z zachowaniem poziomu istotności statystycznej  $p < 0,05$ . Wyniki statystyczne umożliwiły rzetelną ocenę wpływu olejku eterycznego na skuteczność działania antybiotyków wobec badanych

szczepów bakterii.

## Wyniki

We wszystkich badanych szczepach *E. coli* zaobserwowano synergistyczne działanie olejku eterycznego z drzewa herbacianego z wybranymi antybiotykami: ceftazydymem (CAZ), lewofloksacyną (LEV), tikarcyliną z kwasem klawulanowym (TIM) oraz piperacyliną z tazobaktamem (TZP). Najsilniejszy efekt synergii odnotowano w przypadku ceftazydymu, gdzie olejek przywrócił wrażliwość na antybiotyk u 93% badanych szczepów. Średnia wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrosła z 9,73 mm do 26,7 mm, co stanowi różnicę 16,97 mm. Mediana MIC wzrosła z 9 do 26,5 mm po dodaniu olejku. W przypadku lewofloksacyny średnia MIC zwiększyła się z 17,9 mm do 30,63 mm (różnica 12,73 mm), a mediana wzrosła z 14,5 do 30 mm. Dodatek olejku przywrócił wrażliwość u 70% analizowanych szczepów. Dla tikarcyliny z kwasem klawulanowym średnia MIC bez olejku wynosiła 10,07 mm, natomiast w połączeniu z olejkiem wzrosła do 27,53 mm (różnica 17,46 mm). Mediana MIC zwiększyła się z 8,5 do 27,5 mm, a wrażliwość na antybiotyk została przywrócona u 90% szczepów. Analogicznie, piperacylina z tazobaktamem wykazała wzrost średniej MIC z 10,67 mm do 27,1 mm (różnica 16,43 mm). Mediana MIC wzrosła z 10 do 26 mm, przy czym dodatek olejku spowodował wrażliwość u 87% badanych bakterii. Wszystkie uzyskane wyniki wskazują na istotne wzmocnienie działania badanych antybiotyków pod wpływem olejku eterycznego z drzewa herbacianego. Podstawowe wskaźniki statystyczne (średnia, mediana) dla poszczególnych antybiotyków znajdują się na Rycinie 4.

 <b>E. coli</b>	Monoterapia			Zastosowany olejek			 Różnica MIC monoterapia-olejek (µg/ml)
	 Średnia (µg/ml)	 Mediana (µg/ml)	 Odchylenie standardowe (µg/ml)	 Średnia (µg/ml)	 Mediana (µg/ml)	 Odchylenie standardowe (µg/ml)	
 CAZ	9,73	9	4,13	26,7	26,5	5,01	16,97
 LEV	17,9	14,5	10,5	30,63	30	6,17	12,73
 TZP	10,67	10	4,54	27,1	27,5	5,38	16,43
 TIM	10,07	8,5	4,86	27,53	26	5,57	17,47

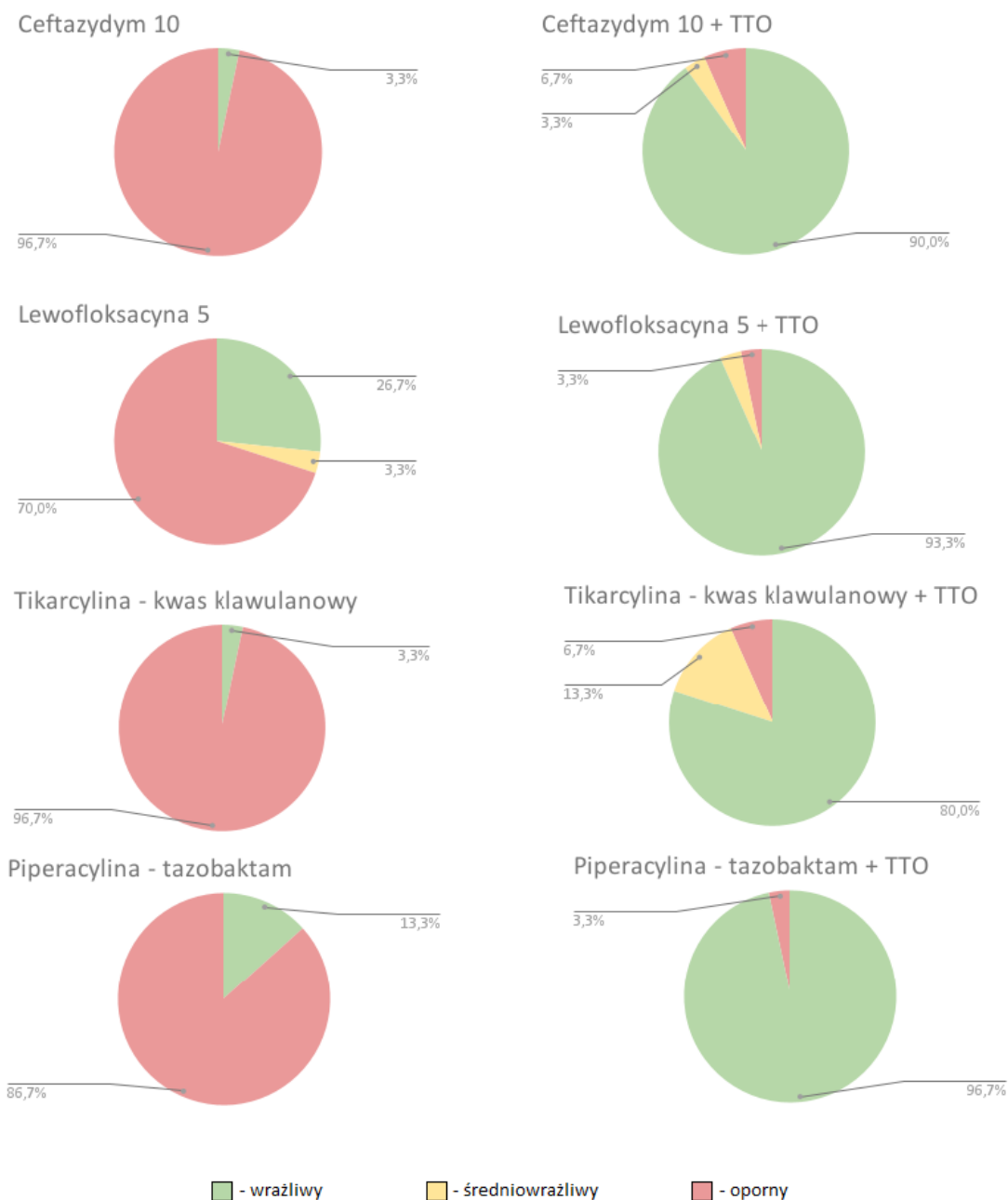
 <b>S. aureus</b>	Monoterapia			Zastosowany olejek			 Różnica MIC monoterapia-olejek (µg/ml)
	 Średnia (µg/ml)	 Mediana (µg/ml)	 Odchylenie standardowe (µg/ml)	 Średnia (µg/ml)	 Mediana (µg/ml)	 Odchylenie standardowe (µg/ml)	
 E	21,29	21,5	5,53	29,56	30	4,31	8,27
 CN	21,33	22	3,58	27,61	28	5,6	6,28
 FOX	15,71	15	5,18	27,06	26,5	7,49	11,35
 LEV	27,16	29	4,61	31,14	32	5,03	3,98

**Rycina 4.** Statystyka podstawowa (średnia, mediana, odchylenie standardowe) poszczególnych antybiotyków u szczepów *E. coli* i *S. aureus*. CAZ - ceftazydym ; LEV - lewofloksacylna ; TZP - piperacylina z tazobaktamem; TIM - tikarcylina z kwasem klawulanowym ; E - erytromycyna; CN - gentamycyna; FOX - cefoksytyna

W przypadku *S. aureus* olejek eteryczny z drzewa herbacianego wykazywał synergistyczne działanie z badanymi antybiotykami, choć w mniejszym stopniu niż w przypadku *E. coli*. Najbardziej wyraźny efekt synergii zaobserwowano dla cefoksytyny, gdzie przywrócono wrażliwość na antybiotyk u 63% badanych szczepów. Średnia wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrosła z 15,71 mm do 27,07 mm, natomiast mediana MIC zmieniła się z 15 do 26,5 mm. Najmniejszy efekt synergistyczny odnotowano dla lewofloksacylny, gdzie różnica w MIC wyniosła 3,98 mm, a mediana MIC wzrosła z 29 do 32 mm. Przywrócono wrażliwość u 10% badanych szczepów. Dla gentamycyny średnia MIC wzrosła z 21,33 mm do 27,61 mm (różnica 6,28 mm), a mediana MIC z 22 do 28 mm, z przywróceniem wrażliwości u 6,67% szczepów. W przypadku erytromycyny średnia MIC wzrosła z 21,29 µg/ml do 29,56 mm (różnica 8,27 mm), a mediana MIC zmieniła się z 21,5 do 30 mm. Wrażliwość na antybiotyk przywrócono u 30% badanych szczepów. Uzyskane dane wskazują na ograniczony, lecz istotny potencjał olejku herbacianego jako substancji wspomagającej wobec wybranych antybiotyków w terapii zakażeń

szczepami *S. aureus*.

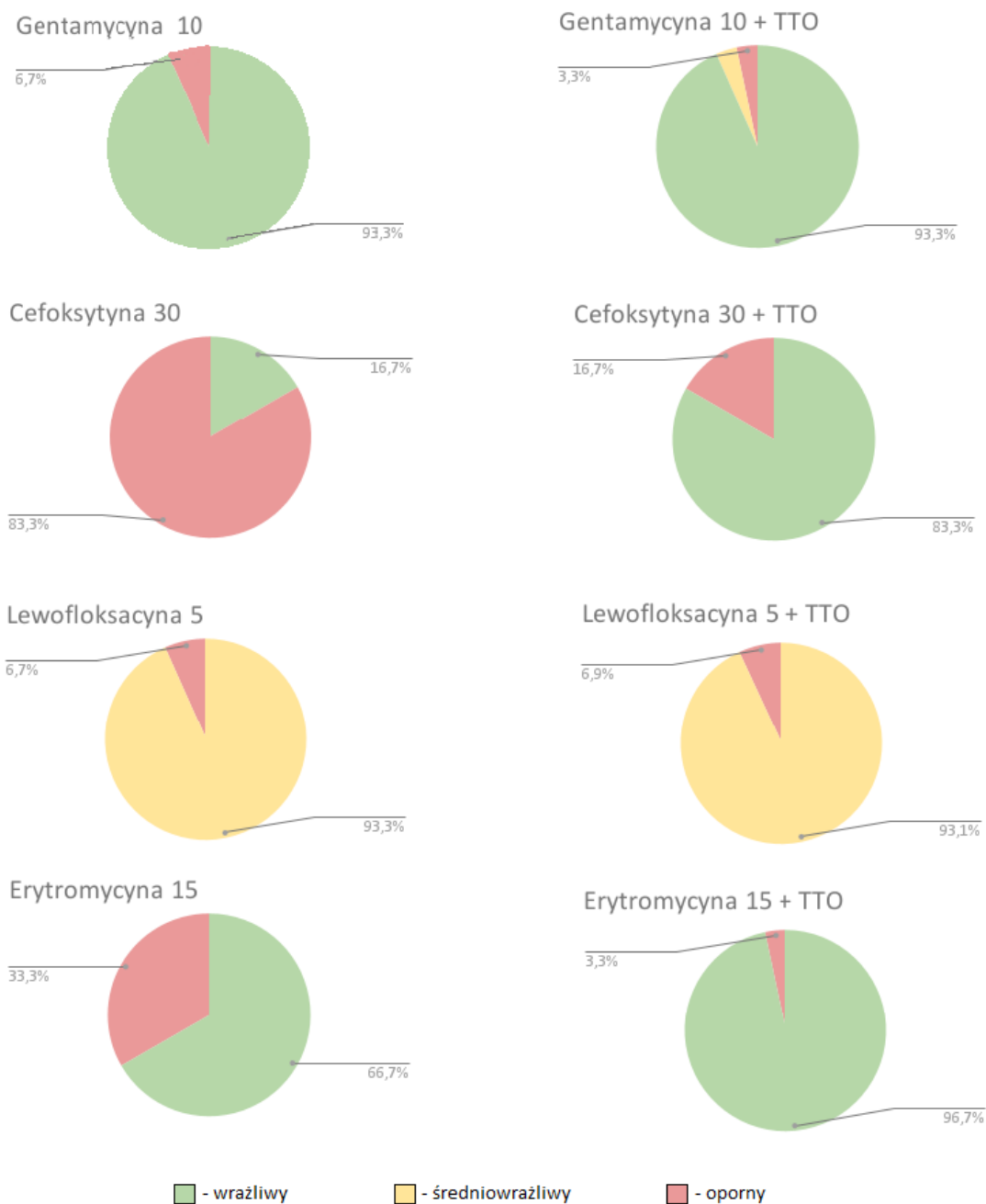
W przypadku *E. coli*, przed zastosowaniem TTO dla CAZ aż 96,67% szczepów wykazywało oporność na antybiotyki. Po dodaniu olejku 90% szczepów zakwalifikowano jako wrażliwe, 3,33% jako średniowrażliwe, a 6,67% pozostało opornych. Dla LEV 70% szczepów było opornych w monoterapii, 26,67% wrażliwych, a 3,33% średniowrażliwych. Po zastosowaniu olejku odsetek szczepów wrażliwych wzrósł do 93,33%. Przywrócenie wrażliwości nastąpiło u 67% szczepów. W przypadku TIM odsetek szczepów opornych przed dodatkiem olejku wynosił 96,67%. Po jego zastosowaniu wrażliwość odnotowano 80% szczepów, 13,33% było średniowrażliwych, natomiast 6,67% opornych. Olejek przywrócił wrażliwość u 77% szczepów. Dla TZP oporność stwierdzono u 86,67% szczepów. Po dodaniu olejku aż 96,67% szczepów wykazało wrażliwość na antybiotyki. Wrażliwość została przywrócona u 90% szczepów. Porównanie wrażliwości szczepów *E. coli* przedstawiono na Rycinie 5.



**Rycina 5.** Odsetek szczepów *E. coli* sklasyfikowanych jako S/I/R przed i po dodaniu TTO.

W badaniu *S. aureus* wykazano, że olejek eteryczny z drzewa herbacianego wykazuje synergistyczne działanie z wybranymi antybiotykami, choć efekt ten był mniej wyraźny niż w przypadku *E. coli*. Dla erytromycyny przed zastosowaniem olejku 66,67% szczepów było wrażliwych na działanie antybiotyku. Po dodaniu olejku liczba szczepów wrażliwych wzrosła do 96,67%, co wskazuje na przywrócenie wrażliwości u około 30% badanych szczepów. Średnia wartość MIC wzrosła z 21,29 mm do 29,57 mm (różnica

MIC 8,28 mm), a mediana MIC zmieniła się z 21,5 do 30 mm. W przypadku gentamycyny stwierdzono, że 93% szczepów było wrażliwych na antybiotyki. Po zastosowaniu olejku pojawiło się 3,33% szczepów średniowrażliwych, zaś średnia MIC wzrosła z 21,33 mm do 27,61 mm (różnica 6,28 mm). Mediana MIC zwiększyła się z 22 mm do 28 mm, a przywrócenie wrażliwości obserwowano u około 6,67% szczepów. Dla cefoksytyny 83,33% szczepów było opornych, a 16,67% wrażliwych. Po zastosowaniu olejku odsetek szczepów wrażliwych wzrósł do 83,33%, a opornych pozostało 16,67%. Średnia MIC wzrosła z 15,71 mm do 27,07 mm (różnica MIC 11,36 mm), a mediana MIC z 15 mm do 26,5 mm. Przywrócenie wrażliwości odnotowano dla około 63% badanych szczepów. Dla lewofloksacyny zmiany były mniej wyraźne. Średnia MIC wzrosła z 27,16 mm do 31,14 mm (różnica 3,98 mm), a mediana z 29 mm do 32 mm. Przywrócenie wrażliwości nastąpiło jedynie u około 10% szczepów. Wyniki wskazują na potencjał olejku eterycznego z drzewa herbacianego jako potencjalnej substancji synergistycznej wspomagającej działanie wybranych antybiotyków przeciwko szczepom *S. aureus*, ze szczególnym uwzględnieniem cefoksytyny i erytromycyny. Porównanie właściwości szczepów *S. aureus* przedstawiono na Rycinie 6.



**Rycina 6.** Odsetek szczepów *S. aureus* sklasyfikowanych jako S/I/R przed i po dodaniu TTO.

Test Shapiro-Wilka badający istnienie rozkładu normalnego danych statystycznych wykazał, że dane dotyczące grupy bez dodatku olejku nie spełniały warunków rozkładu normalnego, natomiast dane z grupy z dodatkiem olejku charakteryzowały się rozkładem zbliżonym do normalnego lub normalnym. W związku z tym, do analizy statystycznej porównań wielkości

stref użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya, który opiera się na porównaniu średnich wielkości stref zahamowania wzrostu bakteryjnego między grupą antybiotyków, gdzie zastosowano olejek z drzewa herbacianego, a grupą bez olejku. W grupie szczepów *E. coli* istotnie zwiększone strefy zahamowania wzrostu stwierdzono we wszystkich badanych antybiotykach (CAZ 10, LEV 5, TIM 75/10 oraz TZP 30/6) w obecności olejku, w porównaniu do grupy kontrolnej bez olejku ( $p < 0,0001$ ). Analogiczne wyniki uzyskano na szczepach *S. aureus* dla antybiotyków E 15, CN 10, FOX 30 i LEV 5. Obserwowano istotne statystycznie powiększenie stref zahamowania wzrostu w grupie z olejkiem w stosunku do grupy bez olejku ( $p \leq 0,00071$ ). Najsilniejszy efekt zarejestrowano dla erytromycyny (E 15). Wyniki testów U Manna-Whitneya przedstawiono na Rycinie 7.

 <b><i>E. coli</i></b>	 Statystyka U	 p-value	 Istotność statystyczna
 Antybiotyk			
 CAZ	531,5	0.00000	Istotny
 LEV	125,5	0.00001	Istotny
 TZP	1,0	0.00000	Istotny
 TIM	1,5	0.00000	Istotny
 <b><i>S. aureus</i></b>	 Statystyka U	 p-value	 Istotność statystyczna
 Antybiotyk			
 E	63,5	0.00000	Istotny
 CN	98,5	0.00000	Istotny
 FOX	93,0	0.00000	Istotny
 LEV	222,0	0.00071	Istotny

**Rycina 7.** Wyniki testu U Manna-Whitneya szczepów *E. coli* i *S. aureus* poddanych działaniu olejku z drzewa herbacianego. CAZ - ceftazydym ; LEV - lewofloksacyna ; TZP - piperacylina z tazobaktamem; TIM - tikarcyлина z kwasem klawulanowym ; E - erytromycyna; CN - gentamycyna; FOX - cefoksytyna

## DYSKUSJA

*Pozytywne efekty olejków (w tym olejku TTO) w kombinacji z antybiotykami*

Uzyskane wyniki świadczą o korzystnym współdziałaniu TTO z antybiotykami, co wskazuje na możliwość zwiększania skuteczności terapii przeciwdrobnoustrojowych, zwłaszcza wobec szczepów wykazujących obniżoną wrażliwość na standardowe leczenie. Podobne efekty dostrzegł Iseppi i wsp. przeprowadzając testy na biofilmach bakterii opornych takich jak *E. coli* oraz szczepy oporne *S. aureus* MRSA. [13] Badanie zostało wykonane metodą checkerboard (metoda rozcieńczeniowa, polegająca na wyznaczeniu FIC index), a użytymi antybiotykami były oksacylina, wankomycyna oraz cefotaksym. Oksacyliny użyto do szczepów *S. aureus*, gdzie stężenie MIC dla samego antybiotyku wynosiło 512 µg/ml a w połączeniu z TTO 1 µg/ml. W przypadku *Enterococcus faecium* i wankomycyny odnotowano takie same wartości - MIC dla samego antybiotyku wyniosło 512 µg/ml, a w połączeniu z olejkami 1 µg/ml. Dla szczepów *E. faecalis*, wobec których zastosowano wankomycynę i *E. coli*, wobec której użyto cefotaksymu, odnotowano 4-krotny spadek stężenia MIC, co świadczy o zwiększeniu mocy antybiotyku. [13] Zarówno w przytoczonym badaniu, jak i naszych badaniach zaobserwowano synergizm działania olejku herbacianego z badanymi antybiotykami (istotność statystyczna testu U Manna-Whitneya obejmowała wszystkie kombinacje z olejkami). Współdziałanie omawianych kombinacji potwierdzono także w kolejnym badaniu Iseppi i wsp., w którym oceniano skuteczność oksacyliny w połączeniu z TTO oraz olejkiem eukaliptusowym wobec szczepów MRSA, wykorzystując metodę checkerboard i wskaźnik FIC. [14] Dla dwóch szczepów *S. aureus* wartość MIC oksacyliny uległa redukcji z 256 µg/ml do 8 µg/ml (spadek 32-krotny), natomiast dla jednego szczepu *S. aureus* z 64 µg/ml do 4 µg/ml (spadek 16-krotny), co wskazuje na wyraźną synergację antybiotyku z badanymi olejkami. Autorzy przeprowadzili również ocenę przepuszczalności błony komórkowej metodą pochłaniania fioletu krystalicznego, wykazując jej istotne zwiększenie w obecności kombinacji oksacylina–TTO oraz oksacylina–olejek eukaliptusowy, z wartościami absorpcji rzędu 74% i 67% odpowiednio. [14] Wyniki te łączą obserwowaną intensyfikację przepuszczalności błony z nasileniem efektu przeciwdrobnoustrojowego, co mechanistycznie uzasadnia

ułatwioną penetrację chemioterapeutyków do wnętrza komórek MRSA w warunkach terapii skojarzonej. Zbieżność tych obserwacji z naszymi wynikami, w których również odnotowano wzmocnienie działania antybiotyków w obecności TTO, wzmacnia hipotezę, że modulacja przepuszczalności błon komórkowych jest jednym z kluczowych mechanizmów leżących u podstaw efektu synergistycznego w układach antybiotyk–olejek eteryczny.

Pozytywny wpływ TTO na aktywność tobramycyny wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wykazali D'Arrigo i wsp., demonstrując synergię oraz istotne wydłużenie efektu poantybiotykowego (PAE) przeciwko *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213. [15] Samodzielnie tobramycyna wykazywała krótkie PAE wynoszące odpowiednio 1,3 h dla *E. coli* i 1,7 h dla *S. aureus*, natomiast w połączeniu z TTO PAE wydłużał się do 10,8 h dla *E. coli* przy stężeniu TTO 0,05% oraz do 10,4 h i 17,4 h dla *S. aureus* przy stężeniach TTO 0,25% i 0,50%. Autorzy wnioskowali, że synergistyczna interakcja może zwiększać skuteczność antybiotyku i stanowić podstawę do rozwoju preparatów miejscowych lub wziewnych w określonych wskazaniach klinicznych. [15] Zestawienie tych obserwacji z wynikami niniejszego badania, w którym również odnotowano wzmocnienie działania antybiotyków przez TTO, wspiera tezę o powtarzalności zjawiska synergii — także wobec szczepów wykazujących oporność — i uzasadnia dalszą ocenę zastosowań wspomagających antybiotykoterapię, z potencjałem ograniczania selekcji oporności w terapiach skojarzonych.

### Ograniczenia badania

Nasze badanie posiada pewne ograniczenia. Metodologia skupiała się na teście dyfuzyjno-krażkowym w standardzie EUCAST, wymagającym inokulum 0,5 jednostki w skali McFarlanda; w praktyce dopuszczalne są niewielkie odchylenia wynikające z ograniczonej dokładności turbidymetrii, jednak mogą one wprowadzać minimalne zmienność stref. Pomiar wykonywano jako średnicę strefy całkowitego zahamowania wzrostu z

dokładnością do 1 mm; w przypadkach brzegowych (nakładanie się stref lub wyjście strefy poza krawędź płytki) stosowano pomiar promienia zgodnie z zasadami odczytu EUCAST, co może zwiększać niepewność pomiaru. Badania miały charakter *in vitro*, co ogranicza możliwość bezpośredniego przełożenia obserwowanych efektów na warunki *in vivo*; różnice wynikające z farmakokinetyki/farmakodynamiki, środowiska zakażenia i odpowiedzi gospodarza mogą modyfikować skuteczność interwencji, dlatego konieczna jest weryfikacja w modelach *in vivo* i badaniach klinicznych. Ponadto dostępna literatura dotycząca przeciwbakteryjnych właściwości olejków eterycznych, w tym olejku TTO, pozostaje fragmentaryczna i niejednoznaczna metodycznie, co podkreśla potrzebę dalszych, dobrze zaprojektowanych badań potwierdzających obserwowane efekty oraz ich znaczenie kliniczne. Wielkość próby obejmowała 30 izolatów *E. coli* i 30 *S. aureus*, kontynuacja badania w wielu ośrodkach i rozszerzenie o inne gatunki Gram-dodatnie i Gram-ujemne zwiększyłoby wiarygodność i zakres wnioskowania. Choć zastosowano standardowe procedury (kontrola inokulum, podłoże Mueller–Hinton, odczyt wg EUCAST), test dyfuzyjny jest metodą pośrednią skalibrowaną względem innych metod AST i pozostaje podatny na czynniki techniczne (wilgotność, liczba krążków i wzajemne nakładanie stref), co może minimalnie wpływać na wartości graniczne stref.

### *Implikacje kliniczne*

Obserwowany efekt synergii między olejkiem TTO a antybiotykami sugeruje możliwość redukcji dawek leków przy zachowaniu aktywności przeciwbakteryjnej, co potencjalnie ogranicza toksyczność i działania niepożądane w terapii zakażeń wywołanych przez *E. coli* i *S. aureus*. Taki efekt może być szczególnie użyteczny w zakażeniach o wysokim obciążeniu opornością, gdzie opcje terapeutyczne są ograniczone; synergia może wspierać leczenie skojarzone i zmniejszać ryzyko selekcji dalszej oporności poprzez jednoczesny nacisk na różne cele bakteryjne. Jednocześnie brak standaryzacji badań synergii oraz różne metody badawcze utrudniają

bezpośrednie przełożenie wyników *in vitro* na decyzje kliniczne, co wymaga ujednolicenia protokołów i ustanowienia precyzyjnej definicji efektu synergistycznego.

Ze względu na standardy interpretacyjne, decyzje kliniczne muszą pozostawać w zgodzie z punktami odcięcia EUCAST; wyniki należy interpretować w kontekście kategorii S/I/R. Zanim kombinacje olejku i antybiotyków zostaną zaimplementowane, konieczne są badania farmakokinetyczno-farmakodynamiczne i ocena bezpieczeństwa, w tym zmienności składu chemicznego preparatu, interakcji lekowych i miejscowego podawania w zależności od ogniska zakażenia. Wreszcie, doniesienia przeglądowe wskazują, że choć klinicznie istotna indukcja oporności na olejki jest dotąd rzadko obserwowana, długofalowe ryzyko selekcji tolerancji wymaga monitorowania, a wdrożenia kliniczne powinny być prowadzone w ramach dobrze zaprojektowanych prób z kontrolą jakości preparatu i standaryzacją składu.

## PODSUMOWANIE

Badanie wykazało, że dodatek olejku z drzewa herbacianego (TTO) istotnie wzmacniał działanie wybranych antybiotyków wobec klinicznych izolatów *E. coli* i *S. aureus* w metodzie dyfuzyjno-krażkowej (zgodnej z rekomendacjami EUCAST), przy czym efekt był wyraźniejszy dla *E. coli* i szczególnie zauważalny w połączeniach z ceftazydymem, lewofloksacyną, tikarcyliną z kwasem klawulanowym oraz piperacyliną z tazobaktamem, prowadząc często do przywrócenia wrażliwości; dla *S. aureus* synergia była umiarkowana, najsilniejsza dla cefoksytyny i erytromycyny, a słabsza dla lewofloksacyny i gentamycyny, co potwierdzono analizą statystyczną (Shapiro–Wilk, U Manna–Whitneya) i opisową (średnie, mediany, odchylenia standardowe). Spójność tych wyników z doniesieniami literaturowymi, m.in. wydłużeniem efektu poantybiotykowego tobramycyny w skojarzeniu z TTO oraz wielokrotną redukcją MIC oksacyliny wobec MRSA przy równoczesnym

zwiększeniu przepuszczalności błony, wzmacnia hipotezę, że TTO działa jako substancja wzmacniająca działanie antybiotyków poprzez zaburzenia integralności błon i ułatwienie penetracji leku, choć przełożenie niniejszych badań do praktyki klinicznej wymaga badań *in vitro*, *in vivo* oraz badań klinicznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Korczak L, Majewski P, Iwaniuk D, Sacha P, Matulewicz M, Wieczorek P, et al.: Molecular mechanisms of tigecycline-resistance among Enterobacterales. *Front Cell Infect Microbiol.*;14:1289396. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11035753/>, data dostępu [9 April 2024]
2. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.*;21(12). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33400359/>, data dostępu [3 December 2020]
3. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, et al. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health.* 2024 Apr 1;2:100081. Dostępne na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2949916X24000343>, data dostępu [April 2024]
4. Tokuda M, Shintani M. Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microb Biotechnol.*;17(1). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38226780/>, data dostępu [1 January 2024]
5. Gauba A, Rahman KM. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel).*;12(11). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37998792/>, data dostępu [1 November 2023]
6. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol [Internet].*;8(1):26–38. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966814/>, data dostępu [January 2010]
7. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist*;3(3). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34286272/>, data dostępu [1 September 2021]
8. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*;12(1):547–69. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33522395/>, data dostępu [12 December 2021]
9. Yan A, Kus J V., Sant N. The *Staphylococcus aureus* complex: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*;63(7). Dostępne na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01276-24>, data dostępu [1 July 2025]
10. Carson CF, Hammer KA, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.*;19(1):50–62. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16418522/>, data dostępu [January 2006]
11. Dontje AEWK, Schuiling-Veninga CCM, van Hunsel FPAM, Ekhart C, Demirci F, Woerdenbag HJ. The Therapeutic Potential of Essential Oils in Managing Inflammatory Skin Conditions: A Scoping Review. *Pharmaceuticals (Basel).*;17(5). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38794141/>, data dostępu [1 May 2024]
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 15.0. 2025. Dostępne na: <https://www.eucast.org>.
13. Iseppi R, Mariani M, Benvenuti S, Truzzi E, Messi P. Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. Essential Oils on Antibiotic-Resistant Bacterial Biofilms. *Molecules.*;28(4). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36838657/>, data dostępu [1 February 2023]
14. Iseppi R, Condò C, Messi P. Synergistic Inhibition of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. Essential Oils in Association with Oxacillin. *Antibiotics (Basel).* 12(5). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37237749/>, data dostępu [1 May 2023]
15. D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G, Furneri PM, Bisignano G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and

Escherichia coli. Phytomedicine.;17(5):317–22. Dostępne na:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19699074/>, data dostępu [April 2010]

# AMYLOIDOZA SERCA W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Cardiac amyloidosis in clinical practice

**Wiktorja Daria Pastuszka<sup>1\*</sup>, Kinga Maria Muś<sup>1</sup>, Mateusz Maciejczyk<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Studenckie Koło Naukowe Biochemii, Wydział Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Radomski; pastuszkawiktorja03@gmail.com (\*autor korespondencyjny)*

<sup>2</sup>*Zakład Higieny, Epidemiologii i Ergonomii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku*

## WPROWADZENIE

Amyloidoza to rzadka choroba (rocznie rozpoznaje się około 10 nowych przypadków na milion mieszkańców, a łącznie choruje około 51 osób na milion [1]) polegająca na pozakomórkowym odkładaniu substancji zwanej amyloidem w tkankach organizmu. [2] Czynniki patofizjologiczne amyloidozy różnią się w zależności od typu amyloidozy – choroba może wynikać zarówno z nadprodukcji nieprawidłowego białka, mutacji genetycznych czy z występowania przewlekłych stanów zapalnych. [3, 4, 5, 6, 7]. Amyloidoza prowadzi do zaburzenia funkcji zajętych narządów na skutek mechanicznego uszkodzenia i toksyczności agregatów białkowych. Złogi mogą lokalizować się w różnych tkankach, począwszy od nerek, wątroby, śledziony, węzłów chłonnych i nadnerczy, aż po rzadziej zajmowane narządy, takie jak mózg, drogi oddechowe czy serce. Ogólne objawy amyloidozy to: osłabienie, utrata masy ciała, zawroty głowy czy utrata przytomności. [8] Bardziej specyficzne zależą od typu choroby oraz zajętego organu. W niniejszej pracy skupiamy się na amyloidozie serca, gdzie złogi mogą powodować zaburzenia rytmu pracy serca, tj. migotanie przedsionków, ale również zaburzenia układu bodźco-przewodzącego, tj. blok odnogi pęczka Hisa. [9, 7]

## TERMINOLOGIA

Amyloidoza znana jest już od drugiej połowy XIX wieku. Występowała wcześniej pod różnymi nazwami, takimi jak zmiana smalcowata czy zmiana woskowata. W polskim piśmiennictwie utrwaliło się pojęcie „skrobiawica”, będące bezpośrednim tłumaczeniem słowa „amyloid”. Termin ten został wprowadzony przez Rudolfa Ludwiga Karla Virchowa, niemieckiego patologa, który nadał odkładającemu się materiałowi nazwę amyloid, co dosłownie oznacza „skrobiopodobny”. [10] Pomimo powszechnego przekonania, nazwa ta wynika z charakterystycznych cech wykazywanych przez amyloid podczas barwienia.

Virchow zapożyczył ten termin od botaników Vogela i Schleidena, którzy używali go dla materiału roślinnego, który, aby nabrał właściwości skrobi, a mianowicie zmieniał barwę na niebieską po dodaniu jodu, musiał być traktowany kwasem siarkowym. Zasugerował amyloid jako kompromis, ponieważ botanicy nie używali tego terminu. [11]

Dopiero w 2018 roku Komitet Nomenklatury Międzynarodowego Towarzystwa Amyloidozy (ISA) wprowadził ogólną definicję nazwy amyloid. W medycynie stosowano ją wyłącznie w odniesieniu do patologicznych złogów fibrylarnych agregatów białkowych o wyraźnych właściwościach mikroskopowych, w szczególności powinowactwie do barwnika czerwieni Kongo oraz dwójłomności w świetle spolaryzowanym. Obecnie jednak wiadomo, że takie barwienie może się znacznie różnić intensywnością i wyglądem, a złogi mogą być także funkcjonalne. Ustalono, że termin fibryla amyloidu powinien być używany w odniesieniu do wszelkich fibryli  $\beta$ -harmonijki o strukturze poprzecznej. Natomiast zaleca się, aby w przypadku użycia słowa amyloid jasno określić jego charakter - funkcjonalny lub patologiczny - oraz źródło pochodzenia. [11]

## PATOFIZJOLOGIA

Amyloidoza to grupa chorób wynikająca z odkładania się nieprawidłowo sfałdowanych białek w postaci włókienkowych struktur amyloidowych. [3] Gdy złogi te rozprowadzane są systemowo, tj. w pewnej odległości od miejsca syntezy prekursora, stan ten jest zawsze nazywany amyloidozą. Amyloid może również występować miejscowo, ale tylko niektóre z tych typów są określane jako amyloidoza. Najlepszym przykładem jest miejscowa amyloidoza AL (związana z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin). Choć lokalne złogi amyloidu są istotnymi elementami patogenezy choroby Alzheimera, choroby Parkinsona czy cukrzycy typu 2, schorzenia te nie są zaliczane do amyloidoz, ponieważ agregacja białek jest wyłącznie jednym z patomechanizmów choroby. [4]

Podstawowym składnikiem złogów amyloidowych są fibryle zbudowane ze protofilamentów, czyli stosów warstw białkowych o strukturze  $\beta$ -harmonijki, które po skręceniu tworzą fibryl amyloidowy. Fibryle amyloidowe mogą składać się z 1, 2, 3, 4 lub wielu takich protofilamentów. Protofilamenty są ze sobą połączone równolegle poprzez łańcuchy boczne. [3]

Amyloid jest białkiem o strukturze włókienkowej, ale poza nim w skład amyloidu wchodzi: osoczowe białko amyloidu P (SAP, serum amyloid P), glikozaminoglikany oraz apolipoproteiny E i J. [12] Do innych substancji należy składnik surowiczego amyloidu P pentraksyny - SAP oraz proteoglikany, głównie siarczanu heparanu (HSPG), które są obecne

w zewnątrzkomórkowo odkładanym amyloidzie. Chociaż znaczenie składników dodatkowych dla rozwoju i trwałości amyloidu jest niejasne, wykazano, że SAP chroni fibryle przed degradacją, a brak HSPG hamuje rozwój różnych form amyloidu. [4]

W przypadku amyloidozy ATTR (amyloidoza transtyretynowa), białkiem prekursorowym jest transtyretyna, białko składające się ze 127 aminokwasów o masie cząsteczkowej 55 kD, syntetyzowane głównie w wątrobie, które transportuje tyroksynę oraz kompleks retinolu (witaminy A) z białkiem wiążącym retinol. ATTR rozwija się, gdy transtyretyna traci swoją stabilną formę. Zamiast istnieć w postaci czterech połączonych ze sobą części (tetrameru), białko rozpada się na pojedyncze fragmenty. Te fragmenty tworzą następnie małe struktury - oligomery, które stopniowo tworzą większe nici (protofilamenty), a w końcu włókniste złogi amyloidowe. Te złogi odkładają się z sercu i innych narządach. W ten sposób zaburzając integralność błon komórkowych, prowadzą do stresu oksydacyjnego, zaburzeń wapniowych i śmierci kardiomiocytów, przez co dochodzi do postępującej dysfunkcji serca. [9]

## TYPY AMYLOIDOZ

Obecnie opisano ponad 25 białek zdolnych do tworzenia złogów amyloidowych u człowieka. [5] Podstawowym kryterium klasyfikacji jest typ białka prekursorowego odpowiedzialnego za tworzenie włóknistej struktury amyloidu. Uwzględnia się również miejsce ekspresji białka prekursorowego - postać miejscowa (ograniczona do jednego narządu) czy postać uogólniona (gdy złogi rozprzestrzeniają się w wielu narządach). [3] Poszczególne typy amyloidozy mają szczególne powinowactwo do określonych narządów. Do najczęściej zajmowanych należą nerki, wątroba, układ sercowo-naczyniowy, przewód pokarmowy, a także obwodowy i autonomiczny układ nerwowy. Wśród amyloidoz przebiegających z zajęciem układu sercowo-naczyniowego możemy wyróżnić:

- **Amyloidozę AL**- związaną z monoklonalnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin,
- **Amyloidozę AA** - związaną z białkiem amyloidu A,
- **Amyloidozę ATTR** - której prekursorem jest transtyretyna,
- **Amyloidozę SSA** - starczą amyloidozę układową, której prekursorem jest transtyretyna (TTR) typu dzikiego,
- **Amyloidozę AApoAI**- związaną z apolipoproteina A-I,
- **Amyloidozę IAA** - izolowaną amyloidozę przedstonka,
- **Amyloidozę A $\beta$ 2M** - amyloidozę związaną z  $\beta$ 2 makroglobuliną, obserwowaną głównie u pacjentów długotrwale dializowanych.

## AATR

Wśród głównych typów amyloidozy serca wyróżnia się postać związaną z transtyretyną (ATTR) wynikającą z agregacji amyloidu pochodzącego z niestabilnych cząsteczek transtyretyny. ATTR może mieć charakter dziki (ATTRwt lub SSA) rozwijający się zwykle u starszych pacjentów lub może być wynikiem dziedzicznej mutacji w genie *TTR* (ATTRv). [6] Gen *TTR* znajduje się na chromosomie 18 i zidentyfikowano ponad 130 patogennych mutacji, które warunkują zróżnicowany obraz kliniczny od selektywnego zajęcia serca (ATTR-CA) do czystej polineuropatii z dysfunkcją autonomicznego układu nerwowego (ATTR-PN) i fenotypu mieszanego. Dziedziczenie mutacji odbywa się w sposób autosomalny dominujący. Istnieje silny związek między konkretną mutacją, fenotypem klinicznym i rokowaniem, przy całkowitym 4-letnim przeżyciu wynoszącym 16, 40 i 79% w przypadku mutacji waliny do izoleucyny w pozycji 122 (*Val122Ile*), treoniny do alaniny w pozycji 60 (*Thr60Ala*) i waliny do metioniny w pozycji 30 (*Val30Met*). [13] Warto zauważyć, że nosicielstwo mutacji nie zawsze wiąże się z przyszłym rozwojem choroby, ponieważ biorą w niej udział także słabo scharakteryzowane czynniki epigenetyczne i niegenetyczne. Występowanie poszczególnych wariantów często zależy od uwarunkowań terytorialnych - mówimy wtedy o "efekcie założyciela". Przykładowo *Val30Met* jest endemiczna w Portugalii i Szwecji, podczas gdy *Val122Ile* obserwowano głównie we Francji i Stanach Zjednoczonych z częstością nosicielstwa 3–4% w populacji Afro-Karaibów i Afroamerykanów. [13] Wariant *TTR Val122Ile* wiąże się z późnym początkiem (mediana wieku 69 lat) ciężkiego zajęcia serca z wysoce objawową niewydolnością serca, zwykle z klasą >II według NYHA (Nowojorskiego Towarzystwa Kardiologicznego), krótszym czasem 6-minutowego marszu i wyższymi poziomami NT-proBNP (N-końcowy fragment peptydu natriuretycznego typu B). Pacjenci będący nosicielami mutacji *TTR* wykazują zwiększoną śmiertelność i najkrótszą medianę przeżycia od rozpoznania spośród wszystkich podgrup *ATTRv*. Rozpoznanie powinno zawsze prowadzić do wykonania badania genetycznego w celu zidentyfikowania mutacji *TTR*, jest to szczególnie ważne prognostycznie i dla kwalifikacji rodziny do poradni genetycznej. [13]

## AL

Amyloidoza łańcuchów lekkich immunoglobuliny (AL) to rzadki nowotwór komórek plazmatycznych charakteryzujący się nadmierną produkcją nieprawidłowo sfałdowanych łańcuchów lekkich przez klony komórek plazmatycznych, co prowadzi do dysfunkcji i niewydolności wielu narządów. [18] Jest to najczęstsza postać amyloidozy u dorosłych. [11] Rozpoznanie opiera się na wykazaniu obecności monoklonalnego białka łańcuchów lekkich w surowicy i/lub moczu, potwierdzeniu obecności złogów amyloidu w biopsji oraz typowaniu

białka metodą immunohistochemiczną. Systemowa amyloidoza AL wymaga leczenia skierowanego przeciwko nieprawidłowemu klonowi plazmatycznej komórki [6]

## IAA

Podłożem izolowanej amyloidozy przedsionków jest odkładanie się nierozpuszczalnych białek włóknikowych o strukturze poprzecznej beta-harmonijki wyłącznie w obrębie przedsionków serca. Częstość występowania choroby wzrasta wraz z wiekiem (przekraczając 90% u osób w dziewięćdziesiątym roku życia). [7] Płeć żeńska jest również czynnikiem predysponującym, choć wraz z wiekiem nie są od siebie zależne. IAA jest również powiązana ze strukturalnymi chorobami serca. W przeprowadzonych u 167 pacjentów biopsjach przedsionka, 23 na 26 pacjentów z obecnością amyloidu posiadało reumatyczną chorobę serca, a 3 przypadki pozostałe dotyczyły pacjentów z ubytkami przegrody międzyprzedsionkowej. [7] Histologicznie IAA jest kwalifikowana jako typ IVa w klasyfikacji EHRA (skala migotania przedsionków Europejskiego Stowarzyszenia Rytmu Serca). Za główne białko prekursorowe w tym typie amyloidozy uznaje się przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), który wykazuje właściwości fibrylogenne. Złogi amyloidu są immunoreaktywne dla ANP u większości pacjentów, podczas gdy złogi transtyretyny zostały zidentyfikowane u 10%. [7] Nie stwierdzono korelacji między ilością złogów białkowych a zaawansowaniem choroby. Fenotyp choroby jest najbardziej związany z akumulacją rozpuszczalnych przedfibrylarnych agregatów białek, tzw. przedamyloidowych oligomerów (PAOs). Takie struktury wykazują działanie cytotoksyczne dla kardiomiocytów, a ze względu na swoje możliwości wiązania czerwieni Kongo, mogą nie być uwidaczniane w standardowych metodach diagnostyki amyloidozy. Obecność PAOs jest niezależnie związana z nadciśnieniem. [7]

## OBRAZ KLINICZNY

Amyloidoza cechuje się znaczną zmiennością objawów klinicznych zależną od typu amyloidu oraz fenotypu narządowego. Mimo, że proces chorobowy jest wielonarządowy, to stopień i charakter zajęcia serca pozostają głównym czynnikiem rokowniczym, zwłaszcza w amyloidozie transtyretynowej. [13]

Początkowe objawy amyloidozy są nieswoiste, z czego wynikają trudności w diagnozie choroby. Objawy te obejmują: osłabienie, utratę masy ciała, zawroty głowy czy utratę przytomności. Choroba pozostaje zwykle nierozpoznana do zaawansowanego zajęcia nerek, serca czy przewodu pokarmowego. Jest często rozpoznawana podczas sekcji zwłok. [8]

U chorych obserwuje się częste zajęcie układu bodźcoprzewodzącego serca. Złogi mogą prowadzić do zaburzeń przewodzenia przedsionkowo-komorowego, bloku odnogi pęczka Hisa, choroby zatokowo-predsionkowej i migotania przedsionków. [9] W idiopatycznej amyloidozie przedsionkowej (IAA) notuje się wydłużenie czasu trwania załamka P, co świadczy o lokalnych zaburzeniach przewodzenia przedsionkowego. [7]

## DIAGNOSTYKA

Jednym z głównych problemów klinicznych amyloidozy jest spóźniona diagnoza. 31,8% pacjentów z amyloidozą podaje, że odwiedziło co najmniej pięciu różnych klinicystów zanim postawiono właściwą diagnozę. [6] Z sekcji pośmiertnych wynika, że złogi amyloidu TTR są wykrywane u znacznej części osób w podeszłym wieku. [6] Występują one u 25% ludzi powyżej 80 r.ż., ale warto podkreślić, że w wielu przypadkach ilość amyloidu jest niewielka. Częściej jest on spotykany u pacjentów z niewydolnością serca i zachowaną frakcją wyrzutową. Warto zauważyć, że u większości pacjentów diagnoza jest stawiana dopiero pośmiertnie. [16]

Za złoty standard diagnostyczny amyloidozy uznaje się biopsję narządu. [16] W badaniu histologicznym, włókna wchodzące w skład amyloidu wiążą się z czerwienią Kongo dając patognomoniczną dwójłomność w świetle mikroskopu spolaryzowanego. [10,16] Istotne jest ustawienie odpowiedniego stopnia rotowania filtrów, ponieważ jedynie wówczas niespolaryzowane światło przechodzi w spolaryzowane. Dzięki takiej właściwości mikroskopu spolaryzowanego tło jest ciemne, a materiały wykazujące dwójłomność są jasne. Warto podkreślić, że w świetle spolaryzowanym ciężko jest zauważyć kolor zielony, co wynika z optyki mikroskopu. Zwykle obserwuje się mieszanekę kolorów (niebiesko-zielony lub żółto-zielony). [10] Na podstawie obrazu klinicznego wykonuje się biopsję tkanki tłuszczowej podskórnej, ślinianek czy odbytnicy, co pozwala ujawnić 50-80% pacjentów ze skrobiawicą AL. Wykonuje się też biopsję śródmięśniową serca w celu potwierdzenia amyloidozy ATTR, ale jest ona obciążona dużym ryzykiem powikłań, takich jak: pęknięcie mięśnia sercowego czy tamponada serca. [16] Ponadto, uważa się, że w przypadku heterogennych i jednorodnych złogów amyloidu w sercu biopsja endomiokardialna nie jest rzetelną metodą do śledzenia postępu choroby. [13]

W diagnostyce amyloidozy można także stosować echokardiografię. Choć ma ona szerokie zastosowanie w diagnozowaniu niewydolności serca, nie jest czuła ani specyficzna w stosunku do amyloidozy serca. [16] Badanie echokardiograficzne u osoby z amyloidozą serca wykaże niewytłumaczalne pogrubienie ściany lewej komory ( $\geq 12$  mm), a także stopień drugi lub niższy stopień rozkurczowej dysfunkcji serca, zredukowane prędkości fal  $s'$ ,  $e'$  i  $a'$  w badaniu Dopplera tkankowego czy zmniejszone globalne odkształcenie podłużne (GLS)

lewej komory (tj. skracanie mięśnia sercowego od podstawy do koniuszka). Można też wykorzystać wieloparametryczną skalę echokardiologiczną – pacjent z amyloidozą serca osiągnie w niej powyżej 8 punktów. W skali tej bierze się uwagę na: stosunek względnej grubości lewej komory do wymiaru końcowoskurczowego lewej komory  $> 0,6$  (3 punkty), stosunek prędkości fali E do fali e' w badaniu Dopplerowskim  $> 11$  (1 punkt), amplitudę skurczowego przemieszczenia pierścienia zastawki trójdzielnej w kierunku koniuszka prawej komory (TAPSE - *tricuspid annular plane systoli excursion*)  $\geq 19$  mm (2 punkty), bezwzględną wartość globalnego podłużnego odkształcenia lewej komory  $\leq 13\%$  (1 punkt) i stosunek skurczowego podłużnego odkształcenia wierzchołka do podstawy serca  $> 2,9$  (3 punkty). [2] Ultrasonografia point-of-care (POCUS) może być użyteczna w celu ukierunkowanego przesiewu chorych w społecznościach z wysokim ryzykiem przy pomocy taniego sprzętu i skróconych protokołów. U osób, które nigdy nie miały zdiagnozowanej kardiomiopatii algorytmy sztucznej inteligencji są w stanie określić prawdopodobieństwo związane z gorszym rokowaniem. POCUS może też pomóc zidentyfikować chorych, którzy zostali pominięci w tradycyjnych sposobach diagnozowania. Tylko 10-20% przypadków kardiomiopatii przerostowej, czy też związanej z odkładaniem się amyloidu transtyretyny jest rozpoznana klinicznie. Wykorzystanie algorytmu sztucznej inteligencji dostosowanego do niskiej jakości obrazów POCUS oraz projekcji pozaosiowych może pomóc dostrzec niezdiagnozowane kardiomiopatie. [17]

O patologii może też świadczyć niskie napięcie zespołów QRS w odprowadzeniach kończynowych (poniżej 5 mm) i przedsercowych (poniżej 10 mm). Zmiany te zaobserwowano w 27% przypadków ATTR, a w 84% w amyloidozie serca AL. [13] Potwierdzona liniowa zależność między masą lewej komory i napięcia QRS w badaniu EKG nie ma jednak odzwierciedlenia w przypadku amyloidozy serca. [13] Wzrost masy lewej komory nie jest bowiem związany z przerostem kardiomiocytów, tylko z odkładaniem się amyloidu. Należy pamiętać, że brak niskonapięciowych QRS nie wyklucza diagnozy - wynikają one z utraty funkcji przez mięsień sercowy z powodu rozlanego odkładania się amyloidu. Słaba progresja załamka R w odprowadzeniach przedsercowych i załamki Q występują u  $\frac{2}{3}$  przypadków pacjentów z amyloidem AL w sercu, co może przypominać zmiany związane z zawałem. [13,18] Cechy te stają się różnicujące pacjentów z nadciśnieniem w przypadku zaawansowanych stadiów choroby. Bradyarytmie i choroby związane z zaburzeniami przewodzenia mogą być natomiast spowodowane progresywnym naciekaniami amyloidu i autonomiczną dysfunkcją serca. [18] Najczęstszą arytmia występującą w amyloidozie serca spowodowanej ATTR (dotyka 45-70% pacjentów) jest migotanie przedsionków. Przyczyny tej arytmii należy szukać w zaburzeniu funkcji przedsionka, co powoduje znaczne opóźnienie przewodzenia. Dysfunkcję węzła zatokowego

stwierdza się u 7% pacjentów z amyloidozą serca, a blok przedsionkowo-komorowy pierwszego stopnia u 35-50% pacjentów ze skrobiawicą transtyretyny. [13]

Badanie rezonansu magnetycznego serca (CMR) pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji odnośnie tkanki mięśnia sercowego. [18] Badanie CMR wymaga podania gadolinowych środków kontrastowych, które nie są wskazane u pacjentów z niewydolnością nerek. [16,18] W badaniu obserwujemy typowe dla kardiomiopatii restrykcyjnej zmiany w morfologii serca np. wzrost grubości ściany lewej komory, wzrost objętości lewego i prawego przedsionka przy pogorszonym funkcjonowaniu, dodatkowo opóźnione wzmocnienie kontrastowe mięśnia sercowego (*late gadolinium enhancement*, LGE), nieprawidłowo wydłużone czasy T1, czy też nieprawidłowe rozprzestrzenianie się kontrastu. Polega ono na szybszym wypłukiwaniu gadolinu (wchodzącego w skład kontrastu) z mięśnia sercowego i puli krwi w porównaniu do osób nie chorujących na amyloidozę. [16, 24] Obecność samego LGE nie wpływała znacząco na przeżycie, ale już niektóre cechy kinetyki kontrastu z gadolinem są związane z znaczącą różnicą w przeżywalności. Im mniejsza różnica czasu T1 w mięśniu sercowym pomiędzy warstwą podnasierdziową a powłokową, tym gorsze rokowanie. O gorszym rokowaniu świadczy też niska różnica między czasem T1 mięśnia sercowego i czasem T1 krwi, a także między czasem T1 warstwy podnasierdziowej, a czasem T1 krwi. [19] W CMR często wykrywane są wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne. Jest to też drogie badanie wykonywane tylko w specjalistycznych ośrodkach. [16]

Pojawił się zatem pomysł, żeby wykonać pomiar czasów relaksacji T1 mięśnia sercowego przy pomocy mapowania T1 w rezonansie magnetycznym bez użycia kontrastu. U pacjentów z systemową amyloidozą AL wykazano zmiany czasów T1 w wątrobie, śledzionie i tłuszczu, a także wydłużenie czasów relaksacji T1 w mięśniu sercowym. [18] T1 określa czas relaksacji podłużnej, który jest inaczej nazywany czasem relaksacji spin-sieć [20]. Jest on wydłużony u pacjentów, u których badania kliniczne sugerowały, że zajęcie serca przez chorobę jest niepewne lub nieobecne i bardziej wyraziste niż u osób z innymi chorobami serca, takimi jak stenoza aortalna i w podobnym stopniu w przypadku pogrubienia ściany lewej komory serca. Wzrost czasu T1 jest proporcjonalny do ciężkości zajęcia serca przez chorobę, co jest zauważalne też w markerach dysfunkcji skurczowej i rozkurczowej. Im wyższa wartość czasu relaksacji T1 tym większy stosunek amyloidu do włóknienia z podobną grubością ściany. Dla porównania, u zdrowych ludzi czas T1 dla mięśnia sercowego wynosi średnio 958 ms, a u chorych z amyloidozą AL średnio 1140 ms. [18] Uważa się, że mapowanie T1 bez kontrastu jest bardziej czułe niż LGE-CMR (rezonans magnetyczny serca z późnym wzmocnieniem gadolinowym) dla wykrywania zajęcia serca w amyloidozie AL. Podwyższone czasy T1 w mięśniu sercowym mogą więc być bezpośrednimi markerami złogów amyloidu w sercu. [18]

Sercowa amyloidoza ATTR może być też diagnozowana przy użyciu radioizotopowej scyntygrafii kości z bisfosfonianami znakowanymi technetem. W badaniu wykorzystuje się kwas 3,3-difosfano-1,2-propanodikarboksylowy (DPD) znakowany technetem 99m, pirofosforan (PYP) znakowany technetem 99m lub difosfonian hydroksymetyleny (HMDF) znakowany technetem 99m. Metoda ta pozwala rozpoznać obecny w sercu amyloid ATTR, czasem nawet przed zmianami stwierdzanymi w echokardiografii czy CMR. W przypadku skrobiawicy AL występuje niewielki wychwyty radioznacznika przez serce, co może utrudniać różnicowanie. Scyntygrafia powinna także obejmować tomografię emisyjną pojedynczego fotonu, aby potwierdzić, że wychwyty sercowy pochodzi z mięśniówki serca, a nie z jego jam. [2] W przypadku potwierdzenia skrobiawicy ATTR powinno się wykonać dodatkowo genotypowanie *TTR* w celu różnicowania typu dzikiego i wariantu ATTR. Jeżeli u pacjentów występuje rodzinna historia amyloidozy i wykazano typ dziki ATTR należy wykonać dodatkowe sekwencjonowanie genu *APOA*, żeby wykluczyć możliwość sercowej amyloidozy apolipoproteiny AI. Warto podkreślić, że diagnostyka ATTR typu dzikiego jest niezwykle trudna – choroba występuje u osób starszych z różnymi chorobami współistniejącymi, takimi jak choroba wieńcowa, stenoza aortalna czy nadciśnienie. [16] Badania wykazały, że czułość radioizotopowego skanu kości dla ATTR wynosi >99%, natomiast swoistość 68% w porównaniu z biopsją mięśnia sercowego. W praktyce ocenia się też stężenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (FLC) oraz elektroforezę białek surowicy (SPIE) i moczu (UPIE) z immunofiksacją. Wykazano, że połączenie SPIE, UPIE i FLC z 99% czułością identyfikuje pro-amyloidowe prekursorzy. [2]

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) jest nowo powstałą techniką w diagnozowaniu skrobiawicy sercowej, jak również w różnicowaniu amyloidozy AL od ATTR. Włókna odłożonego amyloidu o strukturze  $\beta$ -harmonijki są odpowiedzialne za wychwyty nośników przez serce. Stosując 30-minutowy dynamiczny protokół pozytonowej tomografii emisyjnej z tomografią komputerową z użyciem  $^{18}\text{F}$ -florbetabenu możliwe jest zróżnicowanie pomiędzy amyloidozą AL i ATTR - większy wychwyty sercowy występuje w przypadku AL niż ATTR. [13]

Scyntygrafia przy użyciu surowiczego składnika P amyloidu (SAP) znakowanego  $^{123}\text{I}$  jest wykorzystywana w diagnozie pacjentów z AL, amyloidozą AA i dziedzicznymi amyloidozami. Ten rodzaj scyntygrafii pozwala ocenić w jakich konkretnie narządach amyloid jest ulokowany. Może też pomóc w monitorowaniu zmian chorobowych, odpowiedzi na leczenie, a także do określenia miejsc biopsji. [13]

W diagnostyce stosuje się także krążące biomarkery krwi. Amyloid niszczy kardiomiocyty, przez co obserwuje się podwyższone są stężenia troponiny i peptydu natriuretycznego w surowicy. Warto zwrócić uwagę na nieproporcjonalne wartości peptydu

natriuretycznego do objawów niewydolności serca, co może sugerować amyloidozę sercową. [13]

## PROFILAKTYKA

W przypadku amyloidozy transtyretynowej możliwości profilaktyczne są bardzo ograniczone. Ze względu na silne uwarunkowania genetyczne, ryzyko zachorowania wynika głównie z obecności patogennych wariantów *genu TTR*. Modyfikacja stylu życia i rutynowe badania przesiewowe nie eliminują zagrożenia. W rodzinach obciążonych mutacjami zalecane jest prowadzenie poradnictwa genetycznego. [21]

Leczenie nefarmakologiczne koncentruje się na kontroli objawów oraz poprawie jakości życia. Jego zakres obejmuje wprowadzenie odpowiednio dobranej diety oraz aktywności fizycznej. Dieta powinna ograniczać podaż sodu i tłuszczów nasyconych, a także stanowić bogate źródło witaminy D. [22] Równie ważne okazuje się wsparcie psychologiczne i społeczne - u prawie 50% chorych z amyloidozą serca występują objawy lękowe, depresja lub oba te schorzenia, a w zaawansowanych przypadkach konieczne jest wprowadzenie opieki paliatywnej. [22]

## LECZENIE

Leczenie amyloidozy serca składa się z dwóch elementów, pierwszym z nich jest leczenie i zapobieganie powikłaniom, a drugim spowolnienie odkładania się złogów amyloidów. Do pierwszego elementu należy zaliczyć leczenie stenozy aortalnej. Wykonanie przezcewnikowego wszczepienia zastawki aortalnej poprawia rokowanie. U pacjentów z niewydolnością serca zwraca się uwagę na bilans płynów, należy stosować diuretyki i beta-blokery, a unikać stosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny i blokerów receptora angiotensyny II. [2] Urządzenia wspomagające pracę lewej komory zwykle nie przynoszą efektów u większości pacjentów. [2] W przypadku niewydolności serca należy rozważyć przeszczep serca. U chorych z amyloidozą serca występuje też wysokie ryzyko choroby zakrzepowo-zatorowej, przez co należy rozważyć stosowanie leków przeciwkrzepliwych, a w przypadku migotania przedsionków wdrożyć leczenie niezależnie od skali CHADS-VASC (skala do oceny ryzyka udaru niedokrwienego mózgu z migotaniem przedsionków niezwiązanym z wadą zastawkową, nazwa jest akronimem czynników ryzyka w języku angielskim: C – zastoinowa niewydolność serca lub dysfunkcja lewej komory, H - nadciśnienie, A – wiek  $\geq 75$  lat, D - cukrzyca, S - przebyty udar mózgu, przemijający atak niedokrwieny, incydent zakrzepowo-zatorowy, V - choroba naczyniowa, A - 65-74 lat, Sc -

pleć) . U chorych stosuje się amiodaron, należy natomiast uważać na preparaty digoksyny. [2]

Drugi element leczenia ukierunkowany jest na hamowanie produkcji prekursorów amyloidu. Specyficzne leczenie w sercowej amyloidozie AL powinno być prowadzone w wielodyscyplinarnym zespole, który składa się ze specjalistów z onkohematologii i kardiologii. Zajęcie serca jest związane z bardzo słabym rokowaniem w przypadku amyloidozy AL - średnie przeżycie wynosi 8 miesięcy, a u chorych bez zajętego chorobą serca do 4 lat. [13] W jednym z badań zainteresowano się wpływem leków wykorzystywanych do leczenia szpiczaka mnogiego - kolchicyny, melfalanu i prednizonu na systemową amyloidozę. Zauważono dłuższe przeżycie chorych, którzy przyjmowali melfalan (17-18 miesięcy) niż w grupie zażywających kolchicynę (8 miesięcy). Mimo, że terapia melfalanem i prednizonem zwiększa przeżycie chorych, leczenie nadal jest mało efektywne. [23] U chorych z amyloidozą AL zaleca się stosowanie terapii opierającej się na deratumumabie (humanizowane monoklonalne przeciwciało IgGk przeciwko CD38) w połączeniu z bortezomibem (odwracalny inhibitor proteasomu 26S), cyklofosfamidem (cytostatyk) i deksametazonem (glikokortykosteroid) (Dara-VCd). W przypadku odpornej amyloidozy poleca się izatuksimab, będący przeciwciałem monoklonalnym anti-CD38. W połączeniu z pomalidomidem i deksametazonem przy wznowie amyloidozy AL 80% pacjentów osiągnęło bardzo dobrą częściową odpowiedź hematologiczną. [14] Istnieje jednak potrzeba dalszych badań na ludziach. W przypadku amyloidozy z t(11;14) (translokacja między chromosomem 11 a 14, aberracja ta może występować w amyloidozie AL), stosuje się jako główne leczenie wenetoklaks, będący selektywnym inhibitorem białka BCL-2 (B-cell lymphoma 2). [14] Pośród 29 pacjentów otrzymujących wenetoklaks zauważono bardzo dobrą częściową odpowiedź hematologiczną, a po sześciu miesiącach terapii u 35% badanych doszło do poprawy parametrów świadczących o zajęciu serca w przebiegu choroby, a w 90,9% poprawiły się parametry świadczące o uszkodzeniu nerek. [14] Co ważne, wzrasta dostępność innowacyjnych i celowanych terapii dla ATTRwt i ATTRv. Efektywne leczenie amyloidozy ukierunkowane jest na hamowanie produkcji zmutowanego białka TTR, co można uzyskać poprzez przeszczep wątroby czy modyfikację genetyczną, jak również wyciszanie genowe (dochodzi do blokady transkrypcji lub translacji genu i przez to nie dochodzi do ekspresji danego genu). [2]

Tafamidis to lek stabilizujący tetramer TTR - zapobiega jego rozkładowi do monomerów przez wiązanie miejsc wiążących tyroksynę. W porównaniu z placebo redukuje o 30% liczbę wszystkich zgonów u pacjentów z amyloidozą i niewydolnością serca. Tafamidis działa głównie u pacjentów z klasą NYHA I-II (klasy niewydolności serca według New York Heart Association, w klasie I nie występuje istotne ograniczenie wydolności fizycznej, klasa II charakteryzuje się niewielkim ograniczeniem wydolności fizycznej), a

zmniejszoną śmiertelność zaobserwowano po 18-20 miesiącach leczenia. U pacjentów z klasą III NYHA (III klasa niewydolności serca, w której wydolność wysiłkowa jest znacznie ograniczona) nie zauważa się już efektu terapeutycznego. [13]

Patirisan to siRNA (*small interfering RNA*, krótki interferujący RNA) zamknięte w tłuszczowych nanocząsteczkach, które blokują ekspresję TTR w hepatocytach. Lek ten odpowiada za przebudowę mięśnia sercowego - dochodzi do zmniejszenia średniej grubości ściany serca oraz obniżenia stężenia NT-proBNP we krwi. W badaniu CMR u 40% osób badanych stwierdzono zmniejszoną gęstość amyloidu w mięśniu sercowym. [13]

Inotersen jest oligonukleotydem antysensowym (krótki fragment kwasu nukleinowego zaprojektowany tak, aby wiązał się z komplementarną sekwencją mRNA konkretnego genu, w celu zablokowania jego transkrypcji), który hamuje produkcję TTR w wątrobie. Lek powoli zmniejsza objawy neurologiczne i przyczynia się do poprawy jakości życia u pacjentów z ATTRv przy dawce 300 mg raz w tygodniu przez okres 12 miesięcy. W jednym z badań zauważono poprawę tolerancji wysiłku i spadek średniej masy lewej komory zmierzony w CMR. [13]

## PODSUMOWANIE

Amyloidoza serca pozostaje chorobą rzadką i trudną do zdiagnozowania. Jest często pomijana przy różnicowaniu przyczyn niewydolności serca, szczególnie u osób w podeszłym wieku. Niska świadomość choroby wśród lekarzy skutkuje słabą diagnostyką, co ogranicza wdrożenie odpowiedniego leczenia i poprawę rokowania.

Złotym standardem w diagnostyce amyloidozy serca jest biopsja serca z barwieniem tkanki czerwienią Kongo, jednak wiąże się jednak z dużym ryzykiem. Dlatego coraz częściej wykorzystuje się metody mniej inwazyjne, tj. rezonans magnetyczny serca (CMR) z kontrastem gadolinowym lub mapowanie T1 bez kontrastu. W celu rozróżnienia dwóch głównych typów amyloidozy - ATTR i AL, co ma kluczowe znaczenie dla zastosowania odpowiedniego leczenia, stosujemy m.in. scyntygrafię kości z bisfosfonianami znakowaną technetem, PET oraz scyntygrafię SAP znakowaną <sup>123</sup>I. Badanie echokardiograficzne czy elektrokardiograficzne może sugerować amyloidozę, ale nie pozwala jej jednoznacznie potwierdzić.

Leczenie amyloidozy obejmuje dwie składowe: zapobieganie i leczenie powikłań sercowych a także spowolnienie odkładania się złogów amyloidów w sercu. Wybór terapii zależy od typu choroby, dlatego istotna jest diagnostyka różnicowa tego schorzenia. W amyloidozie AL stosuje się leki używane w niektórych nowotworach krwi, [m.in.](#) w szpiczaku mnogim czy w przewlekłej białaczce limfocytowej, natomiast w przebiegu amyloidozy ATTR stosuje się leki wpływające na stabilizację lub zmniejszenie produkcji TTR.

Zwiększanie wiedzy i czujności wśród lekarzy różnych specjalizacji, zwłaszcza kardiologów, nefrologów czy neurologów, jest kluczowe dla poprawy opieki nad pacjentami z amyloidozą. Wczesne rozpoznanie pozwala na utrzymanie dobrej jakości życia i większej sprawności pacjentów w codziennym funkcjonowaniu. Stąd też edukacja klinicystów powinna być priorytetem we współczesnej medycynie.

1. Kumar N, Zhang NJ, Cherepanov D, Romanus D, Hughes M, Faller DV. Global epidemiology of amyloid light-chain amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2022 Jul 19;17(1):278. doi: 10.1186/s13023-022-02414-6. PMID: 35854312; PMCID: PMC9295439. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9295439/>
2. Pablo Garcia-Pavia, Claudio Rapezzi, Yehuda Adler, Michael Arad, Cristina Basso, Antonio Brucato, Ivana Burazor, Alida L P Caforio, Thibaud Damy, Urs Eriksson, Marianna Fontana, Julian D Gillmore, Esther Gonzalez-Lopez, Martha Grogan, Stephane Heymans, Massimo Imazio, Ingrid Kindermann, Arnt V Kristen, Mathew S Maurer, Giampaolo Merlini, Antonis Pantazis, Sabine Pankuweit, Angelos G Rigopoulos, Ales Linhart, Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis: a position statement of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases, *European Heart Journal*, Volume 42, Issue 16, 21 April 2021, Pages 1554–1568, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab072>
3. Buxbaum, JN, Eisenberg, DS, Fändrich, M., McPhail, ED, Merlini, G., Saraiva, MJM, ... Westermark, P. (2024). *Amyloid nomenclature 2024: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee.* *Amyloid*, 31 (4), 249–256. Dostępne na: <https://doi.org/10.1080/13506129.2024.2405948>
4. Daniel A. Brenner, Mohit Jain, David R. Pimentel, Bo Wang, Lawreen H. Connors, Martha Skinner, Carl S. Apstein, and Rongliu Liao. *Human Amyloidogenic Light Chains Directly Impair Cardiomyocyte Function Through an Increase in Cellular Oxidant Stress.* (2004) *Circulation Research*, 94 (8). Dostępne na: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126569.75419.74>
5. Julie A. Vrana, Jeffrey D. Gamez, Benjamin J. Madden, Jason D. Theis, H. Robert Bergen, III, Ahmet Dogan. *Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry–based proteomic analysis in clinical biopsy specimens.* (2009) *Blood* 114 (24): 4957–4959. Dostępne na: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-230722>
6. Hare, J. *Cardiac Amyloidosis: Is This the Tip of the Iceberg?\** . *J Am Coll Cardiol Img.* 2020 Apr, 13 (4) 921–923. Dostępne na: <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.11.004>
7. Andreas Goette, Jonathan M. Kalman, Luis Aguinaga, Joseph Akar, Jose Angel Cabrera, Shih Ann Chen, Sumeet S. Chugh, Domenico Corradi, Andre D'Avila, Dobromir Dobrev, Guilherme Fenelon, Mario Gonzalez, Stephane N. Hatem, Robert Helm, Gerhard Hindricks, Siew Yen Ho, Brian Hoit, Jose Jalife, Young-Hoon Kim, Gregory Y.H. Lip, Chang-Sheng Ma, Gregory M. Marcus, Katherine Murray, Akihiko Nogami, Prashanthan Sanders, William Uribe, David R. Van Wagoner, Stanley Nattel, ESC Scientific Document Group , Review coordinator , *EHRA/HRS/APHS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication*, *EP Europace*, Volume 18, Issue 10, October 2016, Pages 1455–1490, <https://doi.org/10.1093/europace/euw161>
8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia* 10 wydanie. Red. wyd. polskiego: Olszewski W. Wrocław: Edra Urban & Partner; 2019. ISBN: 9788366310186.
9. Mathew S. Maurer, M.D., Jeffrey H. Schwartz, Ph.D., Balarama Gundapaneni, M.S., Perry M. Elliott, M.D., Giampaolo Merlini, M.D., Ph.D., Marcia Waddington-Cruz, M.D., Arnt V. Kristen, M.D. i in. *Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy.* (2018) *N Engl J Med* 2018;379:1007-1016. Dostępne na: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1805689?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1805689?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov)
10. Howie AJ. *Origins of a pervasive, erroneous idea: The "green birefringence" of Congo red-stained amyloid.* *Int J Exp Pathol.* 2019 Aug;100(4):208-221. doi: 10.1111/iep.12330. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31515863; PMCID: PMC6877999. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6877999>
11. Buxbaum, JN, Dispenzieri, A., Eisenberg, DS, Fändrich, M., Merlini, G., Saraiva, MJM, ... Westermark, P. (2022). *Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and*

- recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. Amyloid*, 29 (4), 213–219. Dostępne na: <https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2147636>
12. Żelichowski G. *Diagnoza amyloidozy układu sercowo-naczyniowego* (2010) *Choroby Serca i Naczyń*, 7 (1) 40–48. Dostępne na: [https://journals.viamedica.pl/choroby\\_serca\\_i\\_naczyn/article/viewFile/12024/9902](https://journals.viamedica.pl/choroby_serca_i_naczyn/article/viewFile/12024/9902)
  13. Aldostefano Porcari, Marianna Fontana, Julian D Gillmore, Transthyretin cardiac amyloidosis, *Cardiovascular Research*, Volume 118, Issue 18, December 2022, Pages 3517–3535, Dostępne na: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac119>
  14. Bu, Q., Zhu, HH. & Chen, W. *Novel targeted therapies for immunoglobulin light chain amyloidosis: latest updates from the 2024 ASH annual meeting. (2025) J Hematol Oncol* 18, 28 . Dostępne na: <https://doi.org/10.1186/s13045-025-01681-7>
  15. Laires PA, Fang S, Evans J, Thompson J, Gaur A, Staruk B, Gupta A, Manwani R. Incidence and prevalence of light chain amyloidosis in the United States in 2019–2021 using Optum EHR data. *Sci Rep.* 2025 Jul 11;15(1):25149. doi: 10.1038/s41598-025-09498-7. PMID: 40646057; PMCID: PMC12254412. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6331669/>
  16. Julian D. Gillmore, MD, PhD, Mathew S. Maurer, MD, Rodney H. Falk, MD, Giampaolo Merlini, MD, Thibaud Damy, MD, Angela Dispenzieri, MD, Ashutosh D. Wechalekar, MD, DM, John L. Berk, MD, Candida C. Quarta, MD, PhD, Martha Grogan, MD, Helen J. Lachmann, MD, Sabahat Bokhari, MD, Adam Castano, MD, Sharmila Dorbala, MD, MPH, Geoff B. Johnson, MD, PhD, Andor W.J.M. Glaudemans, MD, PhD, Tamer Rezk, BSc, Marianna Fontana, MD, Giovanni Palladini i in.. *Nonbiopsy Diagnosis of Cardiac Transthyretin Amyloidosis.* (2016) *Circulation*, 133 (24) Dostępne na: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021612>
  17. Oikonomou EK, Vaid A, Holste G, Coppi A, McNamara RL, Baloesu C, Krumholz HM, Wang Z, Apakama DJ, Nadkarni GN, Khera R. *Artificial intelligence-guided detection of under-recognised cardiomyopathies on point-of-care cardiac ultrasonography: a multicentre study. Lancet Digit Health.* 2025 Feb;7(2):e113–e123. doi: 10.1016/S2589-7500(24)00249-8. PMID: 39890242; PMCID: PMC12084816. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12084816/>
  18. Karamitsos, T, Piechnik, S, Banyersad, S. i in *Noncontrast T1 Mapping for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis.* J Am Coll Cardiol Img. 2013 kwiecień, 6 (4) 488–497. Dostępne na: <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.11.013>
  19. Maceira AM, Prasad SK, Hawkins PN, Roughton M, Pennell DJ. *Cardiovascular Magnetic Resonance and prognosis in cardiac amyloidosis* 2008;10(1). Dostępne na: <https://doi.org/10.1186/1532-429X-10-54>
  20. Cieszanowski A, Bekiesińska-Figatowska M, red. *Radiologia. Podręcznik dla studentów.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2022. Dostępne na: <https://doi.org/10.53271/2022.027>
  21. Holcman K, Rubiś P, Ćmiel B, Stępień A, Graczyk K, Mróz K, Szot W, Dziewięcka E, Winiarczyk M, Kurek M, Kęska M, Podolec P, Kostkiewicz M. Pre-symptomatic scintigraphic and genetic cascade screening in cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2025 Apr;52(5):1840–1852. doi: 10.1007/s00259-024-06966-6. Epub 2024 Nov 14. PMID: 39537877; PMCID: PMC11928397. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11928397/>
  22. Grzybowski J, Podolec P, Holcman K et al. *Diagnosis and treatment of transthyretin amyloidosis cardiomyopathy: A position statement of the Polish Cardiac Society.* *Kardiol Pol.* 2023, 81(11): 1167–1185. Dostępne na: <https://ptkardio.pl/opinie/53-stanowisko-ekspertow-polskiego-towarzystwa-kardiologicznego-dotyczace-diagnostyki-i-leczenia-amyloidozy-transtyretynowej-serca>
  23. Robert A. Kyle, Morie A. Gertz, Philip R. Greipp, Thomas E. Witzig, John A. Lust, Martha Q. Lacy, Terry M. Therneau *A Trial of Three Regimens for Primary Amyloidosis: Colchicine Alone, Melphalan and Prednisone, and Melphalan, Prednisone, and Colchicine* (1997) *New*

- England Journal of Medicine*, 1997;336:1202-1207, PMID - 9110907. Dostępne na:  
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199704243361702>
24. Falk RH, Quarta CC, Dorbala S. *How to Image Cardiac Amyloidosis* *Circulation: Cardiovascular Imaging* 2014; 7(3) dostępne na:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCIMAGING.113.001396>

# ENDOMETRIOZA JAKO PRZYCZYNA NIEPŁODNOŚCI: MECHANIZMY, WYZWANIA DIAGNOSTYCZNE I STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Endometriosis as a cause of infertility: mechanisms, diagnostic challenges, and therapeutic strategies

**Anna Łońska<sup>1</sup>, Jakub Tomaszewski<sup>1</sup>, Anna Grajewska<sup>2\*</sup>, Edyta Rysiak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Tomaszewski Medical Center, Białystok*

<sup>2</sup>*Zakład Chemii Leków, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku;  
anna.grajewska@sd.umb.edu.pl (\*autor korespondencyjny)*

## WPROWADZENIE

Endometrioza jest przewlekłą, estrogenozależną chorobą zapalną, definiowaną jako obecność poza jamą macicy tkanki endometrium, błony śluzowej macicy. Ogniska chorobowe najczęściej lokalizują się w obrębie miednicy mniejszej: na jajnikach, jajowodach, otrzewnej, czy więzadłach macicy. Zdarza się także, że endometrioza zajmuje jelita, pęcherz, przeponę i inne ogniska odległe. Współczesne wytyczne kliniczne podkreślają, że rozpoznanie nie wymaga już obligatoryjnej weryfikacji histopatologicznej w laparoskopii, przy czym w wielu sytuacjach opiera się na obrazie klinicznym i nieinwazyjnych badaniach obrazowych, takich jak ultrasonografia ginekologiczna transwaginalna. Podkreślić należy, że laparoscopia pozostaje metodą referencyjną w przypadkach niejednoznacznych lub wymagających leczenia operacyjnego. Skala tego problemu zdrowotnego jest globalna [1-3]. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że endometrioza dotyczy około dziesięciu procent kobiet w wieku rozrodczym, co przekłada się na ponad 190 milionów osób, a objawy mogą rozpoczynać się niedługo po pierwszej miesiączce, i utrzymywać się do wieku menopauzalnego. Rozpoznanie bywa

opóźnione o wiele lat, co wynikać może ze zmienności obrazu klinicznego, normalizacji dolegliwości bólowych przez otoczenie kobiety oraz z ograniczonej dostępności ukierunkowanej diagnostyki. Dane literaturowe ostatnich lat wskazują na średnie opóźnienie diagnozy rzędu od kilku do kilkudziesięciu lat. W kontekście rozrodu endometrioza ma znaczenie pierwszoplanowe [2-4]. Niepłodność, rozumiana zgodnie z definicją American Society for Reproductive Medicine jako brak ciąży po dwunastu miesiącach regularnego współżycia bez zabezpieczenia (po sześciu miesiącach u kobiet mających co najmniej 35 lat), występuje u pacjentek z endometriozą częściej niż w populacji ogólnej, a odsetek endometriozy wśród kobiet zgłaszających się do ośrodków leczenia niepłodności sięgać może nawet 25% [3]. Polska Agencja Badań Medycznych podaje, że endometrioza odpowiada za około 40% przypadków niepłodności kobiecej, a u chorych na endometriozę problemy z płodnością ma 50% pacjentek [5]. W wieloośrodkowym polskim badaniu wśród kobiet starających się o dziecko, u 33,73% zdiagnozowano endometriozę jako przyczynę niepłodności, co potwierdza jej istotną rolę jako jednego z najczęstszych czynników ograniczających płodność i uzasadnia konieczność wczesnej diagnostyki oraz ukierunkowanego leczenia [6]. Znaczenie społeczne i zdrowotne jest tym większe, że endometrioza współwystępuje z przewlekłym bólem miednicy, obfitymi krwawieniami, czy przewlekłymi bólami w trakcie i po współżyciu (dyspareunia), co potęguje obciążenie psychiczne, zawodowe, ekonomiczne pacjentek oraz ich rodzin. Wytyczne ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) oraz NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) wskazują, aby kwestie płodności pacjentki uwzględniać od momentu rozpoznania, a plan postępowania dostosowywać do wieku, rezerwy jajnikowej, fenotypu choroby i współistniejących czynników ryzyka [1,2]. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie mechanizmów, poprzez które endometrioza prowadzi do obniżenia płodności, a także omówienie skuteczności i ograniczeń dostępnych strategii terapeutycznych na tej płaszczyźnie.

## ZASADNICZA CZĘŚĆ PRACY

Patogeneza endometriozy jest złożona, wieloczynnikowa i nadal stanowi przedmiot badań, z uwagi na fakt braku jednoznacznego mechanizmu wyjaśniającego jej rozwój i progresję. W literaturze wskazuje się na współdziałanie czynników anatomicznych, immunologicznych, genetycznych, hormonalnych i środowiskowych, które razem prowadzą do powstania i utrzymania zmian endometrialnych poza macicą. Wyróżnić można kilka teorii etiopatogenetycznych. Jedną z teorii stanowi klasyczna teoria Sampsona, zakładająca wsteczne miesiączkowanie, czyli cofanie się krwi miesiączkowej zawierającej żywe komórki endometrium do jamy otrzewnej. Komórki te implantują się na powierzchni otrzewnej, gdzie ulegają proliferacji pod wpływem estrogenów. Teoria ta wyjaśnia częste umiejscowienie zmian w miednicy mniejszej, ale nie wyjaśnia przypadków endometriozy pozagenitalnej ani obecności choroby u kobiet z zamkniętymi jajowodami. Alternatywne hipotezy obejmują metaplazję komórek otrzewnej, która zakłada zdolność komórek mezotelialnych, czyli wyspecjalizowanych komórek nabłonkowych, do transformacji w komórki podobne do endometrium pod wpływem czynników hormonalnych i środowiskowych. Inne koncepcje wskazują na udział komórek macierzystych, które mogą różnicować się w komórki endometrialnej poza jamą macicy. Istnieją także doniesienia o możliwości szerzenia się komórek endometrium drogą naczyń krwionośnych lub limfatycznych, co korespondowałoby z przypadkami lokalizacji schorzenia w odległych lokalizacjach, chociaż są to rzadkie przypadki. Wskazuje się także na mechanizmy immunologiczne i zapalne. Kluczową rolę w patogenezie odgrywa dysfunkcja układu immunologicznego. U zdrowych kobiet komórki endometrium, które dostają się do jamy otrzewnej podczas miesiączki, są eliminowane przez mechanizmy odpornościowe, głównie aktywność komórek NK (ang. natural killer) i makrofagów. W endometriozie obserwuje się obniżoną cytotoksyczność komórek NK, zaburzoną fagocytozę oraz wzrost cytokin prozapalnych i czynników wzrostu. Prowadzi to do przewlekłego stanu

zapalnego, angiogenezy oraz ułatwienia przeżycia i inwazji komórek endometrialnych w otrzewnej [1,2, 7-10].

Endometrioza jest chorobą estrogenozależną. W jej przebiegu obserwuje się nadekspresję aromatazy, enzymu kluczowego w syntezie estrogenów, w ogniskach endometrialnych, co prowadzi do lokalnej nadprodukcji estradiolu i stymulacji proliferacji. Dodatkowo, tkanka endometrialna słabo reaguje na progesteron, ponieważ ma zmniejszoną liczbę receptorów tego hormonu. Powoduje to, że komórki nie przechodzą prawidłowej przemiany w fazie wydzielniczej cyklu i zamiast tego nadal się namnażają. Co istotne, zaburzenia w produkcji prostaglandyn nasilają stan zapalny, co sprzyja nadwrażliwości na ból i przewlekłym dolegliwościom bólowym. Badania rodzinne i bliźniacze wskazują, że w rozwoju endometriozy istotną rolę mogą odgrywać czynniki genetyczne. Zauważa się zmiany w genach regulujących metabolizm estrogenów, działanie układu odpornościowego oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Coraz większe znaczenie przypisuje się także mechanizmom epigenetycznym, które mogą wpływać na aktywność genów kontrolujących zdolność komórek endometrium do przyczepiania się, wnikania w tkanki i przetrwania poza jamą macicy. Nowo powstałe ogniska endometrialnej wymagają unaczynienia, dlatego tworzenie nowych naczyń jest kluczowe w przebiegu choroby. W zmianach wykrywa się zwiększoną produkcję białek (takich jak VEGF ang. vascular endothelial growth factor i angiopoetyny), które stymulują powstawanie naczyń krwionośnych. Jednocześnie obserwuje się nadmierny rozwój włókien nerwowych (neurogeneza) w obrębie ognisk endometrialnych, co tłumaczy, dlaczego pacjentki często odczuwają silny i przewlekły ból. Na rozwój endometriozy mogą wpływać także czynniki środowiskowe. Należą do nich m.in. dioksyny i inne substancje zaburzające równowagę hormonalną, które mogą zmieniać działanie układu odpornościowego oraz nasilać aktywność enzymu aromatazy, zwiększając produkcję estrogenów. Istotne znaczenie ma także stres oksydacyjny, czyli nadmiar wolnych rodników i żelaza w płynie otrzewnowym,

który prowadzi do uszkodzeń komórek i sprzyja postępowi choroby [11-18].

Patogeneza endometriozy znajduje swoje odzwierciedlenie w wielopoziomowych zmianach, obejmujących zarówno mikrośrodowisko tkankowe, jak i strukturę narządów oraz funkcjonowanie całego organizmu. Mechanizmy zapalne, hormonalne, immunologiczne oraz epigenetyczne prowadzą do specyficznych cech morfologicznych i czynnościowych, które tłumaczą obraz kliniczny choroby. Na poziomie narządowym zmiany te manifestują się powstawaniem torbieli endometrialnych, zrostów oraz włóknistych blizn, które deformują anatomiczne stosunki w obrębie miednicy mniejszej. Zmiany obejmują przede wszystkim jajniki, jajowody i otrzewną, co prowadzi do utrudnienia transportu gamet i zaburzeń procesu zapłodnienia. Angiogeneza i włóknienie sprzyjają utrwalaniu ognisk, czyniąc je bardziej odpornymi na leczenie chirurgiczne. Na poziomie całego organizmu konsekwencje patogenezy mają charakter ogólnoustrojowy. Deregulacja hormonalna z przewagą estrogenów nad progesteronem prowadzi do zaburzeń cyklu miesięczkowego i utrudnionej implantacji zarodka. Przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny obecny w płynie otrzewnowym przyczyniają się do uszkodzeń oocytów i obniżenia rezerwy jajnikowej, a także negatywnie wpływają na ruchliwość plemników i zdolność zarodka do prawidłowego rozwoju. Nadmierna neurogeneza w obrębie zmian endometrialnych tłumaczy z kolei nasilone dolegliwości bólowe i hiperalgezę, które są charakterystycznym objawem klinicznym endometriozy. Zrosty włókniste unieruchamiają jajniki i jajowody, deformują zachyłki otrzewnowe i zmieniają wzajemne położenie struktur miednicy, co utrudnia uwolnienie oocytu, jego uchwycenie przez strzępki jajowodu oraz transport w kierunku jamy macicy. Torbiele endometrialne wypełnione produktami hemolizy, są źródłem przewlekłego zapalenia i stresu oksydacyjnego. Dodatkowo ich obecność wiąże się z niższą rezerwą jajnikową, a zabiegi operacyjne, choć często konieczne, mogą ją dalej redukować [13-17]. Z perspektywy niepłodności kluczowe jest to, że nawet przy drożnych jajowodach zaburzona biomechanika miednicy i adhezje upośledzają pobranie i transport komórki jajowej oraz

ruchliwość plemników w drogach rodnych. Te czynniki mechaniczne współdziałają z komponentą biochemiczną zapalenia, wzajemnie nasilając negatywny wpływ na szanse zapłodnienia i wczesny rozwój zarodka. Istotną rolę w rozwoju niepłodności u pacjentek z endometriozą odgrywają także zaburzenia środowiska immunologicznego i oksydacyjnego w jamie otrzewnowej. Podwyższone stężenia cytokin, prostaglandyn i reaktywnych form tlenu (ROS) wpływają niekorzystnie na ruchliwość i funkcję plemników, zmieniają właściwości śluzu szyjkowego oraz zaburzają pracę rzęsek jajowodowych, utrudniając transport komórki jajowej. W badaniach opisano również zmiany w oocytych, takie jak twardnienie osłonki przejrzystej, nieprawidłowa reakcja korowa czy zaburzenia dojrzewania cytoplazmatycznego, które utrudniają wniknięcie plemnika i proces zapłodnienia. Na poziomie komórkowym oocyty częściej nie osiągają dojrzałości metafazy II, wykazują cechy dysfunkcji mitochondrialnej, obniżoną zawartość ATP oraz większą podatność na uszkodzenia DNA. W konsekwencji zmniejsza się ich potencjał rozwojowy, co znajduje odzwierciedlenie w gorszej jakości powstających zarodków. W endometriozie zaburzeniu ulega receptywność endometrium, czyli zdolność błony śluzowej macicy do przyjęcia zarodka w tzw. oknie implantacyjnym. U pacjentek z tą chorobą stwierdzono nieprawidłową ekspresję cząsteczek adhezyjnych, zwłaszcza integryn (receptorów powierzchniowych komórek endometrium), które odgrywają kluczową rolę w procesie zagnieżdżenia. Jednocześnie dochodzi do zaburzeń w szlakach transkrypcyjnych związanych z genem HOXA10 oraz tlenkiem azotu [14-16]. Brak lub niskie stężenie integryn wiąże się z gorszym rokowaniem w zakresie implantacji. Podobne mechanizmy obserwuje się także w innych sytuacjach klinicznych, takich jak nawracające poronienia czy niepłodność niewyjaśnionego pochodzenia, jednak uważa się, że mają one zastosowanie również w endometriozie. W wielu przypadkach współistnieje dodatkowo adenomioza, która dodatkowo obniża zdolność endometrium do przyjęcia zarodka. W praktyce klinicznej skutkiem wskazanych mechanizmów jest obniżenie skuteczności naturalnej prokreacji

oraz selektywnie niekorzystny wpływ na niektóre etapy procedur wspomaganego rozrodu. Dane literaturowe sygnalizują istotnie niższy odsetek implantacji u kobiet z endometriozą. Podkreśla się także, że wyniki mogą być zróżnicowane w zależności od postaci endometriozy (otrzewnowej, jajnikowej, czy głęboko naciekającej) oraz od współistnienia adenomiozy [15-19].

Leczenie ukierunkowane na płodność obejmuje trzy filary: interwencje chirurgiczne, terapię farmakologiczną oraz zastosowanie metod wspomaganego rozrodu. Chirurgia laparoskopowa z użyciem ablacji lub wycięcia ognisk oraz adheziolizy (chirurgicznego usuwania zrostów), jest standardem korekcji zaburzeń anatomicznych. U kobiet z minimalną i łagodną endometriozą (stopień I–II wg rASRM) leczenie operacyjne zwiększa szanse na ciążę spontaniczną w porównaniu z samą laparoskopią diagnostyczną. W bardziej zaawansowanych stadiach operacja najczęściej pełni funkcję przygotowawczą przed technikami wspomaganego rozrodu ART (Assisted Reproductive Technology,) oraz leczenia bólu. Decyzje dotyczące leczenia endometriozy w obrębie jajnika muszą uwzględniać ryzyko redukcji rezerwy jajnikowej i powinny być personalizowane. Odsetek nawrotów po zabiegach chirurgicznych pozostaje istotny, co w planowaniu prokreacji przemawia za wykorzystaniem „okna płodności” w możliwie krótkim czasie po zabiegu. Farmakoterapia jest skuteczna w łagodzeniu bólu, ale nie stanowi metody poprawy płodności [19-23]. Progestageny, złożona antykoncepcja hormonalna oraz analogi i antagoniści gonadoliberyny (GnRH, ang. gonadotropin-releasing hormone) działają poprzez hamowanie osi podwzgórze-przysadka-jajnik i wyłączenie owulacji, przynosząc ulgę objawową kosztem czasowego zniesienia płodności. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami ESHRE i NICE nie rekomenduje się stosowania supresji hormonalnej w celu zwiększenia szans na ciążę; farmakoterapię należy rozważać w funkcji kontroli bólu, ewentualnie w krótkich schematach przed- lub pooperacyjnych, jeśli korzyści analgetyczne przewyższają ryzyko opóźnienia prokreacji. Nowe doustne antagoniści GnRH poprawiają komfort życia i kontrolę krwawień, jednak, podobnie jak klasyczne analogi nie zwiększają odsetka urodzeń żywych i nie powinny być traktowane

jako leczenie niepłodności w przebiegu endometriozy [1,2,16,18]. W obszarze technik wspomaganego rozrodu miejsce inseminacji domacicznej jest ograniczone do wąsko zdefiniowanych sytuacji klinicznych. U młodszych pacjentek ze stopniem I–II, zachowaną drożnością jajowodów i krótkim czasem trwania niepłodności stymulacja owulacji połączona z inseminacją domaciczną (IUI) może przynieść istotną korzyść w pierwszych cyklach, jednak skuteczność postępowania szybko spada wraz ze wzrostem wieku i zaawansowania choroby. W przypadkach umiarkowanych i ciężkich, w niedrożności jajowodów, przy współistnieniu czynnika męskiego lub innych niekorzystnych czynników rokowniczych, standardem jest zapłodnienie pozaustrojowe [18-22]. Strategie „freeze-all”, polegające na odroczeniu transferu i kriokonserwacji wszystkich zarodków, rozważa się u wybranych pacjentek w celu minimalizacji wpływu stymulacji i zapalenia na implantację, choć dowody na ich wyższość są selektywne i zależne od fenotypu choroby. Wybór pomiędzy klasycznym zapłodnieniem pozaustrojowym (in vitro fertilization - IVF) a docytoplazmatyczną iniekcją plemnika (intracytoplasmic sperm injection - ICSI) powinien być uzasadniony obecnością czynnika męskiego lub wcześniejszymi niepowodzeniami zapłodnienia [23-26]. Choć istnieją hipotezy, że stan zapalny związany z endometriozą może utrudniać plemnikom przenikanie przez osłonkę komórki jajowej, szerokie analizy badań oraz zalecenia ekspertów nie potwierdzają przewagi ICSI nad IVF u pacjentek, u których nie występują nieprawidłowości w nasieniu. Rutynowe stosowanie ICSI nie wiąże się też z wyższym odsetkiem urodzeń żywych [24-29]. Dlatego w praktyce klinicznej decyzję o zastosowaniu tej techniki należy podejmować indywidualnie, z uwzględnieniem dotychczasowej historii zapłodnień, jakości nasienia oraz przebiegu wcześniejszych cykli leczenia, a nie wyłącznie na podstawie samej diagnozy endometriozy. Personalizacja strategii terapeutycznej jest kluczowa dla maksymalizacji szans rozrodczych. Wiek pacjentki i rezerwa jajnikowa determinują horyzont czasowy interwencji. Fenotyp choroby, w tym obecność endometriom i postaci naciekającej głęboko, wpływa na decyzję o kolejności leczenia operacyjnego i ART, a

współistnienie adenomiozy może uzasadniać modyfikacje przygotowania endometrium przed transferem. Wytyczne ESHRE i NICE kładą nacisk na wspólne podejmowanie decyzji (shared decision-making), realistyczną komunikację rokowania, unikanie nieuzasadnionych opóźnień oraz koordynację opieki w zespołach wielodyscyplinarnych. Takie podejście równoważy cele przeciwbólowe z celem nadrzędnym, jakim jest urodzenie zdrowego dziecka przy możliwie najmniejszym koszcie zdrowotnym i psychospołecznym [1,2,24-29].

Aspekty psychologiczne i jakości życia wymagają odrębnego podkreślenia. Przewlekły ból, nieprzewidywalność nasilenia objawów, dyspareunia, krwawienia i seria niepowodzeń rozrodczych prowadzą do wysokiego poziomu stresu, nasilają objawy lękowe i depresyjne, zaburzają życie seksualne i relacje partnerskie oraz obniżają jakość życia związaną ze zdrowiem (HRQoL, ang. health-related quality of life). Systematyczne przeglądy potwierdzają większe ryzyko zaburzeń nastroju u kobiet z endometriozą w porównaniu z populacją ogólną, a opóźnienie diagnostyczne wiąże się z gorszym dobrostanem psychicznym i większą absencją w pracy. Włączenie interwencji psychologicznych, zwłaszcza terapii poznawczo-behawioralnej, programów psychoedukacyjnych i grup wsparcia, poprawia wskaźniki jakości życia i radzenie sobie z bólem, dlatego powinno stanowić element standardu opieki, obok fizjoterapii dna miednicy i modyfikacji stylu życia. Warto podkreślić, że endometrioza jest chorobą przewlekłą wymagającą długofalowej relacji terapeutycznej i elastycznego planu, który zmienia się wraz z celami pacjentki. U kobiet, dla których priorytetem jest płodność, terapia powinna minimalizować czas bezowulacyjny i niepotrzebne procedury, natomiast u pacjentek, które nie planują ciąży w danym okresie, nadrzędne pozostaje opanowanie bólu i ograniczanie progresji choroby. Uniwersalnym celem, wspólnym dla obu grup jest jednak poprawa jakości życia oraz zapobieganie długoterminowym następstwom, co osiąga się najlepiej poprzez skoordynowaną, wielospecjalistyczną opiekę, opartą na aktualnych wytycznych i dowodach naukowych [1-4, 13, 16, 18].

## PODSUMOWANIE

Endometrioza stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej ginekologii nie tylko ze względu na przewlekły charakter i wielobjawowość, ale przede wszystkim z powodu jej silnego związku z niepłodnością. Choroba dotyka nawet 10% kobiet w wieku rozrodczym, a wśród pacjentek zgłaszających się do ośrodków leczenia niepłodności jej odsetek może sięgać jednej czwartej. W skali populacyjnej odpowiada za blisko 40% przypadków niepłodności kobiecej, co czyni ją jednym z głównych czynników ograniczających płodność. Mechanizmy odpowiedzialne za utrudnienia w rozrodzie mają charakter złożony i wielopoziomowy. Zmiany anatomiczne takie jak torbiele, zrosty czy włóknienie deformują układ narządów miednicy, uniemożliwiają prawidłowe uwolnienie i transport komórki jajowej oraz zaburzają ruchliwość plemników. Jednocześnie procesy zapalne i immunologiczne prowadzą do przewlekłego stresu oksydacyjnego, uszkodzeń oocytów, obniżenia rezerwy jajnikowej i gorszej jakości zarodków. Złożoność mechanizmów odpowiedzialnych za niepłodność w przebiegu endometriozy sprawia, że trudno jest wskazać jedno miejsce interwencji. Anatomiczne zrosty i torbiele zaburzają relacje przestrzenne w miednicy, utrudniając spotkanie gamet. Środowisko zapalne płynu otrzewnowego obniża jakość komórek jajowych i plemników. Zaburzenia hormonalne oraz zmieniona receptywność endometrium uniemożliwiają skuteczne zagnieżdżenie zarodka. Każdy z tych czynników osobno ogranicza szanse na ciążę, a ich współdziałanie dodatkowo potęguje problem. Dlatego też skuteczna opieka wymaga wieloetapowego planu, który obejmuje diagnostykę obrazową, leczenie operacyjne, terapie farmakologiczne oraz, gdy zachodzi potrzeba, wykorzystanie metod wspomaganego rozrodu [16-23].

Endometrioza jest chorobą, która w wyjątkowy sposób pokazuje, jak blisko powiązane są ze sobą zdrowie fizyczne, psychiczne i społeczne kobiety. Choć klasyfikowana jest przede wszystkim jako problem ginekologiczny, jej konsekwencje rozciągają się daleko poza obszar układu rozrodczego.

Nieleczona lub zbyt późno rozpoznana prowadzi do przewlekłych dolegliwości bólowych, obniżenia jakości życia, zaburzeń emocjonalnych, a przede wszystkim niepłodności. Właśnie ta ostatnia bywa dla wielu pacjentek najbardziej dramatycznym wymiarem choroby, gdyż dotyka bezpośrednio planów rodzinnych i osobistego poczucia spełnienia. Nie bez znaczenia pozostaje aspekt psychologiczny. Kobiety zmagające się z endometriozą często latami walczą z bólem i poczuciem niezrozumienia, zanim usłyszą właściwą diagnozę. Brak wsparcia, powtarzające się niepowodzenia w staraniach o dziecko oraz lęk przed utratą płodności prowadzą do nasilonego stresu, obniżonego nastroju czy depresji. W tym kontekście równie istotne jak interwencje medyczne jest zapewnienie opieki psychologicznej, psychoedukacji i dostępu do grup wsparcia, które pomagają odzyskać poczucie kontroli i wspólnoty doświadczeń. Kluczowym kierunkiem na przyszłość jest skrócenie czasu do rozpoznania. Wieloletnie opóźnienia w diagnostyce pozbawiają pacjentki szans na wczesną interwencję, a tym samym na zachowanie rezerwy jajnikowej i większe możliwości prokreacyjne. Wprowadzenie nowoczesnych, nieinwazyjnych metod obrazowania oraz większa świadomość choroby wśród lekarzy i pacjentek mogą realnie poprawić rokowania. Endometrioza nie jest chorobą, którą można całkowicie wyeliminować, jednak przy odpowiednio dobranym leczeniu możliwe jest nie tylko złagodzenie bólu, lecz także realne zwiększenie szans na macierzyństwo. Wymaga to ścisłej współpracy pacjentki z zespołem specjalistów: ginekologiem, embriologiem, chirurgiem, psychologiem czy fizjoterapeutą. Tylko takie podejście pozwala łączyć cele terapeutyczne: poprawę jakości życia, kontrolę objawów bólowych i ochronę płodności. Ostatecznie endometrioza pozostaje wyzwaniem, ale nie przekreśla marzeń o dziecku. Wczesne rozpoznanie, indywidualizacja leczenia oraz interdyscyplinarna opieka to fundamenty, które mogą zmienić jej oblicze, z choroby odbierającej nadzieję w doświadczenie, które, choć trudne, nie musi oznaczać rezygnacji z planów rodzicielskich.

## PIŚMIENNICTWO

1. ESHRE Guideline Group on Endometriosis. ESHRE guideline: endometriosis (2022 update). *Hum Reprod Open.* 2022;2022(2):hoac009. Dostępne na: [www.eshre.eu/guideline/endometriosis](http://www.eshre.eu/guideline/endometriosis), data dostępu [02.08.2025]
2. National Institute for Health and Care Excellence. Endometriosis: diagnosis and management (NG73). London: NICE; 2017 [updated 2024], Dostępne na: [www.nice.org.uk/guidance/ng73](http://www.nice.org.uk/guidance/ng73), data dostępu: [02.08.2025]
3. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility evaluation of infertile women: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2021;116(5):1255–65.
4. World Health Organization. Endometriosis. Fact sheet. Geneva: WHO; 2023. Dostępne na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/endometriosis>, data dostępu: [02.07.2025]
5. Komunikat ABM. Agencja Badań Medycznych rozpoczęła pracę nad projektem własnym dotyczącym wczesnego wykrywania endometriozy; 2024. Dostępne na: <https://abm.gov.pl/pl/aktualnosci/2543,Agencja-Badan-Medycznych-rozpoznala-prace-nad-projektem-wlasnym-dotyczacym-wczes.html>, data dostępu: [02.08.2025]
6. Bablok L., Dziadecki W., Szymusik I., Wolczynski S., et al., Patterns of infertility in Poland - multicenter study. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32(6):799-804.
7. Burney R.O., Giudice L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511–9.
8. Bulun S.E. Progesterone resistance in endometriosis. *Endocr Rev.* 2019;40(2):317–29.
9. Bulun S.E. Endometriosis: mechanisms of disease and novel therapies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;51:1–15.
10. Ahn S.H., Monsanto S.P., Miller C., Singh S.S., Thomas R., Tayade C. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:795976.
11. Laschke M.W., Menger M.D., Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2018;24(2):207–24.
12. Rocha A.L.L., Reis F.M., Taylor R.N. Angiogenesis and endometriosis. *Reproduction.* 2013;145(3):R77–85.
13. Asante A., Taylor R.N. Endometriosis: the role of neuroangiogenesis. *Gynecol Obstet Invest.* 2011;71(3):161–5.
14. Machairiotis N., Vasilakaki S., Thomakos N. Inflammatory mediators and pain in endometriosis. *J Clin Med.* 2021;10(22):5573.
15. Coiplet E., El Ouezzani S., Brugnion F., et al. Endometriosis and environmental factors: a critical review. *Environ Sci Eur.* 2022;34(1):116.
16. Kim J.J., Taylor H.S. Aberrant expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in implantation failure. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(6):323–32.
17. Maddern J., Grundy L., Castro J., Brierley S.M. Pain in endometriosis. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:590823.
18. Raffi F., Metwally M., Amer S. The impact of excision of ovarian endometrioma on ovarian reserve: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):314.e1–9.
19. Somigliana E., Berlanda N., Benaglia L., et al. Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: a systematic review on serum AMH level modifications. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):794–800.
20. Muzii L., Di Tucci C., Di Felicianantonio M., Galati G., et al. Ovarian endometrioma and ovarian reserve: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update.* 2014;20(3):356–66.
21. Marcoux S., Maheux R., Bérubé S. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. *N Engl J Med.* 1997;337(4):217–22.
22. Tummon I.S., Asher L.J., Martin J.S. Randomized controlled trial of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril.* 1997;68(1):8–12.

23. Mappa I., Page Z.P., Di Mascio D., et al. The effect of endometriosis on IVF outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Healthcare (Basel)*. 2024;12(14):1462.
24. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020;114(2):239–45.
25. Meldrum D., Casper R., Diez-Juan A., et al. IVF versus ICSI in patients without severe male factor infertility: an international multicenter randomized trial. *Nat Med*. 2025;31:335–43.
26. Ferrero S., Scala C., Racca A., et al. Impact of surgery for endometriosis on IVF outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2024;98:102–15.
27. Tan J., Li Y., He J., Ma Y., Zhou Y. Early pregnancy outcomes in fresh versus deferred (“freeze-all”) embryo transfer among women with endometriosis. *Reprod Med Biol*. 2021;20(4):506–13.
28. Han Y., Li R., Xu B., et al. Freeze-all versus fresh embryo transfer in women with endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol*. 2025;16:1513775.
29. Wang Y., Liu H., Xu S., et al. Impact of adenomyosis and endometriosis on IVF/ICSI outcomes: a large retrospective cohort study. *Sci Rep*. 2023;13:4551.

# TLENEK AZOTU – WRÓG CZY PRZYJACIEL W GOJENIU ZŁAMAŃ KOŚCI?

Nitric Oxide – Friend or Foe in Bone Fracture Healing?

**Łukasz Woźniak<sup>1\*</sup>, Bożena Antonowicz<sup>1\*</sup>, Natalia Siwicka<sup>1</sup>, Kamil Bijowski<sup>2</sup>, Milena Zabłocka<sup>1</sup>, Kamila Łukaszuk<sup>2</sup>, Jan Borys<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Zakład Chirurgii Stomatologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, lukasz.wozniak@umb.edu.pl, bozena.antonowicz@umb.edu.pl (\*autorzy korespondencyjni)

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Plastycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## WPROWADZENIE

„Per aspera ad astra” głosi łacińskie przysłowie, trafnie określając trudności w próbach znalezienia optymalnych metod oceny gojenia złamań kości we wszystkich jego fazach. Gojenie złamań jest wyróżniającym się spośród procesów naprawczych ustroju, gdyż końcowym jego wynikiem jest pełna odbudowa tkanki, a nie blizna [1]. Fakt ten wskazuje na bardzo wysoki stopień zaawansowania i złożoność tego procesu. Pacjenci z obrażeniami czaszkowo-twarzowymi i współistniejącymi uszkodzeniami innych okolic ciała wymagają wysokospecjalistycznego postępowania będącego ważnym problemem współczesnej chirurgii urazowej [2]. Przebieg gojenia złamań kości można oceniać za pomocą wielu współczesnych metod diagnostycznych. Problemem jednak jest niejednokrotnie ich inwazyjność lub późne ujawnianie zmian zachodzących podczas regeneracji kości, w związku z czym posiadają one ograniczoną przydatność w praktyce klinicznej. Istnieje zatem potrzeba szukania mniej lub nieinwazyjnych oraz powtarzalnych metod, które pozwolą na ocenę procesu gojenia złamań kości w różnych jego fazach [3].

## ANATOMIA TWARZOCZASZKI I UWARUNKOWANIA URAZÓW

Szkielet czaszkowo-twarzowy jest przestrzennym układem 14 zespolonych ze sobą kości. W jego skład wchodzi: po dwie kości szczękowe, kości jarzmowe, kości nosowe, kości podniebienne, kości łzowe, małżowiny nosowe dolne oraz pojedynczy lemiesz i żuchwa [4]. Układ ten stwarza istnienie centralnie i bocznie położonych obszarów, najbardziej wysuniętych w stosunku do pozostałych elementów szkieletu, które są szczególnie narażone na obrażenia zewnętrzne, amortyzując zazwyczaj urazy padające z przodu i boku. Obszary te pełnią rolę „zderzaków” twarzoczaszki. Do złamań dochodzi wskutek nagłego zadziaływania siły przewyższającej jej wytrzymałość [5]. Wzrost liczby pacjentów przyjmowanych na oddziały z powodu urazów czaszkowo-twarzowych spowodowany jest dynamicznym rozwojem motoryzacji, postępem mechanizacji i brutalnością życia społecznego. Główne przyczyny złamań kości twarzoczaszki to: wypadki komunikacyjne, przemoc interpersonalna, urazy sportowe oraz upadki. Znany jest także związek tego typu urazów z nadmiernym spożywaniem alkoholu. Występują również złamania patologiczne spowodowane torbielami, nowotworami oraz chorobami metabolicznymi tkanki kostnej [6].

## FIZJOLOGIA GOJENIA ZŁAMAŃ KOŚCI

Proces gojenia złamań kości jest lawinowym ciągiem reakcji komórkowych i biochemicznych, zapoczątkowanych urazem, mającym na celu odtworzenie ciągłości i pierwotnej struktury uszkodzonej kości [7]. Po urazie dochodzi do rozerwania ścian naczyń krwionośnych i wypełnienia krwią szpary złamania. Następnie wnika ona pod okostną i penetruje istotę gąbczastą. W gojeniu złamań wyróżnia się fazy: zapalną (krwiaka), ziarninowania, kostniny (metaplastyka komórkowa) oraz fazę przebudowy (remodelacja, końcowy zrost kostny). Odzwierciedlają one istotne zmiany morfologiczne i biochemiczne zachodzące w miejscu złamania i jego otoczeniu [8].

### *3.1 Faza zapalna (krwiaka)*

Faza krwiaka trwa do siódmego dnia po urazie. Charakterystycznymi objawami są przekrwienie, obrzęk, ból, gorączka oraz upośledzenie czynności. W pierwszych godzinach po urazie objawy nasilają się, natomiast po 24 godzinach zaczynają samoistnie ustępować [9]. Fazę krwiaka zaczyna adhezja płytek krwi do miejsca uszkodzonych naczyń, degranulacja i uwalnianie z nich lizosomów oraz alfa ziarnistości, m.in. tromboksanu, prostaglandyn, serotoniny i enzymów proteolitycznych. Stymulują one agregację płytek, które wraz z włóknikiem tworzą w szczelinie złamania „hemostatyczny czop” [9]. Płytki krwi są również źródłem wielu czynników wzrostowych, m.in. czynnika wzrostowego płytkopochodnego - PDGF, czynników wzrostowych insulinopodobnych pierwszego i drugiego - IGF I, IGF II, transformującego czynnika wzrostowego beta - TGF  $\beta$  i czynnika wzrostowego naskórka - EGF. Czynniki wzrostowe działają chemotaktycznie na komórki zapalne, które biorą udział w tej fazie gojenia, tj. makrofagi, limfocyty, neutrofile i komórki tłuszczne [9, 10]. Wśród wymienionych komórek w pierwszej fazie, w procesie gojenia rolę centralną i modulującą przypisuje się makrofagom, które tworzą i wydzielają liczne czynniki wzrostowe oraz enzymy proteolityczne [10]. Komórki pierwszej fazy oraz ich mediatory pełnią rolę hemostatyczną, fagocytarną i demarkacyjną w miejscu i otoczeniu złamania [9, 10]. Wpływają one również na rekrutację, migrację i funkcję komórek biorących udział w kolejnej fazie gojenia. Zakres i czas trwania reakcji zapalnej, jako pierwszej fazy gojenia złamań kości ma duży wpływ na dalszy przebieg tego procesu [10–13].

### *3.2 Faza ziarninowania*

W drugiej fazie gojenia, zwanej fazą ziarninowania, która następuje pomiędzy ósmym a czternastym dniem po urazie, komórki mezenchymy pobudzone przez złamanie i stymulowane przez mediatory fazy zapalnej wypełniają krwiak międzyodłamowy [11, 13]. Komórki te wywodzą się z okostnej, śródkostnej, szpiku, śródbłonka naczyń oraz tkanek miękkich otaczających miejsce złamania. Następnie proliferują i różnicują się w dojrzałe

komórki, zdolne do syntezy substancji pozakomórkowej [11, 13]. W fazie tej tworzenie się naczyń i pełna rewaskularyzacja miejsca uszkodzenia jest podstawowym elementem procesu gojenia decydującym o prawidłowości jego dalszego przebiegu. Efektem końcowym drugiej fazy gojenia złamań kości jest wytworzenie w szczelinie złamania tymczasowej, luźnej tkanki łącznej, częściej określanej jako dobrze unaczyniona ziarnina. Sądzi się, że tkanka ziarninowa jest źródłem wielu czynników wzrostowych, które inicjują i kierują następną fazę procesu gojenia złamań [10–13].

### *3.3 Faza kostniny (metaplastyka komórkowa)*

Faza III trwa od pierwszego do czwartego miesiąca. Mediatory tkanki ziarninowej stymulują dalsze namnażanie i różnicowanie się prekursorowych komórek osteogennych w dojrzałe osteoblasty. W luźnej tkance łącznej znajdującej się w szczelinie złamania zróżnicowane osteoblasty syntetyzują macierz kostną składającą się z kolagenu i białek niekolagenowych między innymi osteokalcyny, osteonektyny, osteopontyny, sialoproteiny kostnej. Syntetyzują one także czynniki wzrostowe (IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$ , zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów - bFGF), które pobudzają funkcję istniejących komórek oraz tworzenie nowych osteoblastów [10-13]. W efekcie powstaje tkanka kostna zbudowana z beleczek kostnych o układzie siateczkowatym. Wytworzona w tej fazie kostnina przywraca ciągłość odłamów, ustępuje ich ruchomość, co stanowi kliniczne kryterium zrostu kostnego [10–13].

### *3.4 Faza przebudowy (remodelacja, końcowy zrost kostny)*

W IV fazie gojenia złamań, trwającej do 4 roku po złamaniu, kostnina ulega przebudowie wewnętrznej [10-13]. Proces ten ma charakter cykliczny i odbywa się w ściśle określonych, mikroskopijnych miejscach wytworzonej kostniny. W jego przebiegu dochodzi do aktywacji osteoklastów, osteoblastów, ich komórek prekursorowych oraz tak zwanych spoczynkowych komórek okostnej, a także komórek pochodzenia szpikowego, takich jak monocyty - makrofagi, komórki limfoidalne i komórki tuczne [10-13]. Tworzą one wraz z

naczyniami krwionośnymi i składnikami macierzy kostnej jednostkę przebudowy BMU (basic multicellular unit). Podczas przebudowy kostniny jako pierwszy ujawnia się proces osteoklastycznej resorpcji, a po fazie przejściowej następuje etap osteoblastycznego tworzenia. Oba te procesy, tj resorpcji i tworzenia kości są ze sobą ściśle sprzężone [10-13]. Kostnina w wyniku przebudowy zostaje zastąpiona przez nowo wytworzoną kość blaszkową, w której blaszki są ułożone zgodnie z zasadą architektoniki danego odcinka kości. Przyjmuje się, że warunkiem powstania zrostu samoistnego są obecność krwiaka, ograniczona ruchomość odłamów oraz możliwość rewaskularyzacji miejsca złamania [10–13].

## **TLENEK AZOTU JAKO POTENCJALNY REGULATOR GOJENIA ZŁAMAŃ KOŚCI**

W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej doniesień na temat roli tlenu azotu (NO) w procesie gojenia złamań kości [14]. Stężenie, w jakim tlenek azotu oddziałuje na komórki kości, wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla funkcjonowania tych struktur. Wykazano, że konstytutywnie wydzielany NO, generowany przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS), jest niezbędny do utrzymania prawidłowej aktywności osteoblastów i korzystnie wpływa na procesy gojenia, wspomagając formowanie kości przez osteoblasty [14]. Z drugiej strony stwierdzono jednak, że wysokie stężenia NO mogą negatywnie wpływać na osteoblasty, hamując ich wzrost i różnicowanie, a w konsekwencji prowadząc do utraty masy kostnej [15]. W celu określenia, czy NO działa korzystnie czy szkodliwie na proces gojenia kości, konieczne jest poznanie jego właściwości i mechanizmów działania.

## **BIOLOGIA TLENKU AZOTU**

Odkrycie tlenu azotu około trzydziestu lat temu stanowiło przełom w naukach biologicznych ze względu na złożoność jego działania [16]. Przed poznaniem biosyntezy NO, związek odpowiedzialny za skurcz mięśniówki gładkiej określano mianem śródbłonkowego czynnika rozluźniającego (EDRF).

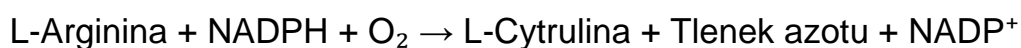
W kolejnych latach wykazano, że EDRF jest tożsamy z tlenkiem azotu, a jego odkrycie przypisuje się Robertowi F. Furchgottowi i jego współpracownikom, za co Furchgott w 1998 roku został uhonorowany Nagrodą Nobla [16]. Po ujawnieniu biosyntezy NO stwierdzono, że bierze on udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych [17]. Wśród jego funkcji wymienia się rozszerzanie naczyń krwionośnych i oskrzeli, udział w neuroprzekaznictwie, hamowanie aktywności fagocytów i agregacji płytek krwi oraz działanie przeciwnowotworowe i bakteriobójcze. NO odgrywa również kluczową rolę w homeostazie kości, regulując równowagę pomiędzy aktywnością osteoblastów i osteoklastów, co umożliwia zachowanie wytrzymałości kości oraz szybkie usuwanie mikrouszkodzeń powstających w obrębie tkanki kostnej [17].

Pomimo istotnego znaczenia fizjologicznego, właściwości fizykochemiczne NO sprawiają, że nadmierna ekspozycja komórek na wysokie stężenia może prowadzić do szkodliwych efektów, w tym hamowania funkcji enzymów, uszkodzeń nici DNA, indukcji peroksydacji lipidów, nitrowania tyrozyny, mutacji genów supresorowych guza, cytotoksyczności oraz zahamowania oddychania mitochondrialnego [18]. Wpływ NO na procesy kostne ma charakter dwukierunkowy i zależy zarówno od jego stężenia, jak i od komórkowego kontekstu działania [19]. Istotnym elementem jego aktywności biologicznej jest również powstawanie reaktywnych metabolitów, takich jak nadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) oraz S-nitrozotiole (RSNO). Nadtlenoazotyn powstaje w wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym i stanowi silny czynnik utleniający i nitrujący, zdolny do uszkodzania białek, lipidów oraz DNA [18,19]. Z kolei S-nitrozotiole powstają w wyniku reakcji NO z grupami tiolowymi białek i pełnią rolę względnie stabilnych nośników tlenu azotu, uczestnicząc w regulacji funkcji białek poprzez mechanizm S-nitrozylacji [20,21]. Związki te odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnału komórkowego oraz modulacji odpowiedzi zapalnej. Określenie, jak konkretnie oddziałuje NO, pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej biomedycyny.

## SYNTEZA TLENKU AZOTU I IZOFORMY SYNTAZY NOS

Tlenek azotu jest wysoce reaktywną, dwuatomową cząsteczką należącą do wolnych rodników ze względu na posiadanie niesparowanego elektronu na zewnętrznej powłoce. Jego okres półtrwania wynosi mniej niż 30 sekund [19]. Działanie NO może mieć charakter endogenny (np. nadmierna miejscowa produkcja w ognisku zapalnym) lub egzogenny (droga inhalacyjna) [20].

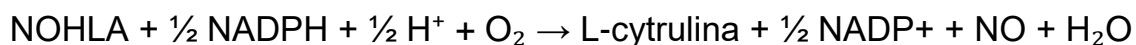
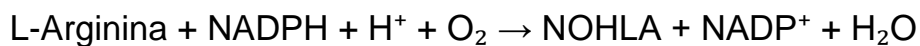
Endogenny tlenek azotu wytwarzany jest przez syntazy tlenku azotu w drodze hydroksylacji L-argininy (L-Arg) [22]:



Do tej pory znane są dwie podstawowe formy syntaz tlenku azotu (NOS): konstytucjonalna (cNOS), w której wyróżniamy formy: neuronalną (nNOS) i śródbłonkową (eNOS) - obie zależne od wapnia i postać indukowalna (iNOS), niezależna od wapnia [23]. Aktywność cNOS powoduje uwalnianie tlenku azotu w krótkich (sekundy, minuty), kontrolowanych ilościach, podczas gdy negatywne skutki ujawniają się w warunkach długotrwałej (godziny, dni) jego produkcji w wyniku aktywności iNOS. Każda syntaza kodowana jest przez inny gen, jest odmiennie regulowana, ma inną lokalizację i może mieć różną wrażliwość na inhibitory [24]. Mimo tego zróżnicowane formy NOS wykazują znaczne podobieństwo strukturalne, podobną orientację i lokalizację kofaktorów, właściwości stereochemiczne centrum aktywnego oraz miejsce wiązania BH<sub>4</sub>. Struktura genów wszystkich form nie różni się zbyt wiele, co sugeruje ich wspólne pochodzenie. Homologia strukturalna form NOS na poziomie DNA u człowieka to ok. 55% [24].

Enzymy NOS wykazują aktywność katalityczną przy dimeryzacji i wymagają użycia dwóch substratów: L-argininy i tlenu cząsteczkowego. Syntaza tlenku azotu produkuje NO katalizując reakcję pięcioelektronowej oksydacji azotu L-Arg. Oksydacja L-argininy do L-cytruliny zachodzi poprzez

dwa etapy monooksygenacji, a produktem pośrednim jest N $\omega$ -hydrokso-L-arginina (NOHLA). Zużywane są 2 mole O<sub>2</sub> i 1,5 mola NADPH do syntezy 1 mola NO [25].



Wszystkie trzy izoformy enzymu (z których każda aktywowana funkcjonuje jako homodimer), posiadają C-końcową domenę o aktywności reduktazowej, homologiczną do białka reduktazy cytochromu P450, zawierającą FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) i FMN (mononukleotyd flawinowy) [26]. Na N-końcu znajduje się domena oksygenazowa zawierająca hem jako grupę prostetyczną, w środku łańcucha polipeptydowego NOS znajduje się natomiast domena wiążąca kalmodulinę. Związanie kalmoduliny umożliwia przepływ elektronów z reszty flawinowej grupy prostetycznej na domenę reduktazową połączoną z hemem. Proces ten ułatwia przekształcenie O<sub>2</sub> i L-argininy w NO i L-cytrulinę [27].

Domena oksygenazowa każdej izoformy NOS zawiera także jako grupę prostetyczną tetrahydrobiopterynę (BH<sub>4</sub>), niezbędną do wydajnej syntezy NO. BH<sub>4</sub> w NOS ma za zadanie aktywować przyłączony do hemu tlen przez dostarczenie pojedynczego elektronu, który odzyskany później umożliwia uwolnienie zsyntetyzowanej cząsteczki NO, inaczej niż w przypadku innych enzymów wykorzystujących BH<sub>4</sub> jako źródło równoważników redukujących, co wymaga reakcji reduktazy dihydrobiopterynowej [28].

W przypadku NOS1 i NOS3, fizjologiczne stężenia Ca<sup>2+</sup> w komórce regulują wiązanie kalmoduliny, przez co inicjują przepływ elektronów z grup flawinowych na grupę hemu. W przypadku NOS2 kalmodulina pozostaje ściśle związana z domeną wiążącą białka nawet przy niskich śródkomórkowych stężeniach Ca<sup>2+</sup>, będąc w zasadzie podjednostką tego izoenzymu. Aktywne NOS są zwykle określane jako dimery, ale działają w rzeczywistości jako

tetramery (2 cząsteczki NOS i 2 cząsteczki kalmoduliny). Dimeryzacja iNOS zależy wyłącznie od domeny oksigenazowej, natomiast nNOS i eNOS od domeny oksigenazowej i reduktazowej. Dimeryzacja iNOS jest bardziej niż dimeryzacja nNOS i eNOS zależna od kalmoduliny i w warunkach fizjologicznych w komórkach jest praktycznie nieodwracalna. Nie jest pewne czy to samo odnosi się do nNOS i eNOS. Dla indukcji dimeryzacji kluczowa jest obecność hemu, natomiast stabilizacja dimerów zależy także od BH4 i L-argininy [29].

Wyróżnia się również nietypowe formy NOS. Barwienia immunohistochemiczne wskazują na istnienie formy mitochondrialnej NOS (mtNOS), która jest aktywna metabolicznie. Najprawdopodobniej jest to forma iNOS, ale związana z błoną, a nie cytozolowa. Wiązanie z błoną może zależeć, np. od kaweoliny. Inną formą NOS, której istnienie sugerowały barwienia immunohistochemiczne i pomiary aktywności enzymatycznej jest postać reumatoidalna NOS, ulegająca ekspresji w chondrocytach stymulowanych cytokinami prozapalnymi (w reumatoidalnym zapaleniu stawów) [30].

## **TLENEK AZOTU W STANACH ZAPALNYCH I USZKODZENIACH KOMÓRKOWYCH**

Każde uszkodzenie tkanek wywołuje reakcję organizmu w postaci stanu zapalnego. W następstwie urazu do przestrzeni pozakomórkowej dostają się liczne antygeny pochodzące ze świata zewnętrznego, jak i z wnętrza zniszczonych komórek [31]. Uszkodzone komórki śródbłonna, a także limfocyty i makrofagi znajdujące się w pobliżu miejsca uszkodzenia zaczynają wydzielać różne mediatory prozapalne. Do tych mediatorów należą liczne cytokiny takie jak czynnik martwicy nowotworów (TNF) i interleukina-1 (IL-1), które stymulują komórki systemu odpornościowego do produkcji znacznych ilości NO poprzez aktywację syntazy iNOS. Wysokie stężenie jest odpowiedzialne za hamowanie proliferacji i różnicowania osteoblastów, a także indukcję apoptozy w komórkach osteoblastów [31].

Istotnym elementem tego procesu jest interakcja tlenu azotu z reaktywnymi formami tlenu generowanymi przez oksydazy NADPH (NOX). W warunkach zapalnych dochodzi do zwiększonej aktywności NOX i nasilonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ), który szybko reaguje z NO prowadząc do powstania nadtlenuazotynu ( $ONOO^-$ ) [21,32]. Reakcja ta skutkuje zmniejszeniem biodostępności tlenu azotu oraz powstawaniem silnie reaktywnych cząsteczek o potencjale cytotoksycznym [21]. Powstały nadtlenuazotyn może uszkadzać białka, lipidy i DNA oraz nasilać procesy nitrozacyjne i oksydacyjne opisane powyżej [18,32]. Dodatkowo wykazano, że reaktywne formy tlenu mogą prowadzić do tzw. rozsprzężenia syntazy tlenu azotu, w wyniku czego enzym zamiast produkować NO zaczyna generować kolejne wolne rodniki, co nasila stres oksydacyjny i prowadzi do powstania błędnego koła uszkodzeń komórkowych [21].

Stwierdzono, że NO odgrywa istotną rolę w procesie peroksydacji lipidów. Jest to łańcuchowy proces wolnorodnikowy, w którym dochodzi do utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych lub reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład fosfolipidów, głównego składnika budulcowego błon komórkowych. Istotne wydaje się, iż proces peroksydacji lipidów, w przeciwieństwie do białek i kwasów nukleinowych, ma charakter reakcji łańcuchowej, prowadzącej do powstania dużej liczby nadtlenków nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów [32]. Jednym z produktów końcowych peroksydacji lipidów jest malonyldialdehyd (MDA), który zawiera dwie reaktywne grupy aldehydowe, mogące reagować z dwiema różnymi cząsteczkami  $R1-NH_2$  i  $R2-NH_2$  i w ten sposób je „zszywać”, tworząc produkty o charakterystycznej strukturze  $R1-N=CH-CH_2-NH-R2$ , nazywane aminoiminopropenowymi zasadami Schaffa [33]. Wykazano, że aldehydy powstające w wyniku peroksydacji lipidów są mniej reaktywne niż wolne rodniki i dzięki temu mogą w komórkach dyfundować na znaczne odległości, przez co pełnią rolę „wtórnych przekaźników” uszkodzenia przez reaktywne formy tlenu i azotu [34]. Aldehydy reagują przede wszystkim

z grupami tiolowymi oraz grupami aminowymi białek, lipidów, aminocukrów i zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Modyfikują one właściwości fizyczne błon komórkowych, przez zwiększenie ich przepuszczalności dla jonów  $H^+$  i innych substancji polarnych [35]. Nastęstwem tych procesów są zmiany różnicy potencjałów elektrycznych po obu stronach błon, prowadzące w efekcie do utraty integralności błon wewnątrzkomórkowych i błony plazmatycznej oraz hamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących [36].

Tlenek azotu zaliczany jest także do głównych czynników nitrujących ugrupowania fenolowe tyrozyny w tkankach i białkach krwi [37]. Powstająca w wyniku tego procesu nitrotyrozyna może prowadzić do utraty ich biologicznych funkcji i w konsekwencji do zmian patologicznych. Sugeruje się, że stężenie nitrotyrozyny może być pomocnym markerem pozwalającym ocenić działanie tlenu azotu w warunkach *in vivo*. Ponadto uważa się, że z powodu swojego dłuższego okresu półtrwania jest ona lepszym wskaźnikiem zwiększonej produkcji NO od metabolitów tlenu azotu [37].

Z kolei ekspresja genu kodującego eNOS rośnie wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, np. w następstwie uszkodzenia błony komórkowej. Dochodzi w związku z tym do zwiększenia płynności i przepuszczalności błony oraz do uszkodzenia protein błonowych (receptorów, kanałów jonowych, enzymów). Skutkiem wzrostu przepuszczalności błony komórkowej jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia kationów wapnia, a w konsekwencji pobudzenie ekspresji eNOS, a co za tym idzie produkcją tlenu azotu [38].

## PODSUMOWANIE

Przedstawione dane wskazują, że tlenek azotu pełni złożoną i zależną od warunków biologicznych rolę w procesie gojenia kości. Jego działanie nie ma charakteru jednoznacznie korzystnego ani jednoznacznie szkodliwego,

lecz stanowi element dynamicznej regulacji odpowiedzi tkankowej na uraz [14]. W warunkach fizjologicznych, przy kontrolowanej aktywności konstytutywnych syntaz tlenku azotu, mediator ten uczestniczy w regulacji perfuzji tkankowej, aktywności komórek kościotwórczych oraz przebudowy macierzy kostnej. Utrzymanie odpowiedniego stężenia NO sprzyja zachowaniu równowagi pomiędzy procesami osteogenezy i resorpcji, co warunkuje prawidłową odbudowę struktury kości [15].

Odmienny efekt obserwuje się w warunkach nasilonej odpowiedzi zapalnej, w której dominującą rolę odgrywa indukowalna syntaza tlenku azotu. Długotrwała ekspozycja komórek na wysokie stężenia NO oraz reaktywnych pochodnych azotu prowadzi do zaburzeń funkcji osteoblastów, nasilenia procesów uszkodzenia błon komórkowych oraz zmian w strukturze białek i kwasów nukleinowych. Mechanizmy te mogą ograniczać zdolność regeneracyjną tkanki kostnej oraz wpływać na jakość powstającej kostniny [15].

Z punktu widzenia biologii gojenia kości kluczowe znaczenie ma zatem nie sama obecność tlenku azotu, lecz równowaga pomiędzy jego fizjologiczną produkcją a nadmierną syntezą towarzyszącą reakcji zapalnej. Tlenek azotu można zatem traktować jako mediator o działaniu regulacyjnym, którego efekt biologiczny zależy od lokalnych warunków mikrośrodowiska tkankowego, czasu ekspozycji oraz źródła jego powstawania [21].

Uwzględniając przedstawione mechanizmy, można stwierdzić, że tlenek azotu nie pełni wyłącznie funkcji czynnika sprzyjającego regeneracji ani wyłącznie mediatora uszkodzenia. Stanowi on element złożonego układu regulacyjnego procesu gojenia kości, w którym działanie protekcyjne i cytotoksyczne pozostają w dynamicznej, wzajemnie uwarunkowanej równowadze. Dwukierunkowy charakter jego aktywności stanowi przesłankę do dalszych badań nad możliwością wykorzystania parametrów związanych z

metabolizmem tlenku azotu jako potencjalnych wskaźników przebiegu procesu gojenia, a także jako przyszłych celów interwencji terapeutycznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Steppe L, Megafu M, Tschaffon-Müller MEA, Ignatius A, Haffner-Luntzer M. Fracture healing research: Recent insights. *Bone Rep.* 2023 Dec 1;19. doi:10.1016/J.BONR.2023.101686 PubMed PMID: 38163010.
2. Mühlenfeld N, Thoenissen P, Verboket R, Sader R, Marzi I, Ghanaati S. Combined trauma in craniomaxillofacial and orthopedic-traumatological patients: the need for proper interdisciplinary care in trauma units. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery.* 2022 Aug 1;48(4):2521–8. doi:10.1007/S00068-020-01479-X/FIGURES/5 PubMed PMID: 32869128.
3. Ehnert S, Histing T. Advances in Fracture Healing Research. *Bioengineering* 2024, Vol 11,. 2024 Jan 9;11(1). doi:10.3390/BIOENGINEERING11010067
4. Junn JC, Som PM. Maxillofacial Skeleton and Facial Anatomy. *Neuroimaging Clin N Am.* 2022 Nov 1;32(4):735–48. doi:10.1016/J.NIC.2022.07.008 PubMed PMID: 36244720.
5. Kim H, Han JG, Park HY, Choung YH, Jang JH. Relationship Between Facial Bone Fractures and the Risk of Posttraumatic Complications: A Hypothesis on the Cushion Effect of the Facial Skeletons in Temporal Bone Fractures. *J Korean Med Sci.* 2023;38(27):e215. doi:10.3346/JKMS.2023.38.E215 PubMed PMID: 37431543.
6. Woźniak Ł, Mierzejewska ŻA, Borys J, Ratajczak-Wrona W, Antonowicz B. Oxidative Stress and Biomarkers in Craniofacial Fractures Healing: From Lipid Peroxidation to Antioxidant Therapies. *Antioxidants* 2025, Vol 14,. 2025 Aug 31;14(9). doi:10.3390/ANTIOX14091070
7. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology* 2014 11:1. 2014 Sep 30;11(1):45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164 PubMed PMID: 25266456.
8. Sheen JR, Mabrouk A, Garla V V. Fracture Healing Overview. *StatPearls.* 2023 Apr 8. PubMed PMID: 31869142.
9. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 2012 Mar;347(3):567–73. doi:10.1007/S00441-011-1205-7 PubMed PMID: 21789579.
10. Frade BB, Dias RB, Piperni SG, Bonfim DC. The role of macrophages in fracture healing: a narrative review of the recent updates and therapeutic perspectives. *Stem Cell Investig.* 2023 Feb 8;10(0):4–4. doi:10.21037/SCI-2022-038
11. Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, Diegelmann RF. Principles of Wound Healing. *Diabetic Foot Problems.* 2011 Jan 1;395–402. doi:10.1142/9789812791535\_0028 PubMed PMID: 30485016.
12. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;200(2):165–70. doi:10.3181/00379727-200-43410A PubMed PMID: 1374563.
13. Stammitz S, Klimczak A. Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice. *Cells* 2021, Vol 10,. 2021 Jul 29;10(8). doi:10.3390/CELLS10081925 PubMed PMID: 34440694.
14. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001;103(3):255. doi:10.1046/J.1365-2567.2001.01261.X PubMed PMID: 11454054.
15. Wozniak L, Ratajczak-Wrona W, Borys J, Antonowicz B, Nowak K, Bortnik P, et al. Levels of Biological Markers of Nitric Oxide in Serum of Patients with Mandible Fractures. *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol 10,. 2021 Jun 26;10(13). doi:10.3390/JCM10132832
16. Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology: elegance in complexity. *J Clin Invest.* 2024 Feb 15;134(4). doi:10.1172/JCI176747 PubMed PMID: 0.
17. Kalyanaraman H, Schall N, Pilz RB. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. *Nitric Oxide.* 2018 Jun 1;76:62–70. doi:10.1016/J.NIOX.2018.03.007 PubMed PMID: 29550520.
18. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26464–72. doi:10.1074/JBC.R113.472936 PubMed PMID: 23861390.

19. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19(4–5):221–357. doi:10.1016/S0098-2997(99)00002-3 PubMed PMID: 10231805.
20. Signori D, Magliocca A, Hayashida K, Graw JA, Malhotra R, Bellani G, et al. Inhaled nitric oxide: role in the pathophysiology of cardio-cerebrovascular and respiratory diseases. *Intensive Care Medicine Experimental* 2022 10:1. 2022 Jun 27;10(1):28-. doi:10.1186/S40635-022-00455-6
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315. doi:10.1152/PHYSREV.00029.2006 PubMed PMID: 17237348.
22. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31(6):577–96. doi:10.1080/10715769900301161 PubMed PMID: 10630682.
23. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulation, Structure, and Inhibition. *Med Res Rev.* 2019 Jan 1;40(1):158. doi:10.1002/MED.21599 PubMed PMID: 31192483.
24. Dong J, Li D, Kang L, Luo C, Wang J. Insights into human eNOS, nNOS and iNOS structures and medicinal indications from statistical analyses of their interactions with bound compounds. *Biophys Rep.* 2023 Jun 1;9(3):159. doi:10.52601/BPR.2023.210045 PubMed PMID: 38028152.
25. Demosthenous M, Antoniadou C, Tousoulis D, Margaritis M, Marinou K, Stefanadis C. Endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall: Mechanisms regulating its expression and enzymatic function. *Artery Res.* 2011 Apr 21;5(2):37–49. doi:10.1016/J.ARTRES.2011.03.003
26. Bignon E, Rizza S, Filomeni G, Papaleo E. Use of Computational Biochemistry for Elucidating Molecular Mechanisms of Nitric Oxide Synthase. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019 Jan 1;17:415. doi:10.1016/J.CSBJ.2019.03.011 PubMed PMID: 30996821.
27. Smith BC, Underbakke ES, Kulp DW, Schief WR, Marletta MA. Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 17;110(38). doi:10.1073/PNAS.1313331110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201313331SI.PDF PubMed PMID: 24003111.
28. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, et al. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest.* 2003 Sep 1;112(5):725–35. doi:10.1172/JCI17786 PubMed PMID: 12952921.
29. Roy R, Wilcox J, Webb AJ, O'Gallagher K. Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24,. 2023 Oct 15;24(20). doi:10.3390/IJMS242015200 PubMed PMID: 37894881.
30. Gerdes HJ, Yang M, Heisner JS, Camara AKS, Stowe DF. Modulation of peroxynitrite produced via mitochondrial nitric oxide synthesis during Ca<sup>2+</sup> and succinate-induced oxidative stress in cardiac isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 2020 Dec 1;1861(12):148290. doi:10.1016/J.BBABIO.2020.148290 PubMed PMID: 32828729.
31. Cuzzocrea S, Mazzone E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 2003 Mar 1;144(3):1098–107. doi:10.1210/en.2002-220597 PubMed PMID: 12586786.
32. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1999 May 5;1411(2–3):385–400. doi:10.1016/S0005-2728(99)00028-6 PubMed PMID: 10320671.
33. Uchida K, Sakai K, Itakura K, Osawa T, Toyokuni S. Protein Modification by Lipid Peroxidation Products: Formation of Malondialdehyde-Derived N $\epsilon$ -(2-Propenal)lysine in Proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1997 Oct 1;346(1):45–52. doi:10.1006/ABBI.1997.0266 PubMed PMID: 9328283.

34. Eckl PM, Bresgen N. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. *Free Radic Biol Med.* 2017 Oct 1;111:244–52. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.02.002 PubMed PMID: 28167130.
35. Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol.* 2013;4 SEP:242. doi:10.3389/FPHYS.2013.00242/ABSTRACT
36. Naudí A, Jové M, Ayala V, Cabré R, Portero-Otín M, Pamplona R. Non-Enzymatic Modification of Aminophospholipids by Carbonyl-Amine Reactions. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol 14, Pages 3285-3313. 2013 Feb 5;14(2):3285–313. doi:10.3390/IJMS14023285
37. Bandoowala M, Sengupta P. 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci.* 2020 Oct 2;130(10):1047–62. doi:10.1080/00207454.2020.1713776 PubMed PMID: 31914343.
38. Pourbagher-Shahri AM, Farkhondeh T, Talebi M, Kopustinskiene DM, Samarghandian S, Bernatoniene J. An Overview of NO Signaling Pathways in Aging. *Molecules* 2021, Vol 26,. 2021 Jul 27;26(15). doi:10.3390/MOLECULES26154533 PubMed PMID: 34361685.

# WYBRANE MARKERY USZKODZEŃ OKSYDACYJNYCH W PRZEBIEGU ZŁAMAŃ KOŚCI CZĘŚCI TWARZOWEJ CZASZKI

Selected Biomarkers of Oxidative Damage in Patients with Facial  
Skeleton Fractures

**Łukasz Woźniak<sup>1\*</sup>, Bożena Antonowicz<sup>1\*</sup>, Anna Żaneta Mierzejewska<sup>2</sup>, Milena Zabłocka<sup>1</sup>, Kamila Łukaszuk<sup>3</sup>, Kacper Koralewicz<sup>3</sup>, Jan Borys<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Zakład Chirurgii Stomatologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, lukasz.wozniak@umb.edu.pl, bozena.antonowicz@umb.edu.pl (\*autorzy korespondencyjni)

<sup>2</sup>Instytut Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Białostocka

<sup>3</sup>Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej i Plastycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## WPROWADZENIE

Pacjenci ze złamaniami kości twarzoczaszki stanowią istotne wyzwanie terapeutyczne we współczesnej medycynie. Urazy te prowadzą do zaburzeń morfologicznych i czynnościowych układu stomatognatycznego, a także do defektów estetycznych twarzy, co znacząco wpływa na jakość życia pacjentów. Proces gojenia kości jest złożonym i dynamicznym ciągiem reakcji komórkowych oraz biochemicznych, zapoczątkowanych urazem, których celem jest przywrócenie ciągłości i pierwotnej struktury tkanki kostnej.

Wpływ urazu, w tym urazu jatrogennego związanego z interwencją chirurgiczną, na funkcjonowanie układu odpornościowego stanowi przedmiot licznych badań naukowych. W dalszym ciągu obserwuje się istotne ograniczenia w aktualnym stanie wiedzy dotyczące złożonych zależności między odpowiedzią zapalną, mechanizmami immunologicznymi a procesami regeneracji tkanki kostnej. Uzasadnia to konieczność dalszego pogłębiania wiedzy na temat molekularnych i komórkowych mechanizmów gojenia, co w perspektywie klinicznej mogłoby przełożyć się na udoskonalenie narzędzi

diagnostycznych oraz opracowanie bardziej skutecznych, ukierunkowanych strategii terapeutycznych.

Pomimo wieloletniego doskonalenia metod leczenia operacyjnego, około 10% złamań nie ulega prawidłowemu zrostowi [1]. Do czynników ryzyka należą, m.in.: uszkodzenie tkanek miękkich, urazy naczyniowe, technika chirurgiczna, zakażenia, wiek, choroby współistniejące, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, płeć żeńska oraz otyłość [1,2]. Opóźniona diagnoza prowadzi do przewlekłego bólu, konieczności długotrwałej rehabilitacji oraz trudności w wykonywaniu codziennych czynności, co podkreśla potrzebę wczesnej i dokładnej oceny przebiegu gojenia [2].

Współczesna diagnostyka obejmuje różne metody oceny gojenia złamań, takie jak badania densytometryczne, radioizotopowe, przepływowe, histologiczne i morfometryczne, jednak są one inwazyjne lub ujawniają zmiany zbyt późno, co ogranicza ich praktyczne zastosowanie [2]. Dokładna diagnoza, łatwy dostęp i nieinwazyjne metody mogą przyczynić się do poprawy wyników anatomicznych i funkcjonalnych, skrócenia okresu rekonwalescencji oraz zmniejszenia kosztów opieki zdrowotnej.

## **CEL PRACY**

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli stresu oksydacyjnego w procesie gojenia kości oraz omówienie znaczenia wybranych markerów uszkodzeń oksydacyjnych jako potencjalnych, nieinwazyjnych narzędzi wspomagających diagnostykę i monitorowanie przebiegu regeneracji tkanki kostnej.

## **BIOLOGICZNE PODSTAWY GOJENIA KOŚCI**

Tkanka kostna jest dynamicznym narządem metabolicznym, którego zdolność do regeneracji zależy od ścisłej współpracy komórek kostnych, unaczynienia oraz lokalnych procesów przebudowy [3]. Tkanka kostna składa się z dwóch głównych typów:

- **Kość korowa** - tworzy zewnętrzną, twardą warstwę, zapewniającą sztywność mechaniczną.
- **Kość beleczkowa** - znajduje się wewnątrz kości, jest bardziej porowata i lepiej ukrwiona, co sprzyja szybszemu gojeniu [4].

Skoordynowane działanie trzech głównych typów komórek kostnych – osteoblastów, osteoklastów i osteocytów – zapewnia ciągłą, dynamiczną przebudowę kości. Osteoblasty wytwarzają nową tkankę kostną, osteoklasty resorbują starą lub uszkodzoną kość, a osteocyty wykrywają zmiany mechaniczne i regulują równowagę między formowaniem a resorpcją kości [3].

Fazy gojenia złamań kości:

- I. **Faza zapalna (krwiaka) - do 7 dnia:** powstaje krwiak, który szybko ulega naciekowi przez komórki układu odpornościowego. Cytokiny i czynniki wzRFTtu stymulują proliferację komórek naprawczych [5].
- II. **Faza ziarninowania - 8-14 dzień:** tworzy się dobrze unaczyniona tkanka ziarninowa. Fibroblasty i osteoblasty tworzą strukturalne rusztowanie dla formującej się tkanki kostnej [5].
- III. **Faza tworzenia kostniny (metaplastji komórkowej) - do 4 miesięcy:** miękka kostnina ulega przekształceniu w twardą tkankę kostną, co zapewnia stabilizację odłamów [5].
- IV. **Faza przebudowy (remodelacji, końcowego zrostu kostnego) - do 4 lat:** pierwotna kostnina zostaje zastąpiona bardziej zorganizowaną i wytrzymałą kością blaszkową, dostosowaną do obciążeń mechanicznych [5].

Procesy te są związane z dynamicznymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi w obrębie miejsca złamania, a ich przebieg może być modulowany przez czynniki oksydacyjne [5].

## STRES OKSYDACYJNY I GOJENIE ZŁAMAŃ KOŚCI

W prawidłowo funkcjonującym organizmie ludzkim zachowana jest równowaga redoks, nieznacznie przesunięta w stronę utleniaczy [6]. Reaktywne formy tlenu (RFT) to cząsteczki zawierające tlen, takie jak nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ) i anion ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ). Powstają one głównie podczas transportu elektronów w procesie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [7]. Są to wysoce reaktywne chemicznie cząsteczki, co oznacza, że mogą łatwo reagować z innymi biomolekułami, powodując ich uszkodzenia [7].

W niższych stężeniach RFT pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych, aktywując określone szlaki fizjologiczne regulujące istotne procesy biologiczne. Umożliwiają eliminację patogennych mikroorganizmów oraz stymulują proliferację komórek nabłonkowych i fibroblastów [8]. Jednak podwyższony poziom RFT może prowadzić do peroksydacji lipidów, utleniania białek i uszkodzenia DNA, co skutkuje stresem oksydacyjnym i może prowadzić do śmierci komórek. Udowodniono, że uszkodzenia oksydacyjne biomakrocząsteczek są przyczyną wielu chorób ostrych i przewlekłych oraz mogą wpływać na przebieg i skuteczność gojenia kości [8].

Reaktywne formy tlenu wykazują paradoksalne zachowanie w funkcjach biologicznych - w niskich stężeniach wspomagają układ odpornościowy i uczestniczą w sygnalizacji komórkowej, natomiast ich nadmiar zaburza homeostazę komórkową [9]. Stres oksydacyjny definiuje się jako stan braku równowagi w organizmie, w którym nadmierna ilość RFT przekracza zdolność przeciwutleniaczy do neutralizacji ich szkodliwego działania [10]. Nadmierną produkcję RFT mogą powodować, m.in. nadaktywne neutrofile, drobnoustroje, zmiany hormonalne (np. spadek estrogenu), stany zapalne indukowane przez cytokiny, toksyny egzogenne i endogenne oraz farmakoterapia [6]. RFT są również generowane przez czynniki środowiskowe, takie jak promieniowanie UV, zanieczyszczenie powietrza, palenie tytoniu oraz stres fizyczny i psychiczny [7].

Organizm posiada mechanizmy obronne, które neutralizują RFT poprzez enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza, peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR), a także poprzez małe cząsteczki antyoksydacyjne, np. witaminę C, witaminę E oraz glutation (GSH) [11]. Przeciwutleniacze chronią organizm przed nadmiernym stresem oksydacyjnym, co jest istotne dla prawidłowego przebiegu gojenia kości [12].

W kontekście gojenia złamań kości komórki odpowiedzialne za osteogenezę, takie jak osteoblasty i osteocyty, są szczególnie wrażliwe na podwyższony poziom RFT, który indukuje ich apoptozę, jednocześnie sprzyjając różnicowaniu i aktywności osteoklastów [6]. Nadmierny stres oksydacyjny może opóźnić procesy regeneracyjne, natomiast odpowiednia równowaga redoks wspiera proliferację i funkcjonowanie komórek kostnych.

Wczesne etapy gojenia złamań są związane z reakcją zapalną, w której RFT pełnią funkcję sygnałów molekularnych [13]. Nadmierny stres oksydacyjny może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, co opóźnia regenerację. Przeciwutleniacze zmniejszają nadmierny stan zapalny i wspierają przejście do fazy tworzenia kostniny. Ponadto uczestniczą w syntezie kolagenu, kluczowego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej, niezbędnego do mineralizacji i tworzenia nowej tkanki kostnej. RFT mogą również uszkadzać komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, pogarszając mikrokrażenie oraz dopływ tlenu i składników odżywczych do miejsca złamania, natomiast przeciwutleniacze chronią śródbłonek i wspierają procesy regeneracyjne [7].

Dzięki regulacji równowagi redoks, przeciwutleniacze sprzyjają różnicowaniu osteoblastów i utrzymaniu osteocytów, a także ograniczają nadmierną aktywność osteoklastów [7]. Podkreśla to znaczenie poszukiwania nieinwazyjnych, powtarzalnych i powszechnie dostępnych metod oceny

procesu gojenia, które pozwalają na monitorowanie dynamicznych zmian, zwłaszcza we wczesnych fazach regeneracji.

W badaniach biochemicznych uwidacznia się potencjał monitorowania markerów stresu oksydacyjnego, które mogą wskazywać etap, na jakim znajduje się proces regeneracji kości. Regularne badanie tych markerów pozwala ocenić prawidłowość gojenia, szybko zidentyfikować potencjalne powikłania, takie jak opóźniony lub niepełny zrost, a także umożliwia wczesną interwencję kliniczną. Wiedza o poziomie markerów RFT pozwala lekarzom na dostosowanie leczenia - np. poprzez zmianę dawkowania leków, terapię uzupełniającą lub zastosowanie metod bardziej inwazyjnych, jeśli przebieg gojenia jest nieprawidłowy.

Monitorowanie markerów stresu oksydacyjnego ma również znaczenie w badaniach klinicznych, pozwalając na ocenę skuteczności nowych terapii i ich porównanie. Stosowane strategie terapeutyczne mogą obejmować suplementację antyoksydantów, modyfikację stylu życia - w tym optymalizację diety oraz regularną aktywność fizyczną - a także farmakoterapię ukierunkowaną na redukcję nadmiernej produkcji RFT bądź wzmocnienie endogennych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej organizmu. Ostatecznym celem jest zapewnienie pacjentowi szybkiego, bezpiecznego powrotu do pełnej sprawności, zmniejszenie liczby powikłań i poprawa wyników leczenia [6–13].

Niniejsza praca przedstawia przegląd wybranych markerów stresu oksydacyjnego w kontekście gojenia kości, które stanowią podstawę współczesnych badań naukowych.

## **MARKERY USZKODZEŃ OKSYDACYJNYCH**

### **1. Malondialdehyd (MDA)**

Malondialdehyd (MDA) jest jednym z najważniejszych i powszechnie stosowanych markerów stresu oksydacyjnego w przebiegu gojenia złamań

kości. Powstaje jako produkt peroksydacji lipidów [14]. Jest to proces wolnorodnikowego utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, prowadzący do powstawania nadtlenków tych związków. Peroksydacja lipidów przebiega w trzech etapach: inicjacji, propagacji i terminacji [15].

- **Inicjacja:** usunięcie atomu wodoru z cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego lub reszty kwasu tłuszczowego z fosfolipidu, głównego składnika błon komórkowych. Nienasycone kwasy tłuszczowe w błonach są szczególnie podatne na atak wolnych rodników. Peroksydację mogą inicjować rodniki hydroksylowe ( $\bullet\text{OH}$ ), nadtlenkowe ( $\text{LOO}^*$ ), alkoksylowe ( $\text{LO}^*$ ) lub alkilowe ( $\text{L}^*$ ), a także ozon, tlenki azotu, dwutlenek siarki i podchloryn.
- **Propagacja:** rodniki alkilowe reagują z tlenem, tworząc rodniki nadtlenkowe ( $\text{LOO}^*$ ), które odrywają atomy wodoru od innych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, powtarzając cykl peroksydacji.
- **Terminacja:** zachodzą reakcje między wolnymi rodnikami, tworząc dimeryzowane produkty fosfolipidowe. Dalsze przemiany tych produktów prowadzą do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i powstawania fragmentów, w tym dialdehydu malonowego (MDA) [16].

Podwyższony poziom MDA w tkankach i osoczu wskazuje na zwiększony stres oksydacyjny i nasilenie procesów peroksydacji lipidów. Aldehydy powstałe w tym procesie są cytotoksyczne, mutagenne, mogą powodować pęknięcia DNA i wpływać na integralność błon komórkowych, a także indukować ekspresję COX-2 w makrofagach [17,18]. Większość MDA jest związana kowalencyjnie z białkami, DNA i innymi biomolekułami, natomiast część pozostaje wolna [18].

Podczas gojenia złamań wzRFTt poziomu MDA odzwierciedla nasilenie stresu oksydacyjnego w fazie zapalnej i może wskazywać na potencjalne zaburzenia w późniejszych fazach regeneracji, wpływając na funkcję osteoblastów i osteocytów oraz sprzyjając osteoklastogenezie [14–18].

Pomiar MDA w osoczu człowieka jest pRFTty i powtarzalny. Prawidłowe stężenia mieszczą się w zakresie 1,40–1,90 nmol/dl [19], a najczęściej stosowaną metodą jego oznaczania jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [20,21]. Monitorowanie MDA umożliwia ocenę skuteczności terapii antyoksydacyjnej, wspomagającej regenerację kości i wczesne wykrycie nieprawidłowości w procesie gojenia złamań [22].

U pacjentów ze złamaniami kości obserwuje się istotny wzRFTt stężenia MDA w surowicy i tkankach, szczególnie w fazie zapalnej, co odzwierciedla nasilenie stresu oksydacyjnego i procesów peroksydacji lipidów [22].

## **2. 4-Hydroksynonenal (4-HNE)**

4-Hydroksynonenal (4-HNE) jest jednym z głównych toksycznych produktów nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, procesu autokatalitycznego inicjowanego przez atak wolnych rodników na wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) występujące w dwuwarstwach lipidowych, zwłaszcza w fosfolipidach błonowych [23,24]. 4-HNE powstaje w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-6, takich jak kwas linolowy, gamma-linolenowy, czy arachidonowy [23,24]. Jego wzór chemiczny to  $\text{HOCH}_2\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_4\text{-CHO}$ .

Pomimo względnej stabilności w porównaniu z wolnymi rodnikami, struktura 4-HNE zawiera trzy grupy reaktywne: grupę hydroksylową (-OH) przy czwartym atomie węgla, grupę aldehydową (-CHO) na końcu łańcucha oraz wiązanie podwójne między drugim a trzecim atomem węgla [23]. Te miejsca reaktywne sprawiają, że 4-HNE łatwo reaguje z nukleofilowymi grupami tiolowymi i aminowymi w białkach, lipidach i DNA, tworząc addukt Michaela lub

zasady Schiffa [23,24]. Interakcje te mogą modyfikować aktywność enzymów i prowadzić do stresu karbonylowego [23–25].

W zależności od stężenia, 4-HNE może wpływać na funkcje biologiczne komórek, w tym stymulować lub hamować aktywność kinazy białkowej C (PKC) oraz modulować ekspresję genów poprzez czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B i AP-1 [25]. Istotną rolę odgrywa również aktywacja czynnika Nrf2, który reguluje ekspresję genów związanych z odpowiedzią antyoksydacyjną, w tym oksygenazy hemowej 1 (HO-1), dehydrogenaz aldehydowych (ALDH), transferazy S-glutationowej (GST), białek oporności wielolekowej (MRP), aldo-ketoreduktaz (AKR), reduktazy chinonu NADPH 1 (NQO1) i ligazy glutaminianowo-cysteinowej (GCL) [26].

Fizjologiczne poziomy 4-HNE są istotne dla utrzymania homeostazy komórkowej. Niskie stężenia (poniżej 5 $\mu$ M) stymulują proliferację komórek i łagodną odpowiedź antyoksydacyjną, chroniąc przed poważniejszymi uszkodzeniami, takimi jak działanie czynników rakotwórczych. Wyższe stężenia (20–100 $\mu$ M) prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego, zaburzeń różnicowania i indukcji apoptozy [27].

W aspekcie gojenia złamań kości 4-HNE pełni podwójną rolę. W niskich stężeniach może wspierać adaptacyjne procesy komórkowe, natomiast przewlekły i nadmierny stres oksydacyjny prowadzi do jego akumulacji, co negatywnie wpływa na funkcje osteoblastów i komórek macierzystych mezenchymalnych. Podwyższony poziom 4-HNE może wydłużać fazę zapalną i hamować prawidłowe różnicowanie osteoblastów, prowadząc do opóźnionego lub niepełnego gojenia kości. Może także indukować apoptozę komórek, zakłócając przebieg regeneracji po złamaniu [23–27].

Monitorowanie stężenia 4-HNE umożliwia ocenę poziomu stresu oksydacyjnego na różnych etapach procesu gojenia oraz skuteczności terapii ukierunkowanych na jego redukcję, takich jak stosowanie przeciwutleniaczy.

Śledzenie dynamicznych zmian tego aldehydu może wspierać wczesne wykrywanie nieprawidłowości i optymalizację przebiegu leczenia. [23–27].

U chorych ze złamaniami dochodzi do zwiększenia stężenia 4-HNE w miejscu uszkodzenia oraz w krążeniu ogólnym, co koreluje z nasileniem stresu oksydacyjnego i może wpływać na opóźnienie procesów regeneracyjnych [23–27].

### **3. F2-Izoprostany**

F2-izoprostany zostały odkryte w 1990 roku przez Morrowa i Robertsa [28]. Są związkami chemicznie podobnymi do prostaglandyny F2. Powstają w wyniku niecyklooksygenazowej peroksydacji kwasu arachidonowego wywołanej przez wolne rodniki, zachodzącej w fosfolipidach i lipoproteinach. [29]. Ze względu na stabilność, czułość i specyficzność wobec procesów peroksydacji lipidów, F2-izoprostany są obecnie uznawane za jedne z najbardziej wiarygodnych markerów stresu oksydacyjnego [30]. Mogą być mierzone w osoczu, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym, co umożliwia ich szerokie zastosowanie w badaniach klinicznych i eksperymentalnych.

F2-izoprostany początkowo tworzą się w formie zestryfikowanej w fosfolipidach, a następnie uwalniają się w postaci wolnej przez działanie fosfolipaz. Powstawanie tych związków obejmuje generację trzech rodników arachidonylowych, które ulegają endocyklizacji, tworząc cztery pośrednie regioizomery podobne do prostaglandyny H<sub>2</sub>, a następnie redukcji do czterech regioizomerów pierścienia F. Każdy regioizomer składa się z ośmiu racemicznych diastereoizomerów, co daje łącznie 64 możliwe formy izopRFTtanu F2 [31].

Podwyższony poziom F2-izoprostanu może wpływać na funkcje komórek kostnych. Nadmierny stres oksydacyjny i wysokie stężenia F2-izoprostanu mogą hamować aktywność osteoblastów, co prowadzi do spowolnienia tworzenia nowej tkanki kostnej [31]. Z kolei RFT i F2-izoprostany mogą

zwiększać aktywność osteoklastów, przyspieszając resorpcję kości i zaburzając równowagę między tworzeniem a resorpcją tkanki kostnej [31]. Ponadto F2-izoprostany modulują odpowiedź zapalną, która jest integralną częścią gojenia kości [31]. Umiarkowany stan zapalny sprzyja procesom regeneracyjnym, podczas gdy przewlekły lub nadmierny stan zapalny, powiązany z wysokim poziomem stresu oksydacyjnego, może hamować i opóźniać naprawę kości [31]. F2-izoprostany są stabilnymi wskaźnikami peroksydacji lipidów i pozwalają na ocenę uszkodzenia błon komórkowych oraz komórek zaangażowanych w proces gojenia kości. Ich poziomy są modulowane zarówno przez endogenny status antyoksydacyjny (np. witamina E, selen), jak i przez egzogenną suplementację antyoksydacyjną. Pomiar F2-izoprostanu metodą spektrometrii mas pozostaje metodą z wyboru ze względu na wysoką czułość i swoistość, mimo że jest kosztowna i czasochłonna. Dokładność tej metody w badaniach wynosi około 96%, a precyzja 6-5% [31].

Stężenie F2-izoprostanów jest podwyższone w wielu chorobach związanych ze stresem oksydacyjnym, w tym w schorzeniach sercowo-naczyniowych [32], neurodegeneracyjnych [33], w zespole kruchości [34], cukrzycy [35] oraz w SARS-CoV-2 [36]. Ich poziomy odzwierciedlają zarówno nasilenie stresu oksydacyjnego, jak i skuteczność wewnątrzkomórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, w tym systemu glutationowego.

Podsumowując, F2-izoprostany stanowią stabilny, specyficzny i czuły marker stresu oksydacyjnego w kontekście gojenia złamań kości. Ich monitorowanie pozwala ocenić wpływ stresu oksydacyjnego na funkcję osteoblastów i osteoklastów oraz efektywność interwencji antyoksydacyjnych, co ma kluczowe znaczenie dla regeneracji tkanki kostnej [37].

U pacjentów ze złamaniami kości stwierdza się podwyższone stężenia F2-izoprostanów, które odzwierciedlają nasilenie peroksydacji lipidów oraz mogą korelować z intensywnością odpowiedzi zapalnej i przebiegiem gojenia [37].

#### **4. 8-OHdG**

Jednym z najlepiej poznanych markerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG), powstająca w wyniku reakcji reaktywnych form tlenu z zasadą guaninową. Ze względu na niską energię jonizacji guanina jest szczególnie podatna na utlenianie, co sprawia, że 8-OHdG jest bardzo czułym wskaźnikiem uszkodzeń oksydacyjnych materiału genetycznego oraz nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach [38].

Powstawanie 8-OHdG wiąże się z działaniem rodnika hydroksylowego, który prowadzi do modyfikacji struktury DNA i może skutkować błędami replikacji, mutacjami punktowymi oraz zaburzeniami ekspresji genów. Uszkodzona zasada jest usuwana w procesie naprawy przez wycinanie zasad, a powstała 8-OHdG może być następnie oznaczana w surowicy krwi, moczu lub tkankach, co umożliwia jej wykorzystanie jako biomarkera systemowego stresu oksydacyjnego [39].

W tkance kostnej podwyższone stężenie 8-OHdG występuje w stanach nasilonego stresu oksydacyjnego, które towarzyszą procesom zapalnym oraz zaburzeniom remodelingu kości [40]. Uszkodzenia oksydacyjne DNA w osteoblastach mogą prowadzić do zahamowania proliferacji i różnicowania tych komórek, natomiast w osteoklastach mogą modulować ich aktywność resorpcyjną. W rezultacie stres oksydacyjny DNA może przyczyniać się do zaburzenia równowagi pomiędzy procesami kościotworzenia i resorpcji, wpływając na jakość regeneracji tkanki kostnej [40].

Ze względu na stabilność chemiczną oraz możliwość oznaczania w materiałach biologicznych, 8-OHdG uznawana jest za jeden z najbardziej wiarygodnych wskaźników uszkodzeń oksydacyjnych DNA i znajduje zastosowanie w badaniach nad patogenezą chorób kości oraz procesami gojenia złamań [40].

W przebiegu złamań kości obserwuje się wzrost stężenia 8-OHdG w surowicy i moczu, co wskazuje na zwiększone uszkodzenia oksydacyjne DNA oraz nasilenie stresu oksydacyjnego w komórkach tkanki kostnej [40].

## PODSUMOWANIE

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w procesach naprawczych złamań tkanki kostnej, wpływając zarówno na proliferację i różnicowanie osteoblastów, jak i aktywność osteoklastów oraz przebieg odpowiedzi zapalnej niezbędnej do regeneracji kości. Nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) prowadzi do uszkodzeń białek, lipidów i DNA, co może zaburzać homeostazę tkanki kostnej i opóźniać proces gojenia złamań. W większości badań obserwuje się wzrost markerów stresu oksydacyjnego we wczesnych fazach gojenia złamań, z tendencją do ich stopniowej normalizacji w miarę postępu regeneracji. W celu ograniczenia tych skutków organizm wykorzystuje mechanizmy antyoksydacyjne, których aktywność może być oceniana na podstawie specyficznych markerów stresu oksydacyjnego.

Produkty peroksydacji lipidów, takie jak dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydroksynonenal (4-HNE), odzwierciedlają uszkodzenia oksydacyjne błon komórkowych, wpływając na funkcjonowanie osteoblastów i osteoklastów oraz modulując odpowiedź zapalną. F2-izoprostany, będące stabilnymi produktami nieenzymatycznej peroksydacji kwasu arachidonowego, stanowią czuły i swoisty marker stresu oksydacyjnego wykorzystywany w badaniach klinicznych i eksperymentalnych. Ich podwyższone stężenie może wpływać na aktywność komórek tkanki kostnej oraz przebieg procesów zapalnych, co ma bezpośrednie znaczenie dla dynamiki gojenia złamań.

Istotnym wskaźnikiem oksydacyjnych uszkodzeń materiału genetycznego jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG), odzwierciedlająca stopień uszkodzeń DNA indukowanych przez RFT. Zwiększone stężenie tego markera wiąże się z zaburzeniem proliferacji i różnicowania osteoblastów oraz zmianą aktywności osteoklastów, co może prowadzić do nieprawidłowego przebiegu remodelingu kostnego i pogorszenia jakości regenerującej się tkanki.

Ocena markerów peroksydacji lipidów oraz uszkodzeń oksydacyjnych DNA stanowi zintegrowane narzędzie monitorowania nasilenia stresu oksydacyjnego w przebiegu gojenia złamań. Ich oznaczanie umożliwia ocenę ryzyka uszkodzeń komórkowych, prognozowanie przebiegu regeneracji tkanki kostnej oraz planowanie strategii terapeutycznych, w tym interwencji ukierunkowanych na przywrócenie równowagi redoks i wspomaganie procesów naprawczych kości.

## PIŚMIENNICTWO

1. ioba Breulmann F, Phelipe Hatt L, Schmitz B, Wehrle E, Geoff Richards R, Della Bella E, et al. Prognostic and therapeutic potential of microRNAs for fracture healing processes and non-union fractures: A systematic review. 2023 [cited 2025 Mar 27]; Available from: <https://doi.org/10.1002/ctm2.1161>
2. Coulibaly MO, Sietsema DL, Burgers TA, Mason J, Williams BO, Jones CB. Recent Advances in the Use of Serological Bone Formation Markers to Monitor Callus Development and Fracture Healing. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* [Internet]. 2010 [cited 2025 Mar 27];20(2):105. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3070362/>
3. Bădilă AE, Rădulescu DM, Ilie A, Niculescu AG, Grumezescu AM, Rădulescu AR. Bone Regeneration and Oxidative Stress: An Updated Overview. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2025 Mar 27];11(2):318. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8868092/>
4. Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2018 Jun 4 [cited 2025 Mar 27];20:119. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6053074/>
5. Wozniak L, Ratajczak-Wrona W, Borys J, Antonowicz B, Nowak K, Bortnik P, et al. Levels of Biological Markers of Nitric Oxide in Serum of Patients with Mandible Fractures. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Mar 27];10(13):2832. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8268335/>
6. Tian Y, Ma X, Yang C, Su P, Yin C, Qian AR. The Impact of Oxidative Stress on the Bone System in Response to the Space Special Environment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2025 Mar 27];18(10):2132. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5666814/>
7. Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases - National Library of Medicine Institution [Internet]. [cited 2026 Feb 9]. Available from: [https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay/alma9912509353406676/01NLM\\_INST:01NLM\\_INST](https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay/alma9912509353406676/01NLM_INST:01NLM_INST)
8. Mohideen K, Chandrasekar K, Ramsridhar S, Rajkumar C, Ghosh S, Dhungel S. Assessment of Oxidative Stress by the Estimation of Lipid Peroxidation Marker Malondialdehyde (MDA) in Patients with Chronic Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Dent* [Internet]. 2023 [cited 2025 Mar 27];2023:6014706. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10243953/>
9. Karajibani M, Montazerifar F, Kazemi F, Dashipour AR. Evaluation of Oxidative Stress in Patients with Fracture Admitted to Khatam Al-Anbia Hospital in Zahedan. *Annals of Military and Health Sciences Research* 2020 18:3 [Internet]. 2020 Oct 13 [cited 2025 Mar 27];18(3). Available from: <https://brieflands.com/articles/amhsr-108052>
10. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2006 Mar 10 [cited 2025 Mar 27];160(1):1–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16430879/>
11. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2025 Mar 27];48(6):749–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20045723/>
12. Wang J, Zhang Y, Tang Q, Zhang Y, Yin Y, Chen L. Application of Antioxidant Compounds in Bone Defect Repair. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 Mar 27];13(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39061858/>
13. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. RFT and RFT-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2025 Mar 27];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26998193/>

14. Julita Kulbacka, Jolanta Saczko, Agnieszka Chwiłkowska. Oxidative stress in cells damage processes. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2009 Aug;157(44).
15. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. 2014 [cited 2025 Mar 27]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
16. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* [Internet]. 2011 Oct 12 [cited 2025 Mar 27];111(10):5944–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21861450/>
17. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1990 May 1;238(3):223–33.
18. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 Mar 27];8(3):72. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6466575/>
19. Afronte D, Chen H, Ranasinghe A, Liu C chi, Hennessy A, Hansbro PM, et al. The diagnostic potential of oxidative stress biomarkers for preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Biol Sex Differ* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Mar 27];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35658944/>
20. Cui X, Gong J, Han H, He L, Teng Y, Tetley T, et al. Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens. *J Thorac Dis* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2025 Mar 27];10(5):3088. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6006110/>
21. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2005 [cited 2025 Mar 27];15(4):316–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054557/>
22. Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. *Chromatographia* [Internet]. 2012 [cited 2025 Mar 27];75(9–10):433–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593603/>
23. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death & Differentiation* 2013 20:12 [Internet]. 2013 Oct 4 [cited 2025 Mar 27];20(12):1615–30. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd2013138>
24. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2003 [cited 2025 Mar 27];24(4–5):149–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12892992/>
25. Chiarpotto E, Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, Pronzato MA, et al. Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology* [Internet]. 1999 [cited 2025 Mar 27];29(5):1565–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10216144/>
26. Zhang H, Forman HJ. Signaling pathways involved in phase II gene induction by  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2009 [cited 2025 Mar 27];25(4–5):269. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2810153/>
27. Grune T, Davies KJA. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2003 [cited 2025 Mar 27];24(4–5):195–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12892997/>
28. Milne GL, Nogueira MS, Gao B, Sanchez SC, Amin W, Thomas S, et al. Identification of novel F2-isoprostane metabolites by specific UDP-glucuronosyltransferases. *Redox Biol* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Mar 27];70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38211441/>
29. Ma E, Ingram KH, Milne GL, Timothy Garvey W. F2-Isoprostanes Reflect Oxidative Stress Correlated With Lean Mass and Bone Density but Not Insulin Resistance. *J Endocr Soc*

- [Internet]. 2017 [cited 2025 Mar 27];1(5):436–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29264499/>
30. Lorenzano S, RFTt NS, Khan M, Li H, Lima FO, Maas MB, et al. Oxidative Stress Biomarkers of Brain Damage: Hyperacute Plasma F2-IsopRFTtane Predicts Infarct Growth in Stroke. *Stroke* [Internet]. 2018 [cited 2025 Mar 27];49(3):630–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371434/>
  31. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isopRFTtanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000 Feb 15 [cited 2025 Mar 27];28(4):505–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10719231/>
  32. Anderson C, Milne GL, Park YMM, Sandler DP, Nichols HB. Cardiovascular disease risk factors and oxidative stress among premenopausal women. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2025 Mar 27];115:246–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229550/>
  33. Peña-bautista C, Álvarez L, Durand T, Vigor C, Cuevas A, Baquero M, et al. Clinical Utility of Plasma Lipid Peroxidation Biomarkers in Alzheimer's Disease Differential Diagnosis. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 Mar 27];9(8):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32707935/>
  34. Kane AE, Sinclair DA. Frailty biomarkers in humans and rodents: Current approaches and future advances. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2025 Mar 27];180:117–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31002925/>
  35. Li Q, Wang M, Li X, Shao Y. Aging and diabetic retinopathy: Inherently intertwined pathophysiological processes. *Exp Gerontol* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2025 Mar 27];175. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36893949/>
  36. Žarković N, Jastrząb A, Jarocka-Karpowicz I, Orehovec B, Baršić B, Tarle M, et al. The Impact of Severe COVID-19 on Plasma Antioxidants. *Molecules* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Mar 27];27(16):5323. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9416063/>
  37. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isopRFTtanes--25 years later. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 [cited 2025 Mar 27];1851(4):433–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25449649/>
  38. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* [Internet]. 2009 May 7 [cited 2026 Feb 9];27(2):120–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19412858/>
  39. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 1996 [cited 2026 Feb 9];74(6):297–312. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8862511/>
  40. Callaway DA, Jiang JX. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2026 Feb 9];33(4):359–70. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00774-015-0656-4>

# CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA I WYBRANE PARAMETRY DIAGNOSTYCZNE ROPOWICY GŁOWY I SZYI

## Clinical Characteristics and Selected Diagnostic Parameters of Head and Neck Phlegmon

**Bożena Antonowicz<sup>1\*</sup>, Łukasz Woźniak<sup>1</sup>, Marta Borowska<sup>2</sup>, Joanna Mandryk<sup>1</sup>,  
Kamila Łukaszuk<sup>3</sup>, Kamil Bijowski<sup>3</sup>, Jan Borys<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Zakład Chirurgii Stomatologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
[bozena.antonowicz@umb.edu.pl](mailto:bozena.antonowicz@umb.edu.pl) (\*autor korespondencyjny)*

<sup>2</sup>*Zakład Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Białostocka*

<sup>3</sup>*Klinika Chirurgii Szczękowej i Plastycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

## WPROWADZENIE

Procesy zapalne jamy ustnej, przestrzeni okołoszczękowych oraz międzypowięziowych części twarzowej czaszki i struktur szyi stanowią poważne wyzwanie diagnostyczno-terapeutyczne we współczesnej praktyce lekarskiej [1,2]. Złożona anatomia tej okolicy, bliskie sąsiedztwo kluczowych struktur naczyniowo-nerwowych oraz obecność licznych przestrzeni powięziowych sprzyjają szybkiemu szerzeniu się zakażenia. Dodatkowo nieswoisty obraz początkowych objawów klinicznych może utrudniać wczesne rozpoznanie, co zwiększa ryzyko groźnych powikłań ogólnoustrojowych [3, 4, 5].

Szczególnie niebezpieczną postacią zakażenia jest ropowica regionu twarzowo-szyjnego, uznawana za najcięższą i potencjalnie zagrażającą życiu formę ostrego, rozlanego, ropnego zapalenia tkanki łącznej w tej okolicy. Cechuje się ona dynamicznym, gwałtownym przebiegiem, brakiem wyraźnego

odgraniczenia oraz tendencją do szerzenia się wzdłuż przestrzeni powięziowych [3, 4, 5]. Stan ten wymaga pilnej i kompleksowej diagnostyki, intensywnego leczenia ogólnoustrojowego oraz interwencji chirurgicznej. Wczesne rozpoznanie i niezwłoczne wdrożenie właściwego postępowania terapeutycznego mają kluczowe znaczenie dla ograniczenia rozprzestrzeniania się procesu zapalnego, zapobiegania groźnym powikłaniom oraz poprawy rokowania pacjenta [1, 4, 5].

### *Epidemiologia i etiologia ropowicy*

Ropowica tkanek części twarzowej czaszki może występować zarówno u dzieci, jak i u dorosłych [5-7]. Najczęściej rozwija się u osób z zaburzeniami odporności, (immunoniekompetyentnych), wynikającymi, m.in. ze stosowania leków immunosupresyjnych (np. po przeszczepach narządów), długotrwałej terapii kortykosteroidami lub cytostatykami, a także w przebiegu zakażenia wirusem HIV [8-11]. Do grupy podwyższonego ryzyka należą również pacjenci w złym stanie ogólnym, obciążeni chorobami przewlekłymi i metabolicznymi, takimi jak cukrzyca, otyłość, zaburzenia krążenia czy choroby nerek [2]. W piśmiennictwie wskazuje się także na predylekcję wiekową - częstsze występowanie ropowicy obserwuje się u dzieci oraz u osób w podeszłym wieku [4, 5, 12]. U pacjentów bez istotnych obciążeń ogólnych ta postać zapalenia rozwija się najczęściej jako powikłanie niewłaściwie leczonego, pierwotnie ograniczonego procesu ropnego [4].

Wyniki badań wskazują, że 90% zapaleń tkanek w obrębie twarzy i jamy ustnej ma podłoże zębopochodne, a 2/3 z nich jest następstwem martwicy i zgorzeli miazgi u osób ze złym stanem higieny jamy ustnej, z obecnością licznych ubytków próchnicowych, korzeni zębów i zapaleniem przyzębia [1, 2, 4, 5, 9]. Do najczęstszych przyczyn niezębopochodnych należą powikłania ropnych stanów zapalnych gardła, migdałków podniebiennych, zatok obocznych nosa, gruczołów ślinowych, zapaleń kości, złamań żuchwy i ran postrzałowych [1, 2, 4, 5, 8-16].

O rozwoju ropowicy decyduje nie tylko obniżona odporność organizmu, obecność chorób współistniejących oraz zły stan higieny jamy ustnej, lecz także wysoka patogenność i wirulencja drobnoustrojów. Proces zapalny rozwija się w sytuacji, gdy mechanizmy obronne gospodarza okazują się niewystarczające do ograniczenia i zlokalizowania ogniska zakażenia, a jednocześnie dochodzi do działania drobnoustrojów o zwiększonej zjadliwości [ 1, 4, 5].

Ropowica najczęściej ma etiologię mieszaną i jest wywoływana przez mikrobiotę bakteryjną o charakterze polimikrobiologicznym. W jej patogenezie uczestniczą przede wszystkim bakterie z grupy paciorkowców, gronkowców, maczugowców oraz pałeczki tlenowe i beztlenowe; w niektórych przypadkach współudział mogą mieć również grzyby. Ryzyko rozwoju ropowicy istotnie wzrasta wraz z dużą liczebnością drobnoustrojów oraz ich wysoką toksycnością. Produkowane przez nie enzymy i toksyny sprzyjają lizie tkanek, przełamaniu barier anatomicznych oraz szybkiemu szerzeniu się zakażenia w obrębie przestrzeni powięziowych [1, 4, 5, 7].

### *Patofizjologia ropowicy*

W przebiegu ropowicy dochodzi do postępującego obumierania tkanek, przede wszystkim powięzi, które ulegają martwicy rozplywnej. Powstałe w ten sposób środowisko sprzyja intensywnemu namnażaniu się drobnoustrojów, zwłaszcza bakterii beztlenowych, co dodatkowo nasila destrukcję tkanek i szerzenie się zakażenia [1, 4, 5].

We wczesnej fazie ropowicy, obejmującej pierwsze 48 godzin choroby, nie stwierdza się obecności ropy - dominuje obrzęk tkanek. W obrazie histologicznym widoczny jest nasilony naciek zapalny o charakterze leukocytnym oraz wysięk surowiczy, przenikający pomiędzy włókna mięśniowe i elementy tkanki łącznej, wśród których obecne są liczne kolonie bakterii. Na tym etapie obserwuje się niewielką tendencję do tworzenia ograniczonej jamy ropnia [5]. Między 2. a 4. dobą choroby w przekroju zajętych tkanek pojawiają się liczne drobne jamki wypełnione treścią ropną,

która powstaje w następstwie nadkażenia wysięku surowiczego. W miarę postępu procesu zapalnego, w obrębie twardego nacieku tworzą się ogniska rozmiękania, jednak bez skłonności do zlewania się w większe, wyraźnie odgraniczone jamy [5]. Po 3-4 dniach, w zaawansowanym stadium martwicy tkanki łącznej międzypowięziowej i międzymięśniowej, pojawia się znaczna ilość rzadkiego, cuchnącego wysięku ropnego o zabarwieniu szarzielonym, zawierającego fragmenty martwiczo zmienionych tkanek oraz pęcherzyki gazu. Obserwuje się charakterystyczny obraz tkanek - mają one barwę szarą, są kruche i ulegają łatwemu rozwarstwieniu, co świadczy o zaawansowanych zmianach martwiczych [5].

### Szerzenie się zakażenia

Szerzeniu się zakażenia w przebiegu ropowicy sprzyja brak wyraźnego ograniczenia przez pierścień włóknisty, charakterystyczny dla ropni [1, 4, 5]. Proces rozwija się w tkance łącznej oraz w przestrzeniach powięziowych i międzymięśniowych, które nie posiadają wyraźnych barier anatomicznych i stanowią, tzw. „drogi niskiego oporu”, umożliwiające łatwe rozprzestrzenianie się zakażenia. Anatomia i topografia struktur regionu jamy ustnej, części twarzowej czaszki oraz szyi, w połączeniu z bliskością naczyń krwionośnych i nerwów, znacząco wpływają na sposób propagacji procesów zapalnych. W efekcie zakażenie najczęściej szerzy się przez ciągłość tkanek (*per continuitatem*), wybierając jednocześnie drogę najmniejszego oporu [4, 5, 10].

U osób z osłabioną odpornością - w wyniku immunosupresji, chorób przewlekłych czy zakażenia wirusem HIV - organizm nie jest w stanie skutecznie ograniczyć ogniska zapalnego [2, 9]. Nieskuteczna odpowiedź immunologiczna sprzyja szybkiemu namnażaniu się drobnoustrojów oraz postępującej destrukcji tkanek. Dodatkowo mikroorganizmy wywołujące ropowicę wytwarzają liczne toksyny i enzymy, takie jak hialuronidaza i kolagenaza, które rozkładają tkankę łączną, oraz hemolizyny i leukocydyny, niszczące komórki odpornościowe. Produkcja gazu i enzymów martwiczych sprzyja powstawaniu pustych przestrzeni w tkankach poprzez ich rozmiękanie

i ułatwia penetrację ropnego wysięku, co przyspiesza szerzenie się zakażenia [5].

## OBRAZ KLINICZNY ORAZ WYBRANE WSKAŹNIKI ROPOWICY REGIONU GŁOWY I SZYI

W przypadku ropowicy głowy i szyi rozpoznanie ustala się na podstawie szczegółowo zebranego wywiadu lekarskiego (badania podmiotowego) oraz dokładnego badania przedmiotowego, obejmującego ocenę stanu ogólnego, badanie zewnętrzne i wewnętrzne [4, 5]. Istotną rolę odgrywają również badania dodatkowe, w tym badania obrazowe - radiologiczne, ultrasonografia (USG), tomografia komputerowa (CT), stożkowa tomografia komputerowa (CBCT) oraz rezonans magnetyczny (MR) [4, 5, 8, 9]. Uzupełnieniem diagnostyki są badania laboratoryjne (biochemiczne), a także proste zabiegi chirurgiczne o charakterze diagnostycznym, umożliwiające pobranie materiału do badania mikrobiologicznego i histopatologicznego [4, 5, 17].

Kompleksowa ocena kliniczna i laboratoryjna pozwala na potwierdzenie rozpoznania oraz określenie rozległości i dynamiki procesu zapalnego [4, 5].

### *Badanie podmiotowe (wywiad)*

W wywiadzie pacjenci z ropowicą zgłaszają objawy ogólnoustrojowe, takie jak bóle i zawroty głowy, podwyższona temperatura ciała - niekiedy z towarzyszącymi dreszczami - złe samopoczucie, ogólne osłabienie, bóle mięśniowe, wzmożona męczliwość, uczucie rozbicia oraz apatia. Nasilenie objawów ogólnych pozostaje zwykle w korelacji z rozległością oraz dynamiką procesu zapalnego [1, 4-6, 13].

W obrazie klinicznym ropowicy dominują dolegliwości bólowe o charakterze miejscowym, których etiologia może być związana zarówno z czynnikiem zębopochodnym, jak i niezębopochodnym [1, 4, 5]. Charakter oraz dynamika początku choroby, manifestującej się bólem zęba, pozostają zróżnicowane i zależą od stanu klinicznego zęba oraz stopnia zaawansowania

procesu zapalnego. Najczęściej zgłaszanym objawem jest silny, pulsujący ból o tendencji do promieniowania wzdłuż gałęzi nerwu trójdzielnego, zwykle niepoddający się działaniu standardowych leków przeciwbólowych. Charakterystyczną cechą jest nasilona bolesność zęba podczas nagryzania oraz przy palpacji, której towarzyszy subiektywne odczucie jego „wydłużenia” i „wysadzenia” z zębodołu, wynikające ze zmian zapalnych w obrębie tkanek okołowierzchołkowych. Często obserwuje się również zwiększoną ruchomość zęba [4, 5].

W przypadkach ropowicy w następstwie zapalenia kości dolegliwości bólowe mogą obejmować całą grupę zębów w zajętej obszarze, czemu towarzyszy ich wzmożona ruchomość oraz obecność patologicznej wydzieliny w kieszonkach dziąsłowych. W odniesieniu do zębów żuchwy możliwe jest występowanie parestezji w zakresie unerwienia nerwu zębodołowego dolnego (objaw Vincenta), stanowiącej wyraz zajęcia struktur nerwowych przez proces zapalny [4, 5].

W części przypadków początkowe objawy kliniczne mogą być związane z utrudnionym wyrzynaniem zębów lub stanami zapalnymi rozwijającymi się jako powikłanie po ekstrakcjach [4, 5].

Dolegliwości bólowe mogą być również następstwem niezębopochodnych przyczyn procesu zapalnego, w tym infekcji gardła i migdałków podniebiennych, zapalenia zatok przynosowych, dróg łzowych i woreczka łzowego oraz gruczołów ślinowych. Objawom tym towarzyszy zazwyczaj stopniowo narastające wygórowanie zapalnie zmienionych tkanek, zlokalizowane w obrębie jamy ustnej, twarzy lub szyi, stanowiące wyraz szerzenia się procesu zapalnego w przestrzeniach anatomicznych głowy i szyi [4-7].

Pacjenci zgłaszają również wystąpienie obrzęku zapalnego, który może prowadzić do zaburzeń połykania w postaci dysfagii oraz bólu gardła nasilającego się podczas aktu połykania (odynofagii), co skutkuje trudnościami w przyjmowaniu pokarmów, ograniczeniem podaży doustnej oraz utratą apetytu. Bolesność towarzysząca połykaniu, obejmująca niekiedy także ślinę,

może manifestować się ślinotokiem wynikającym z unikania aktu połykania [2, 4, 5, 13, 18]. Objawy te są szczególnie nasilone w przebiegu ropowicy Ludwiga, w której proces zapalny obejmuje dno jamy ustnej, przestrzeń podjęzykową i podbródkową oraz obustronnie przestrzenie podżuchwowe i przygardłowe, z tendencją do szerzenia się w kierunku głębokich przestrzeni szyi [4, 5, 8-11, 13, 18, 19].

Utrudnienia w spożywaniu pokarmów mogą być ponadto związane z różnego stopnia ograniczeniem rozwierania szczęk (szczękościsk, trismus), stanowiącym następstwo zajęcia struktur mięśniowych lub przestrzeni powięziowych. W przypadkach współistniejącego obrzęku języka pacjenci zgłaszają również zaburzenia emisji głosu oraz artykulacji, określane jako mowa niewyraźna („kluskowata”), wynikające z ograniczonej ruchomości narządu mowy [2, 4, 5, 9, 10, 13, 18].

Pacjenci mogą również zgłaszać trudności w oddychaniu, a w zaawansowanych przypadkach - duszność. Wystąpienie szczękościsku, narastających zaburzeń połykania oraz objawów niewydolności oddechowej stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy w przebiegu ropowicy i może świadczyć o szerzeniu się procesu zapalnego do przestrzeni głębokich szyi [4, 5, 10, 13, 18, 19].

W przypadkach współistniejącego zapalenia zatok przynosowych obserwuje się wyciek patologicznej wydzieliny z przewodów nosowych oraz jej spływanie po tylnej ścianie gardła [4, 5].

### *Badanie przedmiotowe*

#### *Objawy ogólne i neurologiczne*

W badaniu przedmiotowym już we wczesnym okresie choroby pacjent może pozostawać w ciężkim stanie ogólnym. Obserwuje się znaczne osłabienie, bledność powłok skórnych, wzmożoną potliwość oraz zaostrenie rysów twarzy. Występuje wysoka gorączka, sięgająca lub przekraczająca 40°C, często z towarzyszącymi dreszczami. U części chorych mogą pojawiać się zaburzenia świadomości, bezsenność, tachykardia z obecnością tętna

nitkowatego i słabo wypełnionego, a także utrata łaknienia, niekiedy z towarzyszącą biegunką i wymiotami [4, 5, 13, 18].

Zaburzenia oddychania, w tym duszność, stanowią szczególnie groźny objaw i są najczęściej obserwowane w przebiegu ropowicy Ludwiga. W tym przypadku obrzęk tkanek dna jamy ustnej powoduje przemieszczenie języka ku górze i ku tyłowi, co prowadzi do zwężenia światła górnych dróg oddechowych i utrudnienia swobodnego przepływu powietrza. Pacjent przyjmuje wówczas charakterystyczną pozycję z opuszczoną głową, co sprzyja przemieszczeniu języka ku przodowi i częściowej poprawie drożności dróg oddechowych. W obrazie klinicznym mogą również występować zaburzenia mowy wynikające z ograniczonej ruchomości języka oraz obrzęku tkanek miękkich [4, 5, 13, 18, 19].

### *Objawy zewnątrzustne*

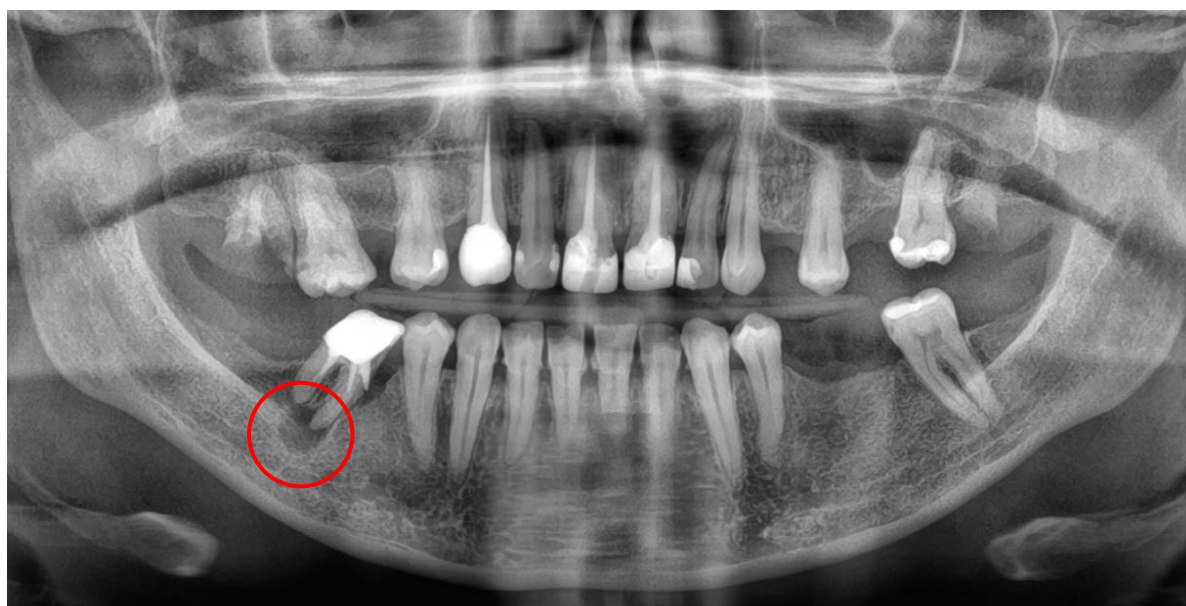
W badaniu miejscowym, zewnątrzustnym stwierdza się rozległy obrzęk tkanek miękkich, będący następstwem rozlanego, nieostro odgraniczzonego nacieku zapalnego [4, 5, 9, 13, 18, 19]. W przypadku głębokiej lokalizacji procesu zapalnego skóra nad zmianą może pozostawać niezmienną. Natomiast przy powierzchniowym umiejscowieniu zapalenia obserwuje się jej zaczerwienienie, napięcie oraz wzmożone ucieplenie. Tkanki objęte procesem zapalnym wykazują konsystencję elastyczną lub twardą i są bolesne przy badaniu palpacyjnym [4, 5, 13, 18]. W miarę progresji choroby, niekiedy po dłuższym czasie trwania procesu zapalnego, w obrębie twardego nacieku mogą formować się ogniska rozmiękania oraz liczne zbiorniki ropne. W przypadkach powierzchniowego ich położenia możliwe jest stwierdzenie objawu chełbotania, natomiast przy lokalizacji głębokiej objaw ten może być niewyczuwalny przy palpacji [4, 5, 13]. Skóra wciągnięta w proces zapalny może ulec martwicy i przebicciu, prowadząc do wytworzenia czynnej przetoki zewnętrznej. Regionalne węzły chłonne, ze względu na znaczny obrzęk i naciek tkanek, często pozostają niedostępne w badaniu palpacyjnym [4, 5].

### Objawy wewnątrzustne

W badaniu przedmiotowym wewnątrzustnym stwierdza się zmiany odpowiadające etiologii procesu zapalnego, zarówno o podłożu zębopochodnym, jak i niezębopochodnym, obejmujące struktury jamy ustnej, gardła lub krtani [4-6, 8, 12, 13, 16, 18]. Obraz kliniczny zależy od pierwotnego ogniska zakażenia oraz miejsca szerzenia się procesu zapalnego prowadzącego do rozwoju ropowicy. Do obrazu miejscowego dołączają objawy charakterystyczne dla lokalizacji nacieku zapalnego [3-5]. Może występować szczykościsk o różnym nasileniu, utrudniający, a niekiedy uniemożliwiający przeprowadzenie pełnego badania jamy ustnej. W niektórych przypadkach obserwuje się ślinotok oraz obecność nieprzyjemnego zapachu z ust (*fetor ex ore*), będącego następstwem toczącego się procesu ropnego i rozpadu tkanek [4-5].

### Badania obrazowe

W przypadku ropowicy o etiologii zębopochodnej wykonywane są zdjęcia radiologiczne wewnątrzustne, pantomogramy (OPG), czy tomografia komputerowa stożkowa (CBCT) Ryc.1.



**Rycina 1.** Badanie OPG pacjenta ze zmianami okołowierzchołowymi przy zębie 46 (Materiały własne - Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Plastycznej UMB).

Badania te umożliwiają całościową ocenę uzębienia oraz struktur kostnych szczęki i żuchwy [5, 17]. Obraz radiologiczny pozwala uwidocznic przyczyny zębopochodne ropowicy, w tym m.in. zapalenia ozębnej, zmiany zapalne wokół zębów zatrzymanych, pozostawione korzenie, powikłania po leczeniu endodontycznym lub implantologicznym, obecność torbieli zębopochodnych, a także stany zapalne tkanki kostnej w obrębie szczęki i żuchwy [5].

W diagnostyce obrazowej ropowicy badaniem o największej wartości jest tomografia komputerowa części twarzowej czaszki i szyi z podaniem kontrastu, umożliwiającą precyzyjną ocenę przestrzeni okołoszczękowych oraz międzypowięziowych szyi [4, 5, 10, 17] Ryc.2.



**Rycina 2.** Skany tomografii komputerowej (CT) - ropowica twarzy po stronie lewej (Materiały własne - Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Plastycznej UMB).

Dość powszechnie stosowaną, łatwo dostępną metodą służącą określeniu lokalizacji oraz różnicowaniu zbiorników ropnych powierzchownych i głębokich, oceny patologii tkanek miękkich, węzłów chłonnych, gruczołów ślinowych jest ultrasonografia. Jej zastosowanie jest jednak ograniczone, zwłaszcza w ocenie trudno dostępnych przestrzeni przygardłowych i zagardłowej oraz przy podejrzeniu ropowicy śródpiersia [4, 5, 7, 17].

W przypadku konieczności oceny i monitorowania szerzenia się procesu zapalnego w kierunku podstawy czaszki lub ku dołowi, w stronę klatki piersiowej z tworzeniem ropni opadowych (*abscessus descendens*), badaniem z wyboru pozostaje tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny, pozwalające na dokładną wizualizację struktur głębokich i oceny ryzyka powikłań [4, 5, 7, 16, 17].

Badania obrazowe umożliwiają precyzyjną ocenę przyczyn i rodzaju patologii tkanek miękkich oraz struktury kostnej w przebiegu ropowicy w obrębie głowy i szyi. Pozwalają na określenie lokalizacji zbiorników treści ropnej, w tym w głęboko położonych i trudnych diagnostycznie przestrzeniach międzypowięziowych głowy i szyi, w oczodole, zatokach przynosowych oraz w obrębie czaszki. Ponadto umożliwiają ocenę drożności dróg oddechowych oraz mapowanie miejscowych i ogólnych dróg szerzenia się procesu zapalnego, obejmujących głowę i szyję, mózgowiczaszkę, śródpiersie, klatkę piersiową oraz jamę brzuszną [4, 5, 7, 17, 19].

## **Badania biochemiczne**

### *Markery ropowicy*

Markery biochemiczne stanowią istotne narzędzie w diagnostyce procesów zapalnych o charakterze ostrym i przewlekłym, zarówno o lokalnym, jak i uogólnionym przebiegu [1]. Umożliwiają one kompleksową ocenę stanu klinicznego pacjenta, monitorowanie skuteczności wdrożonego leczenia oraz kontrolę dynamiki szerzenia się zakażenia. Ponadto parametry biochemiczne mogą pełnić funkcję wskaźników prognostycznych, pozwalających na wczesną identyfikację pacjentów obciążonych zwiększonym ryzykiem rozwoju powikłań, takich jak sepsa, wstrząs septyczny czy niewydolność wielonarządowa [1, 5, 8, 19].

W przebiegu ostrego stanu zapalnego, zwłaszcza o etiologii bakteryjnej, obserwuje się charakterystyczne zmiany w parametrach laboratoryjnych odzwierciedlających odpowiedź ostrej fazy organizmu [1, 5].

**Białko C-reaktywne (CRP)** - jest białkiem ostrej fazy, którego stężenie w surowicy istotnie wzrasta w odpowiedzi na toczący się proces zapalny, często wielokrotnie przekraczając wartości referencyjne [1, 5, 20-22]. Zwiększenie jego poziomu następuje szybko, zwykle w ciągu 6-8 godzin od inicjacji reakcji zapalnej i wykazuje dodatnią korelację z nasileniem odpowiedzi zapalnej organizmu. Dynamika narastania CRP w początkowej fazie zapalenia jest wysoka i może wyprzedzać wystąpienie innych objawów klinicznych, takich jak gorączka. Maksymalne stężenie osiągnięte jest zazwyczaj po 24-48 godzinach. Wartości przekraczające 10 mg/L sugerują obecność istotnego procesu zapalnego, najczęściej o etiologii infekcyjnej. W przebiegu ciężkich zakażeń, w tym ropowic głowy i szyi, stężenie CRP może osiągać wartości trzycyfrowe, przekraczające 150-200 mg/L. CRP jest markerem o wysokiej czułości, jednak niskiej swoistości, co ogranicza jego przydatność w różnicowaniu etiologii stanu zapalnego [1, 2, 5, 16, 20-22].

**Odczyn Biernackiego (OB, ESR-erythrocyte sedimentation rate)**, jest nieswoistym wskaźnikiem stanu zapalnego, którego wartość wzrasta w następstwie zwiększonego stężenia białek ostrej fazy w osoczu, zwłaszcza fibrynogenu [1, 23, 24]. Zmiany w składzie białkowym osocza prowadzą do agregacji erytrocytów oraz przyspieszenia ich opadania, co klinicznie manifestuje się podwyższonym odczynem Biernackiego [23, 24]. Podwyższone wartości OB mogą świadczyć o obecności oraz progresji procesu zapalnego, w tym infekcji, a także o nieskuteczności wdrożonej terapii. Parametr ten znajduje zastosowanie w monitorowaniu przebiegu choroby i ocenie odpowiedzi na leczenie. Dynamika wzrostu OB jest wolniejsza w porównaniu z innymi markerami zapalnymi, zwłaszcza CRP zwiększenie wartości obserwuje się zazwyczaj po 24–48 godzinach od początku procesu zapalnego. Ponadto OB może utrzymywać się na podwyższonym poziomie przez dłuższy czas po ustąpieniu ostrej fazy zapalenia [1, 23, 24].

**Leukocytoza** ( $\uparrow$  **White Blood Cells**), definiowana jest jako zwiększenie liczby leukocytów we krwi obwodowej powyżej 11 000/ $\mu$ l [1, 20]. Najczęściej towarzyszy jej przewaga granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilia), co jest charakterystyczne dla zakażeń o etiologii bakteryjnej. W badaniu rozmazu krwi obwodowej może być obserwowane tzw. „przesunięcie w lewo”, polegające na obecności niedojrzałych form układu granulocytarnego, takich jak metamielocyty, mielocyty czy promielocyty. Zjawisko to odzwierciedla wzmożoną aktywność proliferacyjną szpiku kostnego w odpowiedzi na bodziec zapalny. W przebiegu ciężkich zakażeń liczba leukocytów często przekracza 15–20 tys./ $\mu$ l, co świadczy o nasilonej odpowiedzi zapalnej organizmu. Należy jednak podkreślić, że w stanach skrajnie ciężkich, zwłaszcza w przebiegu sepsy, może wystąpić leukopenia, stanowiąca niekorzystny czynnik rokowniczy [1, 16, 20].

**Prokalcytonina (PCT)**, w przebiegu uogólnionej odpowiedzi zapalnej syntetyzowana jest, m.in. przez monocyty, granulocyty oraz limfocyty. Zwiększenie jej stężenia obserwuje się już we wczesnych godzinach rozwijającej się infekcji bakteryjnej, a wartości  $\geq 0,5$  ng/ml sugerują obecność ciężkiego zakażenia bakteryjnego [1, 22, 25, 26]. PCT wykazuje większą swoistość w diagnostyce zakażeń bakteryjnych niż CRP, ponieważ jej synteza indukowana jest bezpośrednio przez produkty pochodzenia bakteryjnego, w tym endotoksyny, oraz mediatory odpowiedzi zapalnej. W związku z tym podwyższone stężenie PCT przemawia za bakteryjną etiologią procesu chorobowego. W przeciwieństwie do zakażeń bakteryjnych, w przebiegu infekcji wirusowych, chorób autoimmunologicznych, urazów czy po zabiegach operacyjnych wzrost stężenia PCT jest zazwyczaj nieznaczny lub nieobecny, co zwiększa jej wartość w diagnostyce różnicowej ciężkich zakażeń [1, 22, 25]. Prokalcytonina stanowi wczesny marker uogólniania się procesu zapalnego i może poprzedzać wystąpienie objawów klinicznych. Jej stężenie wykazuje dodatnią korelację z nasileniem reakcji zapalnej oraz stopniem rozsiewu zakażenia. Wartości PCT przekraczające 2 ng/ml wskazują na wysokie

prawdopodobieństwo sepsy lub uogólnionej odpowiedzi zapalnej o etiologii bakteryjnej. W przebiegu ciężkich zakażeń bakteryjnych, w tym sepsy i wstrząsu septycznego, stężenie prokalcytoniny może wzrastać nawet kilkuset- lub tysiąckrotnie w stosunku do wartości referencyjnych. Ze względu na wysoką czułość i swoistość diagnostyczną PCT stanowi jeden z kluczowych markerów laboratoryjnych w rozpoznawaniu sepsy i monitorowaniu jej przebiegu [1, 25, 26].

Monitorowanie poziomu PCT znajduje istotne zastosowanie w ocenie skuteczności terapii przeciwbakteryjnej. Szybkie obniżanie się jej stężenia po wdrożeniu leczenia, możliwe do zaobserwowania już po 24 godzinach, świadczy o korzystnej odpowiedzi klinicznej i potwierdza efektywność zastosowanej terapii [1, 25, 26].

W przebiegu ropowicy, zwłaszcza w sytuacji uogólniania się zakażenia i rozwoju sepsy, obserwuje się wzrost stężeń dodatkowych markerów laboratoryjnych, takich jak mleczany, presepsyna, pentraksyna, czy fibrynogen [1, 20, 27-30]. Równocześnie mogą występować zaburzenia gospodarki elektrolitowej, nieprawidłowości w badaniu gazometrii krwi oraz odchylenia w parametrach układu krzepnięcia, zmiany w proteinogramie (obniżenie poziomu białka) oraz pojawienie się białka w moczu, odzwierciedlające postępującą dysfunkcję narządową i aktywację ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej [1, 5]. Parametry te mają znaczenie nie tylko diagnostyczne, lecz również prognostyczne i rokownicze, umożliwiając wczesną identyfikację pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka ciężkiego przebiegu zakażenia. Kompleksowa, łączna analiza wskaźników zapalnych, metabolicznych i koagulologicznych pozwala na ocenę stopnia nasilenia procesu zapalnego, monitorowanie dynamiki choroby oraz ocenę skuteczności wdrożonego leczenia [1, 5].

### *Chirurgiczne zabiegi diagnostyczno-lecznicze*

Chirurgiczne zabiegi diagnostyczno-lecznicze umożliwiają pobranie materiału do badań bakteriologicznych w celu wykonania posiewu i antybiogramu, a także do badań cytologicznych lub histopatologicznych [4, 5].

W przypadku ropowicy standardowym postępowaniem diagnostyczno-terapeutycznym jest szerokie nacięcie skóry i tkanki podskórnej wraz z rozwarstwieniem tkanek położonych głębiej oraz rewizją przylegających przestrzeni międzypowięziowych. Zabieg ten umożliwia odbarczenie ogniska zapalnego poprzez ewakuację wydzieliny, co prowadzi do złagodzenia dolegliwości bólowych oraz uzyskania materiału pozwalającego na ustalenie wstępnego rozpoznania. Pobranie treści ropnej daje jednocześnie możliwość przeprowadzenia pełnej diagnostyki bakteriologicznej [4, 5, 19].

### **Badania mikrobiologiczne**

W przebiegu ropowicy głowy i szyi badania mikrobiologiczne najczęściej wykazują obecność mieszanej mikrobioty bakteryjnej, obejmującej zarówno drobnoustroje tlenowe, jak i beztlenowe [5, 7, 13]. W celu precyzyjnej oceny etiologii zakażenia przeprowadza się badanie mikrobiologiczne materiału klinicznego z wykorzystaniem metod hodowlanych (posiewu), umożliwiających identyfikację patogenów odpowiedzialnych za rozwój procesu zapalnego.

Najczęściej izolowanymi drobnoustrojami są:

#### **bakterie tlenowe lub względnie beztlenowe:**

- *Streptococcus* spp., głównie paciorkowce grupy A (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus haemolyticus*) i grupy viridans (*Streptococcus viridans*), grupy F, czasem C/G (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*);
- *Staphylococcus aureus* (w tym MRSA w niektórych przypadkach);
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Haemophilus* spp. (rzadziej, głównie przy infekcjach zatok obocznych nosa); Enterobacteriaceae (np. *Escherichia coli*, *Klebsiella*) - w ciężkich postaciach zakażeń [5, 7, 11, 13, 19].

#### **bakterie beztlenowe (dominujące w ropowicach zębopochodnych):**

- Bacteroides spp. (np. *Bacteroides fragilis*),
- Prevotella spp. (np. *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*),
- Fusobacterium spp. (np. *Fusobacterium nucleatum*),
- Peptostreptococcus spp.,
- Veillonella spp. (*Veillonella parvula*),
- Porphyromonas spp. [5, 7, 8, 13, 19].

Badania mikrobiologiczne obejmują również wykonanie antybiogramu, który ocenia wrażliwość patogenów na poszczególne antybiotyki i umożliwia dobór terapii celowanej. W ramach badań określa się również MBC (minimal bactericidal concentration) - najmniejsze stężenie bakteriobójcze, które wskazuje aktywność bakteriobójczą antybiotyku, tj. najniższe stężenie konieczne do zabicia określonej populacji bakterii danego gatunku [5]. Oznacza się także MIC (minimal inhibitory concentration) - najmniejsze stężenie hamujące, będące miarą aktywności bakteriostatycznej antybiotyku, czyli najniższe stężenie niezbędne do zahamowania wzrostu i wstrzymania procesów życiowych hodowli bakteryjnej [5].

W leczeniu empirycznym, wdrażanym przed uzyskaniem wyników badania mikrobiologicznego i antybiogramu, stosuje się antybiotyki o szerokim spektrum działania, przede wszystkim penicyliny, dodatkowo w skojarzeniu z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz, oraz cefalosporyny II i III generacji, a także metronidazol - szczególnie w celu zapewnienia skuteczności wobec bakterii beztlenowych. W uzasadnionych przypadkach zastosowanie znajduje również piperacylina z tazobaktamem. Po uzyskaniu wyniku antybiogramu terapię należy zmodyfikować do postaci leczenia celowanego, dostosowanego do zidentyfikowanego patogenu oraz jego wrażliwości na antybiotyki [5].

## POWIKŁANIA

Ropowica regionu głowy i szyi, w przypadku niewłaściwego lub opóźnionego leczenia, może prowadzić do szeregu ciężkich powikłań zarówno

miejscowych, jak i ogólnoustrojowych [4, 5, 13]. Do klinicznych objawów alarmowych, wskazujących na ciężki lub szybko postępujący proces zapalny oraz zwiększone ryzyko uogólnienia infekcji i powikłań zagrażających życiu, należą: silny, narastający ból tkanek miękkich twarzy, szyi lub jamy ustnej; trudności w przełykaniu (dysfagia); postępujący szczękocisk; zaburzenia głosu i chrypka; trudności w oddychaniu oraz duszność. Jednym z najbardziej bezpośrednich zagrożeń jest niedrożność dróg oddechowych (*obturatio respiratoria*), wynikająca z obrzęku tkanek dna jamy ustnej oraz przestrzeni podjęzykowej i podżuchwowej, a także z przemieszczenia języka ku górze [4, 5, 13].

Powikłania oczodołowe obejmują zapalenie tkanek oczodołu (*cellulitis orbitae*), ropień oczodołu (*abscessus orbitae*) oraz ropowicę oczodołu (*phlegmone orbitae*), prowadzące do bólu, obrzęku, ograniczenia ruchomości gałki ocznej, zaburzeń widzenia, a w skrajnych przypadkach utraty funkcji narządu wzroku [4, 5] Ryc.3.

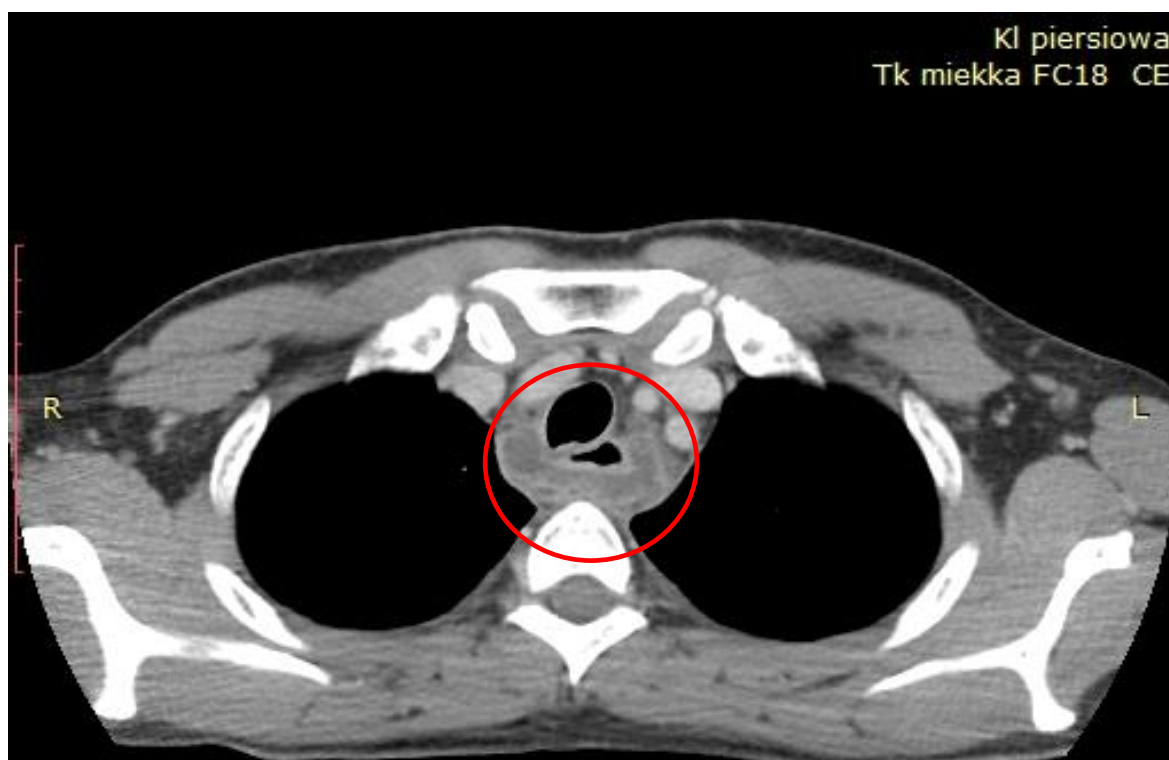


**Rycina 3.** Ropowica oczodołu (Materiały własne - Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Plastycznej UMB).

Może również dojść do zakrzepowego zapalenia żył twarzy (*thrombophlebitis*), co sprzyja rozprzestrzenianiu się infekcji do struktur

wewnątrzczaszkowych [4, 5]. Powikłania wewnątrzczaszkowe obejmują zakrzepowe zapalenie zatoki jamistej (*thrombosis sinus cavernosi*), ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (*meningitis purulenta*), ropne zapalenie mózgu (*encephalitis purulenta*) oraz ropnie mózgu (*abscessus cerebri*), które niosą ze sobą wysokie ryzyko trwałego uszczerbku neurologicznego lub zgonu. W niektórych przypadkach obserwuje się również zapalenie nerwów czaszkowych, takich jak nerw wzrokowy, podoczodołowy czy zębodołowy dolny [4, 5].

Infekcja może rozprzestrzeniać się w kierunku śródpiersia, prowadząc do zapalenia śródpiersia (*mediastinitis*), a także do płuc (pneumonia) i osierdzia (*pericarditis*), w tym z wytworzeniem ropniaka osierdzia (*pyopericardium*) [4-6, 9, 13, 19] Ryc.4.



**Rycina 4.** Badanie CT - Ropowica śródpiersia (Materiały własne - Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej i Plastycznej UMB).

Powikłania odległe obejmują ropnie przerzutowe (*abscessus metastaticus*) w narządach takich jak płuca, mięsień sercowy, wątroba, nerki czy kości [4, 5].

Pojawienie się objawów ogólnoustrojowych, takich jak gorączka, dreszcze i tachykardia, a także objawów neurologicznych, w tym zaburzeń świadomości, senności i bólu głowy, może wskazywać na rozwój sepsy (*sepsis*) lub zajęcia przestrzeni wewnątrzczaszkowej. Nagłe pogorszenie stanu ogólnego, objawiające się spadkiem ciśnienia tętniczego, sinicą i przyspieszeniem oddechu, może sygnalizować wstrząs septyczny (*shock septicus*), stanowiący bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta [4, 5, 8, 19]. Wystąpienie tych objawów wymaga natychmiastowej interwencji medycznej, obejmującej rozszerzoną diagnostykę, modyfikację terapii przeciwbakteryjnej, leczenie chirurgiczne oraz wdrożenie postępowania wspomagającego funkcje życiowe [4, 5].

## PODSUMOWANIE

Wczesna diagnostyka ropowicy głowy i szyi ma kluczowe znaczenie ze względu na jej dynamiczny przebieg oraz skłonność do szybkiego szerzenia się wzdłuż przestrzeni powięziowych. Brak wyraźnych barier anatomicznych sprzyja rozprzestrzenianiu się zakażenia na sąsiednie okolice anatomiczne, co może prowadzić do zajęcia głębokich przestrzeni szyi, śródpiersia, a nawet rozwoju uogólnionej reakcji zapalnej i sepsy [1, 4, 5]. Opóźnienie rozpoznania zwiększa ryzyko ciężkich powikłań, takich jak niedrożność dróg oddechowych, zakrzepica naczyń żylnych, zapalenie śródpiersia czy wstrząs septyczny [1, 4, 5]. Ponadto zaawansowany proces zapalny wiąże się z rozległą martwicą tkanek, koniecznością szerokich interwencji chirurgicznych oraz dłuższą hospitalizacją. Wczesne rozpoznanie umożliwia szybkie wdrożenie celowanej antybiotykoterapii, odpowiedniego leczenia chirurgicznego oraz intensywnego nadzoru ogólnoustrojowego. Pozwala to ograniczyć rozległość zmian, zmniejszyć ryzyko powikłań oraz istotnie poprawić rokowanie pacjenta [1, 4-6, 12, 13].

## PIŚMIENNICTWO

1. Antonowicz B., Łukaszuk K., Zalewska A., Mierzejewska Ż. A., Woźniak Ł., Rusztyn B., Fejfer K., Borys J.: Markery biochemiczne stanów zapalnych regionu głowy i szyi., Białystok, UMB, 2024, 146-165.
2. Pham Dang N., Delbet-Dupas C., Mulliez A., Devoize L., Dallel R., Barthélémy I.: Five predictors affecting the prognosis of patients with severe odontogenic infections. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17, 8917, doi:10.3390/ijerph17238917.
3. Chiapasco M.: *Chirurgia stomatologiczna*, Edra, Urban & Partner, Wrocław, 2020.
4. Kryst L.: *Chirurgia szczękowo-twarzowa*, PZWL, Warszawa, 2022.
5. Rahnema M.: *Chirurgia stomatologiczna i szczękowo-twarzowa*, PZWL, Warszawa, 2024.
6. Pietraszek M., Witkiewicz J., Miętkiewska-Leszniowska D., Wierzbicka M.: Ropowica szyi - opis przypadków. *Post Chir Gł Szyi.*, 2019, 1, 1-3.
7. Djemai K., Gouriet F., Michel J., Radulesco T., Drancourt M., Grine G.: *Methanobrevibacter smithii tonsillar phlegmon: a case report*. *New Microbe and New Infect.*, 2021,42, 1-4.
8. Sakhuja A., Shrestha D.B., Aryal B.B., Mir W.A.Y., Verda L.: Rare Angina: A Case Report of Ludwig's angina. *Cureus*, 2022, 14, 6: e25873., doi.10.7759/cureus.25873.
9. Wegrzyn T.Z., Greenberg J.S.: Importance of the physical exam in diagnosing Ludwig's angina without access to modern imaging Modalities in the Developing World. *Cureus*, 2024, 16, 11: e74210., doi.10.7759/cureus.74210.
10. Movva H., Crawley G.A., Nguyen V., Arghavani P.: Atypical presentation of Ludwig angina: diagnostic and therapeutic complications in a Rare Case.,*Cureus*, 2025, 17, 11: e98046., doi.10.7759/cureus.98046.
11. Koussa S., Majagi A., Wang K., Devara A.: Ludwig's angina, anterior neck abscess and cavernous venous thrombosis following third molar extraction. *BMJ Case Rep.*, 2023, 16:e255938. doi:10.1136/bcr-2023-255938.
12. Taraszkiewicz M. J., Piotrowski S. M.: Ropowica szyi - aktualny problem diagnostyczno-leczniczy. Opis przypadków. *Forum Med Rodz.*, 2018, 12, 4, 149-155.
13. Bortnik P., Tryniszewska E., Wiczorek P., Kosierkiewicz P., Siemiątkowski A., Załęski P., Borys J.; Ropowica dna jamy ustnej zębopochodna - opis przypadku. *Prog Health Sci.*, 2016, 6, 2, 178-183.
14. Rosenfeld R. M., Piccirillo J. F., Chandrasekhar, S. S., Brook I., Ashok Kumar K.A., Kramper M., Orlandi R.R., Palmer J.N., Patel Z.M., Peters A., Walsh S.A., Corrigan M.D.: Clinical practice guideline (update): Adult sinusitis. 2015, *Otolaryng Head Neck Surg.*, 152, 2 suppl., S1-S39.
15. Fokkens W. J., Lund V. J., Mullol J.: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. 2012, *Rhinol*, 50, suppl 23, 1-298.
16. Tailor B.V., Devakumar H., Myuran T., Dimitrios Ioannidis D.: Parapharyngeal and floor-of-mouth abscess secondary to tonsillar phlegmon: A rare and unusual cause of Ludwig's angina. *Clin Case Rep.*, 2022,10:e06325., doi.org/10.1002/ccr3.6325.
17. Różyło-Kalinowska I., Różyło T.K.: *Współczesna radiologia stomatologiczna*, Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2021.
18. Kawataki M., Yoshida H., Araki M.: Ludwig's Angina. *Intern Med.* 2021, 60, 16, doi: 10.2169/internalmedicine.5477-20.
19. Vallée M., Gaborit B., Meyere J., Malard O., Boutoille D., François Raffi F., Florent Espitalier F., Asseray N.: Ludwig's angina: A diagnostic and surgical priority. *Int J Infect Dis.*, 2020, 93,160-162.
20. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. PWN, Warszawa, 2017.
21. Pepys M. B., Hirschfield G. M.: C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.*, 2003 111, 12, 1805-1812.

22. Simon L., Gauvin F., Amre D.K., Saint-Louis P., Lacroix, J.: Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Inf Dis.*, 2004, 39, 2, 206-217.
23. Brigden M.L.: The erythrocyte sedimentation rate: still a helpful test when used judiciously. 1999, *Post Med.*, 105, 5, 91-94.
24. Saadeh C.: The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical applications. 1998, *South Med. J.*, 91, 3, 220-225.
25. Becker K. L., Nysten E. S., White J. C., Müller B., Snider, R. H.: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Met.*, 2004, 9, 4, 1512-1525.
26. Meisner M.: Update on procalcitonin measurements. *Ann Lab Med.*, 2014, 34, 4, 263-273.
27. Vincent J.L., Quintairos e Silva A., Couto L., Taccone F.S.: The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care*, 2011, 15, 1, R88.
28. Mussap M., Noto A.: Clinical utility of presepsin (sCD14-ST) in the diagnosis of sepsis and in predicting mortality in septic patients: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.*, 2013, 51, 5, 1015-1019.
29. Garlanda C., Mantovani A.: Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Ann Rev Immunol.*, 2013, 31, 337-366.
30. Mosesson M. W.: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.*, 2005, 3, 8, 1894-1904.