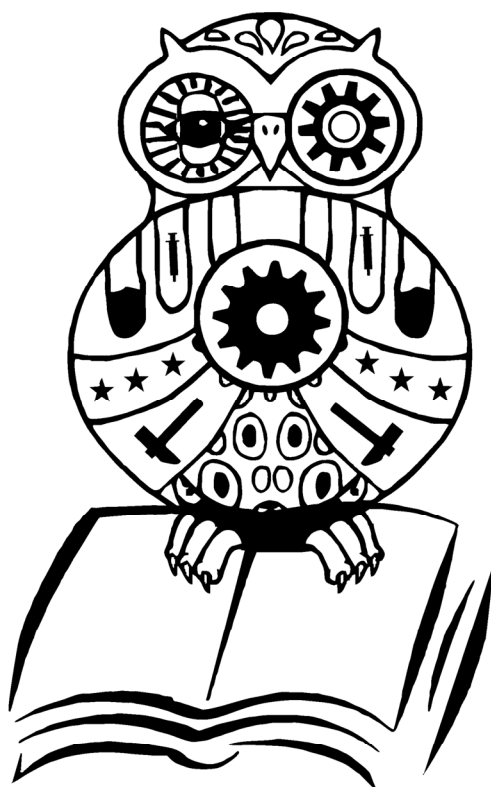


*Nauka niejedno ma imię...*

**TOM II**



Wydawnictwa Uczelniane  
Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego  
w Bydgoszczy

#### OPINIODAWCY

dr hab. nauk wet. Janusz Danek, prof. nadzw. UTP  
dr hab. Tomasz Kosiada  
dr hab. inż. Jolanta Kwiatkowska-Malina, prof. nadzw.  
dr hab. n. med. Małgorzata Łukowicz, prof. nadzw.  
dr hab. inż. Marek Macko, prof. nadzw.  
dr hab. inż. Łukasz Muślewski  
dr hab. inż. Maciej Niedostatkiwicz  
prof. dr hab. inż. Cezary Podsiadło  
prof. dr hab. Beata Rutkowska  
prof. dr hab. Ewa Solarska  
prof. dr hab. inż. Władysław Szaflik  
prof. zw. dr hab. Henryk Tylicki

Opracowanie redakcyjne i techniczne  
mgr Michał Górecki, mgr Dorota Ślachciak, mgr inż. Tomasz Szałajda

Projekt okładki  
mgr inż. Sebastian Sendel

Projekt logo  
mgr inż. Andrzej Filipiak, mgr inż. Sebastian Sendel

© Copyright

Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego  
Bydgoszcz 2014

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich.

ISBN 978-83-64235-57-3

Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego  
Redaktor Naczelny  
prof. dr hab. inż. Józef Flizikowski  
ul. ks. A. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz, tel. 52 3749482, 52 3749426  
e-mail: [wydawucz@utp.edu.pl](mailto:wydawucz@utp.edu.pl) <http://www.wu.utp.edu.pl>

---

Wyd. I. Nakład 70 egz. Ark. aut. 15,5. Ark. druk. 16,25.  
Zakład Małej Poligrafii UTP Bydgoszcz, ul. ks. A. Kordeckiego 20

## Spis treści

### CZĘŚĆ I. NAUKI TECHNICZNE

Kinga Bizon	
Wykorzystanie odnawialnych źródeł energii w budownictwie pasywnym .....	7
Andrzej Graczyk	
Metody ujawniania śladów na miejscu zdarzenia drogowego .....	17
Agnieszka Grzybowska	
Alternatywne rozwiązanie kopuły sufitu ruchomego wielofunkcyjnej sali koncertowej .....	29
Izabela Kasprzyk	
Problematyka projektowania budynków przedszkolnych w świetle aktualnie obowiązujących przepisów prawnych .....	41
Maciej Kotyk, Adam Troszyński	
Badania oddziaływania rodzaju napełnienia i temperatury otoczenia na sztywność promieniową opon samochodowych .....	49
Przemysław Osowski, Tomasz Piątkowski	
Badanie zjawiska zderzenia z wykorzystaniem metody elementów skończonych .....	61
Magdalena Sosnowska	
Problematyka przestrzennej pracy konstrukcji na przykładzie żelbetowego ostrosłupa .....	73

### CZĘŚĆ II. NAUKI ROLNICZE

Marcin Juda, Anna Baturo-Cieśniewska, Karol Lisiecki, Katarzyna Koczwarą	
Real-time PCR i LAMP w identyfikacji patogenów roślin .....	85
Karolina Joanna Lipińska, Katarzyna Mitura, Ewa Spychaj-Fabisiak	
Wpływ nawadniania na plon i jakość bulw ziemniaka .....	99
Karol Lisiecki, Grzegorz Lemańczyk, Marcin Juda, Katarzyna Koczwarą	
Mikroorganizmy jako alternatywa dla konwencjonalnej ochrony roślin przed chorobami .....	111
Katarzyna Mitura, Karolina Joanna Lipińska, Mateusz Świtkowski, Ewa Spychaj-Fabisiak	
Bioregulator Kelpak – charakterystyka oraz zastosowanie .....	125
Anna Ziółkowska	
Procesy przekształceń roślinności runi łąkowej .....	135

### CZĘŚĆ III. NAUKI MEDYCZNE

Jarosław Hoffman, Anetta Hoffman, Maciej Śniegocki, Kamila Woźniak, Monika Kuczma, Justyna Sępowska Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne u pacjentów z dyskopatią odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa .....	147
Jarosław Hoffman, Piotr Wojasiński, Ewa Trela, Wojciech Hagner, Anetta Hoffman, Izabela Stańczyk Świadomość społeczna na temat osób niepełnosprawnych .....	157
Jarosław Hoffman, Anetta Hoffman, Maciej Śniegocki, Maciej Lewandowski, Kamila Woźniak, Monika Kuczma Terapie eksperymentalne w urazach rdzenia kręgowego .....	165
Ewelina Kijewska, Piotr Kamiński, Agnieszka Adameczuk The relationship between environmental factors and the mutations in the AZF region of Y chromosome in subfertile men .....	175
Maria Krajewska, Magdalena Lampka, Piotr Kaczorowski, Tomasz Tyrakowski Krążące komórki śródbłonna jako marker uszkodzenia śródbłonna w chorobach sercowo-naczyniowych .....	191
Maria Krajewska, Magdalena Lampka, Piotr Kaczorowski, Tomasz Tyrakowski Stężenie międzykomórkowej molekuly adhezyjnej (ICAM-1) i sL-selektyny w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową .....	203
Dorota Ratuszek-Sadowska, Kamila Woźniak, Mikołaj Kowalski, Wojciech Hagner Zastosowanie przezskórnej elektrycznej stymulacji nerwów TENS w terapii zespołów bólowych kręgosłupa .....	215
Dorota Ratuszek-Sadowska, Monika Struensee, Kamila Woźniak, Wojciech Hagner Zespoły bólowe kręgosłupa – postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne .....	227
Kamila Woźniak, Maciej Śniegocki, Dorota Ratuszek-Sadowska, Marcin Grela Metody leczenia krwawienia podpajęczynówkowego pochodzącego z pękniętego tętniaka .....	239
Kamila Woźniak, Maciej Śniegocki, Dorota Ratuszek-Sadowska, Marcin Grela, Mateusz Szostak Neurostymulacja rdzenia kręgowego jako jedna z nowoczesnych metod leczenia bólu neuropatycznego .....	249

**CZEŚĆ I**  
**NAUKI TECHNICZNE**



# WYKORZYSTANIE ODNAWIALNYCH ŹRÓDEŁ ENERGII W BUDOWNICTWIE PASYWNYM

Kinga Bizon<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Nowe potrzeby, coraz szerszy dostęp do innowacyjnych materiałów oraz większe możliwości finansowe spowodowały, że w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nastąpiło wiele zmian w sektorze budownictwa. Ewolucja ta dotyczy zarówno architektury i funkcjonalności budynków, jak i zużycia przez nie energii. Unia Europejska wprowadza przepisy, które określają szczegółowe wymagania w tym zakresie. Należą do nich przede wszystkim Dyrektywa unijna EPBD z 2002 roku [Dyrektywa EPBD... 2002] oraz Dyrektywa w sprawie charakterystyki energetycznej budynków z 2010 roku [Dyrektywa Parlamentu... 2010], zgodnie z którymi wymagania wprowadzane są stopniowo do końca 2020 roku. Od 2021 roku na terenie Unii Europejskiej mają być wznoszone wyłącznie budynki o bardzo niskim zapotrzebowaniu na energię, zasilane, choćby częściowo, z odnawialnych źródeł energii (OZE).

Wskaźnik zapotrzebowania budynku na energię ( $E_0$ ) systematycznie się zmniejsza. Wymogi prawne, udoskonalenia technologiczne i materiałowe doprowadziły do powstania budynków energooszczędnych ( $E_0 \leq 70 \text{ kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{rok})$ ), niskoenergetycznych ( $E_0 \leq 45 \text{ kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{rok})$ ), a w końcu pasywnych ( $E_0 \leq 15 \text{ kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{rok})$ ).

Współczesny budynek, oprócz wymagań wytrzymałościowych i komfortu użytkowania, musi charakteryzować się niskim zużyciem energii.

## 2. ODNAWIALNE ŹRÓDŁA ENERGII

Odnawialne źródła energii (OZE) w Ustawie Prawo energetyczne zdefiniowano jako: „źródła wykorzystujące w procesie przetwarzania energię wiatru, promieniowania słonecznego, aerotermalną, geotermalną, hydrotermalną, fal, prądów i pływów morskich, spadku rzek oraz energię pozyskiwaną z biomasy, biogazu pochodzącego ze składowisk odpadów, a także biogazu powstałego w procesach odprowadzania lub oczyszczania ścieków albo rozkładu składowanych szczątków roślinnych i zwierzęcych” [Ustawa... 1997].

Odnawialne źródła energii są alternatywą dla tradycyjnych, nieodnawialnych nośników, czyli paliw kopalnych. Ich zasoby uzupełniają się w naturalnych procesach, co pozwala uznać je jako praktycznie niewyczerpalne.

### 2.1. Rodzaje odnawialnych źródeł energii

Podstawowym źródłem energii odnawialnej jest promieniowanie słoneczne. Może być ono wykorzystywane bezpośrednio i przetwarzane na:

- energię cieplną – konwersja fototermiczna (cieplna),

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, e-mail: kingabizon@gmail.com

- energię elektryczną – konwersja fotowoltaiczna (fotoelektryczna),
- energię chemiczną lub biochemiczną – konwersja fotochemiczna.

Możliwe jest występowanie tych przemian równocześnie, jednak zazwyczaj zachodzą dwie pierwsze.

Wykorzystywane są również efekty wtórne oddziaływania promieniowania słonecznego, czyli tak zwane pochodne promieniowania słonecznego. Zalicza się do nich:

- płynące ciekłe powierzchniowe,
- wiatr,
- biomasę, związaną z procesem fotosyntezy (w tym odpady biologiczne),
- ciepło zawarte w wodzie, gruncie i powietrzu, transformowane przez pompy ciepła,
- falowanie morza, wywołane oddziaływaniem wiatru,
- prądy morskie, spowodowane gradientem temperatury wód.

Niezwiązane z promieniowaniem słonecznym są: energia geotermiczna, czyli energia wnętrza Ziemi, oraz energia oceanów (pływów), powstająca dzięki siłom grawitacyjnym i ruchowi Ziemi [Dyrektywa Parlamentu... 2010].

Wykorzystanie odnawialnych źródeł energii w budownictwie pasywnym w polskich warunkach wiąże się przede wszystkim z użyciem:

- energii promieniowania słonecznego – systemy pasywne i aktywne,
- energii otoczenia budynku, zawartej w jego naturalnym środowisku (grunt, powietrze, wody gruntowe lub powierzchniowe) – pompy ciepła,
- energii odpadowej – rekuperacja ciepła z instalacji wentylacyjnych, ścieków i innych.

W mniejszym stopniu dotyczy również wykorzystania energii biomasy (instalacje z nowoczesnymi kotłami spalającymi paliwa drzewne) oraz energii wiatru (turbiny wiatrowe) [Dyrektywa EPBD... 2002].

### **3. PASYWNE SYSTEMY SŁONECZNE**

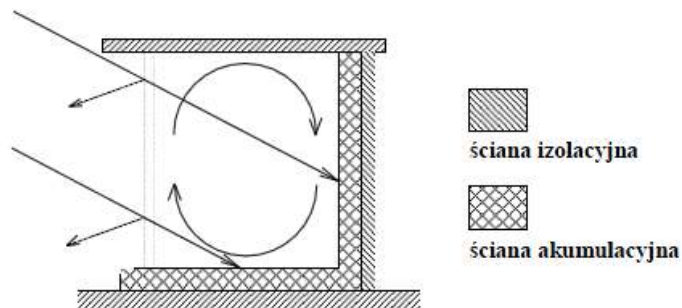
Pasywne (bierne) systemy słoneczne to elementy budynków, które dzięki odpowiedniemu zaprojektowaniu mogą wykorzystać promieniowanie słoneczne. Nie stosuje się w nich dodatkowych urządzeń, które wspomagałyby lub wymuszały transport i przekazywanie ciepła [Dyrektywa EPBD... 2002].

#### **3.1. Bezpośredni system pasywnego pozyskiwania zysków słonecznych**

Bezpośredni system pasywnego pozyskiwania zysków słonecznych do wnętrza budynku przez okna jest najprostszymi i nie wymaga żadnych dodatkowych nakładów finansowych. Należy jedynie pamiętać, że przeszklenia powinny być usytuowane głównie od strony południowej i mieć dużą powierzchnię. Promieniowanie słoneczne jest w takim przypadku pochłaniane i magazynowane w ścianach, podłodze oraz przedmiotach znajdujących się w pomieszczeniu. Część zgromadzonej energii zostaje przekazywana do powietrza, dzięki czemu temperatura wewnątrz budynku wzrasta. Ściana przeciwna do okna powinna być wykonana z elementów akumulujących ciepło (np. klinier), aby proces był jak najbardziej efektywny [Dyrektywa EPBD... 2002].



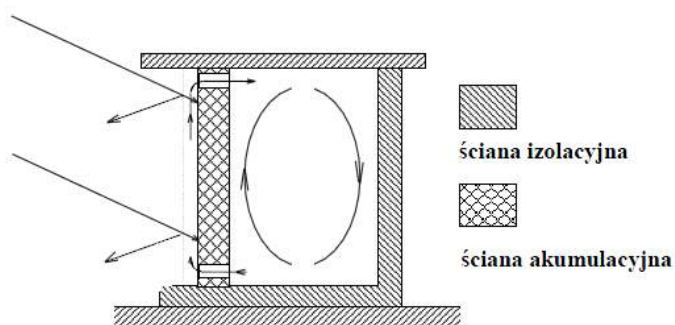
System bezpośredni nie jest jednak pozbawiony wad. Istnieje ryzyko takiego wahania temperatury wewnątrz pomieszczenia, które przekracza zakres odczuwalnego komfortu cieplnego (rys. 1).



Rys. 1. System zysków bezpośrednich (źródło: Krajowa Agencja Poszanowania Energii S.A., Domy energooszczędne [Dyrektywa EPBD... 2002])

### 3.2. Pośredni system pasywnego pozyskiwania zysków słonecznych

Wady wyżej opisanej metody pozyskiwania zysków słonecznych mogą być zminimalizowane dzięki wprowadzeniu systemu pośredniego. Wnętrze budynku odseparowuje się od bezpośredniego promieniowania słonecznego układem magazynującym. Zmniejszają się zatem wahania temperatury wewnątrz pomieszczeń. Funkcją taką może pełnić na przykład ściana Trombe'a, czyli umieszczona w południowej elewacji budynku masywna (o dużej pojemności cieplnej) przegroda osłonięta z zewnątrz szkłem. W jej wnętrzu gromadzona jest energia słoneczna, a ciepło przekazywane jest do pomieszczenia przez konwekcję. Dzięki opóźnieniu w dostarczaniu energii do wnętrza budynku rozkład dobowy temperatury w nim jest korzystniejszy [Ustawa... 1997] (rys. 2).

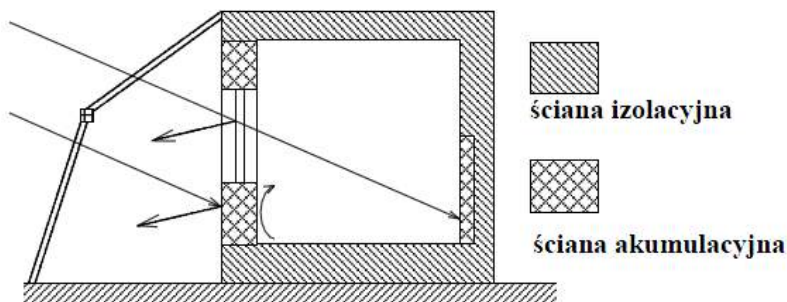


Rys. 2. System zysków pośrednich (źródło: Krajowa Agencja Poszanowania Energii S.A., Domy energooszczędne [Dyrektywa EPBD... 2002])

### 3.3. Mieszany system pasywnego pozyskiwania zysków słonecznych

Innym rozwiązaniem jest tak zwany mieszany system pasywnego pozyskiwania zysków słonecznych. Może go stanowić na przykład całkowicie oszklona weranda, któ-

ra musi być wyposażona w odpowiednią wentylację oraz konstrukcyjnie zabezpieczona przed zbyt dużymi zyskami słonecznymi latem. Weranda jest ogrzewana w sposób pośredni, dlatego wewnątrz niej dochodzi do dużych zmian temperatury. Znajdujące się obok pomieszczenie mieszkalne uzyskuje jednak energię słoneczną w sposób pośredni, dzięki czemu niekorzystne wahania temperatury w nim są mniejsze [Dyrektywa EPBD... 2002] (rys. 3).



Rys. 3. System mieszany z oszkloną werandą (źródło: Krajowa Agencja Poszanowania Energii S.A., Domy energooszczędne [Dyrektywa EPBD... 2002])

#### 4. AKTYWNE SYSTEMY SŁONECZNE

Aktywne systemy słoneczne pozyskują i przetwarzają promieniowanie słoneczne w inne formy energii (cieplną, elektryczną, mechaniczną) w skonstruowanych do tego celu urządzeniach lub instalacjach. Wyróżnia się wśród nich systemy:

- niskotemperaturowe – kolektory i stawy słoneczne,
- wysokotemperaturowe – farmy i elektrownie słoneczne,
- wspomagające – magazyny energii, diody cieplne i inne.

##### 4.1. Kolektory słoneczne

Do konwersji fototermicznej najczęściej stosuje się kolektory słoneczne, które stanowią podstawowy element instalacji solarnej. W urządzeniach tych dochodzi do konwersji na ciepło promieniowania słonecznego.

Kolektory można podzielić między innymi ze względu na: medium robocze (np. cieczowe, powietrzne), izolacje (np. próżniowe lub izolowane wełną mineralną) czy obudowę (np. przykryte, odkryte, z jedną lub dwiema szybami). W zależności od konstrukcji kolektora wyróżnia się z kolei kolektory płaskie, płaskie próżniowe i rurowe próżniowe.

Kolektory słoneczne umieszczane są najczęściej na dachach, jednak możliwe jest także ich usytuowanie na ścianach lub na specjalnym stelażu obok budynku. Niezależnie od miejsca montażu powinny być skierowane w stronę południową, aby promieniowanie słoneczne docierało do nich jak najdłużej [www.ogniwafotowoltaiczne.pl] (rys. 4).



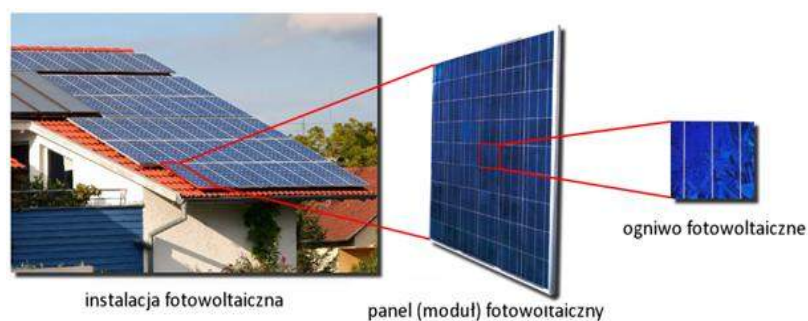
Rys. 4. Płaskie kolektory słoneczne na dachu budynku [www.instalacjebudowlane.pl]

Ciepło otrzymane w wyniku konwersji fototermicznej zachodzącej w kolektorach słonecznych jest wykorzystywane z reguły do podgrzewania ciepłej wody użytkowej (c.w.u.). Istnieje również możliwość dogrzewania pomieszczeń (wspomaganie centralnego ogrzewania), jednak takie zastosowanie wymaga znacznie większych powierzchni kolektorów słonecznych.

Nośnikiem ciepła w instalacji solarnej jest roztwór glikolu propylenowego, który krąży w instalacji dzięki pracy pompy obiegowej. Jest on transportowany do zasobnika ciepłej wody użytkowej, gdzie następuje przekazanie ciepła zimnej wodzie przez przenikanie. Oziębiony glikol pompowany jest przez pompę solarną z powrotem do kolektorów słonecznych, gdzie cały proces się powtarza [www.instalacjesolarne.com.pl].

#### 4.2. Ogniwa fotowoltaiczne

Innym sposobem aktywnego wykorzystania promieniowania słonecznego jest system konwersji fotowoltaicznej (fotoelektrycznej), czyli bezpośrednia zamiana energii promieniowania słonecznego na energię elektryczną, zachodząca w ogniwie fotowoltaicznym. Jest ono zbudowane z ogniw krzemowych. Ogniwa takie integruje się ze sobą w układy – panele (moduły) fotowoltaiczne, które wspólnie tworzą całe systemy fotowoltaiczne. Są one montowane analogicznie jak kolektory słoneczne – na dachach lub jako instalacje wolnostojące (rys. 5) [www.hydraulika24.com.pl/pompyciepla.html].



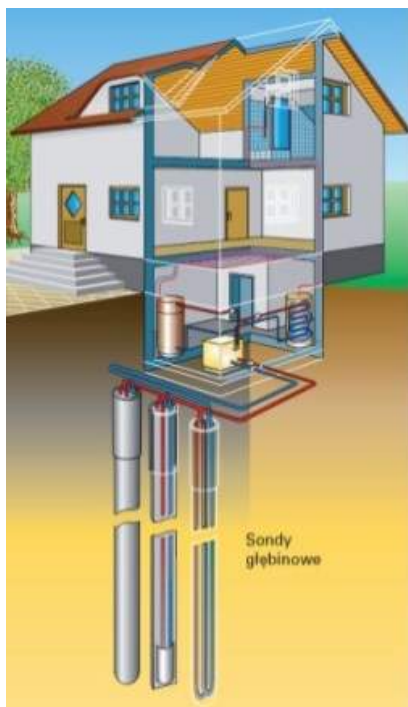
Rys. 5. Instalacja, panel i ogniwo fotowoltaiczne [www.poradnik.sunage.pl]

## 5. POMPA CIEPŁA

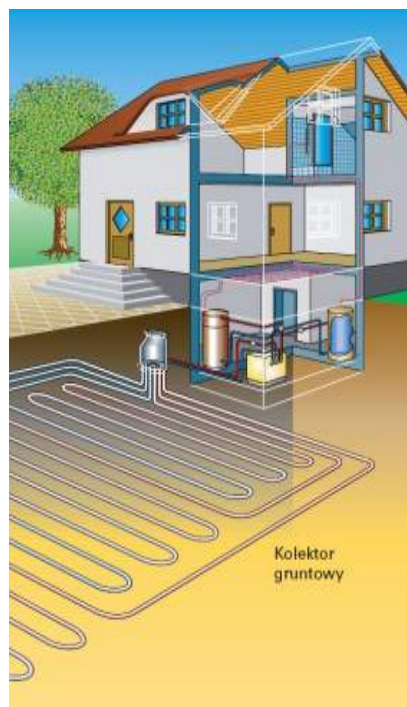
Znane są adsorpcyjne, absorpcyjne i sprężarkowe pompy ciepła. Pozwalają na przekazanie energii ze źródła o niskiej temperaturze (źródło dolne) do źródła o temperaturze wyższej (źródło górne). Energia pozyskana przez pompę ciepła może być wykorzystywana zarówno do ogrzewania pomieszczeń, jak i podgrzewania ciepłej wody użytkowej [[www.instalacjebudowlane.pl](http://www.instalacjebudowlane.pl)].

### 5.1. Dolne źródło: grunt

Gruntowa pompa ciepła pobiera ciepło spod powierzchni ziemi – zarówno z płytko położonych miejsc gleby (za pomocą kolektora poziomego lub spiralnego), jak i z jej głębszych warstw (dzięki odwiertom pionowym). W obu przypadkach są to rury wypełnione solanką (mieszanka wody z glikolem) [[www.instalacjebudowlane.pl](http://www.instalacjebudowlane.pl)] (rys. 6 i 7).



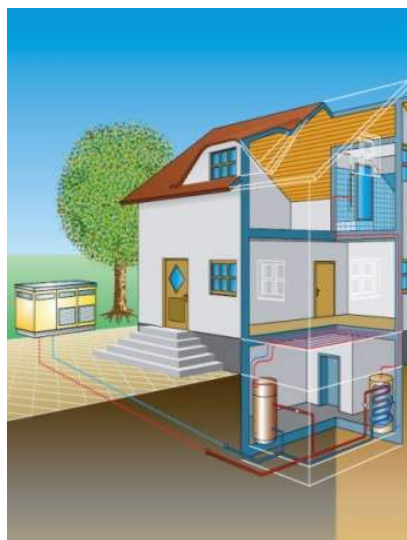
Rys. 6. Schemat odwiertów pionowych  
gruntowej pompy ciepła  
[[www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html](http://www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html)]



Rys. 7. Schemat kolektora poziomego  
gruntowej pompy ciepła  
[[www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html](http://www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html)]

## 5.2. Dolne źródło: powietrze

Ciepło uzyskane z powietrza zewnętrznego jest wykorzystywane do ogrzewania pomieszczenia (poprzez ogrzewanie powietrzne) lub przekazywane do instalacji wodnej (kaloryfery, ogrzewanie podłogowe). Powietrzna pompa ciepła jest najtańsza, najłatwiejsza w montażu, może być umieszczona na zewnątrz lub wewnątrz budynku. Mimo to nie jest zbyt często stosowanym rozwiązaniem, gdyż takie dolne źródło ciepła w klimacie umiarkowanym nie zawsze charakteryzuje się odpowiednią stabilnością [www.instalacjebudowlane.pl] (rys. 8).

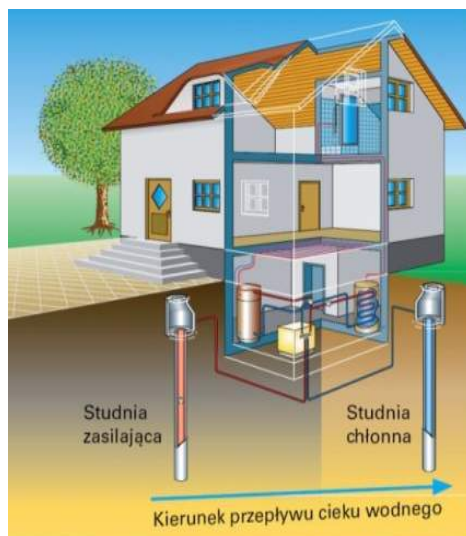


Rys. 8. Schemat pompy ciepła powietrze-woda  
[www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html]

## 5.3. Dolne źródło: woda

Pompy ciepła mogą pobierać ciepło z wody gruntowej lub ze zbiorników i cieków wodnych. Najczęściej jako dolne źródło wykorzystywana jest woda gruntowa. Ciepło z niej jest uzyskiwane za pomocą systemu dwóch lub więcej studni, w zależności od zapotrzebowania na ciepło. Jedna z nich jest zbiornikiem ciepłej wody (studnia zasilająca – czerpalna), natomiast pozostałe magazynują wodę schłodzoną (studnie chłonne – zrzutowe) (rys. 9).

Jeżeli dolnym źródłem ciepła jest woda powierzchniowa, to rozwiązanie to eliminuje obowiązek budowy studni. Pojawiają się jednak inne utrudnienia, m.in. konieczność instalacji filtrów oczyszczających wodę z zanieczyszczeń [www.instalacjebudowlane.pl].



Rys. 9. Schemat działania pompy ciepła woda-woda  
 [www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html]

## 6. PODSUMOWANIE

Budynki pasywne to obiekty, które mają bardzo niskie zapotrzebowanie na energię do ogrzewania (maksymalnie  $15 \text{ kWh}/(\text{m}^2 \cdot \text{rok})$ ), a komfort cieplny jest zagwarantowany głównie dzięki pasywnym źródłom ciepła: promieniowaniu słonecznemu, mieszkańcom, urządzeniom elektrycznym.

Istnieje wiele kryteriów, które należy uwzględnić przy wznoszeniu takich budynków. Należą do nich przede wszystkim minimalizowanie strat ciepła i powiększanie zysków energetycznych. Właściwe efekty uzyskuje się między innymi dzięki zastosowaniu odpowiednich urządzeń i konstrukcji do pozyskiwania energii z jej odnawialnych źródeł. Bez uwzględnienia takich rozwiązań nie powstanie żaden energooszczędny obiekt.

Spośród odnawialnych źródeł najczęściej wykorzystuje się energię promieniowania słonecznego. Jest ona pozyskiwana zarówno pasywnie (bezpośrednio do wnętrza budynku, bez dodatkowych urządzeń), jak i aktywnie (przy zastosowaniu kolektorów słonecznych lub systemów fotowoltaicznych). Innym przykładem wykorzystania OZE są pompy ciepła, pobierające energię z powietrza, wody lub gruntu.

Ze względu na konieczność racjonalnego gospodarowania zasobami energii budownictwo pasywne staje się coraz bardziej popularne, a redukcja emisji  $\text{CO}_2$  jest możliwa właśnie, dzięki zastosowaniu odnawialnych źródeł energii.

## LITERATURA

Dyrektywa EPBD (Energy Performance of Buildings Directive) 2002/91/EC Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej, z 16 grudnia 2002 r., dotycząca charakterystyki energetycznej budynków, 2002.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/31/UE z dnia 19 maja 2010 r. w sprawie charakterystyki energetycznej budynków, 2010.

Krajowa Agencja Poszanowania Energii S.A., 2012. Domy energooszczędne. Podręcznik dobrych praktyk. KAPE Warszawa.

Praca zbiorowa red. P. Klemma, 2006. Budownictwo ogólne. Tom 2. Fizyka budowli. Arkady Warszawa.

Ustawa z dnia 10 kwietnia 1997 roku – Prawo energetyczne, 1997. Dz.U. z 1997 r. Nr 54 poz. 348 z późn. zm..

<http://www.instalacjebudowlane.pl>

<http://www.instalacje-solarne.com.pl>

<http://www.hydraulika24.com.pl/pompy-ciepla.html>

<http://www.ogniwafotowoltaiczne.pl>

<http://www.pompyciepla.com>

<http://www.poradnik.sunage.pl>





# METODY UJAWNIANIA ŚLADÓW NA MIEJSCU ZDARZENIA DROGOWEGO

Andrzej Graczyk<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Na miejscu wypadku drogowego pojazdy pozostawiają ślady, dzięki którym możliwe jest ustalenie przebiegu oraz przyczyny zdarzenia drogowego. Na podstawie zabezpieczonych śladów współpracy ogumienia pojazdu z nawierzchnią bieżni z zakresu rekonstrukcji wypadków drogowych ustalają manewry podjęte przez kierujących pojazdami, miejsce wystąpienia stanu zagrożenia oraz prędkość pojazdu tuż przed wystąpieniem wypadku. Prawidłowe rozpoznanie śladów pozostawionych przez pojazdy i zabezpieczonych na miejscu wypadku oraz przeprowadzona na tej podstawie rekonstrukcja zdarzenia drogowego są niezbędne do poprawnej oceny materiału dowodowego zgromadzonego na potrzeby organów procesowych. Ustalają one bowiem sprawstwo za zaistniałe zdarzenie drogowe.

Obecnie w pojazdach samochodowych stosowane są układy bezpieczeństwa czynnego, które zapobiegają nadmiernemu poślizgowi kół zarówno w trakcie manewru hamowania, jak i przyspieszania. Koła nie zostawiają widocznych śladów na jezdni, przez co nie ma możliwości lub istnieje ograniczona możliwość identyfikacji w sposób organoleptyczny śladów współpracy ogumienia pojazdu z nawierzchnią drogi. W takiej sytuacji nie można przeprowadzić rekonstrukcji zdarzenia drogowego i wskazać przyczyny wystąpienia wypadku.

Prawidłowe rozpoznanie rodzaju śladów zabezpieczonych na miejscu zdarzenia drogowego oraz możliwość ustalenia intensyfikacji zjawiska fizycznego występującego w trakcie ich powstawania są niezbędne do przeprowadzenia jednoznacznej rekonstrukcji zdarzenia w sensie kryminalistycznym. Efektem końcowym takiej rekonstrukcji jest bowiem ekspertyza, która powinna jasno stwierdzać, co zawiodło w systemie człowiek – pojazd – otoczenie.

Celem badań było opracowanie metody wykrycia sensorycznie nierozpoznawalnych śladów współpracy ogumionego koła pojazdu z nawierzchnią asfaltową oraz na podstawie stwierdzonych śladów ustalenie intensywności hamowania pojazdu.

## 2. METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH

Badaniom poddano ślady kontaktu ogumienia pojazdu z asfaltową nawierzchnią jezdni.

Ustalono skład chemiczny oraz wykonano analizę widmową wyselekcjonowanych próbek nawierzchni asfaltowej. Przebadane grupy nawierzchni bitumicznych składały się z próbek, na których nie zabezpieczono żadnych śladów współpracy z kołem pojazdu oraz z grupy próbek, na których zabezpieczono organoleptycznie rozpoznawalne ślady hamowania pojazdu. Próbki charakteryzowały się różnym stopniem pokrycia sensorycznie rozpoznawalnymi śladami hamowania. W warunkach laboratoryjnych nanie-

---

<sup>1</sup> Politechnika Łódzka, Wydział Mechaniczny, Katedra Pojazdów i Podstaw Budowy Maszyn, ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź, e-mail: andrzej.graczyk@biegli.com

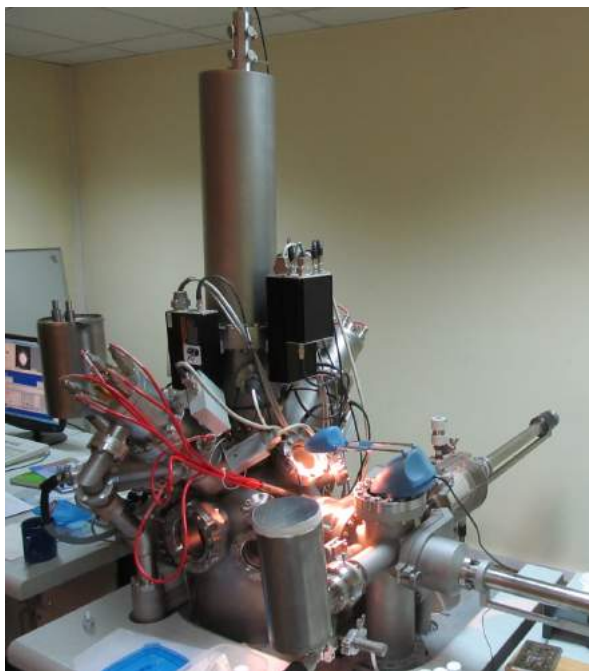
siono ślady ogumienia (tarcie opony o nawierzchnię bitumiczną) na przygotowane wycinki nawierzchni asfaltowej. Do wykonania śladów hamowania na próbkach nawierzchni asfaltowej wykorzystano bezdętkową oponę radialną, przeznaczoną do użytku w sezonie letnim dla pojazdów osobowych.

Wykonano trzy rodzaje badań nawierzchni bitumicznych:

- składu chemicznego cienkich warstw próbek rzędu kilku nm z wykorzystaniem urządzenia TOF.SIMS 4,
- składu chemicznego cienkich warstw próbek rzędu kilkuset  $\mu\text{m}$  z wykorzystaniem urządzenia LUV 266X,
- współczynnika odbicia promieniowania elektromagnetycznego (długości fali od 185 nm do 900 nm) na urządzeniu SPECORD M40.

Pierwsze dwa badania polegały na analizie składu chemicznego przygotowanych próbek przy wykorzystaniu spektrometrów masowych. Pozwoliło to na wyznaczenie bezwymiarowego stosunku masy atomowej do ładunku ( $m/z$ ), który zjonizował związek lub pierwiastek. Jest to bardzo istotne założenie, bowiem znajomość metody jonizacji umożliwia przeliczenie parametru ( $m/z$ ) na właściwą masę związku chemicznego lub pierwiastka.

Pierwszą serię badań wykonano za pomocą urządzenia TOF.SIMS 4 (rys. 1), służącego do spektrometrii masowej jonów wtórnych. Urządzenie to umożliwia analizę składu chemicznego powierzchni (cienkie warstwy rzędu kilku nm) ciał stałych.

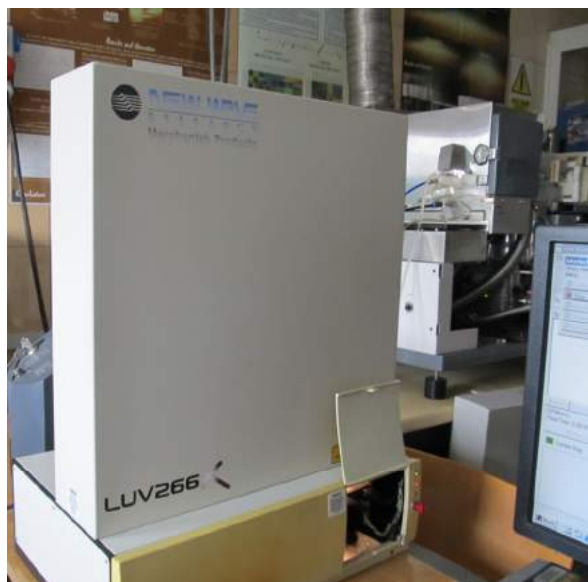


Rys. 1. Urządzenie TOF.SIMS 4 służące do spektroskopii masowej jonów wtórnych [opracowanie własne]

W urządzeniu tym powierzchnie próbek bombardowane są przez skoncentrowane jony promieni świetlnych. Dochodzi do uwolnienia z badanej powierzchni jonów nazywanych wtórnymi, które następnie są analizowane za pomocą spektroskopu masowego w celu określenia składu pierwiastkowego lub cząsteczkowego (badanej powierzchni próbki). Na temat spektroskopii masowej jonów wtórnych pisali między innymi: Cygański [1993], Kęcki [2013]. Producent wraz z urządzeniem TOF.SIMS 4 dostarczył system akwizycji danych. Do urządzenia podłączony jest komputer typu PC (mający odpowiednie oprogramowanie), dzięki temu możliwa jest akwizycja wyników badań oraz stosowna ich obróbka. Wyniki badań przedstawione są w postaci dwuwymiarowych wykresów – oś odciętych przedstawia stosunek masy atomowej do ładunku ( $m/z$ ), wykrytych pierwiastków i związków, natomiast na osi rzędnych odczytać można ilość wykrytych pierwiastków lub związków w trakcie wykonanej próby laboratoryjnej.

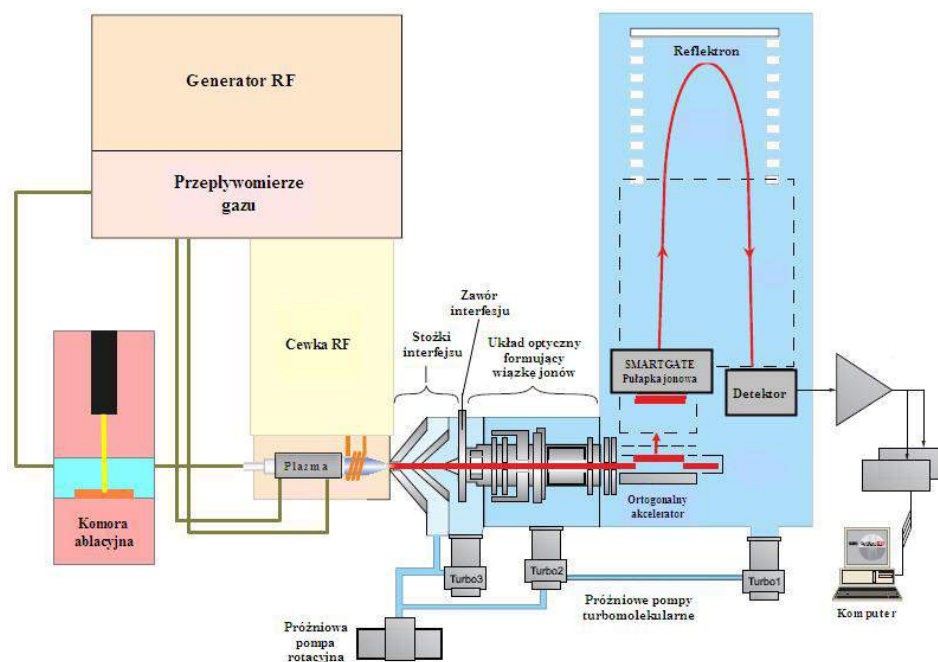
Kolejnym etapem pracy były badania wykonane przy użyciu urządzenia LUV 266X (rys. 2), wykorzystującego spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie z analizatorem czasu przelotu – układ LA ICP-TOF-MS z przystawką do ablacji laserowej LA. W tej części badań laboratoryjnych rozszerzono zakres badań; oprócz próbek nawierzchni asfaltowych tożsamyh z próbkami przebadanymi na urządzeniu TOF.SIMS 4 wprowadzono próbki wycinków warstwy ścierniczej opony samochodowej. Dodatkowa seria próbek pochodziła z bezdętkowej opony radialnej przeznaczonej do użytku w sezonie letnim (opona samochodu osobowego).

Urządzenie LUV 266X umożliwia analizę pierwiastkową powierzchni ciał stałych. Dzięki wykorzystaniu ablacji laserowej analizie zostały poddane warstwy próbek nawierzchni bitumicznej oraz materiału ścierniczej opony samochodowej do głębokości około 200  $\mu\text{m}$  (zbadano znaczne głębsze warstwy próbek w porównaniu z urządzeniem TOF.SIMS 4).



Rys. 2. Urządzenie LUV 266X służące do badania składu chemicznego powierzchni, wykorzystujące proces ablacji laserowej [opracowanie własne]

Termin „ablacja laserowa” jest używany ogólnie w celu opisania „wybuchowego” oddziaływania wiązki lasera z materiałem próbki. Oddziaływanie laser – materiał powoduje zamianę energii fotonu na energię elektronową, termiczną i mechaniczną na powierzchni próbki. Rezultatem takiego oddziaływania jest odparowanie i usunięcie materiału w postaci neutralnych atomów i molekuł, dodatnich i ujemnych jonów z wystawionej na to promieniowanie powierzchni ciała stałego. Mechanizm ablacji laserowej jest zdominowany przez dwa procesy w zależności od natężenia napromieniowania lasera: ablację (usunięcie) i parowanie. Schemat spektrometru LA ICP-TOF-MS przedstawiono na rysunku 3. Wysoka czułość tej metody pozwala na wykrycie większości pierwiastków układu okresowego w ilościach poniżej 1 µg/g. Tematykę dotyczącą działania urządzeń wykorzystujących ablację laserową przedstawiali między innymi: Cygański [1993] oraz Kęcki [2013].



Rys. 3. Schemat spektrometru LA ICP-TOF-MS [Szynkowska]

W wyniku oddziaływania wysokoenergetycznego strumienia lasera (natężenie napromieniowania może być większe od  $1 \times 10^{10}$  W/cm<sup>2</sup>) na powierzchnię próbki, stałe cząstki ulegają oderwaniu. Energia fotonów zostaje przekształcona w energię elektronową, termiczną i mechaniczną. Są one odpowiedzialne za odparowanie i usunięcie cząstek z powierzchni próbki wystawionej na działanie lasera, przez który zostaje utworzony krater o średnicy od kilkudziesięciu do kilkuset mikrometrów i głębokości 100-200 µm. Stałe cząstki przenoszone są w strumieniu gazu obojętnego (He lub Ar) do źródła wzbudzenia ICP, czyli do plazmy (o temperaturze ~10 000 K), gdzie ulegają jonizacji. Następnie trafiają przez interfejs do analizatora mas. Jest nim spektrometr mas czasu przelotu TOF.

W analizatorze czasu przelotu TOF rozdzielenie jonów zachodzi na skutek różnic w czasie potrzebnym do przelotu jonów od komory jonizacyjnej do detektora przez długą, wolną od pola rurę próżniową (rys. 3). Parametry techniczne oraz przebieg badania przy wykorzystaniu spektrometru LA ICP-TOF-MS opisali Cygański [1993] oraz Kęcki [2013]. Wynikiem przeprowadzonych analiz na urządzeniu LUV 266X są dwuwymiarowe wykresy przedstawiające widmo składu chemicznego badanych próbek.

Trzecim rodzajem badań były prace wykonane przy użyciu urządzenia SPECORD M40 (rys. 4).



Rys. 4. Urządzenie SPECORD M40 użyte do analizy widm emisyjnych odbitego promieniowania elektromagnetycznego [<http://www.medson.pl>]

Celem badań było wyznaczenie charakterystyk widmowych promieniowania elektromagnetycznego odbijanego przez badane próbki nawierzchni asfaltowych. Próby wykonano dla długości falowej w zakresie od 185 do 900 nm, ograniczenie to wynikało z zastosowanej aparatury badawczej. Analiza uzyskanych widm emisyjnych odbitego promieniowania elektromagnetycznego może posłużyć do określenia składu chemicznego badanych nawierzchni asfaltowych oraz ustalenia ilości odbitego promieniowania elektromagnetycznego od tych powierzchni. W trakcie badań wyznaczono również rodzaj promieniowania elektromagnetycznego, które cechowało się największym współczynnikiem odbicia od przygotowanych próbek asfaltowych.

### 3. WYNIKI PRZEPROWADZONCH BADAŃ

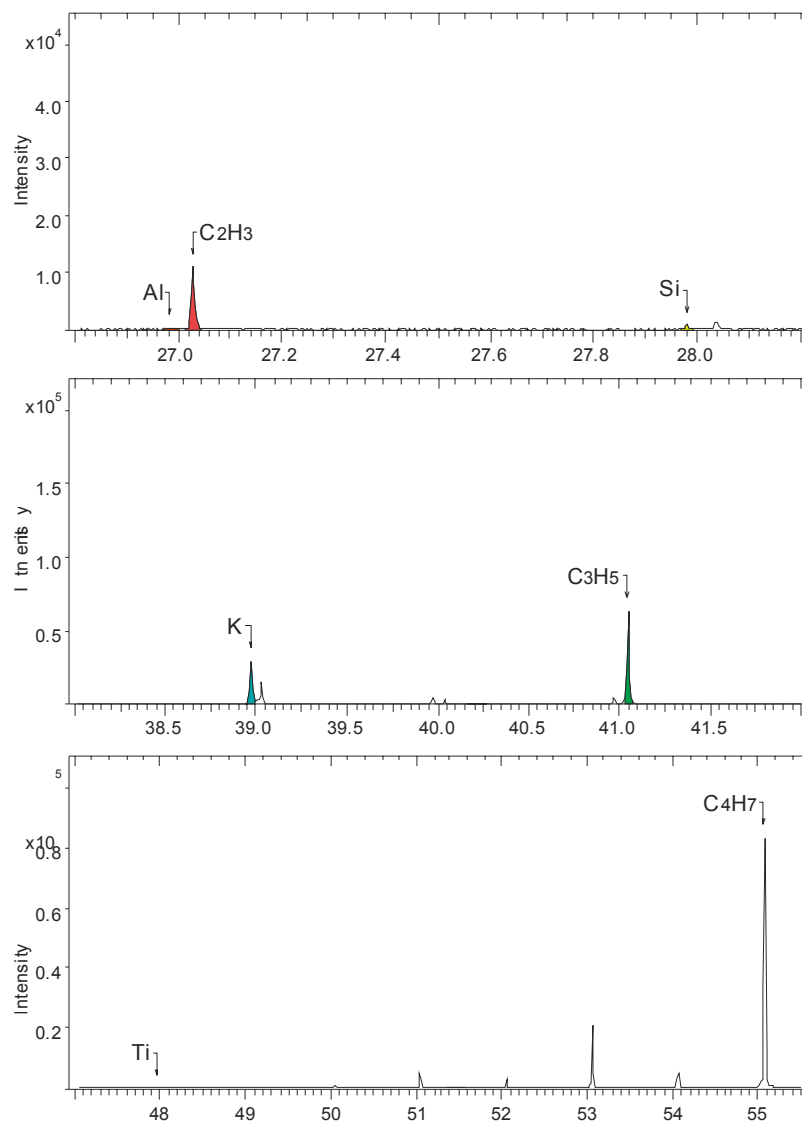
#### 3.1. Badania przeprowadzone na urządzeniu TOF.SIMS 4

Na rysunkach 5 i 6 przedstawiono wybrane wykresy opracowane na podstawie przeprowadzonych badań składu chemicznego przy zastosowaniu urządzenia TOF.SIMS 4. Wykresy przedstawiają pierwiastki i związki wykryte w strukturze powierzchniowej badanych próbek nawierzchni asfaltowych. Oś odciętych (x) wykresów opisuje stosunek ( $m/z$  – masy do ładunku) z wyznaczonymi pierwiastkami i związkami, na osi rzędnych (y) odczytać można ilość wykrytych pierwiastków i związków, która w danej próbce badawczej została wytracona z powierzchni próbki poddanej badaniu.

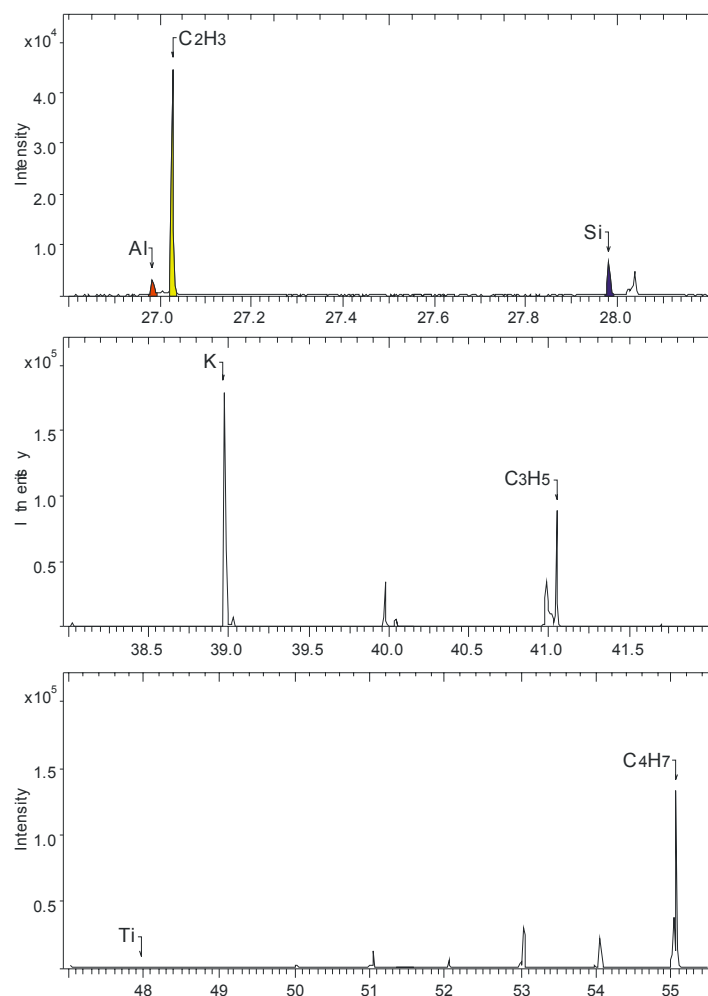
Przeprowadzone próby wykazały, że w warstwie wierzchniej badanych próbek występują takie pierwiastki, jak: aluminium, krzem, potas, tytan, żelazo, węgiel i wodór

oraz związki węglowodorowe. W artykule przedstawiono tylko część wykresów analizy wyników (rys. 5 i 6), zawierającej pierwiastki oraz związki chemiczne opisane parametrem  $m/z$  od ok. 27 do ok. 55.

Wykresy przedstawiają wyniki badań powierzchni kruszywa próbki asfaltowej, na której została naniesiona warstwa gumy z hamowanej opony samochodowej.



Rys. 5. Pierwiastki oraz związki wykryte na powierzchni próbki asfaltowej (śląd współpracy opony z nawierzchnią asfaltową, rozpoznawalny organoleptycznie)  
[opracowanie własne]



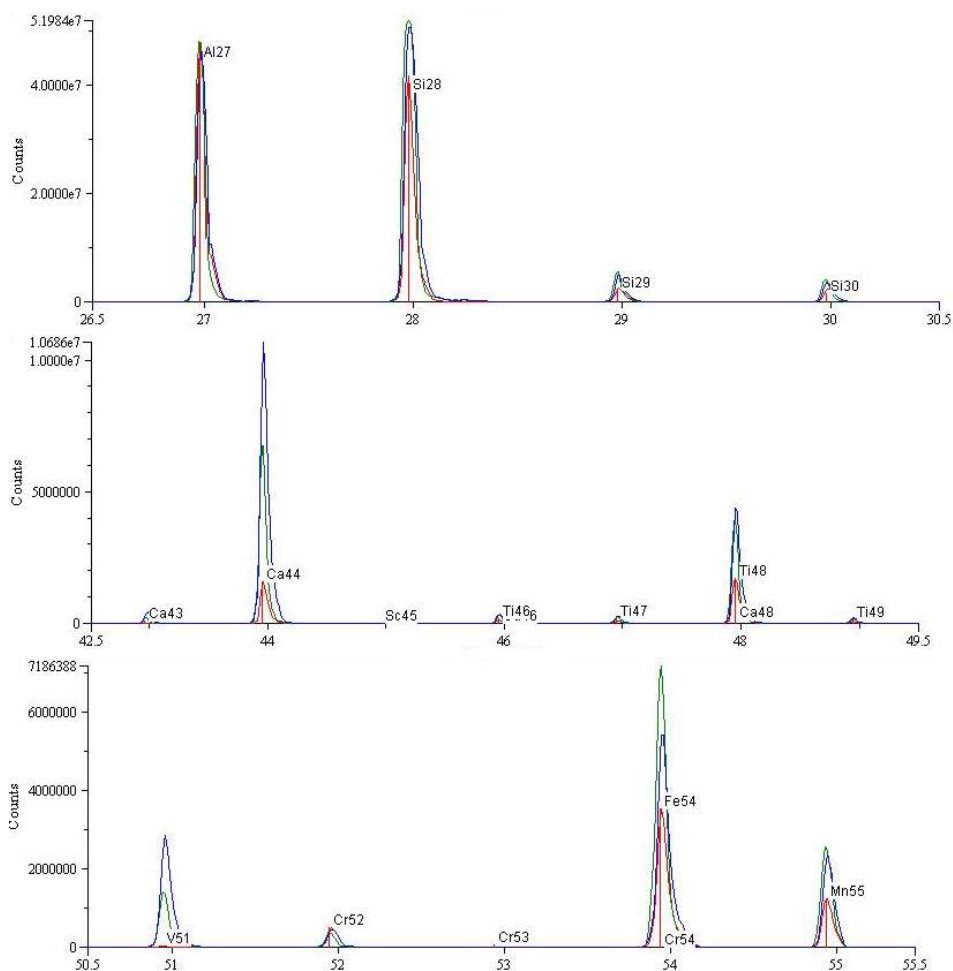
Rys. 6. Pierwiastki oraz związki wykryte na powierzchni próbki asfaltowej (brak śladów współpracy opony z nawierzchnią asfaltową) [opracowanie własne]

Wykresy przedstawiają wyniki badań powierzchni kruszywa próbki asfaltowej, na której nie zostały naniesione ślady hamowanej opony pojazdu. Przeprowadzone badania warstw wierzchnich (nanowarstwy) próbek nawierzchni asfaltowej, na których nie naniesiono śladów pochodzących od opony samochodowej oraz próbek z naniesionymi śladami opony samochodowej nie wykazały żadnych różnic w składzie chemicznym badanych powierzchni (rys. 5 i 6).

### 3.2. Badania przeprowadzone na urządzeniu LUV 266X

Na rysunku 7 przedstawiono wybrane wykresy opracowane na podstawie przeprowadzonych badań składu pierwiastkowego z zastosowaniem urządzenia LUV 266X wykorzystującego ablację laserową. Analogicznie do wyżej przedstawionych rysunków wykonano wykresy przedstawiające pierwiastki (izotopy pierwiastków) wykryte w stru-

kturze powierzchniowej badanych próbek nawierzchni asfaltowych oraz warstwy ścieralnej opony samochodowej. Oś odciętych (x) wykresów opisuje stosunek m/z oraz wyznaczone pierwiastki, na osi rzędnych (y) odczytać można ilość wykrytych pierwiastków. Przeprowadzone badania wykazały, że w warstwie wierzchniej badanych próbek występują takie pierwiastki, jak: aluminium, krzem, wapń, tytan, wanad, chrom, żelazo, mangan, kobalt, nikiel, cynk, miedź, ołów, rtęć czy magnez. W pracy przedstawiono tylko część wykresów analizy wyników (rys. 7), która zawiera atomy – parametr m/z od 26,5 do 55,5. Poniżej przedstawione wykresy zostały wykonane przy użyciu oprogramowania – *Fingerprint Optimass 9500*.



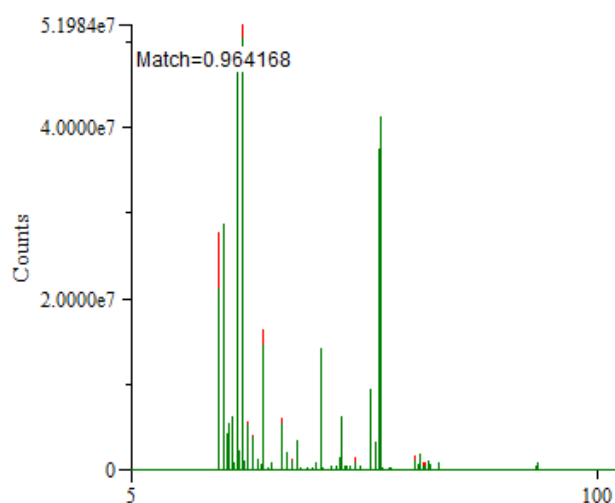
Rys. 7. Pierwiastki wykryte na powierzchni próbek asfaltowych oraz próbce ścieralnej warstwy opony samochodowej, kolor czerwony – opona samochodowa, kolor zielony – nawierzchnia asfaltowa (bez śladów opony), kolor niebieski – nawierzchnia asfaltowa z naniesionymi śladami opony [opracowanie własne]



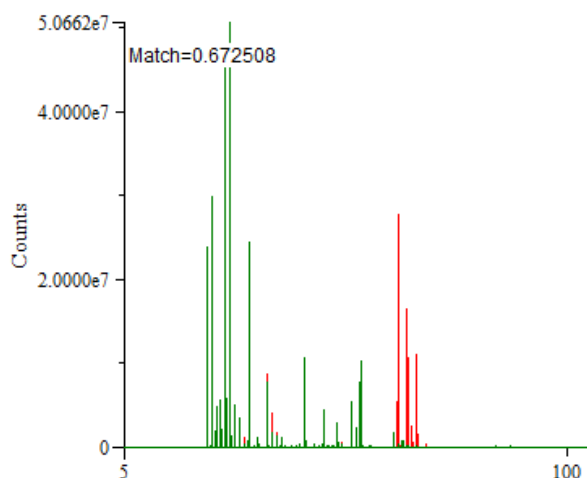
Na rysunku 7 w sposób wykreślony przedstawiono wyniki badań trzech próbek. Kolorem czerwonym oznaczono pierwiastki (izotopy pierwiastków), które wchodziły w skład warstwy ścieralnej opony samochodowej. Odpowiednio kolorami zielonym i niebieskim oznaczono pierwiastki (izotopy pierwiastków), które wchodziły w skład nawierzchni bitumicznej – bez naniesionych śladów opony oraz z naniesionymi śladami opony samochodowej. Badania przeprowadzone na spektrometrze masowym wykorzystującym ablację laserową (głębokość badanej powierzchni dochodząca do ok. 200  $\mu\text{m}$ ) dały podobne wyniki do uzyskanych przy badaniach wykonanych na urządzeniu TOF.SIMS 4. Wykazano ponadto, że warstwa ścieralna opony samochodowej ma taki sam skład izotopowy co przebadane próbki nawierzchni asfaltowych.

Jedyną różnicę, jakie wykazano w trakcie analizy wyników, dotyczą ilości pierwiastków występujących w badanych próbkach. Zauważono, że różnice w ilości pierwiastków w poszczególnych próbkach nawierzchni asfaltowych nie są tak znaczne jak w przypadku porównania ilości pierwiastków występujących w warstwie ścieralnej opony samochodowej z nawierzchnią bitumiczną (rys. 7).

Przy wykorzystaniu oprogramowania – *Fingerprint Optimass 9500* wykonano analizę porównawczą widm uzyskanych dla badanych próbek. Wyżej wymienione oprogramowanie umożliwia zestawienie widm masowych w zakresie od 6 do 260 m/z (oś x) bądź wybranych fragmentów podanego zakresu i określenia między nimi korelacji – współczynnik pokrycia widm masowych – nazywany inaczej współczynnikiem dopasowania (ang. *match*). Współczynnik może przybierać wartości w zakresie 0-1 (tj. 0-100%). Na rysunkach 8 oraz 9 przedstawiono wykresy korelacji widm masowych wykrytych w trakcie badań pierwiastków.



Rys. 8. Współczynnik dopasowania, widma masowego próbki nawierzchni asfaltowej bez śladów opony samochodowej (kolor czerwony) oraz widma masowego próbki nawierzchni asfaltowej – z widocznymi śladami współpracy z oponą samochodową (kolor zielony) [opracowanie własne]



Rys. 9. Współczynnik dopasowania, widma masowego próbki opony samochodowej (kolor czerwony) oraz widma masowego próbki nawierzchni asfaltowej – bez śladów współpracy z oponą samochodową (kolor zielony) [opracowanie własne]

Na podstawie analizy wykresu przedstawionego na rysunku 8 stwierdzono, że w próbkach nawierzchni asfaltowej (bez śladów opony samochodowej oraz ze śladami opony samochodowej) nie ma żadnej istotnej różnicy w ilości występowania poszczególnych pierwiastków – współczynnik dopasowania wynosił 0,96. Korelacja dla innych próbek – różne rodzaje nawierzchni bitumicznej (w tej samej konfiguracji – porównana próbka nawierzchni asfaltowej bez śladów oraz ze śladami opony samochodowej) była na wysokim poziomie, współczynnik dopasowania widm składu pierwiastkowego wynosił od 0,92 do 0,98. Korelacja widm przedstawionych na wykresie rysunku 6 wykazała, że w warstwie ścieralnej badanej opony samochodowej występuje kilkakrotnie większa zawartość izotopów cynku (trzy czerwone piki – wykres nr 6, stosunek ładunku do masy  $m/z$  odpowiednio 64, 66 i 68) w porównaniu z dowolną badaną próbką nawierzchni asfaltowej. Współczynnik dopasowania dla porównanych widm na wykresie (rys. 6) wynosi 0,67.

### 3.3. Badania przeprowadzone na urządzeniu SPECORD M40

W pracy nie przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na spektrometrze SPECORD M40. Dane uzyskane podczas badania odbitych fal promieniowania elektromagnetycznego są w trakcie analizy oraz obróbki związanej z ich graficzną prezentacją. Wstępna analiza wykazała, iż emisyjności próbek asfaltowych poddanych badaniom spektrometrycznym różnią się i są uzależnione od stopnia pokrycia widocznymi śladami pochodzącymi od opony samochodowej oraz rodzaju odbijanej fali elektromagnetycznej.

## 4. PODSUMOWANIE

Analiza wyników badań związanych z określeniem składu chemicznego nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi próbkami nawierzchni asfaltowej bez śladów

ogumienia a nawierzchnią z naniesionymi śladami ogumienia. Każda z przebadanych próbek nawierzchni bitumicznych (kilka rodzajów nawierzchni asfaltowych oraz próbki z zabezpieczonymi śladami pochodzącymi od opony samochodowej bądź próbki bez takich śladów) miała taki sam skład chemiczny. Badania przeprowadzone na spektrometrach masowych pozwoliły jedynie na wykrycie niewielkich różnic związanych z ilością występowania danego pierwiastka lub związku chemicznego w poszczególnych próbkach nawierzchni asfaltowej. Dodatkowo należy podkreślić, że w dotychczas przeprowadzonych próbach laboratoryjnych zbadano próbki nawierzchni asfaltowych, na których występowały widoczne organoleptycznie ślady pochodzące od opony samochodowej. W związku z powyższym należy uznać, że próba opracowania metody wykrywania niewidocznych śladów współpracy ogumienia pojazdu z nawierzchnią asfaltową przy wykorzystaniu metod chemicznej oceny składu powierzchni jest przedsięwzięciem wysokiego ryzyka i może okazać się niemożliwa.

Na podstawie analizy wyników ustalono, że powierzchnie badanych próbek nawierzchni asfaltowych cechują się różną emisyjnością promieniowania odbitego; jest ona zależna od stopnia pokrycia asfaltowej próbki widocznymi śladami hamowania koła pojazdu. Ustalono ponadto pasmo promieniowania – zakres podczerwieni (około 800 nm), dla którego występuje wzmożone odbicie fali elektromagnetycznej.

Obecnie prowadzone są analizy zjawisk towarzyszących odbiciu i pochłanianiu fal elektromagnetycznych oraz dotyczące rozpoznania sposobów filtrowania fal elektromagnetycznych w postaci światła widzialnego. Zaplanowano również kolejny etap prac laboratoryjnych; zostaną wykonane badania odbicia fali elektromagnetycznej (o zróżnicowanych częstotliwości) od próbek nawierzchni asfaltowych, na których pojazdy samochodowe hamowały w sposób gwałtowny, lecz ślady rozpoznane sensorycznie nie zostały zabezpieczone.

## LITERATURA

Cygański A., 1993. Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. WNT Warszawa.

Kęcki Z., 2013 Podstawy spektroskopii molekularnej. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.

Szynkowska M., Badanie składu pierwiastkowego tonerów metodą LA-ICP-TOF-MS. Instrukcja do laboratorium chemii sądowej, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej – Politechnika Łódzka.

<http://www.medson.pl>



# **ALTERNATYWNE ROZWIĄZANIE KOPUŁY SUFITU RUCHOMEGO WIELOFUNKCYJNEJ SALI KONCERTOWEJ**

**Agnieszka Grzybowska<sup>1</sup>**

## **1. WPROWADZENIE**

W pracy przedstawiono rozwiązania architektoniczne wielofunkcyjnej sali koncertowej usytuowanej w Toruniu, a w szczególności kopuły sufitu ruchomego budynku oznaczonego w projekcie wykonawczym jako M3. W związku z założeniami poczynionymi na poziomie projektu architektonicznego sali koncertowej, zakładającymi dostosowanie funkcji obiektu do potrzeb koncertów symfonicznych, opery, teatru, musicali, konferencji, projekcji kinowych oraz telewizyjnych, należało spełnić odpowiednie wymagania akustyczne dotyczące czasu pogłosu. Skutecznym i możliwym do zrealizowania w przypadku wielofunkcyjnej sali koncertowej sposobem na uzyskanie adekwatnego do wydarzenia czasu pogłosu jest zmiana kubatury. W głównej sali koncertowej przyjęto rozwiązanie polegające na wprowadzeniu do geometrii sufitu pięciu ruchomych elementów o znaczących wymiarach. Mobilny sufit głównej sali koncertowej wykreowano jako ustrój pięciu elementów o złożonej geometrii przestrzennej, których element nośny stanowią stalowe przestrzenne kratownice. W pracy przedstawiono inny wariant jednej z kopuł sufitu ruchomego niż przyjęty w projekcie wykonawczym wielofunkcyjnej sali koncertowej. Sala koncertowa jest obecnie w fazie realizacji.

## **2. CHARAKTERYSTYKA BUDYNKU SALI KONCERTOWEJ**

Projekt wykonawczy wielofunkcyjnej sali koncertowej stanowi rozwinięcie idei utworzonej na potrzeby konkursu architektonicznego ogłoszonego przez Miasto Toruń w 2008 roku. Dotyczył on zagospodarowania zdewastowanej dzielnicy Torunia „Jordanki” na cele kulturalno-kongresowe. Przedstawiono wówczas wizję bryły zatopionej w zieleni, nawiązującej pod względem kolorystyki oraz faktury do gotyckiej zabudowy Torunia (wizualizację przedstawiono na rysunku 1). Oczekiwania środowisk kulturalnych oraz negocjacje prowadzone pomiędzy inwestorem – Gminą Miasta Toruń – a projektantem zdeterminowały ostateczny profil sali, która łączy w sobie funkcje: koncertową, teatralną, kongresową, filmową, targową i plenerową. Utworzenie projektu tak monumentalnej i wyjątkowej konstrukcji wymagało od projektantów zastosowania innowacyjnych rozwiązań technologicznych i konstrukcyjnych. Wielorakość funkcji, które łączy w sobie sala, sprawia, iż obiekt ten jest unikalny i nowoczesny, dzięki czemu będzie kulturalną chlubą regionu kujawsko-pomorskiego i przyczyni się do rewitalizacji Torunia.

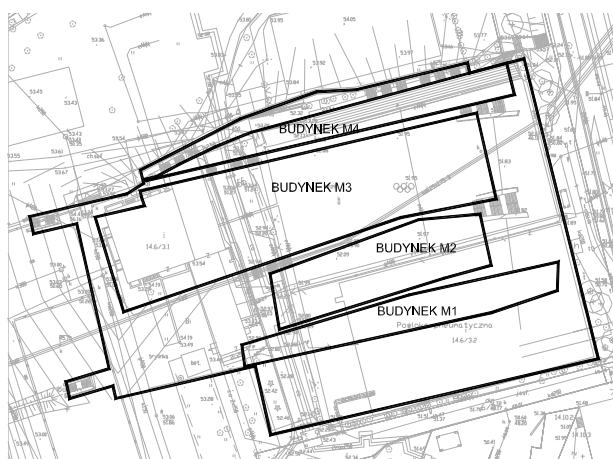
---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska, Katedra Konstrukcji Budowlanych, ul. prof. S. Kaliskiego 7, 85-769 Bydgoszcz, e-mail: grzybowska.utp@gmail.com



Rys. 1. Wizualizacja Sali [Pulajew]

W ujęciu architektonicznym zaprojektowana wielofunkcyjna sala koncertowa jest obiektem, który można zaadaptować do różnego typu wydarzeń kulturowych oraz zmiennej liczby widzów. Forma obiektu jest unikalna, a jego projekt zdobył prestiżową nagrodę w kategorii Kulturalne Projekty Przyszłości na Festiwalu Architektury Światowej (WAF – *World Architecture Festival*). Rozmieszczenie w planie zaprezentowano na rysunku 2.



Rys. 2. Rozmieszczenie modułów w planie [Pulajew]

Konstrukcję budynku w przeważającej części zaprojektowano jako żelbetową monolityczną, natomiast konstrukcję dachu przewidziano jako stalową. Zastosowano następujące rozwiązania materiałowe:

- ściany szczelinowe wykonane z betonu klasy C35/45 o wodoszczelności W8 i mrozoodporności F100;
- ściany zewnętrzne poniżej poziomu +0,00, płyta fundamentowa, podwaliny wykonane z betonu klasy C30/35 o wodoszczelności W8 i mrozoodporności F100;
- konstrukcje żelbetowe wewnątrz budynku wykonane z betonu klasy C30/37 o wodoszczelności W4;

- podkład betonowy wyrównawczy pod płytę fundamentową z betonu klasy C10/12;
- ściany działowe betonowe z betonu klasy C20/25 o wodoszczelności W4;
- ściany wewnętrzne działowe murowane – gazobeton odm. 600 na zapr. M5;
- stal zbrojeniowa A III N;
- stal konstrukcyjna klasy S355, S235 – zastosowano profile walcowane;
- materiały budowlane oznakowane znakiem B lub CE posiadające atesty i certyfikaty Instytutu Techniki Budowlanej.

Ze względu na charakter pracy statycznej z konstrukcji wyodrębniono dwie zasadnicze części: nadziemną oraz podziemną. Każda z nich pełni inne funkcje w przenoszeniu obciążeń, stąd też nieco inny charakter przybierają zastosowane w nich rozwiązania konstrukcyjne, a także wymagania programu funkcjonalno-użytkowego całości obiektu. Stropy przewidziano jako żelbetowy, monolityczny układ płyt krzyżowo zbrojonych opartych na słupach, ścianach oraz tarczach o zróżnicowanej wielkości i grubości w zależności od rozpiętości i wielkości obciążenia. Założono wykonywanie elementów belkowych łącznie ze stropami, nie dopuszczając do przerwy technologicznej na styku belki i płyty stropowej. Wobec przedstawionych powyżej założeń stwierdzono, iż zgodnie z tablicą 29 PN-B-03264, według której wykonano projekt pierwotny, stropy monolityczne oraz wewnętrzne ściany żelbetowe należy betonować maksymalnie piętnastometrowymi odcinkami, wykorzystując mieszankę betonową z ograniczoną ilością skurczu. Jako pokrycie dachowe budynków M1, M2 oraz M3 zaprojektowano jednopółaciowe dachy stalowe, natomiast nad budynkiem M4 stropodach żelbetowy. Dla modułu M1 przewidziano pełnościennie dźwigary podparte na ścianach podłużnych. W modułach M2 oraz M3 konstrukcją główną są stalowe dźwigary kratowe, podparte na ścianach podłużnych, współpracujące z płattami pełnościennymi. Ponadto w budynku M3 zdublowano dźwigary ze względu na występowanie sufitu ruchomego. Mocowanie do podpór będzie realizowane za pomocą połączeń śrubowych. Elementy konstrukcyjne rozróżniono pod względem następujących klas:

- klasa 1: dźwigary dachowe, które będą przenosiły obciążenia od sufitu ruchomego, belki i rygle podtrzymujące wciągarki;
- klasa 2: pozostałe dźwigary, płatwie, główne konstrukcje pomostów technicznych;
- klasa 3: podkonstrukcja picado, pomosty techniczne i inne.

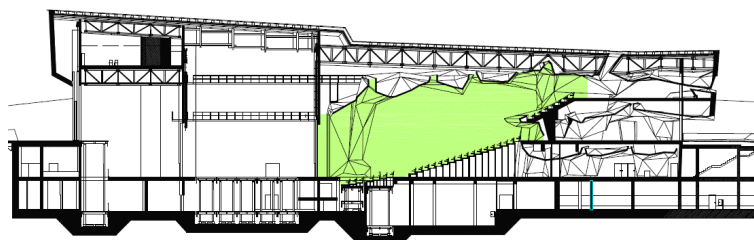
Zaprojektowano bezpośrednie posadowienie obiektu, poniżej zwierciadła wody gruntowej, w postaci płyty fundamentowej na poziomie -6,025 (41,35 m n.p.m.).

### 3. PIERWOTNE ROZWIĄZANIE PROJEKTOWE

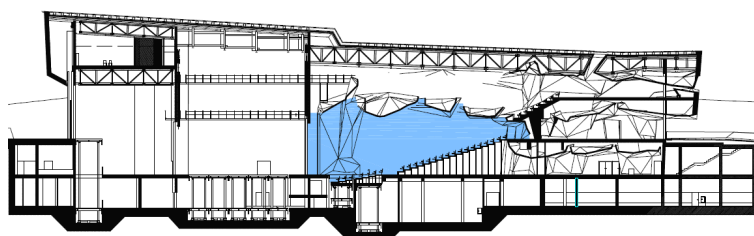
W związku z założeniami poczynionymi na poziomie projektu architektonicznego wielofunkcyjnej sali koncertowej w Toruniu, zakładającymi dostosowanie funkcji obiektu do potrzeb różnych wydarzeń, należało spełnić odpowiednie wymagania akustyczne. Dotyczyły one czasu pogłosu [Szudrowicz 2005], a pożądanym jest w tym przypadku osiągnięcie przedziału między 1,0 a 1,8 s, co można zrealizować przez zmianę wewnętrznej kubatury głównej sali koncertowej (zlokalizowanej w budynku M3 wielofunkcyjnej sali koncertowej). Takie rozwiązanie umożliwia zmienianie kubatury nawet o 30% w zależności od wymagań użytkowych. Oznacza to zakres zmian od 5,500 m<sup>3</sup> do

8,200 m<sup>3</sup>. Na rysunkach 2 oraz 3 zaprezentowano pozycje ekstremalne sufitów ruchomych głównej sali koncertowej.

a)



b)

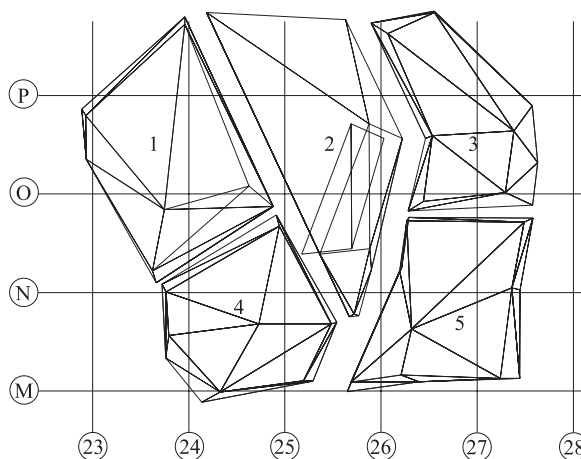


Rys. 3. Widok sufitu w pozycji maksymalnie: a) podniesionej i b) opuszczonej [Pulajew]

Zaletą tego rozwiązania jest to, iż wówczas w minimalnym stopniu oddziałuje na jakość dźwięku w sali, natomiast jako wadę można uznać wysoki koszt i poziom skomplikowania systemów umożliwiających realizację założenia. Przyjęto rozwiązanie polegające na wprowadzeniu do geometrii sufitu pięciu ruchomych elementów o znaczących wymiarach, co zaprezentowano na rysunku 4. Mobilny sufit głównej sali koncertowej wykreowano jako ustrój pięciu elementów (przedstawionych na rysunku 4) o złożonej geometrii przestrzennej, składający się z płaszczyzn w kształcie trójkątów, ruchomych dzięki zdalnie sterowanemu systemowi. Powstałe bryły mocowane będą do konstrukcji stalowej, wykreowanej z przestrzennego układu kratownic podwieszonych do głównych belek dachowych (opisanych powyżej), stanowiącej część nośną całej konstrukcji. Skomplikowanie geometryczne konstrukcji kopuł sufitu ruchomego sprawia, iż trudne jest stworzenie jednoznacznych i wystarczająco dokładnych rysunków ilustrujących poszczególne elementy. Jako obudowę ścian i sufitów przewidziano konglomerat (całość będąca połączeniem różnorodnych elementów) żelbetowo-ceglany, który stanowi wykończenie architektoniczne, nie biorąc udziału w pracy konstrukcji. Rozwiązanie to jest prototypowe i w ostatecznej wersji okładzina sufitu ruchomego głównej sali koncertowej przewidziana została w postaci płyty żelbetowej grubości 6 cm, natomiast nośna konstrukcja to przestrzenne kratownice stalowe, do których zaprojektowano użyto profili: IPE 140 ze stali S355, ROHR101.6x4 ze stali S235, ROHR48.3x3.6 ze stali S235, FL150x20 ze stali S235, BL20x150 ze stali S235. Schemat rozmieszczenia kratownic oraz widok jednej z nich przedstawiono na rysunkach 4 oraz 5. Rozpatrywanie konstrukcji możliwe jest jedynie w połączeniu z modelem trójwymiarowym, stworzonym



przez projektanta modelu 3D, który jest znacznym ułatwieniem podczas przesyłania danych do wycinarek numerycznych.

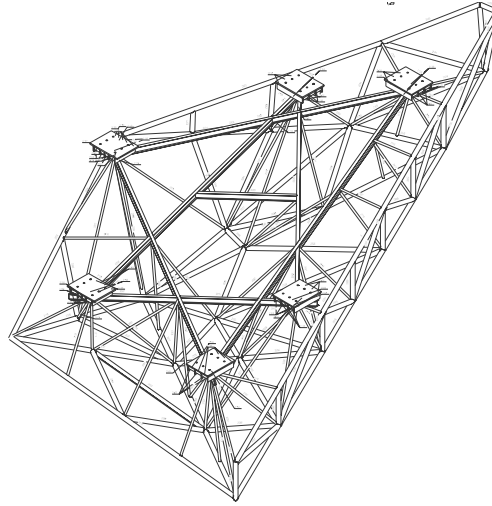


Rys. 4. Rozmieszczenie kopuł sufitu ruchomego [Pulajew]

Mobilność sufitom zapewniają zamontowane do konstrukcji dźwigarów dachowych wciągarki mające możliwość aretacji, czyli unieruchomienia sufitu w założonej konfiguracji. Każda kopuła jest podnoszona przez sześć (bądź pięć) wciągarek elektro-mechanicznych, które spełniają wszystkie normy bezpieczeństwa obowiązujące w Unii Europejskiej [EN 1570:1998, DIN 56950:2003, EN ISO 12100-1:2003, EN ISO 13849-1:2003, EN ISO 13850:2006, EN 12385, DIN 56955]. Ich rozmieszczenie na stropie technicznym jest realizowane tak, aby obciążenia w punktach kotwienia względem środka ciężkości sufitu ruchomego nie przekraczały obciążeń projektowych wciągarki. Wymusza to uzyskanie w tych punktach jednakowych reakcji. Każdy ruchomy element (kopuła) jest dodatkowo wyposażony w trzy urządzenia ryglujące, które podwyższają bezpieczeństwo sufitów. Mechanizm ryglujący mocuje kopułę w określonych pozycjach, a umiejscowienie punktów mocowań sufitu, nawet w przypadku niezadziałania jednego z nich, nie stwarza zagrożenia stabilności sufitu. Dalszym rozważaniem poddano kopułę numer 2, zaprezentowaną na rysunku 5. Reakcje w punktach mocowań kopuły wynoszą ok. 170 kN.

Ruchome kopuły wielofunkcyjnej sali koncertowej stanowią element determinujący elastyczność przestrzeni w głównej sali koncertowej, tak aby była dostosowana do potrzeb wydarzenia kulturalnego odbywającego się wewnątrz. Można wówczas dostosowywać liczbę widzów od 500 do 900 oraz zmieniać kubaturę, by odpowiadała wymaganiom akustycznym zróżnicowanym dla poszczególnych wydarzeń kulturalnych.

Warstwa wykończeniowa w początkowej fazie projektu była zdefiniowana jako konglomerat żelbetowo-ceglany, jednak idea ta uległa ewolucji. W fazie ostatecznej okładzinę określono jako sześciocentymetrową warstwę z betonu architektonicznego, natomiast dla elementów stałych sufitu pozostała w postaci konglomeratu żelbetowo-ceglanego. Element ten niewątpliwie oddziałuje na komfort i bezpieczeństwo użytkownika obiektu.



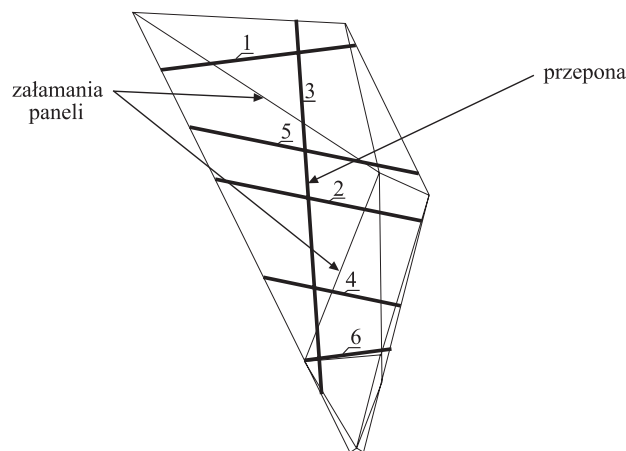
Rys. 5. Widok kopuły numer 2 zamodelowanej w 3D [Pulajew]

#### 4. PROJEKT KONSTRUKCYJNY KOPUŁY ŻELBETOWEJ NUMER 2 WEDŁUG EUROKODU 2

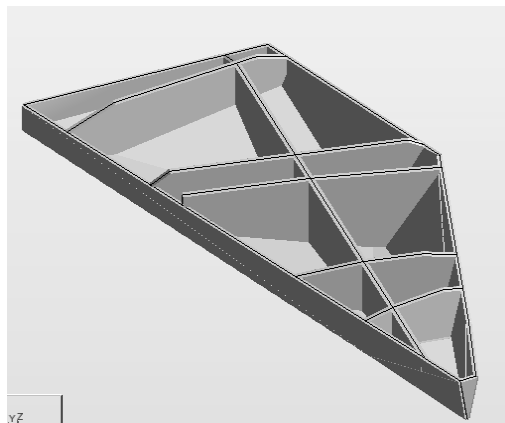
Do projektowania przyjęto beton C35/45 oraz stal EPSTAL B500SP (klasa C), zgodnie z PN-1992-1-1 [2008]. Na podstawie projektu wykonawczego wielofunkcyjnej sali koncertowej w Toruniu [Szudrowicz 2005] stwierdzono, iż determinującym obciążeniem projektowanej kopuły żelbetowej będzie ciężar własny. Obciążenie konstrukcji zwiększono ponadto dodatkowo o  $0,5 \text{ kN}\cdot\text{m}^{-2}$  ze względu na aspekty technologiczne (ciężar instalacji, podesty technologiczne). Jako obciążenia wyjątkowe przewidziano natomiast zerwanie jednej z lin wciągarek.

W pierwszej kolejności określono lokalizację w przestrzeni poszczególnych węzłów kopuły, na podstawie istniejącego projektu architektonicznego. Ponieważ podpory nie były zlokalizowane na obwodzie konstrukcji, lecz w wybranych punktach montażu wciągarek, dlatego konieczne było wprowadzenie do ustroju dodatkowych elementów umożliwiających montaż podpór. Jako rozwiązanie tej kwestii przewidziano wprowadzenie przepon pionowych, połączonych z okładziną (panelami). Założono układ przepon przedstawiony na rysunku 6.

Przepony umożliwiają podparcie konstrukcji. Wyznaczenia płaszczyzn paneli i przepon dokonano na podstawie trzech punktów. Wykorzystując ogólne równanie płaszczyzny, stworzono w Microsoft Excel tablice umożliwiające obliczenie współczynników równań płaszczyzn przepon oraz paneli. Jako kolejny etap przyjęto określenie współrzędnych punktów, w których poszczególne przepony przenikają miejsca schodzenia się paneli. Szukany punkt będzie stanowił punkt wspólny trzech płaszczyzn i jednocześnie naroża przepon. Punkty określono na przecięciu się płaszczyzn przepon z panelami (łącznie wyznaczono ich 33). Na rysunku 7 przedstawiono widok konstrukcji z wprowadzonymi ściankami.



Rys. 6. Lokalizacja przepon



Rys. 7. Widok przepon

Oprócz umożliwienia podparcia konstrukcji przepony pełnią również bardzo ważną funkcję polegającą na zapewnieniu sztywności przestrzennej całości ustroju kopuły. Po wymodelowaniu przepon przystąpiono do definiowania podpór punktowych. Utworzenie symulacji zerwania lin dla każdej z wciągarek polegało na rozpatrywaniu zagadnienia dynamicznego za pomocą rozwiązań statycznych. W miejscu zerwania linii wciągarki do odpowiedniej przepony przyłożono reakcję powstałą w tym punkcie o tej samej wartości, lecz z przeciwnym zwrotem. Aby w takim przypadku reakcje działające na poszczególne wciągarki nie odbiegały od siebie, wyważono kopułę poprzez wprowadzenie sił skupionych stanowiących dodatkowy balast. Wartości reakcji charakterystycznych otrzymanych w ten sposób nie odbiegają od siebie o 20%. Siatkę elementów skończonych wygenerowano korzystając z opcji siatkowania prostego Coons'a (trójkątnego). Otrzymane siły potraktowano jako miarodajne do projektowania konstrukcji. W celu utworzenia nowego projektu dokonano następujących założeń:

- grubość paneli i przepon: 0,10 m;
- średnica zbrojenia: 8 mm;

- klasa ekspozycji wg PN-EN 1992-1-1 [2008]: X0 – konstrukcja znajduje się wewnątrz obiektu, stąd otulina 20 mm.

Przystępując do analizy stanów granicznych nośności, na podstawie otrzymanych z obliczeń statycznych wyników zidentyfikowano, w jakiej fazie pracuje element żelbetowy. W tym celu dokonano sprawdzenia warunku interakcyjnego. Jeśli warunek ten jest spełniony, wówczas element pracuje w fazie pierwszej – jako niezarysowany. Jeśli natomiast powstałe naprężenia przekraczają wytrzymałość betonu na rozciąganie, element będzie pracował w fazie drugiej i wymiarowanie zbrojenia sprowadzi się do projektowania elementu mimośrodowo rozciąganego. Przypadek rozciągania poddano szczegółowej analizie i wyznaczono warunki interakcyjne dla wszystkich paneli w układach lokalnych, dla kierunku x (normalna panela) oraz dla kierunku y (prostopadła do normalnej panela). Zbrojenie w większości paneli przyjęto w rozstawie 5 cm, natomiast w przeponach, ze względu na ich wyteżenie, w rozstawie 3 cm. Tak jak się spodziewano, przepony żelbetowe przejęły siły z okładziny żelbetowej, jednocześnie odciążając ją. Procedurę sprawdzenia nośności na ścinanie wykonano według normy PN-EN 1992-1-1 [2008]. Sprawdzenia dokonano w miejscu występowania największej siły poprzecznej na kierunku y, ze względu na mniejszą wysokość użyteczną.

Przy wyznaczaniu stanów granicznych użyteczności stwierdzono, że:

- dopuszczalna szerokość rys, dla panelu najbardziej wyteżonego, nie została przekroczona, gdyż:

$$w_k = s_{r,max} (\epsilon_s - \epsilon_{cm}) = 0,257 \text{ [mm]} < w_{max} = 0,4 \text{ [mm]}$$

gdzie:

- $w_k$  – szerokość rys,
- $s_{r,max}$  – maksymalny rozstaw rys,
- $\epsilon_{sm}$  – średnie odkształcenie zbrojenia,
- $\epsilon_{cm}$  – średnie odkształcenie betonu pomiędzy rysami,
- $w_{max}$  – graniczna szerokość rys, dobrana zgodnie z tablicą 7,1N [PN-EN 1992-1-1 2008]

- maksymalne ugięcie konstrukcji nie przekracza 5 mm.

Obliczenia kotwienia zbrojenia podłużnego wykonano według normy PN-EN 1992-1-1 [2008], otrzymując wartość 23 cm, a ostatecznie przyjęto jako długość zakotwienia prętów 25 cm.

Po wykonaniu kalkulacji zbrojenia dla wyników odczytanych z programu, stwierdzono, iż w miejscu największego rozciągania jednej z przepon siła jest nieprawdopodobnie duża i dlatego przypadek ten rozpatrzono ponownie.

Po zmianie siatkowania jednego panelu wyniki okazały się być korzystniejsze, a spiętrzenie naprężeń wyraźnie punktowe, co sugeruje niedokładność modelu MES programu Robot dla zastosowanej siatki elementów skończonych. Przy zmianie siatki dla całości konstrukcji wyniki są ewidentnie błędne, a różnice (pomiędzy przypadkami, gdzie zmieniono siatkowanie dla rozpatrywanego panela) sięgają nawet 1000%.

Aby nie odrzucać wyników, zbrojenie zaprojektowano na siłę rozciągającą, kierując się aspektami bezpieczeństwa. Ostatecznie zbrojenie przyjęto tak, aby spełnione były stany graniczne nośności oraz użyteczności. Ponieważ norma prezentuje przykłady ugięcia dla typowych elementów żelbetowych, nie można dokonać porównania przemieszczeń odczytanych z programu Robot z wartością normową. Ugięcie konstrukcji w najbardziej ekstremalnym przypadku sięga 5 mm. Norma prezentuje przykłady ugię-

cia dla typowych elementów żelbetowych, dlatego nie można dokonać porównania przemieszczeń odczytanych z programu Robot z wartością normową. Wartość rzeczywistą ugięcia uznano za akceptowalną ze względu na komfort użytkowania oraz estetykę konstrukcji. Ze względu na nietypowy kształt konstrukcji zaleca się betonowanie konstrukcji metodą torkretowania „na mokro” [Instrukcja ITB... 1991], polegającą na dynamicznym natryskiwaniu masy betonowej za pomocą sprężonego powietrza. Charakteryzuje się ona umożliwieniem ujednoczenia mieszanki przy jej stałej konsystencji oraz szacunkowo mniejszymi stratami w porównaniu z tradycyjnymi metodami betonowania oraz wskaźnikiem w/c równym 0,4. W przypadku betonu wykonanego tą metodą uzyskuje się polepszenie wodoszczelności, ognioodporności oraz przyczepności. Ponadto przewiduje się zastosowanie zbrojenia. Włókna będą pełnić rolę mikrozbrojenia zmniejszającego skurcz plastyczny oraz służyć będą niwelowaniu mikrospektań w twardniejącym betonie, przy jednoczesnym ograniczeniu powstawania rys w stwardniałym betonie. Zgodnie z Aprobata Techniczną... włókna 48 mm mogą być stosowane do betonów natryskowych. Skomplikowanie deskowania konstrukcji będzie wymagało indywidualnego zamówienia u dostawcy. Demontaż deskowań powinien być przeprowadzony bez wstrząsów. Deskowanie (ze sklejki wodoodpornej) powłoki ma być odsunięte po dwóch tygodniach, a elementy brzegowe oraz konstrukcje wsporcze po upływie trzech tygodni.

## 5. ANALIZA ROZWIĄZAŃ PROJEKTOWYCH

W tabeli 1 zestawiono warianty rozwiązania żelbetowego kopuły przyjętego w pracy oraz stalowego przedstawionego w istniejącym projekcie, których obliczenia wykonane zostały według innych norm. Ta różnica zaistniała, gdyż w czasie wykonywania obu projektów obowiązywały inne normy.

Rozwiązanie alternatywne żelbetowe kopuły numer dwa wielofunkcyjnej sali koncertowej w porównaniu z przyjętym w projekcie proponowanym rozwiązaniem jest prostsze w realizacji, aczkolwiek aspekt ekonomiczny wymagałby wykonania adekwatnego kosztorysu inwestorskiego. Wymaga wykonania płyt okładziny o grubości 10 cm, czyli w porównaniu z rozwiązaniem pierwotnym zwiększenia grubości o 4 cm. Nie rzuca to jednak w znaczący sposób na całość konstrukcji, czego odzwierciedleniem są wartości reakcji podporowych. W wariantcie żelbetowym są one nieco wyższe niż w przypadku wariantu o konstrukcji nośnej stalowej. Przyjmując wariant żelbetowy należałoby ponadto przeprojektować wciągarki, których udźwig wynosi 90 kN. W przypadku konstrukcji nośnej stalowej okładzina żelbetowa traktowana jest jako dodatkowe obciążenie stałe i nie jest wliczana jako element nośny, natomiast w przypadku wariantu żelbetowego założono, iż cała konstrukcja będzie elementem nośnym. Autorka pracy uważa to za bardziej korzystne rozwiązanie, ponieważ nie trzeba wówczas stosować dodatkowych elementów potrzebnych do montażu okładziny w celu przymocowania do konstrukcji nośnej. Sam płaszcz staje się elementem nośnym, dlatego rezygnuje się ze skomplikowanej stalowej przestrzennej kratownicy na rzecz przepon żelbetowych o grubości płaszczka. Przyjmując rozwiązanie o konstrukcji nośnej stalowej do wykonania okładziny, należy wykonać specjalne, kosztowne deskowanie. W przypadku kopuły żelbetowej można zastosować z powodzeniem deskowanie typowe dla przepon. Po rozszalowaniu, konstrukcja żelbetowa będzie już gotowa do użytku, natomiast w przypadku rozwiązania o konstrukcji nośnej stalowej trzeba będzie przymocować okładzinę do elementów nośnych, co będzie wymagało stworzenia dodatkowej podkonstrukcji. Nale-

żałoby wykonać kosztorys inwestorski dla obu wariantów i porównać końcowy wynik, dlatego też nie można jednoznacznie stwierdzić, które rozwiązanie będzie korzystniejsze pod względem ekonomicznym. Zdaniem autorki pracy niebagatelną rolę odgrywa również łatwość czytania projektu na budowie. Ponieważ niedokładności wykonawcze są nieuniknione, stąd ważne jest ograniczenie ryzyka błędu do poziomu minimalnego. Rozpatrując oba warianty w tym aspekcie, autorka pracy uważa, że rozwiązanie alternatywne jest łatwiejsze w praktycznym budownictwie, jednakże nie można jednoznacznie stwierdzić, które z rozwiązań jest lepsze.

Tabela 1. Porównanie wariantów stalowego i żelbetowego kopuły sufitu ruchomego wielofunkcyjnej sali koncertowej

Lp.	Cecha konstrukcji	Konstrukcja nośna stalowa z okładziną żelbetową	Konstrukcja żelbetowa
1	rodzaj okładziny	plyta żelbetowa o grubości 6 cm	plyta żelbetowa o grubości 10 cm
2	zbrojenie w okładzinie	rozproszone	obliczone z uwagi na SGN oraz rozproszone
3	typ usztywnień przestrzennych	stalowe kratownice przestrzenne	przepony żelbetowe
4	reakcja charakterystyczna na wciągarkę	około 150 kN	około 170 kN
5	ugięcie	nie analizowano	0,5 cm
6	rodzaj przyjętego obciążenia	stałe: ciężar własny oraz dodatkowo 0,2 kN·m <sup>-2</sup>	stałe: ciężar własny oraz dodatkowo 0,5 kN·m <sup>-2</sup>
7	łatwość odczytywania rysunków na budowie	rozpatrywanie możliwe tylko z modelem 3D	rozpatrywanie możliwe w 2D
8	użycie specjalistycznego sprzętu	wycinarki numeryczne CNC	–
9	deskowanie	okładziny	okładziny oraz przepon
10	konieczność tworzenia dodatkowej podkonstrukcji	tak – ze względu na mocowanie poszycia do konstrukcji nośnej stalowej	nie
11	termin realizacji	szacunkowo zbliżony	

## 6. WNIOSKI

W opinii autorki pracy całościowa ocena obu rozwiązań projektowych powinna być niezależna i zostać uzupełniona o kosztorysy. Na podstawie całościowej analizy pracy określono następujące wnioski:

- wariant żelbetowej kopuły wielofunkcyjnej sali koncertowej w Toruniu jest możliwy do realizacji pod warunkiem zmiany technologii wciągarek, gdyż obciążenie przypadające na jedną wciągarkę jest w takim przypadku większe. Niezależnie od tego strefa zakotwień lin powinna zostać poddana szczegółowej analizie, czego nie obejmuje zakres pracy;
- modelowanie kopuły żelbetowej w programie komputerowym wymagało interpretacji wyników, zgodnej z zasadami powszechnej wiedzy inżynierskiej, po-

- nieważ generowane przez program automatyczne siatkowanie powodowało lokalne, skokowe zwiększenie naprężeń;
- podczas modelowania analizowanej struktury w programie realne wyniki dała siatka trójkątna, jednakże siatka elementów skończonych wymaga udoskonalenia, co można uzyskać poprzez ręczne wprowadzenie siatki elementów skończonych do programu;
  - panele i przepony pracują w fazie drugiej jako mimośrodowo rozciągane.

## LITERATURA

Aprobata Techniczna włókna BarChip SHOGUN.

DIN 56950:2003. Urządzenia techniczne dla organizowania imprez kulturalnych i sportowych. Urządzenia maszynowo techniczne.

DIN 56 955. Technologie sceniczne – założenia obciążeniowe w dziedzinie teatralnej i związanej – bezpieczne obciążenie robocze.

EN 12 385. Bezpieczeństwo lin stalowych.

EN 1570:1998 wraz ze zmianami EN 1570:1998/A1:2004. Wymagania bezpieczeństwa dla zapadni podnoszonych.

EN ISO 13850:2006. Bezpieczeństwo urządzeń maszynowych, urządzenia zatrzymania awaryjnego.

EN ISO 13849-1:2003. Bezpieczeństwo urządzeń maszynowych, bezpieczeństwo części systemów sterujących, kontrola.

EN ISO 12100-1:2003 Bezpieczeństwo urządzeń maszynowych.

Instrukcja ITB nr 299, 1991. Wykonanie betonu natryskowego. ITB Warszawa.

PN-EN 1992-1-1:2008. Eurokod 2: Projektowanie konstrukcji z betonu. Część 1-1: Reguły ogólne i reguły dla budynków.

Podhorecki A., 2004. Wytrzymałość materiałów 1. Statyka i wytrzymałość ustrojów prętowych. Wyd. Uczeln. ATR Bydgoszcz.

Pulajew T., Projekt pierwotny: Konstrukcja SKT Jordanki, T. 2.

Szudrowicz B., 2005. Ocena izolacyjności akustycznej w budynkach na podstawie badań. Praca badawcza ITB NA-47. Sprawozdanie końcowe. Maszynopis, biblioteka ITB.





# PROBLEMATYKA PROJEKTOWANIA BUDYNKÓW PRZEDSZKOLNYCH W ŚWIEŹLE AKTUALNIE OBOWIĄZUJĄCYCH PRZEPISÓW PRAWNYCH

Izabela Kasprzyk<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Projektowanie budynków użyteczności publicznej, na przykład szkół czy przedszkoli, nie jest powszechnym i codziennym zadaniem w biurach projektowych. Większość tego typu obiektów została zaprojektowanych kilkadziesiąt lat temu, w związku z czym projektanci, którzy dopiero zaczynają swoją pracę, mogą mieć problem z dotarciem do normatywów czy nawet aktów prawnych obowiązujących przy projektowaniu takich obiektów. Budynki przedszkolne, szkolne i inne dotyczące oświaty pod względem budowlanym muszą spełniać oczywiście wymogi zamieszczone w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury [2002].

Celem pracy, poza przedstawieniem problemu pozyskania aktów prawnych, jest też wykazanie, że najważniejsze jest zaprojektowanie przedszkola, które będzie miejscem komfortowym dla małych dzieci, ponieważ to właśnie one są w tym przypadku najistotniejsze. Rodzice muszą natomiast mieć pewność, że ich pociechy spędzają czas w miejscu bezpiecznym, komfortowym i przede wszystkim przyjaznym.

W ostatnich latach w Polsce pojawił się problem z określeniem liczby miejsc dla dzieci w przedszkolach. Liczba istniejących przedszkoli publicznych okazała się być niewystarczająca. Pojawił się też problem typowo prawny, np. jakiemu dziecku należy się w pierwszej kolejności miejsce w przedszkolu publicznym. Wielu mieszkańców miast zaczęło się wyprowadzać poza ich granice, natomiast w małych miejscowościach i na wsiach dotychczas nie było przedszkoli. Problem ten został formalnie rozwiązany poprzez wykreowanie przez Ministerstwo Edukacji Narodowej nowych przepisów prawnych dotyczących utworzenia nowych przedszkoli i tzw. nowych form wychowania przedszkolnego. Obecnie większość przedszkoli powstaje w adaptowanych budynkach, są to tzw. punkty lub zespoły przedszkolne [Rozporządzenie Ministra Edukacji... 2010], które nie obejmują pomieszczeń przeznaczonych na zaplecze kuchenne. Jeżeli jednak projekt ma obejmować przedszkole publiczne z całym zapleczem potrzebnym do użytkowania tego obiektu, to nie ma do dyspozycji żadnych aktów prawnych, z których wynikałyby potrzebne ku temu podstawowe informacje.

Na świecie zauważa się obecnie wzrost zainteresowania edukacją przedszkolną. Coraz więcej uwagi przywiązuje się do wyglądu, bezpieczeństwa czy estetyki budynków przedszkolnych. Dla przykładu prof. Helen Penn zauważa, że hiszpańskie i włoskie przedszkola są miejscami sprzyjającymi rozwojowi, zapewniającymi dużo wysokiej jakości przestrzeni, gdzie dzieci mogą się rozwijać i odkrywać świat na swój sposób [Dudek 2013]. Największą uwagę w przedszkolach w Hiszpanii i Włoszech skupia się na korzyściach zdrowotnych pozyskiwanych ze światła dziennego i świeżego powietrza, w związku z czym w budynkach tych stosuje się bardzo dużo naświetli [Dudek 2013].

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska, Katedra Mechaniki Konstrukcji, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, e-mail: izabelakasprzykutp@gmail.com

Zwraca się też uwagę na dobór projektantów. Architekci z dużą wyobraźnią oraz wrażliwi na potrzeby dzieci będą zdecydowanie lepszymi projektantami przedszkoli, ponieważ znają dziecięce potrzeby [Jameson i Watson 1998].

W związku z pojawieniem się potrzeby utworzenia większej liczby miejsc dla dzieci w przedszkolach, w biurach projektowych zaczęli pojawiać się chętni inwestorzy do budowy tego typu obiektów. Dodatkową zachętą stały się też fundusze ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytet IX, Działanie 9.1, Poddziałanie 9.1.1 – Zmniejszanie nierówności w stopniu upowszechniania edukacji przedszkolnej. W ramach wymienionego wyżej poddziałania 9.1.1 można dofinansować następujące typy projektów: tworzenie ośrodków wychowania przedszkolnego (w tym również realizacja alternatywnych form wychowania przedszkolnego) na obszarach i w środowiskach o niskim stopniu upowszechnienia edukacji przedszkolnej (w szczególności na obszarach wiejskich); wsparcie istniejących przedszkoli, przyczyniające się do zwiększonego uczestnictwa dzieci w wychowaniu przedszkolnym, np. dłuższe godziny pracy przedszkoli, uruchomienie dodatkowego naboru dzieci, zatrudnienia personelu; opracowanie i realizacja kampanii informacyjnych promujących edukację przedszkolną [8].

### **1.1. Rodzaje form przedszkolnych**

W ustawie o systemie oświaty [Ustawa... 1991] wyróżnia się przedszkola publiczne i niepubliczne. Przedszkolem publicznym jest przedszkole, które:

- a) prowadzi bezpłatne nauczanie i wychowanie w zakresie co najmniej podstawy programowej wychowania przedszkolnego,
- b) przeprowadza rekrutację dzieci w oparciu o zasadę powszechnej dostępności,
- c) zatrudnia nauczycieli mających kwalifikacje określone w odrębnych przepisach.

W ustawie tej wyróżnia się też inne formy wychowania przedszkolnego.

Rozporządzenie [2010] podaje, że wychowanie przedszkolne może być prowadzone w następujących, innych niż przedszkola i oddziały przedszkolne w szkołach podstawowych, formach:

- a) zespołach wychowania przedszkolnego, zwanych dalej „zespołami”, w których zajęcia są prowadzone w niektóre dni tygodnia,
- b) punktach przedszkolnych, zwanych dalej „punktami”, w których zajęcia są prowadzone przez cały rok szkolny, z wyjątkiem przerw ustalonych przez organ prowadzący.

Rozporządzenie [2010] stwarza więc możliwość utworzenia punktów przedszkolnych, które nie muszą spełniać takich wymagań, jak przedszkola, w których dzieci przebywają w pełnym wymiarze godzin, na przykład wymagań dotyczących zaplecza kuchennego, ponieważ mogą korzystać z usług cateringowych.

## **2. FORMALNE UWARUNKOWANIA PROJEKTOWANIA BUDYNKU PRZEDSZKOŁA PUBLICZNEGO**

Jak wcześniej wspomniano, chcąc zaprojektować przedszkole publiczne, które miałyby między innymi całe zaplecze kuchenne, sale o odpowiednich wymiarach i odpowiednim nasłonecznieniu, a także inne potrzebne pomieszczenia, należy skorzystać

z rozporządzenia w sprawie warunków technicznych [Rozporządzenie... 2002]. Jednakże w rozporządzeniu brak informacji dotyczących zagospodarowania działki, liczby potrzebnych pomieszczeń i ich funkcji, rodzaju pomieszczeń, ich wielkości.

W rozporządzeniu [2002] określono następujące warunki:

- drzwi wejściowe do budynku i ogólnodostępnych pomieszczeń użytkowych oraz do mieszkań powinny mieć w świetle ościeżnicy co najmniej szerokość 0,9 m i wysokość 2 m. W przypadku zastosowania drzwi zewnętrznych dwuskrzydłowych szerokość skrzydła głównego nie może być mniejsza niż 0,9 m;
- minimalna wysokość w świetle w pomieszczeniach do pracy, nauki i innych celów, w których nie występują czynniki uciążliwe lub szkodliwe dla zdrowia, przeznaczonych na stały lub czasowy pobyt więcej niż 4 osób, powinna wynosić 3,0 m;
- w pomieszczeniu przeznaczonym na pobyt ludzi stosunek powierzchni okien, liczonej w świetle ościeżnic, do powierzchni podłogi, powinien wynosić co najmniej 1:8, natomiast w innym pomieszczeniu, w którym oświetlenie dzienne jest wymagane ze względów na przeznaczenie – co najmniej 1:12;
- pomieszczenia przeznaczone do zbiorowego przebywania dzieci w żłobku, przedszkolu i szkole, z wyjątkiem pracowni chemicznej, fizycznej i plastycznej, powinny mieć zapewniony czas nasłonecznienia co najmniej 3 godziny w dniach równonocy (21 marca i 21 września) w godzinach 8:00-16:00, natomiast pokoje mieszkalne – w godzinach 7:00-17:00;
- w ustępach ogólnodostępnych należy stosować wentylację grawitacyjną lub mechaniczną – w ustępach z oknem i jedną kabiną, a w innych – mechaniczną o działaniu ciągłym lub włączaną automatycznie;
- budynek przedszkola zalicza się do kategorii zagrożenia ludzi – ZL II. (ZL II – przeznaczone przede wszystkim do użytku ludzi o ograniczonej zdolności poruszania się, takie jak szpitale, żłobki, przedszkola, domy dla osób starszych);
- drzwi stanowiące wyjście ewakuacyjne powinny otwierać się na zewnątrz pomieszczeń przeznaczonych dla ponad 6 osób o ograniczonej zdolności poruszania się.

Aby zaprojektować budynek prawidłowo, należy wyszukiwać dodatkowych informacji między innymi w wojewódzkiej stacji sanitarno-epidemiologicznej. Z takiej instytucji pozyskano „Wytyczne programowo-funkcjonalne projektowania przedszkoli” [1979], wydane przez Ministerstwo Oświaty i Wychowania w Warszawie. Z wytycznych wynika bardzo dużo potrzebnych informacji, takich jak:

- sala zajęć z zespołem sanitarnym, schowkiem porządkowym i składem leżaków stanowi kompleks pomieszczeń dla jednego oddziału. Dla sal zajęć należy przewidywać oświetlenie od południa, południowego wschodu lub południowego zachodu, przy czym niedopuszczalne jest oświetlenie wyłącznie od wschodu, północy i zachodu;
- zespoły sanitarne dzieci projektuje się odrębne dla każdego oddziału. Zespół sanitarny powinien być bezpośrednio dostępny z sali zajęć. W zespole należy przewidzieć:

- 3 miski ustępowe o zmniejszonych wymiarach,
- 3 umywalki o zmniejszonych wymiarach,
- 1 natrysk;
- miski ustępowe należy obudować ściankami do wysokości 1,30 m. Natrysk powinien składać się z płytkiej miski, umieszczonej na wysokości 45 cm nad podłogą i baterii natryskowej z ruchowym sitkiem. Nie należy sytuować natrysku pod oknem;
- ustęp dostępny z terenu należy sytuować na parterze od strony placu gier i zabaw. W przedszkolach 1- i 2-oddziałowych ustęp należy wyposażyć w umywalkę i miskę ustępową, w przedszkolach 4- i więcej oddziałowych – w 2 umywalki i 2 miski ustępowe, ponadto w każdym przypadku w zawór czerpalny ze złączką do węża;
- hall – poczekalnia dla rodziców jest miejscem ogólnego badania stanu zdrowia dziecka przy jego przyjściu do przedszkola, służy rodzicom do rozbierania z odzieży wierzchniej oraz do oczekiwania na dziecko po zakończeniu zajęć;
- pokój personelu pedagogicznego jest miejscem przygotowywania zajęć oraz odpoczynku personelu pedagogicznego. Pokój powinien być dostępny z komunikacji oraz wyposażony w umywalkę;
- ustęp personelu należy sytuować na każdej kondygnacji i wyposażyć w umywalkę i miskę ustępową oraz zawór czerpalny ze złączką do węża. Ustęp zlokalizowany na parterze należy udostępnić rodzicom i interesantom;
- zmywalnia naczyń stołowych powinna być dostępna z powierzchni komunikacyjnej. W rozwiązaniach piętrowych zmywalnię należy projektować na obu kondygnacjach. Należy zapewnić wynoszenie zlewków wyłącznie przez przejścia komunikacyjne lub bezpośrednio na zewnątrz budynku. Poza wyposażeniem technologicznym w zmywalni przewidzieć umywalkę i zawór czerpalny ze złączką do węża;
- kuchnia z przygotowalnią przeznaczona jest do przygotowywania i obróbki ciepłej potraw oraz rozdzielania ich na oddziały; sytuować na parterze lub piętrze. Poza wyposażeniem technologicznym należy przewidzieć umywalkę i zawór czerpalny ze złączką do węża. Należy wydzielić miejsce do zmywania naczyń kuchennych. W przedszkolach 1-oddziałowych wydzielić odpowiednio wyposażony boks o powierzchni 4-5 m<sup>2</sup> do obróbki wstępnej surowców;
- magazyn produktów suchych służący do okresowego przechowywania produktów żywnościowych należy projektować z łatwym dostępem od strony wejścia gospodarczego oraz w pobliżu kuchni;
- szatnia personelu kuchni służy jednocześnie pracownikom do spożywania potraw. Przy projektowaniu wielkości szatni należy stosować wskaźnik min. 0,65 m<sup>2</sup> na osobę;
- zespół sanitarny personelu kuchni należy łączyć z szatnią personelu oraz udostępnić z powierzchni komunikacyjnej przez przedsionek izolujący. Zespół ten należy wyposażyć w umywalkę, miskę ustępową i natrysk oraz zawór czerpalny ze złączką do węża;

- pomieszczenie na odpadki żywnościowe należy sytuować w pobliżu wejścia gospodarczego z dostępem wyłącznie z zewnątrz. Wyposażyć w zawór czerpalny ze złączką do węża;
- skład opału dla kuchni należy projektować w przypadku zainstalowania w kuchni trzonu węglowego oraz kotłów warzelnych węglowych.

Dodatkowo w budynku powinien znaleźć się jeszcze: magazyn ziemniaków i magazyn warzyw, magazyn kiszonek, magazyn zasobów, magazyn opakowań, pomieszczenie do przepierek, magazyn bielizny brudnej i magazyn bielizny czystej, magazyn mebli i sprzętu terenowego.

Wytyczne [1979] określają również wygląd działki, na której znajdować się ma budynek przedszkolny:

- działka przedszkolna powinna mieć dobre nasłonecznienie oraz znajdować się w bezpośrednim sąsiedztwie terenów zielonych, z dala od arterii komunikacyjnych;
- działka przedszkolna powinna być ogrodzona, przy zapewnieniu dojazdu i dojazdu drogami o utwardzonej powierzchni;
- podwórze gospodarcze z drogą dojazdową powinno znajdować się w pobliżu wejścia gospodarczego oraz bramy wjazdowej na teren. Podwórze gospodarcze należy wydzielić od innych terenów przedszkola zielenią, a ponadto od strony terenów dziecięcych – niskim ogrodzeniem. Przy podwórzu należy przewidzieć śmietnik i trzepak. Droga prowadząca do podwórza gospodarczego nie powinna się krzyżować z drogą komunikacyjną dla dzieci. Należy stosować następujące szerokości dróg i ścieżek:
  - szerokość drogi gospodarczej 2,5-3,0 m,
  - szerokość ścieżek 0,75-1,50 m;
- plac przedwejściowy usytuowany przy furtce wejściowej powinien mieć utwardzoną nawierzchnię. Pożądane jest ustawienie ławek;
- plac do zabaw i gier zbiorowych powinien mieć kształt prostokątny i wyrównaną nawierzchnię;
- place zabaw poszczególnych oddziałów powinny być od siebie odizolowane w miarę możliwości pod względem widokowym i mogą mieć kształt dowolny;
- nie należy betonować terenów przedszkolnych przeznaczonych do zajęć i zabaw dla dzieci.

Niezwykle ważny jest fakt, że od końca lat 70. XX wieku, gdy zostały sporządzone wytyczne, nie pojawiło się żadne ich wznowienie. Wytyczne z 1979 roku nie są aktualnie obowiązkowe do spełnienia, jednak nie powstały żadne nowe przepisy dotyczące budynków przedszkolnych, stąd warto z tego dokumentu skorzystać, pomimo że powstał w okresie obowiązywania zupełnie innych standardów w budownictwie, zarówno w zakresie rozwiązań projektowych, jak również poziomu i jakości wykonawstwa prac budowlanych.

Obecnie projektanci w Polsce poza wymienionymi do tej pory rozporządzeniami mogą również posługiwać się innymi normami. Dla przykładu warto przy projektowaniu przedszkola skorzystać z podręcznika projektowania architektoniczno-budowlanego

[Neufert i Neff 2007]. Opracowanie powstało co prawda w okresie minionym – w oparciu o normy niemieckie, jednak przy obecnym stanie aktów prawnych dotyczących projektowania przedszkoli w Polsce można wspomóc się normami zagranicznymi. W podręczniku dokonano próby charakterystyki przedszkoli ze względu na wiek dzieci i ich liczbę w grupie. Określono powierzchnię przypadającą na jedno dziecko (ok. 1,5-3 m<sup>2</sup>); grupy powinny natomiast liczyć od 15 do 30 dzieci na jedno pomieszczenie. Dane te zawierają ważną informację dotyczącą wielkości projektowanych pomieszczeń. Określono również, że w salach powinno się przewidzieć dodatkową powierzchnię na szafki, regały itp. Przedstawiono również przykłady rzutów przedszkoli, z których jasno wynika, jakie pomieszczenia powinny się znaleźć w budynku i w jaki sposób powinny być usytuowane (rys. 1).



Rys. 1. Przykładowy rzut pomieszczenia dla grupy przedszkolnej – rzut typowy według arch. Franken i Kreft [Neufert i Neff 2007]

### 3. PROJEKT PRZEDSZKOLA UWZGLĘDNIAJĄCY AKTUALNIE OBOWIĄZUJĄCE UWARUNKOWANIA PRAWNE

Rozkład pomieszczeń rozplanowano zgodnie z wytycznymi zamieszczonymi zarówno w wytycznych programowo-funkcjonalnych [1979], jak również w podręczniku projektowania [Neufert i Neff 2007] – obie publikacje zawierają bowiem podobne do siebie założenia dotyczące rozplanowania funkcji w przedszkolach. Rozkład, który przyjęto, miał za zadanie ułatwić poruszanie się po budynku dzieciom, jak i pracownikom obiektu i przede wszystkim stworzyć przestrzeń bezpieczną, bez schodów dostępnych dla dzieci. Przedszkole zaprojektowano jako budynek wolnostojący, parterowy, podpiwniczony, o powierzchni zabudowy 654,54 m<sup>2</sup>. Tak duża powierzchnia zabudowy miała bowiem pomieścić wszystkie potrzebne pomieszczenia. W piwnicy zlokalizowano magazyny potrzebne dla części kuchennej, magazyny sprzętu i mebli oraz kotłownię. W ten sposób oddzielono część „technologiczną” przedszkola od części ogólnodostępnej dla dzieci, która znajduje się na parterze. Zaprojektowano przedszkole dwuoddziałowe, z dwiema osobnymi salami zabaw. Każda sala miała osobną łazienkę, w pełni przystosowaną dla dzieci (nisko zamocowane umywalki oraz miski ustępowe). Miski



14 cm. Ściany działowe wykonano z bloczków z betonu komórkowego odmiany 500 o grubości 12 cm.

Strop zaprojektowano jako strop gęsto żebrowy TERIVA II o grubości konstrukcyjnej 34 cm.

Stropodach zaprojektowano jako stropodach odpowietrzany.

#### 4. WNIOSKI

W sytuacji gdy chce się zaprojektować przedszkole z pełnym zapleczem kuchennym i sanitarnym, brak możliwości zdobycia pełnych i obowiązujących przepisów, z których wynikałoby, jakie pomieszczenia i o jakich parametrach powinny się znaleźć w tym budynku. Inspektorzy do spraw BHP i sanitarnych przy projektowaniu przedszkoli nadal posługują się wytycznymi z 1979 roku, mimo że nie są one prawnie obowiązujące. Dla projektantów brak aktualnych normatywów dotyczących projektowania przedszkoli jest utrudnieniem, ponieważ nie jesteśmy w stanie w pełni poprawnie podejść do jego zaprojektowania.

Przy dużej potrzebie powstawania pełnoczasowych (pełnowymiarowych) nowych placówek należałoby więc utworzyć nowe szczegółowe przepisy, które ułatwiłyby pracę nie tylko projektantom.

#### LITERATURA

Dudek M., 2013. Nurseries. A design guide. USA.

Jameson H., Watson M., 1998. Starting and Running a Nursery: The Business of Early Years Care. United Kingdom.

<http://funduszeunijne1.blox.pl/2009/01/Dotache-unijne-na-utworzenie-i-prowadzenie.html>

Kasprzyk I., 2009. Rozwiązanie architektoniczno-konstrukcyjne budynku przedszkola. UTP w Bydgoszczy, praca magisterska.

Neufert P., Neff L., 2007. Podręcznik projektowania architektoniczno-budowlanego. Arkady Warszawa.

Rozporządzenie Ministra Edukacji Narodowej z dnia 31 sierpnia 2010 r. w sprawie rodzajów innych form wychowania przedszkolnego, warunków tworzenia i organizowania tych form oraz sposobu ich działania, 2010. Dz.U. z 2009 r. Nr 83, poz. 693.

Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 12 kwietnia 2002 r. w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie, 2002. Dz.U. z 2002 r. Nr 75, poz. 690 z późn. zm.

Ustawa o systemie oświaty z dnia 7 września 1991 roku, 1991. Dz.U. 1991 nr 95 poz. 425.

Wytyczne programowo-funkcjonalne projektowania przedszkoli, 1979. Ministerstwo Oświaty i Wychowania Warszawa.



# BADANIA ODDZIAŁYWANIA RODZAJU NAPEŁNIENIA I TEMPERATURY OTOCZENIA NA SZTYWNOŚĆ PROMIENIOWĄ OPON SAMOCHODOWYCH

Maciej Kotyk<sup>1</sup>, Adam Troszyński

## 1. WSTĘP

Opony samochodowe są jedynymi elementami, które podczas jazdy stykają się z nawierzchnią dróg. Elementy te mają do zrealizowania wiele zadań, a do najważniejszych należy przenoszenie siły napędowej i obciążenia wynikającego z masy samego pojazdu, przewożonych osób oraz mienia. Niestety istnieje wiele czynników w różnym stopniu ograniczających prawidłowe funkcjonowanie opon i komfort podróżowania. Mimo ciągłego powstawania coraz nowszych i lepszych procesów technologicznych oraz mieszanek, z jakich wytwarza się opony, nie ma możliwości zmiany elementarnych zjawisk fizycznych zachodzących w oponach samochodowych podczas jazdy, zwłaszcza zmiany ciśnienia i sztywności na skutek wahań temperatury. Można jedynie ograniczyć skutki tych procesów.

Zmiana właściwego ciśnienia w oponach wpływa negatywnie na bezpieczeństwo poruszania się pojazdami samochodowymi, znacznie przyspiesza zużycie opon, a w przypadku zmniejszenia ciśnienia w oponie – zużycie paliwa. Zmieniające się warunki zewnętrzne wpływają na ciśnienie w oponach samochodowych, jednak stopień tych zmian nie jest szczegółowo znany opinii publicznej.

Za sprawą różnych czynników bardzo popularne stało się ograniczanie zmian ciśnienia w oponach poprzez ich napełnianie łatwo dostępnym i niedrogim azotem zamiast powietrzem. Pomimo tego, że procentowa zawartość azotu w powietrzu jest duża, to wyeliminowanie tlenu z medium wypełniającego oponę znacznie zmniejsza jego wrażliwość na zmianę temperatury.

Podczas obserwowania procesów obsługiwania i naprawiania pojazdów samochodowych stwierdzono, że kierowcy bagatelizują problem zachowania prawidłowego ciśnienia w oponach. W przypadku gdy pojazdy sezonowo pokonują stosunkowo dużą liczbę kilometrów, a czasookresy pomiędzy kolejnymi obsługami pojazdów są długie, to ciśnienie w oponach bardzo często ma znacznie niższe wartości niż powinno mieć. Niektórzy użytkownicy lekceważą problem właściwego ciśnienia w oponach, nie zdając sobie sprawy z konsekwencji.

Zagadnienie sztywności promieniowej opon samochodowych zostało zbadane przez Dariusza Szpicala i Krzysztofa Kulikowskiego w Białymstoku w 2014 roku. Podczas eksperymentu uwzględniono zmiany ciśnienia wewnątrz opony pneumatycznej w sposób skokowy, jednak pominięto kwestię zmiany temperatury, która wpływa na ciśnienie, oraz sztywność opony, a obiekt badań napełniono wyłącznie powietrzem [Kulikowski i Szpicla 2014].

Problemem sztywności opon pneumatycznych zajął się również Przemysław Simiński. Jego eksperyment również polegał na wyznaczeniu sztywności promieniowej

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, Wydział Inżynierii Mechanicznej, Zakład Podstaw Konstrukcji Maszyn, 85-789 Bydgoszcz, al. prof. S. Kaliskiego 7, e-mail: maciej.kotyk@utp.edu.pl

opony przy różnym ciśnieniu gazu w jej wnętrzu, jednak zmiana ciśnienia w oponie nie występowała na skutek wahań temperatury, a została wywołana mechanicznie przez eksperymentatora [Luty i Simiński 2008].

Zjawisko zmiany sztywności promieniowej opon zostało dostrzeżone oraz zbadane. Jednak badacze dostrzegają wyłącznie sam efekt, którym jest zmiana ciśnienia w oponie, pomijając to, że zmiana temperatury powoduje wahania ciśnienia wewnątrz opony. Ponadto w niewielu eksperymentach, w których oponę pneumatyczną poddaje się obciążeniom dynamicznym, porównuje się powietrze oraz azot jako gazy mające zastosowanie przy napełnianiu ogumienia.

## **2. OPIS ZJAWISKA ORAZ MODEL MATEMATYCZNY TARCIA TOCZNEGO W ODNIESIENIU DO OPONY SAMOCHODOWEJ**

Tarcie toczne jest to siła przeciwdziałająca obtaczaniu się jednego ciała po drugim, przy czym co najmniej jedno z tych ciał w miejscu kontaktu z drugim ma przekrój kołowy [Henzel i Żylski 2000]. Zjawisko to ma miejsce między innymi w łożysku tocznym pomiędzy kulką łożyska a jego bieżnią lub pomiędzy oponą samochodową a nawierzchnią drogi.

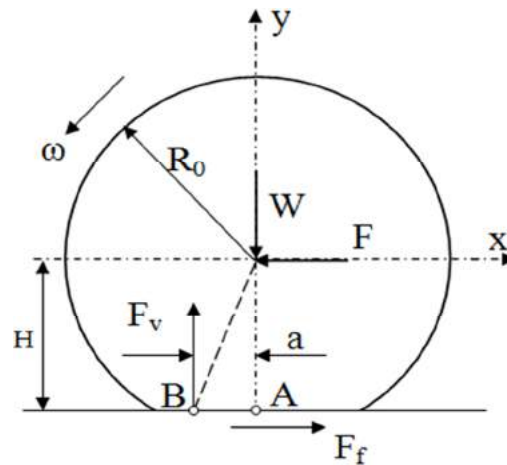
Opór toczenia opony samochodowej zależy od bardzo wielu czynników. Do najważniejszych należą: materiał, z którego jest wykonana opona, oraz rodzaj powierzchni, po jakiej się ona toczy. Producenci opon pneumatycznych zaobserwowali, że zwiększenie zawartości siarki w gumie opony powoduje zmniejszenie oporu toczenia w stosunku do tych, w których procentowy udział siarki jest mniejszy.

Istotnym elementem mającym wpływ na tarcie toczne jest kształt bieżnika opony. Zaobserwowano tendencję polegającą na tym, że opony o głębokich rowkach stawiają nieco większy opór niż te, w których głębokość rowków jest mniejsza.

Kolejnym czynnikiem mającym ogromny wpływ na tarcie toczne opony jest jej napełnienie. Wpływa ono dwójako na oponę. Zbyt małe ciśnienie w oponie pneumatycznej powoduje jej ugięcie i w konsekwencji zwiększenie odkształcalności. Skutkuje to dwoma niekorzystnymi zjawiskami. Pierwsze z nich to zwiększenie powierzchni kontaktu opony z nawierzchnią, co jest odczuwalne przez prowadzącego pojazd samochodowy, ponieważ znacznie zwiększa się opór toczenia. Ponadto przyspiesza zużywanie się opony. Kolejne zjawisko to zwiększenie ugięcia opony; nie to wpływa na tarcie toczne, jednak sam proces ugięcia pochłania pewną ilość energii pochodzącej z silnika, przekazywanej poprzez układ napędowy do kół pojazdu.

Rozmiar opony również ma istotny wpływ na opór toczenia tego elementu. W przypadku gdy ciśnienie w oponach o różnym rozmiarze jest takie samo, opona węższa będzie potrzebowała więcej energii na pokonanie oporów ruchu. Wynika to z faktu, że obciążenie rozłoży się na większej powierzchni, co spowoduje mniejsze ugięcie opony samochodowej i wpłynie na zmniejszenie wartości oporu toczenia.

Na rysunku 1 przedstawiono model opony samochodowej z naniesionymi oddziałującymi na nią siłami. Uogólnione obciążenie opony oznaczono na rysunku jako  $W$ . Element spoczywa na poziomym podłożu, po którym może się toczyć. Dla odzwierciedlenia warunków pracy opony samochodowej w celu zasymulowania siły napędowej, do środka rozpatrywanego elementu przyłożono poziomą siłę napędową oznaczoną jako  $F$ . Należy zaznaczyć, że opisywana siła pozioma wprawi element w ruch postępowy lub poślizg dopiero wtedy, gdy jej wartość przekroczy pewną wartość graniczną. W przypadku gdy wartość liczbowa siły  $F$  będzie zbyt mała, opona pozostanie w bezruchu.



Rys. 1. Model opony samochodowej z naniesionymi siłami oddziałującymi na nią w czasie ruchu [Nader 2007]

Dla potrzeb wyprowadzenia zależności matematycznej przyjmuje się, że opona samochodowa początkowo pozostaje w spoczynku. Działają na nią następujące siły:

- uogólnione obciążenie  $W$ ,
- pozioma siła napędowa  $F$ ,
- reakcja podłoża na siłę pionową  $F_v$ ,
- reakcja podłoża na siłę poziomą zwaną również siłą tarcia  $F_f$ .

Po wyprowadzeniu równań dla osi poziomej i pionowej otrzymujemy formę matematyczną równania o postaci:

$$\sum F_{iy} = F_v - W = 0 \quad (2.1a)$$

$$\sum F_{ix} = F - F_f = 0 \quad (2.1b)$$

Z równań (2.1a) i (2.1b) otrzymuje się:

$$F_v = W, \quad F = F_f$$

Aby opona nie zaczęła się ślizgać po powierzchni, na której się znajduje, konieczne jest spełnienie warunku mającego postać 0:

$$F \leq \mu F_v = \mu W \quad (2.2)$$

gdzie  $\mu$  należy rozumieć jako współczynnik tarcia statycznego.

Należy również ułożyć równanie momentów względem punktu A, który jest swojego rodzaju pionowym rzutem środka modelowej opony na powierzchnię, po jakiej się ona porusza w punkcie styku tych dwóch ciał. Ponieważ moment siły  $F$  równa się  $FR_0$ , a momenty sił  $W$  i  $F_f$  są równe zero, to aby prawa i lewa strona równania były równe co do wartości, siła normalna  $F_v$  musi działać w pewnej odległości od punktu styku A. Innymi słowy, siła ta musi działać na pewnym ramieniu. Ramię, na którym działa opi-

sywana reakcja nie przechodzi dokładnie przez punkt A, lecz w pewnej odległości od niego i w rozpatrywanym modelu musi leżeć z po jego lewej stronie.

Jeżeli oznaczy się moment siły reakcji  $F_v$  działający na ramieniu  $a$  jako  $M_A = F_v a = W a$ , to równanie momentów będzie miało postać:

$$FR_0 - M_A = 0 \quad (2.3)$$

gdzie  $R_0$  jest promieniem dynamicznym opony.

Z równania (2.3) otrzymujemy:

$$M_A = FR_0$$

Wyznaczona zależność ma charakter empiryczny. Jej prawidłowość uzasadnia się tym, że zarówno opona samochodowa, jak również powierzchnia, po jakiej się porusza nie jest obiektem idealnie sztywnym i nieodkształcalnym. Opona samochodowa ulega stosunkowo dużemu ugięciu szczególnie w przypadku dużych obciążeń. W wyniku tego styk opony z nawierzchnią odbywa się nie w punkcie, lecz na określonej powierzchni. Stąd reakcja  $F_v$  rozkłada się na powierzchni styku, której wielkość zależy od wielu czynników. Według rysunku 1 wartość momentu siły  $F_v$  względem punktu A nie może przekroczyć wartości maksymalnej  $M_{A_{MAX}} = F_v a$ , gdzie  $a$  jest ramieniem siły  $F_v$ .

Parametr  $a$  stanowi współczynnik oporu toczenia. Współczynnik ten ma wymiar długości, ponieważ wyraża przesunięcie punktu zaczepienia siły reakcji na obciążenie osi koła poza jego chwilową pionową oś symetrii. Ze wzoru (2.3) można wyznaczyć warunek konieczny, aby opona samochodowa nie zaczęła się toczyć.

Ponieważ:

$$FR_0 \leq M_{A_{MAX}} = F_v a \quad (2.4)$$

stąd:

$$F_f \leq W \frac{a}{R_0} \quad (2.5)$$

gdzie  $F_f$  jest siłą tarcia tocznego [1].

Początkowej fazie ruchu obrotowego opony samochodowej towarzyszy poślizg, czyli przebyta droga podczas jednego pełnego obrotu opony nie będzie równa jej obwodowi.

Należy zaznaczyć, że dla niewielkich prędkości obrotowych prędkość toczenia nie wpływa na siłę tarcia tocznego, zgodnie z teorią trzeciego prawa tarcia, traktującego o tym, że siła tarcia nie zależy bezpośrednio od prędkości [5]. W przypadku gdy prędkość toczenia jest znaczna, to szybkość powstawania odkształceń w oponie jest porównywalna z prędkością rozchodzenia się odkształceń w materiale, z jakiego wykonana jest opona. Wynikiem tych zjawisk jest zwiększenie się gwałtownie oporów tarcia tocznego. Niekiedy dochodzi do sytuacji, w której opory tarcia tocznego są większe niż opory tarcia ślizgowego.

Dla niewielkich prędkości toczenia materiałów charakteryzujących się stosunkowo dużą sztywnością, w których wszystkie odkształcenia mieszczą się w zakresie odkształceń sprężystych, wartość współczynnika oporu toczenia w głównej mierze zależy od:

- materiału opony,
- sposobu ułożenia nici kordu,
- ciśnienia wewnątrz opony
- średnicy opony,
- materiału podłoża,
- szerokości opony,
- gazu, jakim napełniona jest opona,
- inne.

Analizy literaturowe oraz pewne zależności matematyczne wskazują, że ugięcie opony powoduje stosunkowo duże zmiany w jej oporze toczenia. Zwiększone pole powierzchni przylegania opony do podłoża powoduje, że odległość pomiędzy punktem A a punktem zaczepienia siły reakcji podłoża B zwiększa się, wpływając tym samym na zwiększenie współczynnika oporu toczenia [1, 5].

W celu zmniejszenia nadmiernej powierzchni kontaktu opony z podłożem, tj. zmniejszenia utraty ciśnienia na skutek spadku temperatury, eksploatacysty stosują azot jako gaz, którym napełniają opony samochodowe. Głównym problemem badawczym było stwierdzenie, czy korzyści wynikające z zastosowania azotu do napełniania ogumienia są na tyle duże, aby zrekompensować koszty wynikające chociażby z zakupu aparatury do pozyskiwania tego gazu.

### **3. BADANIA ODDZIAŁYWANIA RODZAJU NAPEŁNIENIA I ZMIANY TEMPERATURY OTOCZENIA NA OPONĘ SAMOCHODOWĄ**

#### **3.1. Obiekt badań**

Badano dwa czynniki stosowane do napełniania opon samochodowych. Do badań wykorzystano oponę firmy Yato, wyprodukowaną w 2007 roku, o rozmiarze 175/80/14 (rys. 2). Do opony napełnianej kolejno powietrzem oraz azotem podłączono aparaturę umożliwiającą jednoczesny pomiar ciśnienia, temperatury i ugięcia. Do celów badawczych usunięto zawór zamontowany w obręczy koła.



Rys. 2. Opona wykorzystana do badań

### 3.2. Opis badań

Badania składały się z dwóch etapów.

W pierwszym etapie, po podłączeniu wszystkich elementów, oponę samochodową napełniono powietrzem do ciśnienia równego 2,62 bar przy temperaturze 10°C. Kolejnym krokiem było ustalenie szczelności układu pomiarowego oraz ich wyeliminowanie. Po wykonaniu tych czynności odczekano 5 min w celu ustabilizowania się ciśnienia w oponie samochodowej oraz podłączonego do niej układu. Następnie urządzenie służące do wyznaczania sztywności promieniowej opon samochodowych wraz z innymi elementami układu pomiarowego umieszczono w izotermicznym kontenerze tak, aby zmieniająca się temperatura nie wpływała na pracę elektronicznych elementów składających się na stanowisko pomiarowe. Podczas ochładzania i ogrzewania opony samochodowej przeprowadzano równoległe pomiary temperatury powietrza oraz ciśnienia w oponie. Ponadto na docisku umieszczano kartki papieru, które za pomocą mechanizmu śrubowego dociskano do opony samochodowej pomalowanej tuszem tak, aby w wyniku tych zabiegów na kartce powstało trwałe odbicie bieżnika opony. Czynności te realizowano co 5°C w zakresie temperatur od -15°C do 30°C. Zakres nacisku wynosił od 1000 N do 6000 N z krokiem 1000 N. Górna wartość nacisku wynikała z odczytanej wartości indeksu nośności znajdującego się na oponie samochodowej. Dodatkowo na stanowisku pomiarowym umieszczono czujnik zegarowy, z którego odczytywano ruch docisku urządzenia w celu określenia promieniowego ugięcia opony samochodowej. Po zakończeniu pomiarów oponę opróżniono z powietrza.

W drugim etapie, po podłączeniu wszystkich elementów, oponę napełniono azotem z butli do ciśnienia większego niż potrzebne do realizacji badań. Następnie za pomocą zaworka podłączonego do jednej z końcówek rozdzielacza, zmniejszono ciśnienie azotu w stanowisku pomiarowym, pamiętając o przerwach na ustabilizowanie się ciśnienia. W wyniku tych zabiegów początkową wartość ciśnienia azotu ustalono na 2,62 bar przy temperaturze 10°C. Kolejnym krokiem było uszczelnienie stanowiska pomiarowego. Następnie oponę wraz z pozostałymi elementami układu pomiarowego ponownie umieszczono w izotermicznej komorze i wykonywano równoległe pomiary tempera-

tury azotu, ciśnienia w oponie oraz ugięcia obiektu badań w wyniku działania siły promieniowej. W drugim etapie badań na docisku urządzenia służącego do wyznaczania sztywności promieniowej opon samochodowych również umieszczano kartki papieru w celu odbicia na niej rzeźby bieżnika w sposób identyczny jak w przypadku badania oddziaływania powietrza na sztywność promieniową opony samochodowej oraz w takim samym zakresie nacisków, temperatur i w tych samych krokach. Po zakończeniu badań oponę opróżniono z azotu.

Umieszczenie opony w komorze izotermicznej miało na celu odzwierciedlenie warunków eksploatacyjnych podobnych do tych, gdy temperatura zewnętrzna ulega zmianie.

Badanie polegało więc na nieustannym pomiarze trzech zmiennych.

Dla potrzeb przeprowadzenia pomiarów ciśnienia powietrza oraz ciśnienia azotu wykorzystano manometr mechaniczny firmy Wika (rys. 3) o zakresie pomiarowym od 0 do 10 bar i dokładności 0,02 bar.



Rys. 3. Manometr wykorzystany do wykonania badań

Do pomiarów temperatury powietrza oraz temperatury azotu wykorzystywano elektroniczny termometr o zakresie od  $-50^{\circ}\text{C}$  do  $+150^{\circ}\text{C}$ . Na końcu grotu ze stali nierdzewnej znajdował się czujnik, umieszczony we wnętrzu opony zgodnie z zaleceniami producenta urządzenia. Dla potrzeb badań przewód pomiędzy wyświetlaczem a grotem przedłużono dwużyłowym przewodem elektrycznym na odległość 1000 mm. Termometr elektroniczny wykorzystywany do badań pokazano na rysunku 4.



Rys. 4. Termometr elektroniczny wykorzystywany do badań

W celu precyzyjnego określenia siły oddziaływania na oponę skonstruowano szpulowy czujnik pomiarowy. Tensometry, z których się on składał, zamocowano i połączono ze sobą tak, aby opisywany element był niewrażliwy na występowanie momentu gnącego oraz zmiany temperatury. Szpulowy czujnik pomiarowy zaprezentowano na rysunku 5.



Rys. 5. Szpulowy czujnik pomiarowy

Wszystkie opisywane elementy składające się na stanowisko pomiarowe, połączone ze sobą w sposób umożliwiający napełnienie opony, przedstawiono na rysunku 6.



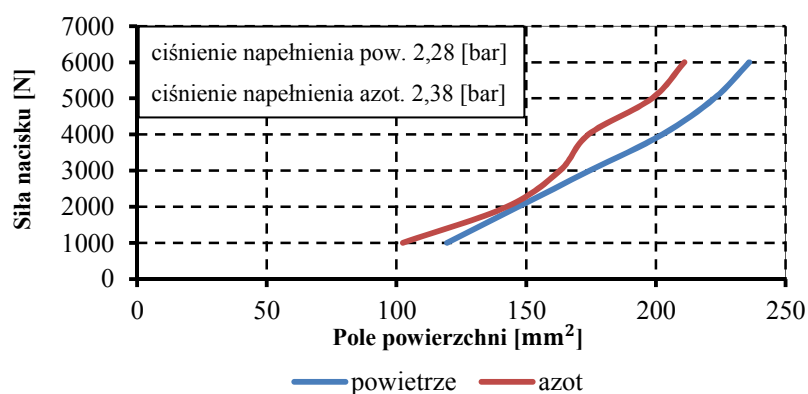


Rys. 6. Urządzenie służące do wyznaczania sztywności promieniowej opon samochodowych wraz z o urządzeniami pomiarowymi

### 3.3. Zestawienie wyników badań

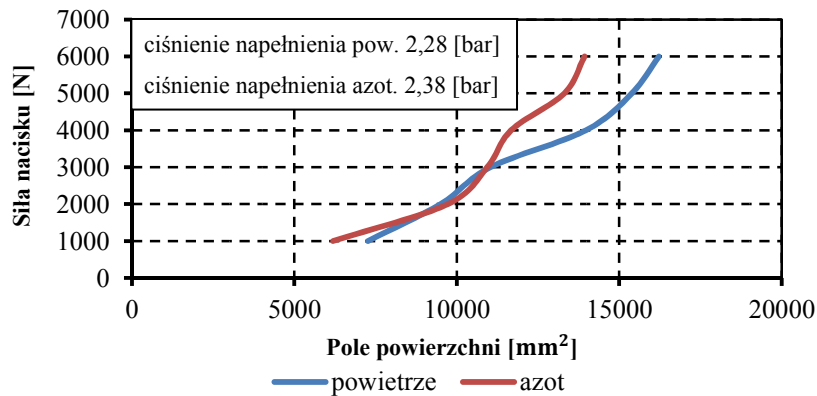
Po wykonaniu eksperymentu stwierdzono, że największe różnice pomiędzy sztywnością promieniową opony napełnionej powietrzem oraz azotem wystąpiły przy spadku temperatury o  $25^{\circ}\text{C}$ , tj. z  $10^{\circ}\text{C}$  (temperatury równowagi ciśnienia – 2,62 bar) do temperatury  $-15^{\circ}\text{C}$ , przy której ciśnienie w oponie napełnionej powietrzem spadło do 2,28 bar, a azotem do 2,38 bar.

Na rysunku 7 przedstawiono porównanie wpływu siły promieniowej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na długość odcisku pozostawionego przez oponę przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$ , natomiast na rysunku 8 – porównanie wpływu siły promieniowej oddziałującej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na pole powierzchni odcisku pozostawionego przez oponę przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$ .

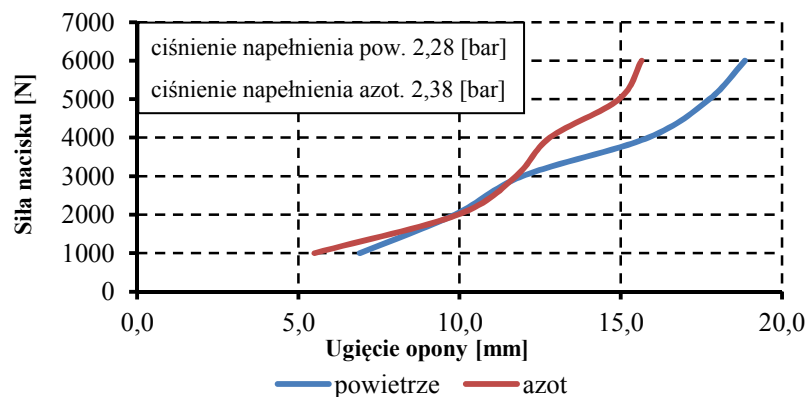


Rys. 7. Porównanie wpływu siły promieniowej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na długość odcisku pozostawionego przez oponę przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$

Rysunek 9 zawiera porównanie wpływu siły promieniowej oddziałującej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na ugięcie opony przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$ .



Rys. 8. Porównanie wpływu siły promieniowej oddziałującej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na pole powierzchni odcisku pozostawionego przez oponę przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$



Rys. 9. Porównanie wpływu siły promieniowej oddziałującej na oponę napełnioną powietrzem oraz azotem na ugięcie opony przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$

#### 4. WNIOSKI

1. Przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$  opona napełniona azotem charakteryzuje się większą sztywnością promieniową niż opona napełniona powietrzem.
2. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zasadnicze różnice w sztywności promieniowej pomiędzy oponami napełnionymi powietrzem a azotem są widoczne przy nacisku powyżej 3000 N.
3. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że azot jest w pewnym stopniu mniej wrażliwy na zmianę temperatury niż powietrze.

## LITERATURA

Henzel Z., Żylski W., 2000. Mechanika ogólna. OWPR Rzeszów.

Kulikowski K., Szpicla D., 2014. Wyznaczanie sztywności kierunkowych opon pojazdów samochodowych w warunkach statycznego działania obciążenia. Eksploatacja i niezawodność. PNTTE Warszawa.

Luty W., Simiński P., 2008. Analiza sprężystości promieniowej ogumienia 14.00R20 z wkładką typu Run-Flat. Czasopismo Techniczne, Mechanika 6-M, 131-138.

Nader J., 2007. Tire nitrogen filling system. Clemson University, Clemson.

Różański S., 2012. Fizyka, repetytorium dla studentów pierwszego roku studiów inżynierskich. PWSZ Piła.



# BADANIE ZJAWISKA ZDERZENIA Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH

Przemysław Osowski<sup>1</sup>, Tomasz Piątkowski

## 1. WSTĘP

Każde opakowanie powinno zapewniać skuteczną ochronę zawartego w nim produktu przed mechanicznym uszkodzeniem, np. spowodowanym uderem z nieodkształcalnym podłożem, z innymi ładunkami lub elementami wykonawczymi manipulatorów. Klasykne podejście w projektowaniu zakładanych zdolności ochronnych opakowań [Svanes i Vold 2010, Azzi i Battini 2012, Jiang i Wang 2012] polega na wielokrotnym wykonywaniu sekwencji czynności: budowanie prototypów opakowań [ASTM D6192-2], ich eksperymentalne badanie zgodnie z normami (ASTM D1596-97 [2011], ISO 2248 [1985], PN-EN 22248 [2001]), wprowadzanie zmian konstrukcyjnych – aż do uzyskania oczekiwanego efektu. Badania eksperymentalne tego typu są długotrwałe i kosztowne, dlatego w procesie projektowym należy dążyć do ich zminimalizowania stosując wspomaganie komputerowe, np. wykorzystując metodę elementów skończonych [Mills i Masso-Moreu 2005, Piątkowski 2010]. Z analizy danych literaturowych [Neumayer 2006, Lobo i Croop 2009] wynika, że do badań przebiegu zjawiska uderu opakowań można by zastosować środowisko LS-DYNA – dedykowane do analiz procesów szybkozmiennych. Problemem w zastosowaniu tego narzędzia jest konieczność szczegółowej znajomości właściwości mechanicznych materiałów konstrukcyjnych stosowanych w opakowaniach – zwykle przez dostawców nieudostępnianych.

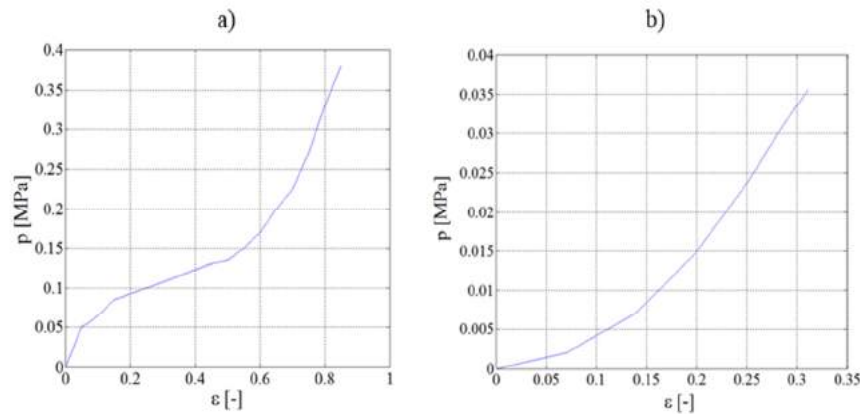
Kluczową rolę w konstrukcji opakowań stanowią wypełnienia (struktury, elementy, układy) przeciwwstrząsowe. Zadaniem tych wypełnień jest pochłanianie i rozproszenie energii kinetycznej wyzwalanej przy nagłym zatrzymaniu obiektu podczas uderu. Jednym z częściej stosowanych materiałów przeciwwstrząsowych jest polistyren spieniony (EPS).

Podczas transportu towary narażone są zwykle na upadek z wysokości 15÷45 cm (wg Yama [2009], wysokość upadku dotycząca ok. 75% towarów przewożonych od producenta do dostawców). Na skutek uderu w strukturach przeciwwstrząsowych wykonanych z EPS powstają głównie naprężenia ściskające, których wartość rośnie wraz ze wzrostem wysokości spadku i masy opakowania.

Spośród modeli materiałów wykorzystywanych w środowisku numerycznym LS-dyna do odzwierciedlenia zachowania się układów przeciwwstrząsowych wykonanych z pianek o zamkniętych komórkach (w tym EPS [Fu-de i in. 2013]) często wykorzystywany jest MAT\_LOW\_DENSITY\_FOAM [Lobo i Croop 2009, LS-DYNA... 2012]. W przypadku tego materiału kluczowym parametrem wymaganym przez aplikację LS-DYNA jest charakterystyka przedstawiająca naprężenia ściskające w funkcji odkształcenia względnego (rys. 1).

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, Wydział Inżynierii Mechanicznej, Zakład Mechaniki Stosowanej, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-789 Bydgoszcz,, e-mail: przemyslaw.osowski@utp.edu.pl



Rys. 1. Wykres naprężenia ściskającego w funkcji odkształcenia względnego (pianki o zamkniętych komórkach) wyznaczony podczas prób: a) ściskania na maszynie wytrzymałościowej przy zadanej stałej prędkości odkształcenia 1 mm/s [Lobo i Croop 2009], b) swobodnego spadku na nieodkształcane podłoże z wysokości  $h = 0,45$  m (uśredniony przebieg z pięciu prób udaru) [opracowanie własne]

Krzywa przedstawiona na rysunku 1a wyznaczona jest na podstawie badań eksperymentalnych realizowanych na maszynie wytrzymałościowej z zadaną stałą prędkością odkształcenia, a na rysunku 1b – na podstawie danych zarejestrowanych podczas prób swobodnego spadku ładunku z wysokości  $h = 0,45$  m na nieodkształcalne podłoże (szczegółowy opis ładunku w dalszej części pracy).

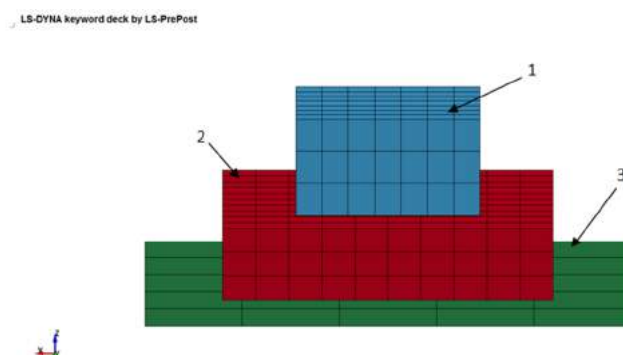
Krzywa z rysunku 1a nie odzwierciedla rzeczywistego przebiegu procesu odkształcania materiału podczas udaru. W realnych warunkach prędkość odkształcenia ładunku jest funkcją czasu: prędkość odkształcenia największą wartość osiąga podczas inicjacji zderzenia, a zero – w chwili uzyskania maksymalnego odkształcenia. Stąd wniosek, że krzywa (dostępna w danych literaturowych [Lobo i Croop 2009], rys. 1a) nie może być wykorzystana podczas symulacji zjawiska udaru. Proponowanym w pracy rozwiązaniem jest wyznaczenie krzywej  $p(\varepsilon)$  na podstawie prób swobodnego spadku na nieodkształcalne podłoże (rys. 1b) z zadanej wysokości, np.  $h = 0,45$  m, a następnie wykorzystanie tej krzywej do symulacji udaru z różnymi prędkościami początkowymi (z różnych wysokości swobodnego spadku). Badania wstępne wykazały jednak, że wykorzystanie takiej krzywej w „surowej” postaci nie gwarantuje skutecznej i kończącej się powodzeniem symulacji. Doświadczenia własne wskazują, że krzywa ta wymaga modyfikacji. Modyfikacja powinna polegać na wydłużeniu krzywej i wymuszeniu przebiegu jej końcowego odcinka równoległe do osi „y”.

Zasadniczym celem pracy jest prezentacja metody modyfikacji charakterystyki  $p(\varepsilon)$  (uzyskanej z prób eksperymentalnych udaru), w której zastosowano optymalizację gradientową SQP krzywej b-sklejanej trzeciego stopnia. Celem dodatkowym jest przedstawienie wyników badań numerycznych udaru opakowania dla różnych wysokości swobodnego spadku z wykorzystaniem uzyskanej wcześniej charakterystyki  $p(\varepsilon)$ . Wyniki badań numerycznych zweryfikowano z danymi otrzymanymi z badań eksperymentalnych.

## 2. MODEL NUMERYCZNY PROCESU ZDERZENIA

### 2.1. Model opakowania

Na rysunku 2 przedstawiono uproszczony model numeryczny opakowania (1, 2), który wykorzystano podczas symulacji procesu uderzenia ze sztywną powierzchnią (3) [Piątkowski i Sempruch 2008, 2009, Chen i in. 2013]. Opakowanie to składa się z produktu (1) (umieszczonego na materiale przeciwwstrząsowym (2)). Produkt (aluminiowy prostopadłościan o wymiarach  $0,076 \times 0,076 \times 0,04$  m i masie 0,4 kg) wraz z materiałem przeciwwstrząsowym (prostokątny wykonany z polistyrenu spienionego (EPS) o wymiarach  $0,136 \times 0,136 \times 0,03$  m) podczas symulacji nadano im prędkość początkową uzyskiwaną podczas swobodnego spadku z wysokości  $h = [0,15; 0,3; 0,45; 0,6]$  m.



Rys. 2. Model numeryczny opakowania podczas symulacji uderzenia: 1 – ładunek, 2 – materiał przeciwwstrząsowy, 3 – sztywne podłoże [opracowanie własne]

Prędkość tę wyznaczamy z następującego wzoru:

$$V = \sqrt{2gh} \quad (1)$$

gdzie:

- $V$  – prędkość ładunku i materiału przeciwwstrząsowego w momencie zderzenia z podłożem,
- $g$  – przyspieszenie ziemskie,
- $h$  – wysokość swobodnego spadku.

Sztywną powierzchnię utworzono (w pliku \*.k LS-DYNA) zgodnie z instrukcją \*RIGIDWALL\_PLANAR\_FORCE. Wizualizację tego elementu prezentuje obiekt SHELL. Pomiędzy blokiem EPS a ładunkiem zastosowano kontakt AUTOMATIC\_SURFACE\_TO\_SURFACE [LS-DYNA 2012].

W elemencie 2 został zastosowany MAT\_LOW\_DENSITY\_FOAM (MAT 57) [LS-DYNA 2012]. Parametry potrzebne do zdefiniowania materiału (gęstość, krzywa  $p(\epsilon)$ ) zostały uzyskane z badań eksperymentalnych. Punkty wyznaczające krzywą  $p(\epsilon)$  (po jej modyfikacji – opisanej w dalszej części pracy) wprowadzono do sekcji \*DEFINE\_CURVES [LS-DYNA 2012]. Interpretacje fizyczne zastosowanych słów kluczowych LS-DYNY przedstawiono w kolejnym podpunkcie.

W rzeczywistym opakowaniu (stosowanym podczas badań doświadczalnych) produkt (1) stanowił trójosiowy rejestrator przyspieszeń firmy Lansmont, który znajdował

się w sześciennym opakowaniu kartonowym (o długości krawędzi 136 mm) wypełnionym EPS o grubości 0,03 m.

## 2.2. Interpretacja fizyczna słów kluczowych LS-DYNY

W modelu wykorzystującym metodę elementów skończonych stosuje się specyficzne słownictwo, które nie jest zrozumiałe dla osoby nieposługującej się środowiskiem LS-DYNA. Sens fizyczny słów kluczowych przedstawiony został w poniższym opisie [Hallquist 2006, LS-DYNA 2012]:

\*MAT\_LOW\_DENSITY\_FOAM – model jednego z materiałów dostępnych w środowisku LS-DYNA. Materiał ten dedykowany jest do modelowania materiałów o dużej ściśliwości i małej gęstości. Do najważniejszych parametrów tego modelu, mających bardzo duży wpływ na przebieg sił reakcji występujących podczas udaru, należą: krzywa dynamicznego ściskania  $p(\varepsilon)$ , moduł Younga  $E$ , gęstość  $\rho$ , współczynnik tłumienia DAMP, współczynniki kształtu (HU, BETA, SHAPE – odpowiedzialne za przebieg udaru podczas etapu odciążania). Moduł Younga wyznaczany jest na podstawie badań statycznego ściskania ( $E = 1,5$  MPa), gęstość stanowi iloraz masy do objętości próbki ( $\rho = 20$  kg·m<sup>-3</sup>). Współczynnik tłumienia (DAMP = 0,5) i współczynniki kształtu (HU = 0,4, BETA = 2, SHAPE = 12) dobierane są metodą prób i błędów. Krzywa dynamicznego ściskania  $p(\varepsilon)$  określana jest na podstawie metody proponowanej w pracy: krzywa  $p(\varepsilon)$  dopasowywana jest (w wyniku optymalizacji numerycznej) do uśrednionej krzywej dynamicznego ściskania uzyskanej na podstawie przebiegów przyspieszeń zarejestrowanych podczas badań eksperymentalnych swobodnego spadku opakowania z wysokości  $h = 0,45$  m, która będzie opisana w kolejnym podpunkcie.

\*DEFINE\_CURVES – sposób zapisu krzywej dynamicznego ściskania  $p(\varepsilon)$  w formie dwukolumnowej tabeli: kolumna pierwsza dotyczy odkształcenia względnego  $\varepsilon$  [–], a druga – naprężenia ściskającego  $p$  [MPa].

\*RIGIDWALL\_PLANAR\_FORCE – prezentuje najprostszyp przypadk kontakt; jest to numeryczna interpretacja geometrycznie sztywnej ściany.

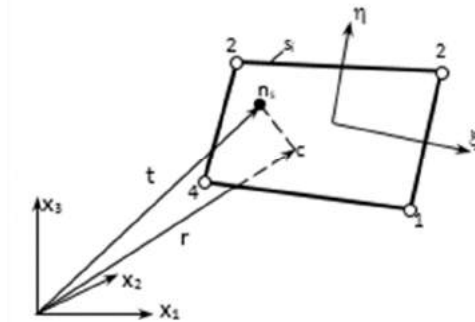
\*CONTACT\_AUTOMATIC\_SURFACE\_TO\_SURFACE – algorytm pozwalający zdefiniować pary ciał znajdujące się w kontakcie. Podczas definiowania kontaktu należy wskazać kompletne obiekty wchodzące w kontakt (metoda najczęściej stosowana) lub węzły siatek tych ciał z warstw przyległych do strefy kontaktu. W algorytmie CONTACT\_AUTOMATIC\_SURFACE\_TO\_SURFACE przyjęto, że kontakt wystąpi na całej powierzchni przylegających ciał. Jedną z powierzchni identyfikowaną jest jako „master”, a druga jako „slave”. W układach symetrycznych decyzja, które z ciał reprezentuje powierzchnię „master”, a które „slave” jest przypadkowa. Jeśli układy nie są symetryczne, wówczas powierzchnią „master” powinna być powierzchnia o większych rozmiarach siatki lub powierzchnia należąca do ciała o większej gęstości. Węzły leżące na tych powierzchniach także są odpowiednio identyfikowane jako: „master” i „slave”. Przyjęto ponadto, że węzły „slave” ślizgają się po powierzchni „master” i pozostają w kontakcie z powierzchnią „master” aż do zaniku sił ściskających, tzw. interface forces (siły penetracji). Siły penetracji wyznaczane są, jeśli występuje penetracja powierzchni master przez węzeł slave tzn.:

$$l = n_i \times [t - r(\xi_c - \eta_c)] < 0 \quad (2)$$



gdzie:

- $n_i$  – normalna do powierzchni „master”  $s_i$ ,
- $t$  – wektor pozycji wyciągnięty do węzła „slave”  $n_s$  (rys. 3),
- $r$  – wektor pozycji wyciągnięty do punktu kontaktu, który jest rzutem prostopadłym węzła „slave”  $n_s$  na płaszczyznę „master”,
- $\xi_c, \eta_c$  – współrzędne punktu kontaktu na płaszczyźnie „master”  $s_i$ .



Rys. 3. Położenie punktów kontaktu  $c$  wtedy, gdy  $n_s$  leży powyżej płaszczyzny „master”  
[Hallquist 2006]

Każdy węzeł „slave” jest sprawdzany pod względem przenikania. Jeśli węzeł „slave”  $n_s$  przeniknął przez płaszczyznę „master”  $s_i$ , wtedy wzrost siły penetracji jest proporcjonalny do wartości przeniknięcia (penetracji):

$$f_s = \begin{cases} -lk_i n_i & \text{if } l < 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

gdzie:

$k_i = \frac{f_{si} K_i A_i^2}{V_i}$  – współczynnik sztywności dla płaszczyzny „master”  $s_i$ ,

$f_{si}$  – współczynnik skali sztywności powierzchni podczas kontaktu,

$K_i, V_i, A_i$  – współczynnik sprężystości objętościowej, objętość i powierzchnia kontaktu.

Współczynnik sztywności  $k_i$  jest funkcją parametru modelu materiału i geometryczną konfiguracją ciał będących w kontakcie.

### 2.3. Krzywa b-sklejana

W celu wyznaczenia zmodyfikowanego przebiegu krzywej  $p(\varepsilon)$  (wymaganego przez algorytm LS-DYNY zgodnie z ustaleniami przyjętymi we wstępie pracy) wykorzystano krzywą b-sklejaną trzeciego stopnia [Piątkowski i in. 2012]. Krzywą tę zastosowano ze względu na jej zasadniczą cechę: zdolność do odwzorowywania skomplikowanych kształtów za pomocą niewielkiej liczby punktów kontrolnych. Krzywe sklejaną powszechnie stosowane są w graficznych edytorach numerycznych (np. programy typu CAD). Przebieg krzywej określa liniowa kombinacja punktów kontrolnych ( $P_i$ ) i funkcji bazowej ( $N_{i,k}$ ) określona według funkcji [Patrikalakis i Maekawa 2001]:

$$r(t) = \sum_{i=0}^n P_i N_{i,k}(t), \text{ gdzie } n \geq k - 1 \quad (4)$$

gdzie:

$t \in \langle 0, n + k + 1 \rangle$  – parametr,

$P$  – punkty kontrolne,

$n$  – liczba punktów kontrolnych  $P$ ,

$k$  – stopień wielomianu krzywej b-sklejanej,

$i = 0, 1, 2, \dots, n$  – indeks punktów kontrolnych,

$N_{i,k}(t)$  – funkcje bazowe krzywej b-sklejanej stopnia  $k$ .

Funkcję  $N_{i,k}(t)$  dla  $i = 0, 1, \dots, n$  wyznacza się za pomocą wzoru [Patrikalakis i Maekawa 2001]:

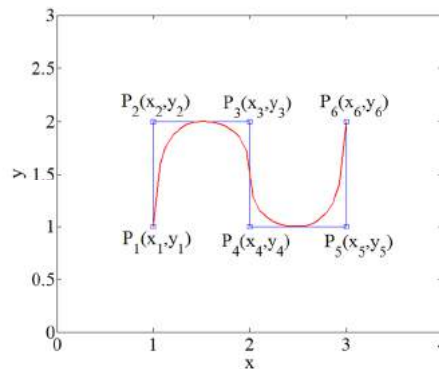
$$N_{i,k}(t) = \begin{cases} 1 & \text{dla } u_i \leq t < u_{i+1} \\ 0 & \text{dla } t < u_i \text{ lub } t \geq u_{i+1} \end{cases} \quad (5)$$

dla  $k = 1$ . Gdy  $k > 1$  [10]:

$$N_{i,k}(t) = \frac{t - u_i}{u_{i+k-1} - u_i} N_{i,k-1}(t) + \frac{u_{i+k} - t}{u_{i+k} - u_{i+1}} N_{i+1,k-1}(t) \quad (6)$$

gdzie:

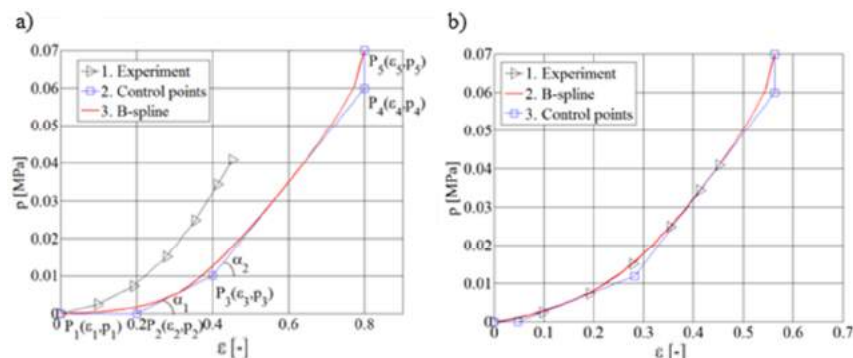
$u_i$  – węzły krzywej.



Rys. 4. Przykładowy przebieg krzywej b-sklejanej:  $P$  – punkty kontrolne [opracowanie własne]

## 2.4. Zadanie optymalizacji

Zmodyfikowany przebieg krzywej  $p(\varepsilon)$  (wymagany w środowisku LS-DYNA) wyznaczono za pomocą optymalizacji numerycznej. Optymalizacja ta polega na dopasowaniu krzywej b-sklejanej do rzeczywistego przebiegu naprężenia ściskającego  $p(\varepsilon)$  zarejestrowanego podczas badań doświadczalnych udaru (rys. 5a, uśrednionego z pięciu prób udaru swobodnego spadku z wysokości  $h = 0,45$  m).



Rys. 5. Przebieg krzywej b-sklejanej: a) stan przed optymalizacją, b) stan po optymalizacji [opracowanie własne]

Celem optymalizacji jest także wydłużenie krzywej b-sklejanej stycznie do asymptoty pionowej, wykraczając poza zakres naprężenia uzyskanego podczas badań eksperymentalnych (rys. 5b). Do rozwiązania tego zadania zastosowano metodę gradientową – algorytm sekwencyjnego programowania kwadratowego (SQP) [Layffer i Mahajan 2010]. Minimalizowanym kryterium oceny jest suma kwadratów różnic przebiegu naprężenia ściskającego (symulowanego i rzeczywistego):

$$\min Q(X) = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (7)$$

gdzie:

$X = [x_2, x_3, y_3, x_4]$  – wektor zmiennych decyzyjnych,

$\hat{y}_i, y_i$  – i-ta współrzędna toru krzywej  $p(\epsilon)$  wyznaczona odpowiednio podczas symulacji numerycznej oraz podczas badań doświadczalnych.

Ograniczenia zadania optymalizacji wymuszają następstwo punktów kontrolnych (rys. 5a), których celem jest uzyskanie niezapętłonego i wypukłego przebiegu krzywej sklejanej:

$$x_3 - x_4 < 0 \quad (8)$$

$$x_2 - x_3 < 0 \quad (9)$$

$$-x_2 < 0 \quad (10)$$

$$y_3 - y_{\max} < 0 \quad (11)$$

$$y_3 < 0 \quad (12)$$

$$x_4 - x_{\max} < 0 \quad (13)$$

$$\alpha_1 - \alpha_2 < 0 \quad (14)$$

Przyjęto, iż całkowity przebieg naprężeń ściskających w funkcji odkształcenia wyznaczony jest przez 5 punktów kontrolnych, z których 4 współrzędne są zmiennymi decyzyjnymi, a pozostałym współrzędnym przypisano stałe wartości:

$$x_1 = 0; \quad y_1 = 0; \quad y_2 = 0; \quad y_{\max} = 0,06; \quad x_5 = 0,9 \quad (15)$$

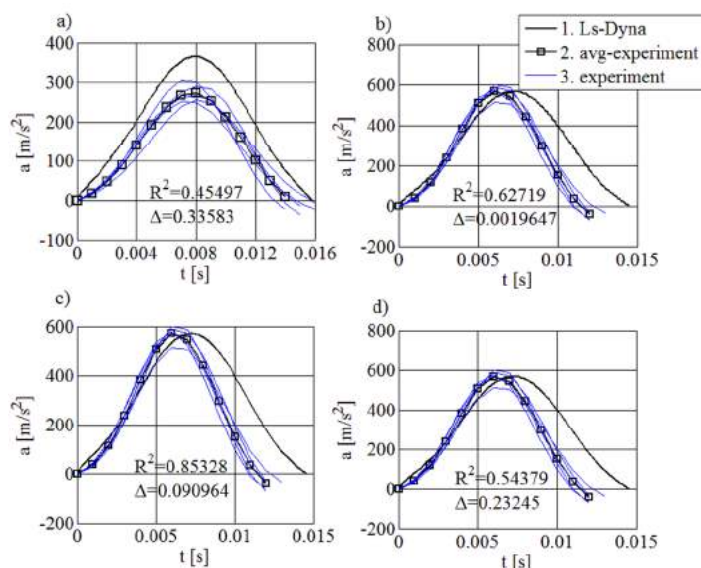
### 3. WYNIKI SYMULACJI I ICH ANALIZA

Na rysunku 6 przedstawiono wyniki przyspieszeń wyznaczonych podczas symulacji procesu zderzenia opakowania z nieodkształcalnym podłożem przy swobodnym spadku z wysokości  $h = [0,15; 0,3; 0,45; 0,6]$  m (krzywe oznaczone odnośnikiem (1)) oraz zarejestrowane podczas badań doświadczalnych (oznaczone odnośnikiem (2) i (3)). Odnośnik (3) dotyczy przebiegów przyspieszeń zarejestrowanych podczas 5 prób udaru, a odnośnik (2) – ich przebiegu uśrednionego. W celu oceny dopasowania danych teoretycznych z rzeczywistymi zastosowano współczynnik determinacji  $R^2$  oraz błąd względny  $\Delta$ :

$$\Delta = \frac{|\hat{a}_{\max} - a_{\max}|}{a_{\max}} \quad (16)$$

gdzie:

$\hat{a}_{\max}$ ,  $a_{\max}$  – maksymalna wartość przyspieszenia wyznaczona na podstawie wyników symulacji (1) oraz badań doświadczalnych (2).

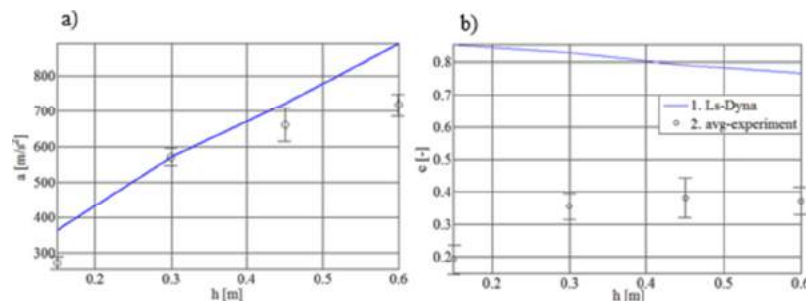


Rys. 6. Wykresy przyspieszeń wyznaczonych podczas udaru przy próbie swobodnego spadku na nieodkształcalne podłoże z wysokości: a)  $h = 0,15$  m, b)  $h = 0,3$  m, c)  $h = 0,45$  m, d)  $h = 0,6$  m [opracowanie własne]

Z analizy zaprezentowanych wykresów wynika, że dane uzyskane na podstawie symulacji odzwierciedlają naturalny charakter procesu udaru –  $R^2 > 0$ . Najwyższą zgodność przebiegów i wartości maksymalnych przyspieszeń uzyskano dla prób swobodne-

go spadku najbardziej zbliżonych do wysokości  $h = 0,45$  m ( $R^2 = 0,853$ , gdy  $h = 0,45$  m oraz  $\Delta = 0,0019$ , gdy  $h = 0,3$  m). Efekt ten spowodowany jest tym, że wartość  $h = 0,45$  m jest „bazową” wysokością, dla której wyznaczono krzywą  $p(\varepsilon)$  (opisującą właściwości dynamiczne zastosowanego w opakowaniu materiału przeciwwstrząsowego). Rozbieżności wyników badań (doświadczalnych i numerycznych) znajdują się w zakresie bezpiecznym dla produktów; opakowania (projektowane na podstawie wyników badań numerycznych) będą przystosowane do tłumienia większych przeciążeń niż w rzeczywistości im nadawane.

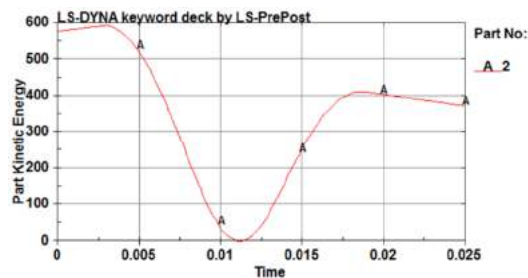
Wykres z rysunku 7a (opracowany na podstawie rys. 6) przedstawia przedziały ufności, w której zawierają się rzeczywiste wartości średniej przyspieszeń przy poziomie ufności 95% oraz wartości przyspieszeń wyznaczone na podstawie symulacji modelu numerycznego. W przedziale ufności zawiera się tylko wynik uzyskany podczas symulacji uderu dla  $h = 0,3$  m.



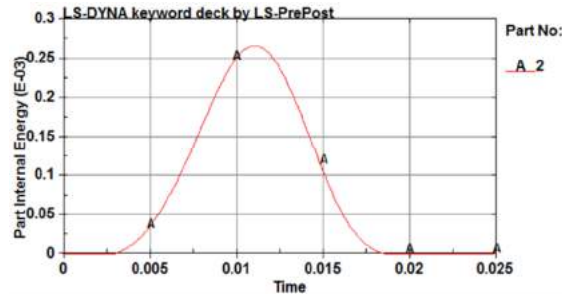
Rys. 7. Zbiorcze wykresy: a) (maksymalnych przyspieszeń) wyznaczone na podstawie rysunku 6, b) współczynnik restytucji [opracowanie własne]

Na rysunku 7b przedstawiono współczynniki restytucji w funkcji wysokości swobodnego spadku, wyznaczone na podstawie badań doświadczalnych oraz symulacji modelu LS-DYNY. Analiza wskazuje, że współczynnik restytucji uzyskany w wyniku symulacji jest znacznie większy od wyznaczonego podczas badań eksperymentalnych. Oznacza to, że model numeryczny ma mniejszą zdolność rozpraszania energii uderu niż obiekt rzeczywisty. Ponadto współczynnik restytucji oznaczony odnośnikiem (1) osiąga coraz mniejszą wartość wraz ze wzrostem wysokości swobodnego spadku. Taki trend współczynnika restytucji potwierdzany jest w literaturze, np. [Gilardi i Sharf 2002].

Przebiegi wartości energii kinetycznej i wewnętrznej (rys. 8 i 9) wyznaczone podczas symulacji modelu numerycznego są zgodne z teorią zderzenia niesprężystego.



Rys. 8. Wykresy zmian energii kinetycznej ładunku podczas swobodnego spadku z wysokości  $h = 0,15$  m na nieodkształcalne podłoże [opracowanie własne]



Rys. 9. Wykresy zmian energii wewnętrznej ładunku podczas swobodnego spadku z wysokości  $h = 0,15$  m na nieodkształcalne podłoże [opracowanie własne]

#### 4. PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono metodę wyznaczania krzywej naprężenia ściskającego w funkcji odkształcenia dla materiału niejednorodnego (EPS) w wyniku optymalizacji numerycznej. Metoda ta została zweryfikowana podczas badań numerycznych i doświadczalnych swobodnego spadku opakowania na nieodkształcalne podłoże. Porównywano wartości maksymalnych przyspieszeń, czas trwania udaru, kształt linii wykresu przyspieszenia. Wyniki badań numerycznych i doświadczalnych nie są w pełni zgodne. Największe rozbieżności występują dla skrajnych wartości przedziału wysokości  $h$  przyjętego w planie badań. Rozbieżności te jednak nie dyskwalifikują przyjętej metodyki – przyspieszenia wyznaczone numerycznie są większe od zarejestrowanych podczas badań doświadczalnych. Dzięki temu próg bezpieczeństwa dla projektowanych opakowań jest podwyższony.

Współczynnik restytucji wyznaczony zarówno na podstawie badań numerycznych, jak i doświadczalnych potwierdza charakter zderzenia niesprężystego. Przyjęta konfiguracja modelu numerycznego wykazuje znacznie mniejszą zdolność rozpraszania energii udaru niż rzeczywisty obiekt badań. Wykres energii kinetycznej modelu numerycznego ładunku również potwierdza naturę zderzenia niesprężystego.

Podjęta w pracy tematyka badawcza powinna być kontynuowana. Istnieje potrzeba opracowania skuteczniejszych narzędzi opisu elementów przeciwwstrząsowych przy jednoczesnym zminimalizowaniu nakładu badań doświadczalnych (niezbędnych do wyznaczenia charakterystyk materiałów konstrukcyjnych).

#### LITERATURA

ASTM D6192-2 – Standard Guide for Transport Packaging Design.

ASTM D1596-97, 2011. Standard Test Method for Dynamic Shock Cushioning Characteristic of Packaging Material.

Azzi A., Battini D., 2012. Packaging Design: General Framework and Research Agenda. John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 25(8), 435-456.

Chen Z., Katsuhiko S., Kawaguchi K., 2013. Improvement of Equivalent Drop Theory for Transport Packaging., John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 26(2), 67-81.

- Fu-de L., Wei-ming T., De G., 2013. Virtual Mass Method for Solution of Dynamic Response of Composite Cushion Packaging System. John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 26, S1, 32-34.
- Gilardi G., Sharf I., 2002. Literature survey of contact dynamics modelling. Mechanism and Machine Theory 37, 1213-1239.
- Hallquist J., 2006. LS-DYNA Theory Manual.
- ISO 2248:1985. Packaging: Complete, filled transport package – Vertical impact test by dropping.
- Jiang J.-H., Wang Z.-W., 2012. Dropping Damage Boundary Curves for Cubic and Hyperbolic Tangent Packaging Systems Based on Key Component. John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 25(7), 397-411.
- Layffer S., Mahajan A., 2010. Foundations of Constrained Optimization. Argonne National Laboratory.
- Lobo H., Croop B. 2009. Selecting Material Models for the Simulation of Foams in LS-DYNA. 7<sup>th</sup> European LS-DYNA Conference, Stuttgart, 10<sup>th</sup> June.
- LS-DYNA Keyword User Manual Volume I and II. Livermore Software Technology Corporation, August 2012, Version 971 R6.1.0.
- Mills N.J., Masso-Moreu Y., 2005. Finite element analysis (FEA) applied to polyethylene foam cushions in package drop test. John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 18(1), 29-38.
- Neumayer D., 2006. Drop Test Simulation of a Cooker Including Foam Packaging and Pre-stressed Plastic Foil Wrapping. 9th International LS-DYNA Conference, Dearborn, Michigan, USA, 6<sup>th</sup> June.
- Patrikalakis N.M., Maekawa T., 2001. Shape Interrogation for Computer Aided Design and Manufacturing. Springer-Verlag, June.
- Piątkowski T., 2010. Active fence with flexible link. Journal of Theoretical and Applied Mechanics 48(1), 87-109.
- Piątkowski T., Sempruch J., 2008. Model of the process of load unit stream sorting by means of flexible active fence. Mechanism and Machine Theory 43(5), 549-564.
- Piątkowski T., Sempruch J., 2009. Model of inelastic impact of unit loads. John Wiley & Sons, Packaging Technology and Science 22(1), 39-51.
- Piątkowski T., Sempruch J., Tomaszewski T., 2012. Spatial approximation of impact test results of unit load. Journal of Polish CIMAC 7(3), 243-251.
- PN-EN 22248:2001P: Opakowania – Opakowania transportowe z zawartością – Metoda badania odporności na uderzenia przy swobodnym spadku.
- Svanes Erik, 2010. Vold Mie: Sustainable packaging design: a holistic methodology for packaging design. John Wiley & Sons Packaging Technology and Science 23(3), 161-175.
- Yam K.L., 2009. Encyclopedia of packaging technology. John Wiley & Sons.





# PROBLEMATYKA PRZESTRZENNEJ PRACY KONSTRUKCJI NA PRZYKŁADZIE ŻELBETOWEGO OSTROŚŁUPA

Magdalena Sosnowska<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

W projektowaniu inżynierskim dąży się do racjonalnego upraszczania schematów obliczeniowych konstrukcji. Obiekty przestrzenne, takie jak hale żelbetowe czy wielospadowe dachy drewniane, obliczane są na ogół jako szereg części składowych jedno- lub dwuwymiarowych. Wiąże się to z przyjęciem odpowiednich założeń upraszczających i warunków brzegowych. Z analizy konstrukcji wynika jednak, że projektowanie przestrzenne ustroju jest niekiedy wymagane ze względów bezpieczeństwa.

## 2. CHARAKTERYSTYKA KONSTRUKCJI OBIEKTU

Przeprowadzona analiza dotyczy budynku muzeum o kształcie piramidy, zbudowanej na bazie kwadratu. Ma on następujące parametry:

- długość, szerokość 53,94 m,
- wysokość 26,90 m,
- kąt nachylenia ścian 45°,
- liczba kondygnacji 3,
- powierzchnia użytkowa 4524,1 m<sup>2</sup>,
- kubatura netto 26156,6 m<sup>3</sup>.

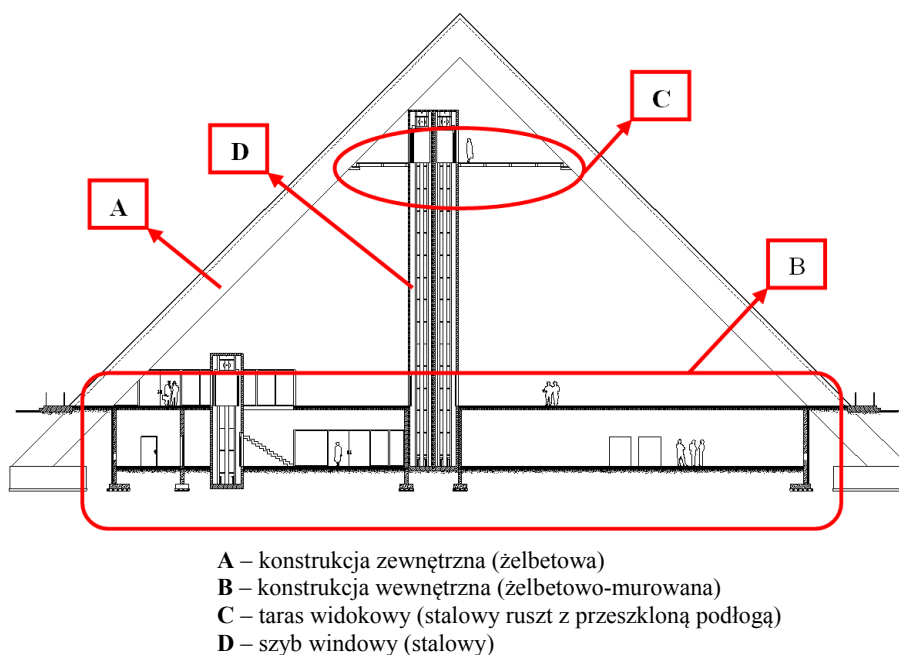
Jest to konstrukcja przede wszystkim żelbetowa. Zawiera jednak części stalowe oraz liczne przeszklenia – dzięki nim wewnątrz jest dobrze oświetlone. W całym obiekcie wydzielono dwie zasadnicze części:

- konstrukcję wewnętrzną – strop żelbetowy, który jest wsparty na ścianach (wewnętrznych murowanych z pustaków Porotherm i zewnętrznych żelbetowych) posadowionych na żelbetowych ławach fundamentowych,
- konstrukcję zewnętrzną (osłonową) w kształcie piramidy – żelbetowy układ płyt opartych na ukośnych belkach (belki w rozstawie 4,50 m, posadowione na ławach fundamentowych). Do piramidy podwieszono stalowy ruszt z przeszkloną podłogą, pełniący funkcję tarasu widokowego.

Podział ten przedstawiono na przekroju pionowym (rys. 1). Z uwagi na duże dysproporcje w wymiarach pomiędzy konstrukcją zewnętrzną a wewnętrzną oraz wynikające z tego znaczne różnice w naprężeniach i deformacjach obie części zostały oddzielone, dzięki czemu pracują oddzielnie.

---

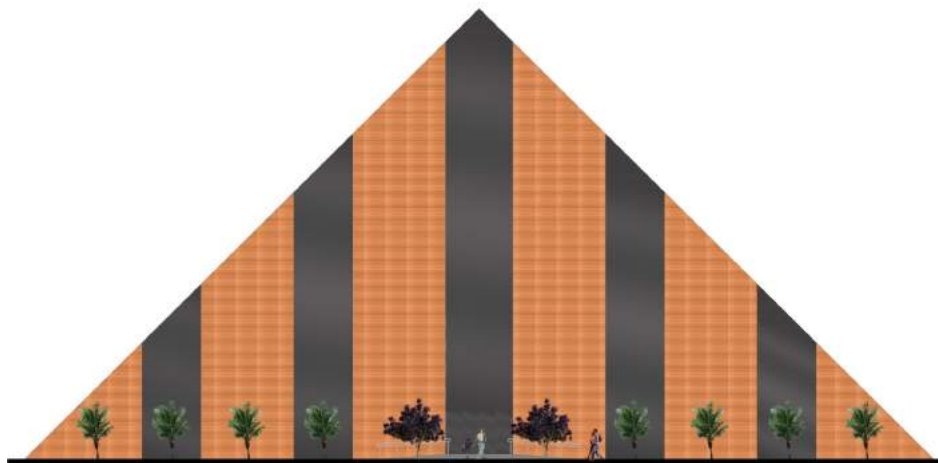
<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska, Katedra Mechaniki Konstrukcji, al. prof. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, e-mail: sosnowska.m@o2.pl



Rys. 1. Przekrój pionowy – główne części budynku [opracowanie własne]

W pracy ograniczono się do zagadnień dotyczących zewnętrznej konstrukcji piramidy. Ma ona własne posadowienie i jest w pełni oddylatowana od wewnętrznej części budynku. Z zewnętrzną piramidą nie współpracuje również stalowy szyb windowy, odsunięty o około 10 mm od rusztu stanowiącego taras. Ważnym etapem projektu było właściwe ukształtowanie konstrukcji zarówno z uwagi na dużą rozpiętość belek ukośnych (12,1÷37,6 m), jak i walory estetyczne. Zaprojektowano ją na wzór dachu kopertowego: belki ukośne, pełniące funkcję krokwi, zostały usztywnione, w co drugim segmencie, za pomocą betonowych płyt a pozostałe przestrzenie między belkami wypełnia przeszklenie (rys. 2). Ze względów estetycznych oraz użytkowych, belki ukośne mają jednakowy przekrój poprzeczny, wynikający z wymiarów belki najbardziej wyężonej.

Całą konstrukcję nośną zaprojektowano z betonu C25/30 i stali A-II 18G2-b. Zbrojenie główne zaprojektowano zgodnie z normą [PN-B-03264:2002], na podstawie algorytmów podanych w monografii Łapki [2007] – w płytach o grubości 15 cm, pracujących jako jednokierunkowo zginane, przyjęto pręty  $\phi 8$  ze stali A-II. W belkach ukośnych o wymiarach 1,0 × 2,0 [m] zastosowano pręty  $\phi 25$  A-II i strzemiona  $\phi 8$  A-II. Z uwagi na bardzo dobre warunki gruntowo-wodne (średnio zagęszczone piaski średnie, poziom wody gruntowej poniżej poziomu posadowienia), zastosowano posadowienie bezpośrednie. Ława fundamentowa ma wysokość 1,50 m i kształt podstawy wydłużony w kierunku działania momentu zginającego [PN-81-B-03020].



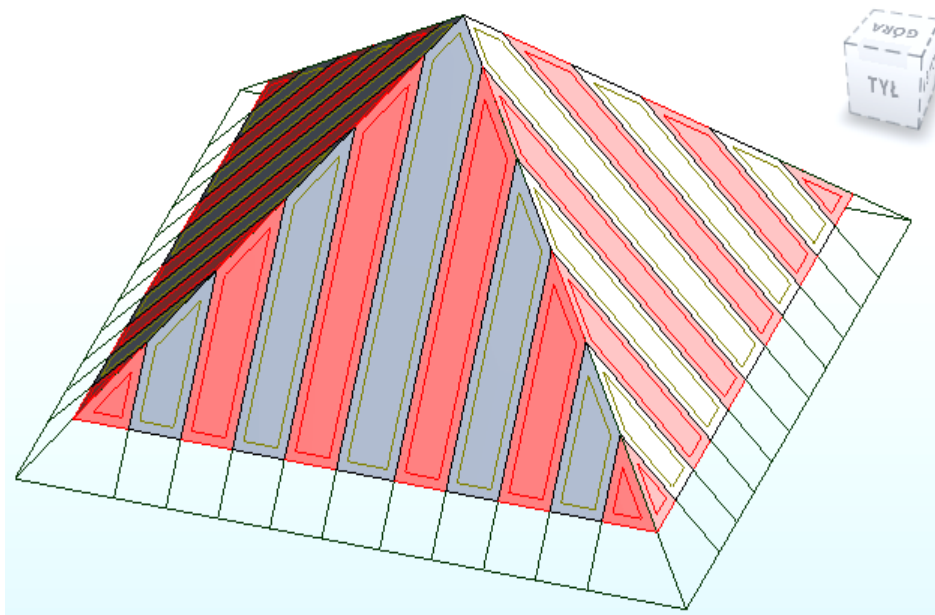
Rys. 2. Elewacja wejściowa [opracowanie własne]

Przy projektowaniu konstrukcji zewnętrznej wzięto pod uwagę: obciążenia stałe oraz środowiskowe (wiatr i śnieg). W pracy ograniczono się do przedstawienia tylko podstawowych informacji o oddziaływaniach zewnętrznych. Wartość charakterystyczna obciążeń stałych (wszystkie warstwy wykończeniowe) została ustalona na podstawie normy [PN-82-B-02001] i wynosi:  $0,78 \text{ kN}\cdot\text{m}^{-2}$ . Obciążenie śniegiem obliczono według normy [PN-80-B-02010], jak dla drugiej strefy śniegowej, natomiast obciążenie wiatrem według normy [PN-77-B-02011], jak dla I strefy wiatrowej i terenu B. Przyjęto również obciążenie technologiczne o wartości  $0,4 \text{ kN}\cdot\text{m}^{-2}$ . Najdłuższe belki ukośne są obciążone reakcjami z tarasu widokowego – ruszt oparto na wspornikach stalowych mocowanych do konstrukcji zewnętrznej. Ponadto belki ukośne są częściowo obciążone gruntem – do wysokości 3,78 m. W poziomie posadowienia występują piaski średnie, średnio zagęszczone i mało wilgotne. Ciężar gruntu oraz jego parametry geotechniczne przyjęto na podstawie normy [PN-81-B-03020].

### 3. OBLICZENIA PRZESTRZENNEJ KONSTRUKCJI ZEWNĘTRZNEJ PIRAMIDY

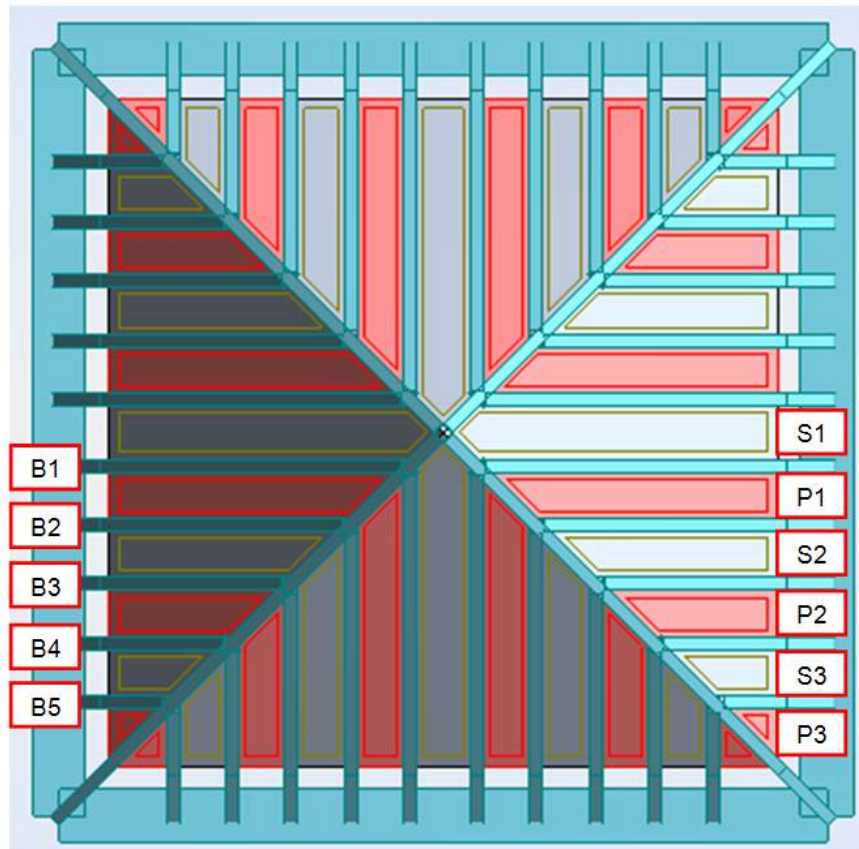
Z uwagi na typowo przestrzenny charakter konstrukcji obliczenia statyczne przeprowadzono w programie Autodesk Robot Structural Analysis, wykorzystującym metodę elementów skończonych. Schemat statyczny projektowanego obiektu przyjęto jako układ belek ukośnych i płyt. Wizualizację analizowanego ustroju w programie Robot przedstawiono na rysunku 3 – elementy jaśniejsze to żelbetowe płyty, natomiast ciemniejsze to przeszklenia opisane w postaci okładzin. Na rysunku 4 wprowadzono natomiast dodatkowe oznaczenia płyt i belek, opisane w dalszej części pracy. Najdłuższe, narożne belki żelbetowe połączone są w wierzchołku. Do nich dochodzą kolejne, o coraz mniejszej długości. Dodatkowo wszystkie belki połączone są wspólną ławą fundamentową, zaprojektowaną po obwodzie budynku. Wszystkie połączenia elementów żelbetowych przyjęto jako sztywne. Dzięki temu została zapewniona odpowiednia sztywność i współpraca przestrzenna całej konstrukcji. W programie Robot dobrano odpowiednie profile belek, grubości paneli oraz materiały, co umożliwiło uwzglę-

dnienie dokładnego ciężaru własnego konstrukcji. Panele szklane dyskretyzowano jako „okładziny”, które program Robot definiuje jako obiekty konstrukcyjne, niemające udziału w nośności ustroju, ale przenoszące obciążenie na sąsiednie fragmenty układu. Wszystkie płyty żelbetowe podzielono na elementy skończone, stosując metodę Coonsa. Jako typ elementów płytowych wybrano czworokąty 4-węzłowe: kwadraty o rozmiarze  $0,40 \times 0,40$  [m]. W przypadku belek zastosowano elementy prętowe o długości  $0,40$  m. Podział na elementy skończone dla płyty P2 przedstawiono na rysunku 5, natomiast dla belki B1 na rysunku 6. Przyjęto posadowienie bezpośrednie, na podłożu sztywnym.



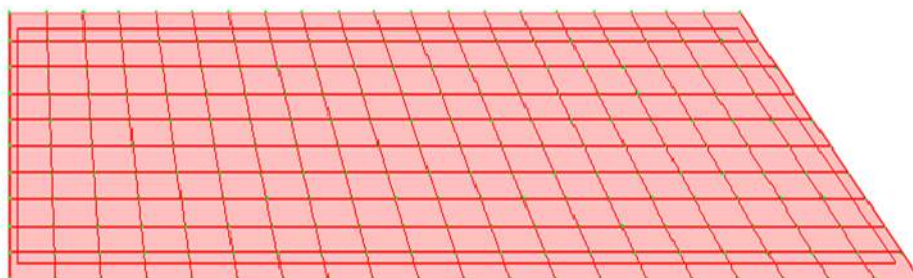
Rys. 3. Wizualizacja konstrukcji w programie Robot [opracowanie własne]

W efekcie przeprowadzonych obliczeń uzyskano wartości sił przekrojowych dla poszczególnych części składowych konstrukcji zewnętrznej. Niektóre z otrzymanych wyników przedstawiono w punkcie 4. Do dalszych obliczeń przyjęto, że płyty (na skutek przyjętych warunków podporowych wzdłuż belek), pracują poprzecznie, ponieważ na kierunku wzdłużnym momenty zginające nie przekroczyły nośności samego przekroju betonowego (na tym kierunku płyty będą wzmocnione przez konstrukcyjne zbrojenie rozdzielcze). W płytach również naprężenia ściskające uznano za pomijalnie małe, gdyż ich wartość nie przekroczyła  $0,08 f_{ck}$ , zatem zgodnie z zaleceniami normy [PN-B-03264:2002] można pominąć  $\sigma_c = 0$ .

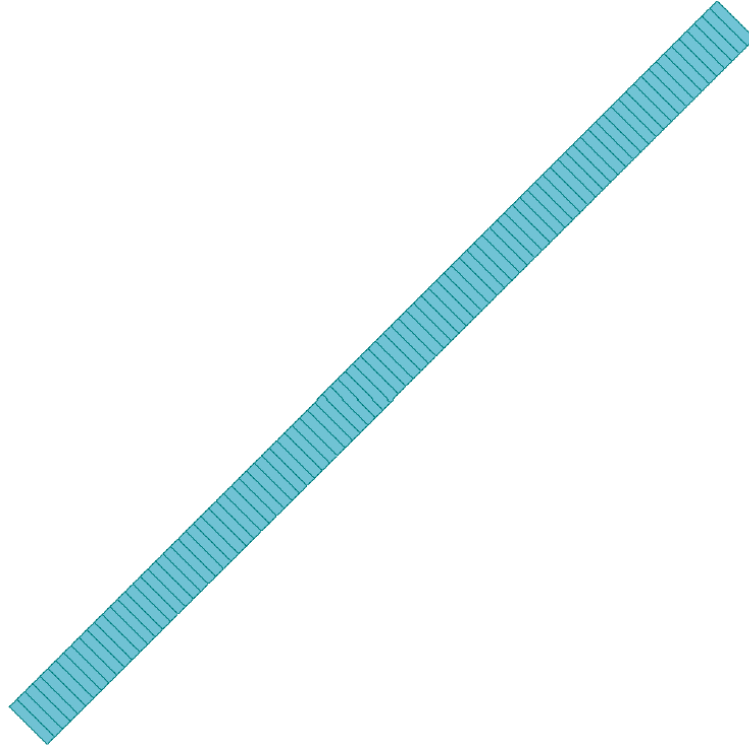


B1÷B5 – żelbetowe belki ukośne  
 P1÷P3 – żelbetowe płyty  
 S1÷S3 – okładziny szklane

Rys. 4. Oznaczenia części składowych konstrukcji zewnętrznej [opracowanie własne]



Rys. 5. Podział na elementy skończone płyty żelbetowej P2 w programie Robot [opracowanie własne]



Rys. 6. Podział na elementy skończone belki żelbetowej B1 w programie Robot  
[opracowanie własne]

#### 4. UPROSZCZONE OBLICZENIA UKŁADU KONSTRUKCYJNEGO PIRAMIDY

W celu oceny wyników otrzymanych w aplikacji Autodesk Robot Structural Analysis obliczenia kilku wydzielonych fragmentów układu wykonano w programie RM-Win. Potraktowano zatem konstrukcję jako pojedyncze płyty oparte na belkach. Dla belek ukośnych obciążenie zebrano z połowy rozpiętości między nimi. W płytach przyjęto te same założenia co w punkcie poprzednim, tj. pominięto momenty  $M_y$  oraz naprężenia ściskające. Sprawdzono dla płyt dwa schematy: utwierdzenie pełne oraz częściowe utwierdzenie na podporach (przeprowadzono obliczenia zgodnie z zaleceniami podanymi w monografii Starosolskiego [2007], obliczając moment  $M_x$  na podstawie wzoru (1) i zakładając konstrukcyjne dozbrojenie elementu nad podporami – na rozpiętość  $0,1 l_n$ ). Wyniki obliczeń przedstawiono w punkcie 4.

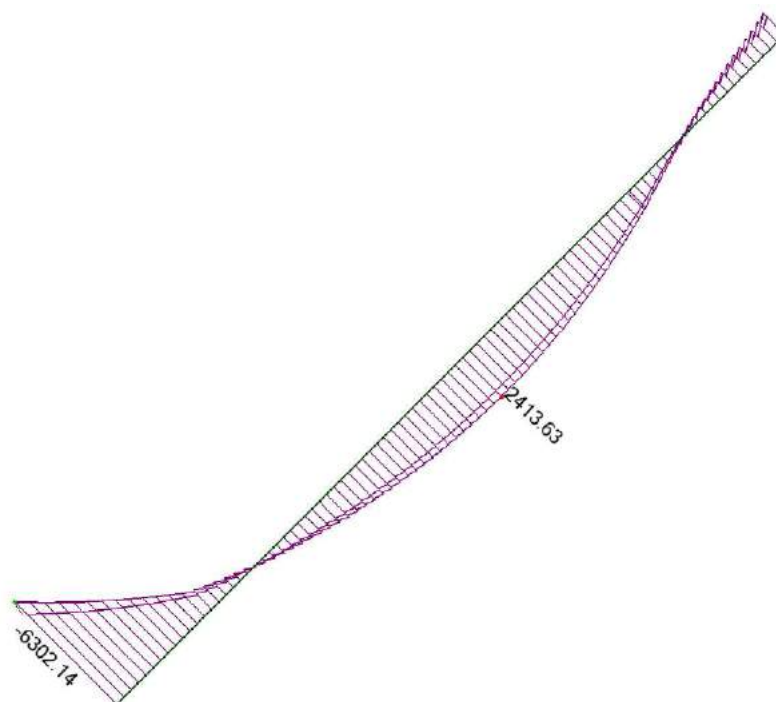
$$M_x = \frac{(g + q) \cdot l^2}{10} \quad (1)$$

gdzie:

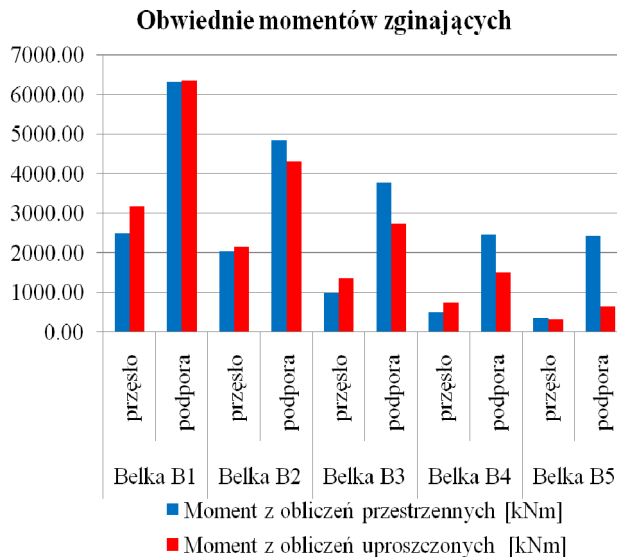
- (g + q) – całkowite obciążenie, łącznie z ciężarem własnym płyty,
- l – rozpiętość teoretyczna płyty (jednakowa dla wszystkich płyt).

## 5. ANALIZA WYNIKÓW

Na rysunku 7 przedstawiono obwiednię momentów zginających dla belki ukośnej B1, otrzymaną z obliczeń przestrzennych całego układu. Wynika z niej, że momenty w połączeniu z fundamentem są ponad 3-krotnie większe niż w podporze górnej. Nie znajduje to odzwierciedlenia w obliczeniach uproszczonych, traktujących wydzielone fragmenty układu jako płaskie – przy stosowaniu analizy dwuwymiarowej momenty te mają bardzo zbliżone wartości (różnica wynosi około 3%). Na rysunku 8 zebrano, w formie histogramu, wartości obwiednich momentów w podporze fundamentowej i w przęśle dla poszczególnych belek ukośnych. Dla najdłuższej belki B1 moment w podporze jest identyczny w obydwu podejściach (różnica wynosi 0,5%), natomiast moment w przęśle różni się nieznacznie. Belka ta w najmniejszym stopniu poddana jest wpływowi przestrzennej współpracy układu. Dla kolejnych belek dysproporcje w wynikach stopniowo się zwiększają, co jest zauważalne przede wszystkim przy porównywaniu momentów podporowych. Stosowanie w tym przypadku podejścia uproszczonego, które nie uwzględnia wzajemnej współpracy fragmentów układu, jest niewskazane, gdyż prowadzi do znacznego niedoszacowania wyników. W rzeczywistości może to stwarzać ryzyko awarii.



Rys. 7. Obwiednia momentów zginających dla belki ukośnej B1 [kNm] – obliczenia przestrzenne [opracowanie własne]

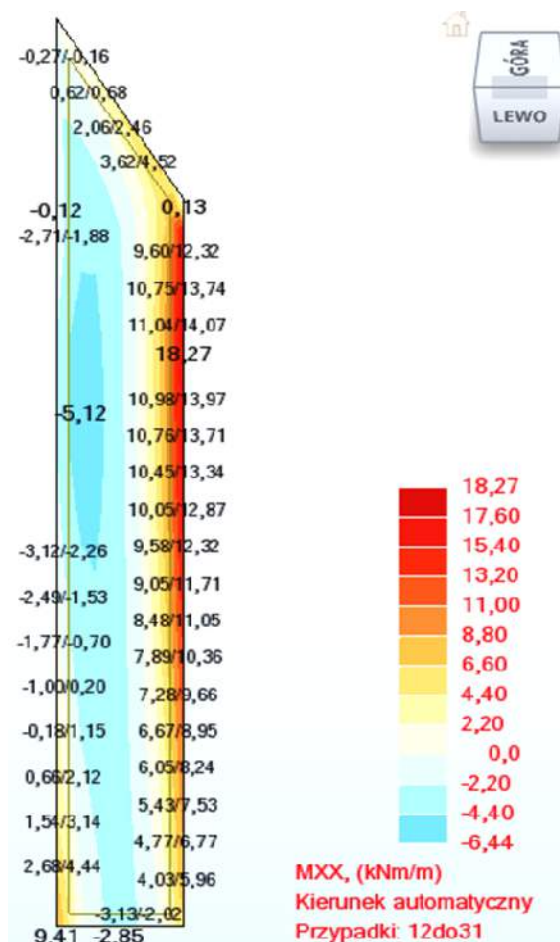


Rys. 8. Obwiednie momentów zginających w belkach – obliczenia przestrzenne i uproszczone [opracowanie własne]

Na rysunku 9 przedstawiono obwiednię momentów zginających dla płyty P1, otrzymane w programie Robot. Wynika z niego, że momenty podporowe są znacznie większe wzdłuż krótszej krawędzi płyty, zatem ta strona wymaga zastosowania większej ilości zbrojenia. Zależność ta potwierdza się dla wszystkich płyt. W przypadku obliczeń dwuwymiarowych nie jesteśmy w stanie dostrzec tych relacji.

W tabeli 1 przedstawiono porównanie obwiedni momentów ekstremalnych podporowych i przeszłowych, otrzymanych w poszczególnych podejściach. Na podstawie tych wyników zaobserwowano, że niepoprawne było przyjęcie w tym przypadku założenia o pełnym utwierdzeniu. Wartości momentów zginających znacząco odbiegają od wyników uzyskanych w dwóch pozostałych przypadkach – są zaniżone, zatem mogłyby to stwarzać ryzyko awarii. Przy porównywaniu drugiej metody uproszczonej, tj. częściowego utwierdzenia, z obliczeniami przestrzennymi, pojawiają się podobne zależności jak w przypadku wyników uzyskanych w belkach. Mianowicie dla płyty P1 wynik momentu przeszłowego jest identyczny, a dla mniejszej płyty P2 występuje różnica w wartości momentu zginającego. Płyta ta w większym stopniu poddana jest wpływom przestrzennej współpracy układu. W przypadku przeprowadzenia obliczeń przy założeniu schematu częściowego utwierdzenia, zgodnie z monografią Starosolskiego [2007], nad podporą nie projektuje się zbrojenia, lecz przyjmuje się zbrojenie konstrukcyjne. W analizowanej konstrukcji momenty przyporowe dla płyt przyjmują dość znaczne wartości, zatem przyjęte zbrojenie konstrukcyjne mogłoby się okazać niewystarczające.





Rys. 9. Obwiednia momentów zginających dla płyty P1 [kNm] – obliczenia przestrzenne [opracowanie własne]

Tabela 1. Obwiednie momentów zginających w płytach – obliczenia przestrzenne i uproszczone [opracowanie własne]

	Moment z obliczeń przestrzennych [kNm]	Moment z obliczeń uproszczonych, wariant częściowego utwierdzenia [kNm]	Moment z obliczeń uproszczonych, wariant pełnego utwierdzenia [kNm]
PŁYTA P1			
Przęsło	6,44	6,45	2,84
Podpora	18,27	[zbrojenie konstrukcyjne]	5,68
PŁYTA P2			
Przęsło	4,46	6,45	2,84
Podpora	11,5	[zbrojenie konstrukcyjne]	5,68

## 6. PODSUMOWANIE

Przy projektowaniu konstrukcji na ogół dąży się do możliwie racjonalnego uproszczenia obliczeń. W większości przypadków obliczenia uproszczone, traktujące wydzielone fragmenty układu jako płaskie, pozwalają uzyskać zadowalające wyniki w stosunkowo szybki i prosty sposób. Obliczenia te są mniej skomplikowane od przestrzennych, więc ryzyko popełnienia błędu jest mniejsze. Prezentowana w pracy konstrukcja ma typowo przestrzenny ustrój, zatem trudno jest rozseparować ją na prostsze modele płaskie i przyjąć właściwe założenia upraszczające. Obliczenie układu traktowanego jako struktura przestrzenna pozwala, w tym przypadku, na wymiarowanie bardziej racjonalne. Ponadto występuje kilka obszarów w tej konstrukcji, w których na skutek współpracy przestrzennej pojawiają się znaczące koncentracje naprężeń, co nie znajduje odzwierciedlenia podczas obliczeń uproszczonych. Zatem przy projektowaniu ukierunkowanym na pseudooptymalizację inżynierską konstrukcji wskazane jest stosowanie modelu przestrzennego całego ustroju jako bardziej wiarygodnego. Istotne przy tym jest jednak możliwe poprawne modelowanie połączeń poszczególnych fragmentów konstrukcyjnych oraz warunków brzegowych.

## LITERATURA

Łapko A., 2007. Projektowanie konstrukcji żelbetowych wg Eurokodu 2 i PN-B-03264:1999. Wydawnictwo Arkady Warszawa.

PN-82-B-02001: Obciążenia budowli. Obciążenia stałe.

PN-80-B-02010: Obciążenia w obliczeniach statycznych. Obciążenie śniegiem.

PN-77-B-02011: Obciążenia w obliczeniach statycznych. Obciążenie wiatrem.

PN-B-03264:2002: Konstrukcje betonowe, żelbetowe i sprężone. Obliczenia statyczne i projektowanie.

PN-81-B-03020: Grunty budowlane. Posadowienie bezpośrednie budowli. Obliczenia statyczne i projektowanie.

Starosolski W., 2007. Konstrukcje żelbetowe. Tom I, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.

Starosolski W., 2008. Konstrukcje żelbetowe. Tom II, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.

**CZĘŚĆ II**  
**NAUKI ROLNICZE**



# REAL-TIME PCR I LAMP W IDENTYFIKACJI PATOGENÓW ROŚLIN

Marcin Juda<sup>1</sup>, Anna Baturó-Cieśniewska, Karol Lisiecki<sup>1</sup>,  
Katarzyna Koczwarą

## 1. WSTĘP

Techniki molekularne polegające na amplifikacji DNA, jakimi są real-time PCR i Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), pozwalają na precyzyjną identyfikację patogenów roślin, m.in. grzybów, bakterii i wirusów. Real-time PCR, oparty na tradycyjnym end-point PCR, jest powszechnie stosowany w diagnostyce patogenów roślin na całym świecie. Pozwala na określenie ilości DNA patogenu za pomocą pomiaru fluorescencji barwnika fluorescencyjnego interkalującego do dwuniciowych cząsteczek DNA. Metoda ta wymaga jednak wyspecjalizowanego personelu oraz kosztownej aparatury laboratoryjnej. Ciągły rozwój diagnostyki molekularnej pozwolił na opracowanie metody LAMP, będącej tanią i szybką alternatywą dla metod opartych na PCR.

## 2. REAL-TIME PCR

Obecnie do najskuteczniejszych i powszechnie stosowanych metod identyfikacji obecności patogenów w materiale roślinnym należą metody molekularne oparte na technice PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Opracowana w 1987 r. przez zespół naukowców ze Stanów Zjednoczonych, pod kierownictwem K. Mullis, ułatwiła i przyspieszyła prace nad strukturą genów i ich funkcją [Słomski 2008].

Stosując metodę PCR, można przeprowadzić specyficzną amplifikację *in vitro* wybranego odcinka DNA (lub RNA) dzięki użyciu dwóch komplementarnych do sekwencji docelowej starterów. W celu przeprowadzenia reakcji niezbędne jest wykorzystanie prawidłowej mieszaniny reakcyjnej. Zawiera ona matrycę DNA (lub cDNA), dwa startery komplementarne do matrycy i definiujące długość amplifikowanego fragmentu łańcucha, termostabilną polimerazę *Taq*, kationy  $Mg^{2+}$  oraz bufor [Słomski 2008].

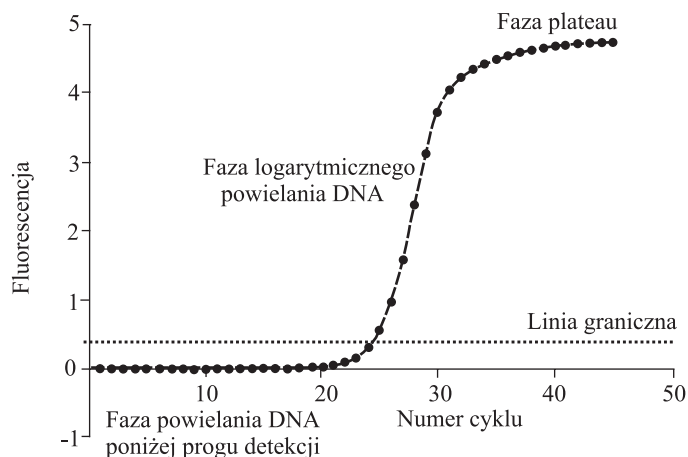
Metoda real-time PCR (qPCR – quantitative PCR), która powstała w oparciu o tradycyjny PCR, jest jednym z najbardziej specyficznych i czułych narzędzi wykorzystywanych do ilościowego oznaczania produktu PCR [Dorak 2006]. Może być użyta do dokładnego i szybkiego wykrywania i ilościowego oznaczania mikroorganizmów w próbkach roślin, ale też powietrza czy gleby [Carisse i in. 2009, Blanco-Meneses i Ristaino 2011, Bilodeau i in. 2012]. Ilościowy PCR polega na analizowaniu natężenia fluorescencji i przetwarzaniu go na liczbową wartość, określającą ilość kopii powstałego produktu, będącego powielanym odcinkiem DNA np. patogenu.

Podstawą do określenia liczby kopii jest wcześniejsze sporządzenie krzywej wzorcowej. W trakcie trwania reakcji monitorowana jest ilość powstającego produktu w każdej z próbek podczas kolejnych cykli, graficznie obrazowana za pomocą krzywej amplifikacji [Shcherbakova 2007] (rys. 1). Po to, aby otrzymać w reakcji real-time PCR sy-

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Zakład Fitopatologii Molekularnej, ul. ks. A. Kordeckiego 20 A, 85-225 Bydgoszcz,  
e-mail: mar.bydg@gmail.com

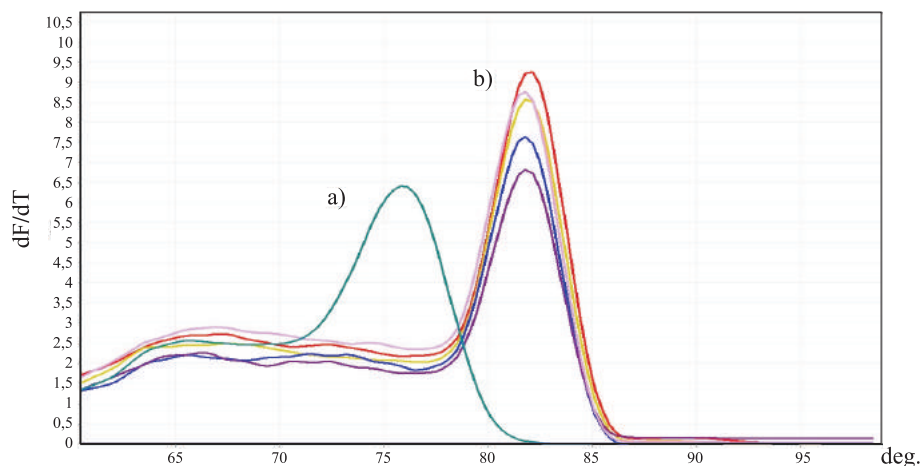
gnał fluorescencyjny, niezbędne jest zastosowanie fluorescencyjnych barwników interkalujących w czasie reakcji w powstające produkty. Jednym z takich barwników jest najpowszechniej wykorzystywany SYBR Green I.



Rys. 1. Krzywa amplifikacji reakcji real-time PCR [Wyska i Rosiak 2006]

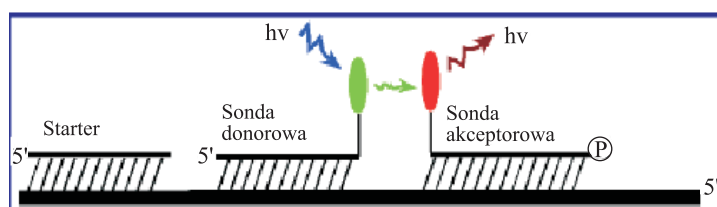
## 2.1. SYBR Green I

SYBR Green I emituje sygnał tylko w przypadku przyłączenia się do dwuniciowej cząsteczki DNA [Schmittgen 2006]. Fluorescencja niezwiązanego barwnika SYBR Green I znajdującego się w roztworze, wzbudzanego określoną długością fali, jest bardzo niska. Natężenie fluorescencji uzależnione jest od ilości dwuniciowych cząsteczek w próbie, powstających w kolejnych cyklach, dzięki użyciu starterów specyficznie przyłączających się do sekwencji otaczających powielany produkt, np. charakterystyczny dla danego gatunku mikroorganizmu. Dlatego też wykorzystanie specyficznych starterów ma kluczowe znaczenie dla uniknięcia występowania niespecyficznych produktów reakcji. Na podstawie monitorowania ilości produktu powstającego w czasie reakcji można ustalić jego wyjściową ilość w materiale. Pozwala to na określenie, jak dużo patogenu znajduje się w badanej próbie [Dorak 2006]. SYBR Green I przyłącza się do wszystkich dwuniciowych cząsteczek powstających w czasie reakcji i powoduje ich fluorescencję. Istnieje zatem prawdopodobieństwo odczytu fałszywie pozytywnego poziomu fluorescencji, na który składa się oprócz fluorescencji właściwego produktu, także jej emisja przez niespecyficzne produkty reakcji, np. dimery starterów [Ponchel 2006, Schmittgen 2006]. Z tego względu konieczne jest precyzyjne dobranie warunków reakcji, na które składa się odpowiedni dobór sekwencji oraz stężeń starterów, a także stężenia matrycy i temperatury poszczególnych cykli reakcji. Optymalizacja real-time PCR warunkuje specyficzność reakcji, którą można sprawdzić za pomocą analizy krzywej topnienia (rys. 2).



Rys. 2. Analiza krzywych topnienia w reakcji real-time PCR: a) krzywa przedstawiająca obecność niespecyficznych produktów reakcji w próbce badanej (dimery starterów), b) krzywe topnienia potwierdzające uzyskanie oczekiwanego produktu [www.dolinabiotechnologiczna]

Analiza przedstawia graficznie liczbę produktów występujących w próbce, różniących się temperaturą rozpadu (topnienia), co uwarunkowane jest ich sekwencją nukleotydową [Bustin 2000, Ponchel 2006]. Obok metod niespecyficznych, do których należy analiza dokonana na podstawie wspomnianego barwnika SYBR Green I, do ilościowej identyfikacji patogenów stosuje się detekcję specyficzną. Wymaga ona użycia specyficznych sond hybrydujących z sekwencją docelową. Emisja sygnału fluorescencji możliwa jest dzięki zachodzeniu zjawiska transferu energii rezonansu fluorescencji (ang. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) (rys. 3).



Rys. 3. Proces transferu energii z fluorochromu donorowego 3', na fluorochrom akceptorowy 5', na przykładzie sond HybProbes [Caplin i in. 1999]

## 2.2. FRET

Transfer energii rezonansu fluorescencji jest zjawiskiem polegającym na transferze energii wzbudzenia typu dipol-dipol – od dawcy fluorescencji do akceptora fluorescencji. Skuteczność tego transferu zależy od wzajemnej orientacji dipola donowego i akceptorowego, dystansu między nimi oraz ich właściwości widma [Sokol i in. 1998]. Gdy w wystarczającej nieznacznej odległości znajduje się wzbudzony fluorochrom oraz drugi fluorochrom będący akceptorem, następuje przekazanie energii mię-

dzy nimi i emisja fluorescencji. Gdy akceptorem wzbudzenia jest wygaszacz (ang. *quencher*), taki jak np. DABCYL, to otrzymana energia jest przez niego rozpraszana w postaci ciepła, a nie fluorescencji. Wygaszacze mogą także zamieniać zaakceptowaną energię na światło o znacznie wyższej długości fali, co w warunkach reakcyjnych także objawia się zanikiem fluorescencji [Bustin 2000].

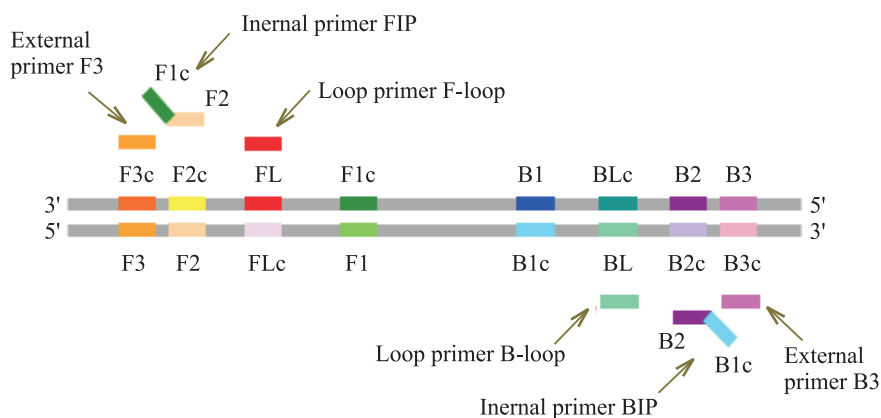
Powszechnie stosowanymi barwnikami wykorzystywanymi w znakowaniu sond real-time PCR są FAM (6-karboksyfluoresceina) oraz TET (4-tetrachloro-6karboksylfluoresceina), pełniące funkcję reportera reakcji fluorescencji. Przykładami wygaszaczy są natomiast TAMRA (6-karboksylotetrametylorodamina) oraz DABCYL ([kwas 4-(4'-dimetylo-aminofenylazo)benzoesowy]) [Sokol i in. 1998].

W detekcji specyficznej wykorzystywane są najczęściej sondy TaqMan i Molecular Beacons. Barwniki niespecyficzne ze względu na stosunkową łatwość wykonania analiz oraz niewielkie koszty są powszechniej stosowane niż specyficzne sondy [Fraga i in. 2008]. Najczęściej wykorzystywanym barwnikiem w analizach real-time PCR jest SYBR Green I. Za pomocą real-time PCR z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I zidentyfikowano i oznaczono ilościowo DNA, m.in. *Sclerotinia sclerotiorum* z rzepaku [Yin i in. 2009], *Fusarium culmorum*, w próbach pszenicy i kukurydzy [Brandfass i Karlovsky 2006]. Barwnik ten zastosowano również do detekcji genu *Tri5* warunkującego powstawanie mikotoksyn z grupy trichotecenów u różnych gatunków *Fusarium* [Schnerr i in. 2001]. Barwnik SYBR Green I zastosowano także w analizie real-time PCR próbek pszenicy mających na celu określenie ilości DNA 4 gatunków rodzaju *Fusarium* (*F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*) odpowiedzialnych za fuzariozę kłosów [Moradi i in. 2010]. Do zalet qPCR można zaliczyć wysoką czułość co powoduje, że bardzo niewielka ilość DNA patogenu może być zidentyfikowana w badanym materiale, nawet w bardzo wczesnych fazach rozwoju choroby, zanim jeszcze pojawią się typowe objawy [Lievens i Thomma 2005].

### 3. LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

Metoda real-time PCR stała się podstawowym narzędziem diagnostycznym w laboratoriach biotechnologicznych. Niestety nie jest wolna od wad. Podstawową są wysokie koszty aparatury, długi czas analizy i dość niska wydajność amplifikacji. Alternatywą w detekcji patogenów wydaje się technika LAMP (ang. *Loop-mediated isothermal AMplification*) po raz pierwszy opisana przez Notomi i in. [2000]. Pozwala ona na przeprowadzenie detekcji DNA mikroorganizmów patogenicznych w krótkim czasie i przy niskich nakładach finansowych. Reakcja oparta jest na *Bst* DNA polimerazie mającej aktywność wymiany nici (ang. *strand displacement*). To powoduje, że wydajność analiz zależy od wielkości docelowego fragmentu DNA. Badania Notomi i in. [2000] wykazały, że fragmenty większe niż 500 par zasad amplifikują bardzo słabo, zatem najważniejsze jest takie dobranie starterów, aby produkt był mniejszy niż 300 pz. W odróżnieniu od real-time PCR w reakcji LAMP wykorzystuje się do 3 par starterów, dlatego specyficzność reakcji jest ekstremalnie wysoka. Stosuje się tu specjalnie zaprojektowane do tego celu startery F3 i B3 (zewnętrzne) amplifikujące największy fragment DNA, tj. ampikon, i okalające go nukleotydy, startery FIP i BIP (wewnętrzne) oraz F-Loop i B-Loop (zapętlające), amplifikujące fragment w zakresie wyznaczonym przez F3 i B3 (rys. 4).





Rys. 4. Konfiguracja starterów w reakcji LAMP [Tomlinson i in. 2010]

W trakcie reakcji powstają jednoniciowe amplikony zawierające strukturę pętli (ang. *loop*), co pozwala na przyłączanie się starterom bez konieczności stosowania denaturacji matrycy w początkowej fazie reakcji. W odróżnieniu od real-time PCR reakcja przebiega w warunkach izotermicznych w temperaturze około 65°C [Notomi i in. 2000, Nagamine i in. 2001, Mori i in. 2004, Tomlinson i in. 2010]. Wysoka specyficzność reakcji wynikająca z przyłączania się starterów w ośmiu różnych regionach docelowej sekwencji powoduje, że LAMP jest bardzo wydajną metodą amplifikacji, która pozwala na syntezę dużych ilości DNA w krótkim czasie. W porównaniu z real-time PCR czas przeprowadzenia reakcji jest krótszy i wynosi przeciętnie około 60 minut, jednak w niektórych przypadkach można tak zoptymalizować reakcję, że trwa poniżej 30 minut. W przypadku LAMP istnieje dużo mniejsze ryzyko inhibowania reakcji niż w trakcie analizy real-time PCR, gdyż niektóre substancje, które powodują inhibicję w reakcji PCR, są w tym przypadku tolerowane [Kaneko i in. 2007, Tani i in. 2007]. Brak znaczącego wpływu inhibitorów na reakcję LAMP pozwala na zastosowanie tej metody w przypadku materiału uzyskanego bezpośrednio z tkanek roślinnych bez konieczności wcześniejszego doczyszczania DNA. Pozwala to na skrócenie czasu analizy i zmniejszenie kosztów pojedynczej reakcji. LAMP w przeciwieństwie do real-time PCR wykazuje nieznaczną podatność lub brak inhibicji reakcji w przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej hemicelulaz pochodzących z tkanek roślinnych. Także wyższe stężenia NaCl, SDS czy CTAB nie wpływają na wydajność reakcji LAMP, podczas gdy w przypadku PCR następuje zatrzymanie reakcji [Kiddle i in. 2012].

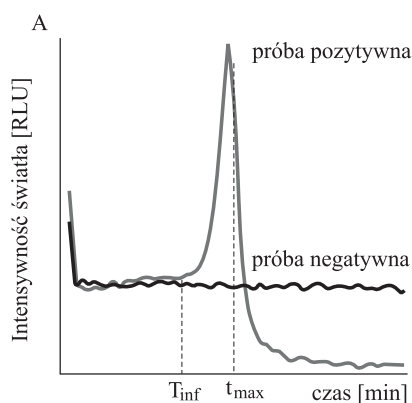
### 3.1. Wizualizacja produktów lamp

Najpopularniejszymi obecnie metodami detekcji produktu amplifikacji jest rejestrowanie wzrostu fluorescencji uzyskanej w wyniku syntezy *in vitro* polinukleotydów podczas reakcji PCR. Barwniki interkalujące oraz wyznakowane startery czy też sondy wymagają wyspecjalizowanego i kosztownego sprzętu optycznego, pozwalającego na rejestrowanie trwającej syntezy docelowego amplikonu. W wyniku tych niedogodności poszukuje się wciąż prostszych i tańszych metod przydatnych do diagnostyki molekularnej, do których z pewnością można zaliczyć LAMP.

### 3.2. Ilościowy lamp

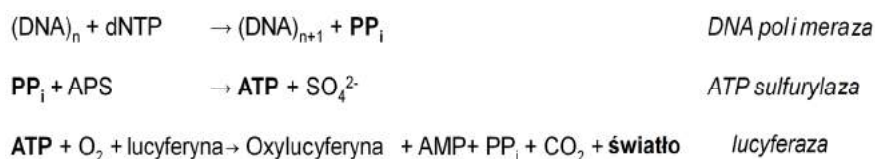
Metoda LAMP dzięki bardzo wysokiej wydajności amplifikacji pozwala na zastosowanie szeregu metod detekcji produktów reakcji, które w przypadku mniej wydajnych metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych nie byłyby możliwe. Inną zaletą wysokiej wydajności amplifikacji w metodzie LAMP jest mierzalny wzrost zmętnienia badanej próby, który jest wynikiem wytwarzania w trakcie reakcji pirofosforanu magnezu (uwalnianego z dNTP przez polimerazę). Pozwala to na oszacowanie ilości produktu w czasie rzeczywistym za pomocą relatywnie prostych urządzeń rejestrujących wzrost zmętnienia (turbidymetria). Za pomocą analizy zmętnienia metodą real-time LAMP skutecznie zidentyfikowano m.in. *Fusarium culmorum* z próbek zbóż przeznaczonych do przemysłu browarniczego [Denschlag i in. 2013].

Inną metodą szacowania wyniku reakcji LAMP w czasie rzeczywistym jest rejestrowanie bioluminescencji formującego się nieorganicznego pirofosforanu ( $PP_i$ ) za pomocą termostabilnej lucyferazy w technologii BART (ang. *Bioluminescent Assay in Real-Time*). LAMP-BART jest alternatywną metodą detekcji amplifikacji cząsteczek DNA przystosowaną do determinacji ilości wytwarzanego nieorganicznego pirofosforanu podczas przyłączania kolejnych nukleotydów przez polimerazę. Podczas przyłączania jednego nukleotydu do nici DNA wytwarzana jest jedna cząsteczka  $PP_i$ . Pozwala to na określenie ilości DNA w badanej próbce poprzez określenie ilości wytworzonego  $PP_i$ . W metodzie LAMP-BART wytworzony  $PP_i$  jest konwertowany na ATP przez enzym ATP sulfurylase przy jednoczesnym zużyciu substratu jakim jest adenozyno-5'-fosfosiarczan (APS). Powstający ATP jest następnie zużywany przez termostabilną lucyferazę i równocześnie uwalniany jest tlen niezbędny do oksydacji lucyferyny. Utleniona lucyferyna emituje kluczowe dla techniki BART światło, pozwalające na oszacowanie ilości DNA w badanej próbce (rys. 5) [Gandelman i in. 2010].



Rys. 5. Krzywa reakcji BART; szara linia oznacza próbę badaną zawierającą produkt reakcji, natomiast linia czarna próbę negatywną [Gandelman i in. 2010]

Podstawy tej reakcji pochodzą z techniki zwanej ELIDA (ang. *Enzymatic Lumino-metric Detection of Inorganic pyrophosphate Assay*) (rys. 6). LAMP-BART oparty na technologii ELIDA pozwala na dynamiczne określenie zmian w ilości uwalnianego pirofosforanu i jego monitorowaniu w czasie rzeczywistym do dwóch godzin w stałej temperaturze wynoszącej 60°C.



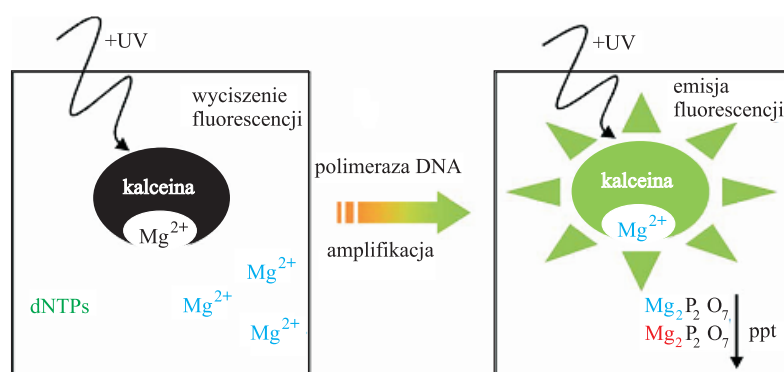
Rys. 6. Schemat biochemicznych reakcji opisujący amplifikację kwasu nukleinowego (polimeraza DNA) oraz ELIDA (ATP sulfurylaza i lucyferaza) [Gandelman i in. 2010]

LAMP-BART nie wymaga kosztownej aparatury. Do detekcji produktu niezbędny jest jedynie termocykler bądź łaźnia wodna oraz sprzęt będący w stanie zarejestrować zmiany poziomów emisji światła, np. fotodetektor lub kamera CCD (ang. *charge-coupled device*).

Metodą LAMP-BART skutecznie zidentyfikowano m.in. *Chlamydia trachomatis* [Gandelman i in. 2010] i *Clostridium difficile* [McElgunn i in. 2014]. Badania te wskazują na potencjalną przydatność technologii LAMP-BART do identyfikacji patogenów roślin.

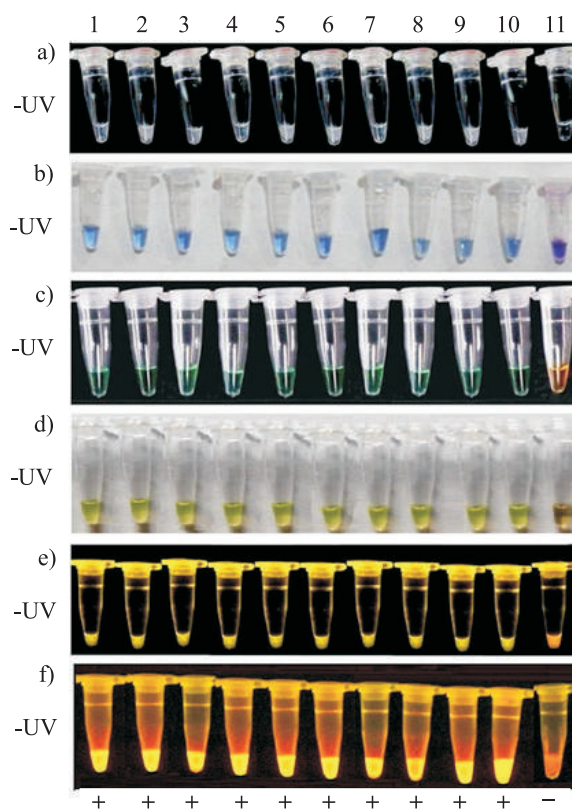
### 3.3. Jakościowy lamp

Produkty LAMP mogą być wizualizowane w świetle UV, po uprzednim dodaniu do mieszaniny reakcyjnej fluorescencyjnych barwników, takich jak kalceina, hydroksynaftol (HNB) czy GeneFinder. Kalceina jest wskaźnikiem do oznaczania metali, emitującym bardzo dużą ilość fluorescencji po związaniu się z dwuwartościowymi jonami metali takimi jak wapń czy magnez. W reakcjach LAMP z użyciem kalceiny dodaje się mangan (w postaci  $\text{MnCl}_2$ ), który wycisza ten barwnik. Jednakże jony pirofosforanowe, uwalniane w trakcie amplifikacji nici z dNTP, usuwają jony manganu związane z kalceiną, tworząc pirofosforan manganu i umożliwiając przyłączenie się magnezu do kalceiny. Kalceina połączona z magnezem i wzbudzona światłem niebieskim emituje fluorescencję o zielonej barwie (rys. 7). Analiza fluorymetryczna z wykorzystaniem kalceiny może być analizowana bezpośrednio w probówkach, co znacznie przyspiesza uzyskanie wyniku oraz zabezpiecza przed kontaminacją przestrzeni laboratoryjnych [Tomita i in. 2008].



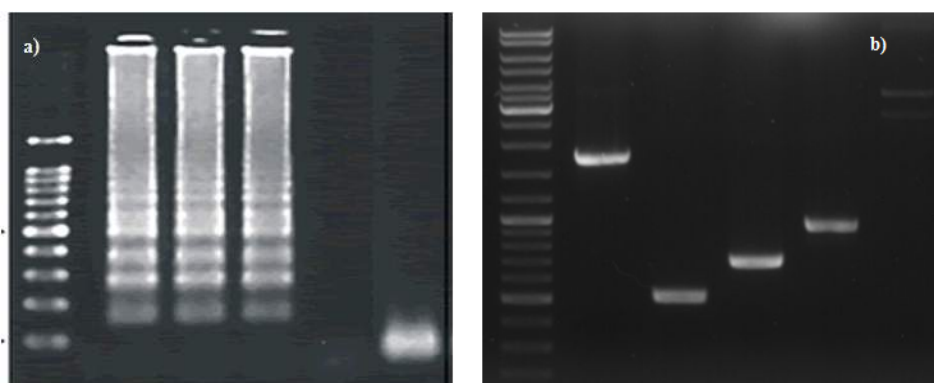
Rys. 7. Przebieg procesu łączenia reszt pirofosforanowych (z dNTP) z jonami manganu, pierwotnie połączonych z kalceiną; jony magnezu przyłączone do kalceiny powodują emisję fluorescencji [Tomita i in. 2008]

W reakcji można stosować także interkalujące barwniki fluorescencyjne, takie jak bromek etydyny, jodek propidyny, SYBR Green I czy też PicoGreen, jednakże w stężeniach niezbędnych do wizualizacji produktu inhibują one przebieg LAMP i z tego względu mogą być dodawane do mieszaniny reakcyjnej dopiero po jej zakończeniu. Powoduje to wystąpienie ryzyka kontaminacji laboratorium spowodowanego otwarciem probówki [Tomlinson i in. 2010]. Innymi szybkimi metodami detekcji są analiza kolorymetryczna z zastosowaniem siarczanu miedzi ( $\text{CuSO}_4$ ) oraz analiza zmętnienia wytrącającego się pirofosforanu magnezu (po dodaniu  $\text{MgSO}_4$  lub  $\text{MgCl}_2$ ) lub pirofosforanu wapnia (po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej  $\text{CaCl}_2$ ). Analizy te mimo swojej prostoty w dużej mierze oparte są na subiektywnej ocenie osoby przeprowadzającej reakcję i dlatego nie mogą być stosowane w wielu przypadkach [Duan i in. 2014]. Weryfikacja wyników reakcji na podstawie analizy zmętnienia powinna być przeprowadzana bezpośrednio po zakończeniu reakcji ze względu na małą stabilność uzyskanego pirofosforanu magnezu/wapnia. Zastosowanie kalceiny, którą dodaje się już do prefiksu, zapewnia brak ryzyka kontaminacji związanej z koniecznością otwierania probówek. Widoczna w świetle UV fluorescencja zapewnia dużo większą pewność uzyskanego wyniku niż analizy oparte na określaniu zmętnienia próbek (rys. 8).



Rys. 8. Detekcja produktów LAMP: a) analiza zmętnienia oparta na chlorku wapnia, b) HNB, c) GeneFinder, d) SYBR Green I (bez światła UV), e) SYBR Green I (ze światłem UV), f) bromek etydyny; w probówkach od 1-10 oznaczono próby pozytywne, a w probówce 11 próbę ujemną zawierającą wodę [Almasi i in. 2013]

Metodą LAMP z wykorzystaniem barwnika kalceiny skutecznie zidentyfikowano szereg patogenicznych grzybów, takich jak *F. graminearum* [Abd-Alsalam i in. 2011]. Innym przykładem jest detekcja 6 gatunków rodzaju *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* i *F. cerealis*) odpowiedzialnych za produkcję z próbek pszenicy [Denschlag i in. 2014]. Innym przykładem zastosowania kalceiny jest identyfikacja 3 gatunków rodzaju *Aspergillus* (*A. nomius*, *A. flavus* i *A. parasiticus*) z prób słoju browarniczego [Luo i in. 2013]. Produkty reakcji LAMP mogą być także wizualizowane na żelu elektroforetycznym. Układ prążków jest odmienny niż w przypadku konwencjonalnego PCR, gdyż wynikiem reakcji jest w tym przypadku wiele prążków przypominających drabinkę (ang. *smear*) (rys. 9).



Rys. 9. Wzory prążków uzyskanych w wyniku elektroforezy na żelu agarozowym:  
a) LAMP b) standardowy PCR [opracowanie własne]

Jednak przeprowadzenie elektroforezy na żelu jest jedynie zabiegiem potwierdzającym uzyskanie pożądanego produktu i nie jest to konieczne. Skraca to w znacznym stopniu czas analizy i powoduje, że LAMP jest metodą bardziej przystępną. Analiza LAMP nie wymaga użycia termocyklera, co czyni ten sposób analizy dostępniejszym, tańszym i łatwiejszym w rutynowych analizach niż PCR. Może być wykorzystywana w warunkach, gdzie szybka ocena poziomu patogenu w uprawach lub surowcach jest niezbędna do podejmowania decyzji odnoszących się do przechowywania i przetwarzania produktów żywnościowych [Tomlinson i in. 2010].

Istnieją wyniki potwierdzające, że LAMP przewyższa czułością konwencjonalny PCR [Fukuta i in. 2013, Zhang i in. 2011]. Tomlinson i in. [2010] oraz Jędrzycka i in. [2013] twierdzą, że czułość tych dwóch technik jest porównywalna. Real-time PCR tylko w nielicznych przypadkach okazuje się czulszą metodą niż LAMP, np. przy detekcji patogenu w kilka godzin po inokulacji [Tomlinson i in. 2010].

Technika LAMP okazała się skuteczna w diagnostyce wielu grzybów patogenicznych dla roślin, takich jak toksynotwórcze gatunki rodzaju *Fusarium* [Denschlag i in. 2014], *Fusarium graminearum* [Almoammer i in. 2013], *F. oxysporum* [Almasi i in. 2013], *Botrytis cinerea* [Tomlinson i in. 2010] czy *Pythium aphanidermatum* i *P. myriotylum* [Fukuta i in. 2013, 2014]. LAMP znajduje także zastosowanie w identyfikacji wirusów, bakterii i pierwotniaków będących patogenami ludzi, roślin i zwierząt [Tsumi i in. 2010, Lin i in. 2012, Niessen i in. 2013].

#### 4. PODSUMOWANIE

Techniki molekularne stanowią obecnie podstawowe narzędzie diagnostyczne w laboratoriach na całym świecie. PCR i jego późniejsza modyfikacja real-time PCR zrewolucjonizowały współczesną naukę dzięki rzetelności poprawnie przeprowadzonego testu, dającego niemal stuprocentową pewność identyfikacji patogenów roślin, zwierząt i ludzi. Metody te pozwoliły na odejście od zawodnych metod identyfikacji za pomocą oceny morfologii mikroorganizmów. Jednakże ciągłe dążenie do udoskonalenia metod badawczych spowodowało, że pewne niedogodności real-time PCR, jakimi są wysoki koszt aparatury oraz relatywnie długi czas testu, skłoniło naukowców do opracowania nowych metod amplifikacji kwasów nukleinowych. Rozwój techniki LAMP w identyfikacji patogenów roślin wydaje się szczególnie znaczący, biorąc pod uwagę jej zalety w porównaniu z obecnie stosowanymi metodami diagnostycznymi. Stosowanie techniki LAMP może zrewolucjonizować dzisiejszą diagnostykę molekularną. Przyśpieszenie, prostota, łatwość oszacowania wyniku i niskie koszty reakcji, a także ciągły rozwój LAMP również w aspekcie badań ilościowych oraz brak konieczności wykorzystania termocyklera pozwalają na aplikację reakcji LAMP do szybkiej detekcji patogenów nawet w warunkach polowych, w przypadku których stosuje się przenośną aparaturę. Metody amplifikacji kwasów nukleinowych – oparte na analizie uwalnianego nieorganicznego pirofosforanu – stanowią kolejny krok w diagnostyce molekularnej. Pozwalają na przeprowadzenie testów ilościowych w czasie znacznie krótszym niż w przypadku real-time PCR i jego modyfikacji. Technologia LAMP-BART, polegająca na pomiarze bioluminescencji związanej z uwalnianiem pirofosforanu, umożliwi przeprowadzenie ilościowej oceny patogenicznych mikroorganizmów w krótkim czasie i za pomocą znacznie tańszej niż w przypadku real-time PCR aparatury.

#### LITERATURA

- Abd-Elsalam K., Bahkali A., Moslem M., Amin E., Niessen L., 2011. An optimized protocol for DNA extraction from wheat seeds and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Fusarium graminearum* contamination of wheat grain. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 3459-3472.
- Almasi M.A., Dehabadi S.M.H., Moradi A., Eftekhari Z., Ojaghkandi M., 2013. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4, 177 Doi:10.4172/2157-7471.1000177.
- Almoammar H., Bahkali A.H., Abd-Elsalam K.A., 2013. One-hour loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of quarantinable toxigenic *Fusarium Garmanirum*. *African Journal of Microbiology Research* 7, 1179-1183.
- Bilodeau G.J., Koike S.T., Uribe P., Martin, F.N., 2012. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* 102, 331-343.
- Blanco-Meneses M., Ristaino J.B., 2011. Detection and quantification of *Peronospora tabacina* using a real-time polymerase chain reaction assay. *Plant Disease* 95, 673-682.

- Brandfass Ch., Karlovsky P., 2006. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiology* 6, 1-10.
- Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- Caplin B.E., Rasmussen R.P., Bernard P.S., Wittwer C.T., 1999. LightCycler™ Hybridization Probes – The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biochemica* 1, 5-8.
- Carisse O., Tremblay D.M., Lévesque C.A., Gindro K., Ward P., Houde A., 2009. Development of a TaqMan real-time PCR assay for quantification of airborne conidia of *Botrytis squamosa* and management of Botrytis leaf blight of onion. *Phytopathology* 99, 1273-1280.
- Denschlag C., Rieder J., Vogel R.V., Niessen L., 2014. Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 177, 117-127.
- Denschlag C., Vogel R.F., Niessen L., 2013. *Hyd5* gene based analysis of cereals and malt for gushing-inducing *Fusarium* spp. by real-time LAMP using fluorescence and turbidity measurements. *International Journal of Food Microbiology* 162(3), 245-251.
- Dorak T., 2006. Real-Time PCR. New York, Taylor and Francis Group.
- Duan Y., Ge C., Zhang X., Wang J., Zhou M., 2014. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology* 43, 61-66.
- Fraga D., Meulia T., Fenster S., 2008. Real-Time PCR. [In:] S. Gallagher & E.A Wiley (Ed.), *Current protocols essential laboratory techniques*, 559-592.
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Ishiguro Y., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Tsuji T., Hashizume F., Watanabe H., Kageyama K., 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Pythium myriotylum*. *Letters of Applied Microbiology*, DOI, 10.1111/1574-6968.12453.
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Hashizume F., Tsuji T., Taguchi H., Watanabe H., Kageyama K., 2013. Detection of *Pythium aphanidermatum* in tomato using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with species-specific primers. *European Journal of Plant Pathology* 136, 689-701.
- Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., 2010. Novel Bioluminescent Quantitative Detection of Nucleic Acid Amplification in Real-Time. *PLoS ONE* 5(11), e14155, DOI,10.1371/journal.pone.0014155.
- Jędrzycka M., Burzyński A., Brachaczek A., Langwiński W., Song P., Kaczmarek J., 2013. Loop-mediated isothermal amplification as a good tool to study changing *Leptosphaeria* populations in oilseed rape plants and air samples. *Acta Agrobotanica* 66, 93-100.

- Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T., 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 499-501.
- Kiddle G, Hardinge P., Buttigieg N., Gandelman O., Pereira C., McElgunn C.J., Rizzoli M., Jackson R., Appleton N., Moore C., Tisi L.C., Murray J.A.H., 2012, GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology* 12, 15.
- Lievens B., Thomma B., 2005. Recent developments in pathogen detection arrays, Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology* 95, 1374-1380.
- Lin Z., Zhang Y., Zhang H., Zhou Y., Cao J., Zhou J., 2012. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology* 185, 296-300.
- Luo J., Vogel R., Niessen L., 2012. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of aflatoxigenic molds and their detection in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 159, 214-224.
- McElgunn C.J., Pereira C.R., Parham N.J., Smythe J.E., Wigglesworth M.J., 2014. A Low Complexity Rapid Molecular Method for Detection of *Clostridium difficile* in Stool. *PLoS ONE* 9(1), e83808. doi, 10.1371/journal.pone.0083808 .
- Moradi M., Oerke E. C., Steiner U., Tesfaye D., Schellander K., Dehne H.W., 2010. Microbiological and SYBR® Green real-time PCR detection of major *Fusarium* head blight pathogens on wheat ears. *Microbiology* 79, 646-654.
- Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T., 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 59, 145-57.
- Nagamine K., Watanabe K., Ohtsuka K., Hase T., Notomi T., 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clinical Chemistry* 47, 1742-1743.
- Niessen L., Luo J., Denschlag C, Vogel R.F., 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology* 36, 191-206.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, E63.
- Ponchel F., 2006. Real-time PCR using SYBR® Green I. [In:] M.T. Dorak (ed), *Real-time PCR*, Taylor & Francis Group, 138-154.
- Schmittgen T.D., 2006. Quantitative gene expression by real-time PCR, A complete protocol. [In:] M.T. Dorak (ed), *Real-time PCR*, Taylor & Francis Group, 127-137.
- Schnerr H., Niessen L., Vogel R.F., 2001. Real-time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by lightcycler – PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology* 71, 51-61.



Shcherbakova L.A., 2007. Advanced methods of plant pathogen diagnostics. [In:] Y.T. Dyakov, V.G. Dzhavakhiya, T. Korpela (eds.), *Comprehensive and molecular phytopathology*, Elsevier, 75-116.

Słomski R., 2008. *Analiza DNA, Teoria i praktyka*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, 1-573.

Sokol D.L., Zhang X., Lu P., Gewirtz A.M., 1998. Real time detection of DNA-RNA hybridization in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 11538-11543.

Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., Kanagawa T., Noda N., 2007. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Analytical Chemistry* 79, 5608-5613.

Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 5, 877-882.

Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters of Applied Microbiology* 51, 650-657.

Tsutsumi N., Yanagisawa H., Fujiwara Y., Ohara T., 2010. Detection of potato spindle tuber viroid by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Research Bulletin of Plant Protection Service Japan* 46, 61-67.

Wyska E., Rosiak M. 2006. Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w badaniach farmakokinetycznych. *Postępy Hig. Med. Dosw. (online)* 60, 660-666.

Yin Y., Ding L., Liu X., Yang J., Ma Z., 2009. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in planta by a real-time PCR assay. *Journal of Phytopathology* 157, 465-469.

Zhang Z.Y., Liu X.J., Li D.W., Yu J.L., Han C.G., 2011. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* 8, 550.

[www.dolinabiotechnologiczna.pl/nowosci/test-zestawow-thermo-dynamo%E2%84%A2-colorflash-qpcr-kits/](http://www.dolinabiotechnologiczna.pl/nowosci/test-zestawow-thermo-dynamo%E2%84%A2-colorflash-qpcr-kits/)



# WPLYW NAWADNIANIA NA PLON I JAKOŚĆ BULW ZIEMNIAKA

Karolina Joanna Lipińska<sup>1</sup>, Katarzyna Mitura, Ewa Spychaj-Fabisiak

## 1. WSTĘP

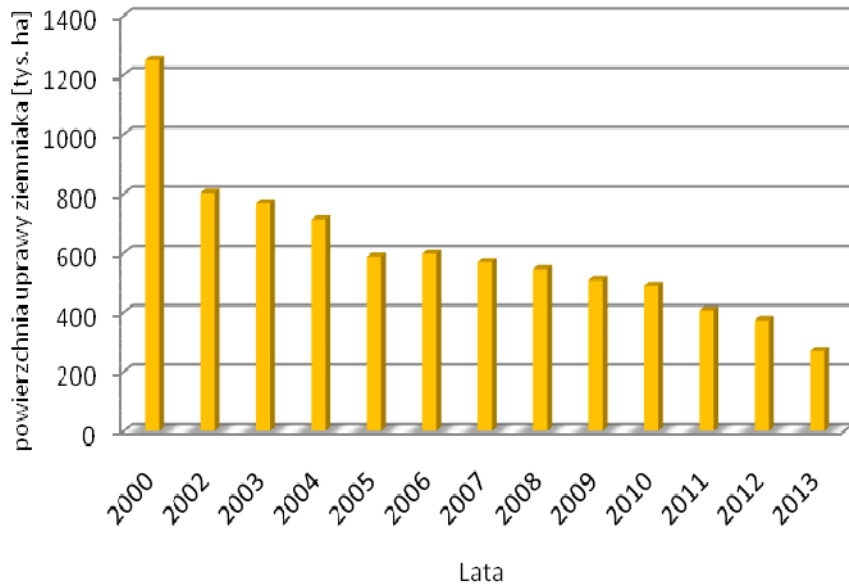
Psianka ziemniak to prawidłowa botaniczna nazwa rośliny, którą najczęściej określa się synonimem – ziemniak. Jest to gatunek byliny należący do rodziny psiankowatych. Nazwa „ziemniak” odnosi się zarówno do części nadziemnej, jak i do części jadalnych – bulw pędowych. *Solanum tuberosum* L. pochodzi z Ameryki Południowej (środkowe Andy). Początkowo był głównym pożywieniem bydła opasowego oraz ważnym surowcem dla przemysłu skrobiowego i gorzelni. Obecnie ziemniak jest podstawowym surowcem do produkcji aż 70 wyrobów, do których zalicza się zarówno te żywnościowe, jak i przemysłowe; wykorzystywany jest również jako materiał sadzeniakowy. Jest to roślina, którą można uprawiać na glebach lekkich [Klikocka i Sachajko 2011].

Znanych jest aż 10000 odmian ziemniaka. W Peru znajduje się największy bank genów tej rośliny, w którym zdeponowano wszystkie poznane odmiany. Polski Rejestr zawiera 129 odmian, wśród których dominują odmiany jadalne. Pod względem wielkości zbiorów roślin uprawnych ziemniak zajmuje czwarte miejsce – zaraz po pszenicy, ryżu i kukurydzy [Klikocka i Sachajko 2011]. Polska zajmuje siódme miejsce w świecie pod względem areалу uprawy i produkcji. W kraju ziemniak należy do najważniejszych gatunków roślin uprawnych pomimo ciągle zmniejszającej się powierzchni uprawy (rys. 1) (GUS).

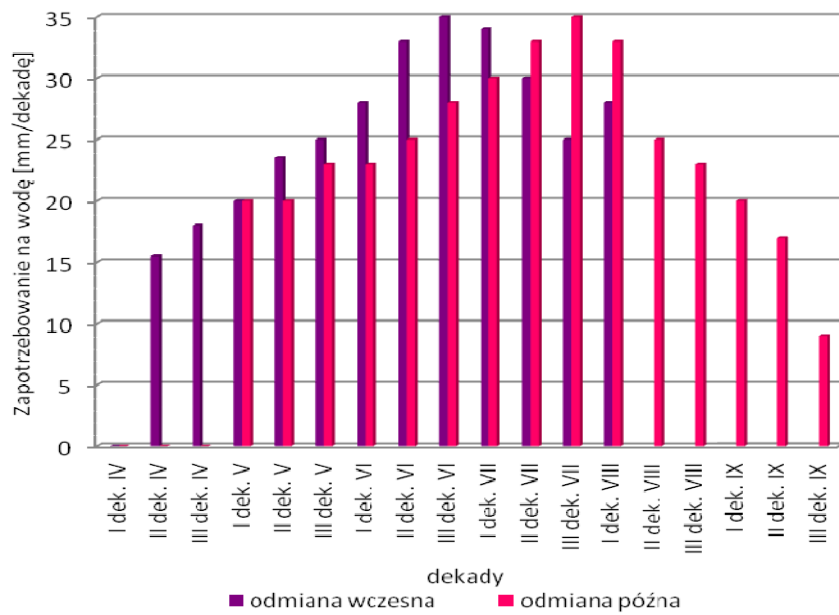
Ziemniak to roślina o wysokim potencjale produkcyjnym, silnie reagująca na poprawę warunków wilgotnościowych [Ossowski i in. 2013]. Czynnikiem ograniczającym produkcję może być niedobór bądź niekorzystny rozkład opadów atmosferycznych i jego zgodność ze zmieniającymi się w czasie potrzebami roślin w okresie wegetacyjnym [Pińska i in. 2009, Trawczyński 2009]. Podawane w literaturze informacje na temat potrzeb wodnych ziemniaka różnią się ze względu na różne warunki prowadzenia doświadczeń, związane z latami badań, odmianami, warunkami siedliskowymi czy zasięgiem terytorialnym [Kalbarczyk i Kalbarczyk 2009]. Jednak średnie zapotrzebowanie ziemniaka w warunkach Polski wynosi od 250 do 300 mm dla odmian wczesnych (w okresie od maja do lipca) oraz od 350 do 400 mm dla odmian późnych (od maja do września), a w latach bardzo suchych powyżej 400 mm [Pińska i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009] (rys. 2). Największe niedobory opadów dla ziemniaka występują od drugiej dekady lipca do połowy sierpnia.

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Zakład Chemii Rolnej, ul. Seminaryjna 5, 85-326 Bydgoszcz, e-mail: lipinska\_karolina@wp.pl



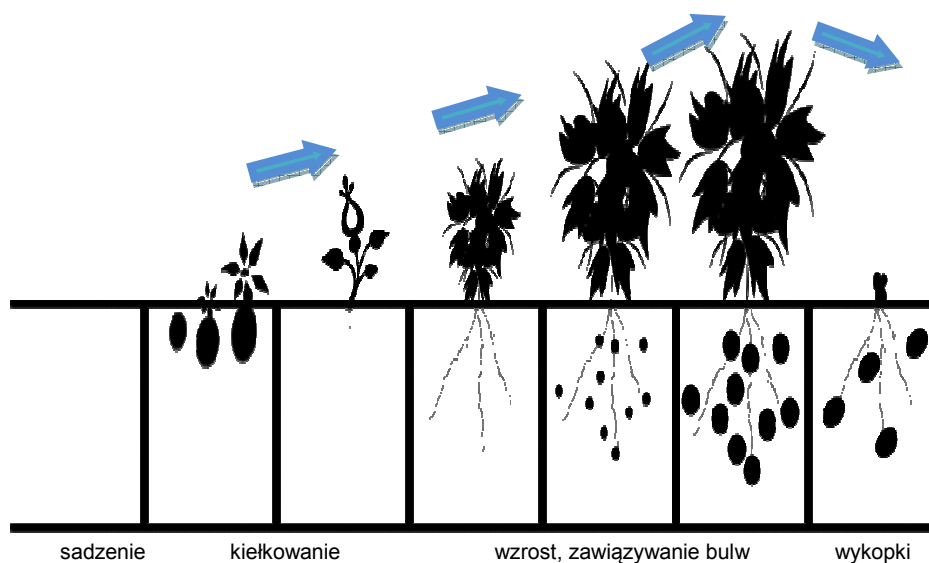
Rys. 1. Powierzchnia uprawy ziemi w Polsce [źródło: GUS]



Rys. 2. Zapotrzebowanie ziemi na wodę z uwzględnieniem odmian wczesnych i późnych (źródło: opracowanie własne na podstawie: [Stachowicz 2001])

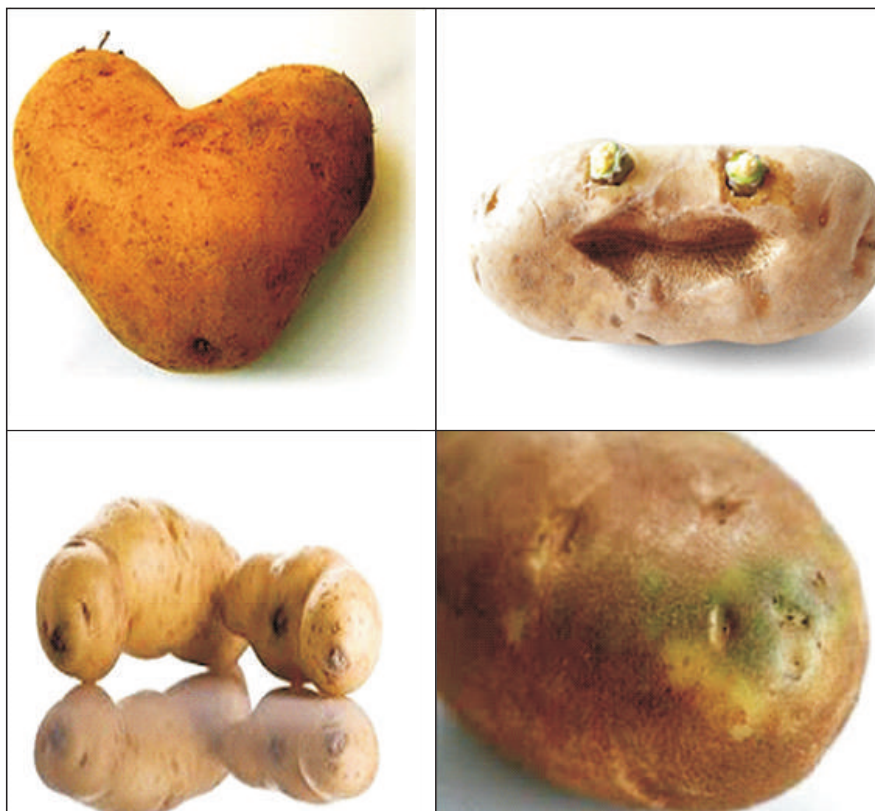
W pierwszych fazach rozwoju roślina wykorzystuje zapasy wodne, które są efektem zimowo-wiosennej retencji profilu glebowego. Korzystny wpływ ma ciepła i słoneczna pogoda oraz niezbyt wysokie opady. Okres krytyczny przypada pomiędzy faza-

mi: zawiązywania się pąków a końcem kwitnienia [Stachowicz 2001, Jakubowski 2007]. Największe zapotrzebowanie na wodę występuje w okresie potuberyzacyjnym, gdy wytworzone bulwy szybko powiększają swoją wielkość i masę. Wtedy ziemniak wykazuje największą wrażliwość na jej niedobór. Optymalna temperatura w tym okresie wynosi 15-20°C. Wyższa temperatura może spowodować zdrobnienie bulw. Końcowa faza wegetacji to usychanie łętów i zbiór, gdy zapotrzebowanie na wodę jest mniejsze (rys. 3) [Stachowicz 2001].



Rys. 3. Przebieg zapotrzebowania na wodę rośliny z gatunku *Solanum tuberosum* L. w poszczególnych etapach rozwoju [źródło: [www.google.pl/img](http://www.google.pl/img)]

Susza to powtarzalna cecha klimatu, która jest konsekwencją naturalnego zmniejszenia opadów w pewnym czasie i na danym obszarze. Określenie rozmiaru suszy, a także poznanie przyczyn i czynników, które wpływają na jej przebieg oraz skuteczność przewidywania mają istotne znaczenie w przeciwdziałaniu skutkom suszy [Łabędzki 2004]. Skutki nie są natychmiastowe, mogą uwidaczniać się w dłuższym czasie. Wystąpienie suszy w okresie wegetacyjnym ziemniaka powoduje przede wszystkim zaburzenia wzrostu oraz deformację bulw z tendencją do spękań i pustowatości miąższu, szczególnie gdy na przemian występują okresy suszy i dużych opadów połączone z wysoką temperaturą. Ponadto przesuszone redliny, po wcześniejszym uwilgotnieniu, pękają, co skutkuje zielenieniem bulw [Stachowicz 2001, Trawczyński 2009] (rys. 4). Niedobór wody w okresie wzrostu może powodować również zaburzenia w przemianach cukrów oraz w prawidłowym zaopatrzeniu rośliny w składniki pokarmowe, co może wpływać na jakość surowca [Pińska i in. 2009, Wierzbicka i Trawczyński 2011].



Rys. 4. Skutki suszy podczas okresu wegetacyjnego ziemniaka [źródło: [www.google.pl/img](http://www.google.pl/img)h]

Najważniejszym czynnikiem, który decyduje o wielkości i jakości plonu warzyw w warunkach klimatycznych naszego kraju, jest woda. W okresie letnim obserwuje się coraz większe zapotrzebowanie na wodę do nawadniania z powodu jej niedoboru w glebie [Grabarczyk 1987, Kaniszewski 2005, Trawczyński 2011, Rolbiecki 2013]. Zabieg ten pozwala na stabilizację dostępności wody w glebie dla roślin w okresie wegetacji [Mazurczyk i in. 2009, Rumas-Rudnicka i in. 2009, Trawczyński 2011]. Jednak czynnikiem ograniczającym rozwój nawodnień jest deficyt wody, dlatego ważna jest optymalizacja nawadniania ze skromnych zasobów [Treder i in. 2011]. Bardzo ważne jest dobranie techniki nawadniania, która zapewni roślinom odpowiednie dawki wody, a także składników pokarmowych.

Najpowszechniej stosowane techniki nawadniania to nawadnianie deszczowniane i kropłowe (rys. 5). Pierwsza z nich polega na dostarczaniu dużych ilości wody pod wysokim ciśnieniem, może to jednak powodować uszkodzenie liści i zaskorupienie gleby. Jest to również proces wysoce kosztowny. Alternatywą do tego rodzaju technologii jest nawadnianie kropłowe. Pozwala ono precyzyjnie dostarczyć odpowiednie dawki wody do rośliny, a także daje możliwość zastosowania fertygacji oraz sprzyja polepszeniu warunków fitosanitarnych. Jest to najczęściej stosowany typ nawadniania w uprawie ziemniaka [Jakubowski 2007, Mazurczyk i in. 2009, Trawczyński 2009, Trawczyński 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Ossowski i in. 2013].



Rys. 5. Rodzaje nawadniania upraw (od góry: nawadnianie kropłowe i deszczowniane [źródło: [www. agrofoto.pl](http://www.agrofoto.pl)])

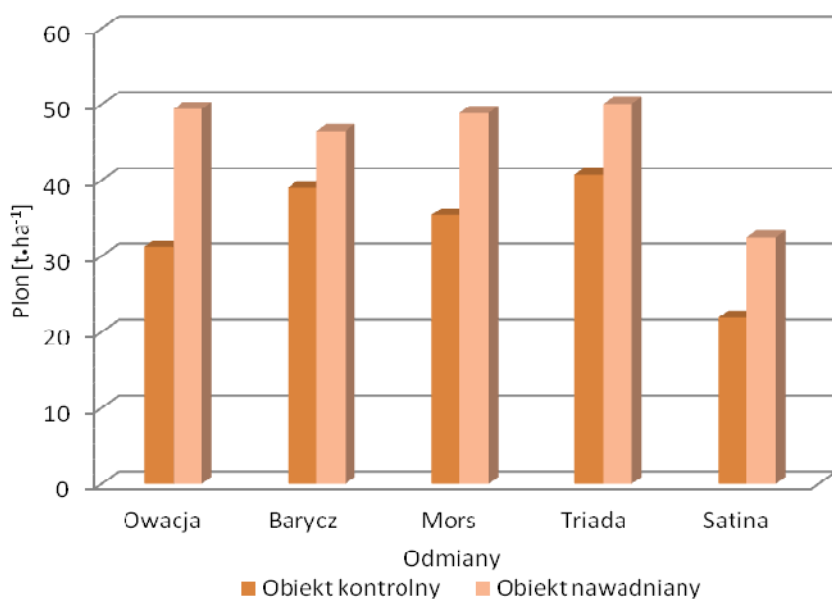
Ziemniak należy do roślin polowych, których uprawa jest zalecana na polach nawadnianych ze względu na zwiększenie przyrostu plonu i poprawę jego jakości. Jednak zbyt intensywny opad w lipcu i sierpniu sprzyja porażeniu plantacji zarazą ziemniaka. Należy pamiętać, że w wyniku nawadniania może dojść do okresowego pogorszenia właściwości chemicznych gleby, szczególnie gleby lekkiej, ze względu na luźniejszy skład granulometryczny, co sprzyja wysokiej przepuszczalności podłoża. Może to przyczynić się do pogorszenia jakości plonów m.in z powodu wymywania składników pokarmowych w głębsze warstwy profilu glebowego [Spychaj-Fabisiak 2001, Koszański i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009, Rumasz-Rudnicka i in. 2009, Stachowicz 2001, Trawczyński 2011 ].

W związku z powyższym dokonano przeglądu literatury [Mazurczyk i in. 2009, Pińska i in. 2009, Rębarz i Borówczak 2009, Rolbiecki i in. 2009, Trawczyński 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Ossowski i in. 2013] dotyczącego wpływu stosowania nawodnień w uprawie ziemniaka na plon i jakość bulw.

Analizie poddano odmiany zarówno wczesne (Owacja, Mors, Berber, Miłek, Agnes, Triada, Dorota, Gracja, Barycz, Satina, Tajfun, Vitara), jak i późne (Fianna, Ursus).

## 2. OPIS ZAGADNIENIA

Obecnie jednym z najważniejszych celów w produkcji ziemniaka jest wysoki plon i jakość zbieranych bulw, a także zmniejszenie nakładów pracy oraz poniesionych kosztów [Jabłoński 2009, Mazurczyk i in. 2009, Trawczyński 2009, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Żarski i in. 2011]. W Polsce ziemniaki uprawia się na areale około 300 tys. hektarów (2013 rok, wg GUS). Powierzchnia uprawy tej rośliny zmniejsza się, podobny trend zaobserwowano w innych krajach europejskich, jednak w przeciwieństwie do Polski zmniejszeniu się areалу towarzyszy satysfakcjonujący wzrost plonu z jednostki powierzchni. Dlatego ważne jest, aby uzyskać podobne wyniki jak na rynkach europejskich. Pomóc w tym może stosowanie dodatkowego nawadniania uprawy. Udowodniono pozytywny wpływ tego zabiegu na wysokość plonu [Mazurczyk i in. 2009, Rębarz i Borówczak 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Ossowski i in. 2013]. Wyniki badań wskazują, że na obiektach nawadnianych wystąpił wzrost plonu o prawie 50% w porównaniu z obiektami kontrolnymi (rys. 6).



Rys. 6. Plon ziemniaka w zależności od stosowanych zabiegów i odmiany [opracowanie własne na podstawie: Mazurczyk i in. 2009, Rębarz i Borówczak 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Ossowski i in. 2013]

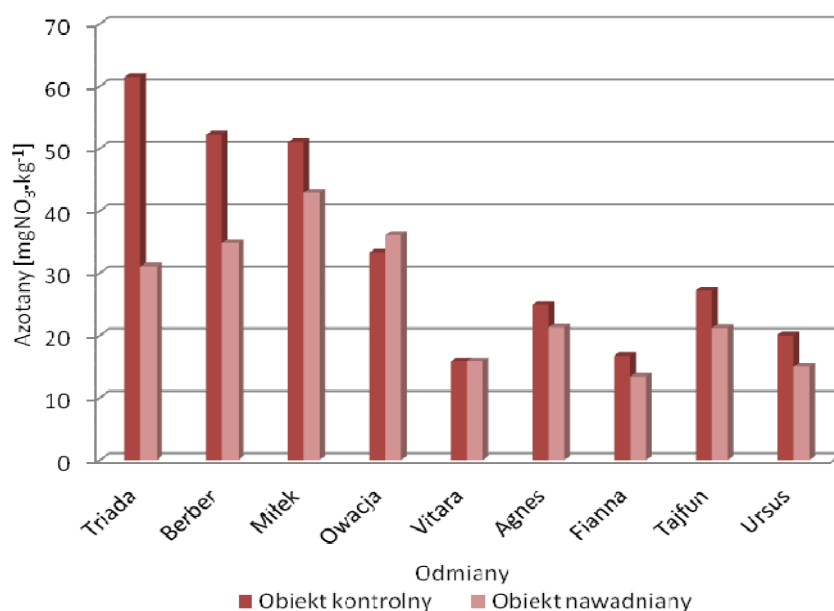
Badania wyraźnie wskazują, że poszczególne odmiany uprawne reagują wzrostem plonu przy stosowanych nawodnieniach uzupełniających. Dla odmiany Owacja plon na obiektach nawadnianych wzrósł średnio o 18,2 t·ha<sup>-1</sup>, a dla odmian: Mors, Satina, Triada i Barycz zaobserwowano wzrost plonu odpowiednio o 13,48; 10,6; 9,34 i 7,45 t·ha<sup>-1</sup>. Najwyższym plonem charakteryzowała się odmiana Triada (50,07 t·ha<sup>-1</sup>), natomiast



najniższym Satina ( $32,50 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Średni plon zebrany z obiektów kontrolnych wyniósł  $33,65 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , natomiast po zastosowaniu nawadniania  $45,46 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

W literaturze przedmiotu opisywano również wpływ nawadniania w aspekcie akumulacji azotanów(V) w bulwach ziemniaków [Mazurczyk i in. 2009, Trawczyński 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011]. Zawartość jonów w ilościach przekraczających dopuszczalne wartości ( $200 \text{ mg NO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$  św.m.) jest szkodliwa dla zdrowia człowieka [Marks 2009, Wierzbicka 2011, Wszelaczyńska i in. 2013, Wszelaczyńska i in. 2014]. Ziemniak jest rośliną o dużej skłonności do akumulacji tych związków w bulwach. Zagórska i Grudzińska [2008] wykazały w badaniach, że zawartość azotanów w bulwach odmian wczesnych jest większa niż u odmian późniejszych.

Zawartość azotanów w bulwach po zastosowaniu nawadniania kształtowała się na niskim poziomie w porównaniu z zawartością azotanów w bulwach uzyskanych z obiektów kontrolnych i wyniosła średnio  $25,73 \text{ mg NO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$  (rys. 7).



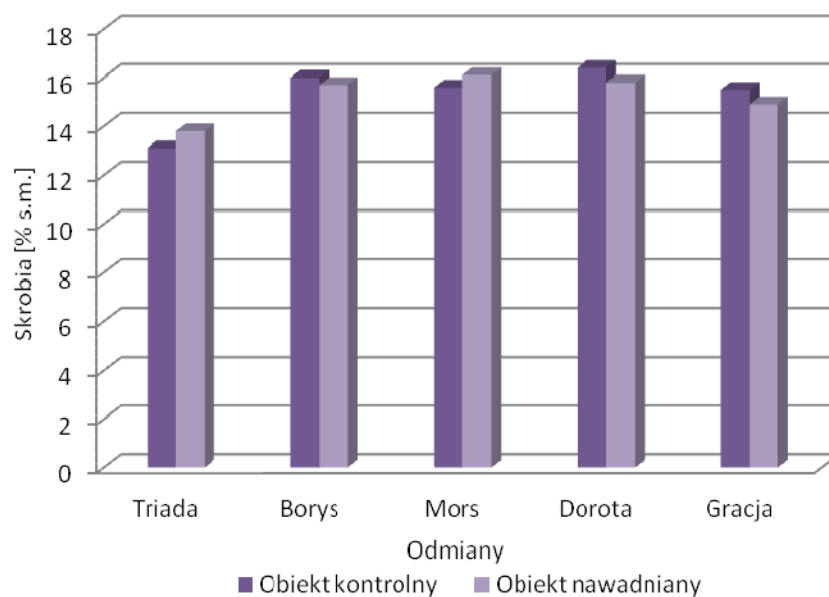
Rys. 7. Zawartość azotanów w bulwach ziemniaka dla poszczególnych odmian z uwzględnieniem stosowanego zabiegu [opracowanie własne na podstawie: Mazurczyk i in. 2009, Trawczyński 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011]

Stwierdzono istotny wpływ nawadniania na zawartość azotanów w bulwach ziemniaka. Bulwy z obiektów nawadnianych zawierały mniej azotanów. Nie wszystkie odmiany zareagowały tak samo. Bulwy odmiany Owacja zawierały więcej azotanów po zastosowaniu nawadniania niż bulwy z obiektu kontrolnego, natomiast bulwy odmiany Vitara tyle samo w obu wariantach doświadczalnych. Spośród ocenianych odmian, najmniej azotanów zawierały: 'Fianna' ( $13,4 \text{ mg NO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 'Vitara' ( $15,8 \text{ mg NO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ ) oraz 'Ursus' ( $15 \text{ mg NO}_3\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Głównym kryterium oceny wartości odżywczej ziemniaka jest zawartość łatwo przyswajalnych węglowodanów, w postaci skrobi oraz suchej masy, które wpływają na konsystencję surowych i przetworzonych bulw oraz ich smak i zawartość składników

mineralnych [Wierzbicka 2011, Ossowski i in. 2013]. Ciepła i słoneczna pogoda o niezbyt wysokich, lecz równomiernie rozłożonych opadach w ostatniej fazie wzrostu bulw ziemniaka sprzyja nagromadzeniu w bulwach suchej masy i skrobi [Stachowicz 2001].

Zastosowane nawadnianie nie różnicowało zawartości skrobi w bulwach ziemniaka. Koncentracja tego składnika w bulwach zebranych z obiektów kontrolnych wyniosła 15,32% s.m., po zastosowaniu nawadniania była podobna i wyniosła 15,26% s.m. Dla odmian Borys, Dorota, Gracja zawartość skrobi była wyższa na obiektach kontrolnych, natomiast dla odmian Triada i Mors w warunkach nawadniania (rys. 8).



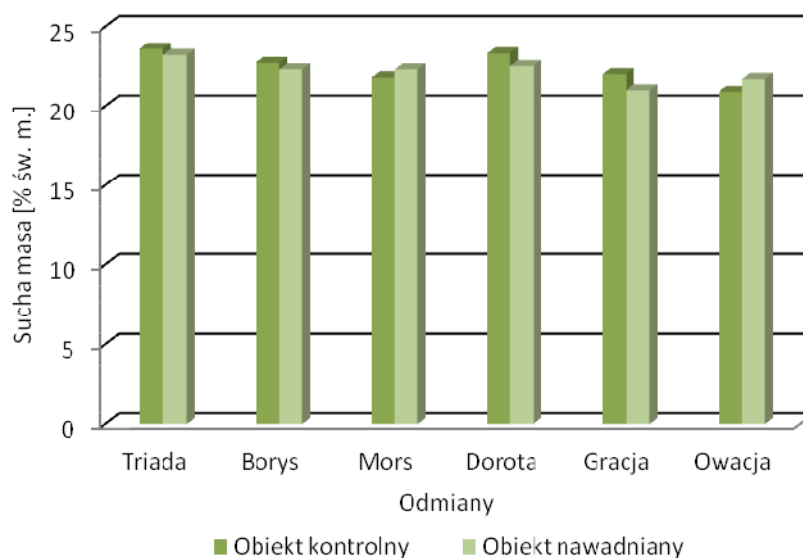
Rys. 8. Zawartość skrobi w bulwach ziemniaka w zależności od odmiany i stosowanych zabiegów [opracowanie własne na podstawie: Pińska i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009, Ossowski i in. 2013]

Podobnie kształtowała się zawartość suchej masy. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy obiektami nawadnianymi a kontrolnymi. Średnia zawartość suchej masy na obiektach kontrolnych wynosiła 23,8% św.m., natomiast na obiektach, gdzie stosowano nawadnianie – 21,6% św.m. Najwięcej suchej masy zawierała odmiana Triada (23,6% św.m.), a najmniej 'Owacja' (20,9% św.m.) (rys. 9).

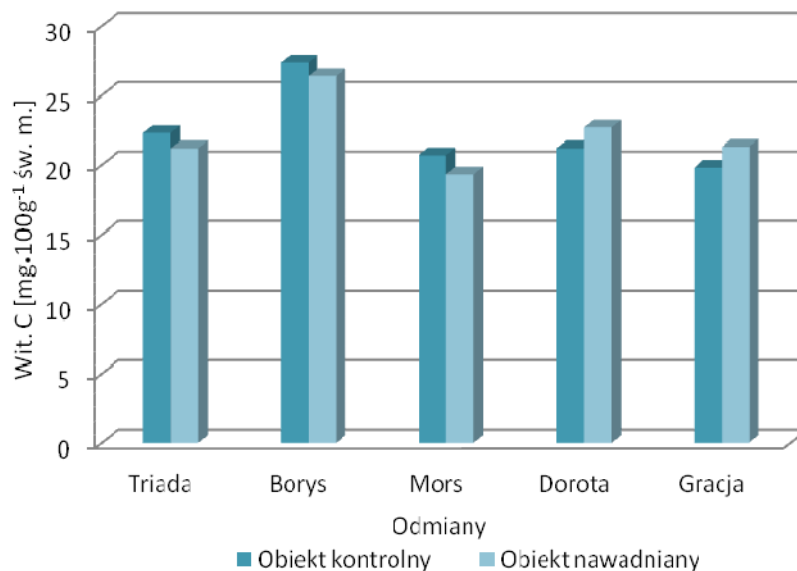
O wartości odżywczej ziemniaka decyduje również zawartość witaminy C w bulwach. Witaminy nie są źródłem energii ani składnikami strukturalnymi tkanek, są jednak niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Najwięcej witaminy C znajduje się w świeżych owocach i warzywach, a ze względu na duże spożycie ziemniaków w Polsce – stanowią one jedno z jej podstawowych źródeł. Już codzienne spożycie 200 g ziemniaków pokrywa w 50% codzienne zapotrzebowanie na tę witaminę [Rytel i Lisińska 2007].

Przedstawione rezultaty badań wykazały, że nawadnianie nie miało istotnego wpływu na jej ilość. Różnice występowały jedynie pomiędzy odmianami [Mazurczyk i in. 2009, Pińska i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Traw-

czyński 2011, Ossowski i in. 2013]. Najwięcej witaminy C zawierała odmiana Borys (27,4 mg·100 g<sup>-1</sup> św.m.), a najmniej Gracja (19,8 mg·100 g<sup>-1</sup> św.m.), (rys. 8).



Rys. 9. Zawartość suchej masy w bulwach ziemniaka dla poszczególnych odmian w zależności od stosowanych zabiegów [opracowanie własne na podstawie Pińska i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009, Ossowski i in. 2013]



Rys. 10. Zawartość witaminy C w bulwach ziemniaka w zależności od odmiany i stosowanego zabiegu [opracowanie własne na podstawie: Mazurczyk i in. 2009, Pińska i in. 2009, Rolbiecki i in. 2009, Wierzbicka 2011, Wierzbicka i Trawczyński 2011, Ossowski i in. 2013]

### 3. PODSUMOWANIE

Warunki klimatyczno-glebowe występujące w naszym kraju sprzyjają uprawie ziemniaka. Jednak osiągnięte plony zależą w dużym stopniu od częstotliwości i rozkładu opadów atmosferycznych [Pińska i in. 2009]. Dlatego bardzo ważne jest stosowanie nawadniania, które często ma charakter interwencyjny, w celu uzupełnienia niedoboru opadów, aby zaspokoić potrzeby wodne rośliny. Nawadnianie upraw jest procesem wymagającym dużej wiedzy oraz precyzji, które pozwala uzyskać zadowalający plon, a także jego wysoką jakość [Żarski i in. 2011]. W przeciwnym przypadku nadmiar wody może sprzyjać występowaniu licznych chorób, niepotrzebnemu zużyciu wody czy energii. Może ponadto powodować wymywanie składników pokarmowych, zwłaszcza azotu, do głębszych warstw profilu glebowego, a nawet do wód gruntowych. Z drugiej strony niedobór wody może spowodować straty plonu [Szeptycki 2011].

Ziemniak ma w Polsce duże znaczenie gospodarcze, co może wynikać między innymi ze sprzyjających warunków agrarnych gospodarstw z przewagą gleb lekkich oraz możliwości wszechstronnych kierunków jego użytkowania. Zatem w związku z zapotrzebowaniem na ten surowiec zabieg nawadniania wydaje się mieć istotne znaczenie dla krajowych producentów.

Od kilku lat obserwuje się spadek areału uprawy tej rośliny. Jest to sytuacja, która dotyczy również pozostałych krajów europejskich, jednak tam w przeciwieństwie do Polski wraz ze spadkiem powierzchni uprawy wzrasta wydajność plonu z hektara.

W świetle przeprowadzonych dotychczas wielu badań i uzyskanych wyników wydaje się zasadne nawadnianie upraw ziemniaka, które pozwala nie tylko na zwiększenie plonu, ale także poprawę jakości. We Francji czy Niemczech systemy nawadniania upraw ziemniaka są wysoko rozwinięte, dlatego ważne jest, by uzyskiwać równie dobre efekty jak za granicą.

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury można stwierdzić, iż nawadnianie istotnie zwiększyło plonowanie bulw ziemniaka, powodując zwiększenie plonu nawet o 50% w porównaniu z obiektami kontrolnymi, gdzie jedynym dostępnym źródłem wody były opady atmosferyczne. Zjawisko to było niezależne od uprawianej odmiany. Zarówno odmiany późne, jak i wczesne reagowały zwiększeniem plonu w większym lub mniejszym stopniu.

Co istotne, zabieg nawadniania znacząco obniżał zawartość azotanów(V), nawet do 50% (odmiana Triada). Formy te są związkami, które w nadmiarze szkodzą zdrowiu, dlatego bardzo ważne jest, by ograniczać możliwość ich spożycia w codziennej diecie. Z pewnością pozytywny wpływ nawadniania, którego efektem jest istotny spadek koncentracji azotanów w bulwach ziemniaka, powinien zachęcać wszystkich producentów zajmujących się uprawą w tego gatunku.

Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu nawadniania na zawartość skrobi, suchej masy czy witaminy C w bulwach ziemniaka. Można jedynie zauważyć różnicę pomiędzy badanymi odmianami.

Nawadnianie wydaje się więc zabiegiem przyszłościowym w uprawie ziemniaka, przy zastosowaniu odpowiedniego – wodo- i energooszczędnego systemu, z uwzględnieniem typu odmiany, warunków glebowych oraz wielkości i częstotliwości stosowanych dawek wody. Należy uwzględnić także pojemność wodną gleby oraz zamierzoną głębokość zwilżenia jej profilu oraz ograniczenia wynikające z pojemności źródła wody.

## LITERATURA

- Grabarczyk S., 1987. Połowe zużycie wody a czynniki meteorologiczne. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 181, 495-511.
- Jabłoński K., 2009. Nowe elementy w technice i technologii produkcji ziemniaków. Cz. 1. Uprawa gleby, nawożenie i sadzenie. Technika Rolnicza, Ogrodnicza i Leśna 4.
- Jakubowski T., 2007. Plonowanie i podatność na uszkodzenia mechaniczne bulw ziemniaka w zależności od współczynnika hydrotermicznego. Inżynieria Rolnicza 8(96), 87-93.
- Kalbarczyk R., Kalbarczyk E., 2009. Potrzeby i niedobory opadów atmosferycznych w uprawie ziemniaka średnio późnego i późnego w Polsce. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 3, 129-140.
- Kaniszewski S., 2005. Nawadnianie warzyw polowych. PlantPress Kraków.
- Klikocka H., Sachajko J., 2011. Kompleksowa ocena agrotechnologii ziemniaka i pszenżyta jarego. Acta Agroph., Rozprawy i Monografie nr 195 (4), 16-20.
- Koszański Z., Rumaszk-Rudnicka E., Kowalewska R., 2009. Zmiany chemicznych właściwości gleby lekkiej w wyniku wieloletniego nawadniania borówki wysokiej. Acta Agrophys. 14(1), 109-114.
- Łabędzki L., 2004. Problematyka susz w Polsce. Woda - Środowisko - Obszary Wiejskie t. 4, 1(10), 47-66.
- Marks N., 2009. Zawartość azotanów, azotynów i metali ciężkich w bulwach ziemniaka w zależności od długości i okresu przechowywania. Inż. Rol. 1(110), 183-187.
- Mazurczyk W., Wierzbicka A., Wroniak J., 2009. Wpływ optymalizacji nawadniania i nawożenia azotem na wybrane parametry wzrostu roślin oraz plon wczesnej odmiany ziemniaka. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 3, 91-99.
- Nowacki W., 2012. O kierunkach zmian w uprawie ziemniaka w Polsce. Biul. IUNG Puławy 266, 21-35.
- Ossowski W., Rolbiecki S., Wojdyła T., Wichrowska D., Rolbiecki R., 2013. Wpływ sposobów nawadniania na plonowanie ziemniaka średnio wczesnego uprawianego na glebie lekkiej w regionie pomorskim. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 1, 133-145.
- Pińska M., Wojdyła T., Rolbiecki S., Rzekanowski C., Rolbiecki R., 2009. Wpływ nawadniania uzupełniającego i nawożenia azotem na jakość wczesnych odmian ziemniaka. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 6, 245-256.
- Rębarz K., Borówczak F., 2009. Wpływ deszczowania i systemu uprawy na plon, wielkość i zdrowotność bulw ziemniaków. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 54(4), 69-73.
- Rolbiecki R., 2013. Ocena potrzeb i efektów mikronawodnień szparaga (*Asparagus officinalis* L.) na obszarze szczególnie deficytowym w wodę. Wyd. Uczeln. UTP w Bydgoszczy, Rozprawy 162.
- Rolbiecki S., Rzekanowski C., Rolbiecki R., 2009. Ocena potrzeb nawadniania ziemniaka średnio wczesnego w okolicy Bydgoszczy w latach 2005-2007. Acta Agrophys. 13(2), 463-472.

Rumasz-Rudnicka E., Koszański Z., Woroniecki T.K., 2009. Zmiany właściwości chemicznych gleby lekkiej pod wpływem nawadniania kropłowego i nawożenia azotem maliny. *Acta Agrophys.* 14 (1), 177- 185.

Rytel E., Lisińska G., 2007. Zmiany zawartości witaminy C w bulwach ziemniaka podczas gotowania i przetwarzania na produkty smażone i suszone. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość* 6(55), 186-197.

Spychaj-Fabisiak E., 2001. Modelowanie procesów wymywania przyswajalnych związków azotu w zależności od właściwości gleb. *Wyd. Uczeln. UTP w Bydgoszczy, Rozprawy* 100.

Stachowicz T., 2001. Szacunek plonów ziemniaka. *NIWA Rolnicza* 12, 6.

Szeptycki A., 2011. Inżynieria rolnicza – pożądane kierunki badań w produkcji ziemniaków. *Prob. Inż. Rol.* 3, 13-20.

Trawczyński C., 2009. Wpływ nawadniania kropłowego i fertygacji na plon i wybrane elementy jakości bulw ziemniaka. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 3, 55-67.

Trawczyński C., 2011. Ocena zmian właściwości chemicznych gleby lekkiej w ekologicznym systemie uprawy roślin z nawadnianiem. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 56(4), 171-177.

Treder W., Wójcik K., Tryngiel- Grać A., Krzewińska D., Klamkowski K., 2011. Rozwój nawodnień roślin sadowniczych w świetle badań ankietowych. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 5, 61-69.

Wierzbička A., 2011. Wybrane cechy jakości bulw ziemniaków uprawianych w systemie ekologicznym w zależności od nawadniania. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 56(4), 203-207.

Wierzbička A., Trawczyński C., 2011. Wpływ nawadniania i mikroorganizmów glebowych na zawartość makro i mikroelementów w bulwach ziemniaków ekologicznych. *Fragm. Agron.* 28(4), 139-148.

Wszelaczyńska E., Pobereźny J., Żary-Sikorska E., Mareček J., 2013. Wpływ miejsca uprawy i przechowywania bulw na wybrane cechy kulinarne trzech odmian ziemniaka. *Inż. Ap. Chem.* 52(2), 68-70.

Wszelaczyńska E., Pobereźny J., Gruszczewski M., 2014. Trwałość przechowalnicza i stabilność cech jakościowych wybranych odmian ziemniaka o różnych kierunkach użytkowania. *Inż. Ap. Chem.* 53(2), 127- 129.

Zgórska K., Grudzińska M., 2008. Zawartość azotanów(V) w bulwach ziemniaka po obróbce wstępnej i termicznej. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.* 500, 475-481

Żarski J., Dudek S., Kuśmerek-Tomaszewska R., 2011. Potrzeby i efekty nawadniania ziemniaka na obszarach szczególnie deficytowych w wodę. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 5, 175-182.

*Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2013, 2014.* Główny Urząd Statystyczny Warszawa.

[www.google.pl/img](http://www.google.pl/img) (18.09.2014).

[www.agrofoto.pl](http://www.agrofoto.pl) (18.09.2014).

# MIKROORGANIZMY JAKO ALTERNATYWA DLA KONWENCJONALNEJ OCHRONY ROŚLIN PRZED CHOROBYMI

Karol Lisiecki<sup>1</sup>, Grzegorz Lemańczyk, Marcin Juda, Katarzyna Koczwarą

## 1. WSTĘP

Od momentu „udomowienia” roślin rolnicy borykali się z potrzebą ochrony swoich upraw i zbiorów przed różnymi agrofagami. Poważny problem w okresie wegetacji roślin oraz przechowywania płodów stanowią patogeny. Biorąc pod uwagę galopujące ceny żywności na rynkach światowych, zmniejszający się areal gruntów zdalnych pod uprawę roślin (spowodowany degradacją środowiska glebowego), wysoki stopień chemizacji rolnictwa oraz ogólną intensyfikację produkcji roślinnej, ważne jest zebranie jak największego plonu o najwyższej jakości. Konsekwencją występowania chorób powodowanych przez różne patogeny jest zmniejszenie ilości otrzymanego plonu oraz spadek jego jakości, co skutkuje wzrostem cen żywności na rynkach światowych. Według Światowej Organizacji Wyżywienia i Rolnictwa straty gospodarki rolnej wywołane przez choroby sięgają do 33% rocznej produkcji w skali całego świata [Kryczyński 2005]. Choroby roślin wywoływane przez grzyby stanowią największą i zarazem najistotniejszą jednostkę chorobową pod względem strat, jakie powodują w rolnictwie konwencjonalnym, integrowanym i ekologicznym. Do walki z nimi stosuje się środki chemiczne zwane fungicydami. Pomimo ich wysokiej skuteczności i prostoty użycia środki te w ostatnich latach nie cieszą się zaufaniem. Są to związki, które mogą bezpośrednio i pośrednio powodować zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka oraz środowiska przyrodniczego.

Podczas aplikacji większości chemicznych środków ochrony roślin należy przestrzegać wielu restrykcyjnych norm bezpieczeństwa, by nie ulec zatruciu. Pozostałości fungicydu mogą kumulować się w tkankach rośliny na długo po jego aplikacji, przez co człowiek może ulec zatruciu podczas konsumpcji pokarmu roślinnego. Dlatego niezbędne jest przestrzeganie okresu karencji. Pozostałości (metabolity) takiego preparatu mogą przez długi czas pozostawać również w środowisku glebowym. Konwencjonalne fungicydy mają czasami bardzo szerokie spektrum działania, w związku z tym mogą nie tylko ograniczać populację docelowego patogenu, ale również redukować organizmy pożyteczne, tworząc tym samym wolne miejsce dla nowego patogenu [Kardowska-Wiater 2011, Kryczyński i Weber 2010].

Istotne jest również to, że jest organizmy szybko uodparniają się na działanie takiego preparatu, przez co staje się on mało użyteczny już po paru sezonach wegetacyjnych [Perez-Garcia 2011]. Dlatego cały czas prowadzone są badania nad nowymi typami preparatów i sposobami ochrony roślin, które mogą zostać użyte bez szkody dla środowiska przyrodniczego oraz człowieka. Wiąże się to z wysokimi kosztami badań. Ponadto rosnące ceny konwencjonalnych środków ochrony roślin skutkują zmniejszeniem rentowności produkcji. Wszystkie te zastrzeżenia spowodowały, że zwrócono uwagę na

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Zakład Fitopatologii Molekularnej, ul. ks. A. Kordeckiego 20 A, 85-084 Bydgoszcz,  
e-mail: Lisiecki88@gmail.com

biologiczne metody ochrony roślin. Biologiczna metoda ochrony polega na ograniczeniu rozwoju organizmów patogennych przy udziale czynników pochodzenia biologicznego – innych organizmów i/lub ich metabolitów.

Od około 30 lat trwają badania nad zastosowaniem wielu powszechnie występujących w naturze organizmów do zwalczania patogenów roślin. Najbardziej obiecujące zdaje się być wykorzystywanie mikroorganizmów (głównie bakterii, ale także niektórych gatunków grzybów), które poprzez swoje oddziaływanie hamują rozwój wielu patogenów roślin. Działanie takie może opierać się na zajmowaniu niszy ekologicznych potencjalnego patogenu, uniemożliwiając lub ograniczając jego rozwój. Potencjał fungistatyczny może opierać się także na obecności w środowisku metabolitów, które mogą skutecznie hamować rozwój grzyba. Metabolity mogą mieć postać kwasów organicznych, polipeptydów, antybiotyków (antybioza), enzymów litycznych itp. Mikroorganizmy mogą też wpływać na zmiany warunków środowiska życia (np. zmianę odczynu środowiska przez wytwarzanie i wydzielanie kwasów organicznych lub rozkład makromolekuł do np. kwasów organicznych), utrudniając lub uniemożliwiając rozwój patogenom.

Aby mikroorganizm był skuteczny w zwalczaniu chorób, musi być spełnionych kilka warunków. Wybrany antagonista musi być obecny w środowisku, gdy występuje prawdopodobieństwo infekcji. Głównym miejscem wystąpienia infekcji są uszkodzenia mechaniczne powierzchni roślin. Przez nie patogeny dostają się do tkanek roślin rozpoczynając proces chorobowy [Kardowska-Wiater 2011]. Organizmami o największym potencjale fungistatycznym są bakterie i promieniowce oraz liczne grzyby. Wiele bakterii naturalnie występuje w obrębie środowiska życia roślin, w glebie, ryzosferze, ryzoplacie, fyllosferze – jako endofity. Podobną strategię wykazują grzyby, zajmując odpowiednią niszę i rozwijając się, wchodzą z rośliną w relacje symbiotyczne (mikoryza). Odpowiednie ukierunkowanie ich działań umożliwia użycie ich jako naturalnego środka o bezpośrednim działaniu fungistatycznym lub wspomagającym roślinę w walce z patogenem czy poprawiającym kondycję roślin. Badania nad takimi organizmami doprowadziły do powstania preparatów zawierających mikroorganizmy. Wiele preparatów opatentowano i wprowadzono na rynek. Do najaktywniejszych szczepów bakteryjnych zalicza się bakterie właściwe z rodzaju *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, promieniowce z rodzaju *Actinomyces* i *Streptomyces* oraz grzyby z rodzaju *Trichoderma*.

W pracy przedstawiono problematykę biologicznej ochrony roślin, sposobów wykorzystywania i odpowiedniego ukierunkowania mikroorganizmów w zakresie ochrony roślin przed chorobami, wspomagania roślin w walce z nimi itp. Opisano przykłady wykorzystywanych preparatów, ich skład, metodę działania oraz tendencje badań nad nowymi metodami biokontroli.

## **2. DZIAŁANIE MIKROORGANIZMÓW WOBEC PATOGENÓW**

### **2.1. Antybioza**

Antybioza (zwana również antagonizmem wzrostowym) to zjawisko polegające na hamowaniu rozwoju i wzrostu jednych mikroorganizmów przez inne w wyniku wytwarzania oraz pozakomórkowego wydzielania metabolitów wtórnych o działaniu szkodliwym lub zabójczym (antybiotyków) [Sobiczewski 2009]. Antybiotyk jest cząsteczką



organiczną, najczęściej polipeptydem, działającą na inny mikroorganizm już w bardzo dużym rozcieńczeniu. Działanie antybiotyków może być zabójcze, lityczne lub statyczne. Dla jednych mikroorganizmów mogą być one zupełnie nieszkodliwe, a na inne działają hamująco lub zabójczo. Synteza takiego antybiotyku może być cechą szczepową, nie tylko gatunkową czy rodzajową [Gołębiowska 1975]. Największymi producentami antybiotyków o działaniu fungistatycznym są bakterie. Rodzaj *Pseudomonas* produkuje pirolnitrynę (zwana też chlorowanym fenylopirolem) o szerokim spektrum zwalczania patogenów z rodzajów *Rhizoctonia* i *Botrytis*. Kolejnym metabolitem jest pioluteoryna skuteczna w zwalczaniu *Pythium* spp. Niestety jest także fitotoksyczna. *Pseudomonas* zdolne są do syntezy fenazyń odgrywających istotną rolę w konkurencji mikroorganizmów o pokarm [Sobiczewski 2009]. Także *Bacillus* spp. zdolne są do produkcji przeciwgrzybowych antybiotyków, np. ituryny A i D. Ituryna A ogranicza infekcje powodowaną przez m.in. *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*. Z kolei ituryna D stosowana jest do zwalczania *Colletotrichum trifolii*, powodując lizę ścian komórkowych przetrwalników [Sobiczewski 2009].

## 2.2. Konkurencja

Działanie grzybobójcze może opierać się również na wzajemnym wypieraniu się mikroorganizmów z danego środowiska. Konkurencja jest powszechnym zjawiskiem występującym w środowisku glebowym. Współzawodnictwo występuje pomiędzy organizmami o identycznych lub zbliżonych potrzebach; może dotyczyć niszy jako miejsca rozwoju lub innych elementów (związków azotu i węgla, światło, woda), niezbędnych do prawidłowego rozwoju. Szansa wygrania walki o czynniki niezbędne do życia zależy głównie od szybkości wzrostu mikroorganizmu, jego wytrzymałości na czynniki środowiskowe, wydajności metabolicznej i energetycznej metabolizowanych składników pokarmowych, zdolności do ruchu. Często konkurencji towarzyszy zjawisko antybiozy i wydzielania innych związków organicznych, co potęguje działanie biobójcze [Libudzisz i in. 2007, Sobiczewski 2009].

## 2.3. Mykopasożytnictwo i mykoliza

Jest to typ interakcji pomiędzy organizmami, w którym jeden odnosi korzyści ze współżycia, jednocześnie powodując niekorzystny wpływ na drugi organizm. Korzyści takiego oddziaływania są związki pokarmowe pozyskane z organizmu żywiciela (azot, węgiel, siarka). Nieodłącznym elementem pasożytnictwa jest zjawisko mykolizy fitopatogenów. Mykoliza to zjawisko polegające na wytwarzaniu i wydzielaniu substancji litycznych (np. enzymów) degradujących ścianę komórkową grzyba. Do enzymów mikolitycznych należą m.in. chitynazy, glukanazy, laminarynazy, celulazy oraz proteazy. Wśród mikroorganizmów mykolitycznych najbardziej znane są bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Vibrio* [Gołębiowska 1975]. Do organizmów mykolitycznych zalicza się również grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* czy *Penicillium* [Marszewska-Ziemięcka 1974].

### 3. BIOLOGICZNE METODY KONTROLI FITOPATOGENÓW

Na przełomie ostatnich 20 lat odkryto, że wiele organizmów ma zdolności naturalnej kontroli patogenów. Działanie biofungicydu powinno opierać się na zdolności organizmu-anatgonisty do redukcji populacji patogena poprzez wpływ na jego metabolizm, hamowanie procesów biochemicznych, rozmnażanie, podziały komórkowe, blokowanie mechanizmu ekspresji genów, procesów sporulacji czy morfogenezy. Działanie takie wykazuje wiele metabolitów mikroorganizmów, m.in. antybiotyki, proteiny, enzymy (chitynazy, glukanazy, proteazy), lotne kwasy tłuszczowe, estry, alkohole, reaktywne formy tlenu [Gwiazdowska i in. 2006]. Mikroorganizmy powinny charakteryzować się szybkim rozwojem, aby w jak najkrótszym czasie mogły skolonizować środowisko występowania roślin. Powinny być skuteczne już w niskich koncentracjach oraz wykorzystać dostępne w środowisku składniki pokarmowe umożliwiające im jak najszybszy rozwój. Muszą być stabilne genetycznie, a także wykazywać skuteczność w zmiennych warunkach środowiska (zwłaszcza temperatury). Mikroorganizmy o właściwościach biobójczych powinny mieć szerokie spektrum działania wobec patogenów, jednak nie mogą być chorobotwórcze dla roślin. Ponadto powinno się je hodować na stosunkowo prostych i tanich pożywkach [Kardowska-Wiater 2011, Kryczyński i Weber 2010]. Produkcja preparatu rozpoczyna się od kilkietapowego procesu namnażania mikroorganizmu. Podstawą tego procesu jest przygotowanie tzw. „kultury matecznej”. Cały proces namnażania odbywa się w specjalnie przystosowanych fermentatorach, w warunkach ściśle kontrolowanych, o objętości zależnej od wielkości produkcji. Dla przykładu produkcja preparatu opartego na *Bacillus thuringiensis* prowadzona jest na dużą skalę w fermentatorach o objętości 100.000 litrów [Tomalak i in. 2010, Martyniuk 2011]. Namnażanie mikroorganizmów może trwać do kilku dni. Proces przerywa się, gdy gęstość hodowli osiąga odpowiedni poziom warunkujący jego skuteczność po przeniesieniu na nośnik. Przez cały czas produkcji niezbędna jest ścisła kontrola warunków hodowli, stanu pożywki, warunków fizykochemicznych oraz czystości kultury. Kolejnym krokiem jest dobranie odpowiedniego nośnika. Preparaty najczęściej mają formę stałą w postaci proszków lub granulek, suchych liofilizowanych lub w postaci płynnej (koncentrat) [Martyniuk 2011].

### 4. CHARAKTERYSTYKA BIOPREPARATÓW

Wieloletnie badania doprowadziły do powstania biopreparatów używanych w rolnictwie. Biopreparaty zazwyczaj mają postać koncentratu, zawiesiny, proszków, granulek itp. W zależności od postaci takiego preparatu zmienia się ilość jtk (jednostek tworzących kolonie) przypadających na jednostkę masy lub objętości. Biopreparaty w postaci proszku nie powinny zawierać mniej niż  $5 \times 10^9$  jtk/g oraz  $7 \times 10^9$  jtk/ml dla zawiesiny. Preparat powinien być wolny od wszelkiego rodzaju zanieczyszczeń innymi mikroorganizmami, jak również nie powinien być mieszany z silnymi utleniaczami, kwasami, zasadami. Podczas przygotowywania wodnego roztworu preparatu nie powinno się używać chlorowanej wody, gdyż działa ona letalnie na mikroorganizmy [Copping 2004]. Istotnym czynnikiem wyboru odpowiedniego szczepu jest nie tylko stopień jego oddziaływania względem patogenów, ale także możliwości technologiczne produkcji i stabilizacji komórek mikroorganizmu. Aby preparat był opłacalny w produkcji i dopuszczony do sprzedaży, powinien być stabilny, skuteczny oraz bezpieczny. Jego produkcja musi być opłacalna i wydajna. Mikroorganizmy wchodzące w skład biopre-

paratu powinny wykazywać szybki przyrost biomasy w warunkach hodowlanych oraz zdolność do przeżywania w procesie dalszej obróbki. Ważna jest także stabilność genetyczna, żywotność i trwałość podczas przechowywania [Kardowska-Wiater 2011]. Zaletą biopreparatów jest możliwość używania ich w uprawach organicznych, gdzie nie jest możliwe używanie konwencjonalnych środków ochrony roślin. Są to preparaty oparte na naturalnie, powszechnie występujących organizmach, dlatego też nie kłóci się to z definicją organicznej uprawy roślin. Preparaty dopuszczone do użycia nie mogą mieć negatywnego wpływu na środowisko i organizmy w nim żyjące.

## 5. MIKROORGANIZMY JAKO POTENCJALNE BIOFUNGICYDY

Dotychczas przebadano wiele mikroorganizmów wykazujących potencjał fungistatyczny, hamowania infekcji, a tym samym redukcji populacji fitopatogenów. Do najbardziej znanych bakterii pod tym względem zalicza się rodzaj *Bacillus*. Preparaty oparte na tych bakteriach stanowią największą grupę biologicznych środków ochrony roślin używanych na skalę komercyjną [Perez-Garcia i in. 2011]. *Bacillus* spp. zdolne są do syntezy wielu metabolitów o działaniu fungistatycznym. Substancje takie mogą stanowić alternatywną metodę ochrony przeciw patogenom lub też mogą stanowić suplement wchodzący w skład konwencjonalnych fungicydów. Większość tych substancji to antybiotyki oraz białka enzymatyczne, jak chitynazy czy  $\beta$ -1,3-glukanazy [Liu i in. 2010]. Kinsella i in. [2009] dowodzą, że *Bacillus subtilis* tworzy biofilmy wokół korzeni roślin, odżywiając się wydzielinami korzeniowymi. Patel i in. [2004] przebadali kilka izolatów otrzymanych z roślin i wybrali jeden o największej aktywności. Szczep zidentyfikowano jako *Bacillus licheniformis* BC98. Bakteria ta jest zdolna do produkcji substancji białkowej o wysokim potencjale przeciwwgrzybicznym; okazała się skuteczna wobec takich patogenów, jak: *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia bataticola* oraz *Curvularia lunata*. Kim i in. [2004] przebadali ponad 250 szczepów zanim wyizolowali jeden o największych zdolnościach fungistatycznych. Najbardziej aktywny szczep *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 produkował enzym zdolny do lizy ścian komórki grzyba. Enzymy te wykazały działanie wobec takich patogenów, jak *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium graminearum*, *Didymella bryoniae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monosporascus cannonballus*, *P. ultimum*, *P. capsici*. Liu i in. [2010] wykazali, że szczep *B. thuringiensis* subs. *colmeri* produkuje chitynazę o wysokim potencjale fungistatycznym. Oczyszczony enzym wykazywał 100% inhibicji względem *Botrytis cinerea* i *R. solani*, a ponadto wobec *Penicillium chrysogenum* i *Physalospora piricola*. Lee i in. [2007] wykazali że chitynazy produkowane przez szczep *Bacillus* sp. DAU101 miały fungistatyczną aktywność wobec *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *R. solani* i *S. sclerotiorum*. Zhao i in. [2010] badali 16 szczepów bakterii wyizolowanych z łodyg ostrokrzewu szerokolistnego (*Ilex latifolia*). Wyizolowany szczep *Bacillus vallismortis* ZZ185 skutecznie hamował rozwój *Alternaria alternata*, *F. graminearum*, *R. solani*, *Cryphonectria parasitica* i *Phytophthora capsici*. Wszystko za sprawą wydzielanej bacilliomycyny D. Liu i in. [2010] wyizolowali z korzeni pszenicy szczep *B. subtilis* EDR4, który wytwarzał proteinę o wysokiej aktywności fungistatycznej względem takich grzybów, jak *Macrophoma kuwatsukai*, *Rhizoctonia cerealis*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *F. graminearum*, *B. cinerea*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Kolejnym istotnym gatunkiem jest *Bacillus polymyxa* VLB16 wyizolowany z ryzosfery ryżu (*Oryza sativa*). Syntetyzowana przez niego proteina wykazała działanie hamujące wobec *Pyricularia grisea* i *R. solani*, powodujące największe straty w uprawie ryżu.

Izolat *Bacillus pumilus* QST 2808 charakteryzował się szerokim spektrum oddziaływań na wiele istotnych pod względem ekonomicznym patogenów grzybowych i bakteryjnych. Biopreparat używany jest do zwalczania wielu grzybów porażających rośliny zbożowe, owocowe, warzywa oraz winorośle. Nie tylko hamuje rozwój patogena, ale także indukuje system odpornościowy rośliny. Działa zarówno jako środek leczniczy oraz ma zastosowanie prewencyjne. Biopreparat z *B. pumilus* QST 2808 może mieć postać proszku lub płynnej zawiesiny. Może być także stosowany z fungicydami lub jako suplement nawozów. Szczep ten jest bezpieczny dla środowiska przyrodniczego. Nie stanowi też zagrożenia dla nasion i młodych siewek [Copping 2004]. Izolat *B. subtilis* GB03 używany jest do zwalczania *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., porażających wschodzące siewki soi, orzechów arachidowych, zbóż czy bawełny. Działanie preparatu polega na szybkim kolonizowaniu ryzosfery, uniemożliwiając rozwój patogenom. Biopreparat jest kompatybilny z innymi środkami ochrony roślin, np. preparatem Captan czy środkami opartymi na miedzi. *Bacillus subtilis* var. *amylo-liquefaciens* FZB24 jest stosowany przy zwalczaniu *Fusarium* spp. oraz *Rhizoctonia* spp. i jako jeden z niewielu biopreparatów przeznaczony do użycia wewnętrznego. Najczęściej jest stosowany w szklarniach, pomieszczeniach i przydomowych ogrodach. Po zaszczepieniu mikroorganizm szybko rozwija się w strefie korzeniowej rośliny, uniemożliwiając rozwój patogenom. Biopreparat ten nie tylko ma właściwości grzybobójcze, poprawia wzrost i plonowanie roślin, a także uodparnia rośliny na infekcje. *Bacillus subtilis* MBI 600 jest skuteczny w zwalczaniu patogenów z rodzajów *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* i innych. Biopreparat stosuje się w uprawie orzechów arachidowych, soi, bawełny, wielu gatunków traw, zbóż, kukurydzy. Działanie biopreparatu opiera się na rywalizacji o składniki pokarmowe w obrębie systemu korzeniowego rośliny. Dowiedziono, że indukuje formowanie się bryły korzeniowej. Biopreparaty z *B. subtilis* QST 713 stosowane są do zwalczania m.in. *Uncinula necator*, *Podosphaera leucotricha*, *B. cinerea*, *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp., *Leveillula taurica*, *Alternaria* spp., *Erwinia amylovora*, *Venturia* spp., *Bremia lactucae*, *Peronospora* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Phytophthora infestans*, *Xanthomonas* spp., *Sclerotinia minor*, *Plasmopara viticola*. Stosuje się go przy uprawie winorośli, leszczyny, chmielu oraz warzyw (brokułów, pomidorów, ziemniaków, marchewi). Preparat skutecznie hamował rozwój wymienionych patogenów.

Kolejnym przykładem bakterii o wysokim potencjale fungistatycznym są szczepy z rodzaju *Pseudomonas*. Wiele izolatów już stosuje się na skalę przemysłową. Mikani i in. [2008] przebadali ponad 210 szczepów *Pseudomonas* pobranych z liści i owoców jabłoni. Wszystkie przebadano pod kątem zwalczania *Botrytis mali*. Spośród nich 10 wykazywało wysokie właściwości fungistatyczne względem *Botrytis mali*. Produkowały wiele metabolitów wtórnych o działaniu fungistatycznym, np. pyrrolintrynę. Wang i in. [2005] odkryli że, metabolity *Pseudomonas fluorescens* K-188 hamowały rozwój *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *P. ultimum*.

Biopreparaty z bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* występują na rynku środków ochrony roślin pod różnymi nazwami handlowymi. *Pseudomonas aureofaciens* Tx-1 stosowany jest do zwalczania *Sclerotinia homeocarpa*, *Colletotrichum* spp., *Pythium aphanidermatum*. Używany jest przy uprawie traw pod postacią darni lub przydomowych trawników, muraw itp. Działanie biopreparatu opiera się na wydzielaniu do środowiska kwasów (PCA, ang. *phenazine carboxylic acid*) oraz jego pochodnych. Nie powinien być mieszany z innymi środkami ochrony roślin czy nawozami. Nie można go mieszać ze środkami zawierającymi związki miedzi. Zaleca się go stosować jako środek

samodzielny. Biopreparat z *Pseudomonas chlororaphis* stosowany jest do zwalczania wielu patogenów występujących w glebie oraz porażających nasiona, m.in. w zbożach, roślinach szklarniowych oraz w szkółkach. Działanie biopreparatu opiera się na szybkim wzroście i kolonizacji strefy korzeniowej, odcięciu potencjalnych patogenów od składników pokarmowych, produkcji metabolitów o działaniu fungistatycznym, a także produkcji aktywatorów wzrostu roślin. Biopreparat nie powinien być stosowany wraz z innymi fungicydami. Może być mieszany z nawozami [Copping 2004].

Kolejną grupą mikroorganizmów o wysokim potencjale przeciwrzybiczym są promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. Są one naturalnymi, kosmopolitycznymi mikroorganizmami glebowymi. Znane są z produkcji wielu antybiotyków, np. streptomycyny, chloromycetyny, nystatyny i innych o szerokim spektrum oddziaływania na inne mikroorganizmy [Gołębiowska 1975]. To właśnie synteza wielu antybiotyków, enzymów i metabolitów warunkuje ich zdolności fungistatyczne. Udowodniono, że złożone polimery, np. chityna, stanowią dla nich istotne źródło węgla organicznego. Dlatego też syntetyzują enzymy chitynolityczne. Wan i in. [2008] wyizolowali *Streptomyces platensis* F-1, który syntetyzuje 16 lotnych związków chemicznych zakwalifikowanych do alkoholi, estrów, kwasów, alkanów, alkenów i ketonów. Dwa z nich, alkohol fenyleotylowy i (+)-epi-bicyclesesquiphellandrene, wykazywały działanie fungistatyczne w stosunku do *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* i *R. solani*. Prapagdee i in. [2008] podają, że niektóre *Streptomyces* skutecznie hamują rozwój *C. gloeosporioides* i *Sclerotium rolfsii*. Produkowały one enzymy z grupy chitynaz i glukanaz. Natomiast Joo [2005] wyizolował *Streptomyces halstedii* szczep AJ-7, który produkował wysokoaktywną przeciwgrzybową chitynazę. Enzym wykazywał najsilniejsze działanie względem *F. oxysporum*. W mniejszym stopniu hamował rozwój *A. alternata*, *C. gloeosporioides* oraz *Septoria lycopersici*. Han i in. [2009] także wyizolowali szczep promieniowca *Streptomyces* ściśle powiązanego z gąbkami *Craniella australiensis*. Zidentyfikowano go jako *Streptomyces* sp. DA11. Produkował on chitynazy hamujące rozwój *Aspergillus niger* i *Candida albicans*. Z kolei Degtyareva i in. [2008] podają że spośród 279 wyizolowanych szczepów *Streptomyces* tylko 17 wykazywało aktywność fungistatyczną względem *Fusarium*. Szczep o największym potencjale fungistatycznym zidentyfikowano jako *Streptomyces hygrosopicus* K49.

Biopreparaty z *P. fluorescens* stosowane są do zwalczania *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. Bakterie te znane są ze swoich właściwości przy przeciwdziałaniu odmrożeniom organów roślinnych. Biopreparat jest skuteczny przy ochronie grusz, jabłoni, bawełny i wielu warzyw. Działanie przeciw patogenom opiera się na antagonizmie. Biopreparat jest stosowany jako środek samodzielny. Biopreparaty z *Pseudomonas syringae* ESC-10 i ESC-11 używane są do kontroli patogenów na składowanym materiale poźniwnym. Można je aplikować na jabłka, gruszki, owoce cytrusowe, warzywa. Działanie preparatu opiera się na szybkiej kolonizacji bakterii tworzących barierę uniemożliwiającą rozwój patogenom. Niestety mikroorganizmy te są wrażliwe na inne środki ochrony roślin i muszą być stosowane jako samodzielny środek ochronny. Biopreparat ze *Streptomyces griseoviridis* K61 stosowany jest w biokontroli wielu patogenów roślin. Wykazuje on antagonizm względem patogenów należących do rodzajów *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*. Jest stosowany w uprawach szklarniowych, ogrodach i zielnikach. Fungistatyczny charakter mikroorganizmu opiera się na kombinacji paru czynników, m.in. rywalizacji o niszę i składniki pokarmowe, zdolności do rozkładu ścian komórkowych patogena, wytwarzaniu metabolitów hamujących rozwój patogena. Niestety biopreparat zawierający *S. griseoviridis* K61 nie może

być mieszany z innymi środkami ochrony roślin ani nawozami. Nie może być też rozrabiany w chlorowanej wodzie. *Streptomyces lydicus* WYEC108 stosowany jest do zwalczania fitopatogenów z rodzaju *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Monosporascus*, *Armillaria*, *Aphanomyces*, *Pythium*, *Phytophthora* i innych patogenów porażających korzenie roślin. Biopreparat stosuje się głównie w uprawach szklarniowych oraz szkółkarskich. Jego działanie polega na kolonizacji strefy korzeniowej. Promiennowce ponadto wydzielają enzymy i inne metabolity o charakterze przeciwwgrzybowym [Copping 2004].

## 6. MIKROORGANIZMY JAKO CZYNNIKI STYMULUJĄCE WZROST I PLONOWANIE ROŚLIN

Pożyteczne oddziaływanie mikroorganizmów nie ogranicza się jedynie do bezpośredniego zwalczania patogenów. Ochrona biologiczna może polegać na pośrednim oddziaływaniu – na elementy środowiska glebowego. W środowisku glebowym występuje wiele mikroorganizmów, których działanie korzystnie wpływa na kondycję, wzrost i rozwój wielu gatunków roślin. Mikroorganizmy takie, których największą grupę stanowią bakterie, nazwano bakteriami stymulującymi wzrost roślin (ang. PGPR – *Plant Growth Promoting Bacteria*/PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Działanie może przybrać postać pośrednią oraz bezpośrednią. Mikroorganizmy zdolne są do przeprowadzania wielu procesów przemian pierwiastków kluczowych dla rozwoju roślin, które nie były dotąd dostępne. Procesy mogą mieć charakter bioakumulacji, biotransformacji, chelatowania pierwiastka (jony metali np.  $Fe^{2+}$ ), uwalniania pierwiastków z form nierozpuszczalnych (np. fosforany), procesu redoks (związki siarki) itp. [Sobiczewski 2009]. Kolejnym przykładem jest zdolność mikroorganizmów do wytwarzania syntezy fitohormonów (auksyny, gibereliny, cytokininy i innych) w środowisku glebowym w bezpośredniej okolicy korzeni. Tym samym przyczyniają się do poprawy zdrowia i kondycji roślin żywicielskich (np. cytokininy wpływając na podziały komórkowe roślin przyspieszają rozrost korzeni, zwiększają powierzchnię chłonną bryły korzeniowej). W celu przyspieszenia wzrostu roślin oraz zwiększenia plonu mikroorganizmy wykorzystuje się od ponad stu lat. Początkowo zjawisko współdziałania mikroorganizmów z roślinami i płynące z tego korzyści zaobserwowano u roślin motylkowych i bakterii z rodzaju *Rhizobium*. Zaimplementowanie zjawiska symbiozy do agronomii skutkowało zwiększeniem biomasy roślin motylkowych, przyspieszeniem ich wzrostu, zwiększeniem plonu oraz odporności na stres. Działanie mikroorganizmów opierało się na wiązaniu wolnego azotu niedostępnego dla roślin wyższych. Z biegiem lat zauważono, że nie tylko ryzobia są zdolne do propagowania wzrostu roślin. Powszechnie stosuje się również szczepionkę wolno żyjących bakterii z rodzaju *Azotobacter*, zdolnych do wiązania wolnego azotu [Sobiczewski 2009].

## 7. BIONAWOZY MIKROBIOLOGICZNE

Z biegiem lat pojawiła się koncepcja tzw. bionawozów. Definicja tego terminu nie jest do końca sformułowana, jednakże odnosi się do tych mikroorganizmów, które przyczyniają się do zwiększenia biodostępności pierwiastków w glebie, a pośrednio także zdrowotności roślin. Nie jest to zatem nawóz organiczny *sensu stricte*, który zawiera substancje organiczne zwiększające żyzność gleby. Preparat taki najczęściej

stosuje się doglebowo – jako zaprawę nasienną – lub dolistnie [Sobiczewski 2009]. Przykładem tego typu „nawozów” w doglebowym dostarczaniu składników pokarmowych są mikroorganizmy zdolne do wiązania azotu. Zdolne są do tego bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* oraz *Azospirillum*. Jednak bionawozy nie ograniczają się tylko do wiązania azotu. Kolejnym bardzo istotnym przykładem jest zdolność mikroorganizmów do uwalniania fosforu z nieorganicznych i organicznych połączeń. Fosfor jest drugim pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu roślin. Nawet w glebie bogatej w fosforany stężenie tego pierwiastka jest niskie (ok. 1-5  $\mu\text{M}$ ) [Richardson i in. 2009]. Działanie takie opiera się na wytwarzaniu przez mikroorganizmy wielu kwasów organicznych, enzymów, np. kwaśnych fosfataz, powodując powstawanie anionów wodorofosforanowych ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) i diwodorofosforanowych ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) [Lugtenberg i Kamilova 2009]. Najbardziej znanymi mikroorganizmami z tej grupy są bakterie *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum* spp., *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus lentus*, *P. chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia* spp. i *Micrococcus* spp. Już w 1988 roku na rynek azjatycki wprowadzono preparat JUWEI C.B.I. zawierający *B. megaterium* oraz *Bacillus mucilaginous*, których aktywność powodowała zwiększenie ilości fosforu w glebie, tym samym wpływając na szybsze przyrosty biomasy roślin i znaczące zwiększenie plonu (ok. 10% dla roślin zbożowych) [Sobiczewski 2009]. Rodriguez i in. [2004] przebadali w warunkach *in vitro* kilka szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* (*Azospirillum brasilense* oraz *Azospirillum lipoferum*) pod względem uwalniania fosforu z połączeń nieorganicznych. W badaniach jako źródła fosforu użyto fosforanu wapnia. Działanie mikroorganizmów polegało na wydzielaniu wielu kwasów organicznych oraz obniżaniu pH środowiska, przez co możliwe było oderwanie fosforu z połączenia nieorganicznego i przejście w formę biologicznie dostępną. Zaobserwowano duże przyrosty stężenia kwasów organicznych (m.in. kwas glukonowy – pochodna glukozy) oraz znaczące zwiększenie ilości łatwo przyswajalnych fosforanów. Autorzy stwierdzili, że przebadane szczepy mogłyby w przyszłości posłużyć jako potencjalny składnik bionawozu. Yazdani i in. [2009] przeprowadzili badania nad zwiększeniem biodostępności azotu i fosforu w uprawie kukurydzy, którą suplementowano nawozami organicznymi w postaci gnojowicy. Dodatkiem był bionawóz w postaci zawiesiny (inokulum) kilku szczepów bakterii z grupy PGPR (*A. chroococcum*, *A. brasilens*, *P. putida*, *B. lentus*). Stwierdzono, że dodatek bionawozu znacząco przyczynił się do zwiększenia ilości N i P w glebie. Jednocześnie wpływa on korzystnie na kondycję roślin, przyrosty biomasy, wielkość plonu oraz odporność na patogeny.

## 8. BIOREMEDIACJA W OCZYSZCZANIU GLEB ROLNYCH

Użytkowanie pól niejednokrotnie powoduje degradację środowiska glebowego ze względu na wysoki stopień chemizacji (nawozy sztuczne, środki ochrony roślin), zabiegi agrotechniczne (np. użytkowanie maszyn) oraz inne zanieczyszczenia pochodzenia antropogenicznego [Khan 2005, Grundmann i in. 2007]. Z tego powodu w ostatnich latach zwrócono uwagę na zjawisko bioremediacji w uprawach roślin, które w uproszczeniu polega na usuwaniu ze środowiska glebowego substancji pochodzenia antropogenicznego o działaniu szkodliwym lub toksycznym dla roślin (ropopochodnych, jonów metali ciężkich, WWA, DDT i innych) w miejscu ich występowania (*in situ*) [Khan 2005, Geetha 2008 i Fulekar, Sobiczewski 2009]. Mechanizm działania może przyjmować postać wewnątrzkomórkowej bioakumulacji, mineralizacji, biotrans-

formacji, utleniania i redukcji. Wiele mikroorganizmów zdolnych jest do wydzielania związków organicznych wspomagających biodegradację (kwasy organiczne, enzymy i inne białka). Niestety wiele mechanizmów bioremediacji mikrobiologicznej nadal pozostaje zagadką. Grundmann i in. [2007] wskazują na wiele gatunków mikroorganizmów zasiedlających glebę jako czynniki wspomagające biodegradację pestycydów. Zastosowali oni izolaty otrzymane z różnych rodzajów gleby. Punktowe inokulowanie zanieczyszczonej gleby znacząco wspomagało mineralizację pestycydów. Z kolei Geetha i Fulekar [2008] jako element wspomagający degradację pestycydów wskazują na użycie mikroorganizmów znajdujących się w nawozach organicznych. Kolejnym przykładem są bakterie z rodzaju *Azotobacter*, znane głównie ze zdolności do wiązania wolnego azotu. Mają one również zdolność do wykorzystywania szerokiej gamy substratów organicznych, w tym pochodzenia antropologicznego. Zdolne są do degradacji mannitolu, kwasu benzooesowego oraz związków fenolowych [Sobiczewski 2009].

Kolejnym problemem jest wysoka koncentracja jonów metali ciężkich w glebach. Jony ołowiu, kadmu, miedzi, cynku czy niklu mogą wykazywać działanie toksyczne zarówno dla środowiska przyrodniczego (mikroorganizmów, zwierząt, roślin), jak i dla człowieka. Jony te mogą kumulować się w tkankach roślin. Belimov i in. [2005] wyizolowali z zanieczyszczonej gleby kilkanaście mikroorganizmów odpornych na toksyczne działanie kadmu i innych metali ciężkich (w tym cynku i miedzi). Mikroorganizmy te wykazywały ponadto zdolność do stymulowania wzrostu elongacyjnego korzeni kapusty sitowatej (*Brassica juncea*). Do grupy tej należały bakterie z rodzajów *Variovorax*, *Rhodococcus* i *Flavobacterium*. Większość z wyizolowanych bakterii wydzielala związki z grupy indoli, sideroforów oraz enzym dezaminazę ACC. Mikroorganizmy pozytywnie wpływały na kondycje roślin, minimalizując toksyczne działanie kadmu i dodatkowo przyczyniały się do usuwania zanieczyszczenia jonami metali ciężkich. Uważa się, że mikroorganizmy usuwają jony metali ciężkich oraz inne zanieczyszczenia na w wyniku procesów enzymatycznych (biodegradacji), biotransformacji i bioakumulacji. Są to procesy bardzo złożone i nie do końca jeszcze poznane.

## 9. PODSUMOWANIE

Przy rosnącym zapotrzebowaniu na żywność i malejącym areale zdadnym do uprawy roli oraz wysokiej chemizacji rolnictwa biologiczne metody ochrony roślin zasługują na zainteresowanie jako alternatywa dla konwencjonalnych metod ochrony. Zachowania konkurencyjne, antybioza, pasożytnictwo, działanie lityczne względem komórek patogena czy indukcja procesów odpornościowych rośliny to tylko nieliczne przykłady mechanizmów, które cechują mikroorganizmy jako czynniki ograniczające liczebność patogenów roślinnych. Z biegiem lat wyizolowano i przebadano wiele szczepów bakterii o wysokim potencjale fungistatycznym. Oddziaływanie bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Azotobacter* stanowi główny kierunek badań. Część z nich wykorzystuje się we współczesnych preparatach. Stosowane mogą być w formie samodzielnego inokulantu lub bardziej złożonego koinokulantu wchodzącego w skład środka ochrony roślin. Zastosowanie najnowszych metod molekularnych i biotechnologii niewątpliwie wpłynie na zwiększenie skuteczności takich preparatów, między innymi poprzez umożliwienie lepszej identyfikacji mikroorganizmów oraz dokładniejsze zbadanie interakcji pomiędzy mikroorganizmami. Biologiczna ochrona jest właściwym kierunkiem we współczesnej ochronie roślin przed chorobami.



## LITERATURA

- Copping L.G., 2004. The Manual of Biocontrol Agents. British Crop Protection Council.
- Belimova A.A., Hontzeasb N., Safronovaa V.I., Demchinskayaa S.V., Piluzzac G., Bullittac S., Glick B.R., 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37, 241-250.
- Degtyareva E.A., Vinogradova K.A., Aleksandrova A.V., Filonenko V.A., Kozhevina P.A., 2009. Soli *Actinomycetes* as potential biofungicides. *Moscow University Soil Science Bulletin* 64, 73-77.
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52, 137-145.
- Geetha M., Fulekar M.H., 2008. Bioremediation of pesticides in surface soil treatment unit using microbial consortia. *African Journal of Environmental Science and Technology* 2(2), 036-045.
- Gołębiowska J., 1975. *Mikrobiologia rolnicza*. PWRiL Warszawa.
- Grundmann S., Fuß R., Schmid M., Laschinger M., Ruth B., Schulin R., Munch J.C., Schroll R., 2007. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere* 68, 511-517.
- Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X., Li Z., 2009. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Marine Biotechnology* 11, 132-140.
- Joo G-J., 2005. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal control agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters* 27, 1483-1486.
- Kardowska-Wiater M., 2011. Drożdże jako czynniki ochrony biologicznej roślin. *Postępy Mikrobiologii* 50, 107-119.
- Khan A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 355-364.
- Kim P.I., Chung K-Ch., 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters* 234, 177-183.
- Kinsella K., Schulthess C.P., Moriss T.F., Stuart J. D., 2008. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 374-379.
- Kryczyński S., 2005. *Podstawy fitopatologii*. Fundacja Rozwój SGGW Warszawa.
- Kryczyński S., Weber Z., 2010. *Fitopatologia*. Tom I. *Podstawy fitopatologii*. PWRiL Poznań.

- Lee Y-S., Park I-H., Yoo J-S., Chung S-Y., Lee Y-C., Cho Y-S. Ahn S-C., Kim C-M., Choi Y-L., 2007. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresource Technology* 98, 2734-2741.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2007. *Mikrobiologia techniczna. Tom I. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania.* Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
- Liu B., Huang L., Buchenauer H., Kang Z., 2010. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 305-311.
- Liu D., Cai J., Xie Ch-Ch., Liu Ch., Chen Y-h., 2010. Purification and partial characterization of a 36-Kda chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its bio-control potential. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 252-256.
- Lugtenberg B., Kamilova F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541-56.
- Malepszy S., 2009. *Biotechnologia roślin.* Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
- Marszewska-Zięmięcka J., 1974. *Mikrobiologia gleby i nawozów organicznych.* PWRiL Warszawa.
- Martyniuk S., 2011. Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. *Postępy Mikrobiologii* 50, 321-328.
- Mikani A., Etebarian H.R., Sholberg P.L., O’Gorman D.T., Stokes S., Alizadeh A., 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology* 48, 107-112.
- Patel V.J., Tendulkar S.R., Chattoo B.B., 2004. Bioprocess development of the production of an antifungal molecule by *Bacillus licheniformis* BC98. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 231-235.
- Perez-Garcia A., Romero D., de Vicente A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 187-193.
- Prapagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S., 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences* 4, 330-337.
- Richardson A.E., Barea J-M., McNeill A.M., Prigent-Combaret C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305-339.
- Rodriguez H., Gonzalez T., Goire I., Bashan Y., 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91, 552-555.
- Sobiczewski P., 2009. Bakterie wykorzystywane w produkcji roślinnej. [W:] S. Malepszy (red.), *Biotechnologia roślin*, Wyd. Nauk. PWN Warszawa, 172-213.

- Tomalak M., Sosnowska D., 2010. Tendencje rozwoju metod biologicznych w ochronie roślin. *Prog. Plant Prot. Post. Ochr. Roślin* 50, 1650-1660.
- Wan M., Li G., Zhang J., Jiang D., Huang H-C., 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control* 46, 552-559.
- Wang S-L., Yen Y-H., Tzeng G-C., Hsieh C., 2005. Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 49-56.
- Yazdani M., Bahmanyar M.A., Pirdashti H., Esmaili M.A., 2009. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea mays* L.). *World Academy of Science, Engineering and Technology* Vol. 3.
- Zhao Z., Wang Q., Wang K., Brian K., Liu C., Gu Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* 101, 292-297.



# BIOREGULATOR KELPAK – CHARAKTERYSTYKA ORAZ ZASTOSOWANIE

Katarzyna Mitura<sup>1</sup>, Karolina Joanna Lipińska,  
Mateusz Świtkowski, Ewa Spychaj-Fabisiak

## 1. WSTĘP

Coraz powszechniej w dzisiejszej agrotechnice stosowane są preparaty o działaniu biostymulującym, w tym szczególnie takie, które zawierają wyciągi z organizmów morskich [Zodape 2001, Matysiak i Kaczmarek 2008, Khan i in. 2009, Gajc-Wolska i in. 2012, Matysiak i in. 2012a, b, Matysiak i Kaczmarek 2012]. Jednym z takich preparatów jest KELPAK. Wytwarzany jest z wyciągu z brunatnic – *Eclonia Maxima*, pozyskiwanych u wybrzeży Afryki Południowej. W literaturze przedmiotu określony jest na ogół jego pozytywny wpływ na uprawę roślin uprawnych i ogrodniczych, szczególnie na plonowanie i jakość plonu, przy czym jego działanie uzależnione jest od gatunku rośliny, a nawet odmiany [Matysiak i Adamczewski 2006, Matysiak i Kaczmarek 2008, Kumar i Sahoo 2011, Aliaga i Pardo 2012, Kocira i in. 2013]. Udowodniono, że traktowanie roślin wyciągiem z *Eclonia maxima* zwiększa u roślin odporność na: suszę, brak składników odżywczych w glebie oraz zasolenie.

Celem pracy jest scharakteryzowanie roli, jaką spełnia KELPAK w dzisiejszym rolnictwie i ogrodnictwie, ze szczególnym uwzględnieniem roślin uprawnych. Wyjaśniono pojęcie bioregulator oraz omówiono zagadnienie stresu u roślin.

## 2. BIOREGULATOR – CO TO TAKIEGO?

Termin „bioregulator” nie jest do końca sprecyzowany. Niemniej jednak można go zdefiniować jako preparat pochodzenia naturalnego. Regulatory roślinne to najczęściej fitohormony, niestanowiące substancji pokarmowych, występujące w roślinach w ilościach śladowych. Wśród nich wymienić można: auksyny, gibereliny, cytokininy, kwas abscysynowy, kwas jasmonowy oraz etylen. Bioregulatory wpływają na wzrost i rozwój rośliny oraz biorą udział (bezpośrednio lub pośrednio) w procesach fotosyntezy oraz transportu wody i substancji pokarmowych [www.asahi.pl]. Problem dotyczący terminologii polega na tym, że w wielu publikacjach ten sam preparat identyfikowany jest jako: bioregulator, biostymulator czy też stymulator wzrostu [Matysiak i Adamczewski 2006, Ciepela 2014]. Dotyczy to również preparatu KELPAK. Niemniej jednak wszystkie trzy definicje łączy jeden fakt. Preparaty tego typu przeciwdziałają czynnikom stresogennym roślin, ułatwiają pobieranie mikro- i makroskładników z gleby, zwiększają odporność roślin na szkodniki i patogeny, co udowodniło w swoich badaniach wielu naukowców [Erlichowska i Pawińska 2003, Matysiak i in. 2012, Lamparski i Szczepanek 2013]. Ich efektywność zwiększa stosowanie wraz z adjuwantami, a dokładniej z surfaktantami – środkami powierzchniowo-czynnymi wykazującymi większe

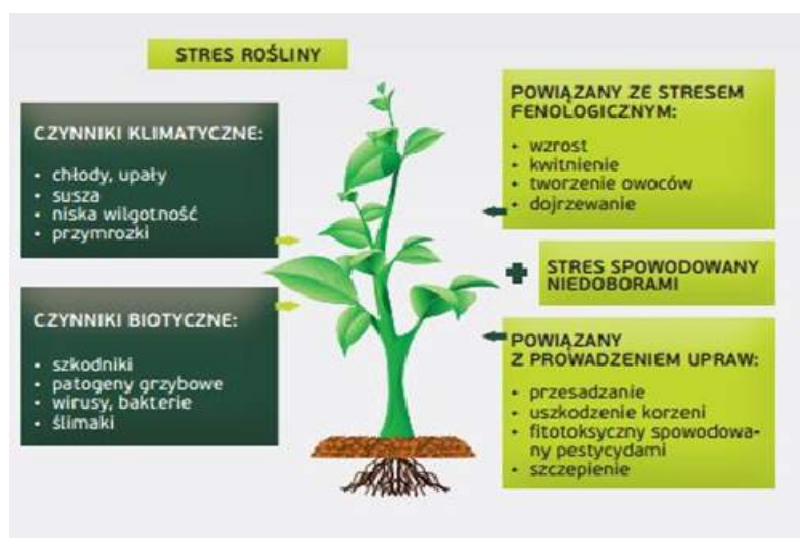
---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii,  
Katedra Chemii Środowiska – Zakład Chemii Rolnej, ul. Seminaryjna 5, 85-326 Bydgoszcz,  
e-mail: katarzyna.mitura@wp.pl

powinowactwo do wody i tłuszczów. Poprzez obniżenie napięcia powierzchniowego cieczy opryskowej powodują większą przyczepność kropeł, a tym samym wpływają na zwiększenie skuteczności stosowanego preparatu [www.wir.org.pl/raporty/adiuwanty/htm].

### 3. STRES U ROŚLIN

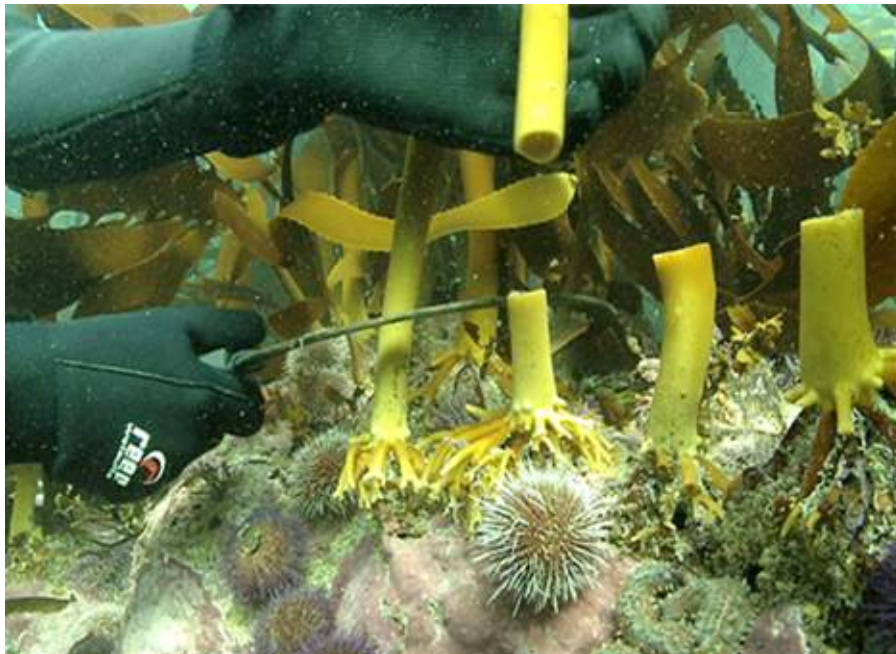
Wprawdzie dla niektórych osób jest to dziwne, ale rośliny również odczuwają stres. Czynniki stresogennymi u roślin może być susza, mróz czy też inwazja szkodników (rys. 1). Zagadnienie stresu i jego wpływ na kondycję roślin jest tematem wielu publikacji i doniesień naukowych [Kacperska 1998, Bai i in. 2006, Matysiak i Adamczewski 2006, Khan i Sarvajeet 2007, Grzyś 2012]. W ostatnich latach zarówno w Polsce, jak i na świecie coraz częściej występują anomalie pogodowe utrudniające naturalny wzrost roślin. Po to, aby zapobiec negatywnym skutkom czynników stresogennych, w rolnictwie i ogrodnictwie coraz chętniej stosowane są preparaty biostymulujące, w tym bioregulator KELPAK. Środki te zabezpieczają rośliny przed niesprzyjającymi warunkami pogodowymi oraz pobudzają do wzrostu po ich wystąpieniu [www.osadkowski.pl].



Rys. 1. Czynniki stresogenne u roślin [źródło: www.osadkowski.pl]

### 4. KELPAK – POCHODZENIE I CHARAKTERYSTYKA

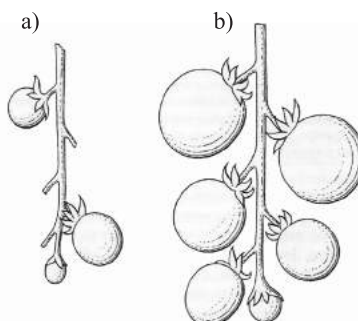
KELPAK to środek z grupy stymulatorów wzrostu w formie koncentratu rozpuszczonego w wodzie, przeznaczonego do oprysku roślin. Preparat ten znalazł zastosowanie zarówno w uprawie roślin polowych, jak i warzywnych, choć prowadzone są również badania nad wykorzystaniem go w sadownictwie [Aliaga i Pardo 2012]. Preparat produkowany jest na bazie wodorostów *Eclonia maxima* (Kelp), pozyskiwanych u wybrzeży Afryki Południowej (rys. 2). Jest to naturalny i unikalny surowiec do pozyskiwania auksyn i cytokinin, czyli grupy hormonów roślinnych pełniących w roślinie wiele istotnych funkcji (tab. 1, rys. 3).



Rys. 2. *Eclonia maxima* w warunkach naturalnych [źródło: www.kelpak.com]

Tabela 1. Funkcje fizjologiczne auksyn i cytokinin w roślinie [źródło: www.kelpak.pl]

Hormony roślinne	Pełnione funkcje
auksyny	<ul style="list-style-type: none"> <li>– odpowiadają za wzrost wzdłużny łodyg</li> <li>– pobudzają tworzenie korzeni bocznych i włośników korzeniowych</li> <li>– przeciwdziałają starzeniu się organów i zrzucaniu liści</li> </ul>
cytokiny	<ul style="list-style-type: none"> <li>– odpowiadają za podział komórek</li> <li>– pobudzają tkanki do wytwarzania organów</li> <li>– pobudzają powstawanie pędów bocznych</li> <li>– hamują procesy starzenia się roślin</li> </ul>



Rys. 3. Auksyny pobudzają partenokarpiczny rozwój owoców: a) kwiatostan pomidora szklarniowego niepotraktowany auksyną wytworzył tylko nieliczne, słabo rozwinięte owoce, b) kwiatostan potraktowany kwasem 2-naftoksoctowym ( $25-50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) wytworzył więcej owoców i rozwija się on szybciej [Jankiewicz 1997]

Stężenie auksyn i cytokinin w preparacie wynosi odpowiednio:  $11 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $0,031 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a ich wzajemny stosunek to 350:1 [www.kelpak.pl]. Prowadzone są również badania nad określeniem stężenia pozostałych hormonów roślinnych u *Eclonia maxima* [Stirk i in. 2014]. W tabeli 2 i 3 zamieszczono dawki i terminy aplikacji dla roślin polowych i warzywnych zalecane przez producenta.

Tabela 2. Termin aplikacji i dawki dla wybranych roślin uprawnych [źródło: <http://www.kelpak.pl/>]

Gatunek	Zalecana dawka	Termin aplikacji
Rzepak	$2 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	jesienią w fazie 3-5 liści, wiosną po ruszeniu wegetacji
Kukurydza	$2-3 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	faza 3-5 liści
Pszenica, pszenżyto, jęczmień	$2 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	od fazy 4 liści do fazy krzewienia
Burak cukrowy	$3-4 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	faza 3-4 par liści

Tabela 3. Termin aplikacji i dawki dla wybranych roślin warzywnych [źródło: <http://www.kelpak.pl/>]

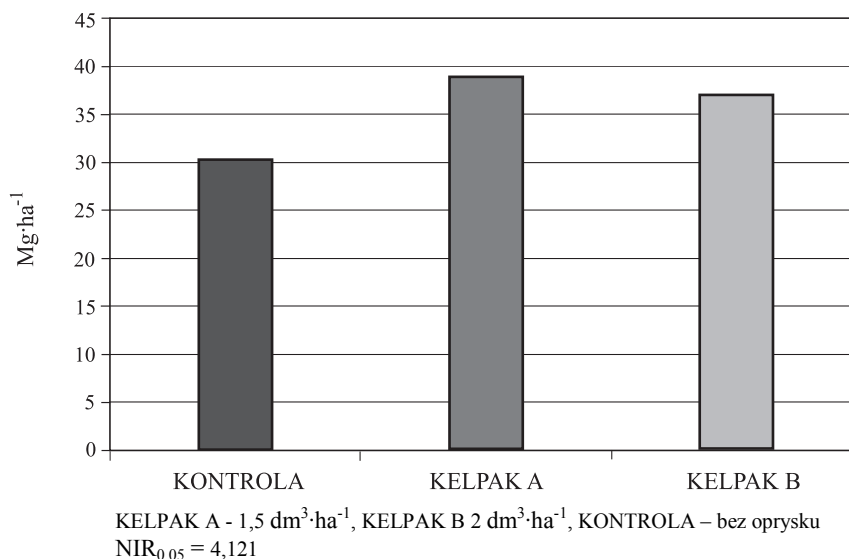
Gatunek	Zalecana dawka	Termin aplikacji
Cebula	$3 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	I oprysk wykonać w fazie 3-4 liści, następnie 2-krotnie co 14 dni
Marchew	$2 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	I oprysk wykonać w fazie 3-4 liści, następnie 2-krotnie co 14 dni
Kapusta biała	roztwór 1% $2-3 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	moczenie lub podlewanie rozsady, oprysk nalistny 14 dni po posadzeniu i 2-krotnie co 14-21 dni
Pomidor, papryka	roztwór 1%, $2-3 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ (0,5% uprawa pod osłonami)	moczenie lub podlewanie rozsady oprysk nalistny 14 dni po posadzeniu i 2-krotnie co 14 dni
Ogórek	$2-3 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	I oprysk wykonać w fazie 2-4 liści, następnie 2-krotnie co 14 dni

W przypadku ziemniaka rekomendowane jest moczenie sadzoniaków przez 5 minut przed sadzeniem w roztworze o stężeniu 0,2-0,4% lub opryskanie w trakcie sadzenia cieczą użytkową o stężeniu 0,5%. Po pełnych wschodach zalecany jest natomiast przez producenta oprysk w dawce  $2-4 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$  i powtórnie po 14-28 dniach dawką  $2 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ . Rekomendowana ilość wody w celu przygotowania cieczy roboczej do oprysku to 250-500  $\text{dm}^3$  na hektar. Niższą dawkę wody zaleca się stosować w przypadku opryskiwania roślin znajdujących się we wcześniejszych fazach rozwojowych. Zalecane jest stosowanie preparatu wraz z dodatkiem adiuwantu. Ponadto trzeba nadmienić, że KELPAK wykazuje synergizm w stosowaniu z nanotechnologicznym nawozem dolistnym Nano Active i Nano Active Forte, co oznacza, że łączny efekt środków jest większy niż suma ich działania oddzielnie [www.kelpak.pl]. Preparat ten stosowany jest obecnie w około 60 krajach. Jego skuteczność w uprawie roślin polowych i warzywnych omówiono w dalszej części pracy.

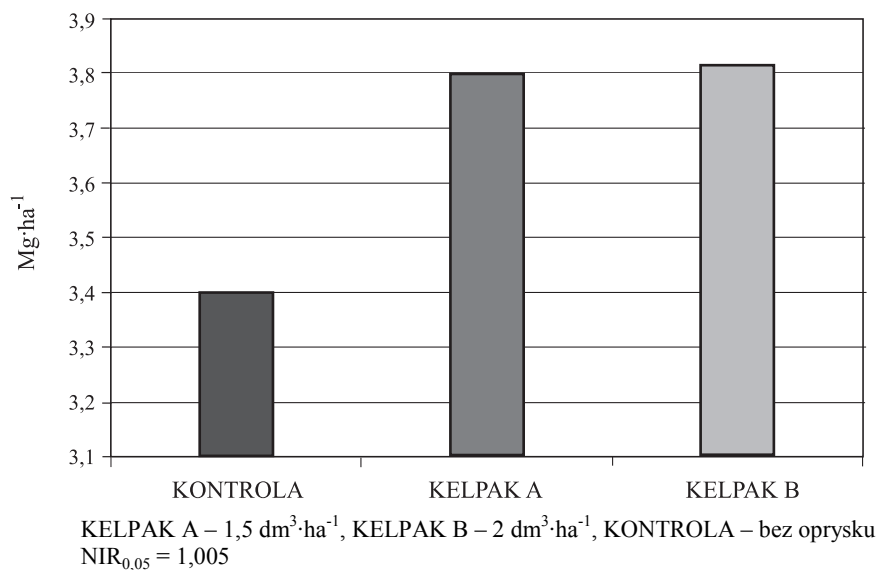


## 5. ZNACZENIE BIOREGULATORA KELPAK W ROLNICTWIE I OGRODNICTWIE

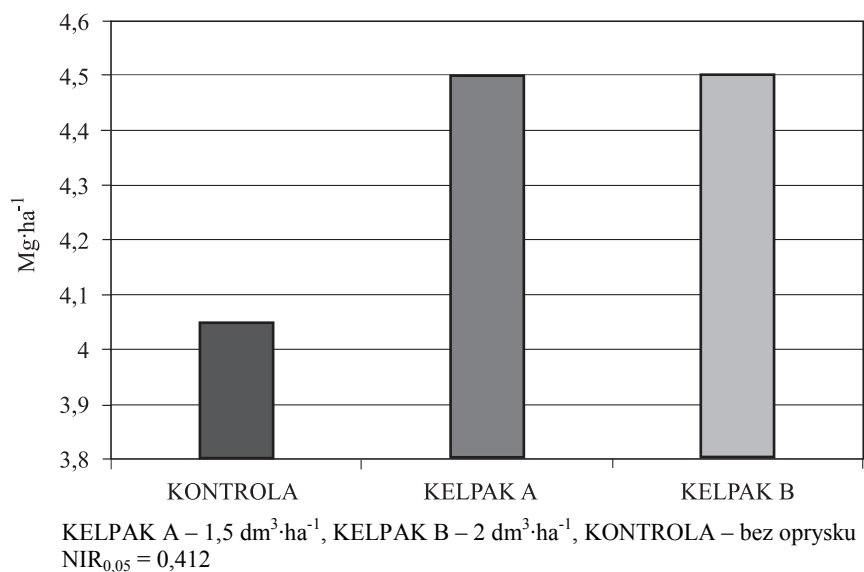
KELPAK, jak wcześniej wspomniano, to środek zaliczany do grupy bioregulatorów (stymulatorów wzrostu roślin), zalecany do stosowania w uprawie roślin uprawnych oraz warzywnych. Niemniej jednak prowadzone są również badania na roślinach sadowniczych oraz ozdobnych [Aliaga i Pardo 2012]. Preparat pobudza wzrost i rozwój roślin, wpływa korzystnie na przyrost korzeni, odporność roślin na szkodniki i choroby, podnosi plonowanie i jakość plonów [Erlichowski i Pawińska 2003, Matysiak i Adamczewski 2006, Matysiak i in. 2012, Lamparski i Szczepanek 2013]. Liczne publikacje i doniesienia podkreślają na ogół pozytywny wpływ *Eclonia maxima* na wzrost plonowania [Matysiak i Adamczewski 2006, Matysiak i Kaczmarek 2008, Kocira i in. 2013]. Matysiak i Adamczewski [2006] w swoich badaniach przeprowadzonych na różnych gatunkach uprawnych udowodnili korzystny wpływ preparatu na wyniki plonowania. Niemniej jednak nie wystąpiły istotne różnice w plonowaniu roślin po zastosowaniu różnych dawek bioregulatora, tj. 1,5 i 2 dm<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>. Najsilniej na działanie aplikowanego preparatu zareagowały: kukurydza, zboża jare i łubin wąskolistny (rys. 4-6), natomiast najslabiej – gorczyca biała i groch siewny (rys. 7, 8). W przypadku kukurydzy na zielonkę autorzy ci uzyskali plon wyższy o około 9 t·ha<sup>-1</sup> w stosunku do obiektu kontrolnego (bez oprysku) po zastosowaniu dawki niższej, tj. 1,5 dm<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup> (rys. 4). Wielkość plonu po zastosowaniu dawki wyższej (2 dm<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>) była o około 2 t·ha<sup>-1</sup> niższa w stosunku do obiektów, na których zastosowano dawkę niższą (rys. 5). Z kolei u pszenicy jarej ci sami autorzy uzyskali plon wyższy niż na obiekcie kontrolnym o około 0,4 t·ha<sup>-1</sup> niezależnie od zastosowanej dawki bioregulatora (rys. 5). W przypadku gorczycy białej rośliny potraktowane dawką niższą, tj. 1,5 dm<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>, wydały plon niższy niż na obiekcie kontrolnym (rys. 7). Niemniej jednak wyższa dawka preparatu wpłynęła na wzrost plonu gorczycy o około 0,45 t·ha<sup>-1</sup>.



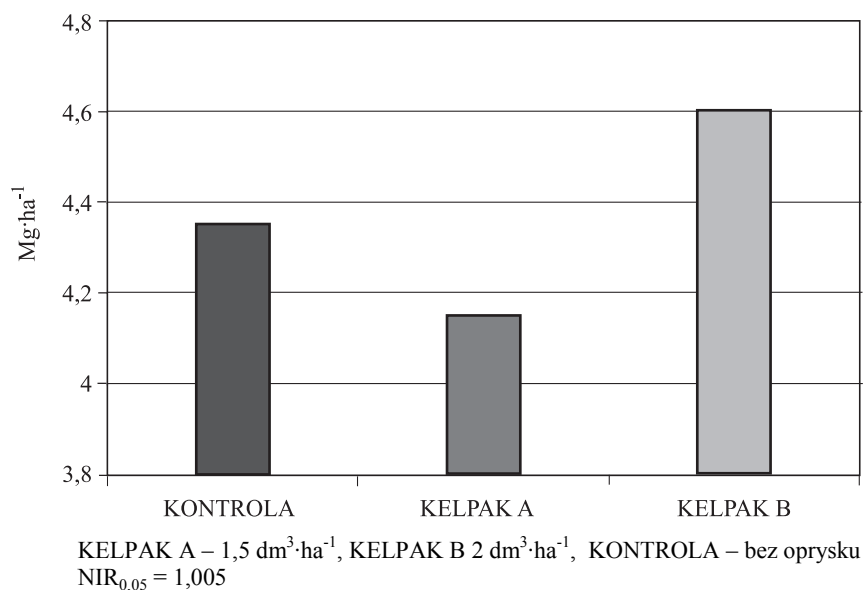
Rys. 4. Wpływ bioregulatora KELPAK na plonowanie kukurydzy z przeznaczeniem na zielonkę [Matysiak i Adamczewski 2006]



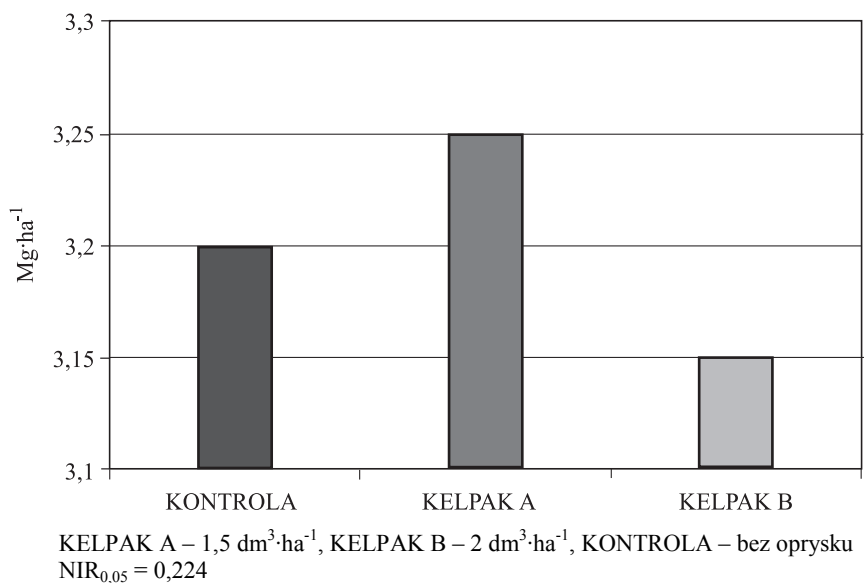
Rys. 5. Wpływ bioregulatora KELPAK na plonowanie pszenicy jarej  
[Matysiak i Adamczewski 2006]



Rys. 6. Wpływ bioregulatora KELPAK na plonowanie łubinu wąskolistnego  
[Matysiak i Adamczewski 2006]



Rys. 7. Wpływ bioregulatora KELPAK na plonowanie gorczycy białej  
[Matysiak i Adamczewski 2006]



Rys. 8. Wpływ bioregulatora KELPAK na plonowanie grochu siewnego  
[Matysiak i Adamczewski 2006]

Badania Kociry i in. [2013] potwierdzają, że ekstrakt z brunatnic *Ecklonia maxima* wpływa korzystnie również na plonowanie fasoli zwykłej. Największą liczbę i masę nasion oraz liczbę strąków autorzy stwierdzili w kombinacji z jednokrotnym opryskiem 0,2% roztworem KELPAK w 2010 roku oraz jednokrotnym 0,4% roztworem preparatu

w 2011 roku. Zastosowanie KELPAKU istotnie zwiększyło liczbę i masę nasion oraz liczbę strąków fasoli w porównaniu z kombinacją, w której nie zastosowano bioregulatora.

Wyniki badań Matysiak i in. [2012] wskazują na poprawę plonowania rzepaku ozimego po zastosowaniu bioregulatora KELPAK, jednakże wyniki istotne statystycznie autorzy uzyskali tylko w jednym roku badań (tab. 4).

Tabela 4. Wpływ biostymulatora KELPAK na plon nasion rzepaku ozimego [opracowanie własne na podstawie Matysiak i in. 2012]

Objekt i termin wykonania zabiegu BBCH		Plon nasion, t·ha <sup>-1</sup>		
		2008/2009	2009/2010	średnio
Kontrola (bez stosowania preparatu)		2,31	3,8	3,06
KELPAK	13-14	2,48	4,07	3,28
KELPAK	28-30	2,90*	4,24	3,43
KELPAK	13-14 28-30	2,99*	4,25	3,62*
NIR <sub>0,05</sub>		0,570	ns	0,554

\* zmiany istotne

ns – zmiany nieistotne

Z kolei Pałczyński i Dobrzański [2004] donoszą, że KELPAK nie wpływa na wielkość całkowitego plonu handlowego pomidorów. Niemniej jednak w każdym roku badań autorzy ci stwierdzili zwiększenie plonu wczesnego pomidorów (w I roku od 17 do 51%, w II od 12 do 22%), podczas gdy drugi i trzeci plon tylko nieznacznie różnił się od kontroli (bez traktowania bioregulatorem).

Z badań Lamparskiego i Szczepanek [2013] przeprowadzonych na pszenicy jarej wynika, że KELPAK aplikowany w dawce 1,5 lub 2 dm<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup> ogranicza całkowitą liczebność fitofagów zaliczanych do rzędów: *Thysanoptera*, *Hemiptera* i *Coleoptera*, w porównaniu z obiektem kontrolnym (bez stosowania preparatu).

Badania Matysiak i in. [2012] wskazują również na poprawę niektórych parametrów jakościowych ziarna, przy czym efekt działania preparatu uzależniony był od warunków meteorologicznych. W niekorzystnych warunkach pogodowych po zastosowaniu preparatu KELPAK uzyskano lepsze parametry technologiczne ziarna pszenicy ozimej w stosunku do obiektu kontrolnego (bez stosowania oprysku).

## 6. PODSUMOWANIE

KELPAK to jeden z powszechniejszych bioregulatorów dostępnych na rynku światowym. Liczne publikacje i doniesienia potwierdzają na ogół jego pozytywny wpływ na plon i jego jakość, zdrowotność roślin czy też rozwój masy korzeniowej. Warto pokreślić, że zainteresowanie preparatami typu KELPAK stale wzrasta i należy liczyć się z tym, że będą to w niedalekiej przyszłości jedne z istotnych elementów agrotechniki.

W związku z powyższym poszerzenie wiedzy na temat bioregulatorów, w tym preparatu KELPAK, może wpłynąć na wzrost efektywności produkcji rolniczej i ogrodniczej. Co więcej, KELPAK może być alternatywą dla środków ochrony roślin, a przy tym ograniczać chemizację rolnictwa. Konieczne są zatem dalsze badania nad wykorzy-

staniem bioregulatorów zarówno w uprawie roślin polowych, jak i ogrodniczych oraz poszerzanie wiedzy na temat zjawiska stresu u roślin.

## LITERATURA

Aliaga O., Pardo C., 2012. Kelpak effect on yield and fruit, on a Cherry orchard cv. Bing over Gisela 6 rootstock, located in Los Lirios, Requinoa, VI Region, Chile. Season 2010. Book of abstracts: The 1<sup>st</sup> World Congress on the use of Biostimulants in Agriculture, Strasbourg, 92.

Bai L., Sui F., Ge T., Sun Y., Lu Z., Yhou G., 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere* 16(3), 326-332.

Ciepiela A., 2014. Zawartość węglowodanów strukturalnych i niestrukturalnych oraz ligniny w *Dactylis glomerata* L. i *Festulolium braunii* (K. Richt.) A. Camus zasilanych biostymulatorem Kelpak SL i azotem. *Nauka Przyroda Technologie* 8(1), #2.

Erlichowski T., Pawinska M., 2003. Biologiczna ocena preparatu Kelpak w ziemniaku. *Postępy w Ochronie Roślin* 43(2), 606-609.

Gajc-Wolska J., Spizewski T., Grabowska A., 2012. The effect of seaweed extracts on the yield and quality parameters of some vegetables in open field production. Book of abstracts: The 1<sup>st</sup> World Congress on the use of Biostimulants in Agriculture, Strasbourg, 54.

Grzyś E., 2012. Wpływ wybranych substancji biologicznie czynnych na kukurydzę uprawianą w warunkach stresu. Monografie CXLV, Wyd. UP Wrocław.

Jankiewicz L.S., 1997. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.

Kacperska A., 1998. Reakcja roślin na czynniki stresowe. [W:] J. Kopcewicz, S. Lewak (red), *Podstawy fizjologii roślin*, PWN Warszawa, 154-170.

Khan W., Rayirath U.P., Subramanian S., Jithesh M.N., Rayorath P., Hodges D.M., Critchley A.T., Craige J.S., 2009. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Plant Growth Regulators* 28, 386-399.

Khan N.A., Sarvajeet S. 2007. *Abiotic Stress and Plant Responses*. New Delhi India: Narosa Publishing House.

Kocira A., Kornas R., Kocira S., 2013. Effect assessment of Kelpak SL on the bean yield (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Central European Agriculture* 14(2), 545-554.

Kumar G., Sahoo D., 2011. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. *Journal of Applied Phycology* 23(2), 251-255.

Lamparski R., Szczepanek M., 2013. Wpływ stosowania bioregulatora Kelpak na występowanie fitofagów w pszenicy jarej. *Postępy Ochrony Roślin* 53(1), 47-51.

Matysiak K., Adamczewski K., 2006. Wpływ bioregulatora Kelpak na plonowanie roślin uprawnych. *Postępy w Ochronie Roślin* 46(2), 102-108.

Matysiak K., Kaczmarek S., 2008. Potential advantages of Kelpak bioregulator applied to some field crops. Book of abstracts: Biostimulators in modern agriculture – Field Crops, 99-106.

Matysiak K., Kaczmarek S., 2012. Effect of seaweed extracts and humic and fulvic acids on germination and early growth of *Zea mays* (L.) and *Brassia napus* var. oleifera, Book of abstracts: The 1<sup>st</sup> World Congress on the use of Biostimulants in Agriculture, Strasbourg, 94.

Matysiak K, Kaczmarek S., Kierzek R. 2012a. Wpływ wyciągu z alg morskich *Ecklonia maxima* (Kelpak SL) na rośliny rzepaku ozimego. Rośliny oleiste 1(XXXIII), 81-88.

Matysiak K., Kaczmarek S., Leszczyńska D., 2012b. Influence of liquid seaweed extract of *Ecklonia Maxima* on winter wheat cv Tonacja. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 57(4), 44-47.

Pałczyński J., Dobrzański A., 2004. Wpływ biostymulatora Kelpak na niektóre cechy morfologiczne pomidora. Postępy w Ochronie Roślin 44(2), 998-1000.

Stirk W.A., Tarkowská D, Turečová V, Strnad M., Staden J., 2014. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. J. Appl. Phycol. 26(1), 561-567.

[www.asahi.pl](http://www.asahi.pl) (data dostępu: 21 sierpień 2014).

[www.kelpak.pl](http://www.kelpak.pl) (data dostępu: 20 sierpień 2014).

[www.osadkowski.pl](http://www.osadkowski.pl) (data dostępu: 20 sierpień 2014).

[www.wir.org.pl/raporty/adiuwanty/htm](http://www.wir.org.pl/raporty/adiuwanty/htm) (data dostępu: 15 wrzesień 2014).

Zodape S., 2001. Seaweeds as a biofertilizer. Journal of Scientific and Industrial Resources 60(537), 8-82.

# PROCESY PRZEKSZTAŁCENŃ ROŚLINNOŚCI RUNI ŁĄKOWEJ

Anna Ziółkowska<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Ochrona gleb, a dokładnie glebowej materii organicznej jest istotnym zagadnieniem w skali globalnej, regionalnej i lokalnej, co zarazem stanowi jeden z ważniejszych celów polityki Wspólnoty Europejskiej. W protokole z Kioto podano, że gleba dzięki zachodzącemu w niej procesowi sekwestracji stanowi największy magazyn zasobów węgla, który należy chronić i w miarę możliwości powiększać [COM 2002, Gonet 2007, Pastuszko 2007, Sapek 2009].

Na obserwowane zachodzących w glebie procesów humifikacji, a jednocześnie oszacowanie zawartości materii organicznej pozwalają badania składu chemicznego gleb i roślinności.

Materiał roślinny stanowi główne źródło materii organicznej gleb łąkowych. W jego skład wchodzi: celuloza, hemiceluloza, ligniny, lipidy, białka, żywice, woski i inne związki powstałe w wyniku degradacji materiału roślinnego w glebie.

Gleby łąkowe są bardzo zróżnicowane pod względem zawartości i jakości materii organicznej. Ich znaczenie i istota przejawiają się w wyższej zawartości substancji organicznej w porównaniu z glebami leśnymi i uprawnymi. W glebach łąkowych istnieją lepsze warunki do akumulacji i immobilizacji substancji organicznej. Tym samym użytki zielone są postrzegane jako sposób wykorzystania gruntów sprzyjający sekwestracji węgla organicznego w glebie oraz odgrywają ważną rolę w zrównoważonym gospodarowaniu tym pierwiastkiem [Czaplak i Dembek 2000, Sapek 2000, Prior i in. 2005, Pastuszko 2007, Burzyńska 2012].

Gleby łąkowe w porównaniu z glebami leśnymi i uprawnymi wykazują większe uwilgotnienie, większą ilość próchnicy i rozkładającej się substancji organicznej [Gonet 2007]. Najważniejszą strefę akumulacji materii organicznej w glebach stanowią poziomy organiczny i próchniczny. Poziomy powierzchniowe gleb łąkowych są zasobne w próchnicę wskutek intensywnej produkcji biomasy, a ograniczony dostęp tlenu przyczynia się do spowolnienia procesów rozkładu podziemnych części roślin [Tomaszewski 1969, Jankowski 2007].

Celem pracy jest przedstawienie na podstawie doniesień literaturowych procesów przekształceń (transformacji) roślinności runi łąkowej i ich znaczenia w procesach sekwestracji węgla.

## 2. ŹRÓDŁA MATERII ORGANICZNEJ W GLEBACH ŁĄKOWYCH

Źródłami materii organicznej w glebach są:

- obumarłe części nadziemne roślin, opadłe w czasie wegetacji (na łąkach i pastwiskach stanowi je ściółka trawiasta i zielna),
- resztki po zbiorze i korzenie roślin wyższych,

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Katedra Chemii Środowiska, ul. Bernardyńska 6/8, 85-029 Bydgoszcz, e-mail: anna.ziolkowska@onet.eu

- nawozy naturalne i organiczne (obornik, gnojowica, nawozy zielone),
- obumarłe w glebie mikroorganizmy, odchody zwierząt [Kögel-Knaber 2002, Meier i Bowman 2010].

Ekosystemy łąkowe i pastwiskowe odznaczają się różnorodnością flory i fauny. Wśród roślin próchnicotwórczych (wzbogacających glebę w materię organiczną) wymienić należy trawy, strączkowe, bobowate, zioła i chwasty, a ich udział zależy od stopnia pielęgnacji [Rogalski 2004, Karczmarczyk 2005, Gonet 2007]. Na obszarze Polski na użytkach zielonych występuje ponad 350 gatunków roślin, z czego 19% stanowią trawy, 5% rośliny bobowate, zaś pozostała część to gatunki zielne: zioła, chwasty oraz rośliny mało przydatne tj. turzyce, sity, sitowia, wełniaki [Reigosa i in. 1999, Rogalski 2004, Rahmanov 2007].

Wśród trawiastej roślinności łąkowej wymienić można m.in.: życię trwałą (*Lolium perenne* L.), życię wielokwiatową (*Lolium multiflorum*), kupkówkę pospolitą (*Dactylis glomerata*), tymotkę łąkową (*Phleum pratense*), kostrzewę łąkową (*Festuca pratensis*), kostrzewę czerwoną (*Festuca rubra* L.), stokłosę (*Bromus*) czy chwastnicę jednostronną (*Echinochloa crus-galli*), wiechlinę łąkową (*Poa pratensis* L.), wyczyńca łąkowego (*Alopecurus pratensis* L.), rajgras wyniosły (*Arrhenatherum elatius*).

Z roślin bobowatych na uwagę zasługują: koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense* L.) i szwedzka (*Trifolium hybridum*), mniszek lekarski (*Taraxacum officinale*), babka lancetowata (*Plantago lanceolata* L.), krwawnik pospolity (*Achillea millefolium* L.), szalwia łąkowa (*Salvia pratensis* L.) i inne [Khalid i in. 2007, Parveen i in. 2008, Machinet i in. 2011].

### 3. SKŁAD CHEMICZNY ROŚLINNOŚCI ŁĄKOWEJ

Skład chemiczny roślinności runi łąkowej odzwierciedla właściwości roślin łąkowych i zależy od ich stadium rozwojowego [Reigosa i in. 1999]. Podstawowymi związkami wchodzącymi w skład ścian komórek roślin są: celuloza, hemiceluloza oraz ligniny.

Celuloza to polisacharyd zbudowany z jednostek 1-4(β)glukozowych o masie cząsteczkowej 300 000-500 000 Daltonów. Celuloza występuje w trawach pastewnych w ilości 13-40% w s.m., zaś w gatunkach traw dziko rosnących jej zawartość wynosi 60% w s.m. [Jaroszyńska 2003, Cao i in. 2011].

Hemiceluloza jest polimerem pentozowym, stanowiącym około 10-20% suchej masy roślin. Hemicelulozy występują w ścianach komórek roślinnych. W ich skład wchodzi związki zbudowane z ksylanów, arabanów, galaktanów, mannanów, które są połączone wspólnymi łańcuchami. Hemicelulozy pełnią funkcje szkieletowe, a ulegając hydrolizie, uczestniczą w metabolizmie komórki. Ich zawartość w trawach wynosi od 13 do 35% w s.m. [Cao i in. 2011, Bi i in. 2012].

Ligniny są biopolimerem o masie cząsteczkowej powyżej 100 000 Daltonów, o nieregularnej trójpodstawionej strukturze. Jej monomerami są związki organiczne będące pochodnymi alkoholi fenolowych: koniferylowego, synapinowego i kumarylowego [Kovalev i Kovaleva 2008].

Zawartość lignin w roślinności trawiastej jest zróżnicowana i wzrasta w miarę rozwoju rośliny. W trawach uprawnych ich zawartość wynosi 1,6-7,0% w s.m., zaś w trawach dziko rosnących nawet powyżej 15% w s.m. Dużą zawartością lignin charakteryzują się: kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea*), kostrzewa czerwona (*Festuca ru-*



*bra* L.), kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.) i wyczyniec łąkowy (*Alopecurus pratensis* L.).

Wśród fenolowych pochodnych ligniny obecnych w komórkach roślinnych można wymienić kwasy:

- hydroksybenzoesowy i jego pochodne – kwasy: dihydroksybenzoesowy, galusowy, protokatechowy, salicylowy, syryngowy, wanilinowy;
- hydroksycynamonowy i jego pochodne – kwasy: cynamonowy, ferulowy, p-kumarynowy, kawowy, synapowy (tab. 1).

Kwasy fenolowe występują w roślinach głównie w formie związanej, jako jednostki strukturalne lignin i tanin hydrolizujących, np. kwas ferulowy tworzy wiązania estrowe i glikozydowe w ścianach komórkowych traw [Parveen i in. 2008, Ralph 2010].

Tabela 1. Zawartość wybranych kwasów fenolowych ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  s.m.) [Mika i in. 2005]

Kwas	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Festuca rubra</i>	<i>Bromus</i>
protokatechowy	12,4	15,4	7,1
p-hydroksybenzoesowy	10,3	10,7	4,8
wanilinowy	9,2	27,0	6,4
chlorogenowy	11,5	172,2	96,2
kawowy	203,4	303,2	74,5
p-kumarynowy	37,8	193,1	32,4
ferulowy	110,2	273,3	94,2

Ligniny roślin zielnych zawierają największe ilości kwasu cynamonowego, a jego zawartość w trawach i roślinach zielnych rosnących na stepach i łąkach wynosi do 20-30  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  C org i jest od 4 do 6 razy wyższa niż u roślin drzewiastych. Zawartość kwasu i aldehydu syryngowego jest wyższa w podziemnych częściach roślin niż nadziemnych [Mika i in. 2005].

#### 4. PROCESY ROZKŁADU MATERII ORGANICZNEJ GLEB

Materia organiczna w glebach ulega ciągłym przemianom biochemicznym, a ich charakter i intensywność są uzależnione od składu chemicznego biomasy, obecności i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów, warunków hydrotermicznych oraz chemicznych i fizycznych właściwości gleb [Bednarek i in. 2004].

Wśród procesów rozkładu materii organicznej gleb wymienić należy:

- mineralizację – związaną z tworzeniem prostych związków nieorganicznych takich jak  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$  oraz jonów np.  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ;
- humifikację – prowadzącą do powstania substancji próchnicznych.

Zakłada się, iż resztki roślinne znajdujące się w glebie ulegają w 75-80% procesom mineralizacji, zaś pozostała ich część przekształca się w związki próchniczne [Zawadzki 1999, Dębska 2003].

##### 4.1. Mineralizacja związków organicznych

Podczas mineralizacji materiału organicznego można wyróżnić trzy zasadnicze etapy:

- ✓ fazę inicjalną, w której dominują procesy hydrolizy i utleniania;
- ✓ fazę mechanicznego rozkładu – rozdrabnianie i mieszanie materiału organicznego z glebą;
- ✓ fazę mikrobiologicznego rozkładu – na skutek zwiększonej ilości bakterii – głównie promieniowców i grzybów – rozkładających celulozę – następuje zanik struktur komórkowych, a tym samym uwolnione zostają ligniny. Pod wpływem mikrobiologicznego rozkładu składniki organiczne są przekształcane do nieorganicznych i wydzielone zostają CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, fosforany, siarczany, K, Ca, Mg, mikroelementy [Zawadzki 1999].

Zdaniem badaczy podczas bilansowania materii organicznej gleb i ocenie jakości materiału roślinnego duże znaczenie ma wartość stosunku C:N, od którego zależą: dostępność dla roślin azotu uwalnianego podczas rozkładu szczątków roślinnych jak i szybkość procesów transformacji [Zaujec 2007].

Naukowcy podają zróżnicowane przedziały wartości krytycznych C:N dla punktu równowagi procesów mineralizacji i immobilizacji azotu, np. Jurcova [1990] wartość C:N szacuje na 20-35:1, zdaniem Blocka (cyt. za Prusinkiewicz i in. [1990]) wynosi ona 15-33:1, zaś López i in. [2006] podają wartość 21-35:1.

W przypadku gdy stosunek wartości C:N jest zbyt szeroki, następuje spowolnienie mineralizacji substancji organicznej oraz pobieranie azotu przyswajalnego dla roślin przez mikroorganizmy (uwstecznianie, zbiałczanie). Gdy jest on zbyt wąski, następuje intensyfikacja mineralizacji azotu, który nie jest wykorzystywany przez rośliny.

Kovalev i Kovaleva [2008] wskazują na różnice w zawartościach węgla i azotu zarówno między gatunkami roślin, jak i w obrębie tej samej rośliny z uwzględnieniem części nadziemnej i korzeni, co jest prawdopodobną przyczyną różnic w szybkościach rozkładu poszczególnych organów rośliny. Gatunek trawy *Lolium perenne* L. charakteryzował się wartością stosunku C:N w pędzie 11,0, zaś w korzeniach 20,1. De la Rosa i in. [2013] podają, iż trawa ta uprawiana w warunkach bez nawożenia azotem miała wartość stosunku C:N dla korzeni mieszczącą się w przedziale 17,3-21,7. Drozd i in. [2007] wskazują, iż masa zielona roślin bobowatych odznacza się wartością stosunku C:N wynoszącą 10-20, zaś masa zielona traw około 20.

Według Kononowej (cyt. za Zawadzki [1999]), początek widocznych zmian w rozkładzie korzeni traw wieloletnich pojawił się po 20-30 dniach, zaś w tkankach swoistych substancji próchnicznych nawet po około 200 dniach.

O szybkości przebiegu procesu mineralizacji, a szczególnie fazy inicjalnej, decyduje również zawartość fosforu. Wraz ze wzrostem jego udziału w materiale roślinnym procesy transformacji materii organicznej przebiegają szybciej [Norton i in. 2011]. Kolbe i Stumpe (cyt. za Dębska [2003]) za optymalne warunki mineralizacji podają wartość stosunku C:P 200-300:1.

Oprócz wartości stosunków C:N i C:P na szybkość mineralizacji ma wpływ ilość łatwo dostępnych połączeń węgla, o czym decydują różnice w składzie ilościowym związków organicznych roślin, występujące nawet w obrębie tego samego gatunku [Lopez i in. 2002, 2006].

Ze względu na wzrost szybkości rozkładu związki organiczne można uporządkować następująco:

- ✓ ligniny, woski, żywice, garbniki,
- ✓ celuloza,

- ✓ hemiceluloza,
- ✓ cukry, skrobia, proteiny.

Z powyższego uszeregowania wynika, iż duża zawartość lignin, wosków, garbników hamuje procesy rozkładu, zaś duża zawartość cukrów i protein przyspiesza procesy transformacji [Scheirs i in. 2003].

Zdaniem Schulze i Freibauer [2005] o szybkości i kierunku procesu mineralizacji decydują również napowietrzenie, temperatura i wilgotność gleby.

Wiosną i w końcu lata ma miejsce maksymalna mineralizacja substancji organicznych, co jest związane ze sprzyjającymi warunkami meteorologicznymi dla aktywności mikroorganizmów glebowych [Gonet 2003b]. Jankowski [2007] podaje, iż stosowanie melioracji odwodnieniowych w przypadku gleb organicznych skutkuje przyspieszeniem procesu mineralizacji i zmniejszeniem zawartości materii organicznej.

## 4.2. Humifikacja materii organicznej

Humifikacja jest procesem biochemicznych przemian szczątków roślinnych i zwierzęcych, prowadzącym do powstania substancji humusowych, wśród których wymienić należy: kwasy huminowe, kwasy fulwowe i huminy [Kögel 1986, Gonet 2003a].

Wśród licznych teorii opisujących tworzenie substancji humusowych do najistotniejszych należą:

- ✓ teoria Stevensona (cyt. za Zawadzki [1999]), według której prekursorami substancji humusowych są węglowodany;
- ✓ teoria Walksmana (cyt. za Pastuszko [2007]), zgodnie z którą substancje humusowe powstają z fragmentów lignin na skutek ubytku grup metoksylowych (OCH<sub>3</sub>) i powstawania grup fenolowych (OH). Utlenianie łańcuchów alifatycznych powoduje powstanie grup karboksylowych (COOH). Mechanizm ten jest szczególnie obecny w słabo napowietrzonych glebach i osadach jeziornych;
- ✓ teoria Kononowej [1973] – według której polifenole pochodzą z nieligninowych źródeł węgla, np. z węglowodanów (celuloz), które są utleniane przez enzymy do chinonów, a te w wyniku procesów polimeryzacji i polikondensacji do substancji humusowych;
- ✓ teoria Flaiga (1984) – koncepcja polifenolowa zakładająca, że enzymatyczne działanie mikroorganizmów na ligniny powoduje uwalnianie kwasów i aldehydów fenolowych. W pierwszym etapie następuje rozpad lignin do kwasów: ferulowego, synapowego oraz p-hydroksycynamonowego. W wyniku reakcji skracania łańcuchów bocznych i ich utleniania powstają kwasy wanilinowy, syryngowy oraz benzoesowy.

Flaig [1984] podkreśla znaczenie reakcji dimetylacji i hydroksylacji w powstawaniu kwasu protokatechowego i galusowego. Kwas protokatechowy ma duży wpływ na procesy humifikacji, gdyż ulega przekształceniom do związków alifatycznych, a tym samym staje się źródłem węgla dla mikroorganizmów.

Ważnym etapem przemian lignin, następującym po reakcjach dimetylacji i hydroksylacji, jest dekarboksylacja oksydacyjna kwasów protokatechowego i galusowego przebiegająca przy udziale fenylooksydaz, w wyniku której powstają pochodne chinonowe. Przyłączenie azotu do chinonów oraz reakcje kondensacji prowadzą do powstania związków próchnicznych. Tlen, amoniak i oksydazy mikroorganizmów pełnią funkcje katalizujące proces humifikacji.

Prekursorami substancji humusowych są nie tylko ligniny i węglowodany, mogą one również powstawać z garbników, terpenów, metabolitów mikroorganizmów i produktów autolizy ich komórek [Badura 2006].

Niezależnie od teorii powstawania związków humusowych w glebach przyjęto, iż główną rolę w ich powstawaniu odgrywają związki fenolowe, będące składnikiem lignin, związków flawonowych roślin oraz produktami mikrobiologicznej biosyntezy z alifatycznych substratów [Pastuszko 2007].

Zmiany zawartości lignin i ich stopień przemiany w rozkładającym się materiale mogą być oceniane poprzez utlenianie materiałów roślinnych i próbek gleb przy użyciu CuO oraz z wykorzystaniem metody kwaśnej hydrolizy [Chabbi i in. 2004, Sjöberg i in. 2004, Kovalev i Kovaleva 2008, Klimek-Turek i Dzido 2010]. Metody te pozwalają na uwolnienie aldehydów i kwasów fenolowych z lignin w postaci:

- jednostek wanilinowych (V), stanowiących sumę zawartości aldehydu wanilinowego i kwasu wanilinowego, które pochodzą z alkoholu koniferylowego,
- jednostek syringowych (S), będących sumą zawartości kwasu i aldehydu syringowego, pochodzącego z alkoholu synapinowego,
- jednostek cynamonowych (C), czyli sumy zawartości kwasu ferulowego oraz kawowego, które pochodzą z alkoholu kumarynowego [Banach-Szott i Dębska 2009, Thevenot i in. 2013].

W wyniku badań nad produktami rozkładu lignin uzyskuje się dane na temat stopnia rozkładu materiału roślinnego w glebie. Kögel [1986] podaje, iż wskaźnikiem stopnia rozkładu lignin mogą być m.in. jednostki wanilinowe, syringowe i cynamonowe powstające podczas utleniania lignin, a ich suma (V+S+C) jest stosowana jako miara nienaruszonych struktur lignin. Wzajemne proporcje poszczególnych jednostek V:S:C Kovaleva i Kovalev [2009] szacują w tkankach korzeni traw na 1:1:2, zaś w tkankach korzeni ziół na 1:2:4.

Kolejnym parametrem opisującym procesy transformacji lignin jest stosunek zawartości kwasu wanilinowego (KW) do aldehydu wanilinowego (AW), gdyż podczas rozkładu aldehyd wanilinowy utlenia się do kwasu wanilinowego. Dla substancji humusowych gleb łąk subalpejskich stosunek KW/AW w warstwie 5-35 cm wynosił 3,66, zaś w warstwie 35-57 cm 0,10. W przypadku substancji humusowych z łąk alpejskich w warstwie 3-20 cm stosunek KW/AW oszacowano na wartość 0,73 [Kovalev i Kovaleva 2008].

## 5. PODSUMOWANIE

O żyzności gleby stanowi w głównej mierze zawartość węgla organicznego. Ekosystemy łąkowe i trwałe użytki zielone ze względu na przebiegający w nich proces darniowy i całoroczną okrywą roślinną stwarzają najkorzystniejsze warunki obiegu i akumulacji węgla organicznego.

Na obserwację zachodzących w glebie procesów humifikacji, a jednocześnie oszacowanie zawartości materii organicznej pozwalają badania składu chemicznego gleb i roślinności.

Autorzy badający proces humifikacji przedstawili wiele hipotez wyjaśniających mechanizmy powstawania substancji humusowych, wskazując na ważną rolę lignin i związków fenolowych w tym procesie.

Identyfikacja związków fenolowych oraz oszacowanie ich zawartości w materiale roślinnym, glebach, frakcjach kwasów huminowych i fulwowych pozwala na określenie przemian, jakim ulega materiał roślinny gleb łąkowych. Tego typu badania mogą dostarczyć informacji o znaczeniu trwałych użytków zielonych w procesach sekwestracji węgla oraz pozwalają na określenie wpływu składu gatunkowego runi łąkowej na tworzenie się substancji humusowych, związków wpływających na właściwości chemiczne, biologiczne i fizyczne gleb.

## LITERATURA

- Badura L., 2006. Rozważania nad rolą mikroorganizmów w glebach. Zesz. Nauk. UP we Wrocławiu, Rolnictwo 89(546), 13-23.
- Banach-Szott M., Dębska B., 2009. Role of plant litter in developing the content of phenolic compounds in humic substances. Ecol. Chem. Eng. 16(3), 239-252.
- Becher M., 2011. Specjacja węgla organicznego i wybranych metali ciężkich w glebie torfowo-murszowej. Woda Środ. Obsz. Wiej. 11(4), 31-42.
- Bednarek R., Dziadowiec H., Pokojska U., Prusinkiewicz Z., 2004. Badania ekologiczno-gleboznawcze. WN PWN, Warszawa.
- Bi R., Spadiut O., Lawoko M., Brumer H., Henriksson G., 2012. Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as a carbon source and to produce enzymes which cleave the  $\beta$ -O-4 bound in a lignin model compound. Cell. Chem. Techn. 46, 227-242.
- Burzyńska I., 2012. Zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego w mineralnej glebie i w płytkich wodach gruntowych na tle użytkowania łąki. Pol. J. Agron. 8, 3-8.
- Cao X.-F., Yuan T., Sun S., Sun R.-C., 2011. Isolation and characterization of soluble polysaccharides from *Calamagrostis angustifolia* Kom. Polysaccharides from grass. BioRes. 6(3), 2895-2911.
- Chabbi A., Rumpel C., 2004. Decomposition of plant tissue submerged in a extremely acidic mining lake sediment: Phenolic CuO-oxidation products and soil state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Soil Biol. Biochem. 36: 1161-1169.
- COM (2002) 179, wersja końcowa, Bruksela, 16.04.2002. Komunikat Komisji Europejskiej do Rady Europejskiej Parlamentu Europejskiego, Komitetu Ekonomiczno-Społecznego oraz Komitetu Regionów – w Kierunku Strategii Ochrony Gleby.
- Czaplak I., Dembek W., 2000. Torfowiska Polski jako źródło emisji dwutlenku węgla. Zesz. Eduk. 6, 61-70.
- De la Rosa J.M., Lieber F., Pour G., Knicker H., 2013. Partitioning of N in growing plants, microbial biomass and soil organic matter after amendment of N-ammonoxidized lignins. Soil Biol. Biochem. 60, 125-133.
- Dębska B., 2003. Rola resztek roślinnych w kształtowaniu żyzności gleb. [W:] B. Dębska, S.S. Gonet (red.), Substancje humusowe w glebach i nawozach. Problemy badań. PTSH Wrocław, 21-29.

Drozd J., Licznar M., Jamroz E., Bekier J., 2003. Próchniczne indeksy dojrzałości kompostów. [W:] B. Dębska, S.S. Gonet (red.), *Substancje humusowe w glebach i nawozach. Problemy badań*. PTSH Wrocław, 75-94.

Dziamski A., 2003. Wpływ nawożenia organicznego na zawartość i jakość próchnicy gleb. [W:] B. Dębska, S.S. Gonet (red.), *Substancje humusowe w glebach i nawozach. Problemy badań*. PTSH Wrocław, 21-29.

Flaig W., 1984. Soil organic matter as a source of nutrients. *Organic matter and rice*. Int. Rice Res. Inst. 631, 73-92.

Gonet S.S., 2007. Ochrona zasobów materii organicznej gleb. [W:] S.S. Gonet, M. Markiewicz (red.), *Rola materii organicznej w środowisku*. PTSH Wrocław, 7-29.

Gonet S.S., 2003a. Próchnica, substancje humusowe, węgiel organiczny – definicje, komentarze, metody oznaczania. [W:] B. Dębska, S.S. Gonet (red.), *Substancje humusowe w glebach i nawozach. Problemy badań*. PTSH Wrocław, 21-29.

Gonet S.S., 2003b. Wpływ substancji humusowych na rośliny. [W:] B. Dębska, S.S. Gonet (red.), *Substancje humusowe w glebach i nawozach. Problemy badań*. PTSH Wrocław, 95-104.

Jankowski M., 2007. Rola materii organicznej w kształtowaniu morfologii gleb i jej znaczenie dla systematyki gleb. [W:] S.S. Gonet, M. Markiewicz (red.), *Rola materii organicznej w środowisku*. PTSH Wrocław, 135-149.

Jaroszyńska J., 2003. Isolation of free phenolic compounds from arboreal leaves by use of the florisol/C18 system. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 702-708.

Jurcova D., 1990. Korenove, a pozberove zvyšky rastlin ako sucast bilancie podnej organickej hmoty. *Humusove latky – aktivni slozka systemu puda – rostlina*. Praha.

Karczmarczyk S. (red.), 2005. *Agrotechnika roślin uprawnych*. Wyd. AR Szczecin.

Khalid M., Soleman N., Jones D.L., 2007. Grassland plants affect dissolved organic carbon and nitrogen dynamics in soil. *Soil Biol. Biochem.* 39, 378-381.

Klimek-Turek A., Dzido T.H., 2010. Separation selectivity of some phenolic acids in PR HPLC system with binary mobile phase comprised various modifiers. *Adsorption* 26, 287-294.

Kögel I., 1986. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers, *Soil Biol. Biochem.* 18, 589-594.

Kononowa M.M., Aleksandrowa I.W., 1973. Formation of humic acids during plant residue humification their nature. *Geoderma* 9, 157-167.

Kovalev I.V., Kovaleva N.O., 2008. Biochemistry of lignin in Soils of Periodic Excessive Moistening (from the Example of Agrogray Soils in Opolie Landscapes on the Russian Plain). *Eurasian Soil Sci.* 41(10), 1066-1076.

Kovaleva N.O., Kovalev I.V., 2009. Transformation of lignin in surface and buried soils of mountainous landscapes, *Eurasian Soil Sci.* 42(11), 1270-1281.

- Lopez M.J., Elorrieta M.A., Vargas-García M.C., Suárez-Estrella F., Moreno J., 2002. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Biores. Technol.* 81, 123-129.
- Lopez M.J., Elorrieta M.A., Vargas-García M.C., Suárez-Estrella F., Moreno J., 2006. Biodelignification and humification of horticultural plant residues by fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57, 24-30.
- Machinet G.E., Bertrand I., Barrière Y., Chabbert B., Recous S., 2011. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1544-1552.
- Míka V., Kubáň V., Klejdus B., Odstrčilová V., Nerušil P., 2005. Phenolic compounds as chemical markers of low taxonomic levels in the family Placaeae. *Plant Soil Environ.* 51(11), 506-512.
- Norton J.B., Jungst L.J., Norton U., Olsen H.R., Tate K.H., Horwath W.R., 2011. Soil Carbon and Nitrogen Storage in Upper Montane Riparian Meadows. *Ecosystems* 14, 1217-1231.
- Pałosz T., 2009. Rolnicze i środowiskowe znaczenie próchnicy glebowej i metodyka jej bilansu. *Roczn. Ochr. Środ.* 11(1), 329-338.
- Parveen I., Winters A., Threadgill M.D., Hauck B., Morris P., 2008. Extraction, structural characterization and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochem.* 69, 2799-2806.
- Pastuszko A., 2007. Substancja organiczna w glebach. *Ochr. Środ. Zas. Nat.* 30, 83-98.
- Prior S.A., Runion G.B., Roggers H.H., Torbert H.A., Reeves D.W., 2005. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> effects on biomass production and soil carbon in conventional and conservation cropping system. *Glob. Change Biol.* 11, 657-665.
- Prusinkiewicz Z., Dziadowiec H., Józefowicz-Kotlarz J., 1990. Rozkład resztek poźniwnych. Ekologiczne procesy w monokulturowych uprawach zbóż. UAM Poznań.
- Rahmonov O., 2007. Relacje między roślinnością i glebą w inicjalnej fazie sukcesji na obszarach piaszczystych. WUŚ Katowice.
- Ralph J., 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* 9, 65-83.
- Reigosa M.J., Souto X.C., Gonsález L., 1999. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regul.* 28, 83-88.
- Rogalski M. (red), 2004. Łąkarstwo. Wyd. Kurpisz Poznań.
- Rumpel C., Kögel-Knaber I., 2011. Deep soil organic matter – a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant Soil* 338, 143-158.
- Sapek B., 2000. Gleba jako „pułapka” na gazy cieplarniane. *Zesz. Eduk.* 6, 52-60.
- Sapek B., 2009. Zapobieganie stratom węgla organicznego w glebach łąkowych. *Inż. Ekol.* 21, 48-61.

- Scheirs J., Bruym L., Verhagen R., 2003. Host nutritive quality and host plant choice in two grass miners: primary roles for primary compounds? *J. Chem. Ecol.* 29(6), 1373-1389.
- Schulze E.D., Freibauer A., 2005. Carbon unlocked from soils. *Nature* 437, 205-206.
- Sjöberg G., Nilsson S.L., Persson T., Karlsson P., 2004. Degradation of hemicellulose, cellulose and lignin in decomposing spruce needle litter in relation to N. *Soil. Biol. Biochem.* 36, 1761-1768.
- Thevenot M., Dignac M.-F., Mendez-Millan M., Barhi H., Hatté C., Bardoux G., Rumpel C., 2013. Ligno-aliphatic complexes in soils revealed by an isolation procedure: implication for lignin fate. *Biol. Fertil. Soils.* 49, 517-526.
- Tomaszewski J., 1969. *Gleby łąkowe*. PWRiL Warszawa.
- Zaujec A., 2007. Funkcje materii organicznej w obiegu związków węgla i żywności gleb. [W:] S.S. Gonet, M. Markiewicz (red.), *Rola materii organicznej w środowisku*. PTSH Wrocław, 31-46.
- Zawadzki S. (red.), 1999. *Gleboznawstwo*. PWRiL Warszawa.



**CZEŚĆ III**  
**NAUKI MEDYCZNE**



# POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNE U PACJENTÓW Z DYSKOPATIĄ ODCINKA ŁĘDŹWIOWO-KRZYŻOWEGO KRĘGOSŁUPA

Jarosław Hoffman<sup>1,2</sup>, Anetta Hoffman<sup>3</sup>, Maciej Śniegocki<sup>3</sup>,  
Kamila Woźniak<sup>3</sup>, Monika Kuczma<sup>4</sup>, Justyna Stębowska<sup>2</sup>

## 1. WPROWADZENIE

Dyskopatia odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa jest schorzeniem cywilizacyjnym. Liczne badania wskazują, że ok. 70-80% mieszkańców Polski powyżej 30. roku życia doświadczy choć jeden raz różnie nasilonych dolegliwości bólowych w obrębie pleców. Dane udostępnione przez Zakład Ubezpieczeń Społecznych potwierdzają skalę problemu, aż 40% ubiegających się o świadczenia pieniężne z tytułu trwałej niezdolności do pracy cierpi na „ból krzyża”. Pomimo postępu w leczeniu zarówno aktualnego napadu bólu, jak i zapobieganiu nawrotom dolegliwości bólowych dyskopatia to jedna z niewielu dziedzin medycyny, w których wciąż panuje wiele zamieszania, nieracjonalnych poglądów oraz niedomówień. Źródłem nieporozumień, stwarzającym nieprawidłowe przeświadczenie o istnieniu wielu chorób u jednego pacjenta, jest nawet terminologia: „choroba dyskowa”, „dyskopatia”, „choroba zwyrodnieniowa kręgosłupa”, „rwa kulszowa”, „zapalenie korzonków”. Leczenie we wszystkich przypadkach bardzo często jest takie samo i polega na stosowaniu w pierwszej kolejności farmakoterapii w różnej postaci. Zdarza się również, że powtarzane serie leczenia nie dają nic poza chwilowym złagodzeniem objawów [Frymoyer i Cats-Baril 1991, Cherkin i in. 1992, Dziak 1997, Cragge 2001, Hoffman 2009].

Zespoły bólowe odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa są zagadnieniem bardzo trudnym ze względu na problemy w diagnostyce i postawieniu jednoznacznego rozpoznania co jest właściwą przyczyną bólu. Kumulujące się obciążenia fizyczne związane ze współczesnym trybem życia codziennego, pracą, a zwłaszcza siedzącym spędzaniem czasu wolnego, a także udogodnieniami cywilizacyjnymi działającymi niekorzystnie na kręgosłup człowieka dotyczą zarówno osób młodych, jak i w zaawansowanym wieku, kobiet i mężczyzn, osób prowadzących siedzący tryb życia, jak i aktywnych fizycznie i wysportowanych. Występują trzy kategorie czynników ryzyka „bólów krzyża”: indywidualne i związane ze stylem życia, fizyczne lub biomechaniczne (tj. podnoszenie ciężarów lub częste dźwiganie, narażenie ciała na wibracje, częste lub długotrwałe pochylanie się lub skręcanie tułowia i obciążenia posturalne) oraz psychospołeczne (tj. brak satysfakcji w związku z wykonywaną pracą lub zbyt niskim wynagrodzeniem) [Gawlikowski 1992, Dziak 2003, Cudała i in. 2010].

---

<sup>1</sup> Wyższa Szkoła Zarządzania w Gdańsku, Wydział Fizjoterapii i Nauk o Zdrowiu, ul. Pelplińska 7, 80-335 Gdańsk, e-mail: jhoffman@o2.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

<sup>3</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

<sup>4</sup> Zamiejscowy Wydział Kultury Fizycznej w Gorzowie Wlkp., Zakład Fizjoterapii Klinicznej

Zmiany przeciążeniowe kręgosłupa początkowo dotyczą mięśni okołokręgosłupowych, następnie tkanek miękkich (więzadeł, powięzi, torebek stawowych, krążków międzykręgowych), w końcowym etapie elementów kostnych kręgosłupa (trzonów kręgow, stawów międzykręgowych). Spośród różnych mechanizmów prowadzących do przeciążenia i wystąpienia dolegliwości bólowych kręgosłupa najczęściej mamy do czynienia z dwoma mechanizmami. Pierwszy powstaje poprzez nagłe uszkodzenie tkanek pierścienia włóknistego krążka pod wpływem zadziałania jednorazowego, silnego urazu na zdrowy uprzednio krążek międzykręgowy. Drugi mechanizm powstaje w wyniku przewlekłych przeciążeń, kiedy to uszkodzenie tkanek pierścienia włóknistego krążka poprzedzone jest wieloletnim stopniowym procesem zwyrodnieniowym dysku [Stodolny 1999, Cubała i in. 2010].

## 2. WYWIAD I DIAGNOSTYKA

Dolegliwości bólowe kręgosłupa to zespół objawów o różnej etiologii i nasileniu, bardzo często towarzyszącym wielu chorobom, stąd tak ważne jest ich szybkie rozpoznanie. Dlatego, aby mieć pewność, że choroba została właściwie rozpoznana i przyspieszyć terapię, lekarz powinien wypracować właściwy algorytm postępowania.

W pierwszej kolejności podstawowym pytaniem, na które diagnosta musi sobie odpowiedzieć jest to, czy obraz kliniczny i wywiad chorobowy wskazują, że charakter dolegliwości i stan chorego mają związek z patologią kręgosłupa czy też objawy są związane z rozwojem innych chorób. Zatem odpowiednie postępowanie diagnostyczne opiera się na kilku zasadniczych elementach: wywiadzie chorobowym, badaniu klinicznym, badaniu obrazowym, badaniach dodatkowych.

Wywiad chorobowy jest ważną częścią postępowania diagnostycznego, pozwalającym na wstępne rozpoznanie źródła i charakteru dolegliwości i ustalenie prognozy dalszego leczenia. Na pierwszym etapie diagnostyki należy zwrócić uwagę na to, czy objawy zgłaszane przez chorego wynikają ze schorzenia kręgosłupa w odcinku lędźwiowo-krzyżowym czy też należą do grupy schorzeń imitujących dysfunkcje i choroby kręgosłupa w tym odcinku, m.in. zmiany zwyrodnieniowe stawów biodrowych, złamania szyjki kości udowej, stan zapalny dróg rodnych, infekcje, zwłaszcza dróg rodnych lub moczowych, choroby nowotworowe dróg moczowych i nerek [Krasuski 2005].

Istotne jest również uzyskanie informacji o trybie życia chorego, wykonywanym zawodzie. Powinno się ustalić czas trwania, charakter i lokalizację bólów, ich częstotliwość, czynniki wywołujące lub nasilające dolegliwości [Hoffman 2009]. Dalszym etapem diagnostyki pacjentów z „bólem krzyża” jest sprecyzowanie rozpoznania klinicznego oraz wykonanie badania klinicznego w celu podjęcia właściwego postępowania leczniczego. Obserwacja skierowana jest już od wejścia pacjenta do gabinetu: sylwetka pacjenta, sposób poruszania się, siedzenia, chodzenia. Konieczna jest ocena zakresu ruchomości kręgosłupa, badanie czucia, prawidłowych odruchów, ocena siły mięśniowej kończyn dolnych [Hoffman 2009].

Jak już wspomniano, bóle kręgosłupa są zespołem objawów o różnej etiologii. W rozpoznaniu różnicowym tych dolegliwości należy uwzględnić: zmiany chorobowe w obrębie dysku międzykręgowego (dyskopatie), zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa, zmiany przeciążeniowo-zwyrodnieniowe w obrębie stawów międzykręgowych, zmiany struktury kostnej prowadzące najczęściej do zniekształceń i złamań kręgów (osteoporoza), zespoły bólowe na tle wad rozwojowych kręgosłupa, zmiany pourazowe, różne

procesy chorobowe struktur kostnych, zmiany chorobowe układu nerwowego, zespoły bólowe czynnościowe, zespoły psychogenne [Krasuski 2005].

Bardzo istotną sprawą w zespołach bólowych kręgosłupa jest umiejętna ocena stanu neurologicznego i funkcjonalnego chorego. Przeprowadzając badanie neurologiczne, należy ocenić czucie, siłę mięśniową i odruchy w dolnej połowie ciała. Dzięki temu można wykryć ubytki czuciowe lub ruchowe. Podczas badania układu mięśniowo-szkieletowego powinno się ocenić stawy kończyny dolnej. Połączenie danych z wywiadu z wynikami badania przedmiotowego zwiększa prawdopodobieństwo prawidłowego rozpoznania [Malanga i Nadler 1999].

Pierwszymi objawami obrazu klinicznego dyskopatii w odcinku lędźwiowo-krzyżowym kręgosłupa są dolegliwości bólowe. Występując przewlekłe, utrudniają wykonywanie podstawowych czynności dnia codziennego, prowadząc do wyraźnego obniżenia jakości życia. Niemal u każdego chorego stwierdza się ograniczenie ruchomości, objaw Laseque'a, zaburzenia czucia, mrowienia, drętwienia. Niekiedy dochodzi do zniekształcenia sylwetki i powstania dekompensacji tułowia [Dziak 2003, Gruca 1993].

Na podstawie wyników badania klinicznego określa się poziom przepukliny krążka międzykręgowego. Niedowłady i zaniki mięśniowe obserwuje się przeważnie w późniejszym okresie choroby. Zaburzenie funkcji i dolegliwości bólowe mogą występować na każdym etapie choroby bez symptomów uszkodzenia tkanek i często poprzedzają tworzenie się zmian zwyrodnieniowych. Objawy te mogą jednak towarzyszyć już bardzo rozwiniętym zmianom morfologicznym i wtórnie potęgować dotkliwe dolegliwości już w początkowych etapach choroby kręgosłupa [Fowler i Oyekoya 1995].

Niewielkie dolegliwości neurologiczne w postaci zaburzeń odruchów, parestezji mogą pozwalać na kwalifikowanie chorego do leczenia zachowawczego. Niedowłady znacznego stopnia, ewentualne zaburzenia pęcherza moczowego pochodzenia neurogennego stanowią natomiast wskazanie do szybkiej interwencji chirurgicznej. Nasilone zmiany patomorfologiczne w badaniu obrazowym nakazują zastanowić się nad koniecznością rozwiązania problemu drogą chirurgiczną [Krasuski 2005]. Po wykonaniu dokładnej oceny i zebraniu wywiadu lekarskiego, pełnym badaniu klinicznym zarówno ortopedycznym, jak i neurologicznym, zalecane jest wykonanie badań dodatkowych oraz w razie wątpliwości konsultacji pomocniczych u innych specjalistów.

Badania obrazowe w pełni zrewolucjonizowały diagnostykę chorób kręgosłupa, umożliwiły wiarygodną ocenę stanu funkcjonalnego pacjenta oraz pozwoliły na precyzyjną ocenę wyników leczenia. Zalecenia Komisji Europejskiej w bólach krzyża wskazują, że badania obrazowe RTG, TK i MRI nie są zalecane jako rutynowe, o ile można ustalić wysoce prawdopodobną przyczynę dolegliwości. Poważnym błędem jest planowanie leczenia tylko i wyłącznie na podstawie wyniku badania obrazowego z ominięciem badania klinicznego [Luoto i in. 1999, Białecki i in. 2004, Milecki i in. 2004]. Najnowszym osiągnięciem w dziedzinie badań obrazowych jest nowy system cyfrowej holografii, w którym obrazy generowane są na podstawie danych z tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego. Obrazy te przedstawiane na filmie umożliwiają oglądanie poszczególnych struktur ciała tak, jak gdyby oglądało się preparaty anatomiczne. Ten sposób trójwymiarowego obrazowania ułatwia planowanie zabiegów chirurgicznych, a także pomaga wyjaśnić chorym lub ich opiekunom istotę i charakter choroby [Dziak 2003].

Prześwietlenia rentgenowskie mają na celu wykrycie zmian kostnych oraz określenia ich lokalizacji. Mogą one wykazać zmiany nowotworowe w obrębie kości oraz o typie przeciążeniowo-zwyrodnieniowym w kręgosłupie. U części badanych ob-

serwuje się objawy pośrednie dyskopatii w postaci zwężenia przestrzeni międzykręgowej, trakcyjnej osteofityzacji krawędziowej albo zwiększenia powierzchni podparcia kręgu [Łębkowski 1993].

Badanie tomografii komputerowej CT wykonuje się w celu oceny struktury kostnej, szerokości kanału kręgowego i wzajemnych stosunków anatomicznych pomiędzy kręgami. Dzięki tomografii komputerowej możliwe jest wykrycie przyczyn niepowodzeń leczenia operacyjnego (stenoza, nawracające przemieszczenia jądra miażdżystego, zakażenia, niestabilności, stawy rzekome, obecność ciał obcych) [Walecki i Ziemiński 1997, Krupiński i in. 2002].

W przypadku konieczności oceny struktur kanału kręgowego i wzajemnych stosunków anatomicznych między strukturami kanału a układem kostnym, więzadłowym i tarczami międzytrzonowymi wykonuje się badanie MRI. Za pomocą tej metody można bardzo dokładnie ocenić krążek międzykręgowy i przyległe struktury. Można między innymi określić uwodnienie jądra miażdżystego, a więc stopień jego degeneracji. Jądro rezonans magnetyczny wykazuje dużą przydatność w pooperacyjnych nawrotach choroby, pozwalając na zróżnicowanie ich przyczyny [Łębkowski 1993, Dziak 2003, Białecki i in. 2004].

Coraz dokładniejsze techniki diagnostyczne nie zawsze pomagają w rozpoznaniu choroby. Procesy starzenia się, degeneracji krążka międzykręgowego, destrukcji zwyrodnieniowej w obrębie struktur kostnych nie muszą wywoływać bólu. Czasami obserwuje się olbrzymie zmiany w badaniach obrazowych kręgosłupa, bez objawów klinicznych, i odwrotnie – dużym dolegliwościom bólowym, zaburzeniom funkcjonalnym towarzyszą niewielkie zmiany w badaniach obrazowych kręgosłupa [Hoffman 2009].

Diagnostyka podstawowa uzupełniana jest badaniami dodatkowymi. Do badań dodatkowych należy zaliczyć elektromiografię mięśni niedowładnych, scyntyografię układu kostnego, badania krwi (morfologia, OB, poziom fosfatazy alkalicznej, CRP, stężenie glukozy, elektrolitów, kwasu moczowego w surowicy, TSH), badanie ogólne moczu, USG jamy brzusznej, EKG, USG serca, USG naczyń kończyn, RTG klatki piersiowej, RTG stawów biodrowych, RTG stawów kolanowych [Krasuski 2005].

Rozpoznanie poważnych zaburzeń neurologicznych, właściwa ocena badań dodatkowych, a przede wszystkim ocena badania obrazowego umożliwiają szybką kwalifikację chorego do leczenia zachowawczego lub operacyjnego. Diagnoza jest obarczona ogromną odpowiedzialnością dotyczącą późniejszego wyboru sposobu leczenia.

Pacjenta należy zapytać o dotychczasowe leczenie zgłaszanych dolegliwości i czy był poddany rehabilitacji. Lekarz powinien wiedzieć, na czym polegają określone ćwiczenia ruchowe i metody fizykoterapii. Jeśli zdaniem pacjenta wcześniejsza rehabilitacja była nieskuteczna, należy go zapytać o jej rodzaj, zastosowane zabiegi, a także czy zlecono mu ćwiczenia w domu i czy je wykonywał. Informacje te pomogą zorientować się w zakresie dotychczasowego leczenia i skuteczności zastosowanych metod [Malan-ga i Nadler 1999].

### **3. LECZENIE ZACHOWAWCZE**

Sposób leczenia zależy od fazy choroby, czyli od stopnia nasilenia dolegliwości bólowych dolnego odcinka kręgosłupa. W każdym „ból krzyża” występują dwie fazy choroby: ostra i przewlekła [Dziak 2003]. Celem leczenia w fazie ostrej bólów pleców jest łagodzenie dolegliwości bólowych i skrócenie czasu leczenia.

Szerokie zastosowanie mają zabiegi fizykalne. Fizykoterapię rozpoczyna się po farmakologicznym wyciszeniu ostrych objawów bólowych. Głównym celem fizykoterapii w leczeniu zespołów bólowych kręgosłupa jest zmniejszenie dolegliwości bólowych i odczynu zapalnego oraz redukcja wzmożonego napięcia mięśni przykręgosłupowych. W trakcie leczenia zabiegi fizykalne można ze sobą łączyć w celu uzyskania lepszego efektu terapeutycznego. Zabiegi nie mogą powodować zwiększenia bólu, muszą być dobrze tolerowane i przynosić właściwy efekt leczniczy. Wśród najczęściej stosowanych zabiegów należy wymienić: laseroterapię, fototerapię z odpowiednimi filtrami, ultrasonoterapię, impulsowe pole magnetyczne małej częstotliwości, pola elektromagnetyczne wielkiej częstotliwości, prądy impulsowe średniej częstotliwości, prądy impulsowe małej częstotliwości, jonoforezę, termoterapię (zabiegi ciepłe lub krioterapia w zależności od fazy choroby), hydroterapię (ćwiczenia w wodzie, pływanie). Dobór odpowiednich zabiegów, ich ilości i dawkowania powinny być dokładnie określone przez zlecającego lekarza. Wymagają one bowiem odpowiedniej kolejności stosowania, można je też łączyć ze sobą, ale z zachowaniem rozwagi i w sposób logicznie uzasadniony [Krasuski 2003].

W okresie ostrym stosuje się równoległe leczenie farmakologiczne. Najczęściej podawane są niesteroidowe leki przeciwzapalne i przeciwbólowe, leki rozluźniające układ mięśniowy. Uzupełnieniem leczenia farmakologicznego w fazie ostrej i przewlekłej są blokady okołokręgosłupowe i okołokorzeniowe. Korzystne efekty przynosi ostrzykiwanie bolesnych miejsc okolicy kręgosłupa kortykosteroidami lub roztworem lidokainy. Przy bardzo silnych dolegliwościach bólowych wskazane jest zastosowanie wyciągu za miednicę. Najczęściej stosowanymi są: wyciąg krzesełkowy w pozycji Perschla. Wyciągi mają wpływ relaksujący na mięśnie przykręgosłupowe, grzbietu i wpływ na poszerzenie przestrzeni międzykręgowych w celu odblokowania zakleszczonego pomiędzy kręgami fragmentu jądra miazdżystego czy pierścienia włóknistego. W przypadku wystąpienia ciężkich objawów bólowych lub objawów neurologicznych skutecznym rozwiązaniem jest leżenie w łóżku 2-5 dni w pozycji przeciwbólowej. Ćwiczenia lecznicze w fazie ostrej mają ograniczone zastosowanie [Dziak 2003, Cubała i in. 2010].

W fazie przewlekłej (po upływie 2 tygodni), po wyciszeniu ostrych objawów bólowych istotne jest stopniowe przywracanie pacjenta do wykonywania czynności dnia codziennego oraz lekkich wysiłków fizycznych. Należy stosować zasadę stopniowego przechodzenia od wysiłków o lekkim natężeniu i prostych technicznie, do ciężkich i trudnych, uwzględniając stopień nasilenia ewentualnych dolegliwości bólowych. Pacjenci z nawracającymi „bólami krzyża” wymagają systematycznej obserwacji w celu zabezpieczenia przed pogłębieniem się procesu chorobotwórczego. W fazie przewlekłej, oprócz zabiegów fizykoterapeutycznych i farmakoterapii, wprowadza się ćwiczenia mięśni tułowia i kończyn dolnych, dawkując stosownie obciążenia na kręgosłup. Głównym celem ćwiczeń w zespołach bólowych dolnego odcinka kręgosłupa jest odciążenie stawów międzywyrostkowych, otwieranie otworów międzykręgowych oraz odbarczenie drażnionych korzeni nerwów rdzeniowych.

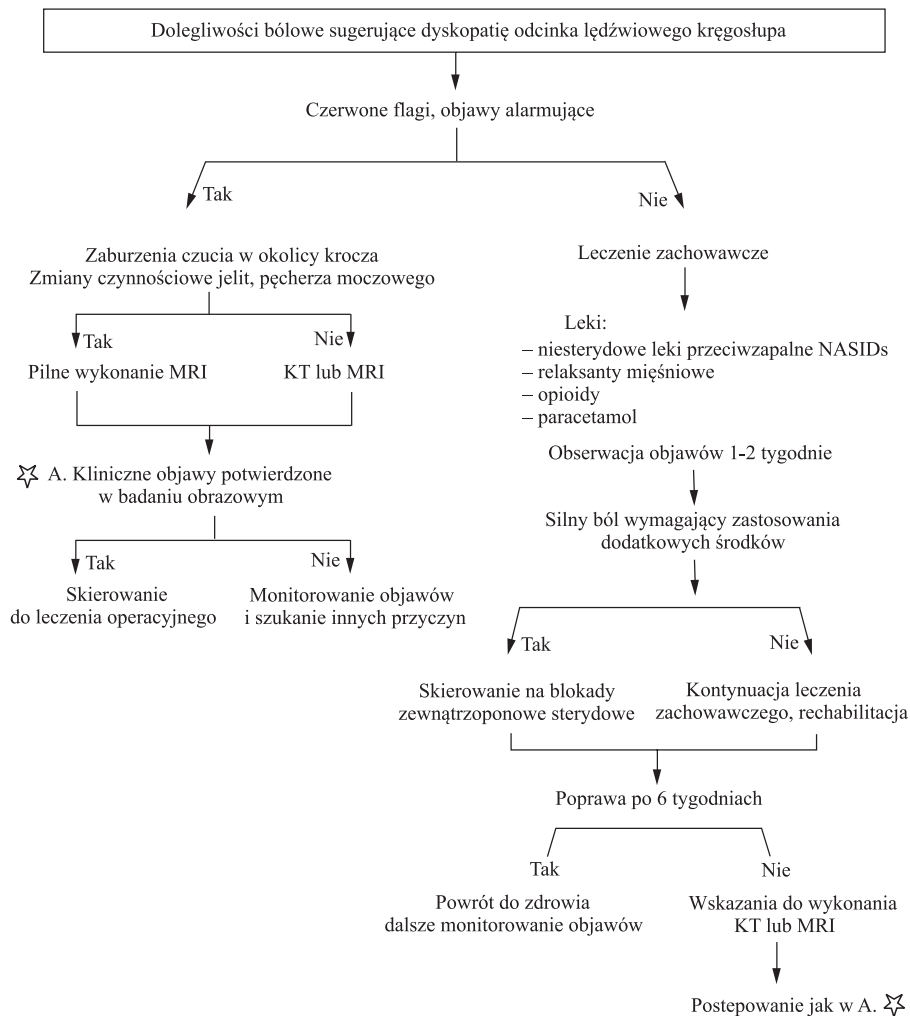
Zalecane są ćwiczenia wzmacniające i stabilizujące tułów oraz nauka kontrolowania i ograniczenia ruchów kręgosłupa, których wykonywanie wywołuje „ból krzyża”. Proces rehabilitacji powinien rozpoczynać się od ćwiczeń synergistycznych, wzmacniających mięśnie brzucha i prostownika grzbietu, których odbudowa i prawidłowa stymulacja zapewnia ważną dla pacjenta kontrolę nerwowo-mięśniową kolumny kręgowej [Dziak 2003]. Coraz większą popularnością wśród pacjentów cieszą się zabiegi z zakre-

su terapii manualnej, takie jak metoda Levitta, Kaltenborna oraz Mulligana, neuromobilizacji, kinezyterapii i metody specjalne, takie jak PNF czy McKenziego.

Ważna jest kontynuacja ćwiczeń profilaktycznych zapobiegających nawrotom bólów, utrzymywanie prawidłowej postawy w pracy, w domu i podczas wypoczynku oraz właściwa gimnastyka wzmacniająca wydolność kręgosłupa i całego ciała [Dziak 2003]. Czynności najprostsze i najczęściej wykonywane, jakimi są np.: podnoszenie ciężarów, siedzenie na krześle w czasie długotrwałej pracy, odpoczynek na fotelu, jak wykazują obserwacje, są często wykonywane niewłaściwie [Krasuski 2005].

Edukacja ruchowa ma na celu podtrzymanie dobrego wyniku leczenia dolegliwości bólowych kręgosłupa. Edukacja i dążenie do wyzbycia się złych nawyków związanych z codzienną pracą i stereotypów ruchowych to istotne elementy leczenia. Profilaktyka jest zdecydowanie najskuteczniejszą metodą zwalczania dolegliwości bólowych i dysfunkcji kręgosłupa.

Wykres przedstawia amerykański algorytm postępowania w przypadku dyskropatii lędźwiowej, stosowany również w Polsce.





#### 4. LECZENIE OPERACYJNE

Szacuje się, że u około 1-2% pacjentów z bólami dolnego odcinka kręgosłupa leczenie zachowawcze nie daje pożądaných efektów. Pacjentów tych kwalifikuje się do leczenia operacyjnego. Właściwa kwalifikacja chorych do zabiegu operacyjnego, oparta na wywiadzie chorobowym, badaniu neurologicznym i wynikach badań obrazowych, warunkuje powodzenie w leczeniu operacyjnym. Interpretacja zmian radiologicznych powinna być skorelowana z badaniem neurologicznym. Wskazaniem do leczenia operacyjnego jest utrzymywanie się codziennie dolegliwości bólowych przez okres 4-6 tygodni pomimo zastosowanego kompleksowego leczenia zachowawczego, permanentne upośledzenie czynności korzeni nerwowych, objawiające się zaburzeniami czucia, znacznym osłabieniem lub porażeniem odpowiednich grup mięśniowych oraz zaburzeniami mikcji [Williams i Murtagh 2003].

W przypadku stwierdzenia znacznego ucisku na struktury nerwowe i towarzyszących zaburzeń funkcji zwieraczy należy poddać się operacji w trybie pilnym, ponieważ długotrwały ucisk korzenia prowadzi do rozwoju zmian niedokrwiennych, które nie poddają się leczeniu chirurgicznemu [Schirmer 1998]. Wyżej wymienione objawy muszą być potwierdzone w badaniach dodatkowych, tj. tomografii komputerowej, rezonansie magnetycznym; lokalizacja bólu korzeniowego zgodna z rozmieszczeniem dermatomów oraz przynajmniej jeden z następujących objawów neurologicznych, których lokalizacja musi być zgodna z oczekiwaną na podstawie obrazu radiologicznego i umiejscowienia bólu; zaburzenia czucia; osłabienie siły mięśniowej; osłabienie odruchów ścięgnistych [Ząbek 1999].

Należy również wspomnieć, że zabieg operacyjny kręgosłupa wiąże się z możliwością wystąpienia powikłań pooperacyjnych, takich jak: krwawienie, zakażenie, zapalenie, nawrotowa przepuklina krążka międzykręgowego, odnerwienie mięśni, niestabilność stawu, uszkodzenie nerwu lub naczynia. Najlepsze wyniki leczenia operacyjnego obserwuje się u pacjentów po stosunkowo krótkim okresie leczenia zachowawczego oraz właściwie przeprowadzonej rehabilitacji pooperacyjnej [Kwolek 2007, Hoffman i in. 2009].

#### 5. PODSUMOWANIE

Dolegliwości bólowe kręgosłupa mogą sprawiać trudności zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne. Szczegółowa diagnostyka „bólu krzyża” ma fundamentalne znaczenie dla właściwego rozpoznania schorzenia i planowanego leczenia. Następstwem niewłaściwej diagnozy będzie nieprawidłowo ukierunkowane leczenie i w konsekwencji gorsze rokowanie. Wprawdzie powstało wiele strategii leczniczych, które nie zostały w pełni zweryfikowane badaniami naukowymi, możliwa jest jednak wnikliwa analiza dostępnych informacji na podstawie szczegółowego wywiadu i badań diagnostycznych, które dostarczają podstawy do właściwego ich stosowania u chorych z bólem krzyża. Takie postępowanie ogranicza nawroty i zaostrenia objawów chorobowych i stanowi właściwą profilaktykę, chroniącą przed wystąpieniem przewlekłego zespołu bólowego kręgosłupa.

**LITERATURA**

- Bakalarek B., 2013. <http://www.ortopeda.biz.pl/leksykon/dyskopatia.pdf>
- Białecki J., Łukawski St., Milecki M., 2004. Obraz krążka międzykręgowego w chorobie dyskowej na podstawie badań MR. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 6, 166-171.
- Cherkin D., Deyo E., Volinn E., 1992. Use of the international Classification of Diseases (ICD-9-CM) to identify hospitalization for mechanical low back problems in administrative databases. *Spine* 17, 817-825.
- Cragee E., 2001. Physiological and functional profiles in select subjects with low back pain. *Spine* 1, 198-204.
- Cubała A., Hoffman J., Molski P., Hagner W., Stańczyk I., Kuczma M., 2010. Prevalence of pain symptoms and range of motion in lumbosacral spine in professional athletes. [In:] M. Napierała (ed.), *Pedagogy of health in physical culture*, Bydgoszcz, Lviv, Warszawa UKW, 144-156.
- Duus P., 1989. *Diagnostyka topograficzna w neurologii*. PZWL Warszawa.
- Dziak A., 1997. *Bóle krzyża*. PZWL Warszawa.
- Dziak A., 2003. *Bolesny krzyż*. *Medicina Sportiva Kraków*
- Fowler B., Oyekoya O., 1995. The therapeutic efficacy of McKenzie Concept in the management of low back pain. *Proceedings 12 International Congress World Confederation Physical Therapists*, Washington, USA.
- Frymoyer J., Cats-Baril W., 1991. An overview of the incidences and cost of low back pain. *Orthop. Clin. North Am* 22, 263-271.
- Gawlikowski J., 1992. Zespoły bólowe okolicy kręgosłupa lędźwiowo-krzyżowego. *Kwartalnik Ortopedyczny* 4, 1-20.
- Gruca A., 1993 *Chirurgia ortopedyczna*. Vol. 3, PZWL Warszawa.
- Hoffman J., 2009. Wpływ metody McKenziego na jakość życia pacjentów z dyskopatią odcinka lędźwiowo-krzyżowego. *Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy*, rozprawa doktorska.
- Hoffman J., Dejewski I., Stębowska J., Hagner W., 2009. Wpływ rehabilitacji na wyniki leczenia operacyjnego dyskopatii odcinka lędźwiowo-krzyżowego. *Kwartalnik Ortopedyczny* 2, 156-161.
- Krasuski M., 2005. Algorytm postępowania diagnostyczno-leczniczego w zespołach bólowych kręgosłupa. *Rehabilitacja Medyczna* 9(3), 19-25.
- Krupiński W., Majcher P., Krupski M., 2002. Degenerative changes of the vertebral column in spatial imaging of 3D computer tomography. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska* 51, 459-465.
- Kwolek A., 2007. *Rehabilitacja medyczna*. Wyd. Medyczne, Urban & Partner Wrocław, 116-129.

- Luoto S., Taimela S., Hurri H., 1999. Mechanisms explaining the association between low back trouble and deficits in information processing. *Spine* 24, 255-261.
- Łębkowski W., 1993. Dyskopatia – punkt widzenia neurochirurga. *Magazyn Medyczny* 5, 6-11.
- Malanga G.A., Nadler S.F., 1999. Nonoperative treatment of low back pain. *Mayo Clinic Proceedings* 74, 1135-1148.
- Milecki M., Lukawski S., Białecki J., 2004. Wartość metod diagnostycznych w rozpoznawaniu choroby dyskowej kręgosłupa lędźwiowego. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 6, 155-159.
- Schirmer M., 1998 *Neurochirurgia*. Wyd. Medyczne Urban & Partner Wrocław.
- Stodolny J., 1999. *Choroba przeciążeniowa kręgosłupa*. Natura Kielce.
- Walecki J., Ziemiński A., 1997. *Rezonans Magnetyczny i Tomografia Komputerowa*. Springer PWN Warszawa.
- Williams A.L., Murtagh F.R., 2003. *Zabiegi diagnostyczne i terapeutyczne w chorobach kręgosłupa – przewodnik*, Wyd. Medipage, Warszawa, 3-21.
- Ząbek M., 1999. *Zarys neurochirurgii*. PZWL Warszawa.



# ŚWIADOMOŚĆ SPOŁECZNA NA TEMAT OSÓB NIEPEŁNOSPRAWNYCH

Jarosław Hoffman<sup>1,2</sup>, Piotr Wojasiński, Ewa Trela<sup>2</sup>, Wojciech Hagner<sup>2</sup>,  
Anetta Hoffman<sup>3</sup>, Izabela Stańczyk

## 1. WSTĘP

Niepełnosprawność zawsze była trudnym wyzwaniem dla człowieka i społeczeństwa. Dzięki zmianom w naszym kraju problem niepełnosprawności jest ujawniany we wszystkich aspektach życia. Sam fakt, że dostrzegamy osoby z niepełnosprawnością i mówimy o ich problemach, jest dobrym początkiem przełomu mentalnego w Polsce. Wprowadzone liczne regulacje prawne, które miały początek w latach 90. XX wieku, m.in. ustawa o rehabilitacji zawodowej i społecznej, zatrudnianiu osób niepełnosprawnych, o ochronie zdrowia psychicznego, o pomocy społecznej, zmienione zasady i tryb orzekania o niepełnosprawności czy w końcu uchwalona przez Sejm RP Karta Praw Osób Niepełnosprawnych, wyjaśniły sytuację Polaków z niepełnosprawnością [Uchwała Sejmu... 1997]. Jednak niezmiennie pozostało, że osoby niepełnosprawne cały czas natrafiają na liczne przeszkody, zwłaszcza jeśli chodzi o funkcjonowanie w życiu społecznym oraz uznanie ich za pełnych i równoprawnych członków społeczeństwa. Zdaniem większości osób niepełnosprawnych, to właśnie postawy społeczne są największą barierą w pełnej integracji. Osoby niepełnosprawne nadal doświadczają niedopuszczalnych postaw opartych na uprzedzeniach, obawach oraz braku wiary w ich zdolności. Ważne jest uświadamianie społeczeństwa, że osoby niepełnosprawne mają takie same prawa człowieka oraz że jest wiele barier społecznych, które ograniczają osoby niepełnosprawne do korzystania z tych praw lub im to uniemożliwiają [Abramowska 2005, Gorajewska 2009].

W Polsce żyje ponad 5 mln ludzi z niepełnosprawnością, a liczba ta stale rośnie. W 2013 roku udział osób niepełnosprawnych ze znacznym stopniem niepełnosprawności wynosi 28,5%, z umiarkowanym – 41,6%, z lekkim – 29,9%. Wśród osób niepełnosprawnych prawnie w wieku produkcyjnym struktura ta przedstawiała się następująco: 21,7% – znaczny stopień niepełnosprawności, 43,7% – umiarkowany, 34,6% – lekki. Najczęstszą przyczynę niepełnosprawności stanowią schorzenia układu krążenia, narządów ruchu oraz schorzenia neurologiczne. Relatywnie niższy jest udział procentowy osób z uszkodzeniami narządu wzroku i słuchu i z chorobą psychiczną [www.niepełnosprawni.gov.pl].

Większość osób niejednokrotnie spotkała się z różnymi określeniami dotyczącymi osób z niepełnosprawnością. Pojęcie „niepełnosprawny”, u każdego wywołuje zupełnie odmienne skojarzenia. Dla niektórych osób jest to „głuchy”, dla innych „bez ręki”, a pozostałym to określenie kojarzy się z człowiekiem poruszającym się na wózku inwa-

---

<sup>1</sup> Wyższa Szkoła Zarządzania w Gdańsku, Wydział Fizjoterapii i Nauk o Zdrowiu, ul. Pelplińska 7, 80-335 Gdańsk, e-mail: jhoffman@o2.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz

<sup>3</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz

lidzkim. Stosowana w dowolny sposób klasyfikacja „niepełnosprawny” jest bardzo często błędnie interpretowana i kojarzona z pojęciami „upośledzony umysłowo” czy „chory”, bo nie każdy człowiek z niepełnosprawnością ma problemy intelektualne lub zdrowotne. Niepełnosprawność można rozpatrywać w ujęciu medycznym, prawnym czy społecznym. „W określeniu pojęcia i poziomu sprawności wyróżnia się sprawność umysłową, psychiczną i fizyczną. Oprócz stanu zdrowia, ogólnej sprawności organizmu doniosłą rolę w ujawnianiu się niedoborów czy dysfunkcji ludzkiego funkcjonowania odgrywają społeczne warunki życia”. Nie można oddzielić niepełnosprawności od kręgu kulturowego czy postępu naukowo-technicznego. Dlatego na skuteczną integrację osób z niepełnosprawnością ze społeczeństwem mają wpływ zarówno uwarunkowania polityczne, filozoficzne, etyczne, społeczne, psychologiczne, jak i materialne oraz techniczne [Przybylski 2003, Golub i in. 2004, Dykcik 2005].

Barieri dotykające ludzi z niepełnosprawnością można sklasyfikować według podziału innego niż tylko fizyczne i społeczne. W celu poznania rozmiaru pojęcia „bariery”, warto zastanowić się nad tym, co każdemu człowiekowi utrudnia codzienne funkcjonowanie, tym bardziej osobie niepełnosprawnej. Likwidacja barier może mieć korzystny wpływ nie tylko na osoby niepełnosprawne, ale także dla całego społeczeństwa. Ważnym zadaniem jest pokazywanie pozytywnego udziału w życiu społeczeństwa osób niepełnosprawnych, bez względu na stopień ich niepełnosprawności, jako aktywnych i pełnoprawnych członków tego społeczeństwa [Gorajewska 2009].

## 2. POSTAWY SPOŁECZNE WOBEC NIEPEŁNOSPRAWNYCH

Integracja społeczna oraz powodzenie rehabilitacji kompleksowej osób z dysfunkcjami narządu ruchu lub umysłowymi w dużej mierze zależą od takich czynników, jak: promocja zdrowia, jakość opieki medycznej, polityka społeczna prowadzona przez państwo oraz postawy społeczne wobec niepełnosprawnych członków społeczeństwa. Postawy społeczne są jedną z najtrudniejszych do przebycia barier utrudniających integrację osób niepełnosprawnych ze społeczeństwem. Często bowiem negatywne postawy i zachowania społeczeństwa stanowią najtrudniejszą przeszkodę w usamodzielnieniu się oraz w dążeniu do samorealizacji osób niepełnosprawnych [Rutkowska i in. 2000].

Postawy społeczne pełnią istotną rolę w życiu społecznym. Sytuacja każdego człowieka jest w dużej mierze uzależniona od tego, czy będzie prawidłowo funkcjonował w środowisku społecznym. Dokonując analizy postawy społeczeństwa wobec osób nie w pełni sprawnych na przestrzeni wpływających lat, należy stwierdzić, że wraz z rozwojem cywilizacji nastąpiły korzystne zmiany, jednak problem trudności życiowych osób z niepełno sprawnościami, związanych z nastawieniem społecznym, jest nadal aktualny. Mimo iż z biegiem lat w końcu zaczęto mówić o prawach osób niepełnosprawnych w kontekście praw człowieka, to jednak cały czas istnieje wiele przeszkód uniemożliwiających korzystanie w pełni z tych praw. Największą z tych przeszkód jest wciąż bardzo duże zróżnicowanie postaw i nastawienia społeczeństwa. Obecnie w światowej, jak i polskiej literaturze wyróżnia się dwie skrajne postawy zachowania wobec osób z niepełnosprawnościami, mianowicie akceptację i odrzucenie. Zdaniem J. Granofsky’ego akceptacja cechuje się obiektywną i realną oceną osoby nie w pełni sprawnej, czyli: po pierwsze – realną oceną ograniczeń spowodowanych niepełnosprawnością oraz oceną wpływu upośledzenia na psychikę, a także działanie

człowieka, a po drugie – akceptacją osób niepełnosprawnych na równi z osobami zdrowymi [Gazdulska 2008].

Natomiast pozytywne nastawienie poznawcze wobec niepełnosprawnych według Granofsky'ego to: znajomość potrzeb tych osób, dostrzeganie ich zalet, możliwości oraz osiągnięć, odrzucanie izolacji, naturalny i życzliwy kontakt z osobami niepełnosprawnymi, umożliwianie osobom niepełnosprawnym pełnienia ról społecznych. Odrzucenie wyraża się nieprzychylnością w stosunku do osób z dysfunkcjami narządu ruchu oraz umysłowymi, czyli unikaniem, piętnowaniem, poniżaniem, brakiem akceptacji. Powoduje to pojawienie się u tych osób dużego obciążenia psychicznego objawiającego się trudnościami w działaniu lub cechami osobowościowymi niepełnosprawnych, a kontakt z nimi staje się utrudniony. Bardzo często przyczyną negatywnych postaw są stereotypy oraz przesady. Stereotyp jest określany jako rozpowszechnianie w różnych grupach społecznych za pośrednictwem języka swoich przekonań na temat osób w sposób zbyt uproszczony i przesadny. Natomiast przesad oraz uprzedzenie posługują się fałszywymi lub nie do końca prawdziwymi informacjami, które zostały przyjęte od społeczeństwa. Stereotypy, przesady i uprzedzenia doprowadzają do tego, że widziane są tylko słabe strony. Zdaniem Granofsky'ego negatywne postawy wobec osób niepełnosprawnych charakteryzują się litością, zbyt troskliwością, negatywnym nastawieniem poznawczym oraz społecznym względem tych osób. Uczucia litości i zbyt troskliwości względem osób niepełnosprawnych oznaczają: przypisywanie im niższych ról społecznych, patrzenie na takie osoby jako na przedmiot ciekawości oraz niedoceniać ich. Negatywne nastawienie poznawcze przejawia się zwracaniem szczególnej uwagi na niepełnosprawność, przecenianie brzydoty upośledzeń. Negatywne nastawienie społeczne wyraża się izolacją osób niepełnosprawnych od zdrowych, niechęcią do ich udziału w różnego rodzaju kontaktach społecznych oraz uczuciem braku komfortu w obecności osób z niepełnosprawnościami [Gazdulska 2008].

Warto również podkreślić uszczegółowioną koncepcję postaw społecznych stworzoną przez Helenę Larkową, która pozwala spojrzeć nieco szerzej na postawy społeczne wobec osób niepełnosprawnych, ponieważ zwraca uwagę na ich złożoność. W prezentowanej przez nią koncepcji między postawą pozytywną a negatywną umieszczona została postawa pośrednia, którą charakteryzuje współczucie, litość, ciekawość, obojętność. Postawa ta jest nazywana ambiwalentną, dwuwartościową, jednocześnie pozytywną i negatywną. Umieszczenie w klasyfikacji przez Larkową postawy ambiwalentnej jest jak najbardziej trafne, ponieważ nie zawsze nastawienia ludzi są tylko pozytywne lub skrajnie negatywne [Wilmowska-Pietruszyńska 2009, libproxy.up.krakow.pl]. Pod kierownictwem prof. Dr. hab. med. K. Turowskiego przeprowadzono badania charakteru postaw wobec osób niepełnosprawnych ponad 400 uczniów polskich szkół zawodowych i licealnych. W badaniu posłużono się zmodyfikowanym kwestionariuszem Heleny Larkowej. Badania przeprowadzone zostały w dwóch grupach dwuosobowych: uczniów zasadniczych szkół zawodowych w szkołach Tarnobrzega i Lubartowa oraz uczniów 3 renomowanych liceów ogólnokształcących w Lublinie. Na podstawie przeprowadzonego sondażu stwierdzono, że młodzież szkolna miewa jedynie sporadyczne kontakty z osobami o ograniczonej sprawności i to najczęściej w miejscach publicznych. Deklarowane postawy respondentów charakteryzowały się ambiwalencją, były często niespójne, a najczęściej pośrednie (264 osoby – 66%). Według danych, bardzo trudno było wskazać w badanej grupie osoby o jednoznacznie pozytywnych bądź negatywnych postawach. Za osoby

o pozytywnych postawach uznano te, które deklarują pozytywne emocje i zachowania względem osób niepełnosprawnych (77 osób – 19,25%). Uczniowie o negatywnych postawach to ci, którzy wykazywali negatywne emocje, agresję, niechęć (59 osób – 14,75%). Pożądane to znaczy pozytywne cechy postaw były często uwarunkowane nauką w renomowanych liceach, zamieszkaniem w mieście, gdzie młodzież miała większy kontakt oraz możliwość współdziałania z osobami o widocznym kalectwie. Negatywne przejawy postaw społecznych zdecydowanie częściej dotyczyły chłopców – uczniów szkół zawodowych. Jak wynika z wniosków z przeprowadzonych badań, zaledwie 27% licealistów i tylko 11,5% uczniów szkół zawodowych deklaruje postawy społeczne wobec osób niepełnosprawnych o charakterze zbliżonym do pożądanego. Postawy negatywne przejawia 9,5% licealistów i 44,5% ich rówieśników ze szkół zawodowych. Niestety uzyskane wyniki wskazują na pilną potrzebę intensywnej edukacji zdrowotnej młodzieży, a także przeprowadzenia działalności informacyjnej i wychowawczej w celu dążenia do kształtowania postaw bardziej przychylnych osobom niepełnosprawnym, dzięki którym osoby te będą miały szansę na pełną integrację w społeczeństwie [Rutkowska i in. 2000].

Powyższe rozważania na temat postaw społecznych wobec osób niepełnosprawnych zwracają uwagę na fakt, iż postawy nie są stałe i ulegają zmianom, a czynniki, które je determinują, to między innymi: obowiązujące normy społeczne, przekonania, polityka socjalna, poziom kultury i warunki ekonomiczne wyznaczające poziom życia ludzi. Często sposób widzenia przez społeczeństwo osób z niepełnosprawnościami wynika ze stereotypów, zwyczajów, ideologii, wierzeń, polityki czy też z braku wiedzy [Gazdulska 2008, Krajewska-Kułąk i in. 2011].

### **3. BARIERY NIEPEŁNOSPRAWNOŚCI, JAKO PROBLEM INTEGRACJI ZE SPOŁECZEŃSTWEM**

Niepełnosprawność bardzo często bywa kojarzona z barierami. Najczęściej wskazuje się na bariery architektoniczne, techniczne i komunikowania się. Jednak na tych barierach nie kończą się problemy osób niepełnosprawnych. Istnieją również ograniczenia tkwiące w sferze psychologiczno-mentalnościowej. Uważa się, że osoby nie w pełni sprawne są bierne, ponieważ nie ma ich na ulicach, w szkołach, zakładach pracy czy też w miejscach rozrywkowo-kulturalnych: teatrze, kinie. Społeczeństwo obywatelskie opiera się na aktywnych obywatelach. Osoby niepełnosprawne mają nie tylko prawa, ale także obowiązki, których ze względu na istniejące bariery nie są w stanie wypełniać. Dlatego osobom z uszkodzeniami narządu ruchu lub deficytami umysłowymi powinny przysługiwać pewne prawa szczególne, aby umożliwić im korzystanie z uprawnień przysługujących wszystkim obywatelom [Gołub i in. 2004, Wilmowska-Pietruszyńska 2009].

W Polsce zmieniają się trendy zdrowotne wyznaczające kierunki zapotrzebowania medycznego i społecznego. Nie ulega wątpliwości, że konieczny jest rozwój geriatry, prowadzenie rehabilitacji w środowisku życia, szczególnie uwzględniając rehabilitację zawodową dającą możliwość zatrudniania osób niepełnosprawnych, która jest najlepszą metodą na wykorzystanie zdolności fizycznych oraz psychicznych tych osób [Wolski i in. 2006]. Przez wiele lat osoby niepełnosprawne fizycznie, intelektualnie oraz przewlekłe chore były w naszym społeczeństwie izolowane. Obecnie jest jeszcze wielu ludzi, których negatywne reakcje w zetknięciu z takimi osobami niestety sprawiają olbrzymią przykrość osobom niepełnosprawnym i bardzo często są „ciężarem”



większym niż sama choroba. To wszystko cały czas powoduje problem zintegrowania się osób z uszkodzeniami narządu ruchu lub brakami intelektualnymi z resztą społeczeństwa [Gronowska i Wilmowska-Pietruszyńska 2007].

Słowo „integracja” pochodzi z języka łacińskiego i oznacza, jak podaje słownik wyrazów obcych, „zespolecie się, scalenie, tworzenie całości z części. Integracja może być ekonomiczna, polityczna, społeczna...” [Król 2000]. Integracja w pedagogice oznacza „dać szansę wspólnego przebywania, uczenia się i zabawy wszystkim dzieciom” [Encyklopedia popularna 1982]. W pedagogice specjalnej, według A. Hulka integracja „wyraża się w takim wzajemnym stosunku pełnosprawnych i niepełnosprawnych, w którym respektowane są te same prawa (...), i w których stwarzane są dla obu grup identyczne warunki maksymalnego, wszechstronnego rozwoju. Integracja pozwała więc być osobie niepełnosprawnej sobą wśród innych. Integracja w takim znaczeniu może mieć zastosowanie do wszystkich sfer życia jednostki niepełnosprawnej – życia rodzinnego, kształcenia ogólnego i zawodowego, pracy, czasu wolnego, aktywności społecznej i politycznej itp.” [Hulek 1997]. Tworzenie w naturalnym środowisku społecznym warunków do rozwoju, nauki, pracy i spędzania wolnego czasu to znaczy umożliwienie osobom niepełnosprawnym prowadzenie normalnego życia, samorealizacji, jest głównym celem integracji społecznej osób niepełnosprawnych. Hulek uważa, że społeczna integracja osób niepełnosprawnych wyraża się w „dążeniu do stworzenia tym osobom możliwości pełnego lub częściowego włączenia się do normalnego życia, dostępu do wszystkich instytucji i usług, z których korzystają pełnosprawni” [Hulek 1997].

Pomimo podejmowanych wielu działań integracyjnych w naszym kraju, integracja osób niepełnosprawnych ze społeczeństwem wciąż spotyka się z różnego rodzaju barierami tkwiącymi między innymi w otoczeniu cywilizacyjnym, w sferze kulturowych wartości i sposobów zachowania się ludzi, a także w procesie edukacji dzieci i młodzieży. Aleksandra Maciarz wymienia bariery społecznej integracji, dzieląc je ze względu na charakter na: bariery fizyczne – nazywane barierami architektonicznymi – niestety otoczenie cywilizacyjne bardzo często przystosowane jest tylko dla osób pełnosprawnych, z zupełnym pominięciem osób niepełnosprawnych, a przecież jest wiele przeszkód natury fizycznej utrudniających przebywanie oraz przemieszczanie się osobom nie w pełni sprawnym. Są to między innymi: wysokie progi, schody, zbyt wąskie korytarze i przejścia w budynkach i środkach komunikacji, wąskie drzwi, brak poręczy, uchwytów, wind, klimatyzacji, pochylni, sygnalizacji świetlnej oraz dźwiękowej, niedostosowane szkoły pod względem architektonicznym do uczniów z konkretnymi rodzajami niepełnosprawności [Maciarz 1999].

Barierami społecznymi to między innymi negatywne postawy oraz przesady w stosunku do osób niepełnosprawnych, które powodują ograniczenie ich udziału w życiu społecznym oraz pełnienia ról społecznych, przejawiają się wobec tych osób na przykład w niechęci pracodawców do przyjmowania ich na pewne stanowiska, w postaci uprzedzeń emocjonalnych niektórych osób lub unikania kontaktów towarzyskich oraz zawodowych, w niechęci nauczycieli do pracy w integracyjnych formach edukacji. Kolejnym rodzajem barier są bariery kulturowe, dotyczące na przykład zachowań dorosłych w stosunku do dzieci. W okresie rozwoju dzieci kształtowane jest w nich poczucie, że walory urody i budowy ciała są bardzo pożądane oraz że zapewniają atrakcyjność i powodzenie społeczne. Często więc dzieci w pierwszym okresie kontaktów z rówieśnikami niepełnosprawnymi przejawiają wobec nich negatywne reakcje oraz niewłaściwe zachowania. Badania dowodzą, że nie tylko ustosunkowanie

dzieci sprawnych wobec dzieci niepełnosprawnych jest gorsze niż wobec pozostałych rówieśników, ale też dzieci niepełnosprawne są bardziej negatywnie ustosunkowane wzajemnie wobec siebie niż wobec pełnosprawnych rówieśników. Bariery edukacyjne cały czas tkwią jeszcze w procesie dydaktycznym tradycyjnej szkoły oraz w działaniach nauczycieli. Według Aleksandry Maciarz dziecko niepełnosprawne w roli ucznia narażone jest na stres związany z rywalizacją w warunkach nierównych szans [Maciarz 1999].

O przełamywaniu barier oraz skuteczności integracji społecznej dzieci, młodzieży i dorosłych osób niepełnosprawnych w istotnym stopniu decydują właśnie postawy społeczne wobec nich. Mają one bardzo duży wpływ na to, jakie prawa, obowiązki i przywileje przyznaje się tym osobom w życiu społecznym. Potrzeby niepełnosprawnych były już uwzględniane w dziesiątkach aktów prawnych, jednak cały czas aktywności tych osób, na przykład na rynku pracy, przeszkadza niestabilność oraz niespójność przepisów, a także brak wiedzy o dostępnych formach pomocy i wreszcie na sam koniec również czasem pasywność samych zainteresowanych [Maciarz 1999].

Osobom niepełnosprawnym fizycznie, intelektualnie, chorym przewlekłe, przysługują identyczne prawa jak wszystkim obywatelom. W Powszechnej Deklaracji Praw Człowieka możemy przeczytać, że „wszystkie istoty są wolne i równe pod względem godności i praw. Są oni obdarzeni rozumem i sumieniem i powinni postępować wobec innych w duchu braterstwa. (...) Każdy człowiek jest uprawniony do korzystania z wszystkich praw i wolności, bez względu na różnice rasy, koloru skóry, płci, języka, religii, poglądów politycznych lub innych przekonań, narodowości, pochodzenia społecznego, majątku, urodzenia lub jakiegokolwiek inne różnice” [amnesty.org.pl].

#### 4. PODSUMOWANIE

Podział na dwa światy osób sprawnych i niepełnosprawnych stał się źródłem licznych uprzedzeń. Rozważania dotyczące postaw społecznych względem osób niepełnosprawnych świadczą o tym, że zarówno w ujęciu historycznym, jak i współczesnym postawy te mają różnorodny charakter. Dzięki postępującej świadomości stopniowo zwiększa się szansa na samodzielność osób z niepełnosprawnością poprzez uświadomienie ich funkcjonalnych możliwości. Jednak tempo zachodzenia pozytywnych przemian pozostaje nadal mało zadowalające. Proces normalizacji życia osób z niepełnosprawnością utrudniają zakorzenione w społecznej świadomości mity, stereotypy, zwyczaje, uprzedzenia, ideologie oraz polityka. Przyczyną ich trwania jest m.in. społeczna niewiedza na temat niepełnosprawności i osób z niepełnosprawnością. W świecie zdominowanym przez nowoczesne technologie rozwiązanie tej sytuacji staje się banalnie proste. Należy poszukiwać sposobów dotarcia do społeczeństwa z opartą na faktach wiedzą na temat niepełnosprawności.

Podsumowując, za niezwykle istotną należy uznać potrzebę inicjowania nowego kierunku myślenia i działań na rzecz równych szans i równoprawnego uczestnictwa w życiu społecznym jako działań korzystnych dla wszystkich obywateli.

## LITERATURA

Abramowska B.E., 2005. Osoby niepełnosprawne w mediach i odbiorze społecznym. [W:] D. Gorajewska (red.), Społeczeństwo równych szans. Tendencje i kierunki zmian, Stowarzyszenie Przyjaciół Integracji Warszawa, 191-198.

Dykcik B.W., 2005. Wprowadzenie w przedmiot pedagogiki specjalnej jako nauki. Pedagogika specjalna. Wyd. V. Wyd. Nauk. UAM Poznań.

Encyklopedia popularna, 1982. PWN Warszawa.

Gazdulska M., 2008. Postawy społeczeństwa wobec osób z niepełnosprawnościami w ujęciu historycznym i współczesnym. *Seminare* 25, 281-285.

Gołub G., Spisacka S., Gładysz I., 2004. Niepełnosprawność – bariery oraz pomoc świadczona osobom niepełnosprawnym przez środowisko lokalne na terenie powiatu bialskiego. V Chełmska konferencja, *Pielęgniarka i położna* 7, 22-24.

Gorajewska D., 2009. Fakty i mity o osobach z niepełnosprawnością. Stowarzyszenie Przyjaciół Integracji Warszawa.

Gronowska Z., Wilmowska-Pietruszyńska A., 2007. Niepełnosprawność a całkowita niezdolność do pracy. *Arch. Med. Sąd. Krym* LVII, 6-10.

Hulek A., 1997. Integracyjny system kształcenia i wychowania. *Pedagogika Rewalidacyjna*, PWN Warszawa, 492-493.

Krajewska-Kułak E., Kułak W., Łukaszuk C., 2011. Postawy studentów kierunku pielęgniarstwo wobec osób niepełnosprawnych. *Hygeia Public Health* 46(3), 355-361.

Król A., 2000. Pomoce dydaktyczne dla nauczycieli pracujących w klasach integracyjnych. WSiP Warszawa.

Maciarz A., 1999. Bariery społecznej integracji. Z teorii i badań społecznej integracji dzieci niepełnosprawnych, Oficyna Wydawnicza „Impuls” Kraków.

Olech P., Szmagał A., Kwapisz U., 2008. Niepełnosprawność a bariery architektoniczne. *Pielęgniarstwo Polskie* 2(28), 115-118.

Przybylski S., 2003. Refleksje nad barierami występującymi przy wdrażaniu integracji osób niepełnosprawnych w Polsce na początku nowego tysiąclecia. *Integracja osób niepełnosprawnych w edukacji i interakcjach społecznych*. Wyd. UMCS Lublin.

Rutkowska E., Jodłowska A., Szamra M., 2000. Postawy społeczne młodzieży wobec osób niepełnosprawnych. *Zdrowie Publiczne* 12, 422-426.

Uchwała Sejmu RP z dnia 1 sierpnia 1997 r., 1997. M.P. z 13.08.1997 r. nr 50 poz. 475.

Wilmowska-Pietruszyńska A., 2009. Niepełnosprawność. *Orzecznictwo Lekarskie* 6(2), 83-89.

Wolski A., Karwat I.D., Juszczyk M., 2006. Niepełnosprawność w populacji polskiej – problem społeczny i ekonomiczny. *Zdrowie Publiczne* 116(4), 631-635.

[http://amnesty.org.pl/uploads/media/Powszechna\\_Deklaracja\\_Praw\\_Czlowieka\\_01.pdf](http://amnesty.org.pl/uploads/media/Powszechna_Deklaracja_Praw_Czlowieka_01.pdf)

[http://libproxy.up.krakow.pl/~biblio/plikownia/pdf/kossewska\\_01.pdf](http://libproxy.up.krakow.pl/~biblio/plikownia/pdf/kossewska_01.pdf)

[www.niepelnosprawni.gov.pl/niepelnosprawnosc-w-liczbach-/dane-demograficzne/](http://www.niepelnosprawni.gov.pl/niepelnosprawnosc-w-liczbach-/dane-demograficzne/)

## TERAPIE EKSPERYMENTALNE W URAZACH RDZENIA KRĘGOWEGO

Jarosław Hoffman<sup>1,2</sup>, Anetta Hoffman<sup>3</sup>, Maciej Śniegocki<sup>3</sup>,  
Maciej Lewandowski, Kamila Woźniak<sup>3</sup>, Monika Kuczma<sup>4</sup>

### 1. WSTĘP

Uszkodzenia rdzenia kręgowego są jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności, które dotyczą najczęściej osób młodych i zdrowych fizycznie. Występowanie uszkodzeń kręgosłupa z towarzyszącym urazem rdzenia kręgowego szacuje się średnio na 25-35 osób na 1 milion w populacji, z czego 80-85% dotyczy mężczyźni. W Polsce odnotowuje się około 700 takich przypadków rocznie. Do najczęstszych przyczyn urazu kręgosłupa zalicza się kolejno wypadki komunikacyjne, skoki do wody, upadki z wysokości oraz urazy sportowe, rzadziej bezpośrednie zranienia kręgosłupa i rdzenia, takie jak postrzały i rany klute [Smętek i Sordyl 2012, Lipiec i in. 2013, Lis i in. 2013].

Rdzeń kręgowy jest delikatną strukturą – zbudowany jest z milionów komórek nerwowych i włókien nerwowych, które przekazują sygnały z mózgu do pozostałych części ciała. Wzdłuż rdzenia kręgowego przekazywane są informacje w postaci impulsów elektrycznych, dzięki którym można siedzieć, chodzić, biegać czy oddychać. Kiedy dochodzi do uszkodzenia rdzenia kręgowego komórki ulegają zniszczeniu, obszar uszkodzenia zaczyna obejmować coraz więcej rodzajów komórek, a przepływ informacji pomiędzy mózgiem a rdzeniem kręgowym zostaje zablokowany [Błaszczyk 2000].

Po urazie rdzenia kręgowego organizm nie jest w stanie odbudować uszkodzonych komórek, powstaje blizna, a jego działanie zostaje trwale upośledzone. Leczenie urazów rdzenia kręgowego stwarza wiele trudności terapeutycznych, a obecny stan wiedzy medycznej pozwala na prowadzenie terapii, która ma na celu ograniczenie konsekwencji urazu rdzenia. Właściwa opieka medyczna natychmiast po urazie może pomóc zminimalizować uszkodzenia komórek nerwowych, a rehabilitacja może pomóc pacjentom odzyskać niezależność [Lis i in. 2013].

Następstwem urazu jest całkowite lub częściowe uszkodzenia rdzenia kręgowego. Objawy kliniczne zależą od rozległości uszkodzenia oraz odcinka kręgosłupa, gdzie doszło do urazu. Charakter i lokalizacja urazu rdzenia wywołuje odmienne zespoły neurologiczne. Całkowitemu uszkodzeniu rdzenia kręgowego towarzyszy stan zniesienia wszelkich fizjologicznych funkcji poniżej miejsca, w którym nastąpił uraz, objawy zazwyczaj są już nieodwracalne. W przypadku niekompletnego urazu rdzenia kręgowego występują różne zespoły objawów, które zależą od stopnia, lokalizacji i rozległości uszkodzenia rdzenia kręgowego [Burt 2004, Fehlings 2005, Harrop i in. 2006, Pickett i in. 2006, Finnerup i in. 2009].

---

<sup>1</sup> Wyższa Szkoła Zarządzania w Gdańsku, Wydział Fizjoterapii i Nauk o Zdrowiu, ul. Pelplińska 7, 80-335 Gdańsk, e-mail: jhoffman@o2.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszcz, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

<sup>3</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszcz, Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

<sup>4</sup> Zamiejscowy Wydział Kultury Fizycznej w Gorzowie Wlkp., Zakład Fizjoterapii Klinicznej

Tkanka nerwowa ma zróżnicowaną budowę i pełni szereg funkcji w całym układzie nerwowym. Drogi nerwowe rdzenia kręgowego tworzą dwukierunkowy system komunikacji. Wstępujące drogi przewodzą impulsy oraz wrażenia czuciowe z narządów obwodowych do mózgu, natomiast zstępujące drogi przewodzą impulsy ruchowe z mózgu do narządów obwodowych. Włókna nerwowe są charakterystyczne dla unerwianego obszaru i przekazywanej informacji nerwowej. W przeszłości utrata funkcji motorycznych i czucia po urazie rdzenia kręgowego uważane były za nieuleczalne ze względu na brak możliwości regeneracji komórek nerwowych ośrodkowego układu nerwowego [Gruener i Biller 2008, Lis i in. 2013]. Leczenie jest bardzo trudne z uwagi na występowanie w strukturze rdzenia kręgowego licznych czynników spowalniających lub w znaczny sposób ograniczających odbudowę komórek nerwowych. W ostatnim czasie liczne badania potwierdziły ich zdolność do samoregeneracji (neurogeneza). Regeneracja zniszczonej tkanki nerwowej jest procesem złożonym i przebiegającym wolno.

Mechanizmy, które regulują procesy regeneracji układu nerwowego w następstwie urazu, są obiektem zainteresowania neurobiologów od ponad 100 lat. Liczne eksperymenty badawcze przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały dużą złożoność zagadnień związanych z przeżyciem i regeneracją neuronów [Hulsebosch 2002, Rosingnal i in. 2007, Lis i in. 2013].

Przerwanie włókien nerwowych skutkuje całkowitą degeneracją obwodowego odcinka nerwu. Nasilenie zmian degeneracyjnych jest zależne od rodzaju włókna nerwowego i odległości od miejsca uszkodzenia. Patofizjologia uszkodzenia rdzenia kręgowego jest rezultatem występującego po sobie urazu pierwotnego i wtórnego. Pierwotne uszkodzenia, powstające w trakcie mechanicznego urazu rdzenia kręgowego, są zmianami patologicznymi o podłożu biochemicznym, narastającymi kaskadowo i wzajemnie się wzmacniającymi, powodując dalszą destrukcję rdzenia kręgowego. W procesie degeneracyjnym na pierwszym etapie dochodzi do rozpadu osłonki mielinowej, zaniku podstawowych składników lipidowych mieliny, a następnie oczyszczania z resztek przez komórki Schwanna oraz przez napływające w miejsce uszkodzenia makrofagi i granulocyty. Uraz rdzenia kręgowego może spowodować również natychmiastową śmierć komórek nerwowych oraz zakłócić dopływ krwi do miejsca uszkodzenia. W obrębie rdzenia kręgowego jednym z głównych czynników hamujących regenerację jest tworzenie się blizny gleyowej, składającej się głównie z nadaktywnych astrocytów i fibroblastów wraz ze związkami inhibitującymi wzrost aksonów nerwu, co stanowi barierę fizykochemiczną dla efektywnej regeneracji nerwów [Lis i in. 2013, Woszczycka-Korczyńska i in. 2013].

## 2. TERAPIE EKSPERYMENTALNE

Współczesny postęp naukowy w medycynie, biologii, a zwłaszcza w neurochirurgii, hodowli komórkowej i inżynierii tkankowej, daje możliwości rozwoju nowych terapii wspomagających leczenie następstw urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego i przeciwdziałających dalszym procesom neurodegeneracyjnym.

Liczne badania prowadzone na całym świecie w ośrodkach naukowych wykazały różnorodność mechanizmów, które są odpowiedzialne za pobudzanie i hamowanie procesów zachodzących w tkance nerwowej po urazie rdzenia kręgowego. Naukowcy prześcigają się w próbach opracowania nowych metod leczenia urazów rdzenia kręgowego, które pokonałyby ograniczenia regeneracji tkankowej w ośrodkowym układzie nerwowym i pozwoliły na przywrócenie sprawności. Większość terapii jest na etapie prób kli-

nicznych, które wymagają przeprowadzenia wielu analiz, żeby mogły zostać wprowadzone do wykorzystania klinicznego [Batchelor i Howells 2003, Dietz i Curt 2006, Lis i in. 2013].

## 2.1. Elektryczna stymulacja

Raport opublikowany w czasopiśmie „Brain” donosi o możliwościach otwierania się rdzenia kręgowego stymulowanego energią elektryczną na nowe informacje płynące z mózgu. Eksperci uważają, że może się to okazać nowym sposobem leczenia urazów kręgosłupa.

Rdzeń kręgowy funkcjonuje jak linia kolejowa dużych prędkości, przewodząca impulsy elektryczne z mózgu do pozostałych części ciała. Jeśli tor zostanie uszkodzony, informacja nie zostanie dostarczona ani informacja czuciowa nie zostanie odebrana w mózgu. Osoby z uszkodzeniami kręgosłupa są narażone na utratę czucia poniżej miejsca urazu. Pomimo urazu część sygnałów elektrycznych z mózgu nadal płynie przez uszkodzony rdzeń, ale nie są one na tyle silne, aby wywołać ruch kończyn. Pionierskie badania nad elektryczną zewnątrzoponową stymulacją pacjentów przeprowadził zespół naukowców z Uniwersytetu Louisville i Uniwersytetu California. Zabieg polega na wszczepieniu specjalnego urządzenia elektrostymulującego, które przekazuje impulsy elektryczne do pęczków włókien nerwowych odchodzących od lędźwiowego odcinka kręgosłupa. Prąd jest o zmiennej częstotliwości i intensywności. Elektryczne impulsy stymulujące wysyłane są do rdzenia kręgowego, w prawidłowym układzie wysyłane są one przez mózg i sprawiają, że dolne partie rdzenia kręgowego są mocniej pobudzane i mogą reagować na sygnały płynące z mózgu [Angeli i in. 2014].

Harkema i wsp. w 2011 roku przeprowadzili eksperyment na amerykańskim sportowcu sparaliżowanym od klatki piersiowej w dół, który dzięki stymulacji elektrycznej i przy odpowiednim intensywnym treningu w staniu i intensywnym chodzeniu na bieżni był w stanie wykonać dowolny ruch kończynami dolnymi. Podobnemu eksperymentowi poddano trzech innych pacjentów sparaliżowanych przynajmniej od dwóch lat. Dzięki eksperymentowi uczestnicy badania odzyskali część możliwości ruchowych, a trzech z nich mogło kontrolować nasilenie ruchu. Badanie to potwierdziło, że zdolność motoryczna sparaliżowanych uprzednio kończyn może zostać przywrócona [Harkema i in. 2011].

Naukowcy nie mają pewności, w jaki sposób elektryczna stymulacja rdzenia wpływa na możliwości wykonania ruchów kończynami. Są opinie, że niektóre elektryczne impulsy napotykają na przeszkody i dlatego nie mają dostatecznej siły do wywołania ruchu. Stymulacja elektryczna dolnych partii rdzenia kręgowego sprawia, że jest on bardziej pobudzony i może prawidłowo odpowiadać na sygnały wysyłane przez mózg. Wyniki przeprowadzonych badań dają szansę pacjentom, którzy zachowali chociażby niewielką część czucia, na przywrócenie kontroli ruchu w wyniku stymulacji elektronicznej rdzenia. Metoda stymulacji elektrycznej znajduje zastosowanie również u pacjentów z tzw. urazem rdzenia, u których nastąpił całkowity zanik mięśni i czucia z dotychczas niewielką szansą na poprawę stanu po urazie rdzenia kręgowego. Mogą oni skorzystać z tej metody leczenia [Angeli i in 2014]. Obecnie nie ma jednoznacznych dowodów na to, że terapia będzie efektywna wśród większej liczby pacjentów, ale daje ogromne nadzieje osobom sparaliżowanym na możliwość zastosowania tej metody w przyszłości i przywrócenie utraconych funkcji motorycznych [www.tewtraplegia.pl].

## 2.2. Przeszczepy komórek

Wiele komórek zostało już zbadanych jako materiał stosowany do przeszczepów. Należą do nich komórki macierzyste, komórki glejowe promieniowe, astrocyty strefy okołokomorowej, komórki osłonowe drogi węchowej, komórki Schwanna i komórki prekursorowe oligodendrocytów [Tuszyński i in. 1998, Doetsch i in. 1999, Franklin i Barnett 2000, Horner i Gage 2000, Raisman 2001, Campbell i Gotz 2002, Barnett i Riddell 2004, Smętek i Sordyl 2012].

### 2.2.1. Komórki węchowe – glejowe

Komórki glejowe wypełniają przestrzeń pomiędzy komórkami nerwowymi, chronią je i pomagają w odżywianiu. Występują zarówno w mózgu, jak też w nerwach obwodowych i rdzeniu kręgowym. Glejowe komórki węchowe w błonie śluzowej ludzkiego nosa mają ogromne możliwości regeneracyjne. Odpowiadają za naprawę nabłonka węchowego, który może ulec zniszczeniu na przykład z powodu silnego kataru, oparzeń górnych dróg oddechowych czy wdychania trujących substancji. Dzięki niezwyklej zdolności regeneracyjnej tych komórek nie musimy się obawiać, że stracimy węch na całe życie, bo po pewnym czasie sprawią one, że znowu poczujemy zapachy. Takiej zdolności nie mają ani komórki siatkówki, dlatego tracimy wzrok, ani włókna nerwowe rdzenia kręgowego, dlatego uszkodzenia rdzenia są trwałe [Barnett i Riddell 2004, 2007].

Komórki osłonkowe drogi węchowej (ang. *olfactory ensheathing cells*, OECs), będące składową mikrogleju, wydzielają szereg czynników neurotroficznych, które wykazują działanie neuroprotektoryjne. Komórki do przeszczepów pozyskiwane są z opuszki węchowej (bOECs) przezczaszkowo, ma ona większy potencjał regeneracyjny. Ostatnie doniesienia podają, że można je wyizolować również z materiału biopsyjnego śluzówki nosa (mOECs). Badania *in vitro* sugerują, że zarówno bOECs, jak i mOECs jednakowo wzmagają przeżywalność i regenerację komórek. Daje to szansę na pozyskiwanie materiału mniej inwazyjną metodą. Pobrany materiał zostaje przeniesiony do laboratorium, gdzie komórki glejowe są izolowane i odpowiednio przygotowane do namnażania. Gdy odpowiednia ilość komórek zostanie wyhodowana, wykonuje się zabieg wstrzyknięcia komórek glejowych małymi porcjami poniżej i powyżej miejsca uszkodzenia rdzenia kręgowego [Barnett i Riddell 2004, Dai i in. 2010, Johnson i in. 2011, Garcia-Escudero i in. 2012].

Liczne badania z udziałem zwierząt wykazały unikalną właściwość komórek węchowych do regeneracji uszkodzonych aksonów nerwów w rdzeniu kręgowym. Pierwsze doświadczenia z udziałem zwierząt przeprowadzono już w latach 90. w Hiszpanii i Portugalii. Eksperyment wykonany na szczurze, któremu najpierw przecięto rdzeń kręgowy, a później poddano go doświadczalnej terapii polegającej na przeszczepie komórek węchowych zakończył się ogromnym sukcesem. Szczur odzyskał władzę w łapach i bez problemu mógł wspinać się po metalowej siatce. Inne zwierzę kontrolne, któremu nie poddano komórek węchowych, nie odzyskało możliwości ruchowych w tylnych łapach. Analogiczne badania z udziałem zwierząt przeprowadzili wrocławscy lekarze, którzy chcieli przeanalizować, czy ta metoda jest bezpieczna. Doświadczenia wykazały, że u żadnego z badanych zwierząt nie wystąpiły objawy uboczne lub niepożądane, zatem można było przystąpić do leczenia ludzi [Barnett i Riddell 2004, Jarundowicz i in. 2004].



W I fazie doświadczeń klinicznych oceniano bezpieczeństwo i możliwość przeszczepiania autologicznych komórek węchowych ze śluzówki nosa i węchowe fibroblasty nerwowe u pacjentów z całkowitym uszkodzeniem rdzenia kręgowego. Jeden z pierwszych takich zabiegów na świecie na człowieku przeprowadził w sierpniu 2008 roku zespół prof. dr. Włodzimierza Jarmundowicza z wrocławskiej Kliniki Neurochirurgii Akademii Medycznej. Kwalifikacja kandydatów do zabiegu odbywała się według ścisłych kryteriów. Musiały to być osoby młode, u których do urazu rdzenia doszło nie wcześniej niż przed kilku laty. Ze względu na niezbędność przeprowadzenia intensywnej rehabilitacji przed zabiegiem i po jego przeprowadzeniu uczestnicy musieli być sprawni fizycznie. Dotychczas przeszczep komórek węchowych przeprowadzono u 3 pacjentów. Grupę kontrolną stanowiło 3 pacjentów, u których zastosowano tylko neuror rehabilitację bez leczenia operacyjnego. Po roku obserwacji u żadnego z pacjentów nie wystąpiły objawy niepożądane. Badania neurofizjologiczne wykazały poprawę w transmisji sygnału w rdzeniu kręgowym i aktywności mięśni kończyn dolnych u pacjentów z przeszczepem komórek węchowych. Wyniki są obiecujące, ale nadal jest to metoda eksperymentalna, więc na efekty trzeba będzie jeszcze poczekać. Niewątpliwie transplantacja glejowych komórek węchowych może mieć zastosowanie w przyszłości, jednak aby ocenić skuteczność tej metody, należy przeprowadzić dodatkowe badania na większej liczbie pacjentów [Raisman 2001, Barnett i Riddell 2004, Lipiec i in. 2013, Tabakow i in. 2013].

### 2.2.2. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste nazywane są „matkami” tkanek i narządów. Określenie to zawdzięczają swoim plastycznym zdolnościom do transróżnicowania. Komórka macierzysta to komórka mająca zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się w dowolne komórki potomne. Jest to jednak duże uproszczenie, bo właściwości i możliwości komórek wykraczają znacznie poza ich rozmnażanie. Mają ogromne zdolności komunikacyjne, pozwalające na rozpoznawanie tkanki, w której się znajdują oraz stanu środowiska, do którego zostały podane. Technologie umożliwiają pozyskiwanie i optymalizowanie komórek macierzystych oraz pozwalają na ich wykorzystanie w celach klinicznych, czego efektem jest trwale zdrowie i długowieczność. Komórki macierzyste mają duży potencjał w zakresie terapii urazów rdzenia kręgowego. Naukowcy pracują nad sposobami wykorzystania komórek macierzystych do naprawy rdzenia kręgowego, korzystając z odkryć poczynionych na podstawie prowadzonych licznych badań z udziałem zwierząt [Domańska-Janik 2004, Panchision 2006].

Badania przeprowadzone z udziałem zwierząt wykazały, że przeszczep komórek macierzystych lub komórek pochodzących od komórek macierzystych może przyczynić się do odbudowy rdzenia kręgowego. Różne typy komórek prekursorowych (w tym nerwowych komórek macierzystych, zarodkowych komórek macierzystych pochodzących z nerwowych komórek progenitorowych i komórek macierzystych zrębu szpiku kostnego) wykazują silne właściwości immunomodulacyjne i neurotropowe, zmniejszają szkodliwą ostrą reakcję zapalną i stwarzają dobre warunki do regeneracji aksonu po urazie rdzenia. Liczne badania wykazały, że komórki prekursorowe wykazują właściwości terapeutyczne dzięki wielu mechanizmom, między innymi przez produkcję dużej ilości neurotroficznych czynników wzrostu, wzmagają regenerację aksonów, indukcję metaloproteinazy macierzy, które degradują macierz zewnątrzkomórkową i powierzchni nie komórek cząsteczek, hamują regenerację aksonów, umożliwiając w ten sposób prze-

chodzenie aksonom przez blizny glejowe. Poza tym komórki te wpływają korzystnie na stymulowanie angiogenezy w uszkodzonej tkance, która zapewnia troficzne wsparcie oraz właściwą przebudowę tkanki nerwowej, aby umożliwić regenerację aksonów wzdłuż długich odcinków włókna oraz wzrost remielinizacji w miejscu uszkodzenia. We wszystkich tych strategiach terapia komórkowa ma na celu przede wszystkim wspieranie endogenicznych procesów naprawczych w celu poprawy funkcji motorycznych [Tamir Ben-Hur 2010].

Naukowcy opracowując terapię komórkami macierzystymi, która pomaga osobom z urazami kręgosłupa, spodziewają się, że po wszczepieniu komórek w miejsce uszkodzonego rdzenia kręgowego mogą przywrócić działanie sieci nerwowej przekazującej informacje w organizmie. Dużym zainteresowaniem naukowców cieszy się metoda przeszczepiania komórek macierzystych w część rdzenia kręgowego, która uległa uszkodzeniu krótko po urazie, mogłyby to zabezpieczyć komórki w miejscu urazu przed dalszym obumieraniem, dzięki uwolnieniu substancji zabezpieczających.

Naukowcy z amerykańskiej firmy Geron pobrali komórki z ludzkiego zarodka, który uzyskali z kliniki leczenia bezpłodności. Komórki zostały poddane odpowiednim procesom rozmnażania i przygotowania w laboratorium. Pierwsze eksperymenty przeprowadzono z udziałem zwierząt. Testom poddano 2 tys. gryzoni z uszkodzonym rdzeniem kręgowym. Rezultaty okazały się zadziwiające. Myszy i szczury odzyskały władze w tylnych łapkach, które wcześniej były całkowicie sparaliżowane. Pierwsze testy na ochotnikach miał charakter wstępny, którego celem jest wykazanie, czy ludzki organizm przyjmie przeszczep bez szkodliwych skutków ubocznych. Miliony komórek zostały wszczepione w rdzeń kręgowy dokładnie w miejscu uszkodzenia, u pacjenta, u którego nie doszło do całkowitego przerwania. W ten sposób można leczyć tylko takie uszkodzenia rdzenia kręgowego, które nastąpiły najwyżej przed kilkoma tygodniami, ponieważ później w miejscu urazu tworzy się tkanka bliznowata uniemożliwiająca regenerację neuronów. Z uwagi na wstępny charakter testu pacjent otrzymał zbyt małą dawkę komórek, aby doszło do wyleczenia [Kęciek 2010].

Testy kliniczne z preparatami uzyskanymi z komórek macierzystych przeprowadził również zespół doktora Armina Curta ze Szpitala Uniwersyteckiego Balgrist w Zurychu. Trzej pacjenci uzyskali czucie poniżej miejsca urazu rdzenia, złamanie kręgosłupa nie musi oznaczać urazu rdzenia. Uczestnicy badania otrzymywali zastrzyki z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych bezpośrednio w miejsce złamania kręgosłupa. U pacjentów zaobserwowano reakcje na lekkie bodźce, takie jak dotyk, ciepło i impulsy elektryczne. W żadnym z eksperymentów nie udało się uzyskać więcej niż częściowego odzyskania utraconych funkcji, ale jest to dziedzina badań, która nieustannie się rozwija, cały czas testowane są i modyfikowane różne rodzaje komórek macierzystych [Lo i Parham 2009, Kęciek 2010, Moreno-Flores 2013, Woszczycka-Korczyńska i in. 2013].

### 3. WNIOSKI

Wszystkie kierunki badań nad regeneracją rdzenia kręgowego są obiecujące. Naukowcy zastrzegają, że to dopiero początek prac nad nową terapią, zatem sparaliżowani pacjenci muszą się uzbroić w cierpliwość. Liczne badania wykazały, że za odbudowę tkanki nerwowej odpowiada wiele czynników jednocześnie. Są to złożone mechanizmy, które muszą być w pełni zrozumiałe, aby rozwiązać problem uszkodzeń rdzenia kręgowego. Działając tylko na jeden z mechanizmów, nie uzyska się pełnych szans na całko-

witą odbudowę tkanki nerwowej. Przyszłościowe strategie mają na celu stworzenie środowiska umożliwiającego ukierunkowaną regenerację aksonów dla przywrócenia odpowiednich połączeń w rdzeniu kręgowym. Rozwiązaniem przyszłości, które budzi nadzieję, jest połączenie różnych metod terapii zarówno tych oddziałujących na poziomie molekularnym, jak i działających na całym obszarze tkanki nerwowej. Przeszczepy komórek w połączeniu z wszczepianiem elektrostymulatorów lub materiałów wspomagających regenerację uszkodzonego rdzenia kręgowego będą dominującym przedmiotem badań w najbliższym czasie.

## LITERATURA

Angeli C., Edgerton R., Gerasimenko Y., 2014. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain* 137, 1394-1409.

Barnett S.C., Riddell J.S., 2004. Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. *J. Anat.* 204, 57-67.

Barnett S.C., Riddell J.S., 2007. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair – what can it achieve? *Nature Reviews Neurology* 3, 152-161.

Batchelor P.E., Howells D.W., 2003. CNS regeneration: clinical possibility or basic science fantasy? Review, *J. Clinical Neuroscience* 10(5), 523-534.

Błaszczak J., 2000. *Biomechanika Kliniczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

Burt A.A., 2004. The epidemiology, natural history and prognosis of spinal cord injury. Mini-Symposium: Spinal Trauma, *Current Orthopaedics* 18, 26-32.

Campbell K., Gotz M., 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosc.* 25, 235-238.

Dai C., Qin Yin Z., Li Y., 2010. Survival of retinal ganglion cells in slice culture provides a rapid screen for olfactory ensheathing cell preparations. *Brain Res.* 1354, 40-46.

Dietz V., Curt A., 2006. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. Review, *Lancet Neurol.* 5, 688-694.

Doetsch F., Caille I., Lim D.A., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Domańska-Janik K., 2004. Perspektywy zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych w chorobach centralnego układu nerwowego. *Nauka* 2, 17-26.

Franklin R.J., Barnett S.C., 2000. Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration – the sweet smell of success? *Neuron* 28, 1-4.

Fehlings M.G., Baptiste D.C., 2005. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury International Journal of the Care of the Injured* 36, 113-122.

Finnerup N.B., Baastrop C., Jensen T.S., 2009. Neuropathic pain following spinal cord injury: mechanisms and treatment. *Scandinavian J. Pain* 1, 3-11.

- Garcia-Escudero V., Garcia-Gomez A., Langa E., 2012. Patient-derived olfactory mucosa cells but not lung or skin fibroblasts mediate axonal regeneration of retinal ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 509, 27-32.
- Gruener G., Biller J., 2008. Spinal Cord Anatomy, Localization, and Overview of Spinal Cord Syndromes. *Continuum: Lifelong Learning Neurol.* 14(3), 11-35.
- Harkema S., Gerasimenko Y., Hodes J., 2011. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *The Lancet* 377, 1938-1947.
- Harrop J.S., Sharan A., Rafliff J., 2006. Central cord injury; pathophysiology, management, and outcomes. *The Spine J.* 6, 198-206.
- Horner P.J., Gage F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963-970.
- Hulsebosch C.E., 2002. Recent advance in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education* 26, 238-255.
- Jarmundowicz W., Tabakow P., Czapiga B., 2004. Olfactory glial cells: hope in the treatment of spinal cord injuries. *Neurol Neurochir Pol.* 38(5), 413-20.
- Johnson T.V., Bull N.D., Martin K.R., 2011. Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Exp. Eye. Res.* 93, 196-203.
- Kęciek K., 2010. Eksperymenty na komórkach macierzystych. *Przegląd* 48.
- Lipiec J., Kulczyk A., Huber J., 2013. Znaczenie diagnostyczne przezczaszkowej stymulacji magnetycznej u chorych po urazie rdzenia kręgowego. *Dysfunkcje narządów ruchu. Diagnostyka i Usprawnianie Pacjentów z Dysfunkcjami Narządów Ruchu* 4, 7-16.
- Lis A., Szarek D., Laska J., 2013. Strategie inżynierii biomateriałów dla regeneracji rdzenia kręgowego: aktualny stan wiedzy. *Polim. Med.* 43(2), 59-80.
- Lo B., Parham L., 2009. Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocr Rev.* 30(3), 204-213.
- Moreno-Flores M.T., Ferón F., Arvanian V., 2013. The 2nd Step by Step International Spinal Cord Repair Meeting – Combining research Step by Step into multi-pronged approaches for spinal cord repair. *J. Biomedical Science and Engineering* 6, 21-32.
- Panchision D.M., 2006. Repairing the Nervous System with Stem Cells. *Regenerative Medicine Chapter 3. Department of Health and Human Services.*
- Pickett G.E., Campos-Benitez M., Keller J., 2006. Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Canada, *Spine* 31(7), 799-805.
- Raisman G., 2001. Olfactory ensheathing cells – another miracle cure for spinal cord injury? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 369-375.
- Rossingnal S., Schwab M., Schwartz M., Fehlings G., 2007 Spinal Cord Injury: Time to Move? *J. of Neuroscience* 27, 11782-11792.

Smętek J., Sordyl R., 2012. Metoda podawania predegenerowanych komórek Schwanna do płynu mózgowo-rdzeniowego w urazach rdzenia kręgowego u szczurów. *Ann. Acad. Med. Siles.* 66(1), 35-42.

Tabakow P., Jarmundowicz W., Czapiga B., 2013. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 22(9), 1591-612.

Tamir Ben-Hur., 2010. Reconstructing neural circuits using transplanted neural stem cells in the injured spinal cord. *J. Clin. Invest.* Sep. 120(9), 3096-3098.

Tuszynski M.H., Weidner N, McCormack M., 1998. Grafts of genetically modified Schwann cells to the spinal cord: survival, axon growth, and myelination. *Cell Transplantation* 7, 187-196.

Woszczycka-Korczyńska I., Olakowska E., Marcol W., 2013. Komórki Schwanna w terapii uszkodzeń rdzenia kręgowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 67, 680-689.

[www.nhs.uk](http://www.nhs.uk) Hope and hype: An analysis of stem cells in media.

[www.tertraplegia.pl](http://www.tertraplegia.pl)



# THE RELATIONSHIP BETWEEN ENVIRONMENTAL FACTORS AND THE MUTATIONS IN THE AZF REGION OF Y CHROMOSOME IN SUBFERTILE MEN

Ewelina Kijewska<sup>1</sup>, Piotr Kamiński, Agnieszka Adamczuk

## 1. INTRODUCTION

Results of many experiments are pointing at progressing lowering number of spermatozoa in the semen of men and the fall of general condition of semen [Wołczyński *et al.* 2002]. The condition of human health, including reproductive potential, is correlated with environment. Xenobiotics can accumulate in the cells of plants and animals, and get into the human body through the trophic chain. Increased concentrations of heavy metals may lead to increased oxidative processes, cause damage to DNA and inhibit the process of its repairing. Because the epithelial cells of the gonads are particularly sensitive to changes in the biological process, spermatogenesis be incorrect or completely inhibited. Often – mentioned are deletions of DNA in AZF region of the Y chromosome (Azoospermia Factor), which can cause various kinds of disorders of sperm, depending on the amount and location.

### 1.1. Semen condition

The primary diagnostic tool in the evaluation of male fertility is semen analysis. Full analysis includes macroscopic and microscopic examination. In order to ensure the quality of the research, should be used a standardized protocol developed by the World Health Organization [WHO 2010]. Accurate assessment of the appearance of the ejaculate, combined with the determination of pH and degree of liquefaction, can help determine the source of a reduction in the reproductive potential. Macroscopic examination includes: ejaculate volume, pH, liquefaction time, color and smell [WHO 2010]. Macroscopic evaluation of the semen must be expanded by a study of its image under the microscope. Only on this basis it is possible to determine, whether the cause of non-pregnancy are disorders of the quantity or quality of sperm, and can become the basis for a more detailed tests (e.g. presence of antinuclear antibodies).

The concentration of sperm in a different ejaculates of the same man, may vary over time [Cooper 2010], because of an impact of physiological, environmental and psychological factors (size of the testicles, process of spermatogenesis, ionizing radiation, smoking, alcohol, medications, diet, stress) and earlier sexual activity (frequency relationship and masturbation). Sperm concentration below the reference value does not prejudice the impossibility of natural conception (except azoospermia), but only about a decrease in the probability [Kuczyński *et al.* 1997, Radwan 2006, WHO 2010]. Sperm motility is a prerequisite for natural fertilization. Sperm cells must penetrate the zona pellucida of the oocyte, by strong moves [Szczygieł and Kurpiszcz 2002, Radwan 2006]. Lack of sperm motility preclude natural conception. Morphology

---

<sup>1</sup> Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Department of Ecology and Environmental Protection, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: ewelina\_kijewska@tlen.pl

– according to WHO (2010), the study evaluated the structure of the head, the midpiece (neck and inset) and tail the sperm cell (the main part and final); [Bergier *et al.* 2010]. Defects of head can be correlated with changes in the structure of the cell membrane (preclude recognition and fusion of the sperm with the zona pellucida), abnormal sperm chromatin fragmentation and acrosome defects. Changes in tail and midpiece structure can cause abnormal sperm motility [Kuczyński *et al.* 1997, Szczygieł and Kurpisz 2002, Radwan 2006].

## **1.2. Causes of male reproductive disorders**

Natural male fertility depends on correct spermatogenesis, hormones activity, functioning of accessory glands and ability to ejaculation. Causes of male infertility, could divided into 3 groups: pre-testicular causes, testicular factors and post-testicular causes [Kuczyński *et al.* 1997]. All causes of infertility are the result of the presence of environmental, physiological and genetic factors, with varying degrees of impact and correlations.

## **1.3. Chemical elements**

Human sperm consists of spermatozoa and seminal plasma. Seminal plasma enables the transport of spermatozoa and protect male germ cells. Each of chemical elements is have a different role in the body, and every change in balance could cause serious consequences. Calcium, magnesium and other electrolytes are keeping the osmotic balance and participate in the transport of nutrients, however zinc and iron are participating in the oxidation processes and the reduction. Zinc and magnesium are stabilizers of cell membranes and they are coenzymes of peroxide dismutase, which prevents the detrimental action of the reactive oxygen species to spermatozoa [Crosignani 1996].

### **1.3.1. Zinc**

Zn is one of most important factors affecting the male sexuality. It is participating in almost all sexual processes- the metabolism of hormones, the forming of semen as well as the adjustment of the vitality of spermatozoa. A deficiency of this element causes decreased levels of testosterone and amount of semen, potency disorders, the reduced vitality of spermatozoa, not to say – the infertility [Zdrojewicz and Wiśniewska 2005]. Zinc is an antioxidant, so is playing very important role in the safeguard of spermatozoa against the attack by free radicals. The high content of this element in the semen reduces sperm activity, keeping it in a relatively calm, lower motility condition. This way enables to reduce the energy and oxygen consumption, which is necessary in the process of fertilization [Shengzi 1991]. Moreover, zinc has a protective role against high concentration of lead which it could cause disorders of the fertility [Skoczyńska *et al.* 2003].

### **1.3.2. Selenium**

Another element, which is very important to human health, is selenium. Low content of the selenium in the soil on some areas – also in Poland – has a close relationship with deficiency Se in the food, what is the cause of serious health problems



of many million people, living on these areas. The selenium is appearing in a high concentration in the semen and is playing an important role in sexual efficiency of men. Selenium is one of the elements of outer mitochondrial membrane of sperm cell and exerting influence on activity of spermatozoa [Hawkes and Turek 2001]. Badmaev and partners [1996] conducted research on 99 men, assigned to 3 groups. Group 1 consisted of 31 men with the lowered fertility but lived in the healthy environment, group 2 consisted of 25 men with the lowered fertility and exhibited to the long-term effect of gas, which contained the hydrogen sulphide, and the control group (43 fertile men). Before starting the treatment and upon completion of every course, semen was analysed. Men from groups 1 and 2 received 2 courses in the treatment with the selenium. Received results showed, that the selenium was effective in curing the lowered fertility. In addition, the therapeutic effect was higher in group 2 than in group 1.

### 1.3.3. Heavy metals

Negative influence on men reproductive potential have **heavy metals**. They are current in the natural environment, and their concentration grows along with the increase in the pollution. Cadmium is in air, water and the soil, in plants and tissues of animals. In nature, this is current in sulphide ores of zinc, copper or lead. Highest concentration in air we observed in industrial districts and cities. The first manifestations of chronic cadmium disorders are, among others, xerostomia, metallic aftertaste, lack of appetite, general weakness. Then cause disorders of the circulatory system and the infertility. Exposing on toxic cadmium cause- more than others- disturbance in the functioning of testicles. Mechanisms of the toxic influence of this element on testicles include damage to the vascular endothelium, Leydig and Sertolie's cells. As a result of the accumulation of cadmium, is also induction of the oxidizing stress and impairments of anty-oxidizable defence mechanisms and increasing the inflammatory response, leading for changes in the morphology and functioning of nuclei. A necrosis of seed ducts can be an effect of these changes and in consequences causes disorders of synthesis of testosterone and disadvantaging spermatogenesis. Short exposing to cadmium appears as increasing the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase and reductase (GPx, GR), what is indicating to the activation of defence mechanisms of cells [Bonda *et al.* 2007]. Cadmium is inducing also damaging the DNA (fragmentation of thread, mutations, chromosome aberrations); [Bertin *et al.* 2006, Filipic *et al.* 2006, Bonda *et al.* 2007] and hindering of DNA repair [Dally *et al.* 1997].

Particularly dangerous of heavy metals is **lead**. Natural explosions of volcanoes, wind erosion of rocks, fires of forests and steppes are his sources. However, anthropogenic emission of lead is over hundredfold bigger than natural emission. The main sources are processes of getting, smelting, purifying ores of lead and other non-ferrous metals, as well as at the manufacture of accumulators, cables, wires, paints, varnishes, glass and crystals. At men it is more and more often possible to connect identified impairment of the fertility with environmental and professional exposing to lead. The mechanisms of influence of lead on male gonads is complex and is based on influence on the spermatogenesissteroid genesisand damaging the vascular endothelium of gonads by the reactive oxygen species, triggering morphological changes (changes of mass of nuclei and seminal vesicles, limiting the population of germ cells as a result of the cellular apoptosis) and functional changes (impairment of the synthesis of testosterone); [Ahotupa *et al.* 1992]. Lead can influence on functions of Leydig cells,

disadvantaging of steroid genesis. In the end of that, the level of testosterone is dropping and quality of semen is lower. Phenomenon of the oxidizing stress in organs of lead poisoned animals is confirmed by the LPO high level (of peroxides of lipids) and TBARS [Ahotupa *et al.* 1992].

#### **1.4. Oxidation stress and enzymatic antioxidant enzyme system**

Sperm cells, as every other cell of the living organism, are able to producing reactive oxygens. Certain amounts of reactive oxygen metabolites, arising in physiological conditions in the respiratory chain, are essential to keep the correct function of spermatozoa. In consequence of overproduction of free radicals and/ or dysfunctions of compensating possibilities of the antioxidizable system in the semen, is achieving the oxidizing stress. In consequence it is leading to peroxidising changes in lipids of cell membranes of spermatozoa, adversely affecting the structure of membrane receptors, enzymatic and transport proteins and increasing level of the fragmentation of the sperm cell DNA [Galecka *et al.* 2008a, b, c]. For providing for the natural function of the system, an existence of the balance between the production and neutralisation of RFT is essential. Metabolic mechanisms are one of elements of such a system [Galecka *et al.* 2008b, c].

Antioxidant system consists of many elements, each cooperating with each other. Due to the particular sensitivity of sperm to the oxidizing effects of ROS, mammalian sperm is equipped with a variety of enzymes and enzymatic compounds. They are responsible for the neutralization of excess ROS – both in the seminal plasma and inside the sperm. Basic antioxidant enzyme system in sperm includes such enzymes, as: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase glutathione/glutathione reductase (GPx/GR) [Galecka *et al.* 2008a, b, c].

##### **1.4.1. Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1. 1)**

SOD showed direct relevance with activity and motility of spermatozoa. The addition of exogenous SOD to the suspension of spermatozoa, protected their vitality and considerably a fall lowered motilities in the time, through the inhibition of the destruction of biological membranes [Kobayashi *et al.* 1991]. However, other researchers haven't confirmed SOD influence on the quality of semen and the inseminating potential of spermatozoa [Zini *et al.* 1993, Hsieh *et al.* 2002].

##### **1.4.2. Catalase (CAT)**

CAT is recognised as the most effective enzymatic antioxidants of semen (EC 1.11.1. 6). Catalase is appearing both inside spermatozoa, as well as in seminal plasma [Soufir *et al.* 1989]. Activity of catalase is lower in semen of infertile patients with the motility disorder [Soufir *et al.* 1989, Siliciano *et al.* 2001].

##### **1.4.3. Glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GR)**

Another important enzymes, which protect sperm cells from toxic influence of reactive oxygen are GPx and GR. Activity of complex GPx/GR is high correlated with level of the selenium in the semen. Glutathione peroxidase protect spermatozoa from loss of motility, caused by spontaneous lipids peroxidation [Alvarez *et al.* 1989]. A lot

of researchers confirm the connection between peroxidation damaging of spermatozoa and male infertility [Sharma *et al.* 2001].

#### 1.4.4. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation is one of most important biological processes associated with RFT action. Main product of peroxydation of lipid component of cellular membranes and very good marker of this process, is malondialdehyde (MDA). The accumulation of these damaged molecules of lipids could cause lowering the fluidity of membranes, and the changes of structure of cellular membranes, which has a direct effect to their receptor and transport functions [Halliwell B. *et al.*, 1993]. MDA is cytotoxic and mutagenous and may cause cancers. For MDA detection, being used colourfull reaction between products of lipid peroxydation and tiobarbiturian acid (TBA); [Halliwelli, 1993].

#### 1.5. Genetic mutations

Accumulation of heavy metals in the body and influence of free radicals, in consequence can cause serious genetic defects. Mutations in genes involved in fertility, can cause the its disorder- e.g. SRY gene, which are responsible for sexual development in male direction, located on short shoulder of the Y chromosome (Yp11.2); [Ramkissoon and Goodfellow 1996, Harley *et al.* 2003]. It has been shown, that women with XY karyotype (diagnosed with mutations in the SRY gene deactivates, as the cause of sex reversal) had a complete gonadal dysgenesis (Swyer syndrome). This confirms the importance of the SRY gene at a very early stage of embryonic development. At the same time, however, only 15% of women with karyotype 46XY, SRY gene mutations is detected. It's show, that for male development other genes are needed. Region responsible for the proper conduct of spermatogenesis is mainly AZF (Azoospermia Factor), located on the long arm of the Y chromosome. Mutations in this region, depending on the type, location and amount, can cause a decrease in motility, decreased sperm count and the total absence of sperm as a result of a impairment of Sertoli cells [Pryor *et al.* 1997, Krausz and McElreavey 1999]. Complete AZFc region consists of eight gene families (of which 5 is expressed only in the testis): CSPG4LY, GOLGA2LY, TTTY3, TTTY4 and TTTY17, three copies of BPY2, two copies CDY1 and four copies of DAZ family [Tiepolo and Zuffardi 1976, McElreavey *et al.* 2000, Kuroda-Kawaguchi *et al.* 2001, Ali and Hasnain 2002]. Complete deletion of the region AZFc, as well as partial deletion of it, can cause significant reduction in semen parameters, but not complete suppression of sperm production (as in the case of mutations in the regions AZFa and AZFb) – which corresponds to the majority of our patients. Partial deletions are most common exactly in AZFc region [Mitra *et al.* 2008].

It isn't possible exactly to say, which genetic and environmental factor have the biggest influence to the fertility of the man. We wanted to examine, if there's any relationship between environmental factors and AZF Y mutations in subfertile men.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Material

The study involved 124 men, who volunteered to points of medical diagnostics and medical practices to seminological examination. Based on this, patients were divided into two groups:

- the control group (A) – 41 men, corresponds with WHO standards (2010) in terms of sperm parameters
- group of patients (B) – 83 men with abnormalities in any of the semen parameters (with respect to the reference values from WHO, 2010).

The health status of men was verified, based on filled questionnaire. Questions included: age, place of living, life – style (as diet and exercise, exposure to radiation, chemicals, smoking, drinking alcohol, taking drugs) – diseases, illness occurring in the family. Both groups were subjected to the same tests.

### 2.2. Analyses

- seminological examination,
- research of activity of antioxidant enzymes and the amount of MDA,
- determination of concentrations of selected chemical elements – Zn, Se, Cd, Pb,
- molecular analyses.

#### 2.2.1. Analyse of sperm condition

Macroscopic evaluation: volume of ejaculate, liquefaction time, pH, color.

Microscopic evaluation: sperm concentration, motility and morphology. Semen parameters were compared with reference values, established by WHO [2010]. Based on the seminological analysis, patients were qualified to control or experimental groups.

The material for further studies, frozen and stored at -80°C.

#### 2.2.2. Tests of antioxidant mechanisms intensity

Antioxidant enzyme activity (SOD, CAT, GPx, GR) and the intensity of lipoperoxidation (amount of MDA) were analysed, using standardized kits of Cayman Chemical Co. To determine these parameters, seminal plasma was used. Ejaculate was centrifuged at 300-400xg for 5 minutes.

##### 2.2.2.1. The activity of superoxide dismutase

SOD in the seminal plasma of was examined, using standardized protocol of Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Co.). This method uses the tetrazolium salt, which – in complex with free radicals- appears in red color. This method allows the determination of the total activity of SOD. Superoxide dismutase activity was calculated from the standard curve (standards included) and expressed in  $U \cdot ml^{-1}$ .

#### 2.2.2.2. Catalase activity

CAT activity was determined using a standardized protocol of Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Co.). This method is based on the reaction of catalase with methanol in the presence of a suitable amount of hydrogen peroxide. Thus resulting formaldehyde reacts with the chromogen, and its concentration is determined spectrophotometrically. Catalase activity was calculated from the standard curve (standards included) and expressed in  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}$ .

#### 2.2.2.3. The activity of GPx and GR remains of closely interrelated

Because of that, material has been tested in the direction of determining the activity of both enzymes, used standardized protocol of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Assay Kits (Cayman Chemical Co.). The methods are based on measuring the rate of oxidation of NADPH. The activity of glutathione peroxidase and reductase presented as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}$ .

### 2.2.3. Concentration of chemical elements

Analysis of the concentration of Zn, Se, Cd and Pb was performed using a highly selective and sensitive spectrometry ICP-MS. This is the most modern and highly sensitive method allowing the determination of the concentration of many chemical elements in small amounts.

First step for concentration analysis was mineralization in a vacuum system, using the apparatus, type Berghof Co. MWS-2.

The material was evaporated to dryness by placing the tubes in mineraliser at 180 to 200°C. After evaporation, the tube was placed in an oven at 480°C for 14 hours. Then, added 3 ml of 65% nitric acid to each sample. The tubes were mixed and placed in a heating block, preheated to a temperature of 200°C for 2 hours. After mineralisation, the solution was diluted with water and transferred to a polyethylene tubes. Analyses of concentration of selected chemical elements were performed by mass spectrometry with inductively coupled plasma induction, using the ICP-MS Agilent 7500C. All tests were made in relation to the internal standard, in order to maintain stability of the apparatus and to minimize the effects of the matrix.

### 2.2.4. Molecular studies

Molecular tests were realized with PCR. The primers used for the reaction were taken from the literature and tested for specificity in the NCBI database.

#### 2.2.4.1. DNA isolation

DNA was isolated from semen using a standard protocol of isolation kit („Sherlock AX”, A&A Biotechnology). Prior to the isolation of DNA, the material had to be lysed. The Eppendorf tube was collected 300  $\mu\text{l}$  of semen. In the case of smaller quantities of semen, was added sterile water to a volume of 300  $\mu\text{l}$ . Then were added: 300  $\mu\text{l}$  of Lysis Buffer L 1.4, 20  $\mu\text{l}$  solution of Proteinase K and 20  $\mu\text{l}$  of 1 M DTT. Samples were incubated at 50°C until complete digestion of the sample (70 to 80 min). The samples were stirred from time to time by vortexing. After incubation, the material was transferred to the column and further reagents were added, in accordance with the isolation protocol. DNA pellet was resuspended in TE buffer. Amount of buffer

was determined individually for each sample, according to the size of precipitate and was 35-50 ml.

Samples were incubated at room temperature and then, stored at -80°C, for further analyses.

#### 2.2.4.2. PCR method

In the present study were examined following deletions:

- AZFc microdeletion – the entire region,
- partial deletions gr/gr – loss of half of the AZFc region,
- partial deletions b2/b3 – loss 1,8Mpz of the region,
- partial deletion b1/b3 – its effects are still little known and require further investigation.

Molecular analysis was based on the presence or absence of genetic markers (STS); [Ferlin *et al.* 2007, Eloualid *et al.* 2012].

#### Used primers:

- sY1191 (NCBI accession number G73809),
- sY1291 (G72340),
- sY254 (G38349),
- sY255 (G65827).

Molecular analysis was conducted in two separate polymerase chain reactions (PCR duplex). According to literature data [Repping *et al.* 2002] and manufacturer's recommendations (Thermo Scientific), optimization of the reaction conditions was done. Based on these results, an own methodology of reactions was developed. In first reaction were used primers sY255 and sY254 (microdeletions of AZFc region). In secondo – primers sY1191 and sY1291 for detection of partial deletions.

The amplified fragments were separated by electrophoresis on an agarose gel, according to the own methodology:

- 1.5% percentage agarose gel – dissolved in 1 × TBE buffer at pH 7.8 with ethidium bromide (0.5 mg/ml).
- electrophoresis – 65 minutes at a voltage 90 V.

Detection of deletions, was based on image of the amplicons on agarose gel. Lack of amplification products was correlated with presence of a suitable deletion [Ferlin *et al.* 2007, Eloualid *et al.* 2012]:

- AZFc microdeletion – no products for sY254 and sY255,
- partial deletions gr/gr – no product for sY1291,
- partial deletions b1/b3 – no products for sY1191 and sY1291,
- partial deletion b2/b3 – no product for sY1191.

#### 2.2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis ( $\alpha = 0.05$ ) were performed using STATISTICA 10.0 and Microsoft Office Excel 2010. As normality test, Shapiro-Wilk test was used, due to its high statistical power. To determine statistically significant differences between two groups (for quantitative data) for the independent variables that do not have a normal distribution, Mann Whitney U test was used. For qualitative variables,  $\chi^2$  test was used.

### 3. AIMS OF STUDY

- 1) Determine if changes in chemical elements balance in semen (Zn, Se, Cd, Pb), affects its condition.
- 2) Determine if there is a relationship between the semen condition and activity of antioxidation enzymes (SOD, CAT, GPx, GR) and amount of MDA.
- 3) Determine the effect of the AZFc mutations on the reproductive potential.
- 4) Establish a link between examined environmental factors and the presence of mutations.

### 4. RESULTS AND DISCUSSION

All men were of reproductive age. The average age of the control group (n = 38) was 29 years and 31 years B – group (n = 65). The median of these groups was 28 and 31 years.

Alcohol consumption below 150 g per week, and exposure to physical agents (e.g. X-rays), declared respectively 97% and 99% patients. Two men (1 in the control group and 1 from the group of patients) reported in a survey abstinence, while the next two (in the same configuration) – alcohol consumption above 150 g per week.

In the course of a comparative analysis has shown that the various groups were highly homogeneous in terms of place of living, smoking and exposure to the of heavy metals.

Comparative analysis showed that the place of living and smoking do not significantly affect the concentration of chemical elements in the semen (Zn, Se, Cd, Pb), activity of antioxidant enzymes or lipid peroxidation processes. Smoking is also not due to the existence of fertility problems, because the quantitative distribution of patients and healthy men in both groups was very similar.

Exposure to heavy metals does not float on the concentration of the chemical elements, the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation processes in semen.

In this study, was observed significant decrease in the amount of Zn in the semen of men with incorrect quality parameters of semen. In addition, we observed increase MDA amount, but these difference was not statistically significant. Zn plays an important role in the normal motility the process of capacitation [Henkel *et al.* 1999] and the acrosome reaction [Zdrojewicz and Wisniewska 2005]. Zinc is also an ingredient of ZnSOD, which is involved in protecting sperm from free radicals. Yuyan *et al.* [2008] research showed, that men with low concentrations of zinc in semen plasma are more likely to have asthenozoospermia. In addition, the reduction of the level of this element increases the percentage of broken tails [Massányi *et al.* 2005]. Kumar *et al.* [2006] conducted an experiment in which bulls – were given zinc supplements in feed. It was found, that semen condition of these animals was better – increase ejaculate volume, sperm concentration and their motility. In our study, showed a significant decrease in the concentration of zinc in men with abnormal semen quality parameters, which indicate the role of this element in the normal motility and morphology of spermatozoa.

The molecular studies of the population results didn't show deletion of the entire region AZFc of the Y chromosome and no partial deletions b2/b3. Moussa and Al-Shoumer [2010] in their study detected a microdeletion AZFc in 55.6% of infertile men. According to reports by other researchers, the frequency of deletions around the

AZFc region is much lower than partial deletions in this region. In research of Imken *et al.* [2009] of 315 men (149 infertile) AZFc microdeletion was found in 4.2% – while partial deletions – in the region of 6% of cases. Hellani *et al.* [2006] in their study reported the presence of partial deletions in 8 of 247 patients with idiopathic infertility, but deletion of the entire region AZFc not found in any of them. Shahid *et al.* [2011] in their study showed a low frequency (0.84%), of b2/b3 deletions in azoospermic men and no effect on the incidence of spermatogenesis disorders. The relationship between the presence of deletions b2/b3 and infertility was recorded in the study of the Chinese population and does not appear to be reflected in the overall population [Wu *et al.* 2007]. Similar conclusions were reached Repping *et al.* [2004].

Partial deletion b1/b3 is quite rare, and its frequency varies between different populations [Giachini *et al.* 2008, Shaqalaih *et al.* 2009]. Due to this fact, the effect it has on male fertility is not fully understood [Repping *et al.* 2004]. In studies Shahid *et al.* [2011] demonstrated the presence of all three microdeletion (gr/gr, b1/b3, b2/b3) in azoospermic and oligospermic men. In our study, partial deletion b1/b3 was detected in two, and deletions gr/gr in 12 patients. In case of presence of partial deletions b1/b3 (n = 2), the difference of frequency between the groups A and B was not statistically significant. The presence of this mutation was not associated with place of living, smoking or exposure to heavy metals. This mutation did not differentiate patients in terms occurrence of specific disorders semen parameters. The average age for the group of patients with deletions was 31 years old, medians 29. For the group of patients in which there was no genetic mutations mean age was 31 years, median – 30. Wu *et al.* [2007] in study of the Chinese population did not show the presence of b1/b3 deletion in any of the 699 patients (451 suffering from idiopathic infertility and 248 fertile men). Steven *et al.* [2012] analyzed the presence of deletions in the region AZFc of 20 884 men from different populations, including more than 4.5 thousand from Poland. It was found, that incidence of b1/b3 deletion in Polish population is about 0.043%, which is two times lower than in the general population. The results correlate with previous reports of low frequency and its population relationship [Repping *et al.* 2003, Giachini *et al.* 2008, Shaqalaih *et al.* 2009, Shahid *et al.* 2011]. Steven *et al.* [2012] also conducted a statistical analysis of the results obtained by the 15 research groups. They showed, that b1/b3 partial deletion increases the risk of serious disturbances of spermatogenesis. Our results did not support the thesis of relationship between presence of this deletion and fertility disorders.

In studies Shahid *et al.* [2011] demonstrated the presence of microdeletions gr/gr of azoospermic and oligozoospermic 171 men, as well as in men with normal semen parameters. Despite the statistical insignificance of the results, the authors suggest a role for these deletions in male infertility. Gr/gr deletions in our study were observed in 8.4% of cases of men with impaired sperm parameters and 12% of normozoospermic men. This result is consistent with reports of some authors [Repping *et al.* 2004, Hucklenbroich *et al.* 2005, Fernando *et al.* 2006, Giachini *et al.* 2008]. Differences in our study were not statistically significant. Carvalho *et al.* [2006] discovered deletions gr/gr in 4.5% infertile, 2.5% fertile and 3.4% subfertile men. Based on the results of their research, concluded, that is no association between the presence of gr/gr deletions and male infertility. In our study, partial deletion gr/gr did not differentiate patients, due to semen disorders. For patients with AZFc deletions, significantly higher activity GR and the amount of Zn in the plasma semen were proved. In this group was also found a lower concentration of lead, but the difference was not statistically relevant.



Zinc plays an important role in the human body. It is a component of many enzymes and membrane proteins. Suitable zinc levels also shows a protective effect against excessive concentrations of lead [Skoczyńska *et al.* 2003]. Benoff [2003] studied the in vitro fertilization in patients with high concentrations of lead in blood. They found, that even high concentration of lead, high levels of zinc has a protective effect. This fact could explain observed in our study lower than, in the control group, the level of Pb in the semen of patients with mutations AZFc, with a significant increase in the concentration of zinc.

## 5. CONCLUSIONS

1. Destabilization of chemical elements balance in semen (Zn, Se, Cd, Pb), may cause male fertility disorders.
2. The activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GR) and amount of MDA are not meaningful indicator of sperm health.
3. Partial deletions (b1/b3 and gr/gr) of AZFc region of the Y chromosome does not does not have a significant effect on semen parameters.
4. Destabilization of chemical elements balance in semen (Zn, Se, Cd, Pb) may increase the risk of DNA mutations in genes associated with the fertility of men.
5. The activity of glutathione reductase is associated with the presence of b1/b3 and gr/gr partial deletions.

Summarizing the results of studies obtained in this study can not determine the relationship between the occurrence of subdelecji b1/b3 and gr/gr AZFc region Y decrease the reproductive potential of men. Both – the presence of mutations, as well as decrease of sperm quality – may be affected by the environment. Abnormalities in the level of zinc and GR activity are associated with the presence of deletions in the region AZFc.

## REFERENCES

- Ahotupa M., Huhtaniemi I., 1992. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol. Reprod.* 46, 1114-1118.
- Ali S., Hasnain S.E., 2002. Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene* 283, 1-10.
- Alvarez J.G., Storey B.T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23, 77-90.
- Badmaev V., Majeed M., Passwater R.A., 1996. Selenium a quest for better understanding. *Atern. Ther. Health Med.* 2(4), 59-62.
- Benoff S., Centola G.M., Millan C., Napolitano B., Marmar J.L., Hurley I.R., 2003. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum. Reprod.* 18(2), 374-383.

- Bergier L., Bakalczuk Sz., Frącki S., Marchlewska K., Piasecka M., Taszarek-Hauke G., Walczak-Jędrzejowska R., Wojtasik J., Zagocka E., 2010. Diagnostyka laboratoryjna. *Journal of Laboratory Diagnostics* 46(2), 161-170.
- Bertin G., Averbeck D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-1559.
- Bonda E., Włostkowski T., Krasowska A., 2007. Metabolizm i toksyczność kadmu u człowieka i zwierząt. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych* 1-2, 87-97.
- Carvalho C.M., Zuccherato L.W., Bastos-Rodrigues L., Santos F.R., Pena S.D., 2006. No association found between gr/gr deletions and infertility in Brazilian males. *Mol. Hum. Reprod.* 12(4), 269-73.
- Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H.W. *et al.*, 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update* 16, 231-245.
- Crosignani P.G., Rubin B., 1996. Guidelines to the Prevalence, Diagnosis, Treatment and Management of Infertility. *Expert on Human Reprod.*, Oxford Univ. Press.
- Dally H., Hartwig A., 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18, 1021-1026.
- Eloualid A., Rhaissi H., Reguig A., Bounaceur S., El houate B., Omar Abidi O., Charif M., Louanjli N., Chadli E., Barakat A., Bashamboo A., McElreavey K., Rouba H., 2012. Association of Spermatogenic Failure with the b2/b3 Partial AZFc Deletion [PDF] *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0034902.
- Ferlin A., Speltra E., Garolla A., Selice R., Zuccarello D., Foresta C., 2007. Y chromosome haplogroups and susceptibility to testicular cancer. *Mol. Hum. Repr.* 13(9), 615-9.
- Fernando L., Gromoll J., Weerasooriya T.R., Nieschlag E., Simoni M., 2006. Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian J. Androl.* 8(1), 39-44.
- Filipic M., Fatur T., Vudrag M., 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human. Exp. Toxicol.* 25, 67-77.
- Gałęcka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florkowski A., Gałęcki P., 2008a. Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Pol. Merk. Lek.* 25, 266-268.
- Gałęcka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałęcki P., 2008b. Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii. *Pol. Merk. Lek.* 24, 446-448.
- Gałęcka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałęcki P., 2008c. Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. *Pol. Merk. Lek.* 25, 269-272.
- Giachini C., Laface, Guarducci E., Balercia G., Forti G., Krausz C., 2008. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 124(4), 399-410.

- Halliwell B., Chirico S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57(Suppl. 5), 715S-724S.
- Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A., 2003. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY and SOX9. *Endocrine Review*, Review 24(4), 466-487.
- Hawkes W.C., Turek P.J., 2001. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *J. Androl.* 22, 764-772.
- Hellani A., Al-Hassan S., A Iqbal M., Coskun S., 2006. Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *JECAR* 3.
- Henkel R., Bittner J., Weber R., Huther F., Miska W., 1999. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil. Steril.* 71(6), 1138-1143.
- Hsieh Y.Y., Sun Y.L., Chang C.C., Lee Y.S., Tsai H.D., Lin C.S., 2002. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J. Clin. Lab. Anal.* 16, 127-131.
- Hucklenbroich K., Gromoll J., Heinrich M., Hohoff C., Nieschlag E., Simoni M., 2005. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 20(1), 191-197. Epub 2004 Oct 21.
- Imken L., El Houate B., Chafik A. *et al.*, 2009. AZF microdeletions and partial deletions of AZFc independent of Y-chromosomal background. *J. Med. Genet.* 46, 21-31.
- Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S., 1991. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum. Reprod.* 6, 987-991.
- Krausz C., McElreavey K., 1999. Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 4, e1-8.
- Kuczyński W., Szamatowicz J., Jędrzejczak P., 1997. Niepłodność męska. [W:] T. Pisarski, M. Szamatowicz (red.), *Niepłodność*, Wyd. Lek. PZWL Warszawa.
- Kumar H., Verma R.P., Singh L.P., Varshney V.P., Dass R.S., 2006. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* x *Bos taurus*) bulls. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 663-675.
- Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., Wilson R.K., Silber S., Oates R., Rozen S., Page D.C., 2001. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 29(3), 279-286.
- Massányi P., Trandzik J., Nad P., Skalická M., Koréneková B., Lukac N., Fabis M., Toman R., 2005. Seminal concentration of trace elements in fox and relationships to spermatozoa quality. *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 40(5), 1097-1105.
- McElreavey K., Krausz C., Bishop C.E., 2000. The human Y chromosome and male infertility. *Results Probl. Cell. Differ.* 28, 211-232.

- Mitra A., Dada R., Kumar R., Gupta N.P., Kucheria K., *et al.* 2008. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: Utility of simplified multiplex PCR. *Indian J. Med. Res.* 127, 124-132.
- Moussa A., Al-Shoumer K., 2010. Cytogenetic abnormalities and azoospermia factor (AZF) microdeletions in infertile men from Kuwait. *Journal of Molecular & Genetic Medicine* 4(1), 232.
- Pryor J.L., Kent-First M., Muallem A. *et al.*, 1997. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New England Journal of Medicine* 336, 534-539.
- Radwan J., 2006. Badanie nasienia. [W:] M. Semczuk, M. Kurpisz (red.), *Andrologia*, wyd. II uaktualnione, WL PZWL Warszawa, ISBN 83-200-3201-6, 162-178.
- Ramkissoo Y., Goodfellow P., 1996. Early steps in mammalian sex determination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6(3), 316-21.
- Repping S., Skaletsky H., Brown L., van Daalen S.K., Korver C.M., Pyntikova T., Kuroda-Kawaguchi T., de Vries J.W., Oates R.D., Silber S., van der Veen F., Page D.C., Rozen S., 2003. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat. Genet.* 35(3) 247-251.
- Repping S., van Daalen S.K., Korver C.M., Brown L.G., Marszalek J., *et al.*, 2004. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 83, 1046-105.
- Shahid M., Dhillon V.S., Khalil H.S., Sexana A., Husain S.A., 2011. Associations of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 19(1), 23-29.
- Shaqalaih A.J., Abu Halima M.S., Ashour M.J., Sharif F.A., 2009. Screening for Y-chromosome microdeletions in a population of infertile males in the Gaza Strip. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod* 6, 7.
- Sharma R.K., Pasqualotto A.E., Nelson D.R., Thomas A.J.Jr., Agarwal A., 2001. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl.* 22, 575-583.
- Zhu W.H., 1991. The immobilization of zinc ions on human spermatozoa in vitro. *Shengzi Yu Biyun* 11, 73-74, 26.
- Siciliano L., Tarantino P., Longobardi F., Rago V., De Stefano C., Carpino A., 2001. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl.* 22, 798-803.
- Skoczyńska A., Stojek E., Górecka H., Wojakowska A., 2003. Serum vasoactive agents in lead-treated rats. *Med. Env. Heal.* 16, 169-177.
- Soufir J.C., Weber P., Laval-Martin D., Calvayrac R., 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24, 185-196.

Rozen S.G., Marszalek J.D., Irenze K., Skaletsky H., Brown L.G., Oates R.D., Silber S.J., Ardlie K., Rozen D.C., 2012. AZFc Deletions and Spermatogenic Failure: A Population-Based Survey of 20,000 Y Chromosomes. *The American Journal of Human Genetics* 91, 890-896.

Szczygieł M., Kurpisz M., 2002. Plemniki. [W:] M. Kurpisz (red.), *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków*, Termedia Wyd. Med. Poznań, 191-202.

Tiepolo L., Zuffardi O., 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human chromosome long arm. *Hum. Genet.* 34, 119-124.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed., 2010. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, ISBN 978 92 4 154778 9.

Wolczyński S., Kuczyński W., Styrna J., Szamatowicz M., 2002. Niepłodność. [W:] M. Kurpisz (red.), *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków*, Termedia Wyd. Med. Poznań, 269-287.

Wu B., Lu N.X., Xia Y.K., Gu A.H., Lu C.C., *et al.*, 2007. A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum. Reprod.* 22, 1107-1113.

Yuyan L., Junqing W., Wei Y., Weijin Z., Ersheng G., 2008. Are serum zinc and copper levels related to semen quality? *Fertil Steril.* 89(4), 1008-1011.

Zdrojewicz Z., Wiśniewska A., 2005. Rola cynku w seksualności mężczyzny. *Adv. Clin. Exp. Med.* 14(6), 1295-1300.

Zini A., de Lamirande E., Gagnon C., 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 183-188.



# KRAŻĄCE KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA JAKO MARKER USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA W CHOROBAH SERCOWO-NACZYNIOWYCH

Maria Krajewska<sup>1</sup>, Magdalena Lampka, Piotr Kaczorowski,  
Tomasz Tyrakowski

## 1. WPROWADZENIE

Choroby sercowo-naczyniowe są obecnie wymieniane wśród najczęstszych przyczyn śmiertelności w wysoko rozwiniętych krajach całego świata. W rozwoju tych schorzeń niezwykle ważną rolę odgrywa dysfunkcja i uszkodzenie śródbłonka naczyniowego (endotelium) [Blann i in. 2005, Grąbczewska i in. 2007, Shirani i in. 2009]. Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego stanowi pierwszy etap powstawania procesu miażdżycowego. Uszkodzenie śródbłonka doprowadza do oddzielania się od ściany naczyń krwionośnych komórek śródbłonka, które przedostają się do krwiobiegu i są określane mianem krążących komórek śródbłonka (*Circulating Endothelial Cells – CECs*) [Boss i in. 2008a].

Proces oddzielenia się komórek śródbłonka od struktury śródbłonka ściany naczyniowej jest wywoływany przez apoptozę tych komórek, proteolizę białek macierzy podśródbłonkowej oraz uszkodzenie śródbłonka zarówno mechaniczne, jak i polekowe. W przypadku stanów zapalnych za pojawianie się CECs odpowiadają natomiast cytokiny, proteazy oraz atak neutrofilowy zależny od dopełniacza [Makin i in. 2004, Kluz i Adamiec 2007, Boss i in. 2008b].

Krażące „złuszczone” komórki śródbłonka pochodzą z powierzchni śródbłonka naczyniowego; krążące we krwi obwodowej mogą również pochodzić z komórek prekursorowych uwolnionych ze szpiku kostnego. Prekursorem komórek śródbłonka naczyniowego jest powiązany z podścieliskiem szpiku kostnego hemangioblast, dający także początek komórkom krwiotwórczym. Hemangioblast pod wpływem działania czynników angiogennych przekształca się w multipotencjalny angioblast, z którego powstają komórki progenitorowe śródbłonka (*Endothelial Progenitor Cells – EPCs*). Przedostają się one do strefy naczyniowej, w której przez stopniowe różnicowanie się zasiedlają endotelium (rys. 1) [Hristov i in. 2004].

Do oznaczania zawartości krążących komórek śródbłonka wykorzystuje się technikę izolacji immunomagnetycznej oraz cytometrię przepływową. W celu identyfikacji CECs stosuje się antygeny śródbłonkowe (czynnik von Willebranda, CD 31, CD 146). Markerem, który różnicuje krążące komórki śródbłonka oraz komórki układu krwiotwórczego, jest antygen CD 45, nieobecny na komórkach linii śródbłonkowej [Blann 2003-2004, Erdbruegger i in. 2006].

Liczba krążących komórek śródbłonka we krwi obwodowej zdrowych osób jest niewielka i wynosi około 5 komórek/ml krwi żyłnej. Zwiększoną liczbę ECs w krążeniu stwierdza się w przebiegu chorób, w których dochodzi do uszkodzenia śródbłonka na-

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kizpatob@cm.umk.pl





naczynia, zbudowaną z komórek mięśni gładkich i włókien sprężystych o układzie wewnętrznym. Zewnętrzną warstwę ściany naczyniowej buduje tkanka łączna wiotka, która składa się z licznych włókien kolagenowych i sprężystych o przebiegu podłużnym oraz nielicznych włókien mięśni gładkich. Pomiedzy warstwą wewnętrzną ściany naczyniowej a jej warstwą środkową oraz pomiedzy warstwą środkową ściany naczyniowej a jej warstwą zewnętrzną obecne są nagromadzone włókna sprężyste (błona sprężysta wewnętrzna i zewnętrzna) [Wnuczko i Szczepański 2007].

Śródbłonek naczyniowy stanowi biologicznie aktywną wyściółkę układu naczyniowego. Pełni rolę selektywnie przepuszczalnej bariery pomiedzy krwią i jej elementami a mięśniówką gładką naczyń krwionośnych [Wasilewska i in. 1999, Rość i in. 2004].

Pod względem strukturalnym jest wyspecjalizowanym jednowarstwowym nabłonkiem płaskim pochodzenia mezenchymalnego o grubości 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , zbudowanym z wielokątnych komórek o wymiarach ok.  $10 \times 30 \mu\text{m}$ , leżących na błonie podstawnej. Endoteliocyty – komórki śródbłonka pokrywają wnętrze wszystkich naczyń krwionośnych, limfatycznych oraz jam serca. Średni czas życia komórek śródbłonka wynosi w przybliżeniu 100 dni, dlatego też konieczne jest ich ciągle odtwarzanie w celu zachowania ciągłości tej warstwy ściany naczynia [Blann i in. 2005, Lipski i in. 2006, Poręba i in. 2006, Wnuczko i Szczepański 2007]. W warunkach fizjologicznych śródbłonek tworzy szczelną i trudną do pokonania barierę dla komórek występujących w krwi. Od strony światła naczynia komórki śródbłonka, dzięki pokrywającej je warstwie glikokaliksu (który obdarza ładunkiem ujemnym wewnętrzną ścianę naczynia) i możliwości odpychania również ujemnie naładowanych albumin oraz elementów morfotycznych krwi, tworzą aktywną powierzchnię ułatwiającą przepływ osocza i tych elementów oraz zapobiegającą jej krzepnięciu [Lipski i in. 2006, Poręba i in. 2006, Wnuczko i Szczepański 2007].

Komórki śródbłonka stanowią warstwę ciągłą, która jest połączona z błoną podstawną. Błona podstawna tworzy macierz zewnątrzkomórkową, w której występuje kolagen typu IV, V, fibronektyna oraz laminina [Walski i Frontczak-Baniewicz 2007, Wnuczko i Szczepański 2007].

W obrębie części podstawno-bocznej komórek śródbłonka obserwuje się występowanie konstytutywnych molekuł adhezyjnych, o charakterze receptorów integrynowych. Odpowiadają one za wiązanie śródbłonka z elementami błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim z kolagenami, glikoaminoglikanami, elastyną, fibronektyną, witronektyną, trombospondyną lub lamininą. Poprzez zapewnienie mocnego przytwierdzenia śródbłonka do podłoża receptory integrynowe wiążą czynnik von Willebranda oraz fibrynogen [Wnuczko i Szczepański 2007].

Na powierzchni luminalnej i bocznej komórek śródbłonka zlokalizowane są zarówno konstytutywne, jak i indukowane cząsteczki adhezyjne, odpowiadające za interakcje międzykomórkowe oraz migrację neutrofilów do ściany naczyniowej w procesach zapalnych [Wnuczko i Szczepański 2007].

O dużej aktywności biologicznej śródbłonka może świadczyć obecność licznych pęcherzyków pinocytarnych oraz białek transportowych wewnątrz komórek. W cytoplazmie komórek śródbłonka zlokalizowane są swoiste struktury otoczone błoną (ciałka Weibel-Palade'a). Zawierają one multimery czynnika von Willebranda (po uszkodzeniu ściany naczynia powoduje one adhezję płytek krwi do włókien kolagenowych) oraz selektynę P. Do innych składników błony komórkowej endotelium zalicza się m.in.: enzym konwertujący (kininazę II), ektonukleazy, antygeny HLA klasy I oraz II, czyn-

nik tkankowy (TF) i inhibitor zewnątrzpo pochodnego toru aktywacji krzepnięcia (TFPI) [Hrikson i in. 1997, Sawicki 2003, Wnuczko i Szczepański 2007].

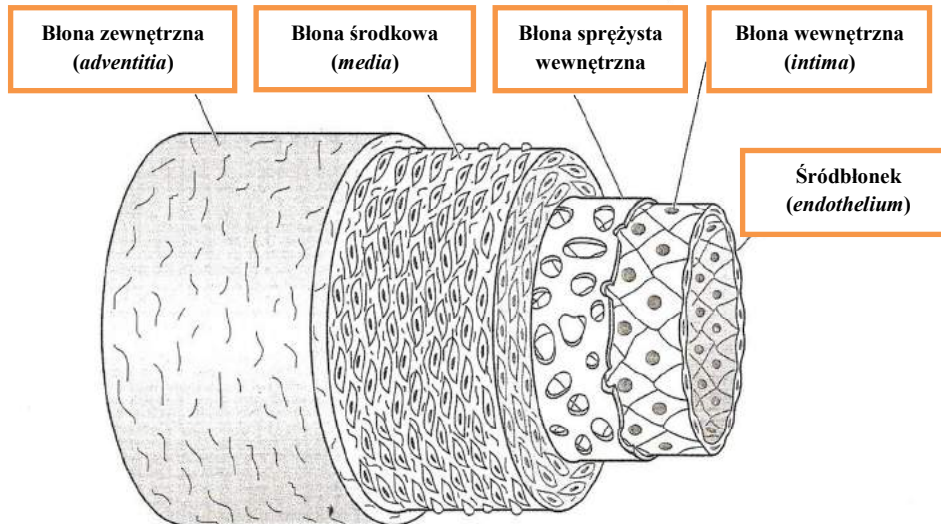
Do najważniejszych funkcji śródbłonka naczyniowego zalicza się regulowanie procesów hemostazy, napięcia i przepuszczalności naczyń. Uczestniczy on również w przebudowie ściany naczyniowej i procesach angiogenezy oraz w regulacji odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Bierze udział w transporcie (czynnym i biernym) gazów i substancji chemicznych [Lipski i in. 2006]. Śródbłonek odbiera napływające sygnały hemodynamiczne oraz fizykochemiczne, które przekazywane są do przyległych komórek oraz do położonej pod nim warstwy mięśni gładkich [Poręba i in. 2006]. Jest strukturą łatwo pobudliwą i szybko odpowiadającą na bodźce. W odpowiedzi na bodźce dochodzi do jego aktywacji oraz zmiany funkcji. Integralność śródbłonka wynika z utrzymywania równowagi krążeniowej i hematologicznej, ale zwłaszcza jego funkcji dokrewnej, która determinuje napięcie mięśniówki gładkiej ściany naczyń [Bednarska-Chrabowska i in. 2002].

Proces kontroli napięcia naczyniowego, a tym samym ciśnienia tętniczego zachodzi dzięki ciągłemu wytwarzaniu dwóch substancji: prostacykliny PGI-1 oraz tlenu azotu (NO). Prostacyklina – produkt metabolizmu kwasu arachidonowego, poza relaksującym wpływem na mięśniówkę naczyń krwionośnych, hamuje także agregację płytek krwi. Adhezję i agregację płytek krwi powoduje również tlenek azotu odkryty w 1980 roku jako czynnik relaksujący pochodzący ze śródbłonka (*Endothelium Derived Relaxing Factor* – EDRF oraz 13-HODE (13-hydroxy-9,11octadecadienoic acid) [Robak i in. 2007]. W komórkach śródbłonka po raz pierwszy zidentyfikowano śródbłonkową syntetazę tlenu azotu (eNOS), która jest jednym z trzech enzymów zdolnych do wytwarzania tlenu azotu. Wykazano, że zdolność funkcjonalna eNOS jest niezbędna w procesie angiogenezy i przebudowy naczyń krwionośnych. Na komórkach śródbłonka zidentyfikowano receptory Toll-podobne (TLRs – *Toll-like receptors*). Występują one nie tylko na monocytach, makrofagach, granulocytach, ale także na limfocytach i komórkach nabłonkowych. Znane są również rozpuszczalne formy tych receptorów znajdujące w płynach wydzielniczych. Przyłączenie ligandu egzogenego (bakterie, wirusy) lub endogenego (gospodarza) do TLR powoduje aktywację odpowiedzi immunologicznej, rozwój procesu zapalnego (wzrost uwalniania cytokin prozapalnych), zwiększoną ekspresję antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I i II, cząsteczek kostymulujących na komórkach prezentujących antygen, a w konsekwencji lepszą prezentację antygeny i odpowiednią aktywację odporności nabytej. Dokładne poznanie mechanizmów efektorowych i transdukcji sygnałów w wyniku przyłączenia ligandu do TLR może mieć duże znaczenie w wyjaśnieniu mechanizmów odróżniania antygenów własnych od obcych, aktywacji procesu zapalnego, a także wpływu odporności wrodzonej na aktywację, swoistość i typ odporności nabytej [Robak i in. 2007].

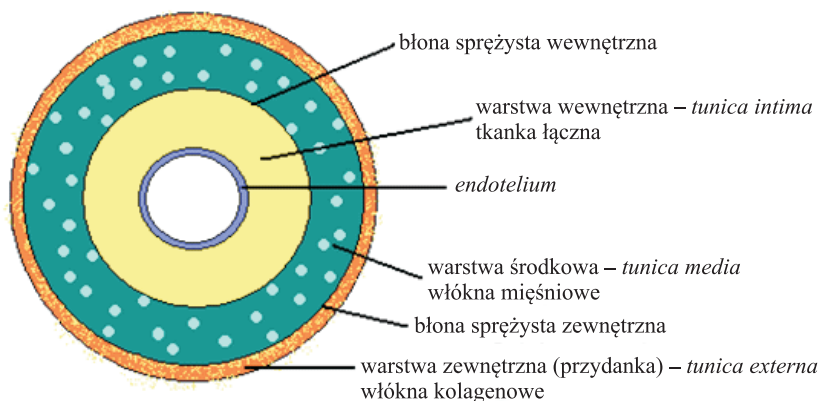
Uszkodzenie mechaniczne śródbłonka naczyniowego zaburza delikatną wieloczynnikową równowagę zapewnianą przez te komórki, powodując rozwój wielu istotnych zmian patologicznych, takich jak nadciśnienie, zmiany miażdżycowe, powstawanie zakrzepów oraz zaburzenia perfuzji tkanek i narządów. Poprzez produkcję wielu czynników wzrostu wpływa wielokierunkowo na leżącą pod nim warstwę mięśni gładkich, regulując jej metabolizm oraz migrację, proliferację i apoptozę komórkową [Grąbczewska i in. 2008, Wnuczko i Szczepański 2007].

Śródbłonek naczyniowy ze względu na dużą powierzchnię, liczbę komórek znajdujących się w ustroju dorosłego człowieka, masę oraz zdolność do syntezy i uwalnia-

nia wielu substancji aktywnych biologicznie jest uważany za autonomiczny narząd i największy gruczoł endokrynnny w ustroju człowieka, pełniący ważną funkcję w wielu procesach ustrojowych [Paprocka i in. 2000, Wnuczko i Szczepański 2007].



Rys. 2. Budowa naczynia krwionośnego [Peter i in. 1997].



Rys. 3. Przekrój naczynia krwionośnego [<http://www.logbia.republika.pl/ukrwio1.html>]

### 3. KRAŻĄCE KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA – RODOWÓD ORAZ METODY IDENTYFIKACJI

W organizmie dorosłego człowieka liczbę krążących komórek śródbłonka ocenia się na  $1-6 \times 10^{13}$ , a powierzchnię, którą pokrywają, na  $1-7 \text{ m}^2$  [Robak i in. 2007]. Na ich powierzchni są obecne receptory wielu molekuł białkowych (czynniki wzrostu, czynniki krzepnięcia), cząsteczek transportujących lipidy (LDL), metabolitów (tlenek azotu, serotonina) hormonów (endotelina 1) oraz genów (tab. 1) [Robak i in. 2007].

Tabela 1. Funkcjonalny podział mediatorów uwalnianych przez EC [Robak i in. 2007]

<p><b>Czynniki zmniejszające napięcie ściany naczyń</b></p> <p>tlenek azotu (NO) prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) czynn timerpolaryzujący (EDGF) sodowo-mocznikowe białko C czynn timerkurczowy pochodzenia śródbłonkowego (EDRF) utleniony metabolit kwasu linolowego (13-HODE)</p>	<p><b>Czynn timerzwiększające napięcie ściany naczyń</b></p> <p>endotelina 1 (ET) angiotensyna II (AT) endoperozydaza (PGH<sub>2</sub>) tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)</p>
<p><b>Czynn timerantyzakrzepowe</b></p> <p>tkankowy aktywator plazminogenu (tAP) prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) tlenek azotu (NO) czynn timerkurczowy pochodzenia śródbłonkowego (EDRF) utleniony metabolit kwasu linolowego (13-HODE)</p>	<p><b>Czynn timerprozakrzepowe</b></p> <p>inhibitor –tAP tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) czynn timer von Willebranda (vWF)</p>
<p><b>Czynn timerhamujące wzrost</b></p> <p>tlenek azotu (NO) prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) sodowo-mocznikowe białko C</p>	<p><b>Czynn timerstymulujące wzrost</b></p> <p>rodniki ponadrtlenkowe endotelina (ET) angiotensyna II (AT)</p>
<p><b>Inhibitory zapalenia</b></p> <p>tlenek azotu (NO)</p>	<p><b>Stymulatory zapalenia</b></p> <p>ponadrtlenki i inne wolne rodniki czynn timer martwicy nowotworu <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</p>

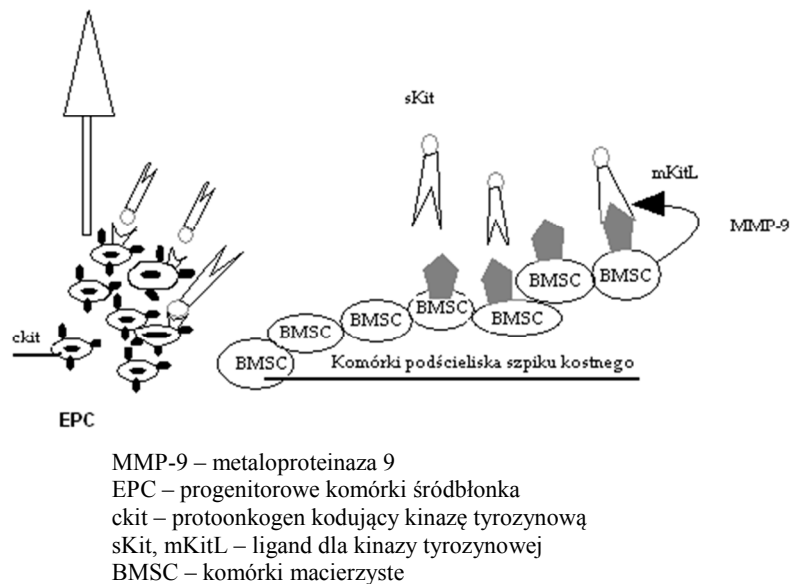
Pod względem czynnościowym komórki śródbłonka można podzielić na następującą grupę: komórki śródbłonka ściany naczyniowej (*Endothelial Cells* – EC), „złuszczone” komórki śródbłonka krążące we krwi obwodowej, które uległy oddzieleniu od ściany naczyniowej w wyniku jej uszkodzenia (*Circulating Endothelial Cells* – CEC), progenitorowe komórki śródbłonka, pochodzące ze szpiku kostnego i krążące we krwi (*Endothelial Progenitor Cells* – EPC) [Kluz i in. 2007].

Hipotetycznym prekursorem EC i hematopoetycznych komórek pnia jest hemangioblast. Warstwa komórek ściany naczyń stanowi nieadhezyjną przestrzeń dla płytek krwi, leukocytów oraz produkuje wiele ważnych czynników regulatorowych, takich jak prostaglandyny i NO [Kawiak 1999, Góra-Tybor i Krawczyńska 2007].

Krążące komórki śródbłonka pojawiają się we krwi obwodowej na skutek odrywania się od ściany naczyń krwionośnych prawidłowych lub nowotworowych; mogą też pochodzić z komórek prekursorowych uwolnionych ze szpiku kostnego. Większość CEC zlokalizowanych we krwi obwodowej pochodzi ze złuszczonego śródbłonka; nie mają one zdolności namnażania się [Góra-Tybor i Krawczyńska 2007]. Mechanizmy oddzielania się komórek śródbłonka ściany naczyniowej w stanach fizjologicznych i patologicznych są różnorodne i mogą być wynikiem: apoptozy komórek endotelialnych, proteolizy białek macierzy podśródbłonkowej, uszkodzenia śródbłonka (za pośrednictwem cytokin, proteaz lub przez atak neutrofilowy zależny od dopełniacza), uszkodzeń mechanicznych lub polekowych [Kluz i Adamiec 2007].

Pochodzenie komórek śródbłonka biorących udział w naprawie lub tworzeniu *de novo* endotelium jest wciąż przedmiotem badań. Do momentu, gdy w 1997 r. po raz pierwszy opisano krążące progenitorowe komórki śródbłonka, za główny mechanizm naprawczy uszkodzonej błony wewnętrznej naczyń uważano lokalną migrację i proliferację dojrzałych komórek śródbłonka, sąsiadujących z miejscami uszkodzenia. Obecnie

przyjmuje się, że to właśnie pochodzące ze szpiku kostnego EPCs (rys. 4) odgrywają podstawową rolę w postnatalnej neowaskularyzacji, ulegając włączeniu do miejsc aktywnej angiogenezy zachodzącej w obszarach uszkodzenia śródbłonka. Jak wykazano, EPC przedostają się do krwi obwodowej w odpowiedzi na działanie wielu bodźców pobudzających angiogenezę, takich jak czynnik wzrostu komórek śródbłonka (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF), przewlekłe niedokrwienie czy uraz naczynia krwionośnego. Progenitorowe komórki śródbłonka wykazują właściwości zbliżone do komórek występujących w embrionalnym angioblastie. Komórki te mają zdolność do proliferacji i przekształcania się w dojrzałe komórki śródbłonka [Werner i Nickenig 2006, Kluz i Adamiec 2007]. Pod względem fenotypu wczesne krążące prekursorowe komórki endotelialne są zbliżone do hematopoetycznej linii pnia i najprawdopodobniej należą do tej samej grupy, co komórki tworzące kolonie granulocytarno-makrofagowe (CFU-GM). Zaobserwowano, że CPECs mogą przekształcić się w dojrzałe ECs lub w monocyty, w zależności od wpływu mikrośrodowiska [Góra-Tybor i Krawczyńska 2007, Kluz i Adamiec 2007].



Rys. 4. Proces przejścia progenitorowych komórek śródbłonka ze szpiku kostnego do krwi obwodowej [Miller-Kasprzak 2007]

Metody izolacji i identyfikacji krążących komórek śródbłonka zostały opisane w publikacji Kluz i Adamiec z 2007 r. Autorzy wspominają zarówno o najstarszych metodach identyfikacji tych komórek, wykorzystujących ocenę morfologiczną rozmazów krwi obwodowej, jak i bardziej zaawansowanych technikach diagnostyki immunocytochemicznej oraz izolacji immunomagnetycznej [Kluz i Adamiec 2007].

Duży problem metodyczny stwarza różnicowanie komórek progenitorowych śródbłonka (EPCs i komórek dojrzałych CECs), gdyż mają one wiele wspólnych antygenów powierzchniowych. Krążące CECs wykrywa się zazwyczaj za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD146, przy czym antygen ten nie jest markerem typowym wyłącznie dla dojrzałych EC i może ulegać ekspresji rów-

niez na powierzchni EPC. W większości przypadków EPC definiuje się jako komórki wykazujące koekspresję markerów niedojrzałości (CD133) oraz markerów śródbłonkowych, mające zdolność do tworzenia kolonii o wysokim potencjale proliferacyjnym w hodowlach *in vitro*. Do identyfikacji EPC wykorzystuje się również receptor dla VEGF (VEGFR-2, Flk-1/KDR), receptor dla angiopoetyny 1 (Tie-2) i antygen powierzchniowy CD34, które jednak mogą ulegać ekspresji także na powierzchni dojrzałych CEC. W praktyce do wykrywania EPC najczęściej stosuje się znakowanie na obecność Flk-1/KDR i CD133 (jednak Flk-1/KDR ulega ekspresji również na powierzchni dojrzałych CEC) [Kluz i Adamiec 2007].

U zdrowych ludzi liczba CEC w porównaniu z liczebnością innych populacji komórek krwi obwodowej jest bardzo mała i zazwyczaj nie przekracza 5 komórek/ $\mu$ l. Techniki używane do detekcji CEC uwzględniają wychwytywanie tych rzadkich komórek z krwi pełnej za pomocą odpowiednio czulej metody i ich identyfikację za pomocą specyficznego markera śródbłonkowego. Najczęściej CEC izoluje się metodą immunomagnetyczną za pomocą perełek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałem przeciwśródbłonkowym anti-CD146 [Kluz i Adamiec 2007]. Antygen CD146 występuje na powierzchni komórek śródbłonka i w śladowych ilościach na powierzchni megakariocytów i komórek niektórych linii nowotworowych. Uważa się więc, że jest swoistym markerem śródbłonkowym, w tym markerem CEC. W ostatnich latach pewną alternatywą dla techniki izolacji immunomagnetycznej CEC staje się technika cytometrii przepływowej, która ma być metodą charakteryzującą się większą czułością [Kluz i Adamiec 2007].

CEC – oznaczane metodą immunomagnetyczną – izolowane są z żyłnej krwi obwodowej. Bardzo istotna jest właściwa technika wlewu krwi, a także odrzucenie kilku pierwszych mililitrów pobranej krwi tak, aby uniknąć jej fałszywego zanieczyszczenia komórkami śródbłonka oddzielnymi na skutek traumatyzacji żyły. Wyizolowane w ten sposób CEC tworzące rozety z perełkami magnetycznymi, barwi się rutynowo akrydyną i liczy pod mikroskopem fluorescencyjnym. Ocena mikroskopowa tak przygotowanych preparatów zależy jednak w dużym stopniu od doświadczenia badającej osoby. Za pomocą techniki separacji immunomagnetycznej, poza całymi komórkami śródbłonka o rozmiarach rzędu 10-50-70  $\mu$ m, izoluje się również większe agregaty komórek (przypuszczalnie zlepione włóknami fibryny) oraz mikrocząsteczki śródbłonka powstające na skutek fragmentacji komórek *in situ* bądź po ich dokonanym oddzieleniu się od błony podstawnej [Kluz i Adamiec 2007]. W miarę coraz szerszego zastosowania metody separacji immunomagnetycznej CEC zaczęły pojawiać się pewne problemy techniczne wymagające wprowadzania konkretnych modyfikacji proceduralnych. Problem potencjalnego, nieswoistego wiązania leukocytów z perełkami magnetycznymi opłaszczonymi przeciwciałem przeciwśródbłonkowym rozwiązano wprowadzając dodatkowe kryteria identyfikacji wyizolowanych komórek, pozwalające upewnić się co do ich śródbłonkowego pochodzenia. Oceniano m.in. morfologię, liczbę związanych perełek magnetycznych oraz właściwości cytochemiczne komórek, w tym ich dodatnie znakowanie się na obecność antygenów śródbłonkowych, takich jak CD31 (PECAM-1) i czynnik von Willebranda, przy jednoczesnym braku ekspresji antygenów leukocytarnych, głównie CD45. Doskonałym testem umożliwiającym identyfikację ludzkich komórek śródbłonka okazało się wiązanie przez nie lektyny izolowanej z ziaren *Kolcolista zachodniego* – *Ulex europaeus* (UEA-1), co pozwoliło na opracowanie dość prostego protokołu separacji immunomagnetycznej CEC, z ich następczym znakowaniem za pomocą UEA-1 i oceną mikroskopową [Kluz i Adamiec 2007]. Podstawowe znaczenie dla zmniejszenia

stopnia nieswoistego wiązania leukocytów z perełkami magnetycznymi ma również utrzymywanie temperatury reakcji w granicach 4°C, ponadto wiązanie to, w przeciwieństwie do wiązania perełek magnetycznych z komórkami śródbłonka, ma charakter niestabilny, dlatego intensywne przepłukiwanie próbek pozwoliło na jego dalszą redukcję do nieistotnego poziomu. Czułość omawianej metody i jej kolejnych modyfikacji oceniano stosując kontrolne linie komórkowe ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej, uzyskując wynik rzędu 90% [Kluz i in. 2007].

#### **4. KRAŻĄCE KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA – MARKERY USZKODZENIA ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W CHOROBAH SERCA I NACZYŃ**

Wyniki badań publikowane w specjalistycznej literaturze medycznej wskazują na tendencje wzrostowe krążących komórek śródbłonka w przypadku wszystkich postaci choroby niedokrwiennej serca (z wyjątkiem stabilnej dusznicy bolesnej). Podwyższoną liczebność CECs obserwuje się w przypadku pacjentów z niestabilną dusznicą bolesną, ostrymi zespołami wieńcowymi oraz zawałem mięśnia sercowego [Makin i in. 2004, Boss i in. 2008b].

U pacjentów ze stabilną postacią choroby wieńcowej liczba CECs w krążeniu obwodowym nie różni się od wyników uzyskiwanych w grupie kontrolnej i jest zazwyczaj istotnie statystycznie niższa niż w pozostałych zespołach chorobowych [Makin i in. 2004, Boss i in. 2008a].

W ostrych zespołach wieńcowych obserwuje się zwiększoną liczbę CEC, która koreluje ze stopniem dysfunkcji śródbłonka ocenianego na podstawie stężenia czynnika von Willebranda oraz tkankowego aktywatora plazminogenu.

Wyniki badań uzyskiwane u pacjentów po zabiegach angioplastyki wykazują nieznaczny wzrost liczby CEC po wykonanym zabiegu zarówno we krwi pobranej z żył obwodowych, jak i z tętnic [Boss i in. 2008b].

Mutin i in. [1999] w swoich badaniach zaobserwowali, że CECs ujawniające się we krwi obwodowej pacjentów z zawałem mięśnia sercowego bądź z ostrym zespołem wieńcowym były żywe w momencie oderwania się od struktury śródbłonka naczyniowego. Stosunkowo niewielka liczba krążących komórek śródbłonka wykazuje w DNA sygnały apoptotyczne. Sugeruje to, iż CECs mogą podlegać procesowi apoptozy dopiero po znalezieniu się w krążącej krwi [Mutin i in. 1999]. Wśród przyczyn odrywania się komórek śródbłonka od ściany naczyniowej w przebiegu ostrych zespołów wieńcowych wymienia się m.in.: apoptozę komórek, mechaniczne usuwanie komórek podczas pęknięcia ściany naczyniowej, proteolizę białek macierzy pozakomórkowej spowodowaną działaniem tkankowego aktywatora plazminogenu (*tissue Plasminogen Activator – tPA*), przedłużające się niedokrwienie mięśnia sercowego (prowadzące do odrywania się bardziej wrażliwych wsierdziowych komórek śródbłonka), utlenienie występujące po pęknięciu ścian naczyń po perfuzji krwi.

Krażące komórki śródbłonka obserwowane są u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym nawet do 42 godzin od momentu wystąpienia bólu w klatce piersiowej. Wskazuje to na stosunkowo długi okres ich półtrwania lub dłuższą ich pobudliwość po momencie oderwania się od śródbłonka ściany naczyniowej.

Na obecność CEC w krążeniu oddziałuje również ewentualne zastosowanie terapii heparyną. W tym przypadku u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym stwierdza się niewielką liczbę krążących komórek śródbłonka [Mutin i in. 1999].

Obserwuje się występowanie dodatniej korelacji pomiędzy liczbą CEC a stężeniem białka CRP (*C Reactive Protein* – CRP) we krwi obwodowej pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego, u których w wywiadzie stwierdzano obecność wcześniejszych zmian sercowo-naczyniowych lub innych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (otyłość, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, płeć męska, podeszły wiek) [Boss i in. 2008a, b].

Badania wykonywane u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym pozwalają stwierdzić, że występowanie dużej liczby CECs po upływie 48 godzin od momentu wystąpienia dyskomfortu i bólu w klatce piersiowej była doskonałym wskaźnikiem występowania incydentów sercowo-naczyniowych lub śmierci w okresie od miesiąca do roku po przeprowadzonym badaniu [Boss i in. 2007].

## 5. PODSUMOWANIE

W przebiegu schorzeń sercowo-naczyniowych dochodzi do uszkodzenia i „złuszczenia” komórek śródbłonka z powierzchni ściany naczynia krwionośnego. Zidentyfikowanie markerów postępującego uszkodzenia śródbłonka naczyniowego pozostaje problemem o pierwszoplanowym znaczeniu klinicznym dla diagnostyki, monitorowania aktywności i podejmowania decyzji dotyczących sposobu leczenia tych chorób. W warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej obserwuje się niewielką liczbę krążących komórek śródbłonka [Kluz i Adamiec 2007]. Wyniki badań publikowane w literaturze medycznej, dotyczące krążących komórek śródbłonka, są niezwykle obiecujące. Wzrost liczby CECs obserwowany w przebiegu schorzeń sercowo-naczyniowych wydaje się odzwierciedlać stopień uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. Wskazuje to na dużą przydatność oznaczania ilości CECs we krwi obwodowej pacjentów jako markera chorób sercowo-naczyniowych i wskaźnika prognostycznego występowania incydentów sercowo-naczyniowych w przyszłości.

## LITERATURA

Bednarska-Chrabowska D., Adamiec R., Rychlik-Golema W., 2002. Wybrane aspekty czynności śródbłonka I. Rola śródbłonka w utrzymaniu równowagi hematologicznej i krążeniowej. *Pol. Merk. Lek.* 12(70), 322-327.

Blann A.D., 2003-2004. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 5-6, 256-261.

Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., 2005. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb. Haemost.* 93, 228-235.

Boos C.J., Balakrishnan B., Blann A.D., 2008a. The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implication for prognosis. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1841-1850.

Boos C.J., Lip Y.H., M.D., Blann A.D., 2008b. Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48(8), 1538-1547.



- Boos C.J., Soor S.K., Kang D., 2007. Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* 28, 1092-1101.
- Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A., 2006. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin. Chim. Acta* 373, 17-26.
- Góra-Tybor J., Krawczyńska A., 2007. Krążące komórki śródbłonna – nieinwazyjny marker angiogenezy. *Act. Haematol. Pol.* 38(2), 195-202.
- Grąbczewska Z., Kubica J., 2008. In search of understanding the endothelium. *Cardiol. J.* 15, 299-302.
- Grąbczewska Z., Thews M., Góralczyk K., 2007. Endothelial function in patients with chest pain and normal coronary angiograms. *Kard. Pol.* 65, 1199-1206.
- Hrikson R.C., Kaye G.J., Mazurkiewicz J.E., 1997. *Histology*. Williams and Wilkins Baltimore.
- Hristov M., Weber C., 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance. *J. Cell Mol. Med.* 8, 498-508.
- Kawiak J., 1999. *Cytometria przepływowa – badania immunocytochemiczne*. Immunocytochemia. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
- Kluz J., Adamiec R., 2007. Krążące komórki śródbłonna w zapalnych chorobach naczyń. *Adv. Clinic. Exp. Med.* 16(1), 95-104.
- Lee K.W., Lip G.Y.H., Tayebjee M., 2005. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood.* 105, 526-532.
- Lipski K.M., Ostrowski K., Komender J., 2006. Udział śródbłonna w formowaniu się naczyń. *Post. Biol. Kom.* 33(1), 59-70.
- Makin A.J., Blann A.D., Chung N.A.Y., 2004. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. *Eur. Heart J.* 25, 371-376.
- Miller-Kasprzak E., 2007. EPCs contributing to vascular repair. *Arch. Immunol. et therap. exp.* 55, 247-259.
- Mutin M., Canavay I., Blann A., 1999. Direct Evidence of Endothelial Injury in Acute Myocardial Infarction and Unstable Angina by Demonstration of Circulating Endothelial Cells. *Blood.* 93(9), 2951-2958.
- Paprocka M., Duś D., 2000. Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonnów naczyń. *Post. Biol. Komórki* 2, 247-260.
- Peter K., Nawroth P., Conradt C., 1997. Circulating Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Correlates With the Extent of Human Atherosclerosis in Contrast to Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1, E-Selectin, P-Selectin, and Thrombomodulin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 505-512.
- Poręba M., Usnarska-Zubkiewicz L., Kuliczkowski K., 2006. Rola komórek śródbłonna i prekursorów śródbłonkowych w naczyniotworzeniu. *Prz. Lek.* 63(3), 142-145.

Robak E., Kiersten M.K., Kulczycka L., 2007. Rola komórek śródbłónka w patogenezie układowego toczenia rumieniowatego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 61, 413-419.

Rość D., Ogorzeja W., Kotschy M., 2004. Selektyny E i P w osoczu krwi osób z chorobą niedokrwinną serca, operowanych w krążeniu pozaustrojowym. *Folia Cardiol.* 11(10), 733-739.

Sawicki W., 2003. *Histologia*. Wyd. PZWL Warszawa.

Shirani S., Darabian S., Jozaghi S., 2009. Correlation between endothelial dysfunction in normal coronary patients with slow flow and aortic ectasia: The first report. *Cardiol. J.* 16, 146-150.

Walski M., Frontczak-Baniewicz M., 2007. Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłónka naczyń krwionośnych. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 117, 46-49.

Wasilewska A., Łysiak-Szydłowska W., 1999. Rola homocysteiny jako źródła dysfunkcji śródbłónka naczyń: niezależny czynnik ryzyka miażdżycy. *Żyw. Czł. i Metab.* 26(3), 255-263.

Werner N., Nickenig G., 2006. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 10(2), 318-332.

Wilkołek P., Woźniak M., Gajos G., 1996. Angiogeneza i jej znaczenie. *Przegl. Lek.* 53, 10.

Wnuczko K., Szczepański M., 2007. Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol. Merk. Lek.* 133, 60-65.

<http://www.chemie.tu-darmstadt.de/bt/ab9.gif>

<http://www.chemie.tu-darmstadt.de/bt/Unbenannt.JPG>

<http://www.logbia.republika.pl/ukrwio1.html>

# STĘŻENIE MIĘDZYKOMÓRKOWEJ MOLEKUŁY ADHEZYJNEJ (ICAM-1) I sL-SELEKTYNY W SUROWICY KRWI PACJENTÓW ZE STABILNĄ CHOROBAŁĄ WIĘŃCOWĄ

Maria Krajewska<sup>1</sup>, Magdalena Lampka<sup>1</sup>, Piotr Kaczorowski<sup>1</sup>,  
Tomasz Tyrakowski<sup>1</sup>

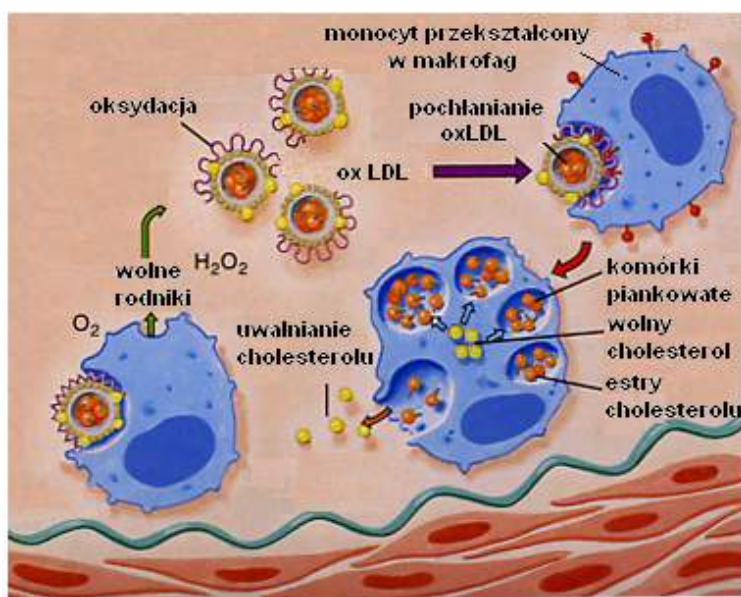
## 1. WPROWADZENIE

Choroby sercowo-naczyniowe są wymieniane wśród najważniejszych przyczyn zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. W Polsce są powodem aż 43% wszystkich zgonów [Baszczuk i in. 2011]. Wśród najważniejszych czynników ryzyka ich występowania nieustannie wymienia się proces miażdżycowy. Miażdżycą jest przewlekłą chorobą dużych i średnich tętnic, której początki obserwuje się już na etapie życia płodowego. Wywołuje ją szereg czynników zarówno osobniczych, jak i środowiskowych. Wśród czynników zapoczątkowujących procesy aterosogenne wymienia się m.in. uszkodzenie śródbłonka naczyń tętniczych, zaburzenia w przemianie lipoprotein oraz zmiany w obrębie makrofagów i komórek mięśni gładkich. Miażdżycą charakteryzuje się powolną akumulacją lipidów, komórek zapalnych oraz składników macierzy pozakomórkowej w ścianie naczyniowej [Baranowska i in. 2005]. Procesy te następują w wyniku długotrwałej odpowiedzi obronnej na czynniki działające w sposób niszczyielski na ścianę naczynia. W procesie progresji zmian miażdżycowych i rozwoju chorób układu krążenia istotną rolę pełni dysfunkcja, aktywacja lub uszkodzenie śródbłonka naczyniowego [Lampka i in. 2012]. Śródbłonek naczyniowy stanowi biologicznie aktywną wyściółkę układu naczyniowego [Wasilewska i Łysiak-Szydłowska 1999]. Pełni rolę selektywnie przepuszczalnej bariery między krwią i jej składnikami a mięśniówką gładką naczyń. Komórki śródbłonka (endotelocyty) pokrywają wnętrze wszystkich naczyń krwionośnych i limfatycznych człowieka oraz jamy serca. Razem z cienką warstwą tkanki łącznej tworzy warstwę wewnętrzną ściany naczyniowej. Odpowiada za regulowanie procesów hemostazy, napięcia naczyniowego i przepuszczalności naczyń. Uczestniczy również w przebudowie ściany naczynia, regulowaniu odpowiedzi zapalnej i immunologicznej oraz w procesach związanych z angiogenezą. Dysfunkcja śródbłonka przejawia się m.in. obniżonym wydzielaniem i nieprawidłową reakcją na tlenek azotu, osłabieniem potencjału fibrynolitycznego i przeciwzakrzepowego, zwiększoną ekspresją czynników chemotaktycznych (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1* – MCP-1). W wyniku dysfunkcji śródbłonka dochodzi do nadmiernej ekspresji molekuł adhezyjnych na jego powierzchni [Modrzejewski i in. 2008]. W odpowiedzi na uszkodzenie śródbłonek zaczyna wydzielać cytokiny prozapalne, które inicjują ekspresję molekuł adhezyjnych (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1* – ICAM-1, sL-selektyna) na powierzchni komórek śródbłonka. Zapoczątkowany zostaje wówczas proces przylegania krążących monocytów do aktywowanych komórek śródbłonka oraz ich migracji do warstwy podśródbłonkowej. Dochodzi do przekształcenia monocytów w makrofagi, z których po wchłonięciu oksydowanych lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *Oxidized*

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kizpatob@cm.umk.pl

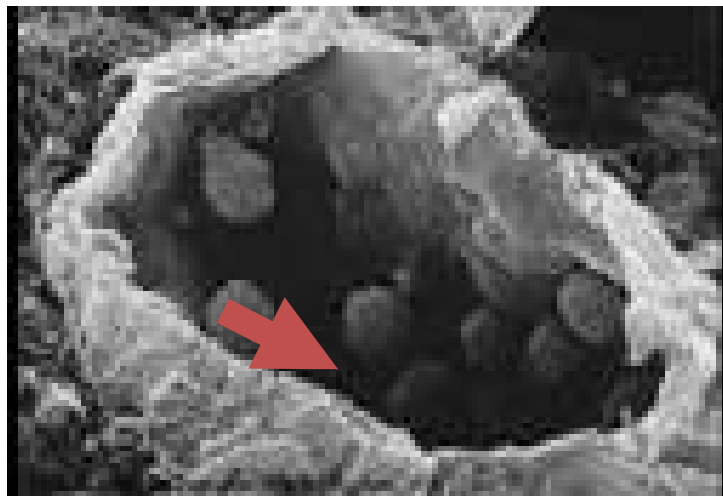
*low-density lipoprotein* – oxLDL) powstają komórki piankowane, stanowiące główny składnik blaszki miażdżycowej (rys.1) [Wasilewska i Łysiak-Szydłowska 1999]. Na skutek zaburzeń w funkcjonowaniu śródbłonna obserwuje się rozwój zmian miażdżycowych oraz postępującą utratę elastyczności tętnic. W konsekwencji może to doprowadzić m.in. do zwężenia lub nawet całkowitego zamknięcia naczyń wieńcowych, obniżenia perfuzji tkankowej, wzrostu obciążenia następczego serca, a w ostateczności do wystąpienia pełnoobjawowej choroby niedokrwiennej serca, która stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia [Bessinger 2002].



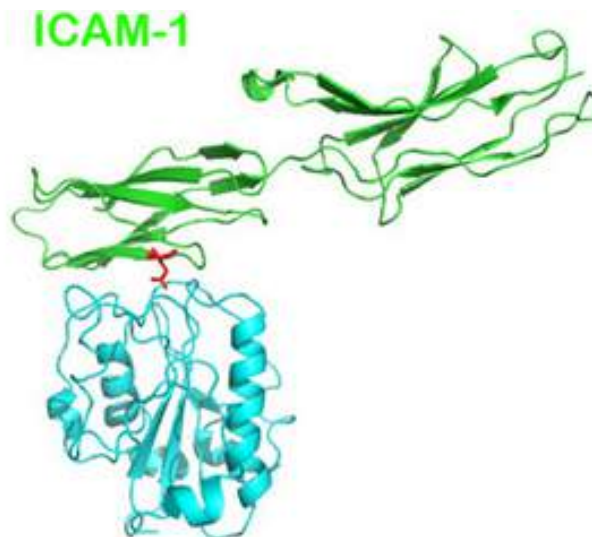
Rys. 1. Proces powstawania komórek piankowych, głównego składnika blaszki miażdżycowej (opracowano na podstawie [<http://www.mcb.barkley.edu>])

Molekuły adhezyjne (ang. *cell adhesion molecules* – CAM), określane również mianem adhezyn, są grupą glikoprotein o zróżnicowanej budowie – białek receptorowych zlokalizowanych na powierzchni śródbłonna [Żerdziński i in. 2012]. Stanowią integralną część błon komórkowych śródbłonna, płytek krwi, leukocytów, komórek nabłonka i fibroblastów [Fal i in. 2003]. Mogą być stale obecne na powierzchni komórek lub też pojawiać się na skutek zewnętrznej stymulacji. Poprzez umożliwianie przylegania leukocytów do śródbłonna uczestniczą w pierwszym etapie procesu migracji leukocytów do ściany naczyniowej (rys. 2). Ekspresja molekuł adhezyjnych zostaje wywołana przez proces zapalny. CAM pojawiają się podczas aktywacji komórek śródbłonna cytokinami prozapalnymi, tj. TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ . Występują w szczególności w obrębie połączeń międzykomórkowych. Warunkują proces wiązania się leukocytów i płytek krwi z komórkami śródbłonna. Do ich głównych funkcji zalicza się zachowywanie ciągłości tkankowej, udział w interakcjach międzykomórkowych oraz wpływ na adhezję i migrację komórek przez błonę wewnętrzną tętnic [Mizia-Stec i in. 2003, Głowińska-Olszewska i in. 2005]. Zaktywowane molekuły adhezyjne podlegają złuszczeniu z powierzchni komórek i pojawiają się w krążeniu jako formy rozpuszczalne (solu-

ble CAM, sCAM), dzięki czemu możliwe jest ich oznaczenie w surowicy krwi. Rozpuszczalne formy molekuł adhezyjnych blokują odpowiednie receptory powierzchniowe komórek i hamują procesy integracji międzykomórkowych [Zapolska-Downar 2002]. Molekuły adhezyjne ze względu na podobieństwa w budowie można podzielić na trzy grupy: selektyny, integryny oraz cząsteczki immunoglobulinopodobne. Do molekuł adhezyjnych uczestniczących w powstawaniu zmian miażdżycowych w ścianie tętnic należy międzykomórkowa molekula adhezyjna (ICAM-1, rys. 3) oraz L-selektyna (LECAM-1, LAM-1).

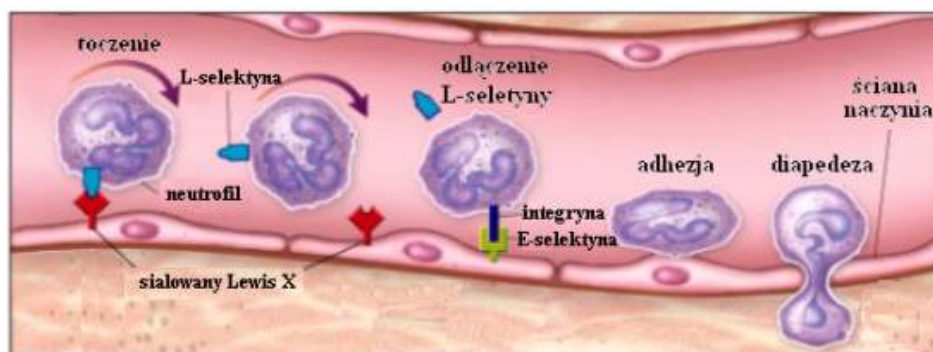


Rys. 2. Proces adhezji leukocytów do śródbłonka naczyniowego (powiększenie 16 000x)  
[[http://www.geocities.com/artandersonmd/anderson\\_hev\\_sem600.jpg](http://www.geocities.com/artandersonmd/anderson_hev_sem600.jpg)]



Rys. 3. Struktura międzykomórkowej molekuly adhezyjnej (ICAM-1)  
(opracowano na podstawie [[http://wang.dfc.harvard.edu/structures\\_adhesion.html](http://wang.dfc.harvard.edu/structures_adhesion.html)])

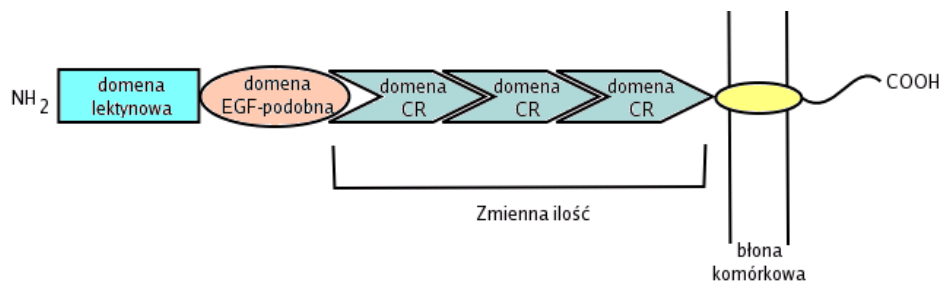
ICAM-1 stanowi śródbłonkowy ligand dla integryn występujących na powierzchni leukocytów. Na skutek jego oddziaływania z integrynami dochodzi do uszkodzenia ciągłości śródbłonka, co umożliwia zachodzenie procesu diapedezy (migracja komórek do wnętrza ściany naczyniowej, rys. 4). Bierze udział w adhezji i migracji leukocytów przez barierę komórek śródbłonka. Jest receptorem dla  $\beta$ 2-integryn leukocytów oraz wielu typów rhinowirusów. Ekspresja ICAM-1 wykazuje niski poziom na komórkach będących w stanie spoczynku, jednakże może wzrastać po stymulacji cytokinami prozapalnymi oraz pod wpływem sił ścinających działających na naczynie [Majewska 2003, Jarosz i Nowicka 2001].



Rys. 4. Schemat obrazujący proces toczenia leukocytów, ich adhezję do komórek śródbłonka oraz diapedezę (opracowano na podstawie [<http://www.chronicprostatitis.com>])

Selektyny to rodzina białek, których cząsteczki mają wspólny plan budowy. W błonie komórkowej umieszczone są N-końcem na zewnątrz. Cząsteczka selektyn tworzona jest przez domenę lektynową, domenę EGF-podobną, domenę homologiczną z białkami regulującymi dopełniacz (CR), występującymi, w zależności od rodzaju selektyny, w liczbie od 2 do 9, fragmentu przezbłonowego, przechodzącego przez błonę i kotwiczącego w niej cząsteczkę oraz fragmentu wewnątrzkomórkowego z C-końcem (rys. 5) [Żebrowski 1991]. Selektyny obecne na powierzchni śródbłonka naczyniowego powodują zmniejszenie prędkości przepływu, aktywację leukocytów i płytek płynących z prądem krwi oraz są odpowiedzialne za procesy kotwiczenia i toczenia leukocytów po jego powierzchni. Procesy te stanowią pierwsze etapy migracji krwinek białych do wnętrza ściany naczyniowej. Połączenie selektyn z leukocytami generuje sygnały, które doprowadzają do inicjacji odpowiedzi zapalnej. Selektyny wiążą się z białkami zróżnicowanymi pod względem chemicznym. Najczęściej spotykanymi ligandami dla selektyn są mucyny (białka połączone z cukrami za pomocą wiązania O-glikozydowego) [Bednarska-Chlebowska i in. 2001, Mizia-Stec 2003]. L-selektyna jest najmniejszą ze wszystkich poznanych selektyn, ponieważ zawiera dwie domeny CR. Występuje konstytutywnie na monocytach, granulocytach i limfocytach, ale jest również obecna na komórkach śródbłonka. Syntetyzowana jest w odpowiedzi na stymulację cytokinową. To molekula adhezyjna nieustannie obecna na powierzchni leukocytów [Gołąb i in. 2004]. W następstwie aktywacji leukocytów ulega złuszczeniu z ich powierzchni. L-selektyna występuje również na powierzchni niewielkich żył, cechujących się wysokim śródbłonkiem, typowych dla unaczynienia węzłów chłonnych [Majewska 2003]. Odgrywa więc istotną rolę w rekrutacji limfocytów do tych narządów. Bardzo ważny

jest także udział L-selektyny w ściąganiu neutrofilii do ognisk zapalnych [Zapolska-Downar 1995]. W czasie zapalenia L-selektyna wykazuje się interakcją z P-selektyną występującą na śródbłonku naczyń krwionośnych. Brak jednej z tych selektyn co prawda nie wpływa znacząco na zahamowanie toczenia się leukocytów po śródbłonku, ale gdy brakuje ich obu, dochodzi do całkowitego zatrzymania tego procesu [Żebrowski 2001].



Rys. 5. Schemat budowy selektyny; objaśnienia w tekście [<http://pl.wikipedia.org/wiki/Selektyny>]

Nieustannie poszukuje się nowych markerów chorób sercowo-naczyniowych, które będą w stanie dostatecznie szybko wykryć zbliżające się zagrożenie ze strony niewłaściwie funkcjonującego układu sercowo-naczyniowego. W licznych doniesieniach medycznych pojawiły się hipotezy, iż molekuly adhezyjne mogą być zaliczane do grupy dobrych markerów chorób sercowo-naczyniowych.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena stężenia rozpuszczalnej formy molekuly adhezyjnej sICAM-1 jako markera aktywacji śródbłonka oraz sL-selektyny jako markera aktywacji leukocytów w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Analizowano również wzajemne relacje między badanymi molekułami oraz korelacje między liczbą leukocytów we krwi obwodowej a stężeniem sICAM-1 i sL-selektyny w surowicy krwi badanych osób.

## 3. MATERIAŁ I METODY

### 3.1. Charakterystyka grupy badanej

Grupa badana składała się z 30 pacjentów (22 mężczyzn i 8 kobiet) ze stabilną chorobą wieńcową. Badaniami objęto osoby w wieku 40-76 lat (średnia wieku  $62 \pm 10$  lat). Natomiast do grupy kontrolnej zakwalifikowano 23 potencjalnie klinicznie zdrowe osoby (12 mężczyzn i 11 kobiet) w wieku 29-86 lat (średnia wieku  $54 \pm 13$  lat).

### 3.2. Materiał badany

Materiał badany stanowiła surowica krwi żyłnej o objętości 3 ml. Krew pobierano z zachowaniem warunków standardowych (rano pomiędzy godziną 7.00 a 9.00, od osób będących na czczo i po całonocnym odpoczynku).

Pobraną krew pozostawiano w temperaturze pokojowej w celu jej całkowitego wykrzepienia. Następnie została poddana wirowaniu przez 10 minut z szybkością 3000 obr./min. w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu próbek oddzielono surowicę, zamrożono ją w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  i przechowywano w tych warunkach aż do dnia wykonania oznaczenia. W dniu badania surowicę rozmrożono w temperaturze pokojowej. Badanie zostało wykonane w jednej serii.

### 3.3. Metody laboratoryjne

Stężenia molekuł adhezyjnych w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu gotowych zestawów testowych: Human sICAM-1 ELISA i Human sL-selektyna ELISA firmy Bender MedSystems oraz czytnika mikroplątek Multiscan firmy LabSystems.

Dane dotyczące liczby leukocytów w krwi obwodowej uzyskano z kart historii choroby pacjentów.

### 3.4. Metody statystyczne

Wyniki przeprowadzonych badań poddano analizie statystycznej. Do jej wykonania użyto programu STATISTICA firmy Statsoft. Dla każdego parametru obliczono medianę oraz kwartył dolny i górny. Poziom istotności statystycznej ustalono z zastosowaniem testu U'Manna-Whitneya. Analizy korelacji występujących pomiędzy badanymi parametrami dokonano przy użyciu testu korelacji Spearmana.

## 4. WYNIKI

Przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wyników badań laboratoryjnych w całej grupie badanej (tab. 1).

Grupę pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową charakteryzowały istotnie wyższe ( $p < 0,05$ ) stężenia rozpuszczalnej molekuły adhezyjnej sICAM-1 w porównaniu ze stężeniami u osób reprezentujących grupą kontrolną (rys. 6).

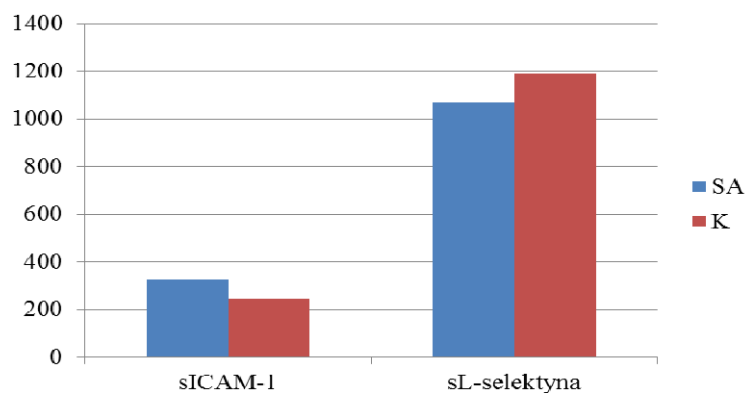
Tabela 1. Wartość oznaczonych parametrów laboratoryjnych w całej grupie badanej

Molekuła adhezyjna ng/ml	Chorzy ze stabilną chorobą wieńcową (SA) n = 30 osób		Grupa kontrolna (K) n = 23 osoby	
	Mediana	Q25-Q75	Mediana	Q25-Q75
sICAM-1	322*	250-366	246	214-267
sL-selektyna	1069*	880-1243	1190	1092-1467

\* statystycznie istotna różnica pomiędzy wynikami grupy badanej i kontrolnej przy wartości  $p < 0,05$

Stężenia sL-selektyny u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową były natomiast statystycznie istotnie niższe ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną (rys. 6).





Rys. 6. Stężenie sICAM-1 oraz L-selektyny w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową (SA) oraz osób z grupy kontrolnej (K)

W grupie badanej zaobserwowano występowanie istotnej korelacji dodatniej pomiędzy stężeniem rozpuszczalnej L-selektyny a stężeniem sICAM-1 ( $r = 0,4142$ ,  $p < 0,05$ ) w surowicy krwi (tab. 2).

Tabela 2. Współczynnik korelacji ( $r$ ) pomiędzy stężeniem sL-selektyny a stężeniem sICAM-1

	sL-selektyna
sICAM-1	$r = 0,4142$ $p < 0,05$

Stężenie żadnej z oznaczanych molekuł adhezyjnych nie wykazywało korelacji z liczbą leukocytów w surowicy krwi badanych osób.

## 5. DYSKUSJA

Choroby serca i naczyń są poważnym problemem epidemiologicznym we współczesnym świecie. Stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia oraz życia ludzkiego na całym świecie. Nic więc dziwnego, że naukowcy z całego świata nieustannie podejmują próby identyfikacji markerów pozwalających na dostatecznie szybką prognozę możliwości wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. Do grona takich markerów można zakwalifikować molekuły adhezyjne ICAM-1 i L-selektynę, które są przydatne w ocenie zagrożenia wystąpieniem incydentów sercowo-naczyniowych w przyszłości oraz do oceny skuteczności obecnie stosowanej terapii leczniczej w przypadku osób ze stwierdzoną stabilną chorobą wieńcową.

W pracy oceniano stężenia rozpuszczalnych form molekuł adhezyjnych w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, sICAM jako markera aktywacji śródbłonna naczyniowego i sL-selektyny jako markera aktywacji leukocytów. Badania wykazały, że stężenia sICAM-1 w grupie pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową były istotnie wyższe ( $p < 0,05$ ) w porównaniu ze stężeniami u osób z grupy kontrolnej. Również badania przeprowadzone w innych ośrodkach badawczych wskazywały na wyższe wartości stężeń molekuly adhezyjnej ICAM-1 u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową niż u osób z grupy kontrolnej. Podwyższone stężenia rozpuszczalnej formy

molekuły adhezyjnej ICAM-1 w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową wykazali także Güray i in. [2004], Haught i in. [1996], Hwang i in. [1997] oraz Modrzejewski i in. [2008]. W badaniach Jarosz i in. [2001] odnotowano także wyższe stężenia sICAM-1 w surowicy krwi pacjentek ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu z wynikami, jakie uzyskano u zdrowych kobiet.

Jednakże nie wszyscy autorzy potwierdzają wzmożoną ekspresję molekuły adhezyjnej ICAM-1 w przebiegu stabilnej choroby wieńcowej. W badaniach Mizi-Stec i in. [2002] oraz Peter i in. [1997] nie obserwowano podwyższonego stężenia molekuły adhezyjnej ICAM-1 u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku badań prowadzonych przez Peter i in. decydujący wpływ na wyniki mogła wywierać niewielka liczebność grupy badanej. W wielu badaniach porównywano stężenia sICAM-1 w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową ze stężeniem tej molekuły u pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową i zawałem mięśnia sercowego. W badaniach Güray i in. [2004] stężenia sICAM-1 nie różniły się pomiędzy tymi grupami. Na podstawie tych wyników uznano, że stężenia sICAM-1 nie różnicują stopnia zaawansowania choroby. Niejednoznaczne wyniki badań odnoszące się do ICAM-1 wskazują na mniejszą przydatność tej molekuły jako wskaźnika uszkodzenia śródbłonna w przebiegu choroby niedokrwiennej serca. Może być to związane z występowaniem tej molekuły na różnych typach komórek. Ekspresja ICAM-1 występuje nie tylko na komórkach śródbłonna, ale również na komórkach krwiotwórczych, nabłonkowych, komórkach mięśni gładkich i fibroblastach. Haught i in. [1996] również nie stwierdzili wpływu zaawansowania choroby niedokrwiennej serca na stężenie sICAM-1 w surowicy krwi. Było ono podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej w tym samym stopniu we wszystkich postaciach choroby niedokrwiennej serca (stabilnej chorobie wieńcowej, niestabilnej chorobie wieńcowej oraz w zawałe mięśnia sercowego). Odmiennie wyniki uzyskali Ghaisan i in., którzy obserwowali niższe stężenia sICAM-1 u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową niż u pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową.

Wzrost stężenia sICAM-1 w surowicy krwi pacjentów ze wszystkimi postaciami choroby niedokrwiennej serca odzwierciedla zdaniem Güray i in. [2004], Haught i in. [1996] oraz Ghaisan i in. nasilenie procesów zapalnych w ścianie naczyniowej. Procesy te inicjują i wpływają na progresję zmian miażdżycowych.

W badaniach własnych analizowano również stężenie sL-selektyny w surowicy krwi pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Stężenia sL-selektyny u tych pacjentów były istotnie niższe ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Haught i in. [1996] oraz Giannitsis i in. [2000] także obserwowali obniżone stężenia sL-selektyny u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Obniżenie stężenia sL-selektyny w tym przypadku może świadczyć o tym, że nadmierna stymulacja leukocytów w przebiegu stabilnej choroby wieńcowej prowadzi do ich wyczerpania czynnościowego.

Wskaźnikiem nasilenia ogólnoustrojowych procesów zapalnych może być wzrost liczby leukocytów w krwi obwodowej. W badaniach własnych nie zaobserwowano występowania korelacji pomiędzy stężeniem molekuł adhezyjnych a liczbą leukocytów w surowicy krwi badanych osób. Istnienie takiej zależności stwierdzali jednak inni autorzy. Baszczuk i in. [2011] obserwowali znamiennej korelację pomiędzy liczbą leukocytów a stężeniem rozpuszczalnych form molekuł adhezyjnych u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową oraz u osób chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. Podobnie Bossowska i in. [2003] w badaniach, którymi objęto pacjentów ze stabilną cho-

robą wieńcową, wykazali dodatnią korelację pomiędzy stężeniem molekuly adhezyjnej ICAM-1 a liczbą leukocytów. Odmienne tendencje w badaniach własnych mogą wynikać z niezbyt licznej grupy badanej.

W literaturze medycznej pojawiły się również doniesienia, że molekula adhezyjna ICAM-1 jako marker uszkodzenia śródbłonka naczyniowego występuje w zwiększonych stężeniach w surowicy krwi osób chorych na nadciśnienie tętnicze. Badania Luisa i in. [Rohde i in. 1999] wykazały, że stężenia tej molekuly są znacząco podwyższone u chorych na nadciśnienie tętnicze, co potwierdziło powyższe doniesienia.

Wyniki wielu obserwacji wskazują na możliwość wykorzystywania molekuly adhezyjnej ICAM-1 jako markera rozwijających się zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych, mogących prowadzić do występowania incydentów klinicznych. Hwang i in. [1997] zaobserwowali, że pacjenci z wyższymi stężeniami molekuly adhezyjnej ICAM-1 mieli bardziej uszkodzony śródbłonek w porównaniu z pacjentami z niższymi stężeniami tej molekuly. Stwierdzili także, że stężenie molekuly adhezyjnej odzwierciedla tendencje do późniejszego występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych. Zdaniem Blankenberga i in. [2001] molekuly adhezyjne mogą być użyteczne w szczególności w prognozowaniu występowania nagłych incydentów naczyniowych u osób z udokumentowaną chorobą układu sercowo-naczyniowego. W opracowaniu Mulvihilla i in. [2002] ocena stężenia molekul adhezyjnych uważana jest za narzędzie diagnostyczne niezwykle przydatne w określaniu ryzyka przede wszystkim u osób z bezobjawowym przebiegiem choroby, jak i z grupy wysokiego ryzyka oraz u osób z udokumentowaną chorobą i występowaniem incydentów sercowo-naczyniowych. Jedynie Blann i in. [1996] nie potwierdzają roli molekul adhezyjnych jako wskaźników prognostycznych dla incydentów sercowo-naczyniowych mogących wystąpić w przyszłości. W badaniach tych autorów wykazano istotnie wyższy poziom molekuly adhezyjnej ICAM-1 u osób ze stabilną chorobą wieńcową niż u osób ze świeżym zawałem mięśnia sercowego.

Na podstawie przedstawionych danych literaturowych wydaje się jednak, że sICAM-1 i sL-selektyna mogą być niezwykle przydatne w ocenie zagrożenia incydentami sercowo-naczyniowymi oraz w ocenie skuteczności stosowanej terapii u pacjentów z miażdżycą. Jak podkreślają niektórzy badacze, ocena poziomu tych molekul adhezyjnych prognozuje rozwój choroby niedokrwiennej, ale ich znaczenie diagnostyczne ma zastosowanie jedynie w przypadku stabilnego okresu choroby.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią poważny problem zdrowotny wśród populacji całego świata. Dlatego też naukowcy starają się zidentyfikować struktury mogące posłużyć za markery tych schorzeń. Liczne doniesienia medyczne starają się odpowiedzieć na pytanie, czy molekuly adhezyjne mogą być przydatne jako markery choroby wieńcowej. Pojawiły się hipotezy, iż oznaczanie molekul adhezyjnych może być dobrym markerem chorób sercowo-naczyniowych.

W wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż podwyższone stężenia sICAM-1 potwierdzają wzmożoną aktywację śródbłonka naczyniowego u osób ze stabilną chorobą wieńcową. Występowanie niższego w porównaniu z grupą kontrolną stężenia rozpuszczalnej L-selektyny może świadczyć o tym, że nadmierna stymulacja leukocytów w przebiegu stabilnej choroby wieńcowej prowadzi do ich wyczerpania czynnościowego. Nasilonej aktywacji śródbłonka towarzyszy wzmożona stymulacja

leukocytów. Liczba leukocytów nie jest powiązana ze stopniem ich aktywacji oraz nie wpływa na nasilenie aktywacji śródbłonna. Wszystko to świadczy o tym, iż zarówno ICAM-1, jak i L-selektyna mogą z powodzeniem być doskonałymi markerami chorób sercowo-naczyniowych i czynnikami prognostycznymi występowania incydentów sercowo-naczyniowych.

## LITERATURA

Baranowska A., Ogórek M., Drózd J., 2005. Patofizjologia ostrych zespołów wieńcowych. *Forum Kardiologów* 10, 56-58.

Baszczuk A., Kopczyński Z., Deręgowska P., Pupek-Musialik D., Cymerys M., Kopczyński J. 2011. Ocena wybranych laboratoryjnych parametrów stanu zapalnego u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Nadciśn. Tętn.* 15, 251-257.

Bednarska-Chlebowska D., Adamiec R., Pawlikowski A., Adamiec J., 2001. Wybrane aspekty czynności śródbłonna. II. Udział selektyn w uszkodzeniu śródbłonna naczyniowego. *Pol. Merk. Lek.* 70, 329-332.

Bessinger A., 2002. Choroba niedokrwienna serca. Część I: Patogeneza i prewencja pierwotna. *Lek. Rodz.* 9, 18-28.

Blankenberg S., Rupprecht H.J., Bickel C. i in., 2001. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 104, 1336-1342.

Blann A.D., Amiral J., McCollum C.N., 1996. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in ischaemic heart disease. *Br. J. Haematol.* 95, 263-265.

Bossowska A., Kiersnowska-Rogowska B., Bossowski A., Galar B., Sowiński P., 2003. Ocena stężenia wybranych cząsteczek adhezyjnych (sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin) w stabilnej i niestabilnej chorobie niedokrwiennej serca oraz w zawale mięśnia sercowego. *Prz. Lek.* 60, 445 – 450.

Fal A.M., Jankowska A., Garstka H., Małolepszy J., 2003. Rola cząsteczek adhezyjnych w patofizjologii procesów chorobowych – perspektywy terapeutyczne. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 110, 765-772.

Giannitsis E., Tettenborn I., Wiegand U., Stierle U., Katus H.A., 2000. Soluble L-selectin and neutrophil derived oxidative stress after pacing induced myocardial ischemia in chronic stable coronary artery disease. *Pacing. Clin. Electrophysiol* 23, 309-314.

Głowińska-Olszewska B., Urban M., Tołwińska J., Peczyńska J., Florys B., 2005. Ocena korelacji między biochemicznymi i biofizycznymi markerami uszkodzenia śródbłonna u dzieci z cukrzycą typu 1. *Endok. Diabet. Ch. Prze. Mat. W. Dziec.* 11(4), 221-227.

Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., 2004. *Immunologia*, Wyd. Nauk. PWN Warszawa.

Güray Ü., Erbay A. R., Güray Y. i in., 2004. Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Int. J. Card.* 96, 235-240.

- Hought W. H., Mansour M., Rothlein R. i in., 1996. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: Further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am. Heart J.* 132, 1-8.
- Hwang S.J., Ballantyne C.M., Sharrett A.R., Smith L.C., Davis C.E., Gotto A.M., Boerwinkle E., 1997. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerotic Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 96, 2, 4219-4225.
- Jarosz A., Nowicka G., 2001. Molekuły adhezyjne – potencjalny marker zmian w obrębie komórek śródbłonna sprzyjających rozwojowi miażdżycy. *Post. N. Med.* 14, 39-41.
- Jarosz A., Nowicka G., 2010. Molekuły adhezyjne w diagnostyce choroby niedokrwiennej serca. *Post. N. Med.* 10, 807-812.
- Lampka M., Grąbczewska Z., Krajewska M. i in., 2012. Endothelial cell markers in coronary artery disease. *Post. Kardiol. Inter.* 8, 275-279.
- Majewska E., 2003. Udział cząsteczek adhezyjnych w procesie zapalnym. *Diag. Lab.* 39, 409-420.
- Mizia-Stec K., Zahorska-Markiewicz B., Goliszek L., 2003. Molekuły adhezyjne a miażdżycy i choroba wieńcowa. *Prz. Lek.* 60, 147-150.
- Mizia-Stec K., Zahorska-Markiewicz B., Mandecki T., Janowska J., Szulc A., Jastrzębska-Maj E., 2002. Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 83, 143-150.
- Modrzejewski W., Knapp M., Dobrzyń A., Musiał W.J., Górski J., 2008. Ceramidy i cząsteczki adhezyjne w stabilnej chorobie niedokrwiennej serca. *Przegl. Lek.* 65, 131-134
- Mulvihill N.T., Foley J.B., Crean P., Walsh M., 2002. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur. Heart J.* 23, 1569-1574.
- Peter K., Nawroth P., Conradt C. i in., 1997. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 3, 505-512.
- Rohde L.E., Hennekens C.H., Ridker P.M., 1999. Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factor in apparently healthy men. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1595-1599.
- Wasilewska A., Łysiak-Szydłowska W., 1999. Rola homocysteiny jako źródła dysfunkcji śródbłonna naczyń: niezależny czynnik ryzyka miażdżycy. *Żyw. Czł. i Metab.* 26, 255-263.
- Zapolska-Downar D., 1995. Miażdżycy: indukcja i modyfikacja interakcji międzykomórkowych, rola lipoprotein. *Czyn. Ryz.* 3-4, 19-26.
- Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., 2002. Miażdżycy jako przewlekła choroba zapalna. *Przegl. Lek.* 59, 147-152.

Żebrowski M.R., 1991. Udział czynnika zapalnego w patogenezie niestabilnej choroby wieńcowej. Pol. Prze. Kard. 1, 129-133.

Żebrowski M. R., Kierus A., Żebrowska A., 2001. Procesy molekularne w patogenezie niestabilnej choroby wieńcowej. Nowa klin. 7, 1031-1035.

Żerdziński M., Rychlik M., Partyka R., 2012. Rola selektyn w rozwoju odpowiedzi zapalnej, J. Lab. Diagnost. 48(3), 347-351.

<http://pl.wikipedia.org/wiki/Selektyny>

[http://wang.dfci.harvard.edu/structures\\_adhesion.html](http://wang.dfci.harvard.edu/structures_adhesion.html)

<http://www.chronicprostatitis.com>

[http://www.geocities.com/artandersonmd/anderson\\_hev\\_sem600.jpg](http://www.geocities.com/artandersonmd/anderson_hev_sem600.jpg)

<http://www.mcb.barkley.edu>

# ZASTOSOWANIE PRZEZSKÓRNEJ ELEKTRYCZNEJ STYMULACJI NERWÓW TENS W TERAPII ZESPOŁÓW BÓLOWYCH KRĘGOSŁUPA

Dorota Ratuszek-Sadowska<sup>1</sup>, Kamila Woźniak<sup>2</sup>,  
Mikołaj Kowalski<sup>1</sup>, Wojciech Hagner<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Przezskórna elektryczna stymulacja nerwów TENS (ang. *Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*) jest jednym ze sposobów nefarmakologicznego leczenia bólu, będącym coraz popularniejszą formą postępowania zarówno w bólu przewlekłym, jak i ostrym. TENS to szczególnie rodzaj elektrostymulacji wykorzystujący prądy impulsowe małej częstotliwości, o trójkątnych, prostokątnych lub sinusoidalnych kształtach impulsów, głównie do leczenia bólu [Świt-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001, Liana i in. 2008].

Prądy TENS wykorzystywane są przede wszystkim jako zabieg przeciwbólowy, stosowane są m.in. w zespołach bólowych kręgosłupa, stawów biodrowych i neuralgii. Są one jednym z elementów kompleksowego leczenia schorzeń kręgosłupa.

Obecnie najczęściej stosowaną metodą jest wysokoczęstotliwa stymulacja HF TENS, tzw. stymulacja konwencjonalna, wykorzystująca prądy impulsowe o częstotliwości 50-110 Hz i czasie trwania impulsu 100-200  $\mu$ s. Efekt analgetyczny uzyskiwany w trakcie tego zabiegu jest wynikiem aktywacji mechanizmów hamujących proces przewodzenia bodźców bólowych na poziomie rdzeniowym (teoria kontrolowanego przepustu rdzeniowego Melzacka i Walla) [Świt-Chmielewska i in. 2001, Pyszora i Kujawa 2003, Bańburski i in. 2006, Liana i in. 2008].

Zespoły bólowe kręgosłupa są lawinowo narastającą „epidemiczną” chorobą społeczeństw wysoko rozwiniętych. Stanowią one główny powód wizyt pacjentów w gabinetach terapeutów, a także drugą pod względem częstości przyczynę niepełnosprawności fizycznej i absencji w pracy. Występują zarówno u osób pracujących fizycznie, jak i u pracowników umysłowych pozostających przez wiele godzin w pozycji siedzącej, obniżając istotnie komfort życia chorych cierpiących z ich powodu. Leczenie bólu związanego z dysfunkcją kręgosłupa lędźwiowego nadal pozostaje wyzwaniem, pomimo że poza farmakoterapią coraz większą uwagę poświęca się odpowiednio dobranym metodom fizjoterapeutycznym [Głowacka 2004, Bańburski i in. 2006, Świerkot 2006].

W literaturze można znaleźć wiele sprzecznych doniesień oceniających skuteczność TENS w leczeniu dolegliwości bólowych o różnej etiologii. Istnieją znaczne różnice w ocenie przydatności tej metody w leczeniu bólu, wynikające często z braku jednoznacznych kryteriów jej stosowania, związanych głównie z doбором czasu zabiegu, pa-

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: klreh@cm.umk.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kknchintr@cm.umk.pl

rametrów prądu i rozwojem tolerancji na ich działanie [Thompson 2001, Bańburski i in. 2006].

## 2. MECHANIZM ELEKTROANALGEZJI

Mechanizm elektroanalgezji tłumaczy ogłoszona w 1965 roku teoria kontrolowanego przepustu rdzeniowego Melzacka i Walla, zwana „teorią bramki kontrolnej” (ang. *gate control theory*), która opiera się na wybiórczym pobudzaniu receptorów bólowych (nocyceptorów) A $\delta$  i C. Według tej teorii impulsy bólowe, które biegną do wzgórza drogami rdzeniowo-wzgórzową boczną i przyśrodkową, mogą zostać w odpowiedni sposób zablokowane [Świt-Chmielewska i in. 2001, Liana i in. 2008].

Ścisłe określone mechanizmy zachodzące w centralnym układzie nerwowym prowadzą do percepcji bólu. Informacja bólowa biegnie z receptorów bólowych (nocyceptorów), które rozmieszczone są w większości tkanek naszego organizmu, włóknami dośrodkowymi mielinowymi A $\delta$  oraz bezmielinowymi C, docierając w postaci impulsu elektrycznego do zwoju rdzeniowego, powodując uwalnianie odpowiednich substancji – neuroprzekaźników i neuromodulatorów. W neuronach rogów tylnych rdzenia kręgowego neuroprzekaźniki łączą się z właściwymi receptorami i następuje przetwarzanie informacji bólowej, jak również modulowanie przewodzonych impulsów. Procesy te umożliwiają zahamowanie uwalniania neuroprzekaźników z ośrodkowych zakończeń aferentnych oraz hamowanie lub torowanie aktywności rogów tylnych rdzenia. Zstępujący układ antynocyceptywny również odgrywa znaczącą rolę w przetwarzaniu informacji bólowej, modulując procesy nocycepcji na poziomie rogów tylnych rdzenia. Końcowy etap przetwarzania informacji polega na uświadomieniu bólu i reakcji emocjonalnej. Na podstawie teorii „bramki kontrolnej” stwierdzono, że selektywna stymulacja grubych (A $\alpha$ ) i średnio grubych (A $\beta$ ) włókien nerwowych wywołuje hamowanie aktywności cienkich włókien nerwowych, odpowiadających za przekazywanie bodźców bólowych [Garrison i Foreman 1994, Taradaj 2001, Pyszora i Kujawa 2003, Liana i in. 2008].

Informacje bólowe biegną także przez specjalne komórki transmisyjne (T), przechodząc przez substancję galaretowatą rdzenia kręgowego. Stymulacja włókien mielinowych wywołuje „zamknięcie bramki” w rogach tylnych rdzenia kręgowego, powodując blok presynaptyczny w ośrodkowych zakończeniach włókien A $\delta$  i C, które przewodzą czucie bólu z tkanek obwodowych do rogów tylnych rdzenia kręgowego. W wyniku tego dochodzi do hamowania przepływu impulsów bólowych do wyższych piętér centralnego układu nerwowego.

Przezskórna stymulacja nerwów wykorzystując ten mechanizm powoduje analgezję na poziomie rdzenia kręgowego, jak również aktywuje zstępujący układ antynocyceptywny, który uwalnia endogenne opioidy [Garrison i Foreman 1994, Pyszora i Kujawa 2003, Liana i in. 2008].

Współcześnie najbardziej powszechna jest opinia, że „teoria bramki kontrolnej” wpłynęła na zrozumienie istoty bólu, gdyż dzięki niej zwrócono uwagę na neuronalne mechanizmy rdzeniowe i nadrdzeniowe. Teoria ta przyczyniła się do zmiany postrzegania mózgu – zaczęto uznawać go za aktywny układ, który selekcjonuje, filtruje i moduluje dochodzące do niego bodźce. Rogi grzbietowe rdzenia przestały być postrzegane jako bierne stacje przekaźnikowe, lecz jako miejsca, gdzie dochodzi do wielu dynamicznych procesów modulowania (hamowania lub torowania) przepływu informacji bólowej [Garrison i Foreman 1994, Pyszora i Kujawa 2003].



### 3. RODZAJE TENS

Wśród stosowanych w praktyce klinicznej odmian TENS wyróżnia się:

- stymulację konwencjonalną o wysokiej częstotliwości – ang. *conventional, high frequency TENS* (HF TENS), opierającą się na wykorzystaniu częstotliwości impulsów podobnych do częstotliwości wyładowań grubych włókien czuciowych A $\beta$ , powodując ich szybkie „zmęczenie”;
- stymulację elektroakupunkturową o niskiej częstotliwości – ang. *acupuncture, low frequency TENS* (LF TENS), wykorzystującą częstotliwość impulsów 1-4 Hz;
- stymulację uderzeniową o niskiej częstotliwości skojarzoną z wiązkami szybkiej stymulacji – ang. *low frequency puls train TENS* lub *burst frequency TENS*, polegającą na stosowaniu impulsów podstawowych, o częstotliwości 2 Hz, oraz występującej po nich krótkotrwałej wiązki szybkiej stymulacji o częstotliwości 80-100 Hz;
- stymulację krótką – intensywną – ang. *brief intense TENS*, stosowaną na bazie częstotliwości impulsów wynoszącej 100-150 Hz i natężeniu impulsu wywołującego drżenie i skurcze mięśniowe [Świt-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001, Pyszora i Kujawa 2003].

Obecnie do najczęściej stosowanych metod zalicza się: wysokoczęstotliwą stymulację HF TENS oraz niskoczęstotliwą elektroakupunkturową stymulację LF TENS [Pyszora i Kujawa 2003, Liana i in. 2008].

Parametry TENS wysokoczęstotliwego i niskoczęstotliwego przedstawiono w tabeli 1.

### 4. PARAMETRY TENS

O efektywności przezskórnej stymulacji nerwów TENS decydują m.in. prawidłowo dobrane parametry impulsów:

- 1) rodzaj impulsu – o przebiegu kwadratowym, prostokątnym, trójkątnym, sinusoidalnym:
  - impulsy prostokątne lub kwadratowe zaleca się stosować u pacjentów o zwiększonej wrażliwości na prąd elektryczny oraz gdy dolegliwości bólowe wynikają z uszkodzenia nerwów,
  - impulsy szpilkowe (trójkątne) zaleca się do intensywnej stymulacji, która przekracza próg pobudliwości, np. w ostrych stanach bólowych;
- 2) częstotliwość – liczba impulsów generowanych w ciągu jednej sekundy:
  - częstotliwości uważane za duże (80-100 Hz) wykorzystuje się w przypadkach nagłego bólu w celu uzyskania szybkiej ulgi,
  - mniejsze częstotliwości (1-20 Hz) lepiej sprawdzają się w przypadku bólu o charakterze przewlekłym;
- 3) szerokość (czas trwania) impulsu:
  - czas trwania impulsu w granicach 100-150  $\mu$ s stosuje się na mięśnie prawidłowo unerwione,
  - wydłużenie impulsu do 200-300  $\mu$ s zaleca się w przypadku uszkodzenia układu nerwowo-mięśniowego;
- 4) amplituda (natężenie):

- natężenie prądu modyfikuje się w zależności od doznań pacjenta [Świt-Chmielewska i in. 2001, Kahn 2002, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008].

Należy pamiętać, iż skuteczność zabiegu elektrostymulacji może się zmniejszać wraz z przystosowaniem organizmu do działającego prądu, co powoduje coraz słabsze reakcje na dostarczane bodźce. Tendencji do akomodacji można zapobiec modyfikując którykolwiek z parametrów zabiegu [Taradaj 2001, Kahn 2002, Kasprzak i Mańkowska 2008].

Praktyka kliniczna potwierdza, iż najbardziej skuteczne w działaniu przeciwbólowym wydają się być następujące parametry: częstotliwość 80-100 Hz i natężenie o wartości podprogowej 10-20 mA. Ból ostry niweluje się poprzez zastosowanie wymienionych parametrów w stymulacji ciągłej lub przerywanej, np. 2 godziny stymulacji – 2 godziny przerwy przez 24-27 godzin. Natomiast optymalnym modelem terapii przewlekłych dolegliwości bólowych jest stosowanie TENS w sposób przerywany, 2-3 razy dziennie po 30-60 minut, a w przypadku rehabilitacji prowadzonej w poradni: 2-3 razy w tygodniu przez okres 5-6 tygodni [Świt-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001].

Tabela 1. Parametry TENS niskiej i wysokiej częstotliwości [Liana i in. 2008, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008]

Parametr	Tens wysokoczęstotliwy (HF TENS)	Tens niskoczęstotliwy (LF TENS)
Częstotliwość	50-110 Hz	1-4 Hz
Czas trwania impulsu	100-200 $\mu$ s	100-200 $\mu$ s
Rodzaj impulsu	prostokątny, trójkątny, sinusoidalny	prostokątny, trójkątny, sinusoidalny
Amplituda	do wartości wywołującej bezbolesne parestezje	silna, ale komfortowa
Mechanizm działania	pobudzenie mechanizmów bramki kontrolnej rdzenia kręgowego	pobudzenie centralnego mechanizmu uwalniania endorfin

## 5. UŁOŻENIE ELEKTROD

Ważnym elementem warunkującym skuteczność stymulacji jest rodzaj stosowanych elektrod oraz ich umiejscowienie podczas terapii. Najczęściej korzysta się z elektrod wielorazowego użytku, wykonanych z przewodzącej prąd gumy silikonowej lub metalu. Wymagają one dokładnego pokrycia żelem lub użycia tzw. wilgotnych podkładów w celu ułatwienia przepływu prądu i zabezpieczenia przez oparzeniem skóry. Do stosowanych metod sposobu ułożenia elektrod zalicza się umiejscowienie:

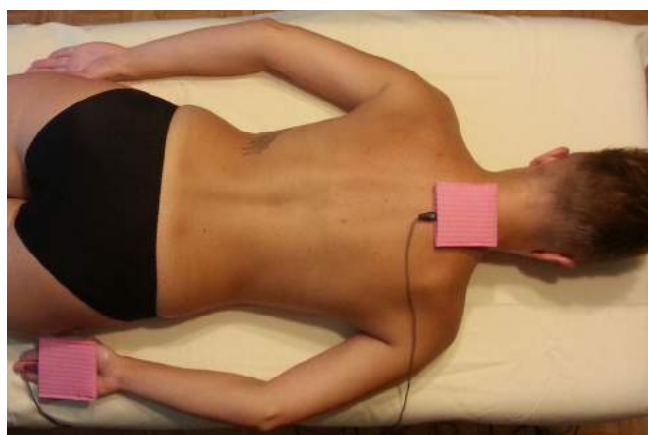
- w obszarze bolesnym,
- w obszarach odruchowo nadwrażliwych stref skórnych (dermatomach),
- na odpowiednich przykręgosłupowych korzeniach nerwowych,
- na odruchowo zmienione strefy mięśniowe (miotomy), kostne (sklerotomy), naczynia krwionośne (angiotomy),
- na przebiegu nerwów obwodowych [Świt-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001, Kahn 2002, Kasprzak i Mańkowska 2008].

Wykorzystanie dwóch obwodów prądowych i/lub ułożenia obustronnego pozwala na zwiększenie obszaru stymulowanego i utrwalenie efektu przeciwbólowego. Stymulację okolicy stawów zaleca się wykonywać w ułożeniu skrzyżnym (interferencyjnym) elektrod, złożonym z dwóch obwodów prądu. W przypadku uszkodzenia nerwów obwodowych elektrody należy ułożyć proksymalnie w stosunku do miejsca uszkodzenia, gdyż stymulacja dystalnie położonych elektrod nasila dolegliwości bólowe. W przypadku uszkodzenia skóry opatrunkiem gipsowym lub półpaścem zaleca się ułożenie kontralateralne [Świt-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001].

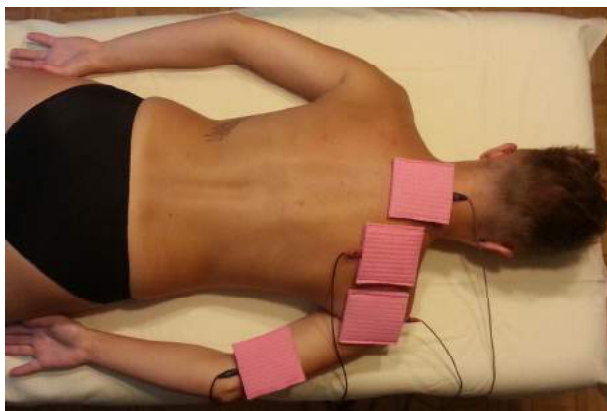
Przykładowe sposoby ułożenia elektrod w zespołach bólowych kręgosłupa przedstawiono na rysunkach 1-8.



Rys. 1. Ułożenie dwuelektrodowe w zespole bólowym odcinka szyjnego kręgosłupa [opracowanie własne]



Rys. 2. Ułożenie dwuelektrodowe w zespole bólowym odcinka szyjnego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny górnej [opracowanie własne]



Rys. 3. Ułożenie czteroelektrodowe (1) w zespole bólowym odcinka szyjnego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny górnej [opracowanie własne]



Rys. 4. Ułożenie czteroelektrodowe (2) w zespole bólowym odcinka szyjnego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny górnej [opracowanie własne]



Rys. 5. Ułożenie dwuelektrodowe w zespole bólowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa [opracowanie własne]



Rys. 6. Ułożenie dwuelektrodowe w zespole bólowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny dolnej [opracowanie własne]



Rys. 7. Ułożenie czteroelektrodowe (1) w zespole bólowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny dolnej [opracowanie własne]



Rys. 8. Ułożenie czteroelektrodowe (2) w zespole bólowym odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa z bólem promieniującym do kończyny dolnej [opracowanie własne]

## 6. ZASTOSOWANIE TENS

Przezsłonna stymulacja nerwów TENS jest wykorzystywana przede wszystkim jako zabieg przeciwbólowy i stosowana zarówno w leczeniu bólu ostrego, jak i przewlekłego, w tym m.in. w zespołach bólowych kręgosłupa, stawów biodrowych i neuralgii. Zabiegi TENS stosuje się z ogromnym powodzeniem w chirurgii: w radikulopatii, bó-

lach fantomowych oraz podczas hartowania kikutów. Wysoką skuteczność uzyskuje się także w zwalczaniu dolegliwości menstruacyjnych, w bólach towarzyszących chorobie zwyrodnieniowej stawów kręgosłupa i stawów obwodowych, w położnictwie oraz bólach stawu skroniowo-żuchwowego [Świst-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001, Kahn 2002, Kasprzak i Mańkowska 2008, Liana i in. 2008, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008].

Zastosowanie stymulacji TENS jest kojarzone przede wszystkim z działaniem analgetycznym, jednak z powodzeniem stosuje się ją w niektórych schorzeniach krążenia obwodowego, leczeniu utrudnionego zrostu kostnego, trudno gojących się ran czy atrofii mięśniowej [Świst-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001].

Działanie przezskórnej elektrostymulacji nie jest natomiast efektywne w przypadku nie zlokalizowanego, rozlanego bólu trzewnego oraz psychogennego. Dyskusyjne jest także stosowanie tej metody w chorobie nowotworowej i jej dolegliwościach [Świst-Chmielewska i in. 2001, Taradaj 2001, Brosseau i in. 2002].

Podczas stosowania elektrostymulacji mogą pojawić także objawy niepożądane, takie jak: skórne odczyny alergiczne lub zapalne, oparzenia skóry czy obrzęki [Taradaj 2001].

## 7. PRECIWSKAZANIA

Przeciwwskazaniami do stosowania prądów TENS są:

- wszczepiony rozrusznik serca,
- stan po udarze mózgu,
- padaczka,
- ostre stany zapalne,
- wyniszczenie organizmu,
- choroby zakaźne,
- metalowe struktury w ciele (endoprotezy),
- oparzenia, odmrożenia,
- zmiany dermatologiczne w obszarze zabiegowym,
- schorzenia naczyń obwodowych III i IV stopień niedokrwienia kończyn dolnych w skali Fountaina,
- zaburzenia czucia,
- cukrzyca,
- niewyrównana choroba nadciśnieniowa [Taradaj 2001, Kinalski 2002, Świerkot 2006, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008].

Nie należy również stosować tej terapii u kobiet w ciąży oraz u osób nie zrównoważonych psychicznie i emocjonalnie. Nie aplikuje się elektrod nad zatoką szyjną, krtańnią, tchawicą, dookoła gałki ocznej oraz na wystających elementach kostnych [Taradaj 2001, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008].

## 8. PODSUMOWANIE

Jednym z podstawowych sposobów leczenia zespołów bólowych kręgosłupa jest ogólnie rozumiana fizjoterapia, której celem jest przywrócenie prawidłowej pracy układu nerwowo-mięśniowo-kostnego kręgosłupa poprzez rozluźnienie lub wzmocnienie

poszczególnych grup mięśni. Ze względu na ich złożoną etiologię postępowanie rehabilitacyjno-lecznicze nie może być jednakowe w każdym przypadku oraz powinno opierać się na rzetelnie przeprowadzonych badaniach diagnostycznych. Praktyka kliniczna i wiele opracowań naukowych wskazują na dużą rolę fizykoterapii w leczeniu zespołów bólowych kręgosłupa, ale niestety zbyt mało jest kontrolowanych i długoterminowych badań oceniających skuteczność działania poszczególnych zabiegów. Jeśli jednak są one prawidłowo zalecane i wykonywane nie niosą za sobą praktycznie działań ubocznych. Głównym celem stosowania zabiegów fizykalnych jest poprawa stanu funkcjonalnego pacjenta oraz zmniejszenie dolegliwości bólowych, które pozwalają na pełniejsze uczestnictwo pacjenta w kinezyterapii. Prawidłowo stosowane leczenie fizykalne stanowi cenne uzupełnienie kompleksowego postępowania analgetycznego, a wielokrotnie nawet alternatywę farmakoterapii [Janco i Trontel 1980, Taradaj 2001, Pyszora i Kujawa 2003, Tomik 2003, Bańburski i in. 2006, Dziak 2007, Straburzyńska-Lupa i Straburzyński 2008].

Zabiegi przeskórnej elektrycznej stymulacji nerwów TENS coraz częściej stosowane są w leczeniu bólu pomimo braku jednoznacznych kryteriów ich stosowania, związanych głównie z doborem czasu zabiegu, parametrów prądu i rozwojem tolerancji na ich działanie. Brak optymalnych podstaw metodycznych zmusza fizjoterapeutów do ich poszukiwania na zasadzie „prób i błędów” [Świst-Chmielewska i in. 2001, Pyszora i Kujawa 2003, Bańburski i in. 2006, Mulvey i in. 2013].

Skuteczność tej metody uwarunkowana jest prawidłowo i indywidualnie dobranymi parametrami impulsu, techniki i metody [Świst-Chmielewska i in. 2001, Kahn 2002, Pyszora i Kujawa 2003, Bańburski i in. 2006, Świerkot 2006].

Prowadzone badania jak dotąd nie udowodniły, że konkretny kształt impulsu może oddziaływać w inny sposób na organizm niż przeciwbólowo. Wskazuje się na brak istotnych różnic pomiędzy stosowaniem impulsów trójkątnych i prostokątnych na stopień analgezji [Meyler i in. 1994, Świst-Chmielewska i in. 2001, Brosseau i in. 2002, Mulvey i in. 2013].

Najistotniejsze znaczenie dla osiągnięcia pożądanego efektu leczniczego TENS przypisuje się częstotliwości impulsów. Część autorów wyraża pogląd, że wysoka częstotliwość impulsów może podnosić próg bólu podczas trwania stymulacji, a następnie jego gwałtowny spadek, natomiast stosowanie stymulacji niskoczęstotliwościowej powoduje stopniowe i dłużej utrzymujące się podwyższenie progu bólu. W jednym z klinicznych eksperymentów zaobserwowano, iż elektrostymulacja o wysokiej częstotliwości podnosi obniżony próg nocyceptywny odruchu zgięciowego, a tym samym próg bólu. Na podstawie tego badania stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie dolegliwości bólowych w kończynie dolnej z bólem korzonkowym. W innych badaniach natomiast nie dowiedziono zmian w progu bólu, pomimo iż uzyskano pożądaną działanie analgetyczne po wpływie TENS [Janco i Trontel 1980, Jette 1986, Świst-Chmielewska i in. 2001].

Kolejnym ważnym parametrem elektrostymulacji jest czas trwania impulsu. Przeprowadzone dotychczas badania wielokrotnie wskazują, że optymalnymi parametrami czasu trwania impulsu w stymulacji czuciowej jest zakres 20-100  $\mu$ s, a dla stymulacji motorycznej 20-200  $\mu$ s. Impulsy o czasie trwania 200-300  $\mu$ s są zalecane w przypadku uszkodzenia układu nerwowo-mięśniowego. Istotnym elementem mającym znaczenie dla osiągnięcia pozytywnego efektu leczniczego TENS jest ułożenie elektrod. Istnieje możliwość wykorzystania tzw. punktów stymulacji nerwów, stymulacji mięśni, punktów akupunkturowych i mięśniowo-powięziowych trigger points celem zwiększenia

skuteczności stymulacji [Meyler i in. 1994, Świst-Chmielewska i in. 2001, Brosseau i in. 2002].

Skuteczność przezskórnej elektrycznej stymulacji nerwów TENS w odniesieniu do szerokiego zakresu zespołów bólowych kręgosłupa wymaga jeszcze potwierdzenia, gdyż badania wielu autorów oceniające skuteczność analgetyczną tej metody dały sprzeczne wyniki. Niektóre prace donoszą o braku statystycznie istotnego wpływu przeciwbólowego tej terapii. Utrudnia to fakt, że bóle kręgosłupa stanowią zespół chorobowy o różnej etiologii i patogenezie, a w kompleksowym leczeniu pacjentów stosuje się najczęściej terapię skojarzoną z innymi zabiegami fizykoterapeutycznymi oraz różnymi formami terapii i każdy czynnik ma wpływ na ostateczny wynik leczenia [Jette 1986, Taradaj 2001, Pyszora i Kujawa 2003, Bańdurski i in. 2006, Mulvey i in. 2013].

Mimo obecności skrajnych doniesień dotyczących skuteczności działania analgetycznego prądów TENS można je uznać za przydatne w walce z bólem, pozwalające w wielu przypadkach uzyskać trwale zmniejszenie lub nawet całkowite zniesienie dolegliwości bólowych. Prawidłowo stosowane prądy TENS są z pewnością techniką bezpieczną, dlatego należy nadal poszukiwać nowych rozwiązań, aby poszerzyć tę technikę i wyeliminować istniejące kontrowersje dotyczące metodyki zabiegów.

## LITERATURA

- Bańburski S., Pyszora A., Krajnik M., Budzyński J., 2006. Działanie przeciwbólowe przezskórnej elektrycznej stymulacji nerwów o wysokiej częstotliwości (H-F TENS). Badanie pilotażowe chorych z przewlekłymi zespołami bólowymi narządy ruchu. *Pol. Med. Paliatywna* 5(3).
- Brosseau L., Milne S., Robinson V., Marchand S., Shea B., Wells G., Tugwell P., 2002. Efficacy of the transcutaneous electrical nerve stimulation for the treatment of chronic low back pain: a meta-analysis. *Spine* 15, 27(6), 596-603.
- Dziak A., 2007. Bóle i dysfunkcje kręgosłupa. *Medicina Sportiva Kraków*.
- Garrison D.W., Foreman R.D., 1994. Decreased activity of spontaneous and noxiously evoked dorsal horn cells during transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *Pain* 58(3), 309-315.
- Głowacka M., 2004. Zespoły bólowe kręgosłupa – diagnostyka i leczenie zachowawcze. *Lekarz* 11, 45-48.
- Janco M., Trontel J., 1980. Transcutaneous electrical nerve stimulation: a microneurographic and perceptual study. *Pain* 9, 219-230.
- Jette D.U., 1986. Effect of different forms of transcutaneous electrical nerve stimulation on experimental pain. *Phys. Ther.* 66(2), 187-190.
- Kahn J., 2002. *Elektroterapia – zasady i zastosowanie*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.
- Kasprzak W., Mańkowska A., 2008. *Fizykoterapia, medycyna uzdrowiskowa i SPA*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.
- Kinalski R., 2002. *Kompendium rehabilitacji i fizjoterapii*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner Wrocław.



- Liana R., Chudański M., Ponikowska I., 2008. Prądy TENS, Träberta oraz Kotz'a w terapii fizykalnej. *Balneol. Pol.* 50 (1), 5-12.
- Meyler W.J., de Jongste M.J., Rolf C.A., 1994. Clinical evaluation of pain treatment with electrostimulation: a study on TENS in patients with different pain syndromes. *Clin. J. Pain.* 10(1), 22-27.
- Mulvey M.R., Radford H.E., Fawcner H.J., Hirst L., Neumann V., Johnson M.I., 2013. Transcutaneous electrical nerve stimulation for phantom pain and stump pain in adult amputees. *Pain Pract.* 13(4), 289-296.
- Pyszora A., Kujawa J., 2003. Zastosowanie elektroterapii w leczeniu bólu. *Pol. Med. Paliatywna* 2(3), 167-173.
- Straburzyńska-Lupa A., Straburzyński G., 2008. Fizjoterapia z elementami klinicznymi, tom I, II. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.
- Świerkot J., 2006. Bóle krzyża – etiologia, diagnostyka i leczenie. *Przew. Lek.* 2(84), 86-98.
- Świst-Chmielewska D., Gieremek K., Polak A., Adamczuk-Bujniewicz H., 2001. Możliwości terapeutyczne przezskórnej elektrycznej stymulacji nerwów (TENS). *Postępy Rehabil.* 15(1), 57-65.
- Taradaj J., 2001. Przydatność przezskórnej elektrycznej stymulacji nerwów TENS w leczeniu bólu. *Rehabil. Med.* 5(4), 93-97.
- Thompson J.C., 2007. Atlas anatomii ortopedycznej Nettera. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner Wrocław.
- Tomik B.J., 2003. Leczenie zespołów bólowych kręgosłupa. *Terapia* 4(136), 39-42.



## ZESPOŁY BÓLOWE KRĘGOSŁUPA – POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNE

Dorota Ratuszek-Sadowska<sup>1</sup>, Monika Struensee<sup>1</sup>, Kamila Woźniak<sup>2</sup>,  
Wojciech Hagner<sup>1</sup>

### 1. WSTĘP

Zespoły bólowe kręgosłupa (SPS, ang. *spinal pain syndromes*) są lawinowo narastającą „epidemiczną” chorobą społeczeństw wysoko rozwiniętych. Stanowią główny powód wizyt pacjentów w gabinetach terapeutów, a także drugą pod względem częstości przyczynę niepełnosprawności fizycznej i absencji w pracy. Występują zarówno u osób pracujących fizycznie, jak i u pracowników umysłowych pozostających przez wiele godzin w pozycji siedzącej, obniżając istotnie komfort życia chorych. Leczenie bólu związanego z dysfunkcją kręgosłupa nadal pozostaje wyzwaniem, pomimo że poza farmakoterapią coraz większą uwagę poświęca się odpowiednio dobranym metodom fizjoterapeutycznym [Jakubowski i Żytkowski 2000, Tomik 2003, Billis i in. 2007].

Istnieje wiele kontrowersji dotyczących patogenezy zespołów bólowych kręgosłupa oraz generatorów bólu. Dolegliwości bólowe kręgosłupa ustępują w 95% w ciągu 3 miesięcy, niemniej jednak w 50-80% przypadków nawracają. Duża różnorodność możliwych przyczyn sprawia ogromne trudności diagnostyczne w zespołach bólowych kręgosłupa. Ból stanowi wypadkową wielu zmian, a współzależności między objawami klinicznymi a zmianami patologicznymi są często złożone [Tomik 2003, Saran 2005].

### 2. ETIOPATOGENEZA ZESPOŁÓW BÓLOWYCH KRĘGOSŁUPA

Ze względu na kompleksowy system funkcjonalny kręgosłupa składającego się z wielu stawów, więzadeł, przyczepów różnych grup mięśniowych oraz połączeń segmentarnych, leżących głęboko pod powłokami, bardzo ciężko ustala się przyczynę powstania bólu oraz miejsce i specyfikę uszkodzenia. Bóle kręgosłupa są jedynie objawami chorób, które mogą umiejscawiać się w różnych strukturach tkankowych, narządach czy też tkankach. W patogenezie bólów kręgosłupa istotną rolę odgrywają zmiany dotyczące krążka międzykręgowego, aparatu kostno-więzadłowego kręgosłupa, stawów międzykręgowych, w większości przypadków związanych z mechanizmem przeciążeniowym kręgosłupa. Niezależnie od punktu wyjściowego dolegliwości bólowych, zmiany patologiczne dotyczą segmentu ruchowego kręgosłupa. Nasilenie się patologii powoduje objęcie zaburzeniem różnych struktur wchodzących w skład segmentu ruchowego, a także sąsiednich i odległych narządów, co wiąże się

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: klreh@cm.umk.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kknchintr@cm.umk.pl

ze wspólnym segmentarnym pochodzeniem tych struktur w rozwoju ontogenetycznym [Marciniak i Szulc 2003, Billis i in. 2007].

Istnieje wiele kontrowersji dotyczących patogenezy zespołów bólowych kręgosłupa oraz generatorów bólu. W powszechnej opinii jedyną przyczyną tej patologii jest choroba zwyrodnieniowa krążka międzykręgowego – choroba dyskowa, dyskopatia, osteochondroza. Jednakże istnieją wiarygodne doniesienia, że w zapoczątkowaniu patomechanizmu znaczący udział mają stawy międzykręgowe oraz stawy krzyżowo-biodrowe. Wielu autorów uważa, że ból może pochodzić z bogato unerwionych torebek stawów międzykręgowych. Ze względu na mnogość przypuszczalnych etiologii, określenie „zespół bólowy kręgosłupa” jest zbyt ogólny i zobowiązuje do poszukiwań innych przyczyn, również tych pozakręgosłupowych [Saran 2005].

Na pierwszym miejscu wśród przyczyn inicjujących zespół bólowy kręgosłupa wymienia się uszkodzenia krążka międzykręgowego, do którego najczęściej dochodzi w miejscach największej ruchomości i obciążenia kręgosłupa. Choroba krążka międzykręgowego może być następstwem wcześniejszego zużywania się tkanek, należy jednak wziąć po uwagę, iż prawdopodobnie mają w tym przypadku znaczenie wrodzone predyspozycje [Dziak 2001, Głowacka 2004]. Objawy uszkodzenia krążka międzykręgowego w 50-60% przypadków związane są z wysiłkiem lub dźwiganiem ciężarów, w 10-20% ujawniają się nagle, pozornie bez uchwytnej przyczyny, a w 30-40% rozwijają się powoli, poprzedzone niewielkimi objawami bólowymi kręgosłupa podczas normalnych czynności dnia codziennego i narastają stopniowo lub manifestują się gwałtownym pogorszeniem. Przemieszczenie jądra miażdżystego, które stanowi najbardziej wyspecjalizowany czynnościowo element krążka, inicjuje łańcuch patologii kręgosłupa. Raz rozpoczęte zmiany stopniowo tak osłabiają krążek międzykręgowy, że obciążenie, które zdrowy krążek znosiłby bez żadnych negatywnych następstw, doprowadza do jego szybkiego uszkodzenia. Początek lawinowych progresji prowadzących do spondylozy może stanowić nie tylko pochylenie tułowia do przodu i dodatkowe przeciążenia związane ze zwiększonymi obciążeniami, ale także występująca w pozycji siedzącej kyfotyzacja odcinka lędźwiowego kręgosłupa. Nagłe pęknięcie zdrowego pierścienia włóknistego jest prawie niemożliwe, gdyż koncentrycznie ułożone warstwy, zbudowane z precyzyjnie zorientowanych włókien kolagenowych, tworzą zarazem silną i elastyczną strukturę [Dziak 2001].

Wtórne zmiany powodowane uszkodzeniem krążka międzykręgowego są również ważne jak te pierwotne. Dyskopatia prosta jest izolowaną postacią i stanowi początkową fazę choroby krążka międzykręgowego. Uważana jest za chorobę cywilizacyjną spowodowaną przede wszystkim siedzącym trybem życia współczesnego człowieka. Takie zmiany degeneracyjne krążka, jak: rozpad koloidów, odwodnienie jądra galaretowatego, ubytek masy krążka i utrata jego elastyczności wtórnie prowadzą do powstania w obrębie jednostki ruchowej nadmiernych ruchów fizjologicznych oraz patologicznych, czyli destabilizacji jednostki ruchowej. Sumujący się w czasie, długotrwały nacisk wywierany przez przemieszczające się ku tyłowi jądro miażdżyste powoduje: rozciągnięcie i zwiotczenie wewnętrznych warstw pierścienia włóknistego, osłabienie jego siły oraz wytworzenie różnicy napięć między mocnymi, dobrze umocowanymi częściami – przednią i boczną a słabszą tylną oraz ich trwałe uwypuklenie, składające się na powstanie tzw. wypukliny pierścieniowej. Stan ten bywa określany mianem protruzji jądra miażdżystego, w którym zachowany jest statyczny mechanizm przemieszczania jądra w zależności od ruchów kręgosłupa.

Naturalne procesy zapalne i naprawcze towarzyszą zmianom destrukcyjnym zachodzącym w krążku. Powstające w ten sposób łącznotkankowe blizny nie są jednak pełnowartościową tkanką, a bezładny układ włókien kolagenowych nie zapewnia biomechanicznej doskonałości porównywanej z czynnością prawidłowych warstw pierścienia włóknistego [Dziak 2001]. Gdy pod wpływem długotrwałego nacisku dojdzie do przerwania pierścienia, utworzy się przerwa przekraczająca połowę jego szerokości i powstanie głęboka szczelina, wówczas wciskać się będzie w nią, w postaci wypustki, przyległy fragment jądra miażdżystego. Część ta może wchodzić do patologicznego otworu i cofać się pod wpływem ruchów kręgosłupa. Takie zjawisko określa się mianem ruchomej lub przerywanej przepukliny. Pogłębienie i poszerzenie szczeliny powoduje, że coraz większa masa jądra miażdżystego wciska się do niej, przyjmując kształt szypuły wypełniającej rozerwany pierścień. W ten sposób powstaje przepuklina najczęściej zaklinowana w patologicznym kanale pierścienia, która poważnie jest już nieodprowadzalna. Czasami dochodzi również do oderwania (oddzielenia) jednego lub nawet kilku fragmentów jądra miażdżystego od masy przepukliny i przemieszczenia się do kanału kręgowego. Jako pierwsze na drodze przepukliny lub oderwanych elementów jądra miażdżystego staje więzadło podłużne tylne, które generuje tzw. bóle dyskowe, promieniujące do tylnej części pośladka. Wypchnięty fragment jądra lub powiększający się worek przepukliny coraz bardziej wdiera się do światła kanału kręgowego i z czasem wchodzi w bezpośrednią styczność z oponą twardą i elementami nerwowymi, m.in. unerwieniem własnym kręgosłupa, ogonem końskim, korzeniami, układem współczulnym i naczyniami krwionośnymi. W przypadkach, w których dochodzi do rozległego uszkodzenia tylnej części pierścienia włóknistego i do tego masywnego przemieszczenia jądra, wytworzona przepuklina może znacznie zwęzić światło kanału kręgowego, co z kolei doprowadzi do ucisku opony twardej oraz włókien nerwowych. W przypadku ucisku na korzenie może dojść w nich do różnie zaawansowanych zmian w wyniku nieznacznej ich przesuwalności po opuszczeniu rdzenia kręgowego. Korzeń może zostać naciągnięty lub uciśnięty. Drażnienie i ucisk na korzeń powoduje jego obrzęk, co doprowadzić może do zwłóknienia i zwyrodnienia pęczków nerwowych. Zjawisko „przyklejania” się korzenia do przepukliny jądra miażdżystego jest niezwykle istotne pod względem klinicznym, gdyż powstałe w wyniku tego zrosty trwale wiążą korzeń z przepukliną, nawet gdy jej zawartość ulegnie zwapnieniu i zmniejszeniu do rozmiarów nieszkodliwych [Dziak 2001, Głowacka 2004].

Progresja zmian patologicznych w krążku międzykręgowym doprowadza do obniżenia jego wysokości i jednocześnie zniesienia działania amortyzującego. Powoduje to przesunięcie osi ruchu ku tyłowi, zaburzając nie tylko mechanikę stawów międzykręgowych, ale prowadząc także do ich przeciążenia oraz wtórnych uogólnionych zmian zwyrodnieniowych, co z kolei przyspiesza ich zużycie. Więzadła i torebki stawów ulegają stopniowemu pogrubieniu, a następnie zwłóknieniu, co prowadzi do powstania nieprawidłowych napięć dających odruch bólowy przewodzony drogą nerwu kręgowego. W zaawansowanej chorobie zwyrodnieniowej kręgosłupa (spondyloza) występują uogólnione zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze o charakterze adaptacyjnym i kompensacyjnym, obejmujące całą jednostkę ruchową. Zmiany te przyjmują postać: wyrosły na krawędziach trzonów (osteofity), przerostu i zwłóknień tkanki łącznej krążka międzykręgowego, a także stawów i więzadeł (syndesmofity) oraz przyczepów mięśni (entezofity) [Dziak 2001].

Wszystkie okołokręgosłupowe tkanki miękkie są niezwykle bogato zaopatrzone w nocyceptywnie zakończenia nerwowe, dlatego też stanowią źródło dolegliwości bólowych w momencie ich mechanicznego przeciążenia – pozycje wymuszone, przedłużone stanie na wyprostowanych nogach, pozycje lekkiego pochylenia ku przodowi, chodzenie na wysokich obcasach, dźwiganie ciężarów itp. lub utraty należynej elastyczności tkanek – starzenie się organizmu, zaburzenia hormonalne. Znaczna część tzw. przeciążeniowych bólów krzyża, związanych z codziennym trybem życia, zazwyczaj wzmacnia już istniejące mechanizmy bólowe na podłożu choroby krążka międzykręgowego, choroby stawów międzykręgowych czy też samych mięśni [Dziak 2001, 2007, Głowacka 2004].

### 3. NAJCZĘSTSZE ZESPOŁY BÓLOWE

Co prawda przyczyną bólów krzyża są najczęściej zmiany występujące w krążku międzykręgowym, istnieją jednak inne struktury kręgosłupa mogące przyczynić się do powstania zespołów bólowych, m.in. tkanka kostna, chrząstka, więzadła, torebki stawowe i przylegające mięśnie. Ból stanowi wypadkową wielu zmian, a współzależności między objawami klinicznymi a zmianami patologicznymi są często złożone. Wśród zespołów bólowych wyróżnia się:

- anomalie wrodzone,
- zmiany zwyrodnieniowe (*spondylosis deformans*, *spondyloarthrosis deformans*, uszkodzenie i zwyrodnienie krążka międzykręgowego),
- zmiany zapalne,
- zakażenia,
- zaburzenia metaboliczne (osteoporoza, choroba Pageta, cukrzyca),
- nowotwory,
- bóle przeciążeniowe i pourazowe,
- przyczyny mechaniczne (uwarunkowania mięśniowo-szkieletowe, inne czynniki patologiczne, idiopatyczna skolioza lędźwiowa),
- zaburzenia naczyniowe,
- problemy psychoneurotyczne i socjalne [Billis i in. 2007, Dziak 2007, Peng 2013].

### 4. DIAGNOSTYKA

Trudności diagnostyczne w zespołach bólowych kręgosłupa wynikają z dużej różnorodności możliwości przyczyn oraz z małej dostępności kręgosłupa w badaniu fizykalnym. Często występuje także brak współzależności pomiędzy objawami a zmianami patologicznymi. Do określenia przyczyny bólów bardzo przydatny jest dokładnie zebrany wywiad i prawidłowo przeprowadzone badanie podmiotowe. Precyzyjne określenie źródła występujących dolegliwości pozwala na leczenie przyczynowe, a nie tylko objawowe [Dziak 2001, Tomik 2003, Kwolek i in. 2004, Peng 2013].

#### 4.1. Wywiad

Przeprowadzenie dokładnego i wnikliwego wywiadu jest bardzo ważne i pomocne w diagnostyce pomimo coraz doskonalszych badań obrazowych i laboratoryjnych. Rzetelny i diagnostyczny wywiad powinien być oparty na notatkach sporządzonych bezpośrednio podczas trwania rozmowy, tak aby nie umknęły ważne informacje, a pytania powinny być konkretne, rzeczowe i w pełni wyczerpujące. Należy brać również pod uwagę wiarygodność pacjenta, który czasami podaje informacje niepełne lub fałszywe. W wywiadzie należy zwrócić uwagę na każdy czynnik mogący wskazać etiologię pochodzenia bólu. Podczas jego przeprowadzenia gromadzi się materiały dotyczące: wieku pacjenta, rodzaju wykonywanej pracy (dodatkowe czynniki ryzyka), aktywności i ćwiczeń w okresie wypoczynku, sfery psychospołecznej (palenie papierosów, picie alkoholu), chorób towarzyszących (gorączka, dreszcze, utrata masy ciała), doznanych wcześniej urazów, chronologii bólu (początek wystąpienia i czas trwania dolegliwości), reakcji organizmu na wcześniejsze leczenie, dokładnej lokalizacji bólu, jego ostrości, charakteru, promieniowania i współistniejących objawów neurologicznych (zaburzenia czucia, osłabienie i zaniki mięśni), czynników łagodzących dolegliwości (odpoczynek, pozycje ciała, aktywność, ćwiczenia, stosowane leki), czynników pogarszających dolegliwości (chodzenie, stanie, kaszel, kichanie, wysiłek fizyczny) [Tomik 2003, Peng 2013].

#### 4.2. Stan ogólny

Badanie przedmiotowe powinno objąć cały kręgosłup. Należy także brać pod uwagę ewentualne schorzenia towarzyszące [Peng 2013]. Ocena stanu kręgosłupa, ze względu na ścisłe połączenie stawów międzykręgowych z rdzeniem, krążkiem międzykręgowym, korzeniami nerwowymi oraz tętnicami kręgowymi, powinna przebiegać w następującej kolejności:

- 1) oglądanie,
- 2) badanie palpacyjne,
- 3) testy neurologiczne,
- 4) badanie ruchów [Kopeć i in. 2006].

Obserwacje prowadzi się od momentu wejścia pacjenta do gabinetu. Badanie polega na ocenie sylwetki, sposobu poruszania i wyglądu chorego. Należy zwrócić uwagę na: ruchy wykonywane codziennie: chodzenie, siadanie, wstawanie, ubieranie i rozbieranie się, sylwetkę, postawę ciała, nawyki w postawie, postawę wymuszoną przez ból, typ konstytucyjny, kształt, wrodzone lub nabyte zmiany prawidłowych konturów, obrzęki, wysięki, zaniki, przerosty, deformacje itp., skórę: zmiany koloru, zmiany troficzne oraz krążeniowe, blizny, stwardnienia, modzele, znamiona, środki pomocnicze: laski, kule, gorsety, bandaże, protezy [Kopeć i in. 2006, Peng 2013].

Badanie dotykiem wykonuje się u chorego w pozycji stojącej i/lub leżącej na brzuchu. Warunkiem skuteczności palpacji jest nie tylko dobra znajomość budowy anatomicznej i topografii ciała, ale także procesów patologicznych. Dotykiem można rozpoznać, czy procesy te toczą się w tkance podskórnej, mięśniach, podwięziach, w łączności ze ścięgnem, kością czy są okołostawowe, czy może śródstawowe. Wykonując badanie palpacyjne należy zwrócić uwagę na: temperaturę powierzchni ciała, reakcję skóry na dotyk i ucisk, wrażliwość tkanek (mechanizmy obronne pacjenta przed bólem, występujące przy przeczulicach), zgrubienia tkankowe, ich przesuwal-

ność, konsystencję, wrażliwość, topografię danej okolicy ciała, tarcia lub trzaski tkanekowe [Kopeć i in. 2006, Peng 2013].

Ocena ruchomości kręgosłupa jest kolejnym etapem badania. Wykonywane testy ruchowe ujawniają anomalie i stany patologiczne zaburzające ruchomość i funkcje kręgosłupa, weryfikują, czy mamy do czynienia z hipermobilnością czy hypomobilnością, czy uszkodzenie dotyczy tkanek miękkich czy stawu. Służą one także do lokalizacji dokładnego miejsca powstałej dysfunkcji oraz bólu, który podczas testu zostanie spowodowany lub zniesiony. W celu odróżnienia bólu miejscowego od promieniującego należy przetestować także sąsiednie odcinki kręgosłupa oraz kończyny [Dziak 2001, Kopeć i in. 2006, Peng 2013]. Badanie ruchu wykonuje się biernie, czynnie oraz oporowo. Ruchy bierne, podczas których dochodzi w stawie do ślizgania i toczenia się, służą sprawdzeniu elementów kurczliwych i niekurczliwych [Kopeć i in. 2006].

Badanie neurologiczne opiera się na badaniu odruchów, czucia, siły i zaników mięśni, umożliwiając wykrycie odchyłeń od prawidłowej funkcji układu nerwowego i tym samym dokładną lokalizację zmian chorobowych. Zmiany neurologiczne mogą powodować następujące dysfunkcje narządu ruchu: wzmożoną aktywność układu nerwowego (np. ruchy drgawkowe), wyzwolenie aktywności z niższych poziomów układu nerwowego w wyniku utraty kontroli przez ośrodki wyższe, obecność cech ujemnych jako następstwa utraty prawidłowej funkcji nerwowej (np. upośledzenie czucia lub porażenie mięśni jako efekt uszkodzenia nerwu obwodowego) [Dziak 2001, Tomik 2003, Peng 2013].

Potwierdzeniem diagnozy lub zwiększeniem jej dokładności mogą być badania dodatkowe, nieinwazyjne i/lub inwazyjne. Wykonanie najbardziej celowych badań dodatkowych ustala się nie wcześniej niż po zebraniu bardzo dokładnego wywiadu i przeprowadzeniu badania przedmiotowego. Różne techniki obrazowania zrewolucjonizowały diagnostykę chorób kręgosłupa, rdzenia oraz korzeni, jednocześnie umożliwiając poprawę wyników leczenia. Do nieinwazyjnych badań dodatkowych zalicza się:

- zdjęcia rentgenowskie (RTG, ang. *radioisotope thermoelectric generator*),
- tomografię komputerową (CT, ang. *computed tomography*),
- jądrowy rezonans magnetyczny (MRI, ang. *magnetic resonance imaging*),
- tomografię emisyjną pojedynczego fotonu (SPECT, ang. *single photon emission computed tomography*),
- pozytonową emisyjną tomografię komputerową (PET, ang. *positron emission tomography*) [Dziak 2001, Tomik 2003, Saran 2005, Peng 2013].

## 5. TERAPIA

Ból kręgosłupa w 95% ustępuje w ciągu 3 miesięcy, niemniej jednak w 50-80% przypadków nawraca, przeważnie w mniej nasilonej postaci. Szczególną uwagę zwraca się na wnikliwą diagnostykę, gdyż leczenie przyczynowe wielokrotnie pozwala pacjentom odzyskać pełną sprawność fizyczną [Jakubowski i Żytkowski 2000, Kwolek i in. 2004, Zarzycki i Zarzycki 2007]. W początkowym etapie należy wykluczyć pozakręgosłupowe pochodzenie dolegliwości, aby nie narazić pacjenta na niepotrzebne cierpienie i umożliwić odpowiednią, celowaną terapię. Kolejnym etapem jest wykrycie struktury kręgosłupa objętej procesem chorobowym, zdiagnozowanie zaburzeń neurologicznych, które kwalifikować mogą chorego do leczenia operacyjnego



oraz rozpoznanie innych zmian chorobowych, m.in. zapalnych czy nowotworowych, które zmuszają do podjęcia specyficznego leczenia. Najliczniejszą grupę stanowią jednak pacjenci kwalifikujący się do leczenia zachowawczego [Jakubowski i Żytkowski 2000, Marciniak i Szulc 2003, Kwolek i in. 2004].

Do istotnych zaleceń terapeutycznych należy zaliczyć właściwą profilaktykę ograniczającą nawroty zaostrzenia objawów chorobowych oraz wystąpienia przewlekłego zespołu bólowego kręgosłupa, obejmującą m.in.: przestrzeganie zasad ergonomii w pracy, jak i w domu, właściwie dobraną aktywność ruchowa czy też unikanie przeciążeń kręgosłupa [Kwolek i in. 2004, Świerkot 2006, Peng 2013]. Istotnym elementem leczenia dolegliwości bólowych jest ich klasyfikacja ze względu na czas trwania dolegliwości:

- ból ostry – trwający do 6 tygodni,
- ból podostry – trwający od 6 do 12 tygodni,
- ból przewlekły – trwający powyżej 12 tygodni (do tego przedziału zalicza się także ból nawracający) [Jakubowski i Żytkowski 2000, Zarzycki i Zarzycki 2007].

Nagły, ostry zespół bólowy wymaga odpowiedniego postępowania farmakologicznego, czasami krótkotrwałego unieruchomienia pacjenta czy też właściwego postępowania mobilizacyjnego – w przypadku rozpoznanej patologii strukturalnej powodującej ból, np. zablokowania ruchowego powierzchni stawów międzykręgowych. Znaczącymi metodami walki z bólem oraz wzmożonym napięciem mięśniowym są prawidłowo stosowane farmakoterapia i fizykoterapia [Marciniak i Szulc 2003, Kwolek i in. 2004].

Jeżeli dolegliwości bólowe utrzymują się pomimo prawidłowo prowadzonego leczenia, należy przeprowadzić ponowne badania diagnostyczne. Trzeba uświadomić chorego, że ustąpienie dolegliwości nie świadczy o wyleczeniu, gdyż uszkodzony segment ruchowy jest stałym, słabym punktem kręgosłupa, wymagającym dbałości o utrzymanie silnego gorsetu mięśniowego, utrwalenie prawidłowych wzorców postawy i nawyków ruchowych [Marciniak i Szulc 2003].

## 5.1. Fizykoterapia

Fizykoterapię można rozpocząć po farmakologicznym wyciszeniu ostrych dolegliwości bólowych. Głównym jej celem jest zmniejszenie dolegliwości bólowych kręgosłupa i odczynu zapalnego oraz obniżenie wzmożonego napięcia mięśni przykręgosłupowych. Fizykoterapię stosuje się w zależności od typu dolegliwości bólowych, rodzaju schorzenia kręgosłupa, doświadczeń własnych leczącego oraz tolerancji zabiegów przez chorego. Jest ona jednym z elementów kompleksowego leczenia schorzeń kręgosłupa. W późniejszym okresie leczenia, aby osiągnąć skuteczniejszy efekt terapeutyczny, łączy się ze sobą pewne zabiegi fizykalne. Zabiegi te muszą być dobrze tolerowane przez pacjenta i przynosić właściwy, pożądany efekt, nie mogą natomiast w żadnym wypadku powodować zwiększenia dolegliwości ani też większej męczliwości chorego. Zabiegi kojarzone ze sobą wymagają odpowiedniej kolejności stosowania. Do najczęściej stosowanych zabiegów zaliczamy:

- przeskórną elektrostymulację nerwów TENS (ang. *transcutaneous electrical nerve stimulation*), mająca na celu leczenie objawowe przewlekłych i ostrych stanów bólowych,

- zabiegi laserowe, stosowane w chorobach zwyrodnieniowych, najczęściej techniką skaningową w miejscach bolesnych, a w przypadku objawów dyskopatycznych metodą kontaktową, na punkty spustowe lub odpowiednie punkty na przebiegu nerwów,
- lampy z odpowiednimi filtrami, np. lampa Sollux z czerwonym filtrem stosowana jest przede wszystkim w stanach zapalnych, natomiast filtr niebieski, ograniczający dawkę ciepła, działa przeciwzapalnie, przeciwbólowo i uspokajająco,
- zabiegi ultradźwiękowe stosowane na przebiegu nerwu lub przykręgosłupowo;
- pole magnetyczne małej częstotliwości,
- pole elektromagnetyczne wielkiej częstotliwości,
- prądy impulsowe średniej częstotliwości (najczęściej prądy interferencyjne),
- prądy impulsowe małej częstotliwości (najczęściej prądy diadynamiczne),
- jonoforeza, czyli wprowadzenie do tkanek jonów o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym,
- termoterapia, czyli zabiegi cieplne,
- hydroterapia w postaci ćwiczeń w wodzie, masażu wirowego oraz pływania [Kwolek i in. 2004].

## 5.2. Kinezyterapia

Należy jak najwcześniej zacząć „uruchamianie” pacjenta, ponieważ kinezyterapia przyspiesza procesy naprawcze i zastępcze w układzie ruchu i narządach wewnętrznych, zabezpiecza przed wykształceniem wadliwych stereotypów zastępczych, przeciwdziała wtórnym zmianom w układzie kostno-stawowo-mięśniowo-więzadłowym, zapobiega powikłaniom krążeniowo-oddechowym oraz poprawia ogólną wydolność ustroju. Kinezyterapię rozpoczyna się w zależności od stanu chorego i zawsze dobierana jest indywidualnie [Kwolek i in. 2004, Peng 2013]. Głównym celem kinezyterapii jest przerwanie „błędneho koła” bólowego poprzez zmniejszenie odruchowego skurczu mięśni przykręgosłupowych i poprawę stabilności kręgosłupa oraz przywrócenie równowagi mięśniowej zapobiegającej nawrotom dolegliwości. W schorzeniach kręgosłupa ściśle dobiera się rodzaj ćwiczeń, kolejność ich wykonywania oraz dawki, czyli czas ich trwania, ilość powtórzeń danego ćwiczenia oraz czas trwania całej serii. Istotna jest także technika wykonywania ćwiczeń [Kwolek i in. 2004, Krasuski 2005, Żytkowski i Durda 2005]. Kinezyterapia stanowi podstawę przeciwdziałania nawrotom choroby, dlatego też ważnym elementem leczenia jest edukacja ruchowa pacjenta, a zwłaszcza dążenie do pozbycia się złych nawyków i stereotypów ruchowych związanych z codziennym życiem. Warunkiem utrzymania dobrego efektu leczenia w zespołach bólowych kręgosłupa jest systematyczne i regularne kontynuowanie kinezyterapii w warunkach domowych [Kwolek i in. 2004, Świerkot 2006].

## 5.3. Farmakoterapia

W zespołach bólowych kręgosłupa stosuje się najczęściej: środki przeciwbólowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne – NLPZ, glikokortykosteroidy, środki rozluźniające napięcie mięśniowe, leki wpływające na nastrój chorego (leki sedatywne, przeciwdepresyjne) [Zembaty (red.) 2002, Tomik 2003].

Wskazane jest stosowanie leczenia przeciwbólowego wg trójstopniowej drabiny analgetycznej. Należy jednak pamiętać o licznych działaniach niepożądanych i konieczności stosowania leków osłonowych w celu zmniejszenia ryzyka powikłań żołądkowo-jelitowych i ze strony innych narządów. W leczeniu przewlekłego bólu krzyża można stosować jako terapię uzupełniającą iniekcję leków przeciwzapalnych lub miejscowo znieczulających bezpośrednio do stawu lub struktury (tzw. blokady). Ułatwiają one znacznie realizację programu rehabilitacji i mogą być przydatne w potwierdzeniu rozpoznania [Marciniak i Szulc 2003, Tomik 2003, Kwolek i in. 2004].

#### 5.4. Leczenie operacyjne

Zespoły bólowe kręgosłupa najczęściej ustępują po zastosowaniu leczenia zachowawczego, jednak około 1% pacjentów wymaga leczenia operacyjnego. Leczeniu operacyjnemu poddaje się pacjentów ze stenozą kanału kręgowego, przepuklinami jąder miażdżystych i niestabilnością. Zadaniem zabiegów chirurgicznych są: dekompresja ucisku na nerw rdzeniowy, stabilizacja stawów kręgosłupa dotkniętych zmianami zwyrodnieniowymi i przewlekłym stanem zapalnym, usunięcie krążków międzykręgowych i stabilizacja kręgosłupa w przypadku krążków z zaburzeniami biochemicznymi, a w konsekwencji umożliwienie funkcjonowania pacjenta, którego ból i często ubytkowe objawy neurologiczne wykluczyły z codziennej aktywności [Kaltenborn 1998, Tomik 2003].

Obecnie wyróżnia się cztery rodzaje wskazań do zabiegów operacyjnych:

- 1) brak dostatecznego ustąpienia rwy kulszowej przy zastosowaniu leczenia zachowawczego,
- 2) ucisk korzenia nerwowego połączony z niedowładem (osłabieniem),
- 3) masywne pośrodkowe wypadnięcie jądra miażdżystego powodujące ucisk ogona końskiego (towarzyszą temu niedowłady kończyn dolnych i zaburzenia zwieraczy pęcherza moczowego i odbytu),
- 4) nawroty bólów dolnego odcinka kręgosłupa lub rwy uniemożliwiające pracę i prowadzenie normalnego życia [Kaltenborn 1998, Tomik 2003].

## 6. PODSUMOWANIE

Kręgosłup jest strukturą niezwykle skomplikowaną zarówno anatomicznie, jak i biomechanicznie. Składa się on bowiem ze 139 stawów, którym towarzyszy wiele wysoko zorganizowanych i bogato unerwionych struktur tkanek miękkich, dlatego też zespoły bólowe kręgosłupa stanowią ogromne wyzwanie dla wszystkich zajmujących się zdrowiem jednostki: lekarzy, fizjoterapeutów i psychologów [Dziak 2001].

Zespoły bólowe kręgosłupa są lawinowo narastającą „epidemiczną” chorobą społeczeństw wysoko rozwiniętych. Stanowią one główny powód wizyt pacjentów w gabinetach terapeutów, a także drugą pod względem częstości przyczynę niepełnosprawności fizycznej i absencji w pracy osób poniżej 45. roku życia [Jakubowski i Żytkowski 2000, Tomik 2003, Zarzycki i Zarzycki 2007]. Szacuje się, że aż 80-100% dorosłej populacji doświadcza co najmniej raz w życiu epizodu bólowego kręgosłupa, natomiast 35% dotkniętych jest objawami rwy kulszowej. Dolegliwości pojawiają się najczęściej między 25. a 65. rokiem życia i związane są w znacznym stopniu z siedzącym trybem życia, ograniczeniem aktywności ruchowej oraz brakiem prawidłowych wzorców zachowań prozdrowotnych. Według wielu autorów częstość

występowania zespołów bólowych kręgosłupa wzrasta z wiekiem – w populacji osób dorosłych stanowi 20%, natomiast u osób po 65. roku życia wzrasta nawet do 49% [Jakubowski i Żytkowski 2000, Tomik 2003].

Określenie „ból krzyża”, pomimo że nie stanowi diagnozy tylko opis dolegliwości i objawów, uzyskało akceptację środowiska medycznego z powodu wątpliwości co do stosowanych powszechnie rozpoznań anatomopatologicznych, np. uszkodzenie krążka międzykręgowego, zespół stawu międzywyrostkowego czy krzyżowo-biodrowego.

Etiologia zespołów bólowych kręgosłupa jest bardzo złożona, a kontrowersje dotyczące ich patogenetycznej roli generatorów bólu nadal aktualne. Udokumentowana opinia dotycząca roli zmian zwyrodnieniowych krążka międzykręgowego w inicjacji patologii (Mixer i Barr 1933, Williams i Keegen 1944, Armstrong 1952, Sandoz 1971, Cyriax 1974, Bourdillon 1982, Cox 1985 według [Dziak 2007]) jest odmienna niż publikowane wiarygodne doniesienia, iż źródłem bólu są inne struktury wchodzące w skład kręgosłupa. Wielu autorów twierdzi, że ból generowany jest w stawach międzykręgowych (Ghormley, Hirsch, Kellgren, Schulitz, Lenz, McCalla, Mooney, Robertson i Shealy według [Dziak 2007]) oraz stawach krzyżowo-biodrowych [Jakubowski i Żytkowski 2000, Dziak 2001, Głowacka 2004]. Wśród wielu autorów panuje opinia, iż źródłem bólów są często bogato unerwione torebki stawów międzykręgowych, jednak inni badacze uważają, że nie ma na to nadal wystarczających dowodów. Ocenia się, że przyczyny leżące u podłoża uszkodzenia krążka międzykręgowego i stawów stanowią jedynie 70% wszystkich dolegliwości, natomiast inne wiarygodne badania donoszą, że 50% przypadków zespołów bólowych kręgosłupa wynika z patologii krążka międzykręgowego, drugą połowę zaś proporcjonalnie stanowią stawy międzykręgowe i krzyżowo-biodrowe [Jakubowski i Żytkowski 2000, Dziak 2001, Głowacka 2004].

Należy jednak pamiętać, że w związku z trybem życia współczesnego człowieka, wyzwaniami, jakie stawia mu środowisko i on sam, mogą pojawiać się z przeciążenia różnych struktur anatomicznych kręgosłupa. Jednym z podstawowych sposobów leczenia zespołów bólowych kręgosłupa jest ogólnie rozumiana fizjoterapia, której celem jest przywrócenie prawidłowej pracy układu nerwowo-mięśniowo-kostnego kręgosłupa poprzez rozluźnienie lub wzmocnienie poszczególnych grup mięśni. Ze względu na ich złożoną etiologię postępowanie rehabilitacyjno-lecznicze nie może być jednakowe w każdym przypadku oraz powinno opierać się na rzetelnie przeprowadzonych badaniach diagnostycznych. Praktyka kliniczna i wiele opracowań naukowych wskazują na dużą rolę fizykoterapii w leczeniu zespołów bólowych kręgosłupa, ale niestety zbyt mało jest kontrolowanych i długoterminowych badań oceniających skuteczność działania poszczególnych zabiegów. Jeśli jednak są one prawidłowo zalecane i wykonywane, nie skutkują praktycznie działaniami ubocznymi.

Do istotnych zaleceń terapeutycznych należy właściwa profilaktyka ograniczająca nawroty objawów chorobowych oraz wystąpienia przewlekłego zespołu bólowego kręgosłupa, obejmująca m.in.: przestrzeganie zasad ergonomii w pracy, jak i w domu oraz właściwie dobraną aktywność ruchową.

## LITERATURA

- Billis E.V., McCarthy C.J., Oldham J.A., 2007. Subclassification of low back pain: a cross-country comparison. *Eur. Spine J.* 16, 865-879.
- Brennan G.P., Fritz J.M., Hunter S.J., Thackeray A., Delitto A., Erhard R.E., 2006. Identifying subgroups of patients with acute/subacute "nonspecific" low back pain: results of a randomized clinical trial. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 623-631.
- Dziak A., 2007. Bóle i dysfunkcje kręgosłupa. *Medicina Sportiva Kraków*.
- Dziak A., 2001. Postępowanie diagnostyczne w bólach krzyża. *Rehabil. Med.* 5(4), 9-21.
- Głowańska M., 2004. Zespoły bólowe kręgosłupa – diagnostyka i leczenie zachowawcze. *Lekarz* 11, 45-48.
- Jakubowski J., Żytkowski A., 2000. Leczenie operacyjne niektórych zespołów bólowych dolnego odcinka kręgosłupa. *Akupunkt. Pol.* 17/18, 568-570.
- Kaltenborn F.M., 1998. Kręgosłup: badanie manualne i mobilizacja. Wydawnictwo Rolewski Toruń.
- Kopeć J., Przedborska A., Smyj K., 2006. Zaburzenia funkcji stabilizacyjnej dolnego odcinka kręgosłupa jako jedna z przyczyn nawracających dolegliwości bólowych. *Kwart. Ortop.* 62(2), 95-97.
- Krasuski M., 2005. Algorytm postępowania diagnostyczno-leczniczego w zespołach bólowych kręgosłupa. *Rehabil. Med.* 9(3), 25-31.
- Kwolek A., Korab D., Majka M., 2004. Rehabilitacja w zespołach bólowych dolnego odcinka kręgosłupa – zasady postępowania. *Postępy Rehabil.* 18(3), 27-31.
- Marciniak W., Szulc A., 2003. *Wiktora Degi ortopedia i rehabilitacja, tom II.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.
- Peng B.G., 2013. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of discogenic low back pain. *World J. Orthop.* 18, 4(2), 42-52.
- Saran T., 2005. Przyczyny zespołów bólowych odcinka lędźwiowo-krzyżowego kręgosłupa i współczesne metody ich leczenia. *Medycyna Ogólna* 11(3), 178-185.
- Świerkot J., 2006. Bóle krzyża – etiologia, diagnostyka i leczenie. *Przew. Lek.* 2(84), 86-98.
- Tomik B.J., 2003. Leczenie zespołów bólowych kręgosłupa. *Terapia* 4(136), 39-42.
- Zarzycki D., Zarzycki M. 2007. Zespoły bólowe kręgosłupa. *Lekarz* 12, 81-84.
- Zembaty A. (red.), 2002. *Kinezyterapia, tom I, II.* Wydawnictwo Kasper Kraków.
- Żytkowski A., Durda A., 2005. Etiopatogeneza zespołów bólowych kręgosłupa lędźwiowo-krzyżowego. *Terapia* 12(173), 34-37.



# **METODY LECZENIA KRWAWIENIA PODPAJĘCZYNÓWKOWEGO POCHODZĄCEGO Z PĘKNIĘTEGO TĘTNIAKA**

**Kamila Woźniak<sup>1</sup>, Maciej Śniegocki<sup>1</sup>,  
Dorota Ratuszek-Sadowska<sup>2</sup>, Marcin Grela<sup>1</sup>**

## **1. WSTĘP**

Krwawienie podpajęczynówkowe jest wynaczynieniem krwi z pękniętego, zmienionego naczynia (tętniaka) do przestrzeni podpajęczynówkowej mózgowia i/lub rdzenia kręgowego. Przestrzeń podpajęczynówkowa to przestrzeń zawarta pomiędzy oponą miękką a oponą pajęczą (pajęczynówką). Zawiera płyn mózgowo-rdzeniowy. Z danych literaturowych wynika, że krwawienie podpajęczynówkowe jest przyczyną około 10-12% wszystkich śródczaszkowych incydentów naczyniowych [van Gijn i in. 2007]. Tętniak jest to ograniczone poszerzenie światła naczynia krwionośnego. Tętniaki najczęściej umiejscawiają się na rozgałęzieniach dużych tętnic, w których błona sprężysta jest najslabiej rozwinięta. W 90% przypadków znajdują w obrębie koła Willysa, a 10% tętniaków naczyń mózgowych dotyczy krążenia kręgowo-podstawnego [Anderson i in. 2000]. Tętniaki zlokalizowane są najczęściej na tętnicy łączącej przedniej, tętnicy łączącej tylnej, w rozwidleniu tętnicy mózgu środkowej, w końcowym odcinku tętnicy podstawnej oraz początkowym odcinku tętnicy tylnej dolnej mózdzku. Głównym objawem krwawienia podpajęczynówkowego jest nagle występujący, bardzo silny ból głowy, któremu mogą towarzyszyć wymioty, objawy oponowe, cechy ogniskowego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Nielezione krwotoki podpajęczynówkowe są przyczyną dużej śmiertelności, dlatego niezmiernie istotne jest szybkie postawienie diagnozy i wdrożenie odpowiedniego leczenia (operacyjnego lub embolizacji) [Anderson i in. 2000].

## **2. KRWAWIENIE PODPAJĘCZYNÓWKOWE – EPIDEMIOLOGIA, CZYNNIKI RYZYKA, OBJAWY**

Częstość występowania krwawienia podpajęczynówkowego wynosi ok. 6-7 osób/100 000/ rok [van Gijn i in. 2007]. Zdarza się, że w niektórych populacjach liczba ta jest zdecydowanie wyższa (np. w Finlandii i Japonii 20 osób/100000/rok) [Anderson i in. 2000, van Gijn i in. 2007]. Krwawienie podpajęczynówkowe występuje przeważnie u pacjentów w średnim wieku (ok. 50. roku życia), nieco częściej u kobiet. Szacuje się, że ok. 15% pacjentów umiera zanim dotrze do szpitala. W ok. 85% przyczyną krwawienia podpajęczynówkowego jest pęknięcie tętniaka [Anderson i in. 2000, Brista i in. 2002]. Krwawienie z tętniaków workowatych często wiąże się ze współwystępo-

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kiknchintr@cm.umk.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: klreh@cm.umk.pl

waniem czynników ryzyka. Wśród nich wymienia się: nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu. Czynniki te są odpowiedzialne za niemal 60% krwawień. Istnieją również tętniaki występujące rodzinnie. Często spotyka się je w wielotorbielowatości nerek, zespole Ehlersa-Danlosa, zespole Marfana, dysplazji włóknistej mięśni [Anderson i in. 2000, Huang i van Gelder 2002]. Wśród rzadszych przyczyn krwawienia podpajęczynówkowego wymienia się: zapalne uszkodzenie tętnic mózgu (np. w przebiegu tętniaków grzybiczych, boreliozy, choroby Behçeta, pierwotnego zapalenia naczyń, zespołu Churga-Straussa, ziarniniaka Wegenera), niezapalne uszkodzenie tętnic (np. rozwarstwienie ściany tętnicy, anomalie tętniczko-żylny, mózgowy przetoki tętniczko-żylny, naczynek jamisty, zakrzepica zatok żylnych, angiopatia amyloidowa, choroba Moya-Moya), anemię sierpowatą, koagulopatie, guzy mózgu (pierwotne i wtórne). Coraz częściej obserwuje się krwawienie podpajęczynówkowe u osób uzależnionych od narkotyków (kokaina) [Huang i van Gelder 2002].

Najbardziej charakterystycznym objawem krwawienia podpajęczynówkowego (ang. *subarachnoid hemorrhage*, SAH) jest nagły, bardzo silny ból głowy, miejscowy lub rozlany. Ból ten często przez chorych opisywany jest jako najsilniejszy w życiu [Fann i in. 2000, Gieteling i Rinkel 2003]. Warto zauważyć, że jedynie u 1% chorych z bólem głowy zgłaszających się na oddziały pomocy doraźnej rozpoznaje się krwotok podpajęczynówkowy. U 1/3 chorych ból głowy jest objawem jednostronnym. Cechą charakterystyczną tego bólu jest brak jakiegokolwiek reakcji na stosowane leczenie przeciwbólowe. Bólowi głowy może towarzyszyć światłowstręt. Objawy oponowe pojawiają się zwykle po 3-12 godzinach jako odpowiedź na obecność krwi w przestrzeni podpajęczynówkowej. U 50% pacjentów występują wymioty. Przy przyjęciu do szpitala 2/3 pacjentów ma zaburzenia świadomości, z czego około połowa chorych jest w śpiączce [Huang i van Gelder 2002, Gieteling i Rinkel 2003]. U 10% chorych można stwierdzić zespół Tersona, czyli przedsiatkówkowe krwawienia do ciała szklanego. Objawy ogniskowego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego występują u 50% pacjentów (najczęściej po 3-5 dniach) i są następstwem skurczu naczyniowego albo bezpośredniego działania wynaczynionej krwi na tkankę mózgową. Często objawy neurologiczne wskazują na umiejscowienie tętniaka (tab. 1). Do oceny klinicznej chorego stosuje się skalę Hunta-Hessa (tab. 2).

Tabela 1. Umiejscowienie tętniaka a objaw neurologiczny [van Gijn i in. 2007]

Umiejscowienie tętniaka	Objawy neurologiczne
Tętnica łącząca przednia	niedowidzenia w dolnych, dwuskroniowych kwadrantach pola widzenia, abulia
Tętnica łącząca tylna	porażenie nerwu okoruchowego
Tętnica szyjna wewnętrzna	zaburzenia czynności dolnych nerwów czaszkowych
Tętnica środkowa mózgu	przeciwstronny niedowład połowiczny, afazja i napady padaczkowe
Tętnica kręgową i podstawną	objawy pniowe i mózdkowe, ubytkowe objawy ze strony dolnych nerwów czaszkowych



Tabela 2. Skala Hunta i Hessa [van Gijn i in. 2007]

Stopień	Objawy
I	brak objawów lub bóle głowy o niewielkim nasileniu, zaznaczona sztywność karku
II	ból głowy o średnim lub znacznym nasileniu, sztywność karku, uszkodzenie nerwów czaszkowych
III	senność, splątanie, ogniskowe objawy uszkodzenia układu nerwowego o niewielkim nasileniu
IV	stupor, niedowład połowiczy o średnim lub znacznym nasileniu, zaburzenia wegetatywne
V	głęboka śpiączka, prężenia

### 3. DIAGNOSTYKA I LECZENIE KRWAWIENIA PODPAJĘCZYNÓWKOWEGO

#### 3.1. Diagnostyka krwawienia podpajęczynówkowego

Pierwszym badaniem obrazowym, które powinno być wykonane przy podejrzeniu krwawienia podpajęczynówkowego, jest tomografia komputerowa (ang. *computer tomography*, CT) głowy (rys. 1). Czulość tego badania wynosi 98%, jeżeli wykonuje się je w ciągu 12 godzin od wystąpienia pierwszych objawów [Roos i in. 2000]. Tomografia komputerowa może być prawidłowa nawet do 2% przypadków ostrego krwawienia (w ciągu 12 godzin) i aż do 57% podostrego krwawienia. Im krótszy czas upłynął od krwotoku, tym większe jest prawdopodobieństwo wykazania obecności krwi (1. dzień – do 95% 3. dzień – do 75%, po tygodniu – do 50%). Skala Fishera i zmodyfikowana skala Fishera (tab. 3) służą do oceny stopnia nasilenia krwawienia w obrazowaniu TK. Skala Fishera pozwala także na oszacowanie ryzyka skurczu naczyniowego. Kolejnym etapem po potwierdzeniu rozpoznania krwawienia podpajęczynówkowego jest poszukiwanie jego przyczyny. Pourazowe krwawienie podpajęczynówkowe charakteryzuje się obecnością krwi na ogół powierzchownie w obrębie kory. Mogą mu towarzyszyć: stłuczenie mózgu, złamania kości czaszki oraz krwiaki podtwardówkowe/nadtwardówkowe. Rozlane krwawienie podpajęczynówkowe bez urazu w wywiadzie oraz bez ognisk stłuczenia wskazuje na tętniaka.

Tabela 3. Skala Fishera i zmodyfikowana skala Fishera [van Gijn i in. 2007]

Stopień	Zmodyfikowana skala Fishera	Skala Fishera
0	brak krwi	–
I	niewielka ilość krwi w zbiornikach bez krwawienia do układu komorowego	brak krwi
II	niewielka ilość krwi w zbiornikach z krwawieniem do układu komorowego	rozlana lub cienka warstwa krwi grubości < 1 mm
III	duża ilość krwi w zbiornikach bez krwawienia do układu komorowego	zlokalizowany skrzep i/lub warstwa krwi grubości > 1 mm
IV	duża ilość krwi w zbiornikach z krwawieniem do układu komorowego	skrzep krwi wewnątrzkomorowy i/lub śródmieższowy



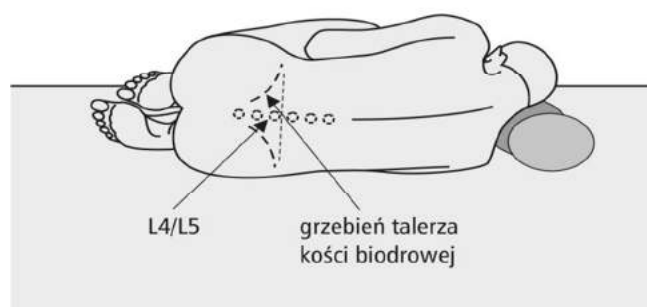
Rys. 1. SAH – krwawienie podpajęczynówkowe z tętniaka na tętnicy łączącej przedniej z przebicciem do układu komorowego – zaznaczone strzałką  
[materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]

Jeżeli zachodzi podejrzenie krwawienia z pękniętego tętniaka, kolejnym etapem jego potwierdzenia jest badanie naczyniowe – angiografia tomografii komputerowej, angiografia magnetycznego rezonansu oraz cyfrowa angiografia subtrakcyjną ta ostatnia uważana jest za złoty standard [Lechmann-Horn i Ludolph 2004, Mark i Pines 2006]. Czulość i swoistość angiografii TK waha się między 80 a 100%. Angiografia tętnic ośrodkowego układu nerwowego umożliwia nie tylko ustalenie lokalizacji tętniaka, ale również ocenę jego położenia w stosunku do innych naczyń i pozwala na wybór odpowiedniej metody leczenia (klipsowanie bądź endowaskularna embolizacja). Umieszczenie krwi może być pomocne w lokalizowaniu tętniaka (tab. 4).

U pacjentów, u których badanie tomografii komputerowej głowy nie potwierdza rozpoznania SAH, nie wykazuje procesu uciskowego ani wodogłowia obstrukcyjnego lub nie jest możliwe wykonanie tego badania, należy wykonać nakłucie podpajęczynówkowe (rys. 2). Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w kierunku krwawienia podpajęczynówkowego jest najbardziej czułym testem wykrywającym krwotok podpajęczynówkowy [Victor i Ropper 2003]. W przypadku wcześniej przebytych krwotoków w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się obecność syderofagów. Przy podejrzeniu krwawienia artficyjnego należy wykonać próbę 3 próbek: płyn w trzech kolejnych próbkach pozostaje równomiernie krwisty. Po około 6 godzinach krwinki czerwone ulegają lizie i uwalniają się produkty ich rozpadu, z tego też względu przed upływem sześciu godzin może nie występować ksantochromia.

Tabela 4. Umiejscowienie krwi a lokalizacja tętniaka

Lokalizacja tętniaka	Umiejscowienie krwi
Tętnica łącząca przednia	szczelina międzypółkulowa lub zakręt prosty
Tętnica środkowa mózgu lub łącząca tylna	bruzda sylwiusza
Końcowy odcinek tętnicy podstawnej, tętnica łącząca tylna, tętnica tylna dolna mózdzku lub tętnica górna mózdzku	okolica mostu lub konarów
Tętnica tylna dolna mózdzku, tętnica kręgową lub podstawna	wewnątrzkomorowo

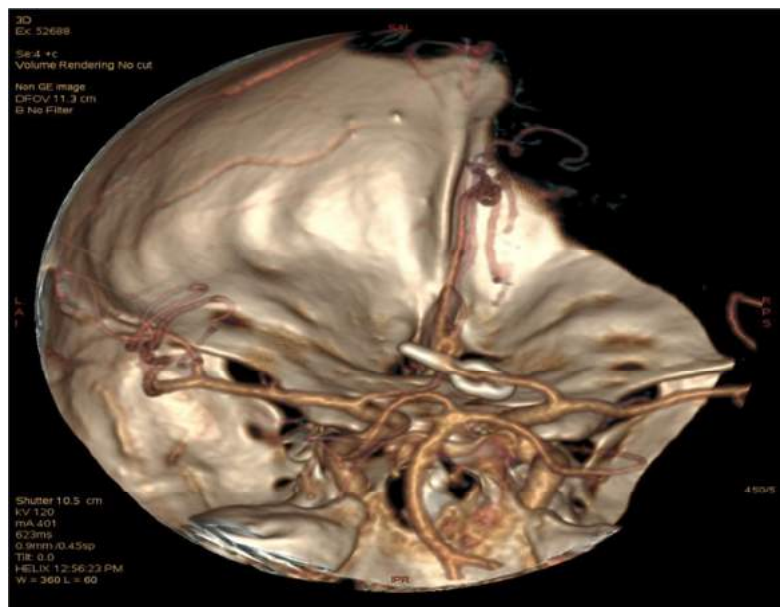


Rys. 2. Schemat wykonania nakłucia lędźwiowego – nakłucie lędźwiowe ok. L4/L5 [www.mp.pl]

### 3.2. Leczenie krwawienia podpajęczynówkowego z pękniętego tętniaka

Pierwszego operacyjnego zamknięcia tętniaka dokonał przypadkowo amerykański neurochirurg Harvey Cushing, który operując chorego z powodu podejrzenia guza w okolicy bruzdy bocznej mózgu natknął się na imitujący go olbrzymi tętniak tętnicy środkowej mózgu. Po nacięciu jego worka i spowodowaniu masywnego krwotoku wypełnił go szybko fragmentem mięśnia skroniowego i zaszył, tamując w ten sposób krwawienie. Rozwój leczenia operacyjnego tętniaków mózgu jest ściśle związany z wprowadzeniem arteriografii przez Edgara Moniza (hiszpańskiego radiologa i neurochirurga). Leczenie operacyjne tętniaków mózgu metodą klipsowania szyi tętniaka datuje się od czasu przeprowadzenia przez Dandy'ego w 1937 roku zabiegu z zastosowaniem klipsa Cushinga do wyłączenia tętniaka z krążenia [Fann i in. 2000, Bistra i in. 2002]. Pierwsze próby leczenia operacyjnego tętniaków tętnicy łączącej przedniej przeprowadził Tönnis (neurochirurg niemiecki) w 1936 roku. Zastosował on dostęp międzypółkulowy z przecięciem ciała modelowatego, ale jego technika nie znalazła naśladowców, gdyż wyniki tych operacji nie były zadowalające, a śmiertelność operacyjna niezwykle wysoka. Operowanie z dojścia poprzez szczelinę międzypółkulową upowszechnił Pool (neurochirurg niemiecki). Współcześnie najczęściej stosowaną techniką operacyjną, wprowadzoną przez Kempa (neurochirurga amerykańskiego), jest dojście pterionalne z częściową resekcją zakrętu prostego. Udoskonaleniu uległa ona po wprowadzeniu do użytku przez Yasargila (neurochirurga tureckiego) mikroskopu operacyjnego. Podstawowym założeniem tej techniki jest uniknięcie kompresji płata czołowego oraz odsłonięcie jedynie szyi i naczynia macierzystego, bez konieczności

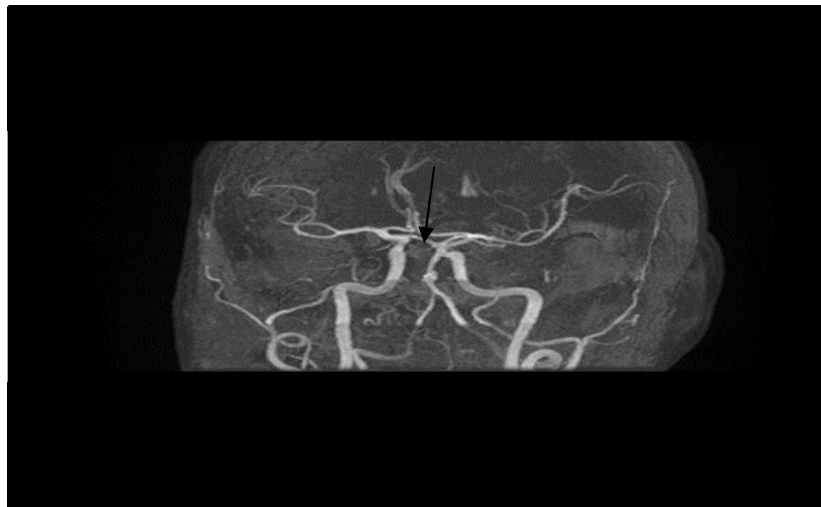
odsłonięcia worka tętniaka. Celem leczenia krwawienia podpajęczynówkowego w zależności od jego postaci jest zarówno minimalizacja skutków klinicznych wewnątrzczaszkowych procesów patologicznych powstałych wskutek krwawienia, jak i protekcja powtórnego krwawienia z pękniętego tętniaka [Mark i Pines 2006]. Leczenie polega na operacyjnym zaopatrzeniu źródła krwawienia oraz zapobieganiu powikłaniom. U chorych z I-III stopniem w skali Hunta i Hessa zaleca się jak najszybsze przeprowadzenie zabiegu (w ciągu pierwszych 3 dni). U chorych z IV-V stopniem w skali Hunta i Hessa zaleca się późny zabieg operacyjny, po uzyskaniu poprawy stanu neurologicznego. Leczenie operacyjne tętniaków mózgu wiąże się z wieloma powikłaniami, zależnymi od lokalizacji tętniaka. Wśród tych znajdujących się w przednim kręgu tętniczym do najważniejszych zalicza się: śródoperacyjne pęknięcie tętniaka, zwężenie tętnicy szyjnej lub jej czasowe zamknięcie, zatorowość naczyń obwodowych, uszkodzenie nerwu węchowego, wzrokowego, okoruchowego (tętniaki tętnicy szyjnej), przewężenie lub zamknięcie głównych naczyń i perforatorów, powstanie krwiałków wewnątrzczaszkowych, ognisk niedokrwieniowych, wystąpienie skurczu naczyniowego (tętniaki podziału tętnicy szyjnej). W przypadku operowania tętniaków kompleksu tętnicy łączącej przedniej i przedniej mózgu może dojść do niedrożności tylnego odcinka tętnicy odżywczej, obrzęku mózgu, wystąpienia krwiała śródmózgowego. Pojawić się mogą również, lub nasilić, zaburzenia osobowości, zaniki pamięci, zaburzenia psychiczne (zespół Korsakowa). Najczęstszym powikłaniem leczenia operacyjnego tętniaków dalszego odcinka tętnicy przedniej mózgu jest niedowład połowiczy w wyniku niedrożności tętnicy lub skurczu naczyniowego. Przez wiele lat jedynym sposobem leczenia tętniaków tętnic mózgowych było postępowanie operacyjne (rys. 3) [van Gijn i in. 2007].



Rys. 3. Klipsowanie tętniaka tętnicy łączącej przedniej – strzałka pokazuje klips wewnątrznaczyniowy [materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]

Z powodu szczególnego umiejscowienia tętniaka leczenie neurochirurgiczne często jest utrudnione bądź niemożliwe. Te trudności spowodowały, że zaczęto poszukiwać alternatywnych metod leczenia. Jedną z wielu metod terapii wewnątrznaczyniowej jest embolizacja za pomocą spiral (rys. 4). Wypełnienie wnętrza worka w tętniakach mózgu za pomocą platynowych elektroodczepialnych spiral (GDC, *guglielmi detachable coils*) lub innych systemów stosuje się od 1991 roku [van Gijn i in. 2007]. Dobór metody leczenia zależy od lokalizacji, wielkości, morfologii tętniaka, technicznego dostępu oraz stanu i wieku pacjenta. Zabieg chirurgicznego zabezpieczenia tętniaka za pomocą klipsa jest bardziej efektywny w procesie rekanalizacji, z kolei wewnątrznaczyniowy sposób terapii jest mniej inwazyjny. Głównym celem embolizacji wewnątrznaczyniowej jest całkowita okluzja tętniaka wewnątrzczaszkowego. Prekursorem leczenia wewnątrznaczyniowego był rosyjski neurochirurg Fiodor Serbinienko, który w 1971 roku przedstawił metodę embolizacji za pomocą odczepialnych balonów wprowadzanych do worka tętniaka [Roos i in. 2000]. Kolejnym przełomem w wewnątrznaczyniowym leczeniu krwawienia podpajęczynówkowego z pękniętego tętniaka było zastosowanie w styczniu 1991 roku przez Guido Guglielmi spiral odczepialnych [Roos i in. 2000]. Technika ta uzyskała aprobatę w Europie i Stanach Zjednoczonych, co pozwoliło na jej dalsze doskonalenie. Aktualnie wyczepianie spirali domózgowych z przewodnika dostarczającego spiralę do worka tętniaka następuje w sposób mechaniczny, galwaniczny lub hydrauliczny. Kolejnym krokiem w leczeniu tętniaków wewnątrzczaszkowych było wprowadzenie stentów. Zwiększyło to możliwość leczenia tętniaków z szeroką szyjką, zapobiegając wypadaniu spiral do naczynia macierzystego. Zastosowanie stentów stanowiło rozwinięcie techniki remodelingu, zaprezentowanej w 1994 roku przez francuskiego radiologa interwencyjnego Jacquesa Moreta. Kolejnym etapem endowaskularnego zamykania tętniaków jest udoskonalanie materiałów wykorzystywanych do wewnątrznaczyniowego zamykania tętniaków. Rozwój neurochirurgii doprowadził do wykorzystywania płynnych środków embolizacyjnych (Onyx) [9, van Gijn i in. 2007]. Obecnie przyjmuje się, że metodą embolizacji można wyłączyć z krążenia do 80% wszystkich tętniaków, wprowadzając za pomocą mikrocewnika do ich światła materiał embolizacyjny. Do embolizacji wewnątrznaczyniowej kwalifikuje się pacjentów w ciężkim stanie ogólnym, z tętniakami o trudno dostępnej lokalizacji, którzy nie wyrazili zgody na klipsowanie, a jednocześnie tętniak charakteryzuje się korzystnym stosunkiem worka do jego szyjki. Przed zabiegiem operacyjnym należy dokładnie ocenić morfologię tętniaka oraz jego wymiary. Optymalnym czasem leczenia wewnątrznaczyniowego tętniaków są pierwsze 72 godziny od momentu krwawienia. Natomiast ultraszybkie leczenie wykonywane w pierwszych 6-12 godzinach od momentu krwawienia jest najkorzystniejsze dla chorego. Obecnie skuteczność wypełnienia światła tętniaka spiralami jest określana za pomocą skali Montreal. Podczas embolizacji pacjent pozostaje w znieczuleniu ogólnym. Konieczne jest stosowanie ciągłej heparynizacji chorego. Spirale są implantowane do worka tętniaka za pomocą mikrocewnika oraz odczepiane pod kontrolą fluoroskopii. Celem leczenia wewnątrznaczyniowego jest wypełnienie tętniaka spiralami. Spirale wprowadza się do worka tętniaka do momentu jego bezpiecznego całkowitego wypełnienia, co potwierdza się w badaniu angiograficznym. Metoda ta nie jest niestety wolna od potencjalnych zagrożeń. Dużym problemem w leczeniu spiralami platynowymi jest dokładna gęstość wypełnienia worka tętniaka spiralami i rekanalizacja, której częstość, według różnych źródeł, waha się od 10 do 55% [van Gijn i in. 2007]. Rekanalizacja po zabiegach wewnątrznaczyniowych prowadzi do nawrotów wypełnienia tętniaka krwią, co zwiększa ryzyko krwotoku

podpajęczynówkowego. Czynniki sprzyjające rekanalizacji to szeroka szyjka tętniaka, duże i olbrzymie tętniaki oraz niekompletna obliteracja. Najczęściej spotykanymi powikłaniami podczas embolizacji są: perforacje worka tętniaka oraz zakrzepice i zatory obwodowe, prowadzące do udarów mózgu. Ryzyko perforacji worka tętniaka występuje głównie w przypadku embolizacji tętniaków krwawiących i według różnych autorów może wynosić 1,9-16%, natomiast powikłanie to dotyczy jedynie 0-1,3% tętniaków niekrwawiących [van Gijn i in. 2007].



Rys. 4. Embolizacja wewnątrznaczyniowa tętniaka tętnicy podstawnej [materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]

#### 4. PODSUMOWANIE

Obecnie w leczeniu krwawienia podpajęczynówkowego z pękniętego tętniaka stosuje się neurochirurgiczne metody operacyjne oraz embolizację wewnątrznaczyniową. Skuteczność obu metod jest porównywalna. Wybór leczenia uzależniony jest od lokalizacji, wielkości i morfologii tętniaka.

#### LITERATURA

Anderson C., Anderson N., Bonita R. i in., 2000. Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Australia and New Zeland. Incidence and case fatality from the Australasian Cooperative Research on Subarachnoid He-morrhage Study (ACROSS). *Stroke* 31, 1843-1850.

Bristra E.H., Algra A., Rinkel G.J.E., Tulleken C.A.F., van Gijn J., 2002. Effectiveness of neurosurgical clip application in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg* 97, 1036-1041.

- Fann J.R., Kukull W.A., Katon W.J., Longstreth W.T. Jr., 2000. Physical activity and subarachnoid haemorrhage: a population based case-control study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 69, 768-772.
- Huang J., van Gelder J.M., 2002. The probability of sudden death from rupture intracranial aneurysms: a metaanalysis. *Neurosurgery* 51, 1101-1105.
- Gieteling E.W., Rinkel G.J.E., 2003. Characteristics of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage in patients with polycystic kidney disease. *J. Neurol.* 250, 418-423.
- Lehmann-Horn F., Ludolph A., 2004 *Neurologia. Diagnostyka i leczenie.* Urban and Partner. Wrocław 24-25, 478-484.
- Mark G.D., Pines J.M., 2006. The detection of nontraumatic subarachnoid hemorrhage: still diagnostic challenge. *Am. J. Emerg. Med.* 24, 859-863.
- Mumenthaler M., Mattle H., 2003. *Neurologia.* Urban and Partner Wrocław, 276-281.
- Roos Y.B.W.E.M., de Haan R.J., Beenen L.F.M., Groen R.J.M., Albrecht K.W., Vermeulen M., 2000. Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in The Netherlands. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 337-341.
- Van Gijn J., Kerr R.S., Winkiel G.J.E., 2007. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 369, 306-318.
- Victor M., Ropper A. *Neurologia Adamsa i Victora*, 2003. Wydawnictwo Czelej Lublin.





# NEUROSTYMULACJA RDZENIA KRĘGOWEGO JAKO JEDNA Z NOWOCZESNYCH METOD LECZENIA BÓLU NEUROPATYCZNEGO

Kamila Woźniak<sup>1</sup>, Maciej Śniegocki<sup>1</sup>,  
Dorota Ratuszek-Sadowska<sup>2</sup>, Marcin Grela<sup>1</sup>, Mateusz Szostak<sup>1</sup>

## 1. WSTĘP

Dolegliwości bólowe to nieprzyjemne doznania wywołane przez potencjalne bądź występujące uszkodzenie tkanek [Diener 2005]. Ból jest przewodzony przez nerwy, rdzeń kręgowy do ośrodków bólowych mózgu, gdzie dochodzi do rejestracji tego przykrego doznania. Jeśli impuls bólowy nie dotrze do mózgu, ból nie jest odczuwany. Prawdopodobnie ta stanowi podstawę wszelkich rodzajów terapii bólu. Neurostymulacja to nowoczesna metoda leczenia za pomocą impulsów elektrycznych, które działając na komórkę nerwową powodują zmianę napięcia na jej powierzchni, dzięki czemu dochodzi do jego zablokowania w miejscu stymulacji na drodze od nerwu obwodowego do mózgu. System do stymulacji rdzenia składa się z trzech elementów: generatora impulsów (czyli baterii, której pracą steruje specjalny układ elektroniczny), niewielkiej płaskiej elektrody umieszczonej w kanale kręgowym oraz łącznika. Operacja polega na wszczępieniu elektrody stymulującej i generatora. Generator impulsów wszczepia się pod skórę na brzuchu lub w górnej części pośladka. Elektrode umieszcza się w kanale kręgowym zwykle w odcinku piersiowym (na wysokości Th8-Th10). Całość zaopatrzone jest w programator, czyli rodzaj pilota, dzięki któremu pacjent sam reguluje natężenie impulsów elektrycznych. Jeśli impuls bólowy nie dociera do mózgu, to pacjent nie odczuwa bólu.

## 2. BÓL PRZEWLEKŁY – PROBLEM CIĄGLE AKTUALNY

Ból jest procesem obronnym, ostrzegawczym dla organizmu [Melzack i Wall 1965, Diener 2005]. Będąc oznaką choroby lub urazu, sygnalizuje potrzebę poszukiwania pomocy medycznej, tym samym mimo swego nieprzyjemnego charakteru stanowi o przeżyciu jednostki. Znajduje to odzwierciedlenie w aktualnej definicji bólu podanej przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania Bólu (ang. *International Association for the Study of Pain*): ból jest nieprzyjemnym doznaniem czuciowym i emocjonalnym związanym z aktualnie występującym lub zagrażającym uszkodzeniem tkanek, lub też doznaniem opisywanym w kategoriach takiego uszkodzenia. Bólowi zwykle towarzyszą różne objawy związane z pobudzeniem autonomicznego układu nerwowego (przyspieszenie czynności serca, wzrost ciśnienia tętniczego) i wzmożonym wydzielaniem niektórych hormonów (np. hormonów kory nadnerczy) oraz zmiany zachowania (np. nad-

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Klinika Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: kiknchintr@cm.umk.pl

<sup>2</sup> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Klinika Rehabilitacji, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: klreh@cm.umk.pl

pobudliwość psychoruchowa). U podstaw odczuwania i uświadamiania doznań bólowych leży nocycepcja. Swoim zakresem obejmuje ona proces transdukcji, transmisji, modulacji, a w końcowym etapie percepcji. W proces nocycepcji są zaangażowane elementy anatomiczne (komórki układu nerwowego) oraz czynniki natury chemicznej (neuroprzekazniki i inne mediatory uwalniane np. z uszkodzonych tkanek). Odczuwalność bólu jest zmienna osobniczo – każdy z nas w inny sposób jest wrażliwy i wytrzymały na bodźce bólowe [Oakley 2004]. Procesy chorobowe stymulują receptory bólowe w tkankach obwodowych. Następnie ból jest przewodzony przez nerwy, rdzeń kręgowy do ośrodków bólowych mózgu, gdzie dochodzi do rejestracji tego przykrego doznania [Lindenroth i Meyerson 2002]. Są sytuacje, w których ból przestaje pełnić swoją funkcję ostrzegawczą, a staje się chorobą samą w sobie. Tego typu zjawiskiem jest niewątpliwie ból przewlekły. Za ból przewlekły uznaje się ból trwający ponad pół roku, którego nie można w żaden możliwie satysfakcjonujący sposób zwalczyć konwencjonalnymi metodami zachowawczymi i chirurgicznymi [Diener 2005]. Ludzie dotknięci bólem nie są w stanie normalnie funkcjonować zarówno w życiu zawodowym, rodzinnym, jak i społecznym. U chorych z bólem przewlekłym nie obserwuje się charakterystycznego dla bólu ostrego pobudzenia układu współczulnego i wewnątrzwydzielniczego. W miejsce pobudzenia psychicznego i niepokoju pojawia się nastrój depresyjny, nadmierna drażliwość i zdenerwowanie. Szczególnym rodzajem bólu jest ból kręgosłupa. Szacuje się, że ok. 70% osób po 50. roku życia przynajmniej raz w roku odczuwa ból kręgosłupa, który w znaczący sposób uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie w życiu zawodowym oraz społecznym. Zespoły bólowe kręgosłupa stanowią obecnie jedną z najczęstszych przypadłości chorobowych w populacji [Ząbek i in. 2006]. Uważa się, że współczynnik zachorowalności jest zdecydowanie wyższy niż w przypadku chorób układu sercowo-naczyniowego. Istnieje wiele przyczyn tych dolegliwości, ale na pierwszy plan wysuwają się zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze, powodujące podrażnienia zakończeń nerwowych struktur kręgosłupa. Sposób postępowania zależy od rozpoznanej przyczyny dolegliwości oraz ich charakteru. W przebiegu przewlekłego zespołu bólowego stosuje się postępowanie zachowawcze. W początkowym okresie stosuje się leki przeciwbólowe z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), niekiedy wspomagane innymi lekami przeciwbólowymi (np. paracetamol), lekami miorelaksacyjnymi oraz uspokajającymi (podwójne działania benzodiazepin). Leżenie w łóżku nie jest zalecane – odpoczynek i unieruchomienie powinny być ograniczone do minimum. Ze względów klinicznych niewątpliwie duże znaczenie ma rehabilitacja (jeśli pozwalają na to dolegliwości i zmiany stwierdzone w badaniach obrazowych). Poza leczeniem zachowawczym ważną jest także edukacja chorego oraz niekiedy psychoterapia, mająca na celu wyparcie mechanizmów utrwalania bólu oraz zapobieżenie nawrotom dolegliwości. W przypadku utrzymywania się dolegliwości mimo leczenia przeciwbólowego można zastosować leczenie miejscowe – ostrykiwanie kręgosłupa lekiem miejscowo znieczulającym lub steroidowym lekiem przeciwzapalnym. Niestety, efekt nie jest trwały i zabiegi należy co jakiś czas powtarzać. Leczenie operacyjne rozważa się po 6 miesiącach trwania dolegliwości nieustępujących po leczeniu zachowawczym. Dane statystyczne wskazują, że każdego roku na świecie wykonywanych jest około miliona operacji kręgosłupa lędźwiowo-krzyżowego, z czego trzy czwarte jest związanych z dekompresją korzeni nerwowych lub ogona końskiego. Najczęściej wykonywaną procedurą neurochirurgiczną jest discektomia lędźwiowa. Wielu autorów publikuje dobre lub bardzo dobre wyniki tych operacji, natomiast w randomizowanych badaniach dobre wyniki uzyskiwane są w 70 do 86% przypadków. Wczesne niepowodzenia operacyjne,

pod postacią uporczywego lub nawracającego bólu, dotyczą około 20% pacjentów operowanych z powodu choroby zwyrodnieniowo-zniekształcającej kręgosłupa w odcinku lędźwiowo-krzyżowym. Późne niepowodzenia obserwowane przez niektórych autorów sięgają 40% chorych. Szacuje się, że ok. 15% rocznie doświadcza z tego powodu przewlekłego bólu i niepełnosprawności z nim związanej. Niepowodzenia operacyjne (ang. *failed back surgery syndrome*), rozumiane jako nawrót bólu, obserwuje się u około 5-15% pacjentów poddanych laminektomii/discektomii w celu leczenia bólu korzeniowego [Urbanowska 2010]. Mimo postępu w medycynie, badań prowadzonych w wielu ośrodkach na całym świecie oraz systematycznego wprowadzania do leczenia nowych leków skuteczność terapii tego rodzaju bólu nadal nie jest satysfakcjonująca.

W sytuacji, gdy dojdzie do wyczerpania możliwości leczenia zachowawczego (rehabilitacji i leczenia przeciwbólowego), chorych z korelacją kliniczno-radiologiczną kwalifikuje się do leczenia operacyjnego. Powszechnie przyjęto, że chirurgia kręgosłupa ma za zadanie utrzymanie funkcji motorycznej oraz zniesienie bólu. Jednak według dostępnej literatury w leczeniu operacyjnym choroby zwyrodnieniowej kręgosłupa notuje od 25 do 30% niepowodzeń [Taslitz 1967].

### 3. NEUROSTYMULACJA – WSKAZANIA I PRZECIWWSKAZANIA

Neurostymulacja to nowoczesna metoda leczenia bólu za pomocą impulsów elektrycznych. Istnieje wiele teorii wyjaśniających mechanizm jej działania, ale mimo wyraźnego postępu medycyny jej mechanizm nie jest do końca poznany. Neurostymulację (ang. *spinal cord stimulation*, SCS) stosuje się np. po niepowodzeniach związanych z operacjami neurochirurgicznymi (ang. *failed back surgery syndrome* i *post-laminectomy syndrome*). Wskazaniem do stymulacji rdzenia kręgowego jest ból neuropatyczny, który najczęściej powstaje w wyniku ucisku nerwów, urazów, zmian niedokrwiennych, metabolicznych (np. neuropatia cukrzycowa) i poinfekcyjnych (np. neuropatia popółpaścowa). Neurostymulacja znajduje także zastosowanie w leczeniu dusznicy bolesnej, stwardnieniu rozsianym, chorobie naczyń obwodowych, zapaleniu pajęczynówki, urazach splotu barkowego, urazach rdzenia kręgowego [DeJongste 2000]. Skuteczność neurostymulacji w leczeniu dusznicy bolesnej ocenia się na ok. 80-90%, w leczeniu FBSS (ang. *failed back surgery syndrome*) na ok. 62% [Urbanowska 2010]. Impuls elektryczny działając na komórkę nerwową powoduje zmianę napięcia na jej powierzchni (czyli depolaryzację). Konsekwencją depolaryzacji jest blokada sygnału bólowego, dzięki czemu nie dociera on do mózgu. Stymulacja włókien A-beta o dużej średnicy w kolumnach grzbietowych rdzenia pobudza neurony do aktywacji mechanizmu bramkowego, który hamuje odbiór bólu we włóknach o małej średnicy A-beta i C w rogach tylnych rdzenia. Mechanizm działania przeciwbólowego opiera się na teorii bramkowej. Sposobem wywołania tego efektu jest antydromowa aktywacja grubych włókien nerwowych w obrębie kolumn grzbietowych rdzenia. Uważa się, że pewną rolę stymulacja odgrywa w regulacji aktywności układu GABA – ergicznego i adenozynowego. W przypadku leczenia bólu wieńcowego neurostymulacja powoduje zmniejszenie zapotrzebowania mięśnia sercowego na tlen, przez co poprawia lokalny przepływ krwi. System do stymulacji rdzenia składa się z trzech elementów: generatora impulsów, elektrody umieszczonej w kanale kręgowym oraz łącznika. Elektrode umieszcza się w grzbietowej części przestrzeni nadtwardówkowej, na wysokości zależnej od miejsca występowania bólu (tab. 1), zwykle drogą laminektomii, pod kontrolą fluoroskopii. Najczęstsze miejsca implantacji generatora zlokalizowane są wzdłuż linii

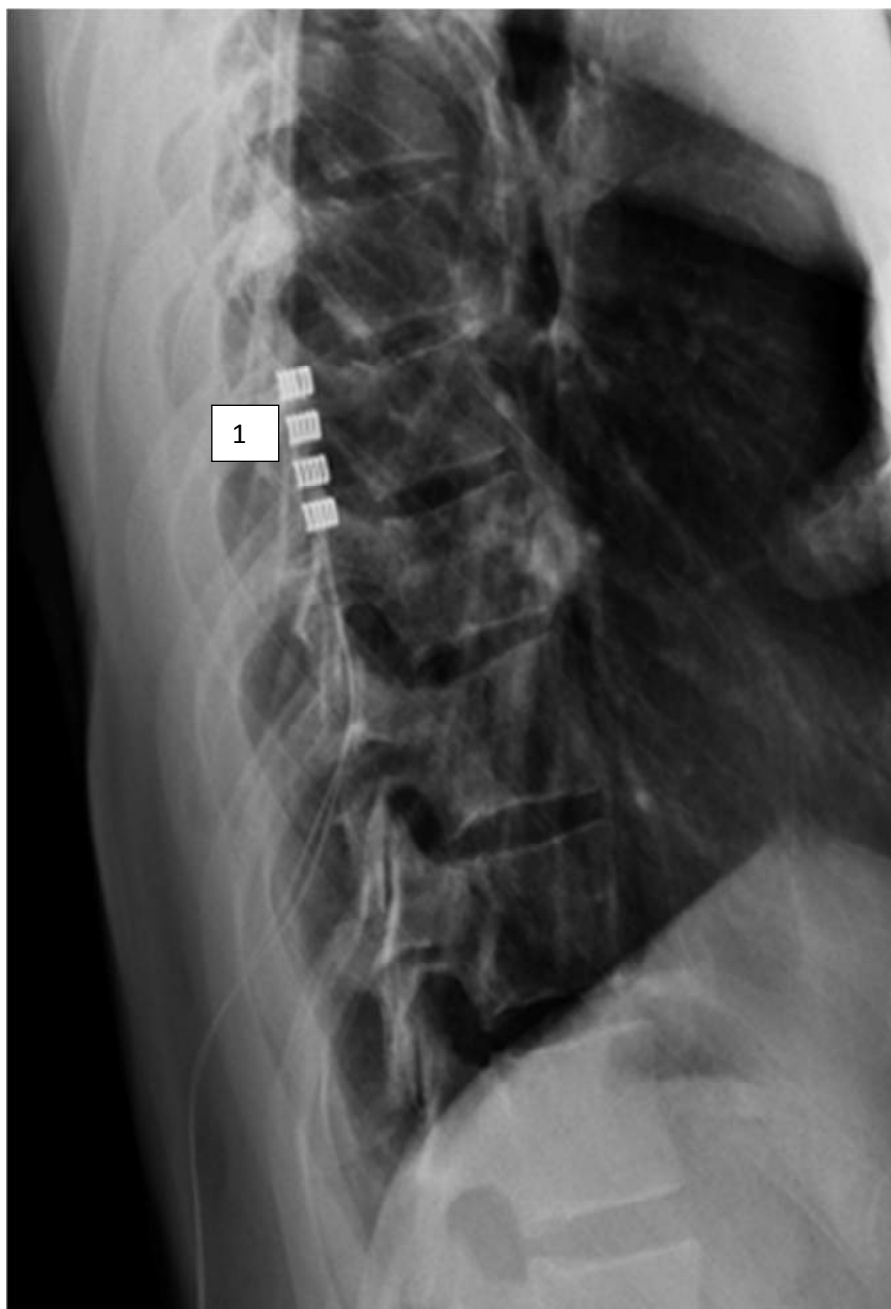
środkowo-pachowej, w górnej części pośladka, w linii pachowej tylnej i powłokach brzucha, tuż poniżej najniższego żebra. Generator zawiera baterię zamkniętą w tytanowej obudowie. Stymulacja elektryczna może pobudzać lub hamować aktywność neuronalną. Elektroda aktywną w systemie stymulacji rdzenia kręgowego jest elektroda ujemna – katoda, która depolaryzuje neurony w obszarze swojego działania, powodując ich wzmożoną aktywność. Elektroda dodatnia – anoda hamuje neurony poprzez hiperpolaryzację. W efekcie tego można uzyskać pożądane pokrycie parestezjami.

Tabela 1. Wszczepienie elektrody w zależności od miejsca występowania bólu (C – odcinek szyjny kręgosłupa, Th – odcinek piersiowy kręgosłupa, LS – odcinek lędźwiowo-krzyżowy kręgosłupa)

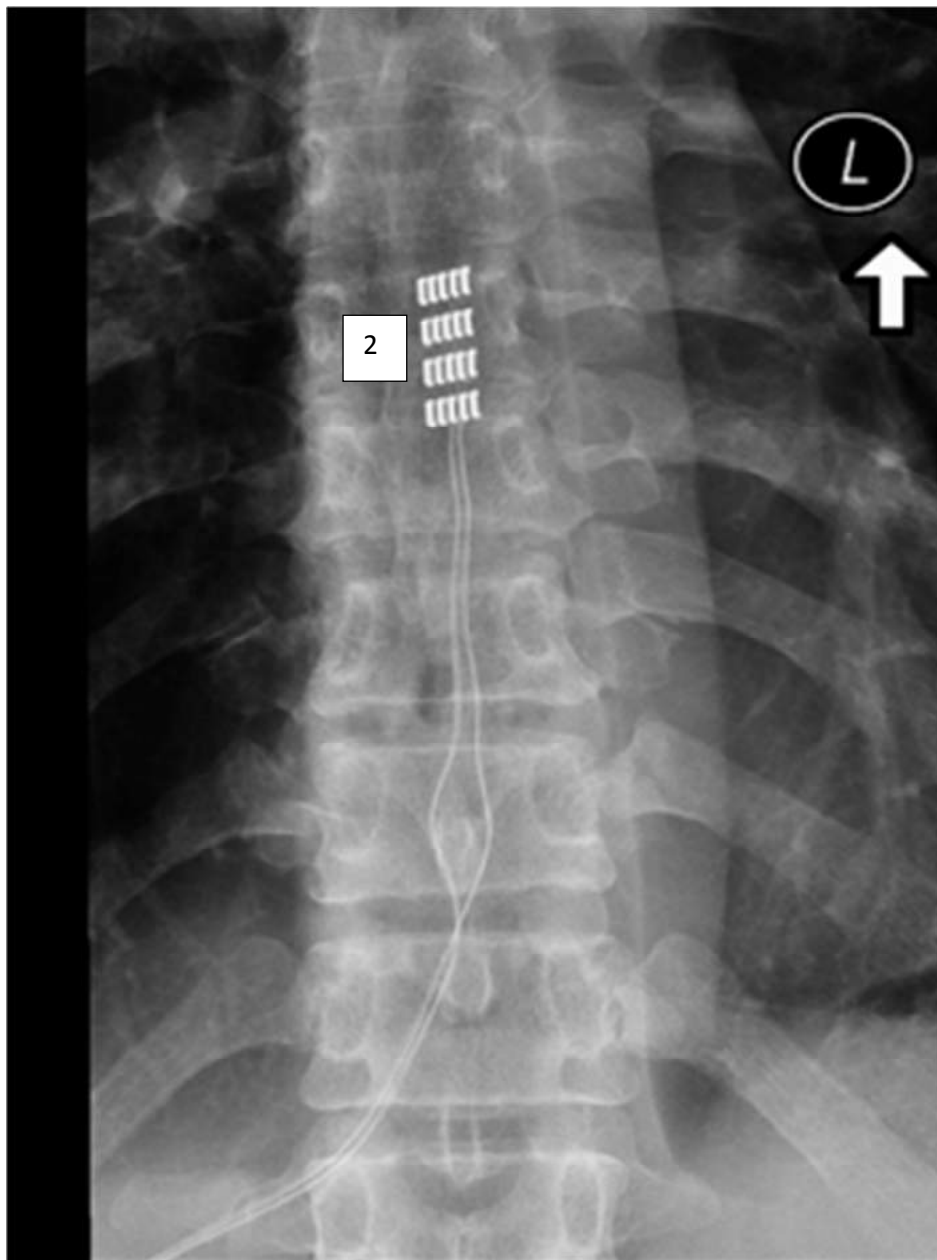
Miejsce bólu	Lokalizacja elektrody
L5-S1	Th9-Th11
Stopa	Th12-L1
Podudzie	Th11-Th12
Udo	Th9-Th10
Pośladki	Th9
Okolica przedsercowa	Th1-Th2
Kończyny górne	C4-Th1

### 3.1. Neurostymulacja – przebieg zabiegu operacyjnego

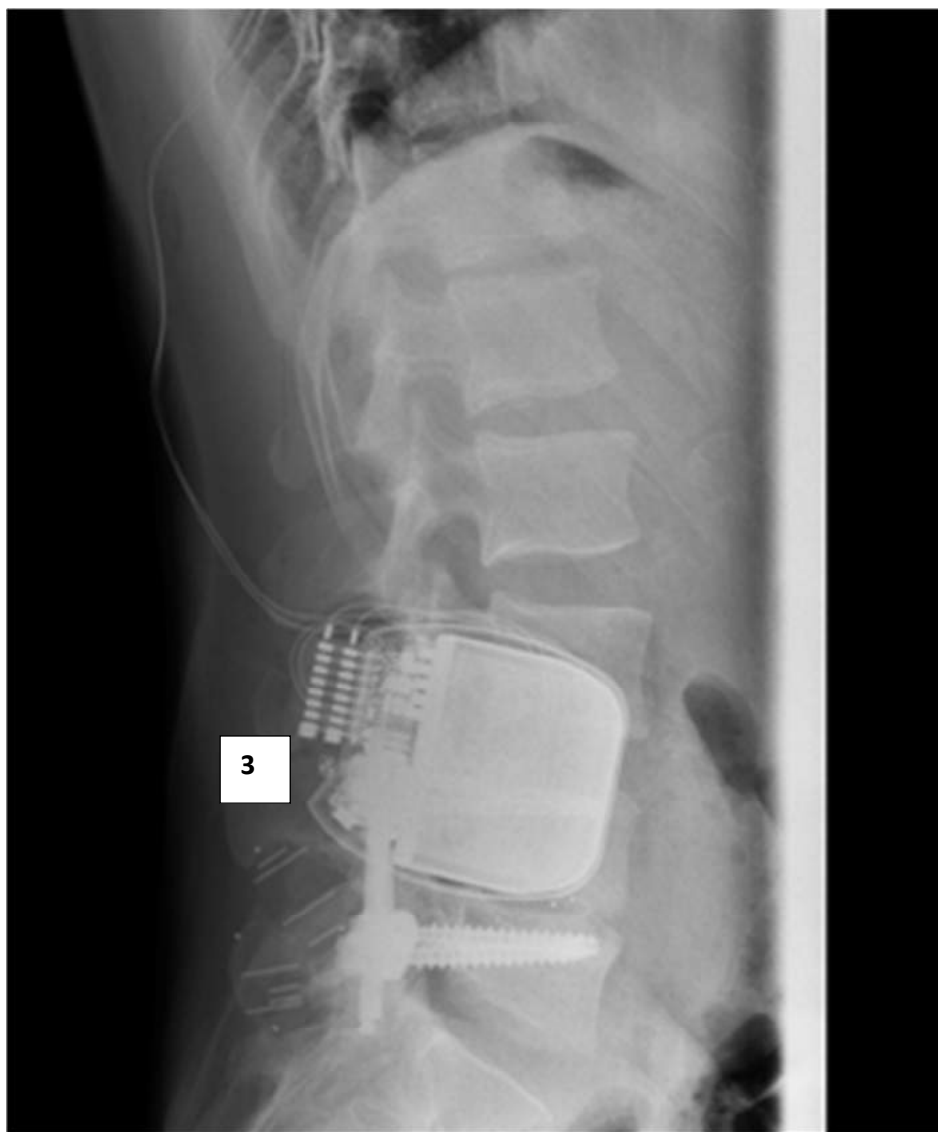
Po kwalifikacji do zabiegu operacyjnego w osłonie antybiotykowej (przed zabiegiem oraz w 1. dobie po zabiegu) generator zwykle implantuje się pod skórę (na wysokości talerza biodrowego), a wychodzącą z niego elektrodę wprowadza się do kanału kręgowego w odcinku piersiowym (zwykle na wysokości Th8-Th10) drogą tradycyjnej laminektomii (operacja neurochirurgicznej polegająca na usunięciu wyrostków kolczystych i łuków kręgów wraz z więzadłem żółtym, które przebiega między łukami kręgów) pod kontrolą tradycyjnej fluoroskopii [Melzack i Wall 1965]. Po umieszczeniu elektrody na worku oponowym i przyszyciu szwem niewchłaniającym, łączy się ją z kablem do stymulacji próbnej i wykonuje test śródoperacyjny, który pozwala na określenie poziomu stymulacji i potwierdza właściwe położenie elektrody. Po zabiegu u każdego pacjenta wykonuje się kontrolne zdjęcia rtg kręgosłupa w odcinku piersiowym oraz lędźwiowo-krzyżowym w celu zlokalizowania elektrody (rys. 1 i 2) oraz generatora (rys. 3). Całość zaopatrzona jest w programator (pilot), dzięki któremu pacjent sam reguluje natężenie impulsów elektrycznych. Po zaprogramowaniu neurostymulatora na odpowiednie napięcie prądu, chorzy opuszczają Klinikę Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej w 2.-3. dobie po zabiegu operacyjnym. W 10.-14. dobie po zabiegu operacyjnym u chorych usuwa się szwy skórne.



Rys. 1. Elektroda, zdjęcie boczne Th8-Th9  
[materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej  
Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]



Rys. 2. Elektroda, zdjęcie A-P Th8-Th9  
[materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej  
Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]



Rys. 3. Elektroda, zdjęcie boczne na wysokości talerza kości biodrowej  
[materiał własny Kliniki Neurochirurgii, Neurotraumatologii i Neurochirurgii Dziecięcej  
Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy]

### 3.2. Powikłania wszczępienia neurostymulatora

Skutki uboczne mogą być związane z zabiegiem chirurgicznym, ze stymulacją oraz z zawodnością stymulatora. Tak jak przy wszelkich zabiegach chirurgicznych przeprowadzanych w znieczuleniu ogólnym może dojść do zatoru tętnicy płucnej, ataku serca, udaru i niewydolności oddechowej. Powikłania [Lindenroth i Meyerson 2002, Cameron 2004] związane ze stymulacją rdzenia kręgowego można podzielić na tech-

niczne i biologiczne (tab. 2 i 3). Najczęściej notowanym powikłaniem technicznym jest przemieszczenie elektrody (13,2%) i jej złamanie (9,1%) oraz uszkodzenie generatora impulsów (2,9%) i baterii (1,6%). Wśród powikłań biologicznych najczęściej wymienia się: infekcję (3,4%), wyciek płynu mózgowo-rdzeniowego (0,3%), ból wokół implantu (0,9%). Po wszczępieniu stymulatora chory może odczuwać dyskomfort i bóle w miejscach nacięć. Rany pooperacyjne na ogół szybko się goją, a przy większych bólach można zastosować środki przeciwbólowe. Tak jak każde urządzenie techniczne, stymulator nie jest sprzętem całkowicie niezawodnym i podlega konserwacji. Bateria wymaga wymiany co 2-7 lat w zależności od użytkowania i parametrów stymulacji (napięcie, częstotliwość długość impulsu prądowego). Poszczególne części urządzenia erodują i szacuje się, że po 10-15 latach mogą przestać działać i będą wymagały wymiany. Przebieg lub naruszenie obudowy elektrody może spowodować poparzenia. Stymulator jest na ogół włączony przez całą dobę. Niemniej jednak pacjent jest wyposażony w pilota pozwalającego na włączanie i wyłączanie stymulatora.

Tabela 2. Powikłania techniczne neurostymulacji (ang. *spinal cord stimulation, SCS*) [Cameron 2004]

Powikłania techniczne	Częstość występowania
Przemieszczenie elektrody	13,2%
Złamanie elektrody	9,1%
Uszkodzenie generatora impulsów	2,9%

Tabela 3. Powikłania biologiczne (ang. *spinal cord stimulation, SCS*) [Cameron 2004]

Powikłania biologiczne	Częstość występowania
Infekcja	3,4%
Płynotok	0,3%
Ból wokół implantu	0,9%
Niepożądana stymulacja	2,4%
Krwiak	0,3%
Reakcja alergiczna	0,1%
Uszkodzenie skóry	0,2%
Inne	1,4%

#### 4. PODSUMOWANIE

Ból jest zjawiskiem wieloczynnikowym i leczenie SCS powinno stanowić element kompleksowego działania. Jedną z metod leczenia przewlekłego zespołu bólowego jest neurostymulacja (SCS). Stymulacja rdzenia kręgowego (SCS) jest techniką medyczną stosowaną od końca 1960 roku, aby złagodzić ból przewlekły [Lindenroth i Meyerson 2002, Cameron 2004]. Według NeurosurgeryToday.org, około 50.000 urządzeń wszczepia się na świecie co roku. Ta technika medyczna jest zatwierdzona przez amerykańską FDA do leczenia przewlekłego bólu kręgosłupa w odcinku szyjnym piersiowym i lędźwiowo-krzyżowym. Metoda znalazła zastosowanie w leczeniu bólu neuropatycznego, *chronic low back pain*, bólu w przebiegu niedokrwienia kończyn dolnych, niepoddającego się leczeniu zachowawczemu bólowi wieńcowemu. Szacuje się, że rocznie w Europie wykonuje się ok. 5 tys. zabiegów operacyjnych związanych ze



wszczepieniem SCS. Neurostymulację SCS stosuje się do zwalczania bólu neuropatycznego. Wskazaniem implantacji do SCS są także tzw. zespoły CRPS (ang. *Complex Regional Pain Syndromes*) oraz bóle po zabiegach neurochirurgicznych tzw. *failed back surgery syndrome* i *postlaminectomy syndrome*. W 1998 r. na konferencji w Brukseli opublikowano kryteria kwalifikacji chorych do zabiegu SCS. Do zabiegu SCS kwalifikuje się pacjentów, u których leczenie zachowawcze jest nieskuteczne lub zakończono leczenie choroby podstawowej, chorych dobrze współpracujących i należycie poinformowanych o metodzie, jej skuteczności i potencjalnych objawach ubocznych, z zachowaną przynajmniej częściowo funkcją sznurów tylnych [Sokal 2007]. Z kolei przeciwwskazania obejmują chorych z rozrusznikiem serca, z zaburzeniami krzepliwości, zaburzeniami immunologicznymi oraz uzależnieniem od leków. Implantacja SCS powinna być poprzedzona analizą psychologiczną.

## LITERATURA

- Cameron T., 2004. Safety and efficacy of spinal cord stimulation for the treatment of chronic pain: a 20 year literature review. *J. Neurosurg (Spine 3)* 100, 254-267.
- DeJongste M.J., 2000. Spinal cord stimulation for ischemic heart disease. *Neurol Res.* 22, 293-298.
- Diener H.Ch., 2005. Pojęcia związane z bólem, Leczenie bólu zespoły bólowe – metody postępowania. Wyd. Urban& Partner Wrocław, 3-5.
- Lindenroth B., Meyerson B.A., 2002. Spinal cord stimulation: mechanism of action. [W:] K.J. Burchiel (ed.), *Surgical management of pain*, Thieme New York, 505-526.
- Melzack R., Wall P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971-979.
- Oakley J.C., 2004. Spinal cord stimulation for the treatment of chronic pain. [W:] K.A. Follet (ed.), *Neurosurgical pain management*, Elsevier, 131-143.
- Sokal P., 2007, Leczenie operacyjne przewlekłych zespołów bólowych. [W:] M. Harat (red.), *Neurochirurgia czynnościowa*, Drukarnia TOM, 103-126.
- Taslitz N., 1967. Electrical inhibition of pain: experimental evaluation, *Anesth. Analg.* 46(3), 299-305.
- Urbanowska J., 2010. Stymulacja rdzenia kręgowego w leczeniu bólu przewlekłego, Spinal cord stimulation in the treatment of chronic pain. *Acta Bio-Optica and Informati-ca* 2(16), 129-132.
- Ząbek M., Sławek J., Harat M., Koszewski W., Opala G., Friedman A., 2006. Stymulacja mózgu i rdzenia kręgowego w leczeniu zaburzeń ruchowych oraz zespołów bólowych – podstawy teoretyczne i zalecenia praktyczne. *Neurol. Neurochir. Pol.* 40(1), 1-9.