

Postępy w naukach przyrodniczych

Progresses in life sciences

1



Redakcja
Kamil Maciąg
Mirosław Szala
Grzegorz Winiarski

Politechnika Lubelska
Lublin 2013

Postępy w naukach przyrodniczych

Progresses in life sciences

1

Politechnika Lubelska 60 lat



Postępy w naukach przyrodniczych

Progresses in life sciences

1

redakcja

Kamil Maciąg

Mirosław Szala

Grzegorz Winiarski



Politechnika Lubelska
Lublin 2013

RECENZENCI

prof. dr hab. Barbara Baraniak, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
prof. dr hab. Zbigniew J. Dolatowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
prof. dr hab. Bogusław Makarski, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
dr hab. Brygida Ślaska prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
dr hab. Marek Babicz prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
dr hab. Waldemar Gustaw, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, prof. UMCS w Lublinie

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2013

ISBN 978-83-63569-84-6

Wydawca: Politechnika Lubelska

ul. Nadbystrzycka 38D, 20-618 Lublin

Realizacja: Biblioteka Politechniki Lubelskiej

Ośrodek ds. Wydawnictw i Biblioteki Cyfrowej

ul. Nadbystrzycka 36A, 20-618 Lublin

tel. (81) 538-46-59, email: wydawca@pollub.pl

www.biblioteka.pollub.pl

Druk: TOP Agencja Reklamowa Agnieszka Łuczak

www.agencjatom.pl

Elektroniczna wersja książki dostępna w Bibliotece Cyfrowej PL www.bc.pollub.pl

Nakład: 50 egz.

Spis treści

Katarzyna Szałapata, Monika Osińska-Jaroszuk, Anna Jarosz-Wilkołazka Bakteryjna degradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych	6
Małgorzata Pac Bioróżnorodność bakterii brodawkowych tworzących symbiozę z roślinami motylkowatymi	22
Anita Swatek, Magdalena Staszczak Degradacja modelowych substratów białkowych przez kompleksy proteasomowe grzybów ligninolitycznych	32
Artur Pałasz, Ewa Rojczyk-Gołębiewska Nowoczesne metody obrazowania układu nerwowego	45
Monika Olszówka, Kamil Maciąg Obecne i przyszłe perspektywy wykorzystania alg	59
Katarzyna Michalczyk, Ilona Mikiciuk, Aleksandra Ciołkowska Ocena stanu wiedzy konsumentów na temat flawonoidów oraz ich wpływu na zdrowie człowieka	69
Sylvia Krzepkowska, Elżbieta Woźniak, Barbara Misztal Oznaczanie azotanów (III) w produktach mięsnych	81
Maciej Frant, Aleksandra Żurek Porfiryny – właściwości oraz wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej	89
Kamila Wlizio, Monika Osińska-Jaroszuk, Anna Jarosz-Wilkołazka Taksol – cząsteczka nadziei w leczeniu nowotworów	100
Kinga Kropiwek, Marcin Hałabis, Mikołaj Firlej, Marcin Letkiewicz, Damian Iwon, Janusz Greszta Wpływ hierarchii społecznej prosiąt na ich behavior	114

Bakteryjna degradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych

Wprowadzenie

Policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH – ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) są to hydrofobowe związki, zbudowane z dwóch lub więcej połączonych ze sobą pierścieni benzenowych, które mogą znajdować się w ułożeniu liniowym, kątowym lub klastrowym. Są one bezbarwnymi, białymi lub bładożółtymi ciałami stałymi, charakteryzującymi się niską rozpuszczalnością w wodzie oraz wysoką temperaturą topnienia i wrzenia [1]. Ich właściwości fizyko-chemiczne zmieniają się wraz ze wzrostem liczby pierścieni benzenowych, a co za tym idzie wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej. Skutkiem tego jest wyraźne zmniejszenie aktywności chemicznej i rozpuszczalności w wodzie tych związków [2]. Swoją wysoką stabilność chemiczną węglowodory aromatyczne zawdzięczają atomom węgla, znajdującym się w policyklicznym ułożeniu; atomy te są w stanie hybrydyzacji sp^2 [3].

Cząsteczki PAH mogą pochodzić zarówno ze źródeł naturalnych, jak i antropogenicznych. Najważniejszymi procesami prowadzącymi do powstawania ich naturalnych skupisk są pożary lasów i terenów nieuprawnych czy erupcje wulkaniczne. Do ich wytwarzania dochodzi również podczas geologicznych reakcji termalnych towarzyszących produkcji paliw kopalnych. Jednak naturalne procesy jedynie w nieznacznym stopniu wpływają na ich syntezę. Do powstawania tych związków głównie przyczyniają się placówki zajmujące się obróbką drewna czy spalaniem odpadów. Policykliczne aromatyczne węglowodory mogą powstawać również podczas niepełnego spalania materiałów organicznych, wycieków ropy naftowej, spalania smoły węglowej, odpadów komunalnych, olei smarowych a także w procesie wytwarzania spalin przez pojazdy mechaniczne. Warto również nadmienić, że jednym z bardzo ważnych źródeł zanieczyszczeń aromatycznych jest dym

¹ Email: katarzyna.szalapata@poczta.umcs.lublin.pl Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii (<http://www.fungi.umcs.lublin.pl/>)

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

³ Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

tytoniowy, który naraża na działanie tych szkodliwych związków zarówno osoby palące, jak i biernych palaczy [1÷9, 21].

Cząsteczki PAH nigdy nie występują pojedynczo, zawsze znajdują się w mieszaninie. Przeprowadzone wielokrotne badania pozwoliły stwierdzić, że obecność jednego związku z tej grupy świadczy również o obecności innych aromatycznych węglowodorów w danej próbie środowiskowej [9].

Od bardzo dawna przypuszczano, że cząsteczki PAH jako główne składniki zanieczyszczeń aromatycznych wykazują właściwości toksyczne, kancerogenne, mutagenne oraz teratogenne. Obecnie benzo[a]piren jest uznawany za jeden z najbardziej kancerogennych związków należących do PAH [7].

Toksyczność tych węglowodorów związana jest głównie z ich biologiczną aktywacją, która prowadzi do powstania pochodnych katecholu lub epoksydów. Te związki pośrednie są źródłem wielu reaktywnych form tlenu, które z kolei mogą tworzyć kowalencyjne addukty z kwasami nukleinowymi oraz przyczyniać się do inaktywacji białek, niszczenia potencjału błonowego czy peroksydacji lipidów [3].

W niektórych cząsteczkach PAH, ze względu na wzajemne ułożenie pierścieni benzenowych, można wyróżnić strukturę „bay region”. Jest to obszar o zwiększonej gęstości elektronowej, która umożliwia tworzenie adduktów z DNA, a w konsekwencji może niekorzystnie wpływać na replikację komórki [9].

Ponadto na wysoką szkodliwość policyklicznych węglowodorów aromatycznych wpływa fakt, iż są one wysoko przyswajalne przez nasz układ pokarmowy dzięki bardzo dobrej rozpuszczalności w tłuszczach oraz to, że aż 75% absorbowanych przez nasz organizm cząsteczek PAH jest wchłaniana przez skórę [5].

Wysoka toksyczność i trwałość policyklicznych węglowodorów aromatycznych stwarza konieczność poszukiwania nowych metod pozwalających na ich efektywną degradację. Poza opracowanymi do tej pory metodami chemicznymi, obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji tych związków.

1. Ogólny mechanizm biodegradacji

Biodegradacja to biochemiczny rozkład związków organicznych przez organizmy żywe (np. bakterie, promieniowce, grzyby, glony) na prostsze składniki chemiczne. Zazwyczaj proces ten wiąże się z niewielkimi zmianami w cząsteczce, takimi jak substytucja lub modyfikacje grup funkcyjnych. Jednak w niektórych przypadkach związek poddany biodegradacji może ulegać całkowitemu rozkładowi, a efektem końcowym tego procesu jest przekształcenie złożonych cząsteczek organicznych w CO₂ i H₂O oraz sole nieorganiczne [10].

W procesie biodegradacji wyjątkowo ważną rolę odgrywa tlen. Poza tym, że jest akceptorem elektronów dla związków aromatycznych, jest on również

zaangażowany w aktywację substratu w reakcji utleniania. Bardzo częstym zjawiskiem jest również biodegradacja w warunkach beztlenowych; wówczas akceptorami elektronów mogą być azotany, żelazo Fe(III) lub siarczany [7].

Wzrost stopnia utleniania jądra aromatycznego cząsteczek PAH sprawia, że stają się one bardziej podatne na degradację, umożliwiając mikroorganizmom korzystanie z nich jako jedyne źródła węgla i energii. Aby związki aromatyczne uzyskały wyższy stopień utlenienia, należy wbudować w ich strukturę tlen cząsteczkowy, co zachodzi podczas reakcji katalizowanej przez oksygenazy, enzymy należące do klasy oksydoreduktaz [3].

W większości szlaków metabolicznych reakcja utleniania przeprowadzana jest przez mono- i dioksygenazy w celu utworzenia z zanieczyszczeń aromatycznych – dihydroksylowanych produktów pośrednich. Te intermedyty są następnie wykorzystywane przez dioksygenazy intradiolowe lub ekstradiolowe w reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego za pomocą tlenu. Rozszczepienie może następować poprzez wbudowanie atomu tlenu pomiędzy dwie grupy hydroksylowe (*orto*/intradiolowe rozszczepienie pierścienia) lub poprzez wbudowanie go obok jednej z dwóch grup hydroksylowych (*meta*/ekstradiolowe rozszczepienie pierścienia). Produkty tej reakcji są następnie kierowane do centralnych szlaków metabolicznych, w których formowane są związki pośrednie biorące udział w cyklu Krebsa [7].

Niektóre szczepy bakteryjne, np. *Mycobacterium* sp., mogą utleniać pierścień aromatyczny policyklicznych węglowodorów aromatycznych dzięki użyciu takiego enzymu jak monooksygenaza cytochromu P₄₅₀. W reakcji tej częściej powstają *cis*- niż *trans*-dihydrodirole [7].

Mechanizm biodegradacji węglowodorów aromatycznych w warunkach beztlenowych można opisać jako proces trójetapowy: węglowodory aromatyczne są częściowo degradowane w warunkach redukujących w obecności azotanów i siarczanów do kwasów organicznych o niskiej masie cząsteczkowej, wytworzone kwasy organiczne odgrywają rolę ligandów kompleksujących nierozpuszczalne tlenki żelaza Fe(III) w warstwach wodonośnych i aktywują żelazo Fe(III), ostatecznie aktywowane żelazo jest dostępne dla bakterii redukujących i w ten sposób wzmacnia degradację węglowodorów aromatycznych [1].

Zarówno degradacja w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych znacząco przyczynia się do usuwania aromatycznych zanieczyszczeń ze środowiska naturalnego. Mechanizm tlenowy wydaje się być jednak bardziej preferowany przez mikroorganizmy. Spowodowane jest to głównie tym, że biodegradacja beztlenowa jest procesem znacznie wolniejszym od degradacji tlenowej. Dodatkowo warunki beztlenowe sprawiają, że proces ten jest wysoce niekorzystny termodynamicznie [7].

2. Szlaki degradacji wybranych policyklicznych węglowodorów aromatycznych

Na przestrzeni kilku ostatnich wieków działalność ludzi znacznie przyczyniła się do dużego wzbogacenia środowiska naturalnego w zanieczyszczenia aromatyczne. Rozwój transportu i przemysłu ciężkiego sprawia, że cząsteczki PAH kumulują się nie tylko w glebie, ale znajdują się również w otaczającym nas powietrzu, a także pokrywają rośliny z łatwością łącząc się z ich warstwą kutykularną, która tak jak węglowodory aromatyczne ma charakter lipofilny. Aromatyczne zanieczyszczenia znajdują się nawet w miejscach, które wydają się być dla nas terenami dziewiczymi. Tak wysokie rozprzestrzenianie się tych związków na kuli ziemskiej związane jest z cyrkulacją powietrza atmosferycznego [11].

Wysokie stężenia cząsteczek PAH w środowiskach zanieczyszczonych, łatwość rozprzestrzeniania się oraz wpływ węglowodorów aromatycznych i metali ciężkich na utrudnienie ich biodegradacji sprawiają, że prowadzone są badania nad poznaniem pełnych szlaków ich bakteryjnego rozkładu [7].

Obecnie wiemy, że istnieje wiele gatunków bakterii, które są zdolne do częściowego lub całkowitego rozkładu policyklicznych węglowodorów aromatycznych (Tabela 1).

Tabela 1 Bakterie degradujące wybrane policykliczne węglowodory aromatyczne

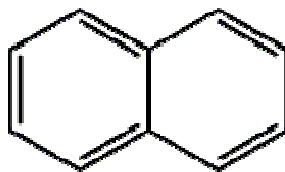
PAH	Gatunki bakterii
Naftalen	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluoresnens</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. testosteroni</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Fenantren	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijerinickia sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Acinetobacter sp.</i>

Fluoranten	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Piren	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Benzo[a]piren	<i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>

Źródło: opracowano na podstawie [7]

2.1. Naftalen

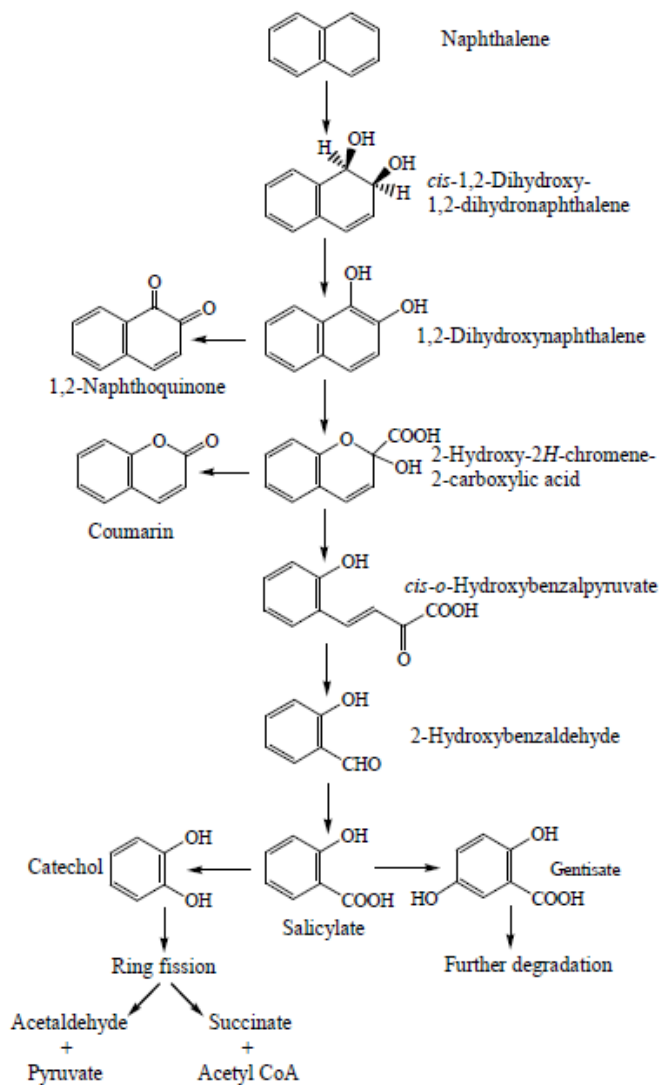
Naftalen (Rys. 1) jest dwupierścieniowym aromatycznym węglowodorem, który powszechnie występuje w środowisku. Ze względu na swoją prostą budowę i stosunkowo wysoką rozpuszczalność jest on stosowany jako modelowy związek przy przedstawianiu procesu bakteryjnej degradacji policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Dodatkowo informacje o biodegradacji naftalenu pozwalają zrozumieć i przewidywać prawdopodobne szlaki metaboliczne w przypadku innych wielopierścieniowych węglowodorów [2, 12].



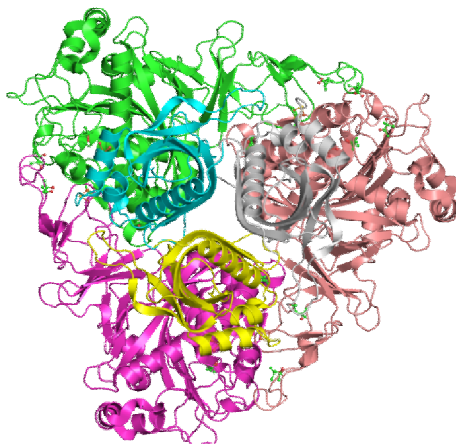
Rys. 1 Struktura naftalenu

Pierwszy etap szlaku tlenowej degradacji naftalenu opiera się na enzymatycznej reakcji, w której powstaje *cis*-(1R, 2S)-dihydrokso-1,2-dihydronaftalen (Rys. 2). W reakcji tej bierze udział dioksygenaza naftalenowa (Rys. 3), będąca białkiem wieloenzymatycznym. W skład jej kompleksu wchodzi trzy składniki: reduktaza ferredoksyny, ferredoksyna i białko żelazowo-siarkowe składające się z dwóch nieidentycznych podjednostek α i β [12].

Kolejnym etapem jest utworzenie 1,2-dihydroksynaftalenu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę *cis*-dihydrodiolową. Następnie 1,2-dihydroksynaftalen jest metabolizowany do kwasu salicylowego w szeregu reakcji, które są dokładniej przedstawione na rys. 2. Poza wcześniej opisaną reakcją 1,2-dihydroksynaftalen może być również utleniany nieenzymatycznie do 1,2-naftochinonu [2].



Rys. 2 Proponowany kataboliczny szlak degradacji naftalenu przez bakterie [2]



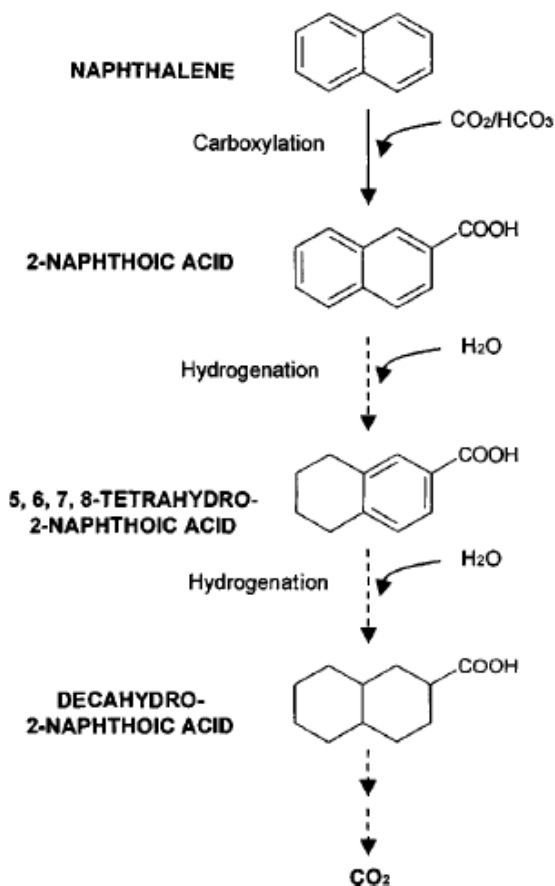
Rys. 3 Struktura krystaliczna dioksygenazy 1,2-naftalenowej *Rhodococcus* sp. [13]

Wytworzony kwas salicylowy jest dekarboksylowany do katecholu, który jest następnie metabolizowany w reakcji *meta*- lub *orto*- rozerwania pierścienia aromatycznego. Powstające wskutek tej reakcji aldehyd octowy i pirogronian oraz bursztynian i acetylo-CoA są związkami, które mogą zostać włączone do podstawowych szlaków metabolizmu komórkowego [2]. Potwierdzone również zostało powstawanie kwasu gentyzynowego podczas degradacji naftalenu przez *P. fluorescens* i *P. alcaligenes* [3].

Poza degradacją w warunkach tlenowych prowadzone są również badania nad anaerobową degradacją naftalenu (Rys. 4). Obecnie jednym z zaproponowanych schematów jest szlak degradacji w warunkach redukujących w obecności siarczanów. Pierwszą reakcją jest tu karboksylacja pierścienia aromatycznego prowadząca do powstania kwasu 2-naftalenowego. Takie przekształcenie naftalenu ma aktywować cząsteczkę do szeregu reakcji hydrogenacji, które skutkują powstaniem kwasu dekahydro-2-naftalenowego, który prawdopodobnie może być rozkładany do dwutlenku węgla. Nie można wykluczyć istnienia innych mechanizmów dla anaerobowej degradacji naftalenu jednak nie zostały one do tej pory wyjaśnione [5].

Jednym z bardzo poważnych problemów podczas biodegradacji naftalenu jest toksyczność jego związków pośrednich. Wiele badań dowiodło, że metabolity naftalenu, takie jak dihydrodiole, mają potencjalnie wyższą biodostępność i mogą być bardziej toksyczne niż ich prekursor [7]. Lundsted i in. [14], badając utlenione pochodne PAH, potwierdzili kumulowanie się pochodnych ketonów, chinonów i kumaryn w czasie procesu usuwania aromatycznych zanieczyszczeń. W takiej sytuacji bardzo istotne staje się osiągnięcie kompletnej mineralizacji

tych związków bez akumulacji związków pośrednich, szczególnie końcowych produktów, które nie ulegają już dalszym przemianom [7].



Rys. 4 Uproszczony szlak degradacji naftalenu w warunkach anaerobowych [5]

2.2. Fenantren

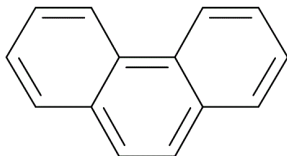
Fenantren (Rys. 5) jest najmniejszą cząsteczką PAH, która posiada strukturę „bay region”, co sprawia, że bardzo często jest używany jako modelowy substrat dla metabolizmu kancerogennych związków aromatycznych. Bakteryjny metabolizm fenantrenu jest inicjowany w reakcji podwójnej hydroksylacji pierścienia aromatycznego przez dioksygenazę fenantrenową. Na tym etapie powstaje 3,4-dihydroksyfenantren, który jest następnie utleniany do kwasu 1-hydroksy-2-naftalenowego [3].

W zależności od rodzaju szczepu bakteryjnego degradującego fenantren możliwe jest metabolizowanie tego związku według trzech różnych schematów:

- 1) szlak ftalanowy – podczas którego w wyniku przekształcania kwasu 1-hydroksy-2-naftalenowego powstaje kwas protokatechowy,
- 2) szlak 1,2-dihydroksynaftalenowy – podczas którego powstaje kwas salicylowy, który może zostać przekształcony do kwasu gentyzynowego lub katecholu,
- 3) szlak tworzenie 1-naftolu z kwasu 1-hydroksy-2-naftalenowego w reakcji katalizowanej przez dekarboksylazę, który jest później metabolizowany do kwasu salicylowego lub o-ftalanu.

Wszystkie trzy szlaki degradacji prowadzą do powstania związków, które po reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego mogą zostać wprowadzone do cyklu kwasów trikarboksylowych [3].

Pizzul i in. [15] stwierdzili, iż *Rhodococcus* sp. DSM 44126 jest zdolny do degradacji 79,4% czystego fenantrenu po upływie 14 dni od założenia hodowli. Podobne wartości osiągnięto jeśli hodowla dodatkowo była wzbogacona heksadekanem (80,6%). Podwyższenie stopnia degradacji do 96,8% osiągnięto poprzez dodanie oleju rzepakowego (0,1%), a dodatek glukozy (0,2%) spowodował, że stężenie fenantrenu spadło poniżej limitu detekcji.



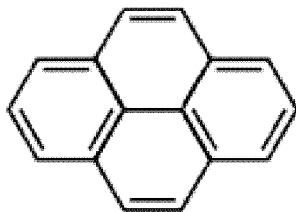
Rys. 5 Struktura fenantrenu

2.3. Piren

Piren (Rys. 6), posiadający cztery pierścienie benzenowe, jest m.in. produktem ubocznym niepełnego spalania związków organicznych. Jednym z najczęściej badanych gatunków bakteryjnych, które degradują piren jako jedyne źródło węgla i energii, jest *Mycobacterium* [2].

Piren jest bardzo często używany jako modelowy związek w przypadku degradacji aromatycznych węglowodorów o wysokiej masie cząsteczkowej. Jego metabolizm u *Mycobacterium* sp. PYR-1 i *Rhodococcus* sp. UW1 przebiega w bardzo podobny sposób [12]. Główny i najważniejszy szlak biodegradacji pirenu rozpoczyna się od reakcji dioksygenacji w pozycji 1,2-. Początkowy oksydacyjny atak powoduje powstanie zarówno *cis*-, jak i *trans*-4,5-pirenodihydrodiolu. Rearomatyzacja dihydrodioli i rozerwanie pierścienia

w pozycji *orto*- prowadzą do powstania kwasu fenantreno-4,5-dikarboksylowego, który jest dalej przekształcany do kwasu 4-fenantrenowego. Kolejny produkt pośredni powstaje w wyniku drugiej reakcji dioksygenacji, a w wyniku jego rearomatyzacji utworzony zostaje 3,4-dihidroksynaftalen. Ostatnim etapem metabolizmu pirenu jest wprowadzenie 3,4-dihidroksynaftalenu w szereg przemian, które wykazują duże podobieństwo do tych zachodzących podczas degradacji fenantrenu [12].



Rys. 6 Struktura piranu

3. Czynniki wpływające na biodegradację

Proces biodegradacji jest niezwykle ważny dla ochrony środowiska przyrodniczego przed aromatycznymi zanieczyszczeniami. Z tego względu bardzo istotne staje się poznanie i zrozumienie działania czynników wpływających na jego intensyfikację. Jest to możliwe dzięki prowadzeniu badań laboratoryjnych, które pozwalają określić optymalne warunki degradacji.

Pierwszym z czynników, wywierających znaczący wpływ na zdolność mikroorganizmów do degradacji cząsteczek PAH, jest temperatura. Większość terenów skażonych przez zanieczyszczenia aromatyczne nie jest w stanie utrzymać optymalnych warunków termicznych dla biodegradacji przez cały rok. Wzrost temperatury pozwala na zwiększenie rozpuszczalności związków aromatycznych oraz zwiększenie ich biodostępności. Niestety, jednocześnie powoduje to również spadek rozpuszczalności tlenu, co negatywnie wpływa na metaboliczną aktywność organizmów aerobowych [5].

Biodegradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych może zachodzić w szerokim zakresie temperatur. Reakcje metabolizowania cząsteczek PAH przeprowadzane są najczęściej w temperaturach mezofilnych, rzadziej badana jest efektywność degradacji w bardzo wysokich lub bardzo niskich temperaturach. Ponadto wykazano, że mikroorganizmy mogą się adaptować do metabolizowania węglowodorów aromatycznych w ekstremalnych warunkach, np. odnotowano degradację naftalenu i fenantrenu pochodzących z ropy naftowej w wodzie morskiej o temperaturze około 0°C [5].

Wiele miejsc zanieczyszczonych policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi nie posiada właściwej dla biodegradacji wartości pH.

Alkalizacja gleby może mieć miejsce poprzez rozkład różnego rodzaju odpadów, m.in. betonu lub cegieł, natomiast środowisko kwaśne łatwo wytwarzane jest w reakcjach uwalniania i utleniania siarczków. Tak poważne zmiany powodują powstawanie mniej korzystnych warunków dla metabolizmu bakteryjnego, gdyż bardzo wiele mikroorganizmów nie wykazuje zdolności do degradacji cząsteczek PAH w warunkach kwaśnych lub zasadowych. Ciekawym odkryciem było to, że pewien gatunek *Pseudomonas*, wyizolowany ze środowiska skażonego węglowodorami aromatycznymi, wykazywał zdolność do obniżenia wartości pH w podłożu płynnym z 9 do 6,5 w ciągu 24 godzin, a dodatkowo wykorzystywał naftalen jako jedyne źródło węgla i energii. Pozwala to stwierdzić, że mikroorganizmy bytujące w środowiskach zanieczyszczonych cząsteczkami PAH mogą mieć stosunkowo wysoki próg tolerancji względem niekorzystnych warunków środowiskowych, ale są także potencjalnie zdolne do metabolizowania zanieczyszczeń aromatycznych w suboptymalnych warunkach [5].

Choć wiadomo, że biodegradacja może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, większość badań skupia się nad biodegradacją tlenową. Podczas tlenowego metabolizmu aromatycznych zanieczyszczeń tlen jest zaangażowany w działanie mono- i dioksygenaz, a jego dostępność znacząco wpływa na działanie tych enzymów [5].

Nadal nie stwierdzono, czy korzyści płynące z beztlenowej biodegradacji przeważają nad jej skutkami negatywnymi (m.in. produkcja gazów cieplarnianych czy przyczynianie się do eutrofizacji wód). Mimo iż przyjęte zostało, że biodegradacja w środowiskach zasobnych w tlen jest o rząd wielkości wyższa niż w środowiskach ubogich w ten pierwiastek, istnieją doniesienia, że w warunkach denitryfikacyjnych poziom degradacji aromatycznych zanieczyszczeń przyjmuje podobne wartości jak w warunkach tlenowych [5].

Mikroorganizmy, oprócz łatwo degradowanego źródła węgla, wymagają do swojego wzrostu również dostępu do składników mineralnych, którymi są azot, fosfor i potas. W miejscach skażonych policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi, gdzie stężenie węgla organicznego jest stosunkowo wysokie ze względu na rodzaj zanieczyszczeń, substancje odżywcze mogą zostać bardzo szybko wyczerpane podczas metabolizmu bakteryjnego. Dlatego też bardzo częstą praktyką jest uzupełnianie środowiska, w którym rozwijają się mikroorganizmy, w azot i fosfor. Pierwiastki te stymulują bakterie i jednocześnie wpływają na podwyższenie poziomu biodegradacji zanieczyszczeń aromatycznych. Oszacowano również właściwy stosunek azotu i fosforu do węgla dla mikroorganizmów, który umożliwia ich optymalny wzrost. Oscyluje on pomiędzy wartościami C:N:P – 100:15:3 a 120:100:1 [5].

Poza czynnikami fizyko-chemicznymi, które w istotny sposób mogą wpływać na proces biodegradacji, bakterie wytworzyły kilka strategii

pozytywnie wpływających na przyswajanie przez nie policyklicznych węglowodorów aromatycznych. W procesy te zaangażowane są biosurfaktanty, sfingany oraz biofilmy tworzone na krystalicznych aromatycznych zanieczyszczeniach [3, 5, 16, 20].

Biosurfaktanty są substancjami, które obniżają napięcie powierzchniowe oraz napięcie na powierzchni fazy. O ich aktywności powierzchniowej decyduje amfifilowa budowa cząsteczki, która zawiera część hydrofobową i hydrofilową, co sprawia, że biosurfaktanty mogą się gromadzić na powierzchni dwóch niemieszających się faz np. oleju i wody. Biosurfaktanty są wytwarzane przez wiele bakterii, drożdży lub grzybów pleśniowych. W kulturach bakteryjnych można wyróżnić trzy kategorie biosurfaktantów:

- 1) biosurfaktanty wewnątrzkomórkowe, do których zaliczane są lipidy błonowe,
- 2) biosurfaktanty zewnątrzkomórkowe, do których zaliczane są kompleksy polisacharydowo-lipidowo-białkowe,
- 3) biosurfaktanty zlokalizowane na powierzchni ściany komórkowej lub otoczki, które zawierają kompleksy lipidowe lub lipidowo-polimerowe [3].

Dzięki temu, że związki te są pochodzenia naturalnego a nie syntetycznego, są one mniej toksyczne dla bakterii, a jednocześnie ułatwiają resorpcję cząsteczek PAH z gleby, poprzez pozorny wzrost ich rozpuszczalności oraz ich wprowadzenie do komórki [3,5,16].

Sfingany są egzopolisacharydami wytwarzanymi przez bakterie z rodzaju *Sphingomonas*. Wytwarzanie sfinganów jest alternatywnym mechanizmem pozwalającym na zwiększanie biodostępności policyklicznych aromatycznych węglowodorów. Największy wzrost pozornej rozpuszczalności jest obserwowany dla czteropierścieniowych węglowodorów, takich jak piren czy fluoranten. Najprawdopodobniej związane jest to z faktem, że te aromatyczne węglowodory są zdecydowanie bardziej hydrofobowe od trójpierścieniowych [16].

W obecności wysokiego stężenia jonów jednowartościowych lub niskiego stężenia jonów dwuwartościowych sfingany formują się w ciasno upakowaną strukturę półkoloidalną. Monomery budujące polisacharyd mogą mieć właściwości hydrofobowe lub hydrofilowe w zależności od ich budowy przestrzennej. Przypuszcza się, że sfingany mogą zawierać regiony hydrofobowe, które powstają w obecności jonów dwuwartościowych i to one są odpowiedzialne za zwiększanie pozornej rozpuszczalności w wodzie cząsteczek PAH [16].

Trzecim mechanizmem zwiększania transferu masy z krystalicznych aromatycznych zanieczyszczeń do komórki bakterii jest tworzenie biofilmów na kryształach. Wykazano, że komórki *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T są zdolne do tworzenia biofilmów na kryształach antracenu. Najbliżej zlokalizowane komórki znajdowały się w odległości niespełna 1 μm od

powierzchni kryształu. Według pierwszego prawa dyfuzji Ficka, mała odległość pomiędzy cząsteczką PAH, która jest w postaci ciała stałego, a powierzchnią komórek biofilmu wpływa pozytywnie na dyfuzyjny transfer masy policyklicznych aromatycznych węglowodorów poprzez wyraźny wzrost ich wodnej koncentracji [17, 18].

4. Podsumowanie

Policykliczne węglowodory aromatyczne ze względu na dużą toksyczność i kancerogenność stanowią ogromne zagrożenie dla ludzi, zwierząt i środowiska. Starsze metody usuwania cząsteczek PAH z miejsc zanieczyszczonych opierały się głównie na użyciu metod fizyko-chemicznych. Wykorzystywanie związków chemicznych jest jednak nieopłacalne, a jednocześnie nie przynosi wymiernych korzyści. Dodatkowo związki używane do chemicznej degradacji są nieraz równie niebezpieczne jak same policykliczne aromatyczne węglowodory [19].

Zastosowanie biodegradacji jako alternatywnej drogi oczyszczania środowiska z aromatycznych zanieczyszczeń jest obecnie jedną z najlepiej rokujących metod ze względu na jej efektywność, redukcję kosztów, wysokie bezpieczeństwo, całkowity rozkład zanieczyszczeń aromatycznych oraz minimalny wpływ na środowisko przyrodnicze [19].

Poza badaniami prowadzonymi nad szlakami metabolicznymi wielu badaczy skupia się na poznaniu genetycznych i molekularnych aspektów związanych z biodegradacją. Znanych jest wiele genów bakteryjnych kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm aromatycznych zanieczyszczeń. Na ich utrzymywanie się w populacjach bakteryjnych wpływa stałe wysokie stężenie cząsteczek PAH obecnych w środowisku, w którym one żyją [11].

Część z tych genów znajduje się w bakteryjnych plazmidach. Dlatego w tę strefę badań wkracza inżynieria genetyczna, która pozwala na izolację genów i wprowadzanie ich do genomów innych organizmów prokariotycznych oraz dodatkowo umożliwia wzmocnienie ekspresji wybranych cech genotypowych odpowiedzialnych za procesy biodegradacji [7].

Biorąc pod uwagę osiągnięcia w dziedzinie inżynierii genetycznej i białkowej, możemy spodziewać się, że niebawem zostanie skonstruowana „bakteria przyszłości” zdolna do degradacji wielu niebezpiecznych związków aromatycznych zagrażających naszemu środowisku. Najprawdopodobniej będzie mogła metabolizować cząsteczki PAH w trudnych warunkach środowiskowych, będzie posiadała geny kodujące wszystkie najważniejsze enzymy wchodzące w skład istotnych szlaków biodegradacji oraz odznaczała się wysoką stabilnością genetyczną i zdolnością do przekazywania własnych cech potomstwu.

Literatura

1. Haritash A. K., Kaushik C. P., *Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review*, Journal of Hazardous Materials, 2009, vol. 169, 1-15
2. Seo J., Keum Y., Li Q. X., *Bacterial Degradation of Aromatic Compounds*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2009, vol. 6, 278-309
3. Phale P. S., Basu A., Majhi P. D., Deveryshetty J., Vamsee-Krishna C., Shrivastava R., *Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds*, Journal of Integrative Biology, 2007, vol. 11, 252-279
4. Woo S. H., Rittmann B. E., *Microbial Energetic and Stechiometry for Biodegradation of Aromatic Compounds Involving Oxygenation Reactions*, Biodegradation, 2000, vol. 11, 213-227
5. Bamforth S. M., Singleton I., *Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, vol. 80, 723-736
6. Cui Z., Lai Q., Dong Ch., Shao Z., *Biodiversity, of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Deep Sea Sediments of the Middle Atlantic Ridge*, Environmental Microbiology, 2008, vol. 10, 2138-2149
7. Cao B., Nagarajan K., Loh K., *Biodegradation of Aromatic Compounds: Current Status and Opportunities for Biomolecular Approaches*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, vol. 85, 207-228
8. Long R. M., Lappin-Scott H. M., Stevens J. R., *Enrichment and Identification of Polycyclic Aromatic Compound-degrading Bacteria Enriched from Sediment Samples*, Biodegradation, 2009, vol. 20, 521-531
9. Smolik E., *Wielopierścieniowe Węglowodory Aromatyczne (WWA)*, http://www.ietu.katowice.pl/wpr/Dokumenty/Materialy_szkoleniowe/Szkol2/10-smolik.pdf
10. Manahan S. E., *Toksykologia Środowiska Aspekty Chemiczne i Biochemiczne*, 2006, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
11. Johnsen A. R., Karlson U., *Diffuse PAH Contamination of Surface Soils: Environmental Occurrence, Bioavailability and Microbial Degradation*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, vol. 76, 533-543
12. Habe H., Omori T., *Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism In Diverse Aerobic Bacteria*, Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2003, vol. 67, 225-243
13. <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/2b1x/summary>
14. Lundsted S., Haglund P., Oberg L., *Degradation and Formation of Polycyclic Aromatic Compounds During Bioslurry Treatment of an Acid Aged Gasworks Soil*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2003, vol. 22, 1413-1420
15. Pizzul L., Castillo M. P., Stenström J., *Characterization of Selected Actinomycetes Degrading Polyaromatic Hydrocarbons in Liquid Culture and Spiked Soil*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, vol. 22, 745-752
16. Johnsen A. R., Karlson U., *Evaluation of Bacterial Strategies to Promote the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, vol. 63, 452-459

17. Wick L. Y., Colangelo T., Harms H., *Kinetics of Mass-transfer Limited Bacterial Growth on Soil PAHs*, Environmental Science & Technology, 2001, vol. 35, ss. 354-361
18. Wick L. Y., Ruiz de Munian A., Springael D., Harms H., *Responses of Mycobacterium sp. 501T to the Low Bioavailability of Solid Anthracene*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, vol. 58, 378-385
19. Leneva N., Kolomytseva M. P., Baskunov B. P., Golovleva L. A., *Phenanthrene and Anthracene Degradation by Microorganisms of the Genus Rhodococcus*, Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, vol. 45, 169-175
20. Johnsen A. R., Wick Y. L., Harms H., *Principles of Microbial PAH-degradation in Soil*, Environmental Pollution, 2005, vol. 133, 71-84
21. Zhang X., Cheng S., Zhu Ch., Sun S., *Microbial PAH-degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors*, Pedosphere, 2006, vol. 16 (5), 555-565

Pracę recenzował: dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Bakteryjna degradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych

Streszczenie

Policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH – ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) są to hydrofobowe związki, zbudowane z dwóch lub więcej połączonych ze sobą pierścieni benzenowych. Swoją wysoką stabilność chemiczną zawdzięczają atomom węgla, znajdującym się w policyklicznym ułożeniu; atomy te są w stanie hybrydyzacji sp^2 . Jako jeden z głównych składników zanieczyszczeń aromatycznych wykazują właściwości канцерогенне, mutagenne oraz teratogenne. Toksyczność tych węglowodorów związana jest głównie z ich biologiczną aktywacją, która prowadzi do powstania pochodnych katecholu lub epoksydów. Obecnie benzo[a]piren jest uznawany za jeden z najbardziej канцерогенных związków należących do PAH.

Wysoka toksyczność i trwałość policyklicznych węglowodorów aromatycznych stwarza konieczność poszukiwania nowych metod pozwalających na efektywną degradację tych związków. Stosowane dotychczas metody chemicznej degradacji są nieoptyczne, nieefektywne i dodatkowo równie niebezpieczne dla środowiska jak cząsteczki PAH. Zastosowanie bakteryjnej degradacji jako alternatywnej drogi oczyszczania środowiska pozwala na całkowity rozkład aromatycznych zanieczyszczeń, redukcję kosztów tego procesu oraz zminimalizowanie negatywnego wpływu środków chemicznych na środowisko przyrodnicze.

Słowa Kluczowe: biodegradacja, policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH), bakterie

Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are hydrophobic compounds that consist of two or more fused benzene rings. High chemical stability of these compounds results from polycyclic arrangement of sp^2 hybridized carbon atoms. As typical aromatic pollutants PAH can have carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties. The toxicity of aromatic hydrocarbons is mainly due to biological activation of these compounds what generates intermediates like epoxide- or catechol-derivatives. Benzo[a]pyrene is known to be the most carcinogenic compound of all PAHs.

The high toxicity and persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons needs to find new methods for the effective degradation of these pollutants. Current methods of their chemical degradation are unprofitable, inefficient and also dangerous for the environment as PAHs. The bacterial degradation is an alternative route for environmental cleanup which allows for complete decomposition of aromatic pollutants, reduce the cost of this process and minimize the adverse effects of chemicals on the environment.

Keywords: biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), bacteria

Bioróżnorodność bakterii brodawkowych tworzących symbiozę z roślinami motylkowatymi

Wstęp

Badania nad różnorodnością organizmów są istotne ze względu na możliwość poznania mechanizmów ich zmienności oraz zależności panujących w danym środowisku. Bakterie brodawkowe tworzące symbiozę z roślinami motylkowatymi to grupa bardzo zróżnicowana, w obrębie, której genomy mogą być podzielone na kilka replikonów o różnej wielkości. Kolisty chromosom zawiera geny których produkty niezbędne są do funkcjonowania organizmu, natomiast na plazmidach znajdują się geny determinujące różne funkcje uważane za pomocnicze, adaptatywne, które umożliwiają bakteriom przystosowanie się do określonych warunków środowiska. Bardzo duża różnorodność występuje nawet wśród niewielkich lokalnych populacji. Szczepy bakteryjne w obrębie tego samego gatunku mogą wykazywać znaczne różnice w budowie i organizacji genomu. Z tym wiąże się także zmienność lokalizacji markerów genetycznych. Dotychczasowe badania wskazują na częste rekombinacje w obrębie oraz między replikonami bakteryjnymi, co potwierdza tezę, iż nie są one strukturami konserwatywnymi, lecz wykazują dużą plastyczność często będącą efektem adaptacji do środowiska [1].

1. Symbioza roślin motylkowatych z ryzobiami

Azot jest podstawowym składnikiem wielu biologicznych związków takich jak białka, kwasy nukleinowe i witaminy. Jest on niezbędny do wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów. W przyrodzie azot występuje w trzech stanach skupienia: stałej, płynnej i gazowej. W litosferze występuje on głównie pod postacią jonu amonowego [2].

Ważnym źródłem azotu dla niektórych organizmów jest atmosfera, a wykorzystanie tego źródła jest istotne dla uniknięcia głodu azotowego. Jednak zdolność do asymilacji tego pierwiastka z atmosfery jest ograniczona tylko do nielicznych bakterii. Poziom biologicznego wiązania azotu w ciągu roku

¹gosiapac86@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Bakcyl” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, <http://www.biolbiot.umcs.lublin.pl>

szacuje się na 150-180 mln ton, natomiast produkcja chemiczna sztucznych nawozów azotowych wynosi 80 mln ton/rok. Biologiczne wiązanie azotu jest więc procesem bardzo wydajnym wnoszącym do obiegu znaczącą ilość azotu. Jest to proces naturalny, przyjazny dla środowiska i mający znaczny udział w tzw. zrównoważonym rolnictwie [3].

Większość organizmów odżywia się heterotroficznie, nabywając azot z przemian związków organicznych. Jednakże wiele z nich, w tym rośliny i bakterie wykorzystują nieorganiczne związki azotu, jak np. azotany VI lub związki amonowe obecne w glebie, czy też związki azotu rozpuszczalne w wodzie, do budowy związków organicznych. Proces przekształcania azotu atmosferycznego w formy biodostępne dla roślin może być przeprowadzany jedynie przez niektóre bakterie określane mianem diazotrofów, a część z nich to bakterie tworzące symbiozę z roślinami motylkowatymi, zwanymi ryzobiami czy też bakteriami brodawkowymi.

Ryzobia to Gram-ujemne, urzęsione, tlenowe pałeczki, które nie tworzą przetrwalników. Na dzień dzisiejszy znanych jest 98 gatunków i 13 rodzajów bakterii brodawkowych, tj.: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (dawniej *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Shinella* [4]. Wykazują one dużą różnorodność metaboliczną co zapewne sprzyja ich przetrwaniu w zmiennym i konkurencyjnym środowisku ryzosfery. Największe różnice leżą w strukturze genów determinujących proces tworzenia brodawek korzeniowych, w tym genów związanych z wyborem gospodarza roślinnego, tak zwanych genów specyficzności gospodarza. [5]. Dendrogramy obrazujące pokrewieństwo filogenetyczne bakterii brodawkowych tworzone są głównie na podstawie genów: 16S rRNA, 23S rDNA, ale także coraz częściej w oparciu o sekwencje innych konserwatywnych markerów tzw. genów metabolizmu podstawowego np. genu syntazy glutaminianowej. Ryzobia wchodzą w związki z roślinami motylkowatymi i podczas tej interakcji redukują azot atmosferyczny. Pełnią istotną rolę w wielu zróżnicowanych ekosystemach. Układy symbiotyczne charakteryzują się wysoką specyficznością uwarunkowaną wzajemnym rozpoznaniem się symbiontów. Proces ten jest ściśle kontrolowany przez obu partnerów symbiozy, a nawiązanie tej mutualistycznej interakcji poprzedzane jest wymianą sygnałów molekularnych.

Ryzobia są mikroorganizmami tlenowymi, choć mogą rozwijać się w warunkach mikrotlenowych, przy obniżonym ciśnieniu tlenu. Są to na ogół drobne, ruchliwe pałeczki o rozmiarach $0,5-0,9 \times 1,2-3,0 \mu\text{m}$. Nie wymagają one do przetrwania kontaktu z rośliną i często spotykamy je jako saprofityczne formy, wolno żyjące w glebie. Jest to jednak zwykle związane z zahamowaniem asymilacji azotu z atmosfery. Dlatego też wolno żyjące ryzobia muszą czerpać ten

pierwiastek pod postacią jonów azotanowych i amonowych z otoczenia, tak samo jak inne bakterie. Podczas symbiozy, ryzobia indukują na korzeniach, rzadziej na łodygach powstawanie nowych, specyficznych organów zwanych brodawkami, w których zachodzi redukcja azotu atmosferycznego. Proces tworzenia brodawek korzeniowych i zdolność wiązania N_2 uwarunkowana jest u bakterii obecnością w ich genomie genów *nod* (ang. *nodulation*), *nif* (ang. *nitrogen fixation*) i *fix* (ang. *fixation*).

1.1. Mechanizm symbiozy bakterii brodawkowych z roślinami motylkowatymi

1.1.1. Flawonoidy – roślinne czynniki inicjujące symbiozę

Flawonoidy wydzielane przez rośliny są pierwszym sygnałem dialogu molekularnego zawiązywanego pomiędzy mikro- a makrosymbiontem. Związki te należą do drugorzędowych metabolitów roślinnych powstających w wyniku indukcji genów szlaku fenylopropanoidowego. Sekrecja czynników Nod powoduje aktywację roślinnych białek (nodulin), syntezę nici infekcyjnych, indukcję podziałów komórek kory pierwotnej korzenia oraz powstawanie zawiązków brodawek [6, 7, 8]. Roślinne flawonoidy spełniają dodatkowo funkcje barwników, naturalnych przeciwutleniaczy, insektycydów, fungicydów, atraktantów, oraz związków hamujących wzrost niektórych grup bakterii [9]. Roślinne flawonoidy aktywują transkrypcję ryzobiowych genów *nod* w wyniku czego syntetyzowane są chitolipooligosacharydami, zwane czynnikami Nod. Roślinne flawonoidy wiążą się z bakteryjnym białkiem NodD. Białko to należy do rodziny regulatorów transkrypcyjnych LysR, które po uaktywnieniu przez flawonoidy przyłącza się do promotorów genów wspólnych *nod* i genów specyficzności gospodarza (*hcn*). Powoduje to aktywację transkrypcji genów *nod* i syntezę czynników Nod. Flawony i flawonony takie jak np. naryngenina i luteolina wydzielane przez rośliny pochodzące ze strefy umiarkowanej (wyka, koniczyna, lucerna, groch) indukują brodawkowanie u szybko rosnących ryzobiów. Natomiast izoflawony (daidzeina) wydzielane przez rośliny pochodzące ze strefy tropikalnej aktywują geny *nod* wolno rosnących ryzobiów należących do rodziny *Bradyrhizobium*.

1.1.2. Bakteryjne czynniki warunkujące proces symbiozy

1.1.2.1. Geny *nod*, *hsn* oraz *nif*

Geny kontrolujące infekcję włośników korzeniowych i tworzenie brodawek można podzielić na dwie grupy: geny wspólne *nod* (ang. *common nod genes*) oraz geny specyficzności gospodarza (ang. *host-specificity nodulation genes*; *hsn*). Geny związane z procesem symbiozy zlokalizowane są u ryzobiów szybko rosnących najczęściej na jednym z plazmidów określanym jako plazmid „symbiotyczny” – pSYM lub dużo rzadziej, głównie u ryzobiów wolno rosnących tzw. bradyrizobiów na chromosomie na tzw. wyspie symbiotycznej (ang. *symbiosis islands*) [10]. Wyspy symbiotyczne są jednym z typów wysp genomowych. Przypuszcza się że są one wynikiem poziomego transferu genów. Są one analogiczne do wysp patogeniczności występujących u bakterii Gram-ujemnych. Zlokalizowano je na przykład w genomach *Mesorhizobium loti* i *Bradyrhizobium japonicum*. U szczepów *M. loti* ich wielkość waha się w granicach 501-610 kpz. Charakteryzują się one niższą zawartością par GC w stosunku do reszty chromosomu. Wyróżniają się również miejscem integracji do genomu, którym jest gen dla fenyloalanylo-tRNA (określamy go jako lewy koniec wyspy) oraz 17 nukleotydowe powtórzenie sekwencji tego genu powstające w wyniku integracji wyspy symbiotycznej zlokalizowane na końcu 3' (określane jako prawy koniec wyspy) [11, 12]. Wyspy symbiotyczne zawierają wysoce konserwatywny i wskazujący na wspólne pochodzenie fragment DNA o wielkości 248 kpz, na którym zlokalizowane są geny kodujące czynnik Nod, podjednostki kompleksu nitrogenazy oraz elementy koniugacyjnego przenoszenia wyspy. Na końcu 5' występuje gen integrazy o dużym podobieństwie do genu integrazy faga P4, którego produkt odpowiada za integrację i wycinanie wyspy symbiotycznej. Dużą część wyspy symbiotycznej stanowią geny o nieznannej funkcji, geny transpozaz, integraz, rezolwaz oraz elementy IS (elementy mobilności). Charakterystyczną cechą wyspy symbiotycznej jest występowanie genów determinujących system sekrecji typu III (*Rhizobium. sp.* NGR234). Na wyspach symbiotyczności zlokalizowano także np.: geny odpowiedzialne za funkcje regulatorowe, i syntezę witamin [3].

1.1.2.2. Czynniki Nod

Głównymi czynnikami bakteryjnymi wyzwalającymi u roślin mechanizm brodawkowania są czynniki Nod (ang. *Nod factor*). Są to specyficzne związki sygnałowe, które ze względu na podobieństwo rdzenia oligosacharydowego do fragmentu chityny, nazywane są lipochitooligosacharydami (LCO). Szkielet czynnika Nod składa się z 3-6 reszt N-acetylo-D-glukozaminy połączonych

wiązaniem β -(1-4)-glikozydowym z przyłączonym łańcuchem acylowym w pozycji C2 nieredukującego końca czynnika Nod. Szkielet podstawowy może być modyfikowany w sposób charakterystyczny dla każdego szczepu. Modyfikacje te mogą obejmować m.in. stopień polimeryzacji łańcucha chitoooligosacharydowego, rodzaj kwasu tłuszczowego i stopień jego nasycenia oraz modyfikacje na redukującym i nieredukującym końcu łańcucha cukrowego [13, 14]. Jako pierwszy został wyizolowany czynnik Nod *Sinorhizobium meliloti* [15]. Na obecność bakteryjnych czynników Nod rośliny odpowiadają szeregiem zmian, które umożliwiają bakteriom kolonizację i infekcję włośników korzeniowych tj. pierwsze etapy symbiozy prowadzące do rozwoju brodawki korzeniowej [16, 17].

2. Bioróżnorodność ryzosfery

Różnorodność biologiczna, zwana też bioróżnorodnością określa bogactwo gatunków w danym środowisku, na które wpływają czynniki klimatyczne, ewolucyjne i ekologiczne. Najczęstszym sposobem badania bioróżnorodności jest określenie liczby gatunków mikroorganizmów zasiedlających dane środowisko. Czynnikiem wpływającym na bioróżnorodność jest konkurencja organizmów o miejsce bytowania i składniki odżywcze w danym środowisku [18].

Gleba jest miejscem bytowania bardzo wielu mikroorganizmów. Ryzosfera jest definiowana jako wąska strefa gleby mająca bezpośredni wpływ na rozwój strefy korzeniowej roślin, a bakterie są ważną grupą mikroorganizmów zamieszkujących tę niszę ekologiczną. Różnorodność i liczba bakterii w ryzosferze jest kontrolowana przez bardzo wiele czynników takich jak składniki pokarmowe, obecność pierwotniaków, wydzielanie przez korzenie roślin substancji odżywczych i różnych czynników, które mogą hamować wzrost bakterii. W zależności od gatunku rośliny, mikroorganizmy mogą mieć negatywne, neutralne lub pozytywne działanie na kondycję rośliny. Bakterie brodawkowe można często znaleźć w pobliżu korzeni roślin motylkowatych i zawsze ich obecność ma pozytywny wpływ na wzrost i plony roślin. Co ciekawe pozytywne interakcje mogą również występować pomiędzy mikroorganizmami zamieszkującymi strefę korzeniową. Wykazano, że mutanty *B. japonicum* odporne na streptomycynę efektywniej zakażają korzenie roślin, jeżeli w pobliżu znajdują się *Streptomyces* sp. [19].

Sama powierzchnia korzenia jest również ważnym miejscem interakcji pomiędzy zasiedlającymi ją organizmami. Ten obszar określany jest mianem ryzoplany. Bakterie często pokrywają nawet do 10% powierzchni korzenia [20].

2.1. Zróżnicowanie genomów bakterii symbiotycznych

Ryzobia są grupą bakterii bardzo zróżnicowaną m.in. pod względem tempa wzrostu, szlaków biosyntezy różnych związków, aktywności metabolicznej, liczby plazmidów oraz struktury lipo- i egzopolisacharydów. Filogenetycznie nie stanowią one spójnego kładu i przemieszane są z gatunkami innych bakterii. Badania profili plazmidowych wykazały, że ryzobia posiadają różną liczbę plazmidów, a ich liczba i wielkość charakteryzuje dany szczep i może być wykorzystywana do identyfikacji i oceny bioróżnorodności szczepów bakteryjnych. Genomy bakterii brodawkowych są podzielone na kilka replikonów o różnej wielkości. Kolisty chromosom zawiera istotne dla życia bakterii geny, natomiast plazmidy kodują różne funkcje, które są uważane za pomocnicze, adaptatywne. Wyjątkiem jest *B. japonicum*, który ma tylko jeden replikon tj. chromosom. Różnice w architekturze genomów można wytłumaczyć poziomym transferem DNA i kointegracją różnych replikonów. Niektóre z ostatnich doświadczeń wykazały, że replikony *S. meliloti* i *Rhizobium* sp. NGR234 mogą łączyć się w jedną cząsteczkę bez zmiany właściwości symbiotycznych [21].

Podział genomu na kilka replikonów umożliwia korzystne dla życia tych organizmów adaptacje do różnych warunków środowiskowych. Jakkolwiek, generalnie przyjmuje się, że plazmidy nie zawierają genów rdzeniowych, niezbędnych do życia bakterii to jednak na niektórych z nich występują pewne geny o zasadniczym znaczeniu np. na plazmidzie pSymB *S. meliloti* występują geny *minCDE* których produkty niezbędne są do podziałów komórek [22].

2.2. Konkurencyjność a bioróżnorodność

Zjawisko konkurencyjności (kompetycji) ryzobiów definiujemy jako zdolność do zasiedlania brodawek przez jeden szczep w mieszanych hodowlach bakteryjnych, a także jego utrzymywanie się w glebie w kolejnych sezonach wegetacyjnych. Organizmy bardziej konkurencyjne zyskują dostęp do składników odżywczych, dzięki czemu są zdolne do utrzymania się w danej niszy ekologicznej [23]. Kompetycja jest nierozzerwalnie połączona z bioróżnorodnością danego środowiska. W środowisku o niewielkim zróżnicowaniu mikroorganizmów zmniejszona jest liczba potencjalnych konkurentów. Czynniki środowiskowymi wpływającymi na konkurencyjność bakterii są: pH, struktura gleby, wilgotność, temperatura, warunki osmotyczne czy też obecność związków chemicznych takich jak np. metale ciężkie. Ze względu na rolnicze i ekologiczne znaczenie bakterii brodawkowych coraz większym zainteresowaniem cieszą się szczepionki biologiczne używane do inokulacji roślin uprawnych. Wykazano m.in., że jednoczesna inokulacja bakteriami z rodzaju *Rhizobium* i *Azospirillum* wpływa na zwiększony wzrost kukurydzy [24]. Współzawodnictwo pomiędzy szczepami

zachodzi na wielu płaszczyznach i jest długotrwałym procesem. Ma ono miejsce bezpośrednio w środowisku ryzosfery, podczas nawiązywania dialogu z gospodarzem roślinnym, w trakcie inwazji tkanek korzenia oraz w samej brodawce. Konkurencja w brodawce jest istotna w kontekście ciągłości gatunku; bakterie, które najlepiej rozwiną współpracę z roślinnym gospodarzem są w stanie intensywnie się namnażać i w konsekwencji tego są zdolne do ponownej kolonizacji ryzosfery. Do ponownej kolonizacji gleby zdolne są tylko formy saprofityczne, które nie przekształciły się w bakteroidy. Ryzobia w obliczu trudnych warunków zarówno w glebie jak i brodawkach konkurują ze sobą o źródła energii. Są one w stanie wykorzystywać wiele rodzajów cukrów, a także inne związki jak np. ryzopiny, nawet jeśli znajdują się one w glebie w niewielkich stężeniach. Oznacza to wytwarzanie dużej liczby transporterów ABC, oraz białek odpowiedzialnych za metabolizm związków wykorzystywanych jako składniki odżywcze [25].

3. Podsumowanie

Bioróżnorodność oraz zróżnicowanie genetyczne jest w ostatnim czasie tematem bardzo intensywnych badań. Szczepy bakteryjne należące do tego samego gatunku mogą wykazywać znaczne różnice w procesach metabolicznych i organizacji genomów. Badania prowadzone nad populacjami bakterii ryzobiowych wykazały znaczną zmienność profili plazmidowych oraz duże różnice w lokalizacji markerów genetycznych. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują jednoznacznie na częste rekombinacje zarówno między- jak i wewnątrzgatunkowe. Bakteryjne genomy nie są, więc tak konserwatywnymi strukturami jak do tej pory sądzono i charakteryzują się znaczną plastycznością [26]. Generalnie architektura genomów jest w dużym stopniu dynamiczna [27].

Podziękowania

Pragnę złożyć serdecznie podziękowania dla dr hab. Adama Chomy za poświęcony czas, cenne uwagi i sugestie przy pisaniu tego artykułu. Dziękuję bardzo Pani Profesor Wandzie Małek za przychylną recenzję pracy.

Literatura

1. Mavingui P., Flores M., Guo X., Dávila G., Perret X., Broughton W. J., Palacios R. (2002); *Dynamics of Genome Architecture in Rhizobium sp.* Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 171-176
2. Paul E., Clark F. (2000); *Mikrobiologia i biochemia gleb* Wyd. UMCS 230-238
3. Skorupska A., Król J., Mazur A., Marczak M. (2008); *Genomika Rhizobium leguminosarum – badanie genów syntezy polisacharydów powierzchniowych*. *Biotechnologia* 2, 27-40

4. Weir, B.S. (2012); *The current taxonomy of rhizobia*. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: 10 April, 2012, Partial Update: 2 May 2013
5. Brenic A., Winans S. (2005); *Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 69, 155-194
6. Perret X., Staehelin C., Broughton WJ. (2000); *Molecular basis of symbiotic promiscuity*. Microbiol Mol Biol Rev. 64(1), 180-201
7. Spanik H. (2000); *Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria*. Annu. Rev. Microbiol. 54, 257-88
8. Jones K., Kobayashi H., Davies B., Taga M., Walker G. (2007); *How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model*. Nat Rev Microbiol. 5(8), 619-33
9. Tsai S., Phillips D., (1991); *Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic Glomus spores in vitro*. Applied Environmental Microbiology 5, 1485-1488
10. Laguerre G., Nour S. M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. (2001); *Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts*. Microbiology 147, 981-993
11. Suominen L., Roos C., Lornet G., Paulin L. (2001); *Identification and structure of hizobium galegae common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer*. Molecular Biology Evolution 18, 907-916
12. Ochman H., Lawrence J. (2000); *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature 4005, 299-304
13. Mergaert P., van Montagu M., Holsters M. (1997); *Molecular mechanisms of Nod factor diversity*. Molecular Microbiology 25, 811-817
14. Downie J. A. (1998); *Functions of rhizobial nodulation genes*. W: The Rhizobiaceae. Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P. J. J. (editors). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 387-402.
15. Catoira R., Galera C. (2000); *Four genes of Medicago truncatula controlling components of a Nod factor transduction pathway*. Plant Cell. 12, 1647-1666
16. Cárdenas L., Holdaway-Clarke T. (2000); *Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors*. Plant Physiol. 123, 443-52
17. Walker S., Viprey V., Downie J. (2000); *Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers*. The Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 13413-8
18. Futuyma D. (2005); *Evolution. Ewolucja różnorodności biologicznej*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 141-161
19. Gregor A., Klubek B., Varsa E. (2003); *Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with Bradyrhizobium japonicum*. Canadian Journal of Microbiology 49, 483-491
20. Bolton H., Elliott L. (1990); *Rhizoplane colonization of pea seedlings by Rhizobium leguminosarum and a deleterious root colonizing Pseudomonas sp. and effects on plant growth*. Plant and Soil, 123, 301-303

21. Barnett M., Kahn M. (2005); *pSyma of Sinorhizobium meliloti: nitrogen fixation and more*. Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms: 113-132. Springer
22. Włodarczyk M., Rudzicz G. (2005); *Megaplazmidy – próba definicji, rozpowszechnienie i różnorodność kodowanych fenotypów*. Postępy Mikrobiologii, 44(1), 3-16
23. Lorkiewicz Z., Kowalczyk E. (1999); *Konkurencja szczepów Rhizobium z mikroflorą glebową o brodawkowanie Lędzwanu siewnego*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 468, 167-174
24. Swędrzyńska D., Niewiadomska A. (2006); *Czy jednoczesna inokulacja siewek kukurydzy (Zea mays L.) szczepami bakterii z rodzaju Rhizobium i Azospirillum może być efektywna?* Acta Agraria et Silvestria 49, 461-470
25. González V., Santamaría R., Bustos P. (2006); *The partitioned Rhizobium etli genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons*. PNAS 103/10, 3834-3839
26. Guo X., Flores M., Mavingui P. (2003); *Natural genomic design in Sinorhizobium meliloti: novel genomic architectures*. Genome Research 13: 1810-1817
27. Mavingui P., Perret X., Broughton W. J. (2005); *Genomic Architecture of the Multiple Replicons of the Promiscuous Rhizobium Species NGR234*. w: Palacios R., Newton W. E.: Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms. Springer 2005, 83-98

Pracę recenzowała: prof. dr hab. Wanda Malek, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

Bioróżnorodność bakterii brodawkowych tworzących symbiozę z roślinami motylkowatymi

Streszczenie

Bakterie symbiotyczne to grupa bardzo zróżnicowana, której genomy są podzielone na kilka replikonów o różnej wielkości. Szczepy bakteryjne w obrębie tego samego gatunku mogą wykazywać znaczne różnice w budowie i organizacji genomu. Z tym wiąże się także zmienność lokalizacji markerów genetycznych. Dotychczasowe badania wskazują na częste rekombinacje w obrębie replikonów bakteryjnych jak i między różnymi replikonami bakterii należących do różnych gatunków, a nawet rodzajów, wskazując na to, że nie są one strukturami konserwatywnymi, lecz wykazują dużą plastyczność, której efektem jest adaptacja do różnych warunków środowiskowych.

Słowa Kluczowe: *Rhizobia*, symbioza, bioróżnorodność, konkurencyjność

Biodiversity of the nodule bacteria forming symbiosis with leguminous plants

Abstract

Nodule bacteria forming symbiosis with plants of the family *Leguminosae* are a very diverse group, in which genomes are usually divided into several replicons of varying size. Bacterial strains belonging to the same species may exhibit significant differences in the structure and organization of the genome. This is also related to the location of genetic markers. Previous studies indicated frequent recombination within the bacterial replicons, indicating that they are not conserved structures, but show a high ductility, which is a result of adaptation to the environment. Bacterial genome plasticity may facilitate bacterial adaptation to changing environmental conditions.

Keywords: *Rhizobia*, symbiosis, biodiversity, competition

Degradacja modelowych substratów białkowych przez kompleksy proteasomowe grzybów ligninolitycznych

Wprowadzenie

Najbardziej uniwersalnymi makrocząsteczkami w układach żywych są białka. Pełnią one rolę właściwie we wszystkich procesach biologicznych. Prawidłowy metabolizm białek obejmujący biosyntezę z aminokwasów oraz proteolizę do peptydów i aminokwasów, umożliwia prawidłowe funkcjonowanie każdej komórki. Procesy proteolizy w komórkach eukariotycznych dotyczą nie tylko białek egzogennych, ale również białek wewnątrzkomórkowych pełniących funkcje strukturalne, regulacyjne oraz katalityczne. Paradygmat niezmienności białek strukturalnych, obowiązujący przez wiele lat, został zakwestionowany przez Rudolfa Schoenheimer'a, który wprowadził pojęcie „obrotu białkowego” [1]. Obecnie wiadomo, że poszczególne białka znajdują się w stanie dynamicznej równowagi pomiędzy procesami ich biosyntezy i degradacji, stale zachodzącymi w komórkach. Przez wiele lat proteoliza nie stanowiła przedmiotu szerszych badań, uwaga naukowców skupiona była głównie na poznawaniu mechanizmów powstawania białek [2].

Proteoliza odgrywa istotną rolę zarówno w procesach katabolicznych, jak i regulatorowych. Białka w organizmach żywych ulegać mogą całkowitej lub ograniczonej proteolizie. Usunięcie tylko niektórych sekwencji aminokwasowych z białek, czyli proteoliza ograniczona, pełni funkcję regulacyjną. Modyfikacje te niezbędne są w procesie dojrzewania białek. Natomiast całkowita hydroliza, poza degradacją białek egzogennych, warunkuje tak ważne funkcje komórek, jak: usuwanie białek nieprawidłowych (nieprawidłowo sfałdowanych lub uszkodzonych), rozkład białek zbędnych, powstających w nadmiarze, degradację kluczowych enzymów i białek regulatorowych [3].

¹ Email: anitaswatek89@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii (binoz.umcs.lublin.pl), Zakład Biochemii

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

W komórkach eukariotycznych wyróżnia się dwa systemy proteolityczne: lizosomalny (wakuolarny) oraz pozalizosomalny (pozawakuolarny) [4].

Szlak lizosomalny poznany został jako pierwszy. Początkowo uznawano, że jedynie z udziałem tego systemu może dochodzić do degradacji białek w komórce [3]. Miejscem degradacji białek są lizosomy jak również pozalizosomalne struktury szlaku endocytarnego. Lizosomy są organellami otoczonymi pojedynczą błoną komórkową. Wypełniają je liczne hydrolazy, aktywne w pH 4-5, zdolne do rozkładu łańcuchów polipeptydowych aż do aminokwasów [4]. W lizosomach degradowane są białka egzogenne jak również endogenne. Degradacja białek wewnątrzkomórkowych w lizosomach zachodzi głównie w warunkach długotrwałego głodu. W latach 70. XX wieku wykazano jednak, że również komórki pozbawione lizosomów, takie jak retikulocyty, są zdolne do skutecznego rozkładu nieprawidłowych białek, a procesy te wymagają energii w postaci ATP, co było wówczas trudne do zrozumienia [5].

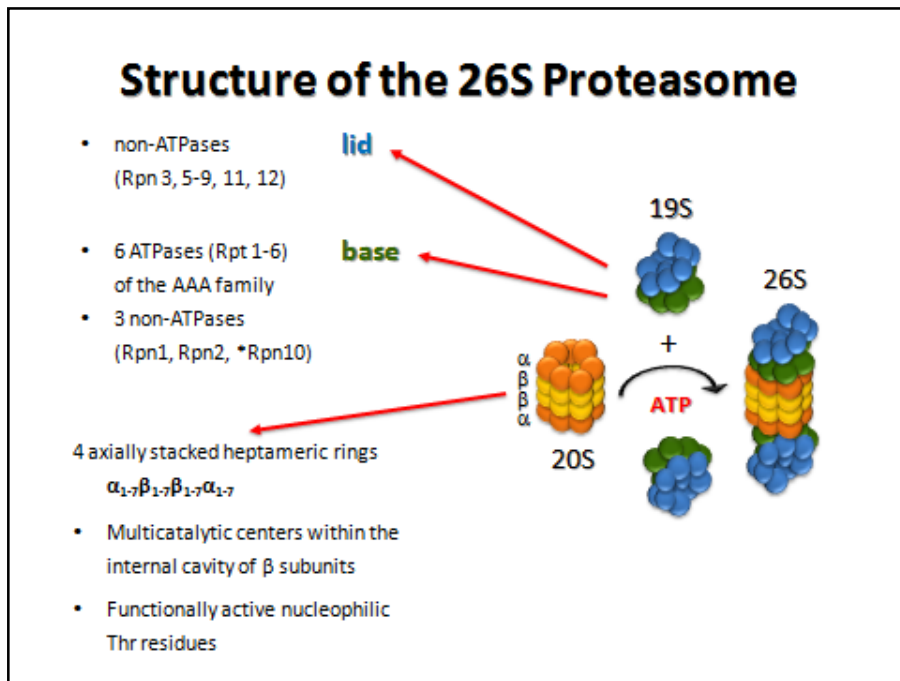
Kolejne badania przyczyniły się do wyjaśnienia degradacji białek zależnej od energii [6, 7]. Wykazano wówczas udział ubikwityny jako czynnika niezbędnego w proteolizie zależnej od ATP, która okazała się głównym procesem pozalizosomalnej degradacji białek wewnątrzkomórkowych z udziałem kompleksu proteasomowego 26S [7]. Kulminacją tych wieloletnich badań było przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie i opisanie zależnej od ubikwityny regulowanej degradacji białek. Uhonorowani tą nagrodą zostali w 2004 roku Aaron Ciechanover, Avram Hershko oraz Irvin Rose. System ubikwityna/proteasom powszechnie występuje w komórkach organizmów eukariotycznych. Jego obecność stwierdzono zarówno u zwierząt [8], roślin [9], jak i u drożdży [10]. W królestwie grzybów wykazano jego obecność również u grzybów ligninolitycznych [11].

Degradacja białek przez kompleks proteasomowy jest procesem wymagającym zużycia energii w postaci ATP. Jest to także proces bardzo selektywny. Proteasom 26S nie rozkłada przypadkowych białek, lecz tylko te zawierające kowalencyjnie przyłączony łańcuch poliubikwitynowy. Łańcuch poliubikwitynowy jest zasadniczym sygnałem do proteolizy z udziałem proteasomów [12, 13].

Proteasom 26S (EC 3.4.25.1) jest wielopodjednostkowym ATP-zależnym kompleksem proteolitycznym, o masie cząsteczkowej około 2500kDa. Zaangażowany jest on głównie w rozkład białek ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek: enzymów regulujących szlaki biosyntetyczne, białek regulujących przebieg cyklu komórkowego, wielu czynników transkrypcyjnych, białek kodowanych przez onkogeny i geny supresorowe, białek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, jak również białek strukturalnych [8, 14]. Kompleks proteasomu 26S (Rys. 1) składa się z proteasomu 20S [16],

tworzącego katalityczny rdzeń, który jest zasocjowany z jednej lub obu stron z asymetrycznym kompleksem regulatorowym 19S [17]. Proteasom 20S, w przeciwieństwie do 26S, nie jest zdolny do proteolizy ubikwitynowanych białek oraz nie wykazuje aktywności ATP-azowej.

Kompleks 20S o masie cząsteczkowej 700kDa posiada konserwatywną budowę. Potwierdziły to najnowsze badania z użyciem mikroskopii elektronowej oraz krystalografii przy pomocy promieni X [18]. Składa się on z 4 pierścieni, z których każdy zbudowany jest z 7 homologicznych podjednostek. Pierścienie te przylegają do siebie tworząc strukturę przypominającą beczułkę [6]. Zewnętrzne pierścienie zbudowane są z podjednostek typu α (α_1 - α_7), wewnętrzne zaś z podjednostek typu β (β_1 - β_7). Ich masa cząsteczkowa waha się między 20-35kDa. Łańcuchy α poprzez NH_2 -końcowe fragmenty podjednostek α zamykają kanał wiodący do wnętrza proteasomu, tworząc tzw. α -bramkę [19, 20].



Rys. 1 Struktura proteasomu 26S [15]

Kompleks 20S pełni funkcję katalityczną. W jego budowie tylko trzy rodzaje podjednostek cechują się aktywnością enzymatyczną. Są to podjednostka β_1 , β_2 i β_5 , różniące się specyficznością w hydrolizie wiązań peptydowych. Wyróżniono trzy podstawowe aktywności kompleksu proteasomowego [20, 21]: aktywność chymotrypsyno-podobną (CHT-L, ang. *chymotrypsin-like*), zlokalizowaną

w podjednostce $\beta 5$, przeprowadzającą hydrolizę wiązania peptydowego po resztach aminokwasów hydrofobowych (Tyr-X, Phe-X, Leu-X), aktywność trypsyno-podobną (T-L, ang. *trypsin-like*), zlokalizowaną w podjednostce $\beta 2$, odpowiedzialną za hydrolizę wiązania peptydowego po resztach aminokwasów zasadowych (Arg-X, Lys-X) oraz aktywność kaspazopodobną (C-L ang. *caspase-like*), zlokalizowaną w podjednostce $\beta 1$, hydrolizującą wiązania peptydowe po resztach aminokwasów kwasowych.

Kompleks regulatorowy 19S zbudowany jest z 19 podjednostek. Tworzą one dwa subkompleksy, tzw. podstawę (ang. *base*) i wieczko (ang. *lid*) [22]. Podstawa zbudowana jest z 6 ATP-az (Rpt1-Rpt6), należących do klasy AAA (ang. *ATPase associated with various cellular activities*), oraz 3 podjednostek (Rpn1, Rpn2 i Rpn10) pozbawionych aktywności ATP-azowej [18]. Podjednostka Rpn10 jest receptorem dla łańcucha poliubikwitynowego, a ponadto łączy podstawę z wieczkiem [17]. Podjednostka Rpt5 prawdopodobnie uczestniczy w rozpoznawaniu poliubikwitynowanego substratu [23]. Podjednostka Rpt2 wiąże się z pierścieniem utworzonym przez podjednostki α i uczestniczy w otwieraniu kanału, współuczestniczy w rozkładowywaniu substratu oraz jego translokacji do wnętrza proteasomu [19, 24].

Wieczko charakteryzuje się brakiem aktywności ATP-azowej. W jego skład wchodzi następujące podjednostki: Rpn3, Rpn5-Rpn9 oraz Rpn11-Rpn13 [18]. Główną rolą wieczka jest prawdopodobnie deubikwitynacja [25, 26].

Ligninoceluloza jest pod względem chemicznym kompleksem dwóch polimerów liniowych: celulozy i hemicelulozy oraz nieliniowego polimeru ligniny [27]. Nieliczną grupę mikroorganizmów zdolnych do degradacji tego kompleksu tworzą grzyby ligninolityczne. Ze względu na sposób ich oddziaływania na poszczególne składniki kompleksu ligninocelulozowego dzieli się je na grzyby tzw. „miękkiej zgnilizny drewna”, „brunatnej zgnilizny drewna” oraz „białej zgnilizny drewna” [28].

Grzyby „białej zgnilizny drewna” są jedynymi organizmami zdolnymi do skutecznej degradacji ligniny w wyniku działania enzymów zewnątrzkomórkowych, do których należą m.in., lakaza, peroksydaza ligninowa i peroksydaza mangano-zależna [29]. Enzymy ligninolityczne są białkami powstającymi zwykle w czasie metabolizmu wtórnego. Wcześniejsze badania wykazały, że przejście z fazy metabolizmu pierwotnego do fazy metabolizmu wtórnego (które związane jest z produkcją tych enzymów), zaangażowane są wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne, zarówno szlaku wakuolarnego jak i pozawakuolarnego [30]. Przypuszcza się również, że produkcja enzymów ligninolitycznych regulowana jest także na poziomie transkrypcji, jednak dokładne mechanizmy tych regulacji nie zostały poznane. Najnowsze badania wskazują jednak na znaczący udział proteasomalnego szlaku degradacji białek w regulacji tego procesu [31].

1. Materiały i metody

1.1. Materiały

Odczynniki używane podczas przeprowadzanych doświadczeń (albumina wołowa, ATP, β -kazeina, fluorescamina, hemoglobina – substrat dla proteaz, marker niskich mas cząsteczkowych LMMM, $MgCl_2$) pochodziły z firmy Sigma (St. Louis, USA). Pozostałe odczynniki (cz.d.a.) pochodziły z POCH Gliwice. Wszystkie roztwory były przygotowane przy użyciu wody Milli-Q (Millipore systemu, Milford, CT, USA).

1.2. Materiał biologiczny

Podczas przeprowadzania badań używany był szczep *Trametes versicolor* pochodzący z kolekcji ATCC (ang. *American Type Culture Collection*), opatrzony numerem 44308, zdeponowany w kolekcji Zakładu Biochemii UMCS pod numerem 7.

1.3. Warunki hodowli

Grzybnie *T. versicolor* pobierano z 2% skosu agarowego i hodowano w warunkach stacjonarnych, w naczynkach scyntylacyjnych zawierających po 10 ml podłoża według Fahraeusa i Rainhammara [32], w temp. 24-26°C. Po uprzednim zaadaptowaniu kultur do warunków hodowli na podłożu płynnym, zbierano 7-dniowe grzybnie, odsączano je na bibule GF83, zamrażano i przechowywano w temp. -20°C.

1.4. Otrzymywanie preparatów wysokocząsteczkowych kompleksów proteasomów

Grzybnie po rozmrożeniu rozbijano przy użyciu homogenizatora Pottera, zamontowanego do robota laboratoryjnego Aid Type 309. Proces przeprowadzano w łaźni lodowej (4°C). Uzyskany homogenat wirowano przez 10 minut, przy RCF 10 000 x g, w temp. 4°C (wirówka firmy „Sigma” typ 3K18).

Wysokocząsteczkowe kompleksy proteasomowe otrzymywano z uzyskanych supernatantów na drodze ultrafiltracji, pozwalającej na usunięcie frakcji niskocząsteczkowych proteaz (poniżej 500 kDa). Proces ultrafiltracji przeprowadzano z zastosowaniem polieterosulfonowej membrany Biomax PBVK Ultrafiltration Disc, 500 000 NMWL, przy użyciu aparatu do ultrafiltracji Amicon 8010, firmy Millipore. Proces prowadzono pod ciśnieniem 0.07MPa w niskiej temperaturze (chłodzenie lodem) [33]. W celu uzyskania preparatu do dalszych analiz przeprowadzano 5 cykli opisanego powyżej procesu. Stężenie białka w uzyskanym preparacie oznaczano metodą Bradford [34].

1.5. Oznaczanie aktywności proteasomów wobec modelowych substratów białkowych metodą spektrofluorymetryczną

W celu zbadania zdolności kompleksów proteasomowych, izolowanych z grzybni *T. versicolor*, do degradacji modelowych białek substratowych oznaczano ilość powstających produktów degradacji w reakcji z fluorescaminą [35]. Procedura ta stanowiła modyfikację wcześniejszej metody badania degradacji białek przez proteasomy 26S [36].

Fluorescamina reaguje z pierwszorzędowymi grupami aminowymi znajdującymi się w aminokwasach końcowych i resztach ϵ -aminowych lizyny peptydowych produktów degradacji, tworząc silnie fluorescencyjne produkty. Nie reaguje ona z aminami drugorzędowymi [37]. Jako substraty dla kompleksów proteasomów w reakcji degradacji zastosowano następujące białka: albuminę, hemoglobinę oraz β -kazeinę. Oznaczenie wykonano w dwóch wariantach: z dodatkiem MgATP (badanie aktywności proteasomów 26S) oraz bez dodatku MgATP (badanie aktywności proteasomów 20S). Fluorescencję powstałą w wyniku reakcji fluorescaminy z produktami degradacji wybranych substratów białkowych mierzono na spektrofluorymetrze FluoroMax 2 (Instruments S.A.: JOBIN YVON/SPEX, Division) przy użyciu programu *FluoroEssence V3: Single Point*. W celu wyznaczenia stężenia pojawiających się produktów degradacji, równocześnie sporządzano krzywą kalibracyjną dla wzorcowych roztworów leucyny (w zakresie od 1-5mM).

1.6. Elektroforetyczna analiza procesu degradacji modelowych białek substratowych przez proteasomy

Wyizolowane preparaty kompleksów proteasomowych inkubowano z wybranymi białkami substratowymi (albuminą, hemoglobiną i β -kazeiną) w celu określenia ich podatności na degradację przez te kompleksy enzymatyczne izolowane z grzybni *T. versicolor*. Oznaczenia wykonywano w dwóch wariantach: z dodatkiem MgATP (badanie aktywności proteasomów 26S) oraz bez dodatku MgATP (badanie aktywności proteasomów 20S). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C i w określonych odstępach czasu: 0 h; 0.5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h, reakcję zatrzymywano poprzez dodanie buforu próbkowego (5x) zawierającego β -merkaptotanol, a następnie denaturację w temp. 95°C przez 5min.

Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) [38] przeprowadzano w temperaturze pokojowej, przy stałym napięciu prądu wynoszącym 150 V, z użyciem aparatu firmy Whatman Biometra®. W doświadczeniach używano 12% żelu separującego oraz 4% żelu zagęszczającego (akrylamid/bisakrylamid 29:1) [31].

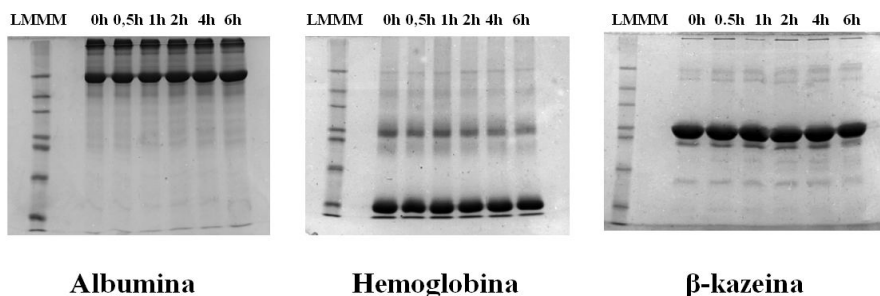
Żele barwiono przy zastosowaniu Coomassie Brilliant Blue R-250 według zmodyfikowanej procedury Wong'a i in. [39].

Wyniki analiz elektroforetycznych dokumentowano za pomocą systemu G:BOX HR (SYNGENE) z oprogramowaniem *GeneSnap*.

2. Wyniki i dyskusja

2.1. Wykazanie stabilności wybranych substratów białkowych w warunkach reakcji

Stosowane w niniejszej pracy modelowe białka substratowe wybrano z większej grupy potencjalnych substratów dla kompleksów proteasomowych *T. versicolor*. Albumina, hemoglobina oraz β -kazeina charakteryzowały się największą stabilnością w warunkach reakcji (37°C, 0-6h). W doświadczeniach wstępnych ustalono parametry istotne w powyższej analizie, takie jak maksymalny czas reakcji, stężenia końcowe substratów, skład procentowy żelu podziałowego oraz stężenie barwnika CBB R-250.



Rys. 2 Analiza elektroforetyczna stabilności wybranych substratów białkowych w warunkach reakcji (mieszanina reakcyjna pozbawiona preparatu enzymatycznego-kontrola negatywna). Próby mieszaniny reakcyjnej pobierano w określonych odstępach czasowych: 0h; 0.5h; 1h; 2h; 4h; 6h. LMMM (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa)

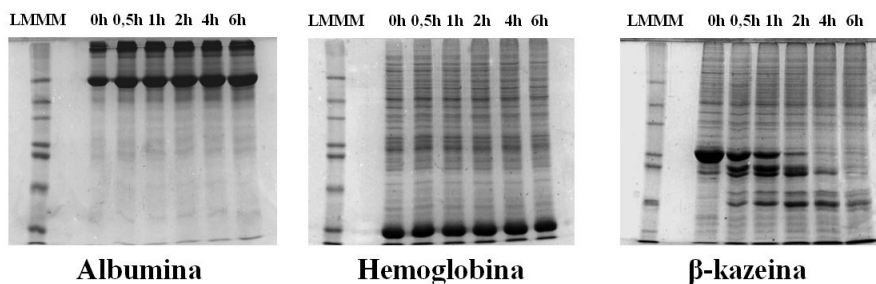
Obrazy elektroforetyczne, uzyskane metodą SDS-PAGE, stanowiły kontrole negatywne w odniesieniu do stosowanych substratów (Rys. 2). Do mieszaniny reakcyjnej w tych wariantach nie dodawano preparatu proteasomów.

Na podstawie powyższej analizy wykazano stabilność w warunkach reakcji wszystkich wybranych modelowych białek substratowych – nie ulegały one degradacji w temperaturze 37°C w ciągu 6 godzin inkubacji. Pozwoliło to na zastosowanie ich jako potencjalnych substratów do badania procesu degradacji białek przez wysokocząsteczkowe kompleksy proteasomowe izolowane z grzybn *T. versicolor*.

2.2. Degradacja modelowych białek substratowych przez kompleksy proteasomów – analiza elektroforetyczna

Doświadczenie miało na celu zbadanie stopnia degradacji wybranych modelowych substratów białkowych (albuminy, hemoglobiny i β -kazeiny) przez proteasomy izolowane z grzybni *T. versicolor*, z wykorzystaniem analizy elektroforetycznej (SDS-PAGE). Nie zaobserwowano różnic w obrazie elektroforetycznym dokumentującym proces degradacji badanych białek substratowych, w odniesieniu do reakcji katalizowanej przez kompleksy proteasomów 26S czy 20S.

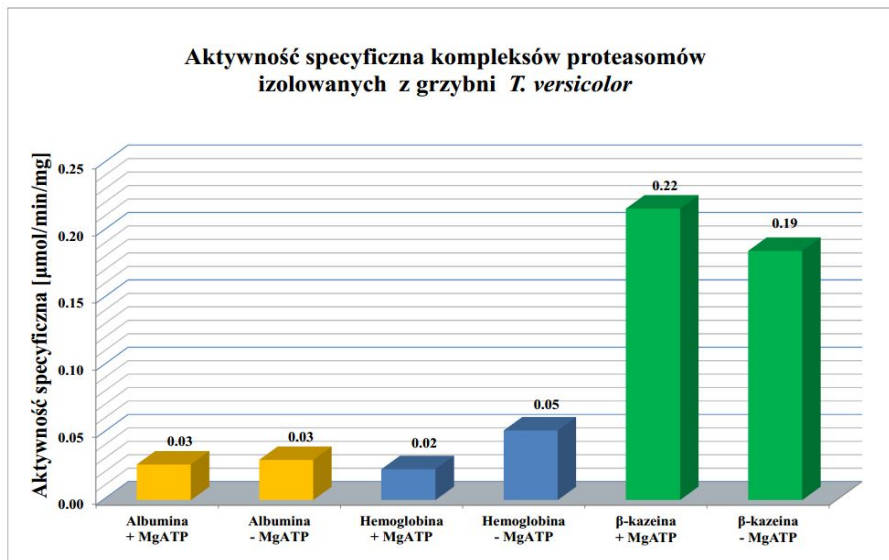
Przeprowadzona analiza elektroforetyczna wykazała podatność na degradację przez kompleksy proteasomów tylko jednego z trzech badanych białek substratowych – β -kazeiny (Rys. 3). W przypadku hemoglobiny stosowanej powszechnie jako komercyjny substrat dla proteaz [40] nie obserwowano jej rozkładu w warunkach reakcji, co świadczy o wystarczającym stopniu oczyszczenia stosowanego preparatu kompleksów proteasomowych z niskocząsteczkowych proteaz obecnych w komórkach *T. versicolor*.



Rys. 3 Analiza elektroforetyczna procesu degradacji modelowych substratów białkowych przez kompleksy proteasomów 26S izolowane z grzybni *T. versicolor*. Próby mieszaniny reakcyjnej pobierano w określonych odstępach czasowych: 0h; 0.5h; 1h; 2h; 4h; 6h. LMMM (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa)

2.3. Degradacja modelowych białek substratowych przez kompleksy proteasomów – analiza spektrofluorymetryczna

Metoda spektrofluorymetryczna pozwoliła na określenie ilości powstających produktów degradacji modelowych białek substratowych w oparciu o analizę intensywności fluorescencji, pojawiającej się w wyniku reakcji z fluorescaminą pierwszorzędowych grup aminowych obecnych w aminokwasach końcowych i resztach ϵ -aminowych lizyny peptydowych produktów degradacji białka [36].



Rys. 4 Stopień degradacji modelowych białek substratowych przez kompleksy proteasomów izolowane z grzybni *T. versicolor*. Aktywność oznaczano metodą wykorzystującą reakcję fluorescaminy z produktami degradacji białek

Aktywność specyficzną kompleksów proteasomowych wyrażano w [$\mu\text{mol/min/mg}$], uwzględniając w obliczeniach ilość białka w stosowanym preparacie, objętości poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej oraz przyrost stężenia produktów degradacji odczytywany z prostoliniowego odcinka krzywej progresji.

Wyniki analiz spektrofluorymetrycznych okazały się zbieżne z rezultatami uzyskanymi metodą SDS-PAGE. Stwierdzono znacznie większy (ok. 10-krotnie) stopień degradacji β -kazeiny przez kompleksy proteasomów w porównaniu z degradacją albuminy i hemoglobiny (Rys. 4). Charakteryzująca się wysoką czułością metoda wykorzystująca reakcję z fluorescaminą pozwoliła na wykazanie nieznacznego stopnia degradacji w przypadku albuminy i hemoglobiny, co nie było możliwe do zaobserwowania podczas analiz

elektroforetycznych. Ponadto powyższą metodą wykazano większą podatność β -kazeiny na degradację ATP-zależną, z udziałem proteasomów 26S.

3. Podsumowanie

Na podstawie analiz elektroforetycznych stwierdzono, że β -kazeina okazała się substratem efektywnie degradowanym przez kompleksy proteasomowe wyizolowane z grzybni *T. versicolor*. Analiza spektrofлуorymetryczna potwierdziła wyniki otrzymane metodą SDS-PAGE. Substratem najlepiej degradowanym również okazała się β -kazeina, a stopień jej rozkładu był największy w reakcji katalizowanej przez proteasomy 26S, w obecności ATP.

Uzyskane wyniki wykazały skuteczność powyższych metod, szczególnie spektrofлуorymetrycznej – wykorzystującej reakcję produktów degradacji z fluorescaminą, do analizy procesu rozkładu białek przez kompleksy proteasomowe ligninolitycznego gatunku *T. versicolor*, co stanowi alternatywę dla procedur z użyciem białek substratowych znakowanych radioizotopami.

Literatura:

1. Schoenheimer, R. (1942) *The Dynamic State of Body Constituents* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA
2. Staszczak, M., Zdunek, E. (1999) *Proteoliza wewnątrzkomórkowa*. Post. Biochem. 4:32-41
3. Mayer, R. J., Doherty, F. (1986) *Intracellular protein catabolism: state of the art*. FEBS Lett. 198: 181-193
4. de Duve, C., Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. 28: 435-492
5. Etlinger, J. D., Goldberg, A. L. (1977) *A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 54-58
6. Ciechanover, A., Hold, Y., Hershko, A. (1978) *A heat-stable component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: 1100-1105
7. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A. (1980) *Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1783-1786
8. Glickman, M., H., Ciechanover, A. (2002) *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol. Rev. 82: 373-428
9. Viestra, R. (2003) *The ubiquitin 26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins*. Trends Plant Sci. 8: 135-142
10. Fischer, M., Hilt, W., Richter-Ruoff, B., Gonen, H., Ciechanover, A., Wolf, D. H. (1994) *The proteasome of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 335: 79-75

11. Staszczak, M. (2002) *Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata**. Enzyme Microb. Technol. 30: 537-541
12. Glickman, M., H., Ciechanover, A. (2002) *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol. Rev. 82: 373-428
13. Pickart, C. M., Cohen, R. E. (2004) *Proteasomes and their kin.: Proteases in the machine age*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5: 177-187
14. Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) *The ubiquitin system*. Annu. Rev. Biochem. 67: 425-479
15. Staszczak, M. (2002) *Ubiquitin-proteasome mediated protein degradation*. MMBB Seminar Series, A presentation of the Department of Microbiology, Molecular Biology and Biochemistry and the University of Idaho College of Agriculture and Life Sciences, Idaho, USA, September 20, 2002, <http://www.ag.uidaho.edu/mmbb/pdf/SemesterSeriesF02.pdf>
16. Wlodawer, A. (1995) *Proteasome: A complex protease with a new fold and a distinct mechanism*. Structure 3: 417-420
17. DeMartino, G. N., Wójcik, C. (2005) *Proteasome regulator*, PA 700 (19S Regulatory Particle). In: Mayer J., Ciechanover A., Rechsteiner M. (Eds.), Protein Degradation. Ubiquitin and the Chemistry of Life, Vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 288-317
18. Lasker, K., Förster, Walzthoeni, T., Villa, E., Unverdorben, P., Beck, F., Aebersold, A., Sali, A., Baumeister, W. (2011) *Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach*. Proc. Natl. Acad. Sci. Early Edition: 1380-1387
19. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., Finley, D. (2000) *A gated channel into the proteasome core particle*. Nat. Struct. Biol. 7: 1062-1067
20. Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999) *The proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu. Rev. Biochem. 68: 1015-1068
21. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V., Goldberg, A. L. (1999) *Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein break down*. Mol. Cell 4: 3595-402
22. Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A. (2012) *Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle*. Nature 482: 186-193
23. Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L., Pickart, C. M. (2002) *A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal*. Nature 416: 763-767
24. Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., Finley, D. (2001) *The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release*. Mol. Cell. 7: 1143-52
25. Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V., Deshaies, R. J. (2002) *Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome*. Science 298: 611-615
26. Yao, T., Cohen, R. E. (2002) *A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome*. Nature 419: 403-407

27. Perez, J., Munoy-Dorado, Y., De la Rubia, T., Martinez, J. (2002) *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin*. Int. Microb. 5: 53-63
28. Kirk, T. K., Chang, H. M. (1974) *Decomposition of lignin by white-rot fungi. w: Isolation of heavily degraded from decayed spruce*. Holzforschung, 28: 217-222
29. Hatakka, A. (2001) *Biodegradation of lignin*. Biopolymers, 1: 129-180
30. Staszczak, M., Zdunek, E., Leonowicz, A. (2000) *Studies on the role of proteases in the white-rot fungus Trametes versicolor: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity*, J. Basic Microbiol. 40: 51-63
31. Staszczak, M. (2008) *The role of the ubiquitin – proteasome system in the response of the ligninolytic fungus Trametes versicolor to nitrogen deprivation*. Fun. Genet. Biol. 45: 328-37
32. Fahraeus, G., Reinhammar, B. (1967) *Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus Polyporus versicolor and some properties of laccase*. Acta Chem. Scand. 21: 2367-2378
33. Staszczak, M., Jarosz-Wilkolazka, A. (2005) *Inhibition of the proteasome strongly affects cadmium stimulated laccase activity in Trametes versicolor*. Biochimie 87: 755-762
34. Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254
35. Garesse, R., Castell, J. V., Vallejo, C. G., Marco, R. (1979) *A Fluorescamine-based sensitive method for the assay of proteinases, capable of detecting the initial cleavage steps of a protein*. Eur. J. Biochem. 99: 253-259
36. Kisselev, A. F., Callard, A., Goldberg, A. L. (2006) *Importance of the proteasome's different proteolytic sites and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate*. J. Biol. Chem. 281: 8582-8590
37. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., Weigle, M. (1972) *Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range*. Science, 178: 871-872
38. Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: 680-685
39. Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J. C., Jakob, U. (2000) *Heating greatly speeds Coomassie Blue staining and destaining*. BioTechniques, 28: 426-432
40. Staszczak, M., Nowak, G., Grzywnowicz, K., Leonowicz, A. (1996) *Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi*. J. Basic. Microbiol. 36: 193-203

Pracę recenzował: prof. dr hab. Jerzy Rogalski, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Degradacja modelowych substratów białkowych przez kompleksy proteasomowe grzybów ligninolitycznych

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zbadanie zdolności proteasomów izolowanych z grzybni ligninolitycznego gatunku *Trametes versicolor* do degradacji modelowych substratów białkowych. Proteasom 26S jest wielokatalitycznym ATP-zależnym kompleksem proteolitycznym, który jest zaangażowany głównie w zależną od ubikwityny degradację białek o krótkim okresie półtrwania oraz białek nieprawidłowo zbudowanych lub zdenaturowanych. System ubikwityna/proteasom powszechnie występuje w komórkach organizmów eukariotycznych. Jego obecność stwierdzono zarówno u zwierząt, roślin, jak i u drożdży.

W królestwie grzybów wykazano jego obecność również u grzybów ligninolitycznych. Zdolności proteasomów, izolowanych z grzybni *T. versicolor*, do degradacji wybranych modelowych substratów białkowych (albuminy, hemoglobiny i β -kazeiny) badano stosując analizy spektrofлуorymetryczne oraz elektroforetyczne. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spośród badanych substratów białkowych skutecznie degradowanym przez kompleksy proteasomowe *T. versicolor* była jedynie β -kazeina. Ponadto wykazano skuteczność metody spektrofлуorymetrycznej, wykorzystującej reakcję produktów degradacji z fluorescaminą, do analizy procesu degradacji białek przez te kompleksy proteasomowe, co stanowi alternatywę dla procedur z użyciem białek substratowych znakowanych radioizotopami.

Słowa Kluczowe: proteasom, β -kazeina, grzyby ligninolityczne

Degradation of model protein substrates by proteasome complexes of ligninolytic fungi

Abstract

The aim of this study was to investigate the ability of the proteasomes isolated from mycelium of the ligninolytic species *Trametes versicolor* to degrade model protein substrates. The 26S proteasome is a multicatalytic ATP-dependent proteolytic complex which is mainly involved in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived, damaged or denatured proteins. The ubiquitin/proteasome pathway is found in all eukaryotic cells examined so far. Its presence was found in animals, plants and yeast. In the kingdom of fungi proteasomes were also reported in ligninolytic fungi. The ability of the proteasomes isolated from mycelium of *T. versicolor* to degrade model protein substrates (albumin, hemoglobin and β -casein) was studied using spectrofluorimetric and electrophoretic analyses. Based on the results, it was found that of the tested protein substrates, only β -casein was effectively degraded by the proteasome complexes of *T. versicolor*. Moreover, the spectrofluorimetric method using the reaction of degradation products with fluorescamine to measure the rate of protein degradation by the proteasomes was shown to be a good alternative to procedures with the use of radioisotope-labeled protein substrates.

Keywords: proteasome, β -casein, ligninolytic fungi

Artur Pałasz¹, Ewa Rojczyk-Gołębiewska²

Nowoczesne metody obrazowania układu nerwowego

Wprowadzenie

Dla wielu współczesnych neuronanatomia wydaje się klasyczną, zamkniętą nauką opisową, której możliwości poznawcze zamknęły się jeszcze w ubiegłym stuleciu. W istocie, znakomita większość struktur mózgowia została precyzyjnie opisana jeszcze w XIX wieku, również na poziomie mikroskopowym dzięki genialnym i nowatorskim pracom Santiago Ramon y Cajala oraz Camillo Golgiego. Opracowane przez nich techniki impregnacji preparatów mózgowia solami srebra, chromu i rtęci umożliwiły ukazanie pełnego obrazu neuronów uwzględniającego przestrzenną architekturę dendrytów i aksonów, a także strukturę komórek glejowych. Warto również wspomnieć postać zmarłego dokładnie 150 lat temu wybitnego anatoma niemieckiego Otto Karla Deitersa, twórcy zachwycających swą dokładnością atlasów cytoarchitektoniki mózgowia. Doskonałe, niemal artystyczne ryciny ilustrujące manuskrypty wymienionych pionierów neurohistologii zasadniczo nie straciły swej aktualności do dzisiaj, a przyjęta tam klasyfikacja morfologiczna neuronów jest wciąż powszechnie stosowana.

Współczesne badania struktury ośrodkowego układu nerwowego nie ograniczają się jedynie do aspektu opisowego, lecz kładą szczególny nacisk na badanie czynności określonych formacji neuronalnych. Pierwzoplanową rolę przypisuje się w związku z tym technikom badawczym, pozwalającym na wgląd w funkcjonowanie mózgowia *in vivo* w oparciu o zwierzęce modele doświadczalne. Zakrojone na szeroką skalę badania tego typu budują nowoczesny obraz neuroanatomii czynnościowej, wykorzystującej najnowsze zdobycze biochemii, biofizyki, genetyki i biotechnologii. Prezentowany artykuł to zwięzły przegląd wybranych aktualnie stosowanych metod obrazowania układu nerwowego, dostarczających nowych, nierzadko intrygujących informacji na temat wzajemnych relacji czynnościowych pomiędzy strukturami mózgu.

¹ apalasz@sum.edu.pl, Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski w Katowicach, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

² ewarojczyk@gmail.com, Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski w Katowicach, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

1. MRI

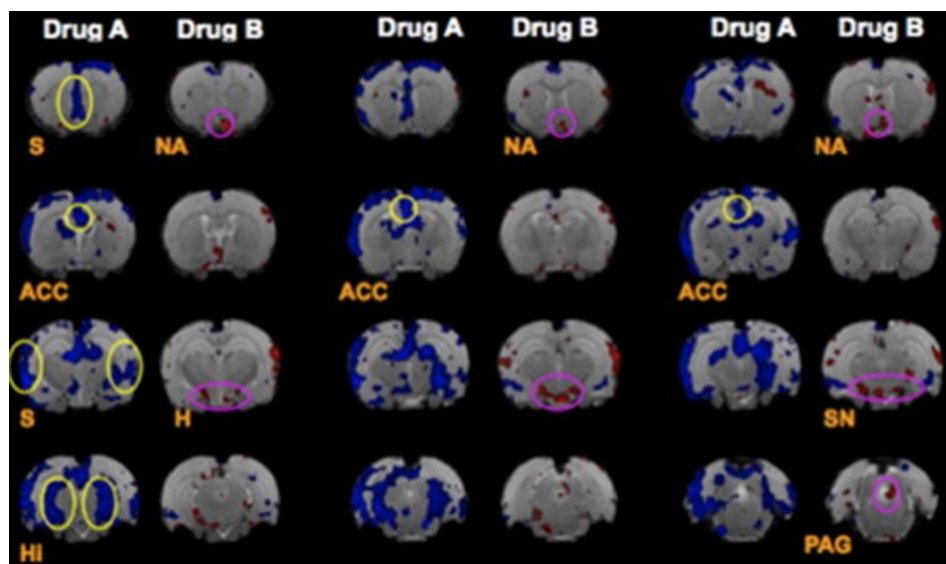
Technika jądrowego rezonansu magnetycznego (MRI) od dawna jest standardem w klinicznym obrazowaniu mózgu. W ostatnim czasie dzięki znacznej miniaturyzacji urządzeń i uzyskaniu wysokich wartości natężenia pola magnetycznego (7-15 Tesli) możliwe stało się wykorzystanie MRI, zwłaszcza czynnościowego (fMRI) do badań małych zwierząt zwłaszcza w aspekcie farmakologicznym. W przypadku klasycznego fMRI wykrywane są zmiany hemodynamiczne mózgowia związane z aktywnością określonych jego obszarów, zmiany zależne od poziomu utlenowania krwi (BOLD, z ang. *blood oxygenation level-dependent*), fluktuacje przepływu krwi (CBF, z ang. *cerebral blood flow*) oraz jej objętości (CBV, z ang. *cerebral blood volume*) w strukturach mózgu [1].

Obrazowanie BOLD (Rys. 1) opiera się na wykrywaniu wzrastającego zużycia tlenu przez neurony i towarzyszących mu zmian hemodynamicznych podczas ich aktywacji. Technika ta nie dostarcza jednak informacji na temat aktywności neuronów w sposób precyzyjny, uwzględniający ich tło cytofizjologiczne. W związku z tym, za szczególnie przydatną i wartościową modyfikację tej metody uznawany jest rezonans magnetyczny wzmacniany manganem (MEMRI, z ang. *manganese-enhanced magnetic resonance imaging*) (Rys. 2). Jej podstawową zaletą jest odzwierciedlenie zależnej od kanałów jonowych akumulacji manganu przez neurony pobudzonych obszarów mózgu, wykazujące zatem ich czynność bioelektryczną. Pozwala to na uzyskanie obrazów wysokiej rozdzielczości oraz precyzyjne ukazanie architektury neuronów oraz wykrywanie ich aktywności. Możliwe jest uwidocznienie struktury warstwowej kory nowej, hipokampa, mózdzku oraz mapowanie wszystkich jąder podkorowych, wzgórza i podwzgórza [2].

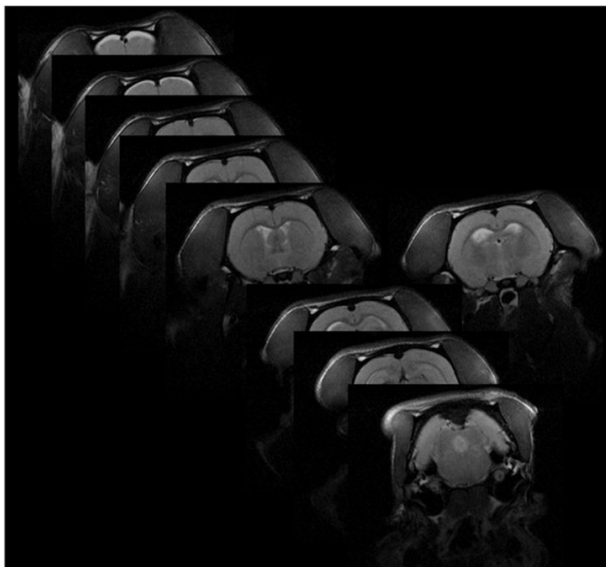
Paramagnetyczny jon Mn^{2+} jest zbliżony swym promieniem van der Waals'a do diamagnetycznego Ca^{2+} , co czyni go idealnym wskaźnikiem w badaniu dynamiki sygnalizacji wapniowej komórek nerwowych. Może on wnikać do ętrza neuronów poprzez napięciowozależne kanały wapniowe typu L. Gradient manganu przemieszcza się transsynaptycznie co pozwala na stworzenie mapy połączeń pomiędzy neuronami. Należy jednak zauważyć, że pierwiastek ten lokuje się również pozaneuronalnie w okolicznych astrocytach, zwłaszcza w ich wypustkach otaczających neurony, bogatych w połączenia jonowo-metaboliczne [3]. Uwodniony Mn^{2+} indukuje silną redukcję sygnału T_1 wody, co skutkuje uzyskaniem jasnego kontrastu w obrazach T_1 -zależnych we wzbudzonych obszarach mózgu.

Interesującą cechą MEMRI jest fakt, że różne struktury mózgu manifestują wzmocnienie sygnału w sposób zależny od czasu jaki upłynął od podania $MnCl_2$. Najwcześniej, w 10 minut po iniekcji pojawia się sygnał w splocie naczyniówkowym, wskazując rolę bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy.

Nieco później następuje wzmocnienie samego płynu, co pozwala na uwidocznienie układu komorowego. Pełny, najsilniejszy sygnał z całego obszaru mózgowia uwidacznia się po jednym dniu, stając się wówczas optymalnym dla badań cytoarchitektonicznych. Znakomita większość struktur mózgu jest wówczas kontrastowo zdefiniowana, co umożliwia dokonanie ilościowej analizy objętości owych obszarów oraz grubości warstw komórkowych w strefach korowych w sposób zautomatyzowany [2]. MEMRI nie jest jednak wolna od ograniczeń; mangan wykazuje cechy neurotoksyczności zakłócając napływ jonów wapnia, co powoduje zaburzenia szlaków metabolicznych neuronu m.in. cyklu Krebsa oraz obrotu neurotransmiterów [3].



Rys. 1 Struktury mózgowia szczura w technice fMRI uzyskane dzięki zastosowaniu znakowania BOLD w badaniu farmakologicznym. [4] – zmodyfikowane



Rys. 2 Wielopłaszczyznowy obraz przekrojów mózgowia szczura w technice rezonansu magnetycznego wzmacnianego manganem (MEMRI). [5] – zmodyfikowane

2. PET

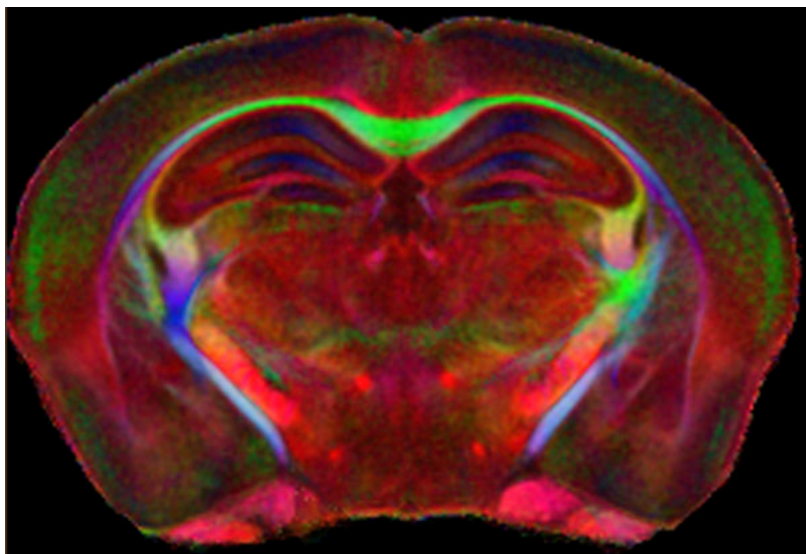
Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) jest również wykorzystywana w zwierzęcych modelach eksperymentalnych. Ma ona zastosowanie w badaniu zmian naprawczych w OUN, neuroplastyczności, pobudzania i hamowania neuronów, fizjologii receptorów, analizy ekspresji genów. Obraz PET powstaje dzięki użyciu związków znakowanych radionuklidami emitującymi pozytony. W wyniku nieinwazyjnego skanowania zanikających fotonów i zastosowaniu techniki tomograficznej uzyskiwany jest trójwymiarowy obraz dystrybucji izotopu w strukturach mózgu. Zastosowanie znakowanych ^{18}F lub ^{11}C substancji odgrywających ściśle zdefiniowaną rolę w biochemii neuronów umożliwia ilościową ocenę wielu parametrów czynnościowych. Możliwy staje się pomiar tempa metabolizmu substratów, syntezy białek, aktywności enzymów, wiązania ligandów do receptorów czy też ekspresji określonych genów.

Ogromną zaletą zastosowania PET jest możliwość pełnej oceny dystrybucji próby w czasie i przestrzeni u jednego badanego zwierzęcia. Dostępność detektorów PET dostosowanych do obrazowania mózgowia małych zwierząt systematycznie wzrasta, trwają też prace nad udoskonaleniem gamma-kamer o znacznie lepszej przestrzennej rozdzielczości i czułości pomiarowej. Stosowane obecnie urządzenia zapewniają rozdzielczość rzędu 6-12 μl . Najnowsze systemy, których wykorzystywane są śladowe ilości znakowanych pozytonowo próbek osiągają nawet 1 μl [6].

3. DTI

Cechą charakterystyczną struktur mózgu jest ich anizotropia, prowadząca do zdeterminowanego kierunkowo przepływu wody, który może być mierzony w rezonansie magnetycznym przy zastosowaniu techniki obrazowania tensora dyfuzji (DTI, diffusion tensor imaging). Cząsteczki wody dyfundują zwykle łatwiej wzdłuż szlaków aksonalnych istoty białej, niż w kierunku poprzecznym. W istocie szarej i płynie mózgowo rdzeniowym dyfuzja ma natomiast charakter izotropowy, choć znacząco zróżnicowany w poszczególnych obszarach.

Uzyskane informacje mogą być przetworzone komputerowo (traktografia) czego efektem jest uzyskanie przestrzennych, kodowanych kolorem map mózgowia uwidaczniających trójwymiarową architekturę włókien nerwowych (Rys. 3). Technika DTI wydaje się być szczególnie przydatna w ocenie zarówno zmian demielinizacyjnych jak i niedokrwiennych mózgowia [6].



Rys 3. Kodowane kolorem obrazowanie tensora dyfuzji (DTI) mózgowia szczura. [7] – zmodyfikowane 35

4. Znakowanie retrogradowe

Mózg to złożony system wielkiej liczby połączonych ze sobą pętli neuronalnych. Jedną z dróg wyjaśnienia struktury tej niezwykle skomplikowanej sieci jest użycie substancji znacznikowych (barwników lub białek), które mogą być wychwytywane przez neurony a następnie transportowane drogą aksonalną. W przypadku, gdy znacznik jest transportowany retrogradowo, wybarwione zostaną neurony wysyłające swe aksony w miejsce podania substancji (Rys. 4). Metoda ta pozwala na uwidocznienie wszystkich wejść neuronalnych do określonego obszaru mózgowia. Kombinacja dwu znaczników retrogradowych, różniących się na przykład długością fali fluorescencji określana jest mianem podwójnego znakowania retrogradowego.

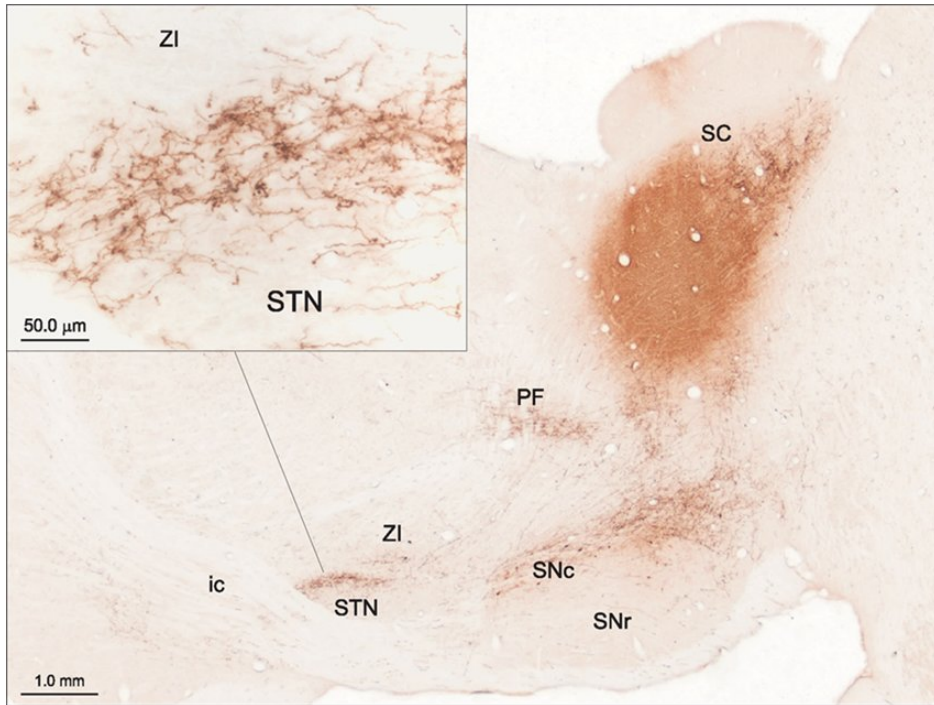
Metoda ta jest szczególnie przydatna w sytuacji, gdy określona struktura mózgu posiada różne projekcje do odmiennych obszarów docelowych. Możliwe jest również zbadanie czy określone aksony biorą swój początek w jednym perykarionie (dywergencja) czy też wielu. Technika ta pozwala na precyzyjny wgląd w strukturę połączeń aferentnych i eferentnych mózgu. Do uwidocznienia połączeń neuronalnych mogą być również wykorzystywane wirusy. W odróżnieniu od konwencjonalnych chemicznych znaczników retrogradowych, wirusy mogą przemieszczać się pomiędzy neuronami drogą synaptyczną. Co szczególnie warto podkreślić, mogą one replikować wewnątrz zainfekowanych neuronów, czego efektem jest znaczne wzmocnienie sygnału. Cecha ta pozwala na precyzyjne wyznaczenie połączonych synaptycznie pętli neuronalnych.

Liczne wirusy neurotropowe wykorzystywane są w technice znakowania transsynaptycznego; wirus opryszczki typu 1 (HSV-1), wirus wścieklizny (RV) oraz pseudo-wścieklizny (PRV). Wśród wymienionych tzw. szczep Bartha PRV (PRV-Bartha) jest szczególnie często wykorzystywany. Celem dokonania szczegółowej analizy morfologicznej złożonych sieci nerwowych, jak np. interakcje pomiędzy pętlami neuronalnymi, użyteczne jest wykorzystanie kombinacji podwójnego znakowania retrogradowego ze znakowaniem wirusowym. W metodzie tej znacznikami transsynaptycznymi są dwa szczepy rekombinowanych wirusów, każdy z nich wykazuje ekspresję unikalnego białka markerowego. Efektem jej zastosowania jest oddzielne wyznaczenie dwu pętli neuronalnych, natomiast pojedynczy neuron, będący początkiem dwu dywergujących pętli charakteryzuje się koekspresją obydwu białek [8].

Pewnym ograniczeniem tej metody był do niedawna brak narzędzia do identyfikacji neuronów połączonych monosynaptycznie z inną grupą komórek a w szczególności z pojedynczym neuronem. Markery międzysynaptyczne nie zapewniają rozróżnienia połączeń bezpośrednich od pośrednich. Poza tym żaden znacznik nie jest na tyle silny, aby podany do pojedynczej komórki był w stanie uwidocznić połączone z nią neurony.

Nowa metoda pozwalająca na identyfikację połączeń monosynaptycznych oparta jest o infekcję interesującej nas grupy komórek zmutowanym wirusem, w którym ma miejsce delecja jednego lub kilku genów odpowiadających za jego transsynaptyczne przemieszczanie. Towarzyszy jej komplementacja owego braku wprowadzeniem utraconego genu wirusowego, jedynie do zainfekowanej komórki. Gdy wszystkie geny wirusowe są obecne w neuronach startowych, wirus może przenikać z nich do komórek pozostających z nimi w monosynaptycznym kontakcie. Ponieważ geny te nie są obecne we wtórnie zainfekowanych komórkach, dalsze rozprzestrzenianie wirusa nie jest możliwe.

Wirusem wykorzystywanym w tej technice jest zazwyczaj wirus wścieklizny z racji swej niskiej cytotoksyczności oraz znacznie większej wydajności infekcyjnej w porównaniu z innymi stosowanymi wirusami zwłaszcza typu opryszczki (α -herpeswirusy). Jest on znakomitą markerem transsynaptycznym, przemieszczającym się jedynie retrogradowo. Co więcej, propagacja wirusa ograniczona jest jedynie do neuronów połączonych z zainfekowaną komórką i nie zachodzi w kierunku sąsiadujących neuronów pozostających poza kontaktem synaptycznym. Strategia biotechnologiczna tej metody opiera się na delecji wirusowego genu glikoproteiny. Glikoproteina ta, usytuowana wewnątrz błony otaczającej rdzeń wirusa, nie jest konieczna dla transkrypcji i replikacji genomu wirusowego w zainfekowanej komórce, natomiast konieczna dla jego transsynaptycznego rozprzestrzeniania się. W rekombinowanym wirusie wścieklizny SADAG-EGFP gen glikoproteiny zastąpiono sekwencją kodującą białko wzmocnionej zielonej fluorescencji (EGFP). Nie pozwala to wprowadzić na jego przemieszczanie jednak zapewnia dobre wyznakowanie struktur dendrytów i aksonu. Aby precyzyjnie nacelować infekcję SADAG-EGFP na genetycznie zdefiniowaną populację neuronów, wykorzystano szczególną interakcję receptorową wirusa ptasiego mięsaka (ASLV-A). Białko otoczki tego specyficznego wirusa (EnvA) ukierunkowuje infekcję jedynie na te komórki, które posiadają receptor TVA, białko obecne jedynie u ptaków, nie obserwowane u ssaków. Wbudowując EnvA do wirusa wścieklizny uzyskuje się wirusa SADAG-EGFP(EnvA), który jest w stanie infekować jedynie małą subpopulację neuronów wykazujących ekspresję TVA. Wprowadzenie genu glikoproteiny do neuronu inicjalnie infekowanego umożliwia powstanie cząstek wirusowych i ich wnikanie do komórek połączonych monosynaptycznie [9].



Rys. 4 Znakowanie retrogradowe szlaków nerwowych mózgowia szczura. Znacznik wprowadzono do wzgórka górnego blaszki pokrywnej (SC), co uwidoczniło projekcje aksonalne do jądra niskowzgórzowego (STN) oraz istoty czarnej (SNc, SNr). [10] – zmodyfikowane

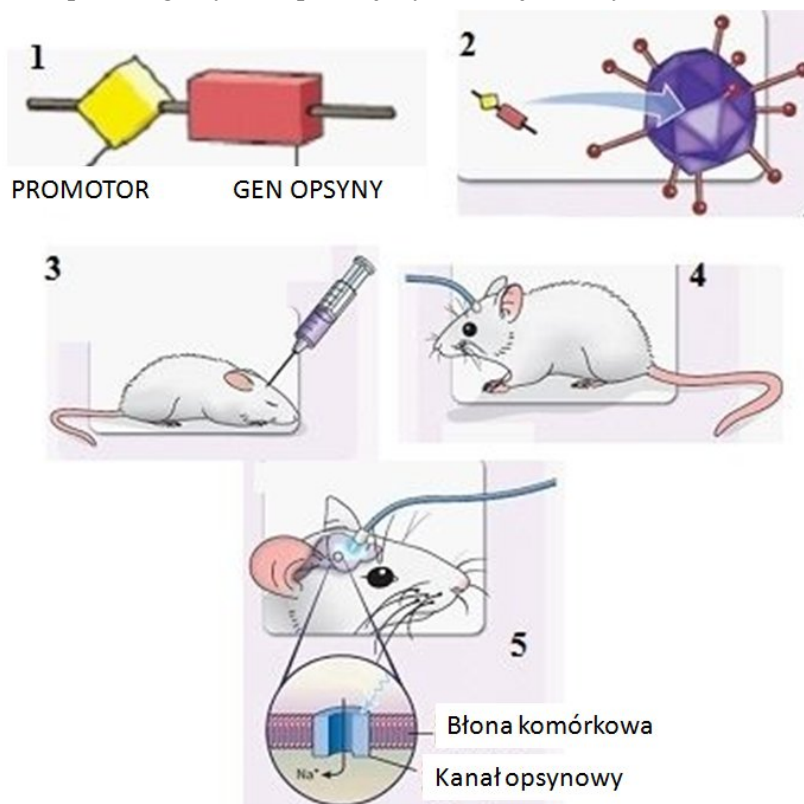
5. Optogenetyka

We współczesnej neurobiologii eksperymentalnej stosowane są liczne nowoczesne technologie nie tylko w celach obrazowania całego mózgu lub jego pojedynczych struktur, lecz również w celu wyciszania lub wzmacniania aktywności elektrycznej neuronów. Pozwala to zrozumieć rolę poszczególnych typów komórek w obrębie szlaków nerwowych. Jedną z interesujących technik neuromodulacji jest optogenetyka, która łączy w sobie optykę, genetykę i bioinżynierię, aby w precyzyjny sposób kontrolować aktywność specyficznych neuronów.

Optogenetyka wykorzystuje pochodzące z mikroorganizmów białka zwane rodopsynami, które pełnią rolę molekularnych czujników odpowiadających na światło. Mają one zdolność wychwytu energii świetlnej i zużywania jej do aktywnego transportu jonów bądź do otwierania kanałów jonowych umożliwiających ich bierny przepływ. W zależności od mechanizmu działania, rodopsyny można podzielić na halorodopsyny, rodopsyny kanałowe i archaerodopsyny. Po wyizolowaniu z mikroorganizmów i otrzymaniu ekspresji

w neuronach, te trzy wyżej wymienione typy rodopsyn odpowiadają na światło w różny sposób. Halorodopsyny pośredniczą w wyciszaniu neuronów poprzez hiperpolaryzację ich błon komórkowych w odpowiedzi na żółte światło, natomiast rodopsyny kanałowe dają odwrotny efekt modulacyjny – po ich stymulacji światłem niebieskim są zdolne do aktywowania neuronów poprzez depolaryzację błon. Z kolei archaerodopsyny odpowiadają na światło zielone i żółte powodując wyciszanie neuronów, nawet do 100% [11,12]. Uproszczony schemat ukazujący pięć stadiów prowadzących do uzyskania efektu modulacyjnego za pomocą optogenetyki przedstawia rys. 5.

Począwszy od 2005 r. (kiedy to po raz pierwszy opisano klasyczną technikę optogenetyczną), zastosowanie opsyn w neurobiologii stawało się coraz bardziej popularne. Ponadto, powstało wiele ulepszeń tego systemu w celu poprawy wydajności poszczególnych etapów tej wyszukanej metody.



Rys. 5 Uproszczony schemat techniki optogenetycznej, 1-stworzenie konstruktu genetycznego, 2-wstawienie konstruktu do zmodyfikowanego wirusa, 3-wstrzyknięcie wirusa do mózgu (ekspresja genów), 4-założenie „optrody”, 5-dostarczenie światła prowadzące do neuromodulacji

6. *Brainbow*

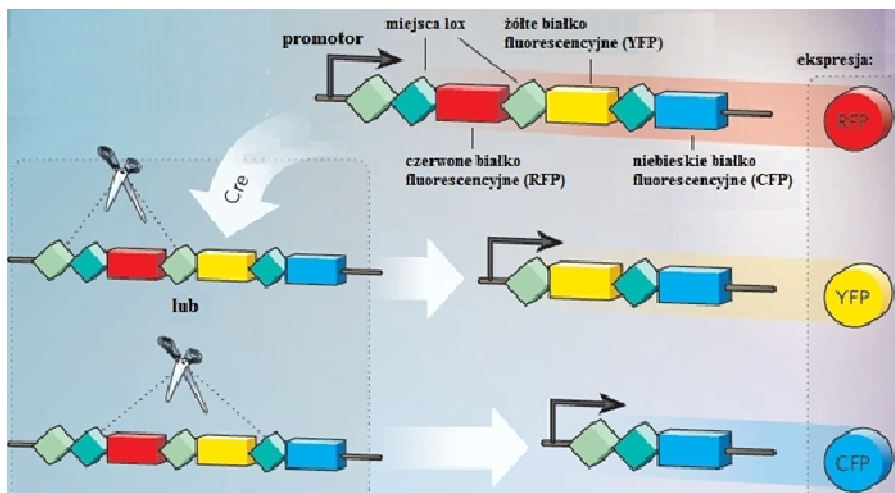
Ogólna struktura anatomiczna oraz fizjologia mózgu są już stosunkowo dobrze poznane. Istnieją również narzędzia umożliwiające neuromodulację i badanie funkcji mózgu w różnych warunkach. Jednak złożoność tego organu jest prawdopodobnie wynikiem ogromnej liczby synaps, które często nie są stabilne w czasie i przestrzeni (zgodnie z teorią plastyczności synaptycznej). Odkrycie tego faktu zapoczątkowało zainteresowanie konektomiką – działem neurobiologii skupiającym się na synapsach i ich wysoko-rozdzielczemu obrazowaniu.

Profesor Jeff Lichtman z Center for Brain Science w Harvard University był jednym z pierwszych naukowców, który zrozumiał potrzebę stworzenia dokładnej, zmiennej w czasie mapy sieci połączeń między komórkami nerwowymi [13,14]. Początkowo opracował on technikę pobierania przez neurony (drogą synaptyczną) znaczników fluorescencyjnych po ich uprzedniej stymulacji elektrycznej. Dzięki temu każda komórka była wybarwiona na inny kolor, co dawało możliwość jej śledzenia w czasie i przestrzeni. Ta technika była jednak skomplikowana z powodu konieczności równoczesnej stymulacji wszystkich neuronów [14,15].

Dopiero odkrycie zielonego białka fluorescencyjnego (GFP, ang. *green fluorescent protein*) i jego kolorowych wariantów (tzw. XFP) stało się krokiem milowym umożliwiającym stworzenie nowej techniki zwanej *Brainbow* opartej na modyfikacjach genetycznych. Stworzono linie transgeniczných myszy wykazujących ekspresję białek fluorescencyjnych o różnych kolorach. Zaskakujące było to, że wzory ekspresji tych białek różniły się w poszczególnych liniach, pomimo wbudowania identycznego konstruktu genowego. U niektórych zwierząt niemal wszystkie komórki nerwowe wykazywały ekspresję XFP, a u innych tylko ich mały procent. Kolejnym krokiem było krzyżowanie ze sobą otrzymanych linii transgeniczných, w wyniku czego powstały nowe szczepy z unikalnym wzorem ekspresji XFP. W niektórych komórkach obserwowano koekspresję kilku białek fluorescencyjnych, co dało efekt powstawania kilku nowych kolorów [14, 16].

Aby zwiększyć ilość barw, a tym samym umożliwić dokładniejsze obrazowanie pojedynczych neuronów i śledzenie dynamiki połączeń pomiędzy nimi, pomocny okazał się dobrze znany w inżynierii DNA system Cre/lox. Rekombinaza Cre ma zdolność wycinania, bądź odwracania fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy sekwencjami *lox*. Powstał więc pomysł stworzenia konstruktów zawierających kilka genów XFP otoczonych różnymi wariantami sekwencji *lox*. W tego typu formach tylko geny znajdujące się bezpośrednio za promotorem ulegają ekspresji. Co więcej, w każdej komórce aktywowana rekombinaza Cre może wyciąć/odwrócić sekwencję DNA tylko w jednej z par miejsc *lox*, a wybór tego miejsca jest przypadkowy. W efekcie komórki

nerwowe zostają wybarwione na różne kolory, a im więcej różnych genów XFP i różnych wariantów lox jest użytych, tym więcej kolorów można uzyskać [13,14]. Uproszczony schemat tego mechanizmu (uwzględniający trzy kolory) jest przedstawiony na rys. 6.

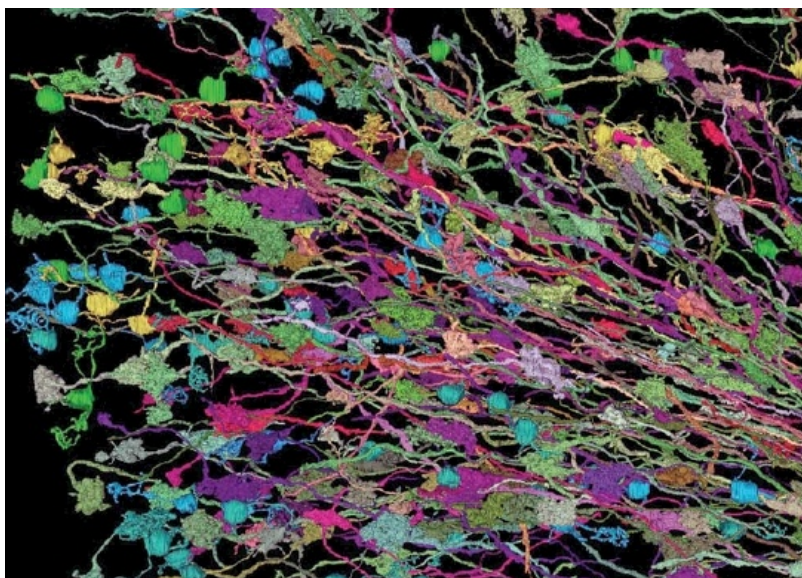


Rys. 6 Idea użycia systemu Cre/lox do stworzenia kolorowej mapy szlaków nerwowych, różne odcienie zieleni oznaczają różne warianty miejsc lox [14] – zmodyfikowane

Po stworzeniu pierwszych wspomnianych wcześniej konstruktów okazało się, że część transgeniczných linii mysich wbudowała więcej niż jedną jego kopię. Umożliwiło to niezależną rekombinację każdej z kopii, co skutkowało otrzymaniem większej ilości barw. W przypadku trzech kopii konstrukt można otrzymać aż dziesięć różnych kolorów, a dodawanie kolejnych generuje olbrzymią liczbę odcieni – nawet ponad 100! W związku z tym szalenie niezwykłym efektem, technika ta została nazwana przez profesora Lichtmana mianem *Brainbow* [14]. Opracowano również system ograniczający liczbę wbudowywanych kopii. Opiera się on na systemie analogicznych do Cre/lox zwanym Flp/FRT. Insercja miejsc FRT w odpowiednie miejsce DNA pozwala wyciąć nadmiarowe kopie po aktywacji rekombinazy Flp [13].

Opracowano dwa główne rodzaje systemu *Brainbow*. Pierwszy (prostszy, przedstawiony na rys. 6) wykorzystuje zdolność rekombinazy Cre do wycinania fragmentów DNA, natomiast drugi opiera się na zdolności tego enzymu do odwracania sekwencji DNA i wymaga ograniczenia aktywności Cre w celu ustabilizowania DNA w jednej z orientacji. Obie te techniki zostały początkowo przetestowane na liniach komórkowych HEK (ang. *Human Embryonic Kidney*). Kolejnym krokiem była próba wykorzystania systemu *Brainbow* do różnych

celów dzięki tworzeniu różnorodnych linii myszy transgenicznych. Przykładowo, udało się ograniczyć proces rekombinacji do konkretnych typów komórek dzięki użyciu odpowiednich promotorów lub krzyżowaniu linii transgenicznych. Ponadto, udało się zastosować *Brainbow* do mapowania szlaków neuronalnych (z pomocą mikroskopii konfokalnej) oraz do badań interakcji komórek glejowych [13]. Rysunek 7 przedstawia rekonstrukcję wewnętrznej warstwy ziarnistej w mózdzku mysim z ponad 300 aksonami i 93 komórkami ziarnistymi.



Rys. 7 Śledzenie szlaków neuronalnych w mózdzku za pomocą systemu *Brainbow* – trójwymiarowa cyfrowa rekonstrukcja aksonów włókien kiciastych i komórek ziarnistych w mózdzku [13] – zmodyfikowane

7. Podsumowanie

Rozwój neurobiologii opiera się w dużej mierze na wykorzystaniu coraz lepszych metod obrazowania mózgu. Klasyczne techniki są stale udoskonalane i wykorzystywane do nowych celów, w tym do badań podstawowych prowadzonych na małych zwierzętach. W ostatnich latach duży nacisk kładzie się na poznanie mikrostruktury układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem architektury połączeń synaptycznych. Ciekawa i istotna wydaje się również możliwość manipulacji aktywnością bioelektryczną pojedynczych neuronów. Dlatego tradycyjne, znane od lat metody obrazowania makrostruktury mózgu oraz techniki neuromodulacji są stopniowo wypierane przez metody nowoczesne, wykorzystujące aktualne osiągnięcia biofizyki,

biotechnologii i biologii molekularnej. Dzięki temu możliwa staje się możliwa dokładna wizualizacja mikrostruktury układu nerwowego, co jest pierwszym krokiem prowadzącym do zgłębiania zależności pomiędzy strukturą, a funkcją poszczególnych grup neuronów.

Literatura

1. Annemie Van der Linden, Nadja Van Camp, Pedro Ramos-Cabrera, Mathias Hoehn, *Current status of functional MRI on small animals: application to physiology, pathophysiology and cognition*, w: NMR Biomed., 2007, 20, ss. 522-545
2. Ichio Aoki, Yi-Jen Lin Wu, Afonso C. Silva, Ronald M. Lynch, Alan P. Koretsky, *In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI*, w: NeuroImage, 2004, 22, ss. 1046-1059
3. Blanca Lizarbe, Ania Benitez, Gerardo A. Peláez Brioso, Manuel Sánchez-Montañés, Pilar López-Larrubia, Paloma Ballesteros, Sebastian Cerdán, *Hypothalamic metabolic compartmentation during appetite regulation revealed by magnetic resonance imaging and spectroscopy methods*, w: Front Neuroenergetics, 2013, doi: 10.3389/fnene.2013.00006
4. David Borsook, Lino Becerra, *CNS animal fMRI in pain and analgesia*, w: Neurosci Biobehav Rev, 2011, 35, 1125-1143
5. Murali Murugavel, John M. Sullivan, *Automatic cropping of MRI rat brain volumes using pulse coupled neural networks*, w: Neuroimage, 2009, 3, 845-854
6. Russell E Jacobs and Simon R Cherry, *Complementary emerging techniques: high-resolution PET and MRI*, w: Current Opinion in Neurobiology, 2001, 11, 621-629
7. Yi Jiang, Allan Johnson, *Microscopic diffusion tensor atlas of the mouse brain*, w: "Neuroimage", 2011, 56, 1235-1243
8. Shinya Ohara, Ken-ichi Inoue, Menno P. Witter and Toshio Iijima, *Untangling neural networks with dual retrograde transsynaptic viral infection*, w: Front Neurosci., 2009, 3, 344-349
9. Ian R. Wickersham, David C. Lyon, Richard J. O. Bernard, Takuma Mori, Stefan Finke, Karl-Klaus Conzelmann, John A. T. Young and Edward M. Callaway, *Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons*, w: Neuron, 2007, 53, 639-647
10. Peter Redgrave, Veronique Coizet, Eliane Comoli, John G. McHaffie, Mariana Leriche, Nicolas Vautrelle, Lauren M. Hayes, Paul Overton, *Interactions between the Midbrain Superior Colliculus and the Basal Ganglia*, w: Front Neuroanat, 2010, 4, 1-8
11. Jacob G Bernstein, Paul A Garrity and Edward S Boyden, *Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits*, w: Current Opinion in Neurobiology, 2012, 22, 61-71
12. Jun-Ping Yao, Wen-Sheng Hou and Zheng-Qin Yin, *Optogenetics: a novel optical manipulation tool for medical investigation*, w: International Journal of Ophthalmology, 2012, 5, 4, 517-522

13. Jean Livet, Tamily A. Weissman, Hyuno Kang, Ryan W. Draft, Ju Lu, Robyn A. Bennis, Joshua R. Sanes and Jeff W. Lichtman, *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system*, w: Nature, 2007, 450(7166), 56-62
14. Jonah Lehrer, *Neuroscience: making connections*, w: Nature, 2009, 457(7229), 524-527
15. Lichtman JW, Wilkinson RS, Rich MM, *Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes*, w: Nature, 1985, 314(6009), 357-359
16. Guoping Feng, Rebecca H. Mellor, Michael Bernstein, Cynthia Keller-Peck, Quyen T. Nguyen, Mia Wallace, Jeanne M. Nerbonne, Jeff W. Lichtman, Joshua R. Sanes, *Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP*, w: Neuron, 2000, 28, 41-51

Pracę recenzował: dr hab n. med. Grzegorz Bajor, Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Nowoczesne metody obrazowania układu nerwowego

Streszczenie

Podstawowe badania neurostrukturalne wykorzystują obecnie nowoczesne techniki obrazowania opracowane dzięki postępowi informatyki i biotechnologii. Istotnych informacji dostarczają metody rezonansu magnetycznego: wzmacnianego manganem (MEMRI), czynnościowego (fMRI), wykorzystującego analizę tensora dyfuzji (DTI) oraz technika pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Precyzyjne śledzenie szlaków nerwowych stało się możliwe dzięki wykorzystaniu znakowania retrogradowego z użyciem modyfikowanych wirusów oraz manipulacji genetycznych wybiórczo znakujących pojedyncze neurony – projekt *Brainbow*. Efektem tej niezwykle inspirującej techniki wizualizacji jest mapowanie połączeń synaptycznych mózgowia o niespotykanej dotąd dokładności (konektomika). Optogenetyka natomiast uczyniła możliwym hamowanie bądź stymulację określonych grup neuronów w sposób mało inwazyjny i bardzo precyzyjny, co otworzyło nowy rozdział w badaniach neurofizjologicznych.

Słowa kluczowe: Brainbow, DTI, MRI, obrazowanie mózgu, optogenetyka, PET, znakowanie

Contemporary methods of nervous system imaging

Abstract

Nowadays, basic neurostructural studies use advanced imaging techniques developed thanks to progress of informatics and biotechnology. Critical information is provided by magnetic resonance methods: manganese enhanced (MEMRI), functional (fMRI), using diffusion tensor analysis (DTI) and positron emission tomography technique (PET). Precise neuronal pathways tracing was made possible with application of retrograde labeling using modified viruses and by genetic manipulations selectively labeling single neurons – *Brainbow* project. Effect of this extremely inspiring visualisation technique is brain synaptic connections mapping with so far unprecedented accuracy (connectomics). Whereas optogenetics enabled inhibition or stimulation of specific groups of neurons in not much invasive and very precise manner, which opened the new chapter in neurophysiological studies.

Key words: DTI, Brainbow, brain imaging, labeling, MRI, optogenetics, PET

Monika Olszówka¹, Kamil Maciąg²

Obecne i przyszłe perspektywy wykorzystania alg

Wstęp

Algi są to małe organizmy, wykorzystywane przez człowieka już od ponad 2 000 lat. Jako pierwsi z dobrodziejstwa tych organizmów skorzystali Chińczycy, którzy wykorzystali je jako pokarm w czasach głodu. Obecnie coraz więcej ludzi przekonuje się nie tylko o odżywczych właściwościach alg, ale również o ich innych zaletach. Prowadzone badania odkrywają wciąż nowe właściwości oraz możliwości wykorzystania tych organizmów. Fakt, że potrzebują one do życia jedynie dwutlenku węgla i energii świetlnej sprawia, że są one niezwykle atrakcyjnym materiałem zachęcającym do poszukiwania kolejnych zastosowań.

Życie na zurbanizowanych terenach, narastające problemy społeczeństwa oraz negatywny wpływ człowieka na środowisko, a także nagminne wykorzystanie preparatów syntetycznych w codziennym życiu skłania naukowców do poszukiwania nowych rozwiązań tych problemów. Okazuje się, że algi mogą stanowić kluczowy element sprzyjający prowadzeniu zdrowego trybu życia, ochronie środowiska, stanowić naturalny i przyjazny człowiekowi składnik kosmetyków i środków pielęgnacji oraz odnawialne źródło energii. Oprócz licznych doniesień naukowych o użyteczności alg świadczyć może mnogość dziedzin życia, w których te organizmy są już powszechnie wykorzystywane.

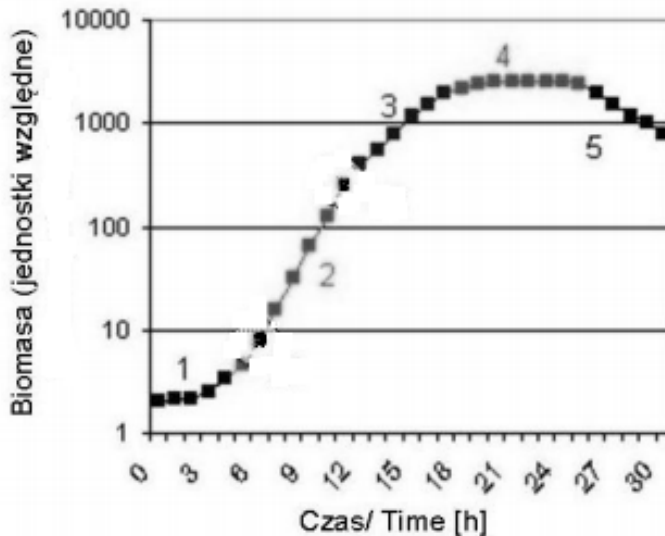
1. Charakterystyka alg

Algi (powszechnie nazywane też glonami) to najczęściej samożywne organizmy plechowe. Występują w środowiskach wodnych i wilgotnych. Algi można znaleźć w wodach słodkich, słonych, ciepłych i zimnych, na całej naszej planecie. Stanowią bardzo niejednorodną grupę organizmów różniących się zarówno pod względem fizjologicznym, jak i biochemicznym. Można je ogólnie podzielić na makro- i mikroalgi. Najczęściej wykorzystywane przez człowieka

¹olszowka.monika@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologii KUL, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

²maciagkamil@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

makroalgi charakteryzują się beztkankową budową ciała, przy czym długość ich niby-łodyg może sięgać do kilku metrów. Można je podzielić na trzy grupy ze względu na rodzaj barwnika jaki zawierają. Są to zieleńce, krasnorosty i brunatnice. Pierwsza grupa zawiera głównie zielony chlorofil, a dodatkowo żółty ksantofil i pomarańczowy karoten. Druga grupa charakteryzuje się zwiększoną zawartością czerwonej fikoerytryny oraz mniejszą ilością niebieskiej fikocyjaniny i również zielony chlorofil. Brunatnice, jak sama nazwa wskazuje zawierają brunatną fukoksantynę oraz zielony chlorofil i żółty ksantofil. Mikroalgi natomiast to mikroskopijne fotosyntetyzujące organizmy znalezione w obu oceanach oraz środowiskach słodkowodnych. Charakteryzują się one bardzo szybkim przyrostem biomasy, podczas którego można wyróżnić następujące fazy wzrostu: adaptacyjną – 1, wykładniczą – 2, spowolnienia – 3, stacjonarną – 4 i zamierania – 5.



Rys. 1 Krzywa wzrostu populacji glonów jednokomórkowych (opracowanie własne na podstawie [1])

Algi rocznie produkują ok. 52 miliardów ton węgla organicznego. Stanowi to ok. 50% całkowitego węgla organicznego produkowanego na Ziemi w ciągu roku [2]. W procesie fotosyntezy przekształcają pobrany dwutlenek węgla, przy pomocy energii świetlnej w biomasę. Do wytworzenia 1 kg suchej masy glonów potrzeba ok. 2 kg dwutlenku węgla [3]. Znanych jest ok. 25 000 gatunków alg, z czego ok. 70 wykorzystywanych jest do produkcji żywności, pasz, kosmetyków i biochemikaliów [4].

2. Zastosowanie alg

2.1. Przemysł spożywczy

Algi zawierają wiele substancji odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Dzięki temu mogą być wykorzystywane jako uzupełnienie codziennej diety. Doskonale sprawdzają się podczas stosowania diety wegetariańskiej, gdzie stanowią źródło witamin i aminokwasów egzogennych [5].

W krajach azjatyckich algi zajmują wysoką pozycję w menu przeciętnego obywatela, głównie są to kraje takie jak np. Japonia, Korea czy Chiny [6]. Natomiast obecnie są wykorzystywane prawie na całym świecie. Do jadalnych zalicza się między innymi algi z rodzin: *Chlorophyceae* (zielenice), *Rhodophyceae* (krasnorosty) i *Phaeophyceae* (brunatnice), zwłaszcza z rodzaju *Caulerpa*, *Durvillea*, *Laminaria*, *Monostroma*, *Nereocystis*, *Oedogonium*, *Porphyra*, *Rhodomenia*, *Sargassum* i *Spirogyra* [7]. Mogą one stanowić podstawę dań lub tylko dodatek, na przykład w postaci sałatki. Największym producentem makroalg są Chiny. Roczna produkcja wynosi tam ok. 5 milionów ton [8]. Dominujące na rynku mikroalgi to *Chlorella* i *Spirulina* [9]. W restauracjach na całym świecie glony serwowane są pod takimi nazwami jak na przykład: „Nori”, „Mitsus”, „Kombu”, „Amanori”, „Sarumen”, „Laber” itd. [7].

Algi są bogatym źródłem węglowodanów, białek, enzymów i błonnika. Poza tym zawierają wiele witamin, takich jak witamina A, C, B1, B2, B6, B12, E. Minerale zawarte w algach (fosfor, żelazo, wapń, potas, sód czy magnez) pozwalają na utrzymanie zbalansowanej diety [6]. Algi zawierają ok 25-30% tłuszczu, 10-20% białek, 2-4% witamin i 0,2-0,5% soli mineralnych. Z powodzeniem mogą stanowić urozmaicenie tradycyjnego jedzenia. W dodatku mogą również stać się dla niego alternatywą. Wielu badaczy pokłada w algach nadzieję związaną ze zmniejszeniem głodu na świecie, szczególnie ze względu na utrzymujący się trend gwałtownego wzrostu liczby ludności na świecie [7].

Warto zwrócić uwagę na fakt, że algi stanowią źródło pigmentów, takich jak np.: beta-karoten, luteina, chlorofil, fikoerytryna, fikocyjanina, zeaksantyna [6], które są powszechnie dodawane do produktów spożywczych w celu nadania im odpowiedniego koloru. Oprócz pigmentów, w przemyśle spożywczym wykorzystuje się substancje zagęszczające, stabilizujące i żelujące, algi oferują tego typu substancje, na przykład powszechnie wykorzystywany w praktyce laboratoryjnej agar z krasnorostów posiada znacznie lepsze właściwości niż żelatyna [5].

O pozytywnych aspektach spożywania alg mogą przekonać się nie tylko ludzie, są one również dodawane jako substancje wzbogacające do pasz dla zwierząt. Wyciągi z mikroalg *Chlorella* i *Spirulina* są składnikami

uzupełniającymi, dodawanymi do pożywienia dla psów, kotów, rybek akwariowych, drobiu, koni, krów i wielu innych [10]. Stanowią one bogate źródło mikroelementów takich jak cynk, mangan, miedź, kobalt, molibden, jod, żelazo i selen. Dodatek substancji odżywczych pochodzących ze źródeł naturalnych zapewnia wyższą ich bioprzyswajalność [5].

2.2. Przemysł kosmetyczny i farmaceutyczny

Bogactwo pożądanых substancji organicznych syntetyzowanych przez algi stało się przedmiotem zainteresowania przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego. Algi są wykorzystywane do produkcji ekstraktów (znajdą zastosowanie w kremach, tonikach i szamponach) oraz maseczek dodawanych do maseczek i kąpeli wyszczuplających [11]. Kosmetyki zawierające dodatki z alg są przeznaczone głównie dla osób przebywających w suchych pomieszczeniach oraz żyjących w ciągłym stresie. Związki zawarte w tych glonach wykazują wysoką zdolność do przenikania poprzez naskórek aż do skóry właściwej dostarczając jej substancji odżywczych. Wspomaga to jej regenerację oraz przyczynia się do opóźniania procesów jej starzenia [12].

Oprócz bogactwa alg w dużą ilość składników odżywczych, działają one ochronnie na skórę, zapobiegając niekorzystnemu wpływowi czynników środowiska oraz utratą wilgoci. Głównie ze względu na posiadanie właściwości nawilżających, jednocześnie pozwalają na szybszą regenerację naskórka. Dodatkowo wpływają na tkankę tłuszczową i komórkową przemianę materii wspomagają proces likwidacji cellulitu i odchudzanie [5].

Glony, ze względu na zawartość ogromnej ilości składników odżywczych, dodawane są w formie sproszkowanej do wielu suplementów diety dostępnych w aptekach. Naturalne pochodzenie tych substancji nie tylko zwiększa korzystne właściwości danego produktu, ale wpływa również na jego atrakcyjność. W ostatnich latach ludzie coraz częściej rezygnują z syntetyzowanych chemicznie witamin czy innych związków wspomagających prawidłowe funkcjonowanie organizmu na rzecz substancji pochodzenia naturalnego. Wpływa to pozytywnie na popularność preparatów wyprodukowanych na bazie alg.

Wysokie właściwości antyoksydacyjne alg działają łagodząco na stres komórkowy wywołany wolnymi rodnikami, jednocześnie podnosząc atrakcyjność produktów na bazie tych organizmów. Produkcję antyoksydantów inicjują warunki środowiska w jakim przebywa organizm. Należą do nich: susza, wysokie zasolenie, wysoka lub niska temperatura, promieniowanie UV czy też obecność metali ciężkich. U człowieka reaktywne wolne rodniki wpływają negatywnie na stan zdrowia i wywołują szereg schorzeń, do których należą: choroby nowotworowe, choroba wieńcowa, miażdżyca, nadciśnienie, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimer'a i Parkinson'a oraz artretyzm [14]. Do antyoksydantów produkowanych przez algi zalicza się:

beta-katoren, wiolaksantyna, zeaksantyna, terpenoidy, polifenole, fikoerytryna, fikocyjanina, witamina C i A. Algi są stosowane również podczas leczenia schorzeń dermatologicznych egzemy, trądziku pospolitego, łagodzą objawy łuszczycy. Dodatkowo wpływają na łagodząco i hamująco na stany zapalne [5].

Algi stanowią źródło wielu potencjalnych nowych leków i substancji bioaktywnych. Szczegółowe badania nad algami morskimi w poszukiwaniu substancji biologiczne czynnych rozpoczęły się w 1950 roku. Pozwoliło to na odkrycie ogromnej ilości nowych związków chemicznych o różnych właściwościach farmakologicznych i różnej aktywności biologicznej. Substancje te są stosowane jako antybiotyki, związki chemiczne o właściwościach antywirusowych, cytotoksycznych, przeciwzapalnych, antynowotworowych [15].

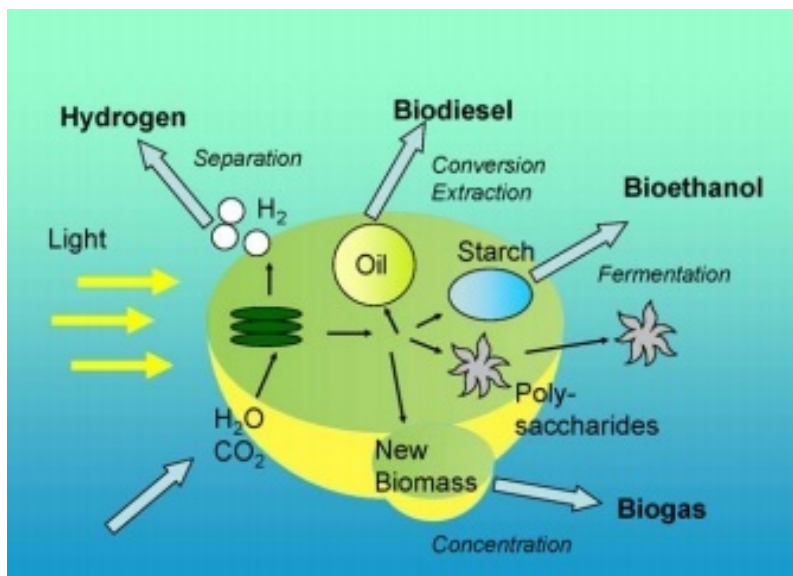
2.3. Rolnictwo

Rolnictwo ekologiczne nie dopuszcza stosowania chemicznych preparatów ochrony roślin i nawozów innych niż naturalne. Również w tej dziedzinie algi znalazły swoje zastosowanie. Dzięki dużej różnorodności i ilości pożądaných przez rolników substancji chemicznych coraz częściej są wykorzystywane na przykład do wzrostu plonowania roślin. Substancje odżywcze pochodzące z naturalnych źródeł (torf, węgiel brunatny, algi) lepiej nadają się do wzbogacania gleb niż sole nieorganiczne, głównie dlatego, że są łatwiej przyswajane przez rośliny. Do preparatów zawierających wyciąg z alg morskich zalicza się Kelpak, stosowany w uprawach winorośli, owoców cytrusowych, uprawach rolniczych i uprawach roślin ozdobnych. Kolejny to Bio – algeen S 90 Plus. Ten biopreparat wpływa na rozbudowę systemu korzeniowego oraz zwiększa odporność na stres i ataki patogenów. Popularne jest również stosowanie kompostu wzbogaconego różnymi gatunkami alg. Obecność specyficznej gamy substancji chemicznych zawartych w tych organizmach, takich jak: fitohormony, aminokwasy, kwasy tłuszczowe i mikroelementy wpływa korzystnie na wzrost i rozwój roślin. Stosowanie biopreparatów pozwala na poprawę właściwości fizycznych gleby, łatwiejsze pobieranie związków pokarmowych przez rośliny oraz wzrost pożądaną flory bakteryjnej gleby. Jednak najważniejszą cechą biopreparatów ze względu na środowisko naturalne i zdrowie człowieka jest ich całkowita biodegradowalność oraz brak szkodliwego i toksycznego działania na ludzi i zwierzęta [5].

2.4. Przemysł energetyczny

Pozyskiwanie energii z alternatywnych źródeł stało się już nie tylko modą, ale koniecznością. Nadmierna eksploatacja zasobów naturalnych, takich jak ropa naftowa, gaz ziemny czy też węgiel doprowadzi w niedalekiej przyszłości do całkowitego ich wyczerpania. Już dzisiaj sięga się po złoża, które jeszcze kilka lat temu wydawały się z ekonomicznego punktu widzenia nieopłacalne, jednak ciągły wzrost cen energii zachęcił inwestorów do sięgnięcia po nie. Kolejnym aspektem korzystania z konwencjonalnych źródeł energii jest emisja do atmosfery znacznych ilości gazów cieplarnianych. Algi wydają się stanowić wprost idealne źródło energii. Poprzez przeprowadzany przez nich proces fotosyntezy przekształcają dwutlenek węgla w biomasę. Przyczyniają się tym samym do zmniejszenia zagrożenia globalnego ocieplenia. Następnie powstałą biomasę można wykorzystać jako materiał do pozyskiwania energii. Kolejnym argumentem przemawiającym za szerokim wykorzystaniem alg jest fakt, iż nie konkurują one o powierzchnię do wzrostu z roślinami uprawnymi przeznaczonymi na konsumpcję.

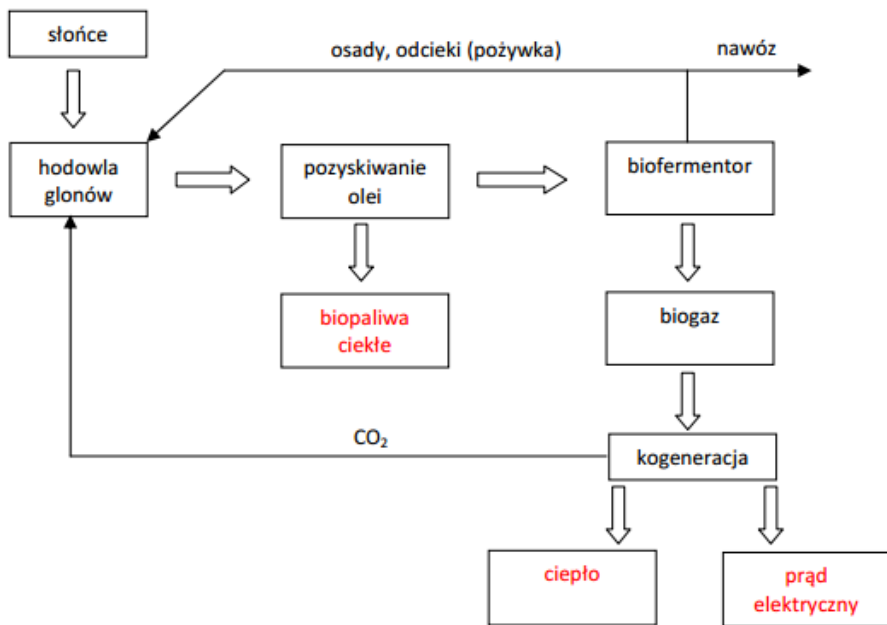
Biotechnologiczne aspekty wykorzystania głównie mikroalg, stały się w ostatnich czasach bardzo popularne. Pozwalają między innymi na produkcję przez algi biodiesla, bioetanolu, biowodoru czy też biometanu. Dodatkowo korzystnym czynnikiem wpływającym na jakość biopaliw jest wysoka zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a z ekonomicznego punktu widzenia korzystny jest szybki przyrost biomasy jaki wykazują te organizmy.



Rys. 2 Możliwości produkcji biopaliw przez algi [16]

W celu wytworzenia biopaliwa płynnego biomasę alg poddaje się procesom termochemicznym (to jest pirolizie, hydrogenacji, gazyfikacji) aby otrzymać na przykład biooleje oraz biochemicznym (fermentacja, transestryfikacja), które prowadzą do powstania biodiesla i bioetanolu [17].

W obecnych czasach biodiesel jest produkowany na bazie olejów pochodzących z roślin konsumpcyjnych, czyli soi, rzepaku, słonecznika i oleju palmowego [11]. Przeciętna zawartość oleju w algach wynosi ok. 30 %. Usytuowanie hodowli mikroalg w dobrze nasłonecznionym miejscu oraz odpowiednio zaprojektowanym technologicznie systemie może doprowadzić do uzyskania nawet 1500 kg/m³/dobę biomasy i wytworzenia ok. 120 m³/ha/rok oleju [3]. Po odzyskaniu z hodowli mikroalg olejów, pozostałą biomasę można wykorzystać dalej. Poddając ją fermentacji wytworzy się biogaz (biometan), który z kolei może być przekształcany w energię elektryczną czy ciepłą.



Rys. 3 Schemat układu technologicznego wykorzystania biomasy alg [3]

Produkcja biomasy alg uzależniona jest od odpowiedniej ilości dwutlenku węgla, wody, soli mineralnych i energii słonecznej. Pierwiastkami niezbędnymi do wzrostu alg są azot, fosfor i żelazo. Temperatura waha się w granicach 20-30°C. Zależy to od gatunku alg. Do hodowli tych mikroorganizmów stosuje się stawy otwarte lub fotobioreaktory.

2.5. Bioadsorpcja zanieczyszczeń

Algi, oprócz pobierania dużej ilości dwutlenku węgla, charakteryzują się pochłanianiem również tlenków azotu. Wydzielają natomiast czysty tlen. Badania prowadzone przez Amerykański Departament Energetyki prowadzone do końca lat 80 XX w. dowiodły przydatności ponad 300 gatunków alg do bioadsorpcji zanieczyszczeń gazowych z atmosfery [18]. Szczególnego znaczenia nabiera tu budowanie „farm alg” w okolicach zakładów emitujących znaczne ilości dwutlenku węgla do atmosfery.

Kolejnym ciekawym zastosowaniem alg jest zdolność do pobierania przez nie metali ciężkich ze ścieków przemysłowych oraz metali szlachetnych. Stwierdzono, że algi stanowią tani i szybko zwiększający biomasę adsorbent. Charakteryzujący się również dużą pojemnością biosorpcyjną dla metali ciężkich [4]. Na wydajność tego procesu ma wpływ budowa ściany komórkowej organizmu. Algi wykazują zróżnicowanie w tej kwestii. Ma to związek z występowaniem w ich ścianie komórkowej różnych makrocząsteczek (polisacharydów i związków z grupy lipidów i białek). Dlatego bardzo ważne jest odpowiednie dobranie gatunku alg do zanieczyszczenia, aby proces oczyszczania zachodził efektywnie. Jony metali są adsorbowane biernie poprzez oddziaływania fizykochemiczne z grupami funkcyjnymi występującymi na powierzchni ściany komórkowej (na przykład karboksylową, hydroksylową, aminową, siarczanową, fosforanową) [19]. Do najbardziej wydajnych biosorbentów należą algi zaliczane do brunatnic, głównie grupa *Sargassum*. Wynika to z dużej ilości wielocukrów występujących w ich ścianie komórkowej [20]. Algi mogą być również stosowane jako bioindykatory stopnia zanieczyszczenia wód związkami biogennymi. Do takich badań wykorzystywane są algi należące do rodziny *Chlorella* [21].

3. Podsumowanie

Algi już teraz zajmują wysoką pozycję w kręgu zainteresowań naukowców z całego świata. Poszukiwanie kolejnych zastosowań dla tych organizmów angażuje kolejne ośrodki naukowe. Inżynieria genetyczna pozwala na taką modyfikację alg, aby były one jeszcze bardziej wydajne w czasie wzrostu, produkcji biopaliw, czy też zawartości składników odżywczych.

Szczególną rolę glonów upatruje się w przemyśle energetycznym. Przeprowadzone badania pokazują znaczny potencjał alg w tej dziedzinie. Prowadzenie hodowli alg i pozyskiwanie z nich biopaliw oraz stosowanie ich jako źródła energii odnawialnej będzie stanowić milowy krok dla społeczeństwa. Chęć, a wręcz obowiązek ochrony środowiska generuje potrzebę poszukiwania alternatywnych źródeł energii, eliminując te negatywnie wpływające na ekosystem. Rosnąca świadomość ludzi i społeczeństwa w sprawach zdrowego odżywiania skłania do coraz częstszego sięgania

pobogate w związki odżywcze algi. Z roku na rok zwiększa się odsetek ludzi wprowadzających do swojego jadłospisu glony. Związki chemiczne pochodzące z alg są w pełni naturalne i dostępne w wielu produktach zarówno kosmetycznych jak i farmaceutycznych.

W artykule przedstawiono główne drogi zastosowania tych organizmów. Szerokie spektrum wykorzystania alg przez człowieka już teraz wydaje się potwierdzać atrakcyjność tych organizmów. Jednak w przyszłości dzięki badaniom prowadzonym przez naukowców zakres wykorzystania alg na pewno będzie jeszcze szerszy.

Literatura

1. G. E. Fogg, *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Univ of Wisconsin Press, 1987
2. C. B. Field, M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, and P. Falkowski, *Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components*. Science, vol. 281, pp. 237–240, 1998
3. M. Krzemieniewski, M. Dębowski, and M. Zieliński, *Glony jako alternatywa dla lądowych roślin energetycznych*, Czysta Energ., no. 9, 2009
4. M. Urbańska and G. Kłosowski, *Algi jako materiał biosorpcyjny – usuwanie i odzysk metali ciężkich ze ścieków przemysłowych*. Ochr. Środowiska Zasobów Nat., no. 51, pp. 62–77, 2012
5. *Algi i Alginiany Leczenie, Zdrowie, Uroda – eBook*. Scribd. [Online]. Available: <http://pl.scribd.com/doc/47003173/Algi-i-Alginiany-Leczenie-Zdrowie-Uroda-eBook>. [Accessed: 21-Aug-2013]
6. I. Priyadarshani and R. Biswajit, *Commercial and industrial applications of micro algae – A review*. J Algal Biomass Utln 2, vol. 3, no. 4, pp. 89–100, 2012
7. D. Ghosh, *Search for future viands*. Reson, vol. 9, no. 5, pp. 33–40, May 2004
8. D. J. McHugh, *A Guide to the Seaweed Industry*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003
9. O. Pulz and W. Gross, *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 65, no. 6, pp. 635–648, Nov. 2004
10. P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, *Commercial applications of microalgae*. J. Biosci. Bioeng., vol. 101, no. 2, pp. 87–96, Feb. 2006
11. M. Frąc, S. Jezierska-Tys, and J. Tys, *Algi – energia jutra (Biomasa, biodiesel) – artykuł przeglądowy*. Acta Agrophysica, vol. 13, no. 3, pp. 627–638, 2009.
12. <http://www.algi.hdwao.pl/>
13. *Chemia w żywności* http://www.powitaminy.pl/artykuly/chemia_w_zywnosci.php.
14. M. L. Cornish and D. J. Garbary, *Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition*. ALGAE, vol. 25, no. 4, pp. 155–171, Dec. 2010
15. M. Borowitzka, *Pharmaceuticals from algae.*, Biotechnology, Vol. VII, Pharmaceuticals from algae., Biotechnology, Vol. VII., vol. VII
16. C. Posten and G. Schaub, *Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-a process view*. J. Biotechnol., vol. 142, no. 1, pp. 64–69, Jun. 2009

17. T. Kenichiro and S. Shigeki, *Liquid Fuel Production Using Microalgae*. J Jpn Pet Inst, vol. 48, no. 5, pp. 251–259, 2005
18. P. Olszowiec, *Usuwanie zanieczyszczenia i wytwarzają paliwo. Glony w energetyce*. Gigawat Energ., no. 01, 2005
19. T. A. Davis, B. Volesky, and A. Mucci, *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*. Water Res., vol. 37, no. 18, pp. 4311–4330, Nov. 2003.
20. K. Vijayaraghavan and D. Prabu, *Potential of Sargassumwightii biomass for copper(II) removal from aqueous solutions: application of different mathematical models to batch and continuous biosorption data*. J. Hazard. Mater., vol. 137, no. 1, pp. 558–564, Sep. 2006
21. W. Kozieł and T. Włodarczyk, *Glony – produkcja biomasy*. Acta Agrophysica, vol. 17, no. 1, pp. 105–116, 2011

Pracę recenzował: dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, prof. UMCS, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Obecne i przyszłe perspektywy wykorzystania alg

Streszczenie

Algi są obiecującym źródłem wielu chemicznych związków o potencjalnym zastosowaniu w wielu gałęziach przemysłu. Różnorodność tej grupy organizmów pozwala na możliwość odpowiedniego doboru organizmu, a następnie opracowanie przystosowanej do konkretnych potrzeb metody ich wykorzystania. Obecnie zostały już wstępnie opracowane technologie wykorzystywane lub gotowe do wdrożenia w wielu gałęziach życia. Produkty na bazie alg są z powodzeniem wykorzystywane w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, a także posiadają mocno ugruntowaną pozycję jako niezbędne narzędzie powszechnie używane w badaniach naukowych. Dodatkowo potencjalnie mogą zostać użyte w przemyśle petrochemicznym, energetycznym, a także w rolnictwie i ochronie środowiska, co jest obiektem intensywnych badań naukowych.

Słowa kluczowe : algi, glony morskie, potencjał przemysłowy

Current and future perspectives of algae application

Abstract

Algae are a promising source of many chemical compounds with potential application in various branches of industry. The diversity of this group of organisms enables a suitable choice of organism and then formulation of application method, well-adjusted to the specific requirements. Currently, the technologies, ready to use in many aspects of life, have been tentatively developed. The products containing the algae are already successfully used in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Moreover, algae hold the strong position as a commonly used tool in scientific research. Additionally, they have a potential to be applied in petrochemical, energy, agricultural and environmental industries. Therefore, they are the target of intensive scientific research.

Keywords: algae, seaweeds, industry potential

Katarzyna Michalczuk¹, Ilona Mikiciuk², Aleksandra Ciołkowska³

Ocena stanu wiedzy konsumentów na temat flawonoidów oraz ich wpływu na zdrowie człowieka

Wstęp

Polifenole stanowią szeroko rozpowszechnioną w świecie roślin grupę związków chemicznych. Jednak największe zainteresowanie wzbudzają należące do nich flawonoidy. Liczne badania przeprowadzane *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że mogą działać one przeciwutleniająco, przeciwzapalnie, antynowotworowo, przeciwmiażdżycowo, moczopędnie i wiele innych [1].

Flawonoidy charakteryzują się dużą różnorodnością pod względem właściwości i struktury.

Albert Szent-Gyorgyi, podczas badań prowadzonych na owocach cytrusowych, odkrył bioflawonoidy. Stwierdził on pozytywny wpływ tych związków na ściany naczyń krwionośnych człowieka, co skutkowało ich mniejszą przepuszczalnością. I właśnie od „przepuszczalności” (ang. *permeability*) nazwał je witaminą P [2]. W rzeczywistości wyodrębniona przez Szent-Gyorgyi’a substancja jest mieszaniną różnych flawonoidów, których obecnie rozpoznano ponad 7000 [3].

1. Flawonoidy

Flawonoidy, inaczej zwane bioflawonoidami lub też flawonami, stanowią rozległą grupę wtórnych metabolitów roślinnych. Gromadzone głównie w powierzchniowych warstwach tkanek chronią swoją intensywną barwą przed negatywnymi skutkami oddziaływania promieniowania ultrafioletowego [2]. Chronią rośliny przed grzybami i owadami. Ponadto mogą pełnić funkcję hormonów roślinnych, regulatorów wzrostu i inhibitorów licznych reakcji enzymatycznych [1]. Znacząco wpływają na smak i barwę warzyw, owoców oraz wytwarzanych z nich produktów [3].

¹michalczuk7@gmail.com, SKN Technologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

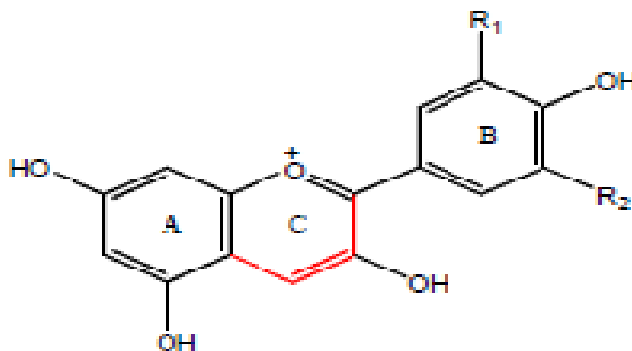
²ilona.mikiciuk09@gmail.com, SKN Technologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

³ceola@op.pl, SKN Technologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

1.1. Budowa chemiczna i podział flawonoidów

Na budowę flawonoidów składają się dwa pierścienie fenolowe (A i B) połączone trójwęglowym mostkiem. Mostek z reguły zamykany jest przez atom tlenu tworząc trzeci pierścień (C) (Rys. 1) [4]. Różnice między poszczególnymi flawonoidami leżą w podstawnikach w pierścieniach. Podstawniki mogą powstawać w wyniku: hydroksylacji (galusan epikatechiny), metylacji (grupy metoksy najczęściej występują w pierścieniu B), acylacji i glikozydacji za pomocą mono- lub oligosacharydów (np. glukozy, ramnozy, ksylozy, arabinozy) w różnych pozycjach pierścieni [5].

Biorąc pod uwagę budowę chemiczną flawonoidy możemy podzielić na flawonole, flawony, flawanony, flawanonole, izoflawony, katechiny, antocyjanidyny [2].



Rys. 1 Podstawowa struktura cyjanidyny, która w liściach kapusty czerwonej zawiera różne podstawniki [6]

1.1.1. Flawonole

Flawonole, ze względu na możliwość syntezy tylko z udziałem światła, gromadzone są w powierzchniowych warstwach tkanek liści i skórki owoców. Są one reprezentowane głównie przez pochodne glikozydowe kwercetyny, np. 3-O-ramnoglikozyd kwercetyny, znany powszechniej jako rutyna, oraz kempferol. Szczególnie bogate we flawonole są: cebula, żurawina, szczypior, owoce jagodowe, jarmuż, papryka, skórka jabłek, brokuły, liście *Ginko biloba*, herbata, kapusta włoska [5, 7, 8, 9, 10].

1.1.2. Flawony

Flawony spotykane są głównie w postaci glikozydów luteoliny i apigeniny. Występują m.in. w pietruszce, prosie, selerze, pszenicy, dzikiej róży, bzie, mięcie, tymianku i podbiale [9, 11].

1.1.3. Flawanony

Flawanony są to związki, które zawierają w swojej budowie grupy ketonowe. Wśród flawanonów możemy wyróżnić:

- hesperydyna – glikozyd flawanony zwanego hespertyną. Spotykany m.in. w liściach mięty pieprzowej, owocach pomarańczy gorzkiej. Wspomaga działanie witaminy C a także poprawia elastyczność i zmniejsza przepuszczalność śródnabłonka naczyń krwionośnych.
- naringenina – jest to aglikon naringiny. Znajduje się w soku grejpfruta a także w dojrzałych nasionach brzoskwiń. Skutecznie obniża poziom cholesterolu, wzmacnia ściany naczyń krwionośnych oraz działa przeciwzapalnie [2, 11].

1.1.4. Izoflawony

Izoflawony występują głównie w roślinach strączkowych, a przede wszystkim w soi i wytworzonych z niej produktach. Najczęściej występujące izoflawony to: daidzeina, genisteina, formononetyna oraz biochanina A. Związki te są uznawane za fitoestrogeny, ponieważ wykazują słabą aktywność estrogenową [1].

1.1.5. Katechiny

Katechiny są monomeryczną formą flawanoli. Znajdują się w morelach i owocach pigwowca (epikatechina) a także w niektórych odmianach jabłek, orzechach, kakao oraz winogronach. W liściach zielonej herbaty można wyróżnić epikatechinę, epigallokatechinę, galusan epikatechiny i galusan epigallokatechiny [12, 3, 11].

1.1.6. Antocyjanidyny

Są to bezcukrowe odpowiedniki antocyjanów. Powstają w skutek kwasowej hydrolizy antocyjanów. Najpowszechniej występującymi są: cyjanidyna (aronia, wiśnie, czerwona kapusta, żurawina, kwiaty bławatka), delfinidyna (winogrona, czarne jagody, czarny bez), malwidyna (liście malwy, winogrona), pelargonidyna (pelargonie, truskawka), peonidyna i petunidyna (bez czarna, peonia, petunia) [11].

1.2. Wpływ flawonoidów na organizm człowieka

Flawonoidy wykazują wysoką aktywność biologiczną. Ich główne pozytywne działanie na organizm człowieka wynika z właściwości antyoksydacyjnych: wychwytywanie/wymiatanie wolnych rodników i ich reaktywnych form (RFT), ograniczenia ich wytwarzania w komórkach, oraz pośrednio chelatowanie jonów metali przejściowych i ochrona niskocząsteczkowych antyoksydantów przed utlenieniem. Ponadto flawonoidy znacznie przyczyniają się do zwiększenia stabilności błon biologicznych a poprzez hamowanie aktywności 5-lipooksygenazy i cyklooksygenazy wykazują również działanie przeciwzapalne oraz przeciwalergiczne. Liczne badania wykazały, że flawonoidy posiadają działanie antykancerogenne poprzez obniżanie aktywności mutagennej a także zmniejszają częstość występowania nowotworów. Zaobserwowano również, że flawonoidy pozytywnie oddziałują na układ odpornościowy poprzez hamowanie proliferacji limfocytów, hamowanie syntezy Ig klasy E, G, M, A oraz uwalnianiu cytokin. Ponadto spożywanie flawonoidów znacznie obniża ryzyko wystąpienia chorób naczyniowo-sercowych [1].

2. Wolne rodniki

Wolny rodnik to atom (lub cząsteczka), która jest zdolna do samodzielnego istnienia, posiadająca jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Niesparowany elektron powoduje przyciąganie rodników poprzez pole magnetyczne. Charakteryzują je nie tylko właściwości paramagnetyczne, ale również duża reaktywność, która jest skutkiem dążenia do pozbycia się dodatkowego elektronu lub przyłączenia kolejnego od innej cząsteczki [13]. Właściwości antyoksydacyjne flawonoidów mają szczególne znaczenie w wychwytywaniu wolnych rodników i reaktywnych form tlenowych (RFT). Bezpośrednie działanie antyutleniające polega na redukowaniu reaktywności tlenu do stabilniejszych, niereaktywnych form. Działanie pośrednie natomiast skutkuje hamowaniem wytwarzania RFT. Wynika to ze zdolności hamowania aktywności enzymatycznej powodujących powstawanie wolnych rodników, np. oksydazy ksantanowej, oraz zdolności wiązania w komórkach jonów metali przejściowych (w szczególności jonów żelaza i miedzi), które zapoczątkowują łańcuchy reakcji wolnorodnikowych [14].

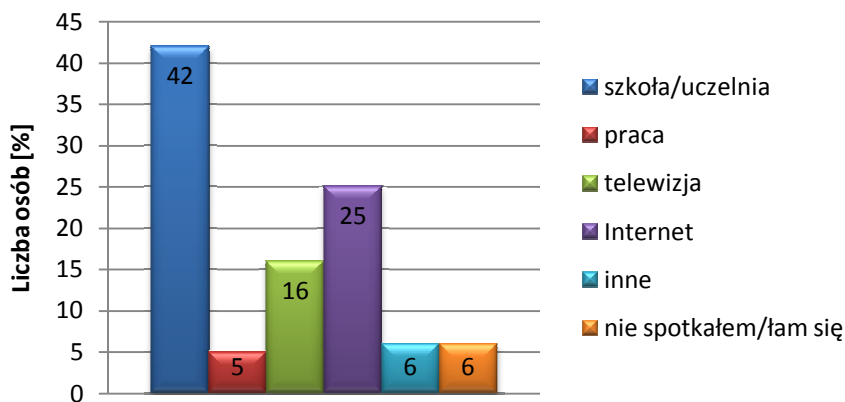
3. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wiedzy konsumentów na temat flawonoidów, oraz zwrócenie uwagi na ich rolę w codziennej diecie. Ankieta miała także za zadanie uświadomić respondentów o korzyściach zdrowotnych płynących ze spożywania produktów zawierających flawonoidy.

4. Analiza badań własnych

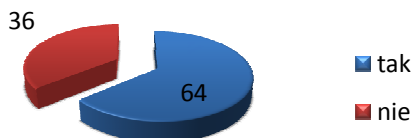
Wiosną 2013 roku przeprowadzone zostały ankiety w grupie 100 osób. Ankietowane osoby były w wieku 20 do 30 lat, przy czym najliczniejszą grupę 71% stanowiły osoby od 20 do 25 lat. W badaniu wzięło udział 58 kobiet i 42 mężczyzn. 61% respondentów stanowili mieszkańcy miast. Ponad połowa respondentów – 56% miała wykształcenie wyższe. Następna, co do ilości osób grupą, były osoby o wykształceniu średnim 34%. Kolejnymi grupami były grupy o wykształceniu zawodowym i podstawowym – po niecałe 5%. Ankietowanym zadano 16 pytań dotyczących znajomości flawonoidów i ich działania.

Na pytanie: „Czy spotkał/a się Pan/Pani z pojęciami flawonoidy, polifenole lub przeciwutleniacze? Jeśli tak – gdzie?” znaczna część osób, bo aż 94% odpowiedziała twierdząco. Głównym miejscem, w którym spotkano się z pojęciami wymienionymi w pytaniach była szkoła lub uczelnia 42%, następnie Internet 25%, telewizja 16%, praca 5% oraz pozostałe 6% (Rys. 2).



Rys. 2 „Czy spotkał/a się Pan/Pani z pojęciami flawonoidy, polifenole lub przeciwutleniacze ? Jeśli tak – gdzie ?” [opracowanie własne]

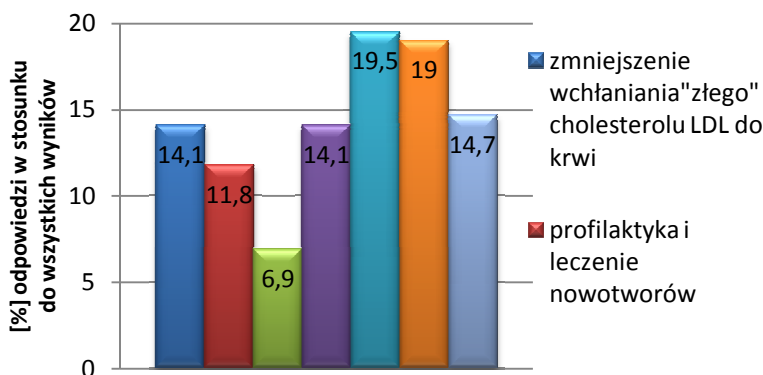
Po udzieleniu odpowiedzi negatywnej na powyższe pytanie respondenci przerywali ankietę, pozostałą część wypełniały osoby, które słyszały o flawonoidach. Ponad połowa osób, którym znane było pojęcie flawonoidów (64%) wiedziała, że mają one wpływ na organizm człowieka (Rys. 3).



Rys. 3 „Czy znany jest Panu/Pani wpływ flawonoidów na organizm człowieka ?” [%] [opracowanie własne]

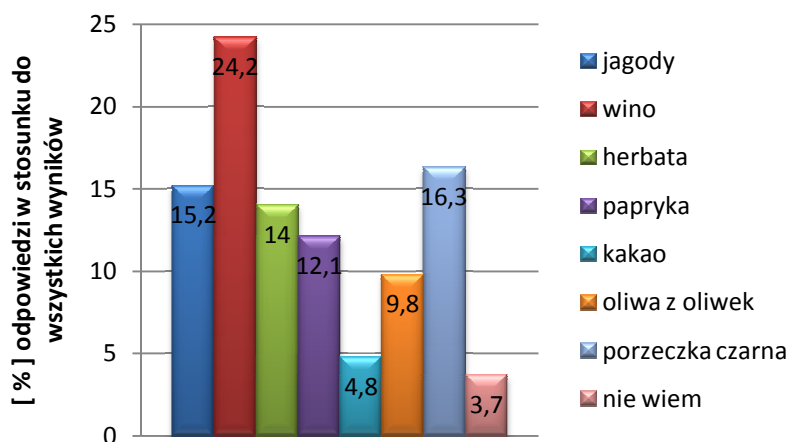
Podobna ilość osób, mianowicie 62% uznało, że wzbogacanie diety we flawonoidy jest ważne dla zdrowia. 59% ankietowanych uważa, iż spożywanie produktów, w których zawarte są przeciwutleniacze może pomóc w prewencji lub leczeniu chorób.

Na pytanie „Jakie są korzyści ze spożywania produktów zawierających flawonoidy?”, poddane badaniu osoby mogły wybrać kilka spośród 7 przedstawionych propozycji. Największą liczbą odpowiedzi cechowały się „ochrona przed działaniem wolnych rodników” oraz „spowolnienie procesów starzenia”. Pierwsza odpowiedź stanowiła 19,5% wszystkich odpowiedzi, druga 19%. Różnice pomiędzy kolejnymi wybranymi przez badanych odpowiedziami były niewielkie. 14,7% wybrało „uszczelnianie i wzmacnianie naczyń krwionośnych”, 14,1% „zmniejszenie wchłaniania „złego” cholesterolu LDL do krwi”, taki sam wynik uzyskała odpowiedź: „profilaktyka i leczenie choroby niedokrwiennej serca”. „Profilaktyka i leczenie nowotworów” stanowiła 11,8%. Najrzadziej wybieraną odpowiedzią była „profilaktyka i leczenie udarów mózgu” – 6,9% (Rys. 4).



Rys. 4 „Jakie są korzyści ze spożywania produktów zawierających flawonoidy ?” [opracowanie własne]

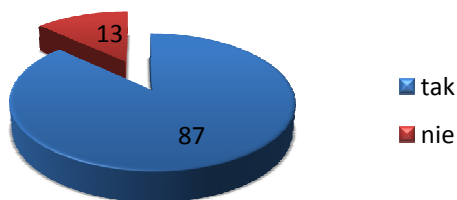
Ankietowani zostali poproszeni o wybranie kilku z podanych produktów, które ich zdaniem są źródłem flawonoidów. Najczęściej wybierane było wino –24,2% wszystkich odpowiedzi. Następnie czarna porzeczka 16,3%, niewiele mniej razy wybrane zostały jagody, które uzyskały 15,2% odpowiedzi. Następnie herbata 14%, papryka 12,1% oraz oliwa z oliwek 9,8%. Produktem, który został wybrany najmniej razy okazało się kakao 4,8% w stosunku do wszystkich odpowiedzi. Bardzo mała grupa ankietowanych 3,7% nie znała odpowiedzi na pytanie (Rys. 5).



Rys. 5 „Proszę zaznaczyć produkty które wg Pana/Pani są źródłem flawonoidów” [opracowanie własne]

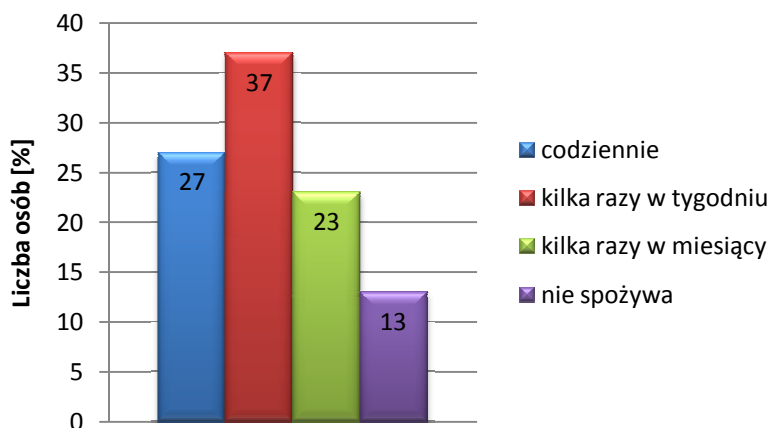
Na pytanie „Czy wie Pan/Pani o wysokiej zawartości flawonoidów w czerwonym winie?” większość respondentów (78%) odpowiedziała twierdząco. Duża liczba badanych osób (93%) uznała, iż umiarkowane picie czerwonego wina może wpływać ochronnie na serce i układ krwionośny.

Ankietowani zostali spytani o to, czy spożywają produkty zawierające flawonoidy oraz o częstotliwość spożywania tych produktów. Znaczna część ankietowanych, mianowicie 87% odpowiedziała, że sięga po żywność zawierającą flawonoidy. Pozostała część 13% stwierdziła, iż nie spożywa tego typu artykułów spożywczych (Rys. 6).



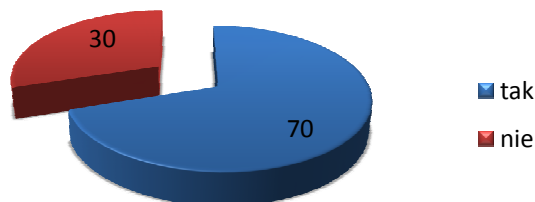
Rys. 6 „Czy spożywa Pan/Pani produkty zawierające flawonoidy ?” [%] [opracowanie własne]

27% osób biorących udział w ankiecie spożywa produkty zawierające przeciwutleniacze codziennie. Najwięcej 37% osób robi to kilka razy w tygodniu, oraz 23% kilka razy w miesiącu. Pozostała grupa osób jak w poprzednim pytaniu nie spożywa produktów zawierających flawonoidy (Rys. 7).



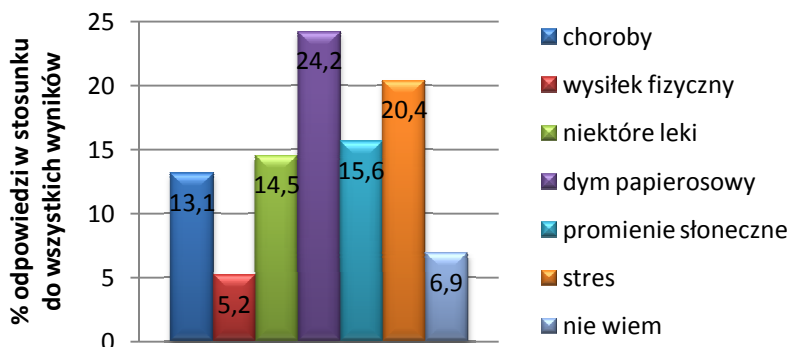
Rys. 7 „Jak często spożywa Pan/Pani produkty zawierające flawonoidy ?” [opracowanie własne]

W następnej kolejności ankietowani udzielali odpowiedzi na pytania dotyczące wolnych rodników. Na pytanie „Czy słyszał/a Pan/Pani o wolnych rodnikach?” 87% odpowiedziało pozytywnie, pozostali 13% nie znali tego pojęcia. Przy czym 30% stwierdziło, że nie zna sposobu ich działania. 70% знаło ich wpływ na organizm (Rys. 8).



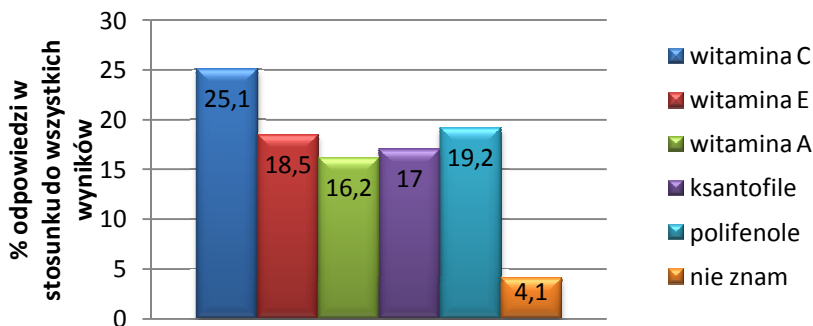
Rys. 8 „Czy znane jest Panu/Pani działanie wolnych rodników ?” [%] [opracowanie własne]

Do pytania: „Co według Pana/Pani powoduje powstawanie wolnych rodników” przyporządkowane było 7 propozycji, z których respondenci mogli wybrać kilka odpowiedzi. Według badanych największy wpływ na powstawanie wolnych rodników ma dym papierosowy 24,2%. Kolejnym czynnikiem był stres –20,4%. 15,6% uzyskały promienie słoneczne, następnie 14,5% niektóre leki i 13,1 % choroby. Wysilek fizyczny został oznaczony najmniejszą ilość razy –5,2%. 6,9% ankietowanych nie znało odpowiedzi na pytanie (Rys. 9).



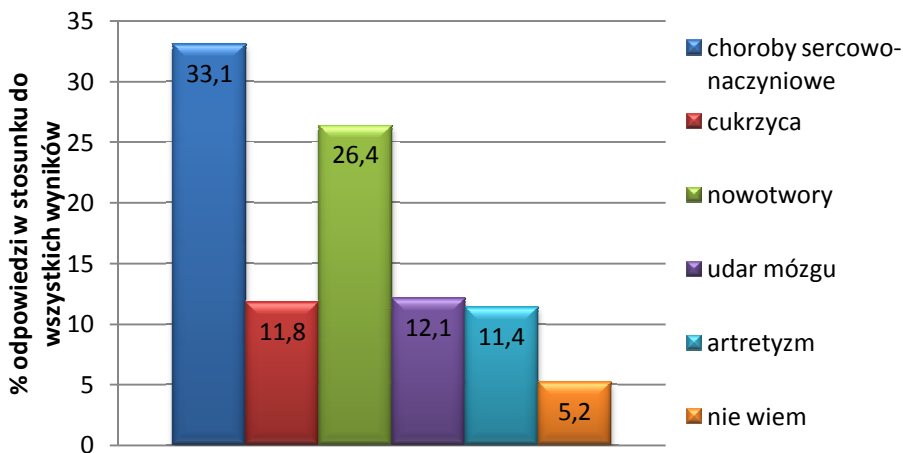
Rys. 9 „Co według Pana/Pani powoduje powstawanie wolnych rodników” [opracowanie własne]

Z przeprowadzonych badań wynika, że 29% ankietowanych nie wiedziało o antyutleniającym działaniu witaminy C. Poproszono również o zaznaczenie antyutleniaczy egzogennych o znanym respondentom działaniu. Witamina C uzyskała najwięcej odpowiedzi 24,5%, następne w kolejności wybierane były polifenole 19,2%, witamina E 18,5% i ksantofile (likopen, luteina, alfa i beta karoten) 17%. Na ostatnim miejscu znalazła się witamina A z wynikiem 16,2%. 4,2% odpowiadających nie wiedziało o działaniu wyżej wymienionych antyutleniaczy (Rys. 10).



Rys. 10 „Do antyutleniaczy egzogennych, których działanie jest Panu/Pani znane należą:” [opracowanie własne]

Ostatnie pytanie dotyczyło powikłań zdrowotnych, jakie mogą wystąpić w przypadku niedoboru antyutleniaczy w diecie. W pytaniu występowała możliwość zaznaczenia kilku odpowiedzi. Najczęściej wybieraną odpowiedzią były choroby sercowo-naczyniowe 33,1%. 26,4% w stosunku do pozostałych propozycji stanowiły nowotwory. Jako kolejne zagrożenie ankietowani wyznaczyli udar mózgu, cukrzycę i artretyzm. Miały one bardzo zbliżone wartości, w granicach 12%. Osób, które nie znały odpowiedzi na pytanie było 5,2% (Rys. 11).



Rys. 11 „Powikłania zdrowotne, które Pana/Pani zdaniem mogą pojawić się na skutek niedoborów antyutleniaczy w diecie to:” [opracowanie własne]

5. Podsumowanie

Z przeprowadzonych badań wynika, że konsumenci posiadają znaczną wiedzę na temat flawonoidów. Mimo to jest jeszcze wiele osób, które nie znają ich działania, oraz nie wiedzą o ich wpływie na organizm człowieka. Wiąże się z tym fakt, że ponad 40% ankietowanych uważa, iż wzbogacanie codziennej diety w produkty, w których składzie znajdują się antyutleniacze nie jest ważne.

Respondenci poproszeni o zaznaczenie działania flawonoidów najczęściej wybierali ochronę przed wolnymi rodnikami oraz spowolnienie procesów starzenia. Są to właściwości, o których najczęściej mówią masowe środki przekazu. Produkty zawierające flawonoidy są spożywane najczęściej kilka razy w tygodniu. Ilości te mogą nie skutkować oczekiwanymi efektami. Choroby sercowo-naczyniowe oraz nowotwory były najczęściej wybierane jako powikłania zdrowotne wynikające z braku przeciwutleniaczy w diecie.

Ponad połowa badanych osób zna działanie wolnych rodników. Najczęściej jako przyczyny ich powstawania oznaczane były dym papierosowy, a także stres.

Literatura

1. Majewska M., Czeczot H., *Flawonoidy w profilaktyce i terapii*, Terapia i leki. Farm Pol, 2009, 65 (5); 369-377
2. Stołowska M., Kłobus G.: *Charakterystyka flawonoidów i ich rola w kosmetyce i terapii*, „Postępy kosmetycznej”, 2010. 1/1, 8-12
3. Ross J.A., Kasum C.M., *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*, Annual Review of Nutrition, 2002, 22, 19-34
4. Krasowska A., Łukaszewicz M. *Czy warto jeść kolorową żywność?* AURA, 2003, 2, 20-21
5. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13 (10); 572-584
6. Kobus J., Flaczyk E., Siger A., Nogala-Kałucka M., Korczak J., Pegg R.B., *Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of Ginkgo leaves*, European Journal of Lipid Science and Technology, 2009, 111; 1140-1150
7. Aherne S.A., O'Brien N.M., *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*, Nutrition, 2002, 18; 75-81
8. Jeszka M., *Badanie zmian zawartości związków polifenolowych w brokułach podczas przechowywania*, Młodzi towaroznawcy, Poznań, 2006, 25-28
9. Jeszka M., Flaczyk E., *HPLC analysis – determination of flavonols in Morus alba leaves*, International Scientific Conference of PhD Students, 2008, 118-120
10. King A., Young G., *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals*, Journal of the American Dietetic Association, 1999, 99, (2); 213-218

11. Wilska-Jeszka J., *Polifenole, glukozyzyny i inne związki prozdrowotne i antyżywnościowe*. Chemia żywności. T. I. Składniki żywności. Red. Z.E. Sikorski. WN-T, Warszawa, 2007, 206-226
12. Gramza A., Korczak J., *Tea constituents (Camellia sinensis L.) as antioxidants in lipid systems*. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16, (8); 351-358
13. Bartosz G. *Druga twarz tlenu*. 2004 PWN, Warszawa
14. Shahidi F., Naczk M., *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC Press, 2004, Boca Raton

Pracę recenzował: dr hab. inż. Waldemar Gustaw, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena stanu wiedzy konsumentów na temat flawonoidów oraz ich wpływu na zdrowie człowieka

Streszczenie

Flawonoidy należą do polifenoli, które są syntetyzowane przez rośliny. Ich obecność wykryto w wielu warzywach i owocach. Znacząco wpływają na smak i barwę warzyw, owoców oraz wytwarzanych z nich produktów. Flawonoidy posiadają wiele kierunków oddziaływania biologicznego. W zależności od struktury chemicznej i grup zawartych w ich cząsteczkach wykazują różnorodny wpływ na organizm człowieka. Liczne badania udowodniły ich działanie antyoksydacyjne, czyli zapobiegające powstawaniu wolnych rodników. Flawonoidy mogą niwelować negatywny wpływ reaktywnych form tlenu. Ponadto uszczelniają i wzmacniają naczynia krwionośne, przez co korzystnie wpływają na krążenie w mięśniu sercowym oraz działają antyagregacyjnie na płytki krwi. Stwierdzono również, że flawonoidy mogą być wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu nowotworów.

W ostatnich latach świadomość konsumentów na temat pozytywnego wpływu żywności i jej składników, w tym także flawonoidów, znacząco wzrosła. Celem pracy było zbadanie stanu wiedzy osób w wieku 20-30 lat na temat flawonoidów oraz ich wpływu na zdrowie człowieka. Badanie zostało przeprowadzone w 2013 roku na grupie 100 osób.

Słowa kluczowe: flawonoidy, polifenole, wolne rodniki

Assessment of consumer knowledge about flavonoids and their effect on human health

Abstract

Flavonoids belong to the class of polyphenols which are synthesized by plants. Flavonoids have been found in many vegetables and fruit. They significantly influence the taste and colour of vegetables, fruit and the derived products. Flavonoids exert multiple biological effect on human body. The actual effect depends on chemical structure and groups contained in molecules. Many studies showed the antioxidant effect of flavonoids. Polyphenols can prevent formation of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, they decrease the permeability of blood vessels and strengthen vascular wall, showing positive impact on coronary circulation and antiplatelet effect. Flavonoids can also be used in cancer prevention and treatment.

Currently, consumer awareness of the positive impact of food and nutrients, including flavonoids, has increased significantly. The purpose of our research was to evaluate knowledge of people aged 20-30 on flavonoids and their influence on human health. The survey was conducted in a group of 100 volunteers in 2013.

Key words: flavonoids, polyphenols, reactive oxygen species

Oznaczanie azotanów (III) w produktach mięsnych

Wstęp

Głównym źródłem związków azotowych w diecie człowieka nie są wyroby z peklowanego mięsa czy woda pitna, lecz warzywa i ich przetwory dostarczające ponad 80 % azotanów. Obecność azotanów w żywności jest wynikiem stosowania nawozów mineralnych, odprowadzania ścieków do wód powierzchniowych i gleby oraz świadomego wykorzystania w przetwórstwie mięsa i serowarstwie. Maksymalne dzienne spożycie azotanów (V) przez człowieka nie powinno przekraczać 5 mg/kg masy ciała zaś azotanów (III) 0,2 mg/kg [1, 2].

Od zarania dziejów człowiek borykał się z problemem psucia się żywności i potrzebą jej konserwacji, a w szczególności mięsa. Zapobieganie psuciu się było bardzo istotnym elementem życia, bowiem zapewniało stały dostęp do jedzenia, nawet w okresie zimowym, czy okresach w których dostęp do żywności był utrudniony. Nasi przodkowie zapoznali się z takimi metodami konserwacji jak suszenie, solenie i zakopywanie w okresie zimy. W obecnych czasach znamy wiele sposobów zapobiegających rozkładowi pokarmów. Rozwój tych metod doprowadził z kolei do zjawiska zwiększonej nadprodukcji żywności, którą to należy zabezpieczać przed zepsuciem. Do obecnie stosowanych metod konserwacji zalicza się między innymi: liofilizację, obróbkę cieplną, suszenie, cukrzenie, pasteryzację, wędzenie, sterylizację radiacyjną oraz peklowanie, które jest najczęściej stosowaną metodą konserwacji produktów mięsnych. Peklowanie opiera się na działaniu solanki lub mieszaniny peklującej, czego skutkiem jest zachowanie barwy i wzmocnienie smaku oraz aromatu, a także hamowanie rozwoju niepożądanych mikroorganizmów.

Mieszanina peklująca składa się z chlorku sodu (NaCl) oraz saletry (KNO_3 , NaNO_3), azotanu (III) sodu (NaNO_2), cukru oraz wody (jako rozpuszczalnika dla mieszaniny peklującej).

¹sylwiak1313@wp.pl, SKN Kalcyt, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Chemii ul. Świętokrzyska 15G, 25-406 Kielce

²elzbieta@wp.pl, SKN Kalcyt, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Chemii ul. Świętokrzyska 15G, 25-406 Kielce

³barbara901204@o2.pl, SKN Kalcyt, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Chemii ul. Świętokrzyska 15G, 25-406 Kielce

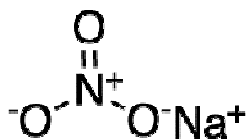
1. Metody peklowania mięsa

Metody peklowania możemy podzielić na dwa rodzaje: peklowanie suche oraz mokre. Pierwsza z nich polega na nacieraniu suchą mieszanką peklującą kawałków mięsa. Czas tego peklowania trwa od 48 do 72 godzin. W trakcie trwania całego procesu, mieszanka ulega rozpuszczeniu w wydzielającym się soku i dzięki temu przenika do wnętrza mięsa.

Peklowanie „na mokro” dzieli się na dwie odmiany: zalewowe i nastrzykowe. Przy peklowaniu zalewowym mięso umieszcza się w odpowiednio dużych zbiornikach, następnie zalewa się mieszaniną peklującą. W peklowaniu nastrzykowym rozróżnia się dwa rodzaje nastrzyków mieszanki peklującej: domięśniowe i dotętnicze.

1.1. Składniki mieszaniny peklującej

Azotan (V) sodu NaNO_3 , nazwa systematyczna trioksoazotan (V) sodu, nazwa handlowa: saletra sodowa, saletra chilijska (Rys. 1).



Rys. 1 Wzór strukturalny i kryształy azotanu (V) sodu [4]

Występuje w postaci bezbarwnych kryształów. Dobrze rozpuszcza się w wodzie. Otrzymuje się go w reakcji wodorotlenku lub węglanu sodu z kwasem azotowym lub przez pochłanianie tlenków azotu w roztworze wodorotlenku sodu [3].

Azotan (V) potasu KNO_3 , nazwa systematyczna: trioksoazotan (V) potasu, nazwa handlowa: saletra potasowa. Występuje w postaci bezbarwnych kryształów, które rozpuszczają się w wodzie. W przyrodzie występuje jako minerał – saletra indyjska. Jest otrzymywany w reakcji azotanu (V) sodu i chlorku potasu w reakcji podwójnej wymiany, oraz jako produkt uboczny przy wytwarzaniu kwasu azotowego [3].

Azotan (III) sodu NaNO_2 , nazwa systematyczna dioksoazotan (III) sodu, dawniej azotyn sodu. Występuje w postaci bezbarwnych higroskopijnych kryształów, dobrze rozpuszczalnych w wodzie.



Rys. 2 Przykładowe opakowanie mieszanki peklującej [5]

Na etykietach produktów, składniki mieszaniny peklującej (Rys. 2) znajdziemy je pod następującymi skrótami: E249, E250, E251 oraz E252 [6].

Tabela 1. Zestawienie informacji o dodatkach spożywczych będących składnikami mieszaniny peklującej

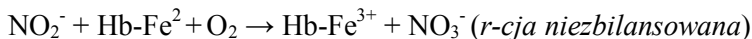
EXXX	Grupa	Funkcja	Szkodliwość
E249	Konserwant	Utrwalająca kolor, konserwująca	Należy unikać
E250	Konserwant	Konserwująca	Należy unikać
E251	Konserwant	Konserwująca	Należy unikać
E252	Konserwant	Konserwująca	Należy unikać

Źródło: Dz.U. 2010 nr 232 poz. 1525; Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 roku [6], Statham B. [7]

1.2. Mechanizmy działania azotanów (III)

Najnowsze badania dotyczące mechanizmu działania azotanów (III) w przetworach mięsnych zostały opracowane przez Honkiela [8]. Przetwory mięsne charakteryzuje niska wartość pH. Przy małych wartościach pH z azotanów (III) powstaje kwas w niewielkich ilościach azotowy, będący źródłem tlenu azotu (II) (NO), dzięki któremu zostaje zachowana różowoczerwona barwa mięsa (Rys. 3). Tlenek azotu (II) w mięsie ulega szczególnej reakcji z żelazem pochodzącym z mioglobiny i hemoglobiny, obecnych w komórkach mięśniowych. W reakcji tej powstaje tzw. „NO-mioglobina”

oraz NO-miochromochromogenu”, które są bezpośrednimi związkami powodującymi powstanie tzw. „czerwieni peklowniczej”.



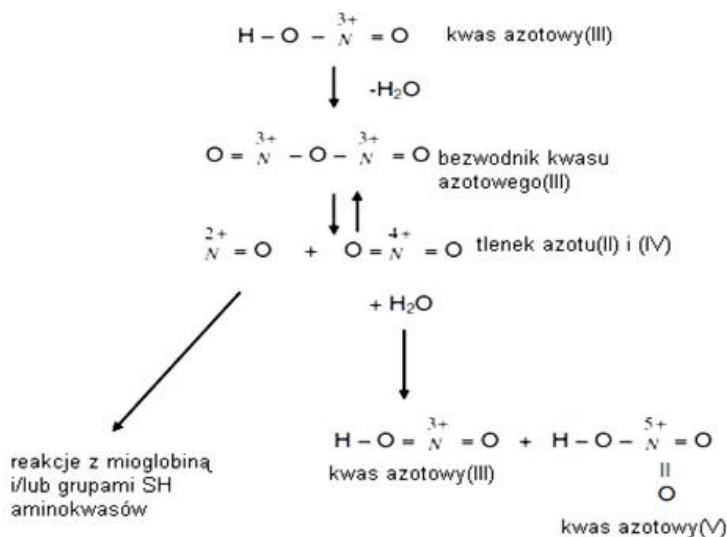
Tlenek azotu (II) związany z żelazem powoduje zatrzymanie negatywnych procesów utleniania, które powodują psucie się mięsa. Najważniejszą właściwością charakteryzującą antybakteryjne działanie mieszaniny pekującej jest to, że tlenek azotu (II), reagując z żelazem z komórek bakteryjnych, powoduje zakłócenie ich metabolizmu.

saletra $\rightarrow$ azotyn $\rightarrow$ kwas azotowy $\rightarrow$ tlenek azotu $\rightarrow$ nitrozo mioglobina

Działanie mieszaniny pekującej zależy od takich czynników jak:

- 1) pH,
- 2) zawartość żelaza,
- 3) obecność kwasu askorbinowego.

Im wyższa wartość pH tym mniej obecnych cząsteczek kwasu azotowego. Natomiast obecność kwasu askorbinowego wzmacnia działanie azotynów [9].



Rys. 3 Reakcje kwasu azotowego w mięsie [8].

1.3. Wpływ na organizm człowieka

Chociaż mieszanina peklująca jest dodawana do niemal wszystkich przetworów mięsnych, to głównym źródłem związków azotowych w diecie człowieka są warzywa i ich przetwory (około 80% azotanów występujących w codziennej racji żywnościowej). Samo spożycie mięs wzbogacanych mieszaniną peklującą wnosi około 16% w dziennej racji żywnościowej [10]. Badania m.in. Karłowskiego i Bojewskiego [1988] wykazały, że dostarczane wraz z żywnością nitrozwiązki mogą wpływać negatywnie na proces translacji informacji genetycznej. Dzieje się tak dlatego, że są one inhibitorami (*związek chemiczny powodujący zahamowanie bądź spowolnienie reakcji chemicznej*) syntezy DNA i RNA. Dodatkowo może dochodzić do transformacji komórek nowotworowych co związane jest silnymi właściwościami wolnorodnikowymi nitrozwiązków – dochodzi do powstania równowagi inhibitor-oksydant. Kolejnym negatywnym skutkiem spożywania nitrozwiązków jest niszczenie błon komórkowych, co skutkuje obniżeniem aktywności układów enzymatycznych. Ponadto nitrozoaminy powstałe w wyniku obróbki termicznej peklowanego mięsa zaburzają funkcjonowanie układu krążenia, poprzez reakcję z hemoglobina w wyniku której powstaje niewiążąca tlen methemoglobina [11].

2. Metodyka badań

Azotany w produktach mięsnych można oznaczać kilkoma sposobami. Niektóre z nich to: chromatografia jonowa, chromatografia gazowa, spektrofotometria. W naszej pracy swoją uwagę skupimy głównie na metodzie kolorymetrycznej, która oparta jest na zdolności jonów NO_2^- i NO_3^- do tworzenia barwnych związków z różnymi odczynnikami.

Metody kolorymetryczne polegają na mierzeniu absorpcji przy podanej długości fali z zakresu światła widzialnego. Kwas sulfanilowy reaguje z N-(1-naftylo)etylenodiaminą, a produktem tej reakcji jest barwnik diazoniowy o barwie czerwono-różowej, której intensywność mierzy się przy długości fali $\lambda=538\text{nm}$.

Proponowana przez nas metodyka oznaczeń prezentuje się następująco:

1) Przygotowywanie próbek:

Pierwszym etapem przygotowywania próbki jest zhomogenizowanie próbki. Następnie odważoną masę próbki umieszczamy w kolbie miarowej (250ml) i dodajemy nasyconego roztworu tetra boranu sodu $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ oraz gorącą wodę destylowaną(150ml). Kolejnym krokiem jest mieszanie i ogrzewanie na łaźni wodnej przez około 15minut. Po zakończeniu gotowania dodajemy roztworu Carreza II i energicznie mieszamy. Zawartość kolby należy ochłodzić i dodać wody destylowanej do kreski miarowej oraz przesączyć. Używając pipety(20ml) przenosimy roztwór do kolby miarowej (100ml) i dodajemy:

rozcieńczony roztwór amoniaku (25%), roztwór kwasu solnego ($0,1 \text{ mol/dm}^3$) i dopełniamy wodą destylowaną do kreski miarowej.

Tak przygotowane próbki umieszczamy w kuwetach pomiarowych i mierzymy absorbancję za pomocą spektrofotometru ($\lambda=538 \text{ nm}$).

3. Wyniki

Tabela 2. Zawartość NaNO_2 (mg/kg) w badanych próbkach spożywczych w roku 2003

Rodzaj wyrobu wędlin	Zawartość azotanów(III)
	X
Surowa kielbasa	17,9
Surowa szynka	19,2
Kaszanka	12,1
Kielbasa homogenizowana	13,2

Źródło: Karl-Otto Honikel [8]

4. Podsumowanie

Rodzaj oraz ilość jonów spożywanych w codziennej diecie wpływa na stan zdrowia człowieka. Zawartość jonów azotowych (III) według Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 19 grudnia 2002 (Dz.U. Nr 21 z dnia 8 lutego 2003, poz. 21), mieści się w granicach dopuszczalnych norm (2,0-160 mg/kg). Najwyższą stężenie tych jonów znaleziono w surowej szynce. Pozytywne skutki działania azotanów(III) w konserwacji żywności, przeważają nad znikomą możliwością powstawania nitrozoamin. Stosowanie azotanu (V) sodu, azotanu (III) sodu oraz azotanu (V) sodu chroni wędliny przed zepsuciem a tym samym umożliwia jej przechowywanie przez dłuższy czas. Związki te przeciwdziałają rozwojowi takich bakterii jak *Clostridium botulinum*, a więc chronią konsumentów przed produkowanymi przez nie toksynami. W przypadku bakterii *Clostridium botulinum* przed botulizmem, czyli stanem chorobowym wywołanym przez botulinę (jad kielbasiany), która jest jedną z dwóch najsilniejszych znanych toksyn, gdyż dawka $1 \cdot 10^{-8} \text{ g}$ jest już śmiertelna dla człowieka.

Nie należy obawiać się wędlin, które utrwalano poprzez peklowanie, choć warto zdobywać rzetelne informacje na temat producentów, wyrobów i jakości, jakie gwarantują.

Literatura

1. Tietze M., Burghardt A., Brągiel P., Mac J.; *Zawartość związków azotowych w produktach spożywczych*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin –Polska, Vol. XXV (1), 2007, 71-77
2. Dżugan M., Pasternakiewicz A.; *Ocena dziennego pobrania azotanówz wyrobami mięsnymi i wodą pitną*, Proceedings of ECOpole; Vol. 1. No. ½, 2007, 128-132
3. Praca zbiorowa pod redakcją prof. dr hab. T.M. Krygowski; *Encyklopedia szkolna chemia*. Wyd. WSiP, Warszawa 2001, 74-75
4. <http://www.digesta.com.pl/sol-smakowa/253-sol-peklowa-mala-paczka.html>; dostęp: 7 maj 2013
5. http://www.jedzdobrze.pl/slownik/7/azotyny_azotany/ ; dostęp: 5 maja 2013
6. Dz.U. 2010 nr 232 poz. 1525; Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych
7. Statham B.; *E 213, czyli co jesz i czym się smarujesz. Tabela składników i dodatków chemicznych*. Poradnik konsumenta. Wyd. RM, Warszawa 2006
8. Honikel K-O.; *The use and control of nitra te and nitrite for the processing of meat products*, Meat Science, 78, 2008, 68-76
9. *Azotyny w przetwórstwie mięsa, aspekt trwałości i bezpieczeństwa parzonych przetworów mięsnych*, Czasopismo: Mięso i wędliny, 24-28; czerwiec 2009
10. Przybyłowski P., Kisza J., Kozłowski K.; *Badania występowania azotanów i produktów ich przemian w mleku i wyrobach mleczarskich*. Rocznik PZH, 38, 3, 1987, 214-227
11. W. Migdał; *Spożycie mięsa a choroby cywilizacyjne*; Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6, 55, 48-61, 2007

**Pracę recenzowała: dr Sabina Dołęgowska, Instytut Chemii,
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach**

Oznaczanie azotanów (III) w produktach mięsnych

Streszczenie

W obecnych czasach jednym z najprężniej rozwijających się rynków jest rynek spożywczy. Do produkcji żywności wykorzystuje się coraz to bardziej nowoczesne metody i technologie. Na przestrzeni kilku ostatnich lat pewnym modyfikacjom uległy również metody konserwacji. W niniejszej pracy podjęto temat związany z konserwacją produktów mięsnych przy użyciu substancji peklujących. Substancje peklujące zawierają głównie azotany (V) i azotany (III). Azotyny (III) stosowane są jako inhibitory dla niektórych mikroorganizmów. W wielu krajach dopuszczalne zawartości azotanów (III) i azotanów (V) w produktach spożywczych są regulowane przez prawo. Suma azotynów (V) i (III) jest ważna dla ludzkiego organizmu, ze względu na ich wędrowkę z układu pokarmowego do krwiobiegu. Azotany(V) mogą ulegać w naszych organizmach redukcji do azotanów (III), które z kolei w kwaśnym środowisku panującym w żołądku przechodzą w rakotwórcze nitrozoaminy.

W niniejszej pracy podjęto się zbadania zawartości niebezpiecznych dla człowieka azotanów (III) w różnych rodzajach mięs, dostępnych w sklepach spożywczych na terenie Polski. Zawartość azotanów (III) w badanych próbkach oznaczono metodą kolorymetryczną.

Słowa kluczowe: azotany (III), azotany w mięsie, spektrofotometria, nitrozoaminy

Determination of nitrates (III) in meat products

Nowadays, the food market is one of the most rapidly growing. In food production are used more and more modern methods and technologies. Methods of maintenance have been change through the years. In our work we have focused on meat products containing a mixture of curing. Curing medium substances contain mainly nitrates and nitrites. Both of these components are in the curing mixture for meat, because nitrite effectively acts as inhibitors for certain microorganisms. In many countries, the dose of these substances are regulated by the law. The sum of nitrite and nitrate is important for human, because of their journey from the gastrointestinal tract into the bloodstream. Nitrates may undergo reduction in our bodies to nitrite, In the stomach nitrite can eventually form carcinogenic nitrosamines in the acidic environment.

The main objective of this work is to determine the content of nitrite in various types of meat products available on the polish market. In this study we used the colorimetric method.

Keywords: nitrites (III), nitrites in meat, spectrophotometry, nitrosoamines

Porfiryny – właściwości oraz wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej

Wstęp

Porfiryny są organicznymi związkami heterocyklicznymi, występującymi zarówno naturalnie w przyrodzie jak i otrzymywanymi na drodze syntezy chemicznej w laboratorium. Zbudowane są z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi (=CH-) w układ makrocykliczny zwany porfiną [1]. Porfiryny różnią się między sobą podstawnikami występującymi w łańcuchach bocznych oraz metalem występującym w ich centrum, bądź też jego brakiem (porfiryny wolne). Typowymi łańcuchami bocznymi tych makrocykli są grupy acetylowa, metylowa, propylowa i winylowa [2]. Porfiryny oprócz spełniania szeregu funkcji biologicznych, znajdują zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej, wykorzystującej ich właściwości fotodynamiczne.

1. Synteza porfiryn

Porfiryny można otrzymać w dwojaki sposób. Na drodze syntezy laboratoryjnej lub na drodze biosyntezy w organizmach żywych.

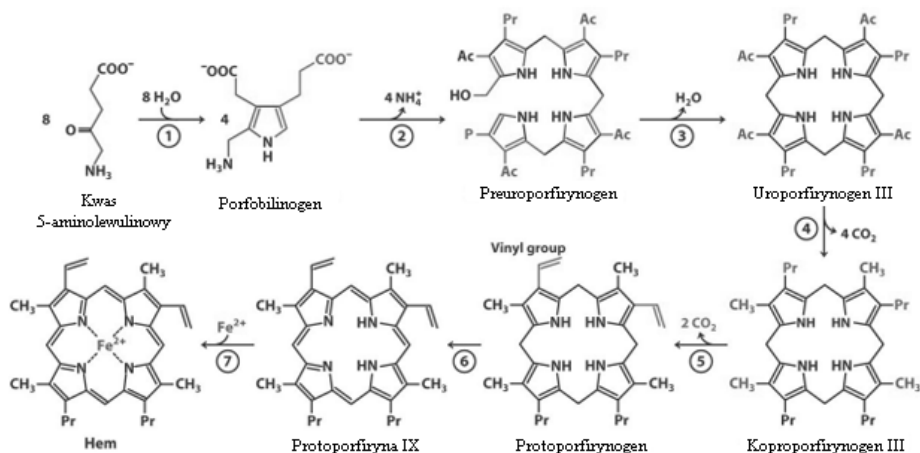
Podstawowy budulec każdej porfiryny pirol można otrzymać w laboratorium na drodze reakcji furanu i amoniaku (roztwór wodny) w temperaturze 400° C w obecności katalizatora jakim jest tlenek glinu (Al_2O_3). Dodatkowo, można otrzymać go na drodze pirolizy białek (np. z kwasu śluzowego), bądź poprzez wydzielenie ze smoły węglowej, w której powszechnie występuje [3]. Kolejnym etapem w laboratoryjnej produkcji porfiryn jest synteza Rothemunda. Polega ona na kondensacji i utlenieniu substratów reakcji jakimi są aldehydy i pirole. W wyniku takiej syntezy powstaje układ porfirynowy nie posiadający metalu [4].

W naturze, biosynteza porfiryny (na przykładzie biosyntezy hemu) rozpoczyna się od reakcji glicyny z sukcynylo-CoA, w wyniku czego powstaje kwas 5-aminolewulinowy, będący bezpośrednim prekursorem porfobilinogenu, czyli zmodyfikowanej postaci pirolu, występującego w organizmach żywych (reakcję katalizuje syntaza porfobilinogenowa). Na drodze kolejnych przemian,

¹ maciej.frant@gmail.com, zurekaleksandra@wp.pl, SKN Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

²magister, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii

poprzez uroporfirynogen III, koproporfirynogen III, protoporfirynogen III, powstaje protoporfiryna IX, będąca bezpośrednim prekursorem hemu. Enzymami katalizującymi reakcję przejścia z protoporfiryny IX do kompletnej porfiryny zawierającej atom metalu, są helatazy (Rys. 1). Mechanizm ich działania nie jest do końca wyjaśniony, ale zakłada się, że stosunkowo sztywny pierścień porfirynowy, jest odkształcany przez nie w celu inercji jonu metalu. Biosynteza zachodzi na przemian, najpierw w mitochondriach, później w cytoplazmie, by ostatecznie zakończyć się w mitochondriach [5].



Rys. 1 Biosynteza hemu (źródło: *Heme synthesis pathway for Palestine-loving nerds*, Kishawi S., 2012 [6], tłumaczenie własne)

Organizmy żywe oprócz zdolności do syntezy porfiryn potrafią również je rozkładać (opis na przykładzie hemu). W pierwszym etapie oksygenaza hemu uwalnia z porfiryny żelazo i tlenek węgla (CO), oraz rozrywa jeden mostek metinowy, w wyniku czego powstaje biliwerdyna IX. Następnie, przy udziale reduktazy biliwerdyny powstaje bilirubina IX (bardzo szybka reakcja). W wyniku dalszych przemian uwalniane są końcowe produkty utlenienia bilirubiny [7].

2. Właściwości biologiczne porfiryn

Typowymi przedstawicielami porfiryn są hemy oraz chlorofile, które dzięki swoim właściwościom, odpowiedzialne są za podtrzymanie życia tlenowego na Ziemi.

Hem jest formą protoporfiryny IX zawierającą w swym centrum atom żelaza. Potrafi go syntetyzować ogromna liczba organizmów żywych, począwszy od bakterii, a skończywszy na człowieku. U ludzi ponad 80% hemu znajduje się w czerwonych krwinkach. Występuje on w hemoglobinie (jest jej grupą prostetyczną), nadając jej unikatowe właściwości wiązania tlenu, umożliwiając jego transport i dystrybucję w całym organizmie [8]. Niezwykle istotny jest udział hemu w łańcuchu transportu elektronów, który bez hemu znajdującego się w cytochromach nie mógłby w ogóle zachodzić. W transporcie tym przekazywane są elektrony z NADH poprzez cytochromy na atomy tlenu (cząsteczkowego), co generuje wytworzenie energii gromadzonej w postaci ATP [2]. Hem stanowi również grupę prostetyczną dla wielu innych hemoprotein takich jak mioglobiny, cytooksydazy, katalazy, peroksydazy czy pirolazy tryptofanu [9]. Zaburzenie syntezy hemu (enzymów tzw. szlaku porfiryn) prowadzi do wystąpienia zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu i wystąpieniu schorzenia zwanego porfirią (erytropoetyczną lub wątrobową) [10].

Kolejną bardzo istotną grupą porfiryn są chlorofile, występujące w roślinach, algach oraz bakteriach fotosyntetyzujących. Wyjściową porfiriną dla syntezy chlorofili jest feoporfiryna, a metalem przyłączanym do niej jest magnez. Dla większości chlorofili (a, b, d, e) charakterystyczna jest obecność długołańcuchowego alkoholu: fitolu, przyłączonego do porfiryny poprzez pirogronian w pozycji 7 [11]. Chlorofile występują w chloroplastach i są niezbędne do przebiegu fotosyntezy. Umożliwiają one zamianę energii świetlnej na energię wiązań chemicznych dzięki absorpcji kwantów światła (faza jasna fotosyntezy). Na drodze fotosyntezy wytwarzany jest z dwutlenku węgla, jako produkt uboczny oraz tlen niezbędny do życia dla większości organizmów żywych. Zakres światła wychwytywany przez chlorofil mieści się w przedziale od 380 nm do 710 nm. Energia wzbudzonego chlorofilu może być wyemitowana pod postacią czerwonego promieniowania fluorescencyjnego [12].

Kobalamina popularnie znana pod nazwą witaminy B12, jest następną porfiriną istotną z biologicznego punktu widzenia. W odróżnieniu od hemu i chlorofilu, w swojej cząsteczce ma mniej podwójnych wiązań, a dwa pierścienie pirolowe połączone są ze sobą w sposób bezpośredni, bez mostka metinowego, a usytuowany centralnie jon (kobaltu) wiąże dodatkowo dwa inne podstawniki. Witamina B12 uczestniczy w reakcji metylacji homocysteiny oraz metabolizmie propionylu~S-CoA. Kobalamina nie jest wytwarzana przez rośliny. Jej niedobór u ludzi prowadzi do rozwoju niedokrwistości i pojawienia się różnych objawów neurologicznych [11].

Innymi porfirynami występującymi w przyrodzie są m.in. turacyna, z atomem miedzi, będąca czerwonym barwnikiem w piórach ptaków z rodziny turakowatych, czy też kofaktor F430, zawierający nikiel występujący u niektórych *Archea*, będący grupą prostetyczną enzymu katalizującego uwalnianie metanu w końcowym etapie metanogenezy [13].

3. Właściwości fizyczne porfiryn

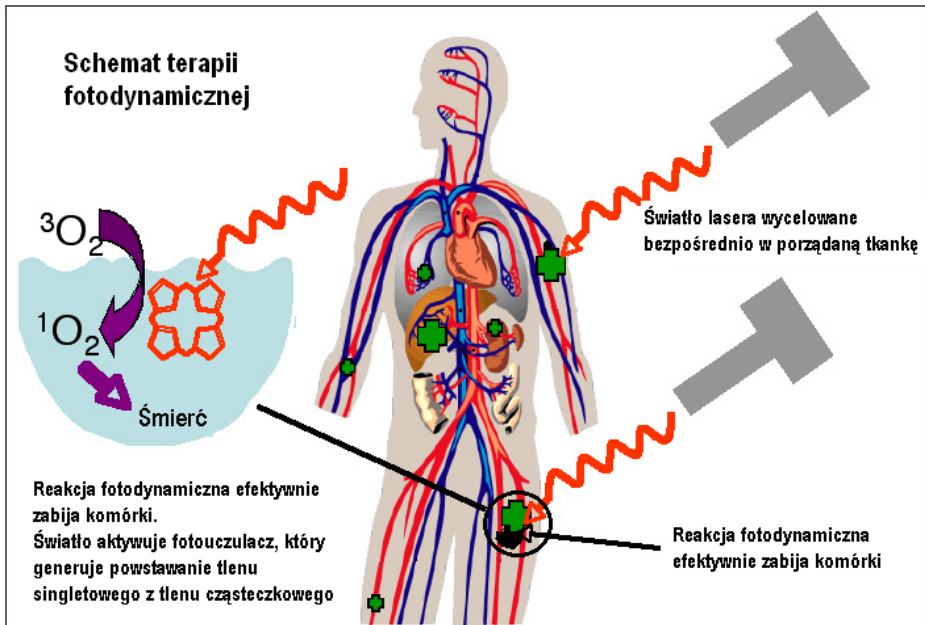
Porfiryny są płaskie, bardzo trwałe oraz silnie zabarwione. Jony metali znajdujące się w centrach porfiryn przyjmują pary elektronów od atomów azotu z piroli. Porfiryny pochłaniają światło, dzięki czemu posiadają charakterystyczne widma absorpcyjne zarówno w części widzialnej jak i nadfioletowej. Zarówno porfiryny jak i metaloporfiryny posiadają dwa bardzo specyficzne pasma absorpcji w tym zakresie. Pierwsze z nich to Pasmo Soreta – dość ostre znajdujące się w zakresie od 400 do 500 nm. Drugie to Pasmo Q, około dziesięć razy słabsze od poprzedniego, składające się z czterech mniejszych pików (w przypadku metaloporfiryn liczba ta może ulec zmniejszeniu do 2-3) i znajdujące się w zakresie 500-700 nm. Widmo absorpcyjne powstaje na skutek przejścia molekuly ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Widmo emisyjne jest przesunięte w kierunku większych długości fali w stosunku do widma absorpcyjnego. Wzbudzone porfiryny intensywnie świecą [14].

4. Fotodynamiczna terapia przeciwnowotworowa (PDT)

Historia terapii fotodynamicznej sięga już kilka tysięcy lat, gdy to starożytni lekarze egipscy opisywali lecznicze właściwości światła. Z kolei, wzmianki o zastosowaniu substancji fotouczulających można już znaleźć w opisach z V-IV wieku przed naszą erą. Nowożytna terapia fotodynamiczna ma początek w badaniach profesora Oscara Raab'a, który na początku XX wieku zaobserwował, że pantofelki zanurzone w roztworze oranżu akrydynowego po naświetleniu umierają, natomiast te same organizmy umieszczone w czystej wodzie i poddane naświetleniu ciągle żyją [15, 16]. W 1903 roku Niels Fiensen, który odkrył, że światło o barwie czerwonej może pomóc w leczeniu ospy, otrzymał nagrodę Nobla za zapoczątkowanie terapii leczącej światłem. W latach dwudziestych XX wieku odkryto zwiększoną fluorescencję guzów nowotworowych myszy naświetlanych promieniowaniem UV (kumulacja endogennych porfiryn). Dwadzieścia lat później odkryto, że endogenne porfiryny kumulują się selektywnie w miejscach powstawania guzów nowotworowych (Auler i Banzer). Lata siedemdziesiąte przyniosły dalsze badania nad fototoksycznością oraz dały początek pierwszym próbom wykorzystania tej terapii w walce z nowotworami u myszy oraz ludzi [15].

Porfiryny odgrywają czołową rolę w nowoczesnej przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej, która wraz z biegiem lat zyskuje coraz więcej zwolenników. Terapia ta wykorzystuje działanie trzech czynników: światła, fotouczulacza (porfiryny) oraz tlenu (Rys. 2). Reakcja może zachodzić na drodze dwóch różnych mechanizmów. W pierwszym etapie światło wzbudza fotouczulacz, a wzbudzona w ten sposób porfiryne może zareagować na kilka sposobów. Może przekazać energię wzbudzenia ze światła bezpośrednio na tlen, generując powstawanie tlenu singletowego (bardzo reaktywna forma tlenu), który reagując ze składnikami komórki tworzy produkty ich utlenienia, prowadząc do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. Wzbudzony fotouczulacz może również generować powstawanie wolnych rodników, które oddziałując z tlenem, tworzą jego reaktywne formy i prowadzą do niszczenia organelli komórkowych oraz błon [17, 18, 19]. Obie powyższe reakcje zachodzą równocześnie a ich stosunek względem siebie zależy od różnych czynników, takich jak stężenie tlenu, czy też rodzaj zastosowanego fotouczulacza. Oprócz tych dwóch mechanizmów, istnieje jednak również trzeci mechanizm różniący się od nich tym, że nie wymaga obecności tlenu. Porfiryne będąc w singletowym stanie wzbudzenia może bezpośrednio reagować z biomolekułami, powodując powstawanie różnych fotoadduktów. Generowanie wolnych rodników oraz przejście elektronów między biomolekułą, a fotouczulaczem, są procesami bardzo nieefektywnymi, dlatego często mechanizm ten nie jest uwzględniany w przypadku terapii fotodynamicznej [20, 21].

Porfiryny są doskonałym modelem fotouczulacza, ze względu na fakt, że gromadzą się selektywnie w komórkach nowotworowych, co związane jest z naturą tych tkanek tj. występowanie dużych śródmiąższowych przestrzeni, nieszczelność układu naczyniowego, obniżone pH względem otoczenia, uszkodzony drenaż limfatyczny, wyższa synteza kolagenu, zwiększona aktywność endocytozy. Kolejną zaletą porfiryn jest to, że gromadzą się w komórce, łatwo ulegają wzbudzeniu światłem o długości fali około 400 nm (Pasma Soreta) – intensywna luminescencja. Wzbudzenie światłem o długości fali 600 nm (Pasma Q), powoduje, że efektywnie generują tlen singletowy oraz rodniki. Porfiryny mogą być szybko usuwane z organizmu dzięki czemu nie powodują efektów ubocznych [18].



Rys. 2 Schemat przebiegu terapii fotodynamicznej (PDT) (źródło: *What is Photodynamic Therapy Pdt?* 2011 [22], tłumaczenie własne)

Tabela 1. Przykłady fotouczulaczy wykorzystywanych w przypadku chorób nowotworowych

Fotouczulacz	Nazwa firmowa	Zastosowanie	Fala wzbudzenia
HPD (częściowo oczyszczona)	Photofrin	Rak szyjki macicy, pęcherza moczowego, przełyku, wewnątrzkrzjelowy, żołądka i guzy mózgu	630 nm
Porfimer sodu	Verteporfin	Rak podstawno-komórkowy	689 nm
BPD-MA (benzo-porfiryna)	Foscan	Guzy głowy, szyi, prostaty i trzustki	652 nm

m-THPC (meta-tetrahydroksyfenylochloryn)	Levulan	Rak podstawno-komórkowy, rak głowy i karku oraz guzy ginekologiczne	635 nm
5-ALA (kwas 5-aminolewulinowy)	Metvix	Diagnostyka guzów mózgu, głowy, szyi pęcherza moczowego	375-400 nm
pochodna metylowa 5-ALA	Benzvix	Rak podstawno-komórkowy	635 nm
pochodna benzylowa 5-ALA	Hexvix	Nowotwory żołądkowo-jelitowe	635 nm
pochodna heksylowa 5-ALA	Purlytin	Diagnostyka guzów pęcherza moczowego	375-400 nm
SnET2 (etiopurpuryna cyny)	BOPP	Powierzchniowe przerzuty raka piersi, rak podstawno-komórkowy, mięsak Kaposi'ego, rak prostaty	664 nm
Protoporfiryna borowa	Photochlor	Guzy mózgu	630 nm
PPH (2-(1-heksyloksetyl)-2-dewinylo alfa-pirofeoforbidu)	Lutex	Rak podstawno-komórkowy	665 nm
Teksafiryna lutetu	Pc 4	Rak szyjki macicy, prostaty i guzy mózgu	732 nm
Ftalocyjanina 4	Talaporfin	Powierzchniowe i podskórne zmiany patologiczne pochodzenia nowotworowego	670 nm
Taporfina sodowa	Nazwa firmowa	Jednolite guzy różnego pochodzenia	664 nm

Źródło: Kulbacka i in., 2008, na podstawie Moan i in., 2003 oraz Dolmans i in., 2003

Obecnie najobszerniej opisane jest wykorzystanie terapii fotodynamicznej, w leczeniu powierzchniowych nowotworów skóry. Gdy mechanizmy kontrolujące wzrost, podziały i różnicowanie komórek wymkną się spod kontroli, powstaje zmiana neoplastyczna, czyli nowotwór. Na takie zmienione chorobowo miejsca można nanieść krem zawierający fotouczulacz, który wnika w skórę i zmienione nowotworowo komórki. W leczeniu nowotworów skóry, błon śluzowych a także narządów rodnych u kobiet jako fotouczulacz znalazł zastosowanie kwas 5-aminolewulinowy (ALA), który sam w sobie nie jest porfiryną ale jej prekursorem (protoporfiryny IX). W przypadku tej substancji wykorzystuje się zjawisko selektywnego (zwiększonego) gromadzenia się kwasu ALA w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych. Zjawisko to wynika z natury komórek nowotworowych, o czym wspomniano wcześniej (m.in. niższe pH niż w otaczających tkankach, uszkodzony drenaż limfatyczny). Dodatkowym bardzo istotnym czynnikiem jest ciąg specyficznych reakcji chemicznych, zachodzących po podaniu kwasu 5-aminolewulinowego. W wyniku kondensacji dwóch cząsteczek kwasu ALA powstaje porfobilinogen i na drodze kolejnych przemian biosyntetycznych powstaje protoporfiryna IX, bezpośredni prekursor hemu. Jak wcześniej wspomniano, w ostatnim etapie syntezy hemu protoporfiryna IX pod wpływem ferrochelatazy przekształca się w hem (inercja żelaza). W przypadku komórek nowotworowych, zaburzona jest aktywność ferrochelatazy. Powoduje to, że w niedługim czasie po dostarczeniu kwasu 5-aminolewulinowego w komórce zaczyna się gromadzić protoporfiryna IX. Znając spektrum aktywności tej porfiryny łatwo jest ją wzbudzić odpowiednią długością fali i zainicjować reakcję fotodynamiczną [24, 25].

Terapia fotodynamiczna posiada szereg zalet w stosunku do np. zabiegu chirurgicznego. Po pierwsze, zabieg jest w większości przypadków bezbolesny. PDT jest metodą szybkiego, miejscowego, selektywnego diagnozowania oraz leczenia powierzchniowych nowotworów skóry. Niszczy komórki nowotworowe w sposób silnie wybiórczy, nie uszkadzając zdrowych tkanek oraz nie pozostawiając blizn. Terapia PDT wykazuje podobną skuteczność co krioterapia, czy też leczenie chirurgiczne. Pozwala to na leczenie powierzchniowych nowotworów w miejscach trudno dostępnych, takich jak powieki, okolice oczu, kąt nosa, czy też policzki. Zastosowanie terapii fotodynamicznej może oszczędzić pacjentowi trudnych, wieloetapowych operacji, które często mogą mieć okaleczający charakter [18].

5. Podsumowanie

Porfiryny oprócz tego, że są niezbędną grupą związków dla świata ożywionego (gdyby nie one życie na Ziemi nie mogłoby istnieć w formie jaką znamy), obecnie znajdują nowsze zastosowanie, a szeroki wachlarz ich zalet przyczynia się do walki z chorobami nowotworowymi. Porfiryny wykorzystywane w terapii fotodynamicznej odgrywają więc istotną rolę w walce człowieka z rakiem.

Literatura

1. Bojarski J., *Chemia organiczna*, wydanie VI, Kraków, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1999
2. Berg J., Tymoczko J., Stryer L., *Biochemia*, wydanie V, Warszawa, Wydawnictwo naukowe PWN, 2007
3. Kołodziejczyk A., *Heterocykliczne związki aromatyczne* [online], 2007 [dostęp 10 maja 2013]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.chemia.pk.edu.pl/~mariamikulska/images/heterocykle.pdf>, s. 1-23
4. Rothmund P., *A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphyrin*, "Journal of the American Chemical Society", 1936, tom. 58 vol. 4, s. 625-627
5. Ajioka R., Phillips J., Kushner J., *Biosynthesis of heme in mammals*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, vol. 1763 s. 723-736
6. Kishawi S., *Heme synthesis pathway for Palestine-loving nerds* na podstawie wykładów prof. Marvina Makinen'a [online], 2012 [dostęp 10 maja 2013]. Dostępny w word Wide Web: <http://smpalestine.com/2012/12/12/heme-synthesis-pathway-for-palestine-loving-nerds/>
7. Hou S., Xu R., Clark J., Wurster W., Heinemann S., Hoshi T., *Bilirubin oxidation end products directly alter K⁺ channels important in the regulation of vascular tone*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2011, vol. 31, s. 102-112
8. Zhang Li, *Heme Biology; The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes*, The University of Texas at Dallas, USA, 2011 s. 1-6
9. Ponka P. *Cell biology of heme*, *American Journal of Medical Science*, 1999, vol. 318, s. 241-256
10. Anderson K., Sassa S., Bishop D., Desnick R., *Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias*, *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 2009, ch. 124, s. 1-53
11. Bańkowski E., *Biochemia Podręcznik dla studentów studiów licencjackich i magisterskich*, Wrocław, MedPharm Polska, 2006, s. 214-224, 298
12. Garstka M., *Strukturalne Podstawy Reakcji Świetlnych Fotosyntezy*, *Postępy Biologii Komórki*, 2007, tom 34, vol. 3 s. 445-476
13. Thauer R., *Biochemistry of Methanogenesis: a Tribute to Marjory Stephenson*, *Microbiology*, 1998, tom 144, vol. 9, s. 2377-2406.
14. Orzeł Ł., Dąbrowski J., *Zastosowanie pomiarów fluorescencji w biochemii i chemii bionieorganicznej*, Zespół Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej, Wydział Chemii UJ, 2010, s. 1-9

15. Daniell M., Hill J., *A history of photodynamic therapy*, Australian and New Zealand Journal of Surgery, 1991, tom. 61, vol. 5, s. 340-348
16. Raab, O., *Ueber die Wirkung Fluorescierenden Stoffe auf Infusorien*, Zeitschrift für Biologie, 1904, vol. 39, s. 524-546
17. Lukšienė Ž., Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment, *Medicina*, 2003, tom. 39, vol. 12, s. 1137-1150
18. Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A., Ługowski M., Banaś T., *Fototerapia jako alternatywna metoda leczenia nowotworów*, *Borgis – Medycyna Rodzinna*, 2008, vol. 4, s. 88-95
19. Dolmans D., Fukumura D., Jain R., *Photodynamic therapy for cancer*, *Nature*, 2003, tom. 5, vol. 3, s. 380-387
20. Capella MAM, Capella LS, *A Light in Multidrug Resistance: Photodynamic Treatment of Multidrug-Resistant Tumors*, *Journal of Biomedical Science*, 2003; vol. 10, s. 361-366.
21. Ochsner M., *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1997, vol. 39, s. 1-18
22. *What is Photodynamic Therapy Pdt?* [online], 2011, [dostęp 10 maja 2013]. Dostępny w World Wide Web: <http://trialx.com/curebyte/2011/06/21/what-is-photodynamic-therapy-pdt/>
23. Moan J., Peng Q., *An outline of the hundred-year history of PDT*, *Anticancer Research*, 2003, tom. 23, vol. 5A, s. 3591-600
24. Peng Q., Warloe T., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Giercksky Karl-Erik, Nesland J., *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy*, *Cancer*, 2000, vol. 79, is. 12, s. 2282-2308
25. Wolf P., Rieger E., Kerl H., *Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid: An alternative treatment modality for solar keratoses, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas?*, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1993, vol. 28, is. 1, s. 17-21

Pracę recenzował: dr hab. Roman Paduch, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Porfiryny – właściwości oraz wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej

Streszczenie

Porfiryny należą do grupy organicznych związków heterocyklicznych (pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego) zbudowanych z czterech pierścieni pirolowych połączonych w makrocycliczny układ zwany porfiną. Związki te mogą występować w postaci wolnej lub w postaci metaloporfiryny z przyłączonym w centrum makrocykla atomem metalu. Typowymi przedstawicielami porfiryn są hemy, będące składnikami m.in. hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów, cytooksydazy, katalazy, oraz chlorofile. Związki te spełniają bardzo istotną rolę w świecie organizmów żywych (m.in. podtrzymanie życia tlenowego na Ziemi).

Oprócz podstawowych właściwości biologicznych, porfiryny znalazły zastosowanie w terapii fotodynamicznej (PDT – ang. *Photodynamic Therapy*), wykorzystywanej w walce z ludzkimi nowotworami powierzchniowymi. Terapia taka wykorzystuje działanie trzech czynników: światła,

fotouczulacza (porfiryny) oraz tlenu. Światło wzbudza fotouczulacz, który przenosi energię na tlen generując jego reaktywne formy bądź produkty jego utlenienia. Uszkadzają one struktury wewnątrzkomórkowe zabijając tym samym komórki nowotworowe. Działanie fotodynamiczne wykazują m.in. uroporfiryna oraz protoporfiryna, która znalazła zastosowanie w terapii. Wykorzystanie porfiryn w PDT jest korzystne, ze względu na fakt, że gromadzą się selektywnie w komórkach nowotworowych. Dzięki temu stanowią ciekawe rozwiązanie w alternatywnych formach terapii przeciwnowotworowych.

Słowa Kluczowe: porfiryny, terapia fotodynamiczna

Porphyrin – properties and use in cancer therapy

Abstract

Porphyrins belong to a group of heterocyclic organic compounds (natural or synthetic) composed of four pyrrole subunits interconnected in a macrocyclic system called porphine. These compounds may be present in a free form or in the form of metalloporphyrins with an atom of metal attached in the center of the macrocycle. Typical representatives of porphyrins are heme porphyrins, which build such compounds as hemoglobin, myoglobin, cytochromes, cytooxidase, catalase, and chlorophylls. These molecules play a significant role in the world of living organisms (such as support of oxygen-dependent life on Earth).

In addition to basic biological properties, porphyrins have been used in photodynamic therapy (PDT – Photodynamic Therapy), used against the human surface cancers. The therapy uses the effects of three factors: light, photosensitizer (porphyrin) and oxygen. Light activates a photosensitizer, which transfers energy onto oxygen to generate the reactive oxygen species or products of its oxidation. They damage the intracellular structures of the cancer cells which leads to their death. Some porphyrins such as uroporphyrin and protoporphyrin have photodynamic action, which has been used in therapy. The use of porphyrins in the PDT is advantageous because they accumulate selectively in tumor cells. For this reason, they are an interesting approaches in alternative anticancer therapy.

Key words: porphyrin, photodynamic therapy

Taksol – cząsteczka nadziei w leczeniu nowotworów

Wprowadzenie

W latach sześćdziesiątych XX wieku w Stanach Zjednoczonych rozpoczęto program poszukiwawczy, którego celem było znalezienie nowych substancji o działaniu przeciwnowotworowym [1]. Spośród 35 000 przeanalizowanych gatunków roślin, szczególną uwagę zwrócono na *Taxus brevifolia*, którego ekstrakt wyróżniał się niezwykle silnymi właściwościami cytostatycznymi. W 1971 roku po raz pierwszy wyizolowano aktywny składnik ekstraktu, otrzymanego z kory cisa, któremu nadano nazwę taksol [2]. Po 1979 roku, kiedy Susan Horwitz i wsp. odkryli mechanizm cytostatycznego działania cząsteczki taksolu, nastąpił dynamiczny rozwój badań chemicznych i farmakologicznych tej cząsteczki, co doprowadziło do zarejestrowania taksolu w 1992 r. jako leku przeciwko rakowi jajnika a w roku 1994 jako leku przeciwko rakowi piersi [3].

1. Występowanie i biosynteza taksolu i taksoidów

1.1. Występowanie

Taksol, znany też jako paklitaksel, jest diterpenoidem, którego głównym źródłem jest rodzaj *Taxus*. Jako pierwszy z tego rodzaju do badań posłużył cis zachodni (*Taxus brevifolia*). Oprócz tego konkretnego gatunku, taksol zawierają też pozostałe gatunki cisów, ale w bardzo zróżnicowanych ilościach, które dodatkowo wahają się w trakcie okresu wegetacyjnego roślin [4].

W cisach oprócz taksolu występują także inne związki z grupy taksoidów, zawierające w swojej budowie charakterystyczny szkielet taksanu. Są one równie ważne co sam taksol, ponieważ mogą zostać wykorzystane jako prekursorzy do jego syntezy. U różnych gatunków należących do rodzaju *Taxus* znaleziono ponad 400 naturalnie występujących związków posiadających szkielet taksanu, stanowiący podstawową strukturę taksolu [5].

¹ kamila.wlizlo@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii; e-mail; strona www: <http://www.fungi.umcs.lublin.pl/>

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

³ Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Biochemii

Na szczególną uwagę zasługują takie taksoidy jak 10-deacetylobakkatyna III, występująca w *Taxus baccata* (10-DAB) oraz bakkatyna III, które są prekursorami do syntezy taksolu. Częścią rośliny, z której na początku izolowano zarówno taksol jak i pozostałe taksoidy była kora cisu. Obecnie, ze względów ekonomicznych, najważniejszym źródłem pozyskiwania tych cząsteczek ze źródeł naturalnych są igły tych roślin [4].

Tabela 1 Zawartość taksoidów w igłach wybranych gatunków cisów (na podstawie [4]).

Gatunek cisa	Zawartość taksoidów w µg/g suchych igiel		
	taksol	bakkatyna III	10-deacetylobakkatyna III
<i>T. brevifolia</i>	130	296	41
<i>T. baccata</i>	63	10	468
<i>T. floridiana</i>	516	0	1689
<i>T. canadensis</i>	285	224	2665
<i>T. celebica</i>	26	0	70
<i>T. cuspidata</i>	136	15	116
<i>T. globosa</i>	433	168	1395
<i>T. wallichiana</i>	272	0	1092

1.2. Budowa cząsteczki i przebieg procesu biosyntezy

Charakterystyczna budowa cząsteczki taksolu wynika z obecności trójpierścieniowego szkieletu pentametylo [9.3.1.0] 3,8-tricyklopentadekanu [5], będącego wspólnym elementem wszystkich taksoidów. Sam taksol ma skomplikowaną budowę, opierającą się o system trzech pierścieni taksanu (A,B,C), pierścień oksetanu (D) oraz związany estrowo boczny łańcuch alifatyczny [6].

Biosynteza taksolu nie jest jeszcze do końca poznana, wiadomo jednak, że obejmuje ona przynajmniej 19 etapów reakcji enzymatycznych, począwszy od wytworzenia pierwszego produktu pośredniego reakcji, jakim jest pirofosforan geranylogeraniolu [5]. Powstawanie tego związku wiąże się z szeregiem reakcji, których substratem wyjściowym jest glukoza. Służy ona jako substrat dla szlaku syntezy mawalonianu, w którym jako produkt końcowy powstaje pirofosforan 3-izopentenylu (IPP). Szlak ten rozpoczyna się od reakcji pomiędzy acetylo-CoA i acetoacetylo-CoA czego wynikiem jest utworzenie

3-hidroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA). Związek ten jest następnie redukowany w cytozolu do mewalonianu, z udziałem enzymu reduktazy HMG-CoA i wykorzystaniem dwóch cząsteczek NADPH i dwóch atomów wodoru. Oprócz mewalonianu, w reakcji powstaje cząsteczka CoA i dwie cząsteczki NADP^+ . Do przekształcenia powstałego mewalonianu w pirofosforan 3-izopentenylu konieczne jest przeprowadzenie trzech reakcji, w trakcie których wykorzystywane jest ATP, a ostatnią z nich jest reakcja dekarboksylacji. W cyklu trzech reakcji, które zachodzą jedna po drugiej powstają kolejno: 5-fosfomewalonian i 5-pirofosfomewalonian, który ulega dekarboksylacji dając pirofosforan 3-izopentenylu [7]. Związek ten w reakcji katalizowanej przez syntazę pirofosforanu geranylogeraniolu przekształcony zostaje w difosforan geranylogeraniolu (GGP), który z kolei w wyniku działania syntazy taksadienu (EC 4.2.3.17) zostaje przekształcony do 4,11-taksadienu uznawanego za prekursora wszystkich taksoidów [5]. 4,11-taksadien przechodzi następnie reakcję stereospecyficznej 5- α hydroksylacji w wyniku działania 5-hydroksylazy taksadienowej (EC 1.14.99.37.). Produktem tego procesu jest 4,11-taksadien-5 α -ol [4]. Powstały związek jest następnie poddawany reakcji acetylacji z udziałem O-acetyltransferazy-taksadien-5-olu (EC 2.3.1.162) co prowadzi do powstania β -4,11-taksadienu [5].

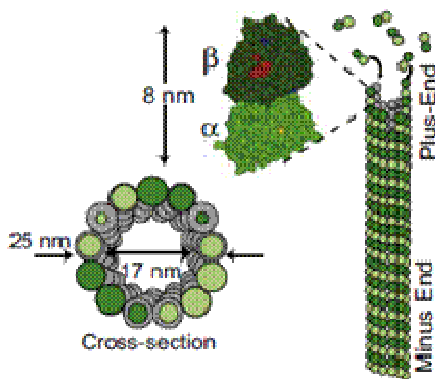
W kolejnym etapie cyklu biosyntezy taksolu, β -4,11-taksadien przechodzi w formę epoksydową, która w procesie wytwarzania pierścienia oksetanu ulega przekształceniu do 9-dihydrobakktyny III [5]. Oksydacja przy atomie węgla C9, 9-dihydrobakktyny III, to kolejny etap procesu. Wynikiem tego przekształcenia jest bakktyna III, do której w końcowym etapie biosyntezy taksolu dołączany jest łańcuch N-benzoilofenyloseryny w pozycji atomu węgla C13. Wynikiem tego typu przekształcenia jest ostateczny produkt reakcji, taksol [5].

2. Działanie cytostatyczne taksolu

2.1. Budowa i funkcjonowanie mikrotubul

Komórki nowotworowe różnią się od komórek prawidłowych przede wszystkim bezustannym i niekontrolowanym podziałem. Celem stosowania większości terapeutyków jest zahamowanie procesu podziału tych komórek. Z tego względu najlepszym etapem cyklu komórkowego do tego typu działania wydaje się mitozę. Na etapie mitozy ma bowiem miejsce bardzo ważny, z punktu widzenia podziału komórki, proces jakim jest wytworzenie włókien wrzeciona kariokinetycznego, które składa się z mikrotubul, struktur białkowych występujących w większości komórek eukariotycznych. Mikrotubule zbudowane są z mniejszych elementów białkowych określanych mianem protofilamentów [8].

Mikrotubule zbudowane są z tubuliny, heterodimerycznego białka, na które składają się analogiczne podjednostki α - i β - tubuliny, każda o masie 50 kDa [7], tworzące razem heterodimer wielkości 8 nm [9]. Mikrotubule mają postać cylindra o średnicy 25 nm [10] z wydrążanym kanałem o średnicy 17 nm (Rys. 1) [9] a na ściany tegoż cylindra składają się wyżej wspomniane podjednostki tubuliny, które układając się naprzemiennie tworzą strukturę helikalną.



Rys. 1 Budowa mikrotubuli i heterodimeru α,β -tubuliny [9]

Każda mikrotubula składa się z 13 protofilamentów [11]. Struktury te, a tym samym i całe mikrotubule są strukturami spolaryzowanymi, których przeciwne końce określone są jako „plus” i „minus”. Według tych końców zorientowane są podjednostki α,β -tubuliny. Podjednostka α tubuliny skierowana jest do końca „minus”, natomiast podjednostka β układa się na końcu „plus” [8]. Końce mikrotubul również układają się w komórce w odpowiednim kierunku; koniec „minus” zakotwiczony jest niedaleko środka komórki, natomiast koniec „plus” wystaje ku jej powierzchni [7].

Mikrotubule są strukturami dynamicznymi. Na ich końcach zachodzą reakcje polimeryzacji w większym stopniu na końcu „plus” i reakcje depolimeryzacji przeważające na końcu „minus”, między którymi występuje stan równowagi dynamicznej, czyli ciągle przyłączanie i odłączanie dimerów tubulinowych.

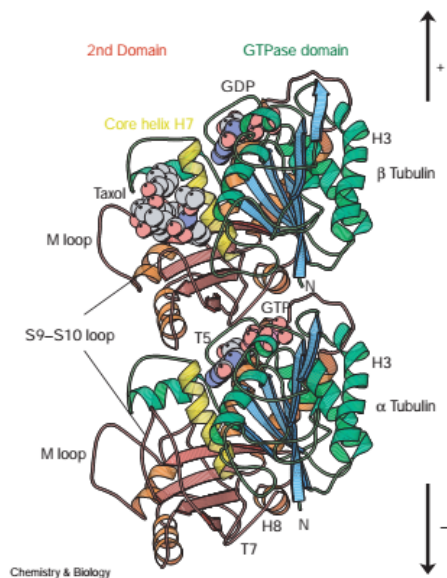
W zależności od tego jak przesunie się równowaga dynamiczna pomiędzy tymi reakcjami, dochodzi do skracania bądź wydłużania mikrotubul. Na stan równowagi dynamicznej ma z kolei wpływ stężenie wolnych heterodimerów α i β -tubuliny w cytoplazmie komórki. Przy niższych stężeniach heterodimerów dochodzi do skracania się mikrotubul, które zachowują z kolei swoją stałą długość przy zwiększających się stężeniach heterodimerów, ale zbyt wysokie ich stężenie prowadzi do przyrastania mikrotubul na obu końcach [10].

W nowo powstałych mikrotubulach, do których wytworzenia niezbędne są jony magnezu i białka MAP's, obecna jest również cząsteczka GTP, głównie z powodu niższego stężenia progowego dla polimeryzacji GTP-tubuliny niż GDP-tubuliny [7]. Kompleks GTP-heterodimer, występujący na końcu „plus”, zabezpiecza heterodimery α,β -tubuliny przed ich dysocjacją do mikrotubul i przez to powoduje ich stabilizację. Dodatkowo stanowi też czynnik sprzyjający wiązaniu kolejnych heterodimerów co prowadzi do wydłużania się mikrotubul. Hydroliza GTP do GDP destabilizuje strukturę i prowadzi do depolimeryzacji końców mikrotubul oraz hamuje przyłączanie kolejnych heterodimerów czego wynikiem jest proces skracania mikrotubul [10]. Jest to niezwykle ważny proces dla prawidłowego działania cytoszkieletu komórki oraz odpowiedniego działania wrzeciona kariokinetycznego przy podziale komórki w czasie mitozy.

2.2. Mechanizm działania taksolu

Stosowanie cytostatyków, a w tym także taksolu ma na celu zakłócenie procesu podziałowego komórki. Jednakże w odróżnieniu od pozostałych terapeutyków, taksol nie hamuje polimeryzacji mikrotubul, przeciwnie, stabilizuje utworzone już mikrotubule [2], hamując depolimeryzację i to pomimo procesu hydrolizy GTP do GDP w cząsteczce tubuliny. W efekcie tego dochodzi do blokady wrzeciona kariokinetycznego, mikrotubule nie ulegają skróceniu, co powoduje nieprawidłowy podział komórki a w konsekwencji jej śmierć [12].

Jako, że działanie cytostatyczne taksolu dotyczy ruchu wrzeciona kariokinetycznego, fazą cyklu komórkowego w jakiej działa ta substancja jest faza G2 lub M, podczas której cząsteczka diterpenu łączy się z β -tubuliną na końcu „plus” mikrotubul (Rys. 2) [12-14].



Rys. 2 Budowa cząsteczki krowiej α - β tubuliny. Strzałki pokazują orientację monomerów α i β względem końców mikrotubuli [14]

Cząsteczka β -tubuliny w swojej drugiej globularnej domenie posiada pewnego rodzaju „kieszonkę”, która stanowi miejsce łączenia taksolu do cząsteczki tubuliny. Miejsce to zawiera szereg reszt aminokwasowych decydujących o przyłączeniu cząsteczki taksolu, w szczególności dotyczy to cząsteczki Asp226 β -tubuliny. Analogiczne miejsce występuje także w α tubulinie, ale różni się od poprzedniego rodzajem reszt aminokwasowych [8].

Stabilność mikrotubul zależy od działania wiązań podłużnych jak i poprzecznych. Podczas hydrolizy GTP do GDP dochodzi do utraty reszty γ -fosforanu, co osłabia wiązanie między dimerami. Taksol przyłączony do cząsteczki β -tubuliny rekompensuje to osłabienie wzmacniając wiązania boczne [8].

Oprócz stabilizowania powstałych już mikrotubul taksol indukuje również polimeryzację kolejnych mikrotubul poprzez obniżenie stężenia krytycznego tubulin prawie do 0 mg/ml i poprzez skrócenia czasu potrzebnego do polimeryzacji niezależnie od obecności czy braku niezbędnych czynników takich jak GTP, MAPs, Mg^{2+} [6].

Jak się okazuje nie bez znaczenia jest moment, w którym taksol zostanie dodany do mikrotubul, czyli czy dzieje się to przed czy po procesie polimeryzacji. Taksol, działający na mikrotubule już utworzone nie wywołuje w nich większych zmian. Znacznie większe zmiany występują w mikrotubulach,

których polimeryzacja została zaindukowana taksolem. W tym przypadku różnią się one znacznie od tych powstałych w warunkach normalnych, wykazując odporność na czynniki, które w przypadku normalnie działających mikrotubul wywołują depolimeryzację. Odporność ta przyczynia się do większej stabilności mikrotubul, przez co stają się one strukturami niefunkcjonalnymi [15, 16].

Stabilizujące działanie taksolu na mikrotubule nie jest jednak jak się okazuje jedynym mechanizmem prowadzącym do śmierci komórek nowotworowych. Dane literaturowe podają, iż skuteczność ta nie wynika jedynie z działania tego związku na tubulinę, ale także na białko Bcl-2, które w prawidłowo funkcjonujących komórkach, hamuje procesy apoptotyczne [13, 17-19].

2.3. Efekty stosowania taksolu w terapii nowotworów

Stosowanie taksolu podobnie jak i innych cytostatyków w chemioterapii wiąże się z szeregiem efektów ubocznych. Taksol wpływa przede wszystkim na poziom komórek krwi wywołując między innymi neutropenię, granulocytopenię jak i inne dolegliwości takie jak arytmia serca, a także możliwość wystąpienia zaburzeń w procesie wytwarzania komórek rozrodczych [20]. Mimo tego podjęto próby leczenia niektórych chorób nowotworowych taksolem, spośród których najlepsze odpowiedzi na leczenie uzyskano w przypadku raka jajnika i raka piersi.

Stosowanie taksolu jako samodzielnego leku w przypadku pacjentek opornych na leczenie innymi terapeutykami jak cisplatyna czy doksorubicyna zaowocowało całkowitą lub częściową odpowiedzią. U pacjentek cierpiących na raka jajnika zanotowano częściową bądź całkowitą odpowiedź u 16-48% kobiet, natomiast odsetek odpowiedzi na leczenie raka piersi wynosił 25-61% [20].

Próbowano jednak szukać nowych rozwiązań, które pozwalałyby na zmniejszenie dawki taksolu przy równoczesnym zmniejszeniu efektów ubocznych i braku zmniejszenia skuteczności leczenia. Rozwiązaniem okazało się stosowanie taksolu w połączeniu z innymi lekami stosowanymi w chemioterapii.

Po raz pierwszy zastosowano taksol w kombinacji z karboplatiną u kobiet nieleczonych wcześniej na raka jajnika. Wyniki okazały się zaskakujące; stwierdzono aż 75% pozytywnych odpowiedzi na leczenie, w tym 67% stanowiły odpowiedzi całkowite [3]. Obiecujące wyniki uzyskano również przypadku trójskładnikowego układu taksol/karboplatyna/gemcitabina. Jego stosowanie u pacjentek wcześniej nieleczonych dało 100% odpowiedzi, w tym 58% całkowitych remisji i 42% remisji częściowych, dlatego też Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ASCO) przedstawiło ten model jako podstawowy w leczeniu raka jajnika w stadium IIB-IV [3].

Inny przykład terapii przeprowadzonej w ostatnim czasie zakładał działanie na komórki raka piersi taksolem i epirubicyną czego efektem było 73% częściowej odpowiedzi na terapię oraz 86% odpowiedzi całkowitej [21].

Zainteresowaniem naukowców cieszyła się również terapia łącząca taksol z cisplatyną, której poddano kobiety w zaawansowanym stadium raka jajnika. W tym przypadku pojawiły się dwie potencjalne możliwości leczenia. Nad pierwszą pracowała Grupa Onkologii Ginekologicznej (GOG), nad drugą zaś zespół europejsko-kanadyjski złożony z Europejskiej Organizacji Badań i Leczenia Raka oraz Instytutu Raka Kanady. W przypadku obu grup badawczych metodyka badań obejmowała podawanie zwiększonych dawek taksolu oraz mniejszych dawek cisplatyny. Różnice natomiast dotyczyły stadium choroby, w którym prowadzono terapię; w przypadku GOG leczeniem objęto grupy chorych w III i IV stadium choroby, natomiast druga grupa badawcza prowadziła leczenie na grupie pacjentów w stadium chorobowym IIB-IV. Wyniki obu grup były podobne, 70% stanowiły odpowiedzi całościowe, a ponad 50% stanowiły odpowiedzi pełne [3]. Oprócz wymienionych przykładów, bada się również możliwość leczenia taksolem w połączeniu z radioterapią w przypadku takich chorób nowotworowych jak rak płuc [22].

3. Otrzymywanie taksolu

3.1. Izolacja taksolu i problemy z nią związane

Wraz z dostrzeżeniem w taksolu nowej nadziei w terapii chorób nowotworowych gwałtownie wzrosło zainteresowanie tym specyfikiem. Naturalnym i najobfitszym źródłem jego występowania jest *Taxus brevifolia*, z którym początkowo wiązano największe nadzieje, jeżeli chodzi o pozyskiwanie tego leczniczego diterpenu. Jednakże ilości taksolu zawarte w jego korze są zbyt małe, aby pokryć wciąż rosnące zapotrzebowanie pacjentów. Przykładowo, kilogram kory *T. brevifolia* zawiera od 100 do 150 mg taksolu i jest to ilość wystarczająca do wyprodukowania 1 kg leku dla 500 pacjentów, a potrzebnych jest do tego około 3 000 drzew [3]. Dodatkowym utrudnieniem jest również fakt, iż osobniki danego gatunku cisa mogą różnić się zawartością taksoidów. W celu ujednolicenia i tym samym zwiększenia ilości uzyskiwanych taksoidów, wykorzystano metodę mikrorozmnażania, gdzie przeprowadza się selekcję osobników, wykazujących dużą zdolność do syntezy taksoidów, a następnie poddaje się je klonowaniu *in vitro*. Następnie pobiera się pąki lub gałązki z węzłami, które umieszcza się w pożywce. Po pewnym czasie powstają pędy, które się odcina i przenosi do podłoża, zawierającego auksyny, co sprzyja wzrostowi korzeni, dzięki czemu powstają sadzonki roślin o ujednoliconym wytwarzaniu taksolu [4].

Kolejny problem w pozyskiwaniu taksolu stanowi sam proces izolacji. W cisach występuje ponad 350 związków chemicznych, należących do grupy taksoidów; wśród tych związków, w mniejszości, znajduje się również taksol. Po przeprowadzeniu procesu izolacji, z biomasy otrzymywana jest frakcja zawierająca cały szereg związków ze szkieletem taksanu. Taki sposób jego pozyskiwania jest więc nisko opłacalny ze względu na otrzymywanie małych ilości pożądanego związku a także konieczność przeprowadzania kosztownych procesów jego oczyszczania [23].

Alternatywnym rozwiązaniem okazała się szybka piroliza typu Waterloo, która jest procesem ciągłym, z bardzo krótkim czasem emisji, a przede wszystkim koszty jej przeprowadzenia są niskie. Przebiega ona z wykorzystaniem mniejszych ilości drogich rozpuszczalników w porównaniu do ilości stosowanych w metodzie tradycyjnej. Podczas tego procesu, przez krótki czas i w wysokiej temperaturze, dochodzi do odparowania wody i związków lotnych z biomasy, w wyniku czego powstaje płynny produkt w postaci smoły, zawierający jedynie nietlotne związki o wysokiej masie cząsteczkowej [24]. W 2001 roku Cass i wsp. [24] przeprowadzili próbę izolacji taksoidów z próbek biomasy roślinnej *Taxus canadensis* z wykorzystaniem szybkiej pirolizy i z 42 g biomasy uzyskiwano zwykle (wliczając straty) 24 g ciekłego produktu, 12 g zwęglonego materiału i 6 g gazu.

3.2. Biotechnologiczna produkcja taksolu i taksoidów

Przy mało wydajnej i nisko opłacalnej izolacji taksolu z biomasy roślinnej, skupiono uwagę na jego produkcji z użyciem metod biotechnologicznych. Stanowią one doskonałą alternatywę syntezy chemicznej taksolu, a zainteresowanie nimi stale rośnie.

Najkorzystniejszymi metodami zarówno pod względem ilościowym jak i ekonomicznym są kultury komórkowe [25]. Stanowią one nieprzerwane i nieograniczone źródło pożądanых produktów, eliminując przy tym problemy, jakie można napotkać przy pozyskiwaniu taksolu z surowca roślinnego. Hodowlę prowadzi się tak, aby doszło do wytworzenia kalusa czyli tkanki przyrannej. Otrzymuje się ją przez działanie mieszaniną auksyn i cytokinin na komórki roślinne, które w warunkach takiej hodowli nie przechodzą podziałów, nie tworząc tym samym organów rośliny. Mimo iż produkcja kalusa może odbywać się z dowolnej części rośliny, to preferuje się komórki merystematyczne oraz igły cisów, ponieważ te elementy są najbardziej produktywne [4].

Wytwarzanie taksolu przez kalus można zwiększać, stosując związki określane jako elicytory, które podnoszą jego stężenie w komórkach kalusa odpowiedniego gatunku *Taxus*. Elicytory to biotyczne lub abiotyczne związki, stymulujące odpowiedź odpornościową roślin [4]. Zaobserwowano, że działanie

takich elicytorów jak jasmonian metylu (MJ) na zawiesinę kultur komórkowych *Taxus baccata* L. indukuje aktywność syntazy difosforanu geranylogeraniolu [26,27].

Elicytory grzybowe, jak np. oligosacharyd pozyskiwany z *Fusarium oxysprum* są również bardzo skuteczne w zwiększaniu produkcji taksolu. Przykładowy oligosacharyd zwiększa intensywność stresu oksydacyjnego [28]. Badane jest również jego działanie na ekspresję genów związanych z mechanizmami obronnymi rośliny, w tym przypadku *T. chinensis*. Aktywując te mechanizmy sprzyja się wytwarzaniu wtórnego metabolitu o działaniu przeciwrzybicznym jakim w tym przypadku jest taksol [29].

Badania z udziałem kultur *T. chinensis* wykazały również, że produkcja taksolu jest większa po działaniu mieszaniną kwasu salicylowego i elicytorów grzybowych, w porównaniu do procesu otrzymywania taksolu pod wpływem samych elicytorów grzybowych [30].

Z zastosowaniem kalusa nie można jednak otrzymywać każdego rodzaju metabolitu. Część metabolitów wtórnych nie jest wytwarzana przez kalus, mimo że ich proces syntezy jest związany z procesem różnicowania komórek. W takim przypadku doprowadza się do powstania nowych pędów, poprzez działanie cytokininami na komórki lub do powstania nowych korzeni poprzez działanie auksynami. W ten sposób otrzymuje się hodowle, z których izoluje się linie wykazujące największą wydajność biosyntezy, będące w kolejnym etapie hodowli podstawą do utworzenia kultur roboczych. Dla zwiększenia procesu syntezy taksolu w hodowlach, miesza się linie komórkowe różniące się wydajnością biosyntezy tego związku. Wykazano bowiem, że taki sposób prowadzenia hodowli jest o wiele wydajniejszy, niż prowadzenie hodowli każdej linii komórkowej osobno. Prawdopodobnie wynika to z pobudzania linii mniej wydajnych przez linie wydajniejsze, w konsekwencji czego dochodzi do nadprodukcji taksolu [4].

3.3. Semisynteza taksolu

Proces semisyntezy taksolu pokrywa obecnie większość zapotrzebowania na ten terapeutyk. Wykorzystuje się tu pozyskiwaną z roślin bakkatynę III jak również 10-deacetylobakktynę (10-DAB), występującą w gatunku *Taxus baccata* [31]. Jest to związek łatwo dostępny ale przede wszystkim posiada on charakterystyczną strukturę chemiczną, typową dla wszystkich taksoidów, w tym także taksolu [5]. Są to przede wszystkim podstawowy pierścień, wszystkie niezbędne grupy funkcyjne oraz poprawna stereochemia. Jedynym elementem różniącym cząsteczkę 10-DAB od cząsteczki taksolu jest brak łańcucha bocznego (2S,3R)-N-benzoilofenyloizoseryny [3].

Obecność (2S,3R)-N-benzoilofenyloizoseryny w cząsteczce taksolu jest niezwykle ważna z tego względu, że odpowiada ona za jego łączenie się z odpowiednim miejscem β -tubuliny. Konieczne jest, aby ten aminohydroksykwasy był syntetyzowany w postaci diastereoizomeru, ponieważ ta forma w porównaniu z innymi stereoizomerami jest najbardziej aktywna [3]. Proces semisyntezy tego łańcucha bocznego opiera się na jego syntetycznym otrzymaniu a następnie jego estryfikacji poprzez przyłączenie go do cząsteczki 10-DAB, u której zablokowano grupy funkcyjne C-7 i C-10. Po procesie estryfikacji grupy te zostają odblokowane i dodatkowo prowadzona jest hydroliza powstałej pochodnej [3].

W reakcji semisyntezy bardzo przydatny okazał się cytochrom P450, który pośredniczy w hydrolizie β -fenyloalanylo-bakktyny III do fenyloizoserynobakktyny III, czyli reakcji, która jest przedostatnim etapem w procesie syntezy taksolu [32]. Tego typu mechanizm pośredniczący znalazł również zastosowanie na etapie 5α -hydroksylacji taksadienu w taksadien- 5α -ol [31].

W 2007 roku wykazano współekspresję wyizolowanych z gatunku *Taxus* enzymów: reduktazy cytochromu P450 i oksygenazy cytochromu P450, które biorą udział w biosyntezie taksolu w komórkach drożdżowych na szlaku bakktyny III [33].

Podejmowano również próby totalnej syntezy taksolu, jednak ze względu na skomplikowaną budowę tego związku metoda ta jest nisko opłacalna i nie jest brana pod uwagę jako sposób jego masowej produkcji [3].

Literatura

1. Kingston D.G.I., 2007, *The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds*, *Phytochemistry* 68, 1844-1854
2. Foss M., Wilcox B.W.L., Alsop G.B., Zhang D., 2008, *Taxol crystals can masquerade as stabilized microtubules*, *Plos One* 1, 1-6
3. Markowska J., Kacprzak K., Koroniak H., 1999, *Na pograniczu chemii i biologii*, Wydawnictwo Naukowe im. Adama Mickiewicza, Poznań, 317-335
4. Szoka Ł., 2009, *Metody biotechnologiczne w otrzymywaniu taksolu- cytostatycznego diterpenu cisów (Taksus)*, *Gazeta Farmaceutyczna* 9, 34-36
5. Hampel D., Mau C.J.D., Croteau R.B., 2009, *Taxol biosynthesis: Identification and characterization of two acetyl CoA: taxoid-O-acetyl transferases that divert pathway flux away from Taxol production*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 487, 91-97
6. Jaszek K., 1995, *Wpływ ekstraktów etanolowych z Taxus x media „Hicksii” i Thuja occidentalis „Aurea” na poziom enzymów i żywotność grzybów Pholiota nameko i Grifola frondosa oraz kultur leukocytów*, Praca magisterska, Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej, Lublin, 10-19
7. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2007, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 723

8. Amos L.A., Löwe J., 1999, *How taxol stabilizes microtubule structure*, Chemistry and Biology 6, 65-69
9. Hawkins T., Mirigian M., Selcuk Yasar M., Ross J.L., 2010, *Mechanics of microtubules*, Journal of Biomechanics 43, 23-24
10. Kilarski W., 2005, *Strukturalne podstawy biologii komórki*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 294
11. Arnal I., Wade R.H., 1995, *How does taxol stabilize microtubules?* Current Biology 5, 900-908
12. Luo T., Wang J., Yin Y., Hua H., Jing J., Sun X., Li M., Zhang Y., Jiang Y., 2010, *(-)Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma*, Breast Cancer Research, 12, 1-10
13. Ganesh T., Guza R.C., Bane S., Ravindra R., Shanker N., Lakdawala A.S., Snyder J.P., et al., 2004, *The bioactive Taxol conformation on α -tubulin : Experimental evidence from highly active constrained analogs*, Proceedings of the National Academy of Science, 101, 10006-10011
14. Nogales E., Wolf S., Downing K.H., 1998, *Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography*, Nature, 391, 199-203
15. Andreau J.M., Bordas J., Diaz J.F., Garcia de Ancos J., Gil R., Medrano F.J., 1992, *Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from pure tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules*, Journal Molecular Biology, 226, 169-184
16. Ray S., Meyhöfer E., Miligan R.A., Howard J., 1993, *Kinesin follows the microtubule's protofilament axis*, The Journal of Cell Biology, 121, 1083-1093
17. Fang G.F., Chang B.S., Kim C.N., Perkins C., Thompson C.B., Bhalla K.N., 1998, *"Loop" domain is necessary for taxol- included mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-included cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis*, Cancer Research, 58, 3202-32
18. Rodi D.J., Janes R.W., Sanganee H.J., Holton R.A., Wallace B.A., Makowski L., 1999, *Screening of library of peptide-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a taxol-binding protein*, Journal Molecular Biology, 285, 197-203
19. Liu K., Cang S., Ma Y., Chiao J.W., 2013, *Synergistic effect of paclitaxel and epigenetic agent phenethyl isothiocyanate on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells* Synergistic effect of paclitaxel and epigenetic agent phenethyl isothiocyanate on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells, Cancer Cell International, 13, 1-7
20. Pawluk K., 1995, *Badanie żywotności i enzymatyki grzybów *Flamulina velutipes* i *Lentinus edodes* oraz kultur leukocytów rosnących w obecności ekstraktów etanolowych z *Taxus x media* „*Hicksii*” i *Thuja occidentalis* „*Aurescens*”*, Praca Magisterska, Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej, Lublin, 11-20
21. Fountzilas G., Dafni U., Bobos M., Batistatou A., Kotoula V., Trihia H., Malamou-mitsi V., et al., 2012, *Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without Paclitaxel*, Plos One 7, 1-13

22. Li G., Zhao J., Peng X., Liang J., Deng X., Yuxiang C., 2012, *Radiation / Paclitaxel treatment of p53-abnormal non-small cell lung cancer xenograft tumor and associated mechanism*, Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 27, 227-233
23. Engels B., Dahm P., Jennewein S., 2008, *Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production*, Metabolic Engineering 10, 201-206
24. Cass B.J., Piskorz J., Scott D.S., Legge R.L., 2001, *Challenges in isolation of taxanes from Taxus canadensis by fast pyrolysis*, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 57, 275-285
25. Naill M.C., Kolewe M.E., Roberts S.C., 2012, *Paclitaxel uptake and transport in Taxus cell suspension cultures*, Biochemical Engineering Journal, 15, 50-56.
26. Lenka S.K., Boutaoui N., Paulose B., Vongpaseuth K., Normanly J., Roberts S.C., Walker E.L., 2012, *Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing Taxus cuspidata suspension culture cells*, BMC Genomics, 13, 1-10
27. Frense D., 2007, *Taxanes: perspectives for biotechnological production*, Applied Microbiology and Biotechnology 73, 1233-1240
28. Yuan Y-J., Li Ch., Hu Z-D., Wu J-Ch., 2002, *A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of Taxus chinensis var. mairei induced by oligosaccharide from Fusarium oxysprum*, Enzyme and Microbial Technology 30, 774-778
29. Ebel J., Mithorer A., 1998, *Early events in the elicitation of plant defense*, Planta, 206, 335-348
30. Khosroushahi A.Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosorowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omid Y., 2006, *Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of Taxus baccata*, Cell Biology International 30, 263
31. Ajikumar P.K., Xiao W.H., Tyo K.E J., Wang Y., Simeon F., Leonard E., Mucha O., Phon T.H., Pfeifer B., Stephanopoulos G., 2010, *Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in Escherichia coli*, Science, 330, 70-74
32. Long R.M., Croteau R., 2005, *Preliminary assessment of the C 13-side chain 2'-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis*, Biochemical and Biophysical Research Communications 338, 410-417
33. DeJong J.M., Liu Y.L., Bollon A.P., Long R.M., Jennewein S., Williams D., Croteau R., 2006, *Genetic engineering of Taxol biosynthetic genes in Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology and Bioengineering 93, 212-224

Recenzent pracy: dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Taksol – cząsteczka nadziei w leczeniu nowotworów

Streszczenie

Taksol to diterpenoid należący do grupy taksoidów, charakteryzujących się obecnością pierścienia taksanowego i wytwarzanych we wszystkich gatunkach cisa. Taksol jest cennym terapeutycznym wykorzystywanym w leczeniu różnego rodzaju nowotworów, a przede wszystkim raka jajnika i piersi. Antymiotyczny mechanizm jego działania w przeciwieństwie do innych cytostatyków opiera się na hamowaniu depolimeryzacji mikrotubul cytoszkieletu komórki. Zawartość taksolu w roślinach jest jednak niewielka i nie występuje w połączeniu z innymi taksoidami, stąd pozyskiwanie tego związku ze źródeł naturalnych jest kosztowne oraz szkodliwe dla środowiska naturalnego. Wydaje się, że najbardziej obiecującą metodą wytwarzania taksolu są kultury komórkowe, gdzie wykorzystuje się tkankę przyranną – kalus, w której dodatkowo zwiększa się wydajność procesu biosyntezy poprzez zastosowanie dodatku elicytorów. Innymi interesującymi metodami pozyskiwania taksolu jest także proces semisyntezy oraz pirolizy, jest on jednak wieloetapowy i bardzo kosztowny.

Słowa kluczowe: taksol, rak piersi, mikrotubule

Taxol – a molecule of hope for antitumor treatment

Abstract

Taxol, a diterpenoid belonging to taxanes, a group characterized by the presence of taxane ring, is produced by every yew species. Taxol is a valuable drug showing activity against various types of cancer, first of all ovary and breast cancer. Antimitotic mechanism of its working other than typical cytostatics bases on stabilizing the microtubule cytoskeleton against depolymerization. However, amount of taxol in plants is very low and this compound occurs in mixture of other taxanes. The isolation of taxol from natural sources is expensive and harmful to the environment. The most promising methods of taxol production are callus cell cultures enhancing by the addition of elicitors. Other interesting methods of taxol production are semisynthesis and pyrolysis but these processes are multistep and costly.

Keywords: taxol, breast cancer, microtubules

Kinga Kropiwiec¹, Marcin Hałabis², Mikołaj Firlej³, Marcin Letkiewicz⁴,
Damian Iwon⁵, Janusz Greszta⁶

Wpływ hierarchii społecznej prosiąt na ich behavior

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój badań dotyczących behavioru zwierząt. Obok aspektów poznawczych, mają one bardzo duże znaczenie dla praktyki hodowlanej, sprzyjają bowiem doskonaleniu systemów utrzymania i użytkowania zwierząt [1]. Jednym z elementów zapewnienia dobrostanu jest stworzenie warunków umożliwiających zwierzęciu wyrażanie swoich naturalnych zachowań [2]. Behavior zwierząt stanowi najbardziej miarodajne źródło informacji o stopniu tolerancji warunków bytowych. Jakościowa i ilościowa ocena odchyień reakcji behawioralnych od normy stanowi ważne wskazanie, co do konieczności modyfikacji systemu technologicznego. Im więcej osobników przejawia zaawansowane stany patologiczne, tym pilniejsze jest dokonanie określonych zmian w otoczeniu zwierząt. Ponadto eliminacja sytuacji stresogennych u świń ma wpływ na ekonomikę produkcji oraz jakość wieprzowiny.

1. Przegląd literatury

Behavior (zachowanie się) jest łącznikiem pomiędzy układem nerwowym a otoczeniem zwierzęcia, objawia się swoistą reakcją organizmu na dany czynnik. Każdy gatunek cechują różne formy zachowań, wszystkie formy występujące u danego gatunku tworzą jego etogram [1]. Behavior zwierząt tworzy się przez pozyskiwanie przez narządy zmysłowe informacji z otoczenia [3], przetwarzanie ich przez struktury nerwowe i tworzenie konkretnych, powtarzalnych form zachowań. Jednak wciąż zmieniające się

¹ kingakdawidy@op.pl, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń,

² marcinhalabis@interia.pl, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń,

³ miki91_91@o2.pl, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń,
⁴ marcin1247@gmial.com Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń,

⁵ damianiwon@onet.pl Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń,

⁶ januszgreszta123@gmail.com, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, KNBiHZ,
Sekcja Hodowli i Biotechnologii Świń

warunki otoczenia prowadzą do ewolucji zachowań gatunkowych. Dodatkowo dzięki znacznej zmienności osobniczej kształtuje się zjawisko bioróżnorodności.

2. Behavior *Sus scrofa domestica*

2.1. Czynniki wpływające na zachowania gatunkowe świń

Istotny wpływ na kształtowanie form behavioru świń mają czynniki [4]:

- 1) **wewnętrzne:** podłoże genetyczne, rasa, wiek, płeć, masa ciała, stan fizjologiczny;
- 2) **zewnętrzne:** mikroklimat i urządzenia wewnętrzne pomieszczeń, technologia i organizacja chowu, zagęszczenie w kojcu, poziom higieny i profilaktyki oraz relacje zwierzę – człowiek.

Czynniki wewnętrzne są czynnikami niezależnymi od człowieka. Szczegółne widoczne jest to w przypadku odmiennych zachowań prosiąt różnej rasy bądź płci. Jak wynika z badań [5] lochy rasy puławskiej wykazują większą aktywność motoryczną i częściej zajmują miejsce przy korycie niż świni rasy wielkiej białej polskiej. Inne badania dowodzą, że samice są bardziej płochliwe, jednak cechują się większą troskliwością o potomstwo, łagodniejszym temperamentem, większą uległością w stosunku do innych osobników. Osobniki męskie są bardziej agresywne, mają silniejszą potrzebę dominowania nad innymi osobnikami [6]. Hodowca może jednak istotnie wpływać na czynniki zewnętrzne. Niewłaściwa postać wszystkich czynników zewnętrznych powoduje powstanie sytuacji stresogennej. Stres jako czynnik „którego działanie powoduje przekroczenie zdolności adaptacyjnych organizmu” [7] prowadzi do zaburzenia homeostazy. Podstawowymi objawami pierwszej fazy stresu są: pobudzenie nerwowe, podniesienie ciśnienia krwi, hiperglikemia, wzrost temperatury, co w konsekwencji prowadzi do osłabienia organizmu. Długotrwałe utrzymywanie się stresu o wysokim poziomie powoduje zmiany patologiczne działania nadnerczy, kończące się zmianami nieodwracalnymi i śmiercią [8]. Dlatego ze względów ekonomicznych wynikających z wyższej użytkowości zwierząt, zaleca się aby hodowcy wprowadzali systemy przyjazne zwierzętom umożliwiające eliminację czynników stresogennych oraz zapewniające osobnikom wyrażanie wrodzonych i utrwalonych form zachowania np. rycie, budowa gniazda.

Na modyfikację zachowań świń wpływa również ingerencja w strukturę stada. w każdej grupie technologicznej tj. prosięta ssące, warchlaki, prosięta odłączone od matki, tuczniki, jak również lochy i knury, można zaobserwować charakterystyczne odmienne zachowania. Zachowaniem wspólnym dla tych wszystkich grup są zachowania związane z strukturą hierarchiczną występującą

w utrzymywaniu grupowym. Zaburzenie hierarchii stada może doprowadzić do wystąpienia agresji. Najczęściej spotykanymi przyczynami zachowań agresywnych u świń utrzymywanych grupowo jest: nadmierne zagęszczenie, różny stopień pokrewieństwa osobników [9], rasa, niewłaściwe żywienie – źle zbilansowana dawka żywieniowa bądź brak wody do picia [10]. Zgodnie z Ustawą o ochronie zwierząt z dn. 21.08.1997 r. (wraz z późn. zm.) oraz ustawą MRiRW z dn. 15.02.2010 r. w sprawie wymagań i postępowania przy utrzymywaniu zwierząt gospodarskich, dla których normy ochrony zostały określone w przepisach UE (Dz. U. 2010, nr 56, poz. 344 ze zm.), świniom powinny mieć zapewnioną odpowiednią powierzchnię kojca. Ponadto świniom zapewnia się stały dostęp do materiałów i przedmiotów absorbujących ich uwagę [11], w szczególności słomy, siana, drewna i trocin, o jakości niewywierającej szkodliwego wpływu na ich zdrowie. Wszystkim zwierzętom należy zapewnić możliwość jednoczesnego pobierania paszy oraz dostęp do pasz objętościowych, które zaspokajają głód i potrzebę żucia. Tworząc nową grupę (przebywająca w jednym kojcu), należy dobierać zwierzęta zbliżone wiekowo i o podobnej masie ciała. z obserwacji własnych wynika, że osobniki włączonych grupach powinny być w tej samej rasy [9]. W celu zminimalizowania agresji proces łączenia należy dokonywać w porach wieczornych, kiedy zwierzęta są zmęczone i śpiące. Osobniki agresywne, ranne, chore i słabsze powinny być eliminowane z grupy, zwierzęta takie można czasowo utrzymywać pojedynczo [12]. Zmniejszenie agresji u świń, np. poprzez obcinanie ogonów, podawanie leków uspokajających mogą być stosowane dopiero po wykorzystaniu powyżej opisanych metod [13].

2.2. Hierarchia stada

Każda grupa technologiczna świń utrzymywana grupowo wykazuje określony behavior wynikający min. ze struktury hierarchicznej występującej w danej grupie [4]. Osobniki każdej grupy możemy zakwalifikować do jednego z pięciu poziomów hierarchicznych:

- 1) **dominanty** – osobniki chętnie podejmujące walkę i zazwyczaj wygrywające;
- 2) **subdominanty** – osobniki stające do walki chętnie, walczące zawzięcie, ustępujące tylko dominantom;
- 3) **podporządkowane** – osobniki niezbyt często stające do walki, gdy już podejmą walkę przegrywają tylko ze zwierzętami wyższymi rangą;
- 4) **opanowane** – osobniki rzadko walczące lecz przeważnie przegrywające walki;
- 5) **marginesowe** – osobniki unikające walk lub podejmujące je sporadycznie i z reguły przegrywające.

Specyficzne zachowania kształtują się zaraz po urodzeniu, i towarzyszą przez cały okres życia. Pierwszy układ hierarchiczny zaobserwować można już po urodzeniu się prosiąt, oseski starają się wtedy zająć przednie, najbardziej mleczne sutki [14]. Prosięta, którym uda zająć się te sutki są prosiętami dominującymi. Ich władzę można zaobserwować także podczas zajmowania miejsca legowiskowego, osobniki dominujące zajmują miejsca pośrodku grupy, gdzie panują najkorzystniejsze warunki termiczne. Na obrzeżach grupy znajdują się osobniki o niskiej pozycji socjalnej. w niekorzystnych warunkach termicznych zwierzęta leżące na obwodzie grupy szybko się ochładzają, budzą i – w celu ogrzania – próbują się dostać do jej środka. Takie próby zmiany miejsca leżenia trwają dopóki na zewnątrz leżącej grupy nie znajdzie się osobnik z wyższego poziomu w hierarchii. Jego gwałtowne powstanie powoduje poruszenie w całej grupie i układanie się w legowisku na nowo, z osobnikami dominującymi zajmującymi znów miejsca środkowe.

Po odsadzeniu prosiąt ów porządek suthkowy oraz legowiskowy nadal odgrywa ważną rolę. Nowy porządek zostaje ustalony podczas tworzenia grupy warchlaków z prosiąt pochodzących z różnych miotów [15]. Zróżnicowanie osobników powoduje powstanie gwałtownych walk mających na celu wyłonienie zwierząt dominujących a tym samym ustalona zostaje nowa hierarchia w grupie. Ustalona struktura jest jednak stosunkowo stabilna. Niewielkie zmiany w szeregu dominacyjnym, następują dopiero po zaistnieniu głębokich zmian w środowisku bytowym.

Świnie rozpoznają się zarówno wzrokowo, jak i węchowo. Co ciekawe, usunięcie jakiegokolwiek świni z ustalonej grupy nie zmienia wcześniej ustalonego porządku nadrzędności u pozostałych zwierząt. Istnieją doniesienia [16], że dominant po powrocie do grupy po 25-dniowej nieobecności nadal będzie prosięciem „alfa”, natomiast zaledwie 3 dniowa nieobecność osobnika marginesowego może wywołać walki po powrocie do grupy.

3. Material i metody

Obserwacje bezpośrednie przeprowadzono w indywidualnym gospodarstwie rolnym z terenu Lubelszczyzny specjalizującym się w hodowli trzody chlewnej. Gospodarstwo realizuje Program Ochrony Zasobów Genetycznych Świń Rasy Puławskiej. Stado znajduje się pod stałą opieką weterynaryjną, warunki utrzymania i żywienia są zgodne z wymaganiami dobrostanu określonymi odpowiednimi ustawami [16].

Obserwacje bezpośrednie przeprowadzono na dwóch miotach rasy puławskiej w wieku 21-28 dni:

- I. 16 sztuk prosiąt
- II. 16 sztuk prosiąt

Matki obu miotów były wolne od zmutowanego allelu genu podatności na stres genu stresowości. Ojcem wszystkich prosiąt był ten sam knur 0 genotypie CC w locus RYR1.

Całość doświadczenia wykonano w następujących etapach:

- 1) Obserwacja prosiąt podczas ssania oraz odpoczynku w celu zaklasyfikowania prosiąt do danego poziomu hierarchicznego (ok. 3prosiąt na jeden poziom) – długość trwania 2 dni.
- 2) Obserwacja zachowania prosiąt w I i II grupie badawczej – długość trwania obserwacji – 4 godziny.
- 3) Obserwacja zachowania osobników podczas połączenia prosiąt z miotu I miotu II w jedną grupę – długość obserwacji ok. 8 godzin.
- 4) Badania zastały przeprowadzone za pomocą obserwacji bezpośredniej oraz przy wykorzystaniu specjalnie przygotowanego etogramu, w którym określono:
 - 1. lokomotorykę, beczynność oraz eksplorację:** stanie, sen, leżenie, chodzenie, bieganie, rycie ściółki, gryzienie słomy.
 - 2. pobieranie pokarmu i defekacje:** ssanie, pobieranie paszy, pobieranie wody, oddawanie kału, oddawanie moczu.
 - 3. interakcje fizyczne i socjalne:** trącanie się nosami, oobskakiwanie, szczypanie szyi i barków, pchanie, walka.
 - 4. anomalie behawioralne:** obgryzanie ogrodzenia, lizanie ścian, uderzanie głową w ogrodzenie, zabawa różnymi przedmiotami w kojcu, obgryzanie ogonków, obgryzanie uszu.

4. Wyniki i ich omówienie

Kat. zachowania \ Czas obserwacji		1 godz. obserwacji					2 godz. obserwacji					3 godz. obserwacji					4 godz. obserwacji				
		D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M
LOKOMOTORYKA A BEZCZYNNOŚĆ EKSPLORACJA	stanie	3	2	2								3	2	2			3	2	2		
	sen	1	1			1	3	3	3	5	3		2				5	4	4	4	4
	leżenie	1	3	3	2	3	3	3	3	6	3	3	3	3	3	3	3	7	3	3	3
	chodzenie	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	bieganie	2				2	1				1	2				1	1	1		0	1
	rycie ściółki,			3				1													
	gryzienie słomy			2				1													
POBIERANIE POKARMU I DEFEKACJE	ssanie	9	8	5	7	3		2		1		8	8	7	6	5	9	8	5	7	3
	pobieranie pasz	2	2	2	1	1		1			2	1	2	3	3	2			2	2	
	pobieranie wody	2	2	2	1	1		1			2	1	2	3	3	2			2	2	
	oddawanie kału	1		1		2						4		1			3		1		
	oddawanie moczu		1			1													1		
INTERAKCJE FIZYCZNE I SOCJALNE	trącanie się nosami,	9	8	7	7	4	2	3	1	1	1	8	9	7	7	3	3	2	1	4	3
	obskakiwanie,	9	9	7	7	3	2	3	1	1	1	9	9	7	7	3	3	2	1	3	3
	szczypanie szyi i barków	6	5	4		2	1	9	1	2	4	6	7	9	7	6	3	7	2	3	1
	pchanie	8	9	6	7	2	2	3	1	2	1	8	9	9	7	6	3	1	2	3	1
	walka		2	2					1	1		3	3								
ANOMALIE BEHAVIORALNE	obgryzanie ogrodzenia			1				2													
	lizanie ścian																	1	1		
	zabawa różnymi przedmiotami w kojcu	2				3						1					2				
	obgryzanie ogonków																				
	obgryzanie uszu																				

Rys. 1. Etogram zachowania osobników miotu I [opracowanie własne]

Wyniki przedstawione na etogramie (Rys 1.) (obserwacja zachowań miotu I) oraz rys. 2. (etogram zachowań miotu II) są na zbliżonym poziomie, co świadczy o dużej powtarzalności behavioru osobniczego w obrębie rasy oraz grupy technologicznej. Przypuszcza się, że ważnym elementem kształtującym uzyskane wyniki jest również wiek świń.

Uogólniając wyniki uzyskane z cztero godzinnej obserwacji, pierwszą oraz trzecią godzinę możemy nazwać „godziną ssania” natomiast godzinę drugą oraz czwartą „godziną spania (odpoczynku)”. Te 2 główne czynności: sen oraz ssanie istotnie oddziaływały na lokomotorykę, oraz interakcje fizyczne i socjalne.

Kat. zachowania \ Czas obserwacji		1 godz. obserwacji					2 godz. obserwacji					3 godz. obserwacji					4 godz. obserwacji				
		D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M	D	SD	P	O	M
LOKOMOTORYKA A BEZCZYNNOŚĆ EKSPLORACJA	stanie	3	2	2				2		1		3	2	2			3	2	1		
	sen	1	1			1	2	4	2	4	1		2				1	4	3	4	1
	leżenie	3	1	3	1	3	2	2	4	2	4	3	2	1	0	3	2	2	3	2	1
	chodzenie	6	7	8	5	9	4	2	4	2	2	7	8	9	9	8	4	2	3	2	8
	bieganie	1				2	2				2	1				2	2	2		2	1
	rycie ściółki,			3									2								
	gryzienie słomy						2														
POBIERANIE POKARMU I DEFEKACJA	ssanie	9	8	5	7	3		3		2		9	7	8	5	4	4	2	4	3	2
	pobieranie pasz	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	1	2	1	1	2	1	3	4	5	3
	pobieranie wody	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	1	2	1	1	2	4	2	2	4	3
	oddawanie kału	2		1	3	2						4		1			3		2		
INTERAKCJE FIZYCZNE I SOCJALNE	oddawanie moczu		1	2		1						1	1	2	2	1				2	
	trącanie się nosami,	9	8	7	7	4	1	2	4	1	2	8	9	7	7	3	3	3	4	2	4
	obskakiwanie,	9	9	7	7	3	5	4	3	7	6	9	9	7	7	3	4	3	2	8	4
	szczypanie szyi i barków	6	5	4		2	2	3	5	4	3	6	7	9	7	6	2	3	2	4	2
	pchanie	8	9	6	7	2	4	2	3	7	8	8	9	9	7	6	5	3	4	5	7
ANOMALIE BEHAVIORALNE	walka	2	2	1						2	4		3	3							
	obgryzanie ogrodzenia			1				1													
	lizanie ścian																	3	2		
	zabawa różnymi przedmiotami w kojcu	2					2					1					3				
	obgryzanie ogonków																				
	obgryzanie uszu																				

Rys. 2. Etogram zachowania osobników miotu II [opracowanie własne]

W analizie lokomotoryki, bezczynności oraz eksploracji zaobserwowano, w „godzinie ssania” wzmożone występowanie „stania” oraz „chodzenia”. Przeważnie czynność ta przejawiały osobniki marginesowe co wynikało, z próby dotarcia do mlecznych przednich sutków, u osobników tych sporadycznie zaobserwowano „bieganie”. Zachowania takie jak „rycie ściółki” zaobserwowano tylko podczas godziny 1 i 3 u osobników ze środka hierarchii, zachowanie to mogło być związane z poczuciem nudy, natomiast „gryzienie słomy” zaobserwowano u osobników dominujących podczas „godziny spania”, jak możemy się domyślać odruch ten był związany z występującym poczuciem zagrożenia pozycji legowiskowej. Po analizie zachowań związanych z pobieraniem pokarmu oraz defekacją zaobserwowano, że godziny ssania prosiąt, analogicznie jak w przypadku innych ssaków (np. dzieci), odbywają się co 2 godziny, w tym czasie zmniejszone jest też pobieranie paszy oraz wody. Po dodatkowe źródło pokarmu nieliczne osobniki (częściej marginesowe) sięgają

tylko podczas „godziny snu”. Po spożyciu paszy osobniki te, kierują się w stronę źródła wody. Zachowania wydalnicze, najczęściej mają miejsce po przebudzeniu się prosiąt.

Również częstotliwość interakcji fizycznych oraz socjalnych dodatnio koreluje z aktywnością motoryczną prosiąt. Podczas ssania częścię można zaobserwować obskakiwanie, szczypanie szyi i barków oraz pchanie. Co ciekawe częścię czynności te wykonują osobniki dominujące. Osobniki opanowane oraz marginesowe częścię „pchają się” oraz „obskakują” podczas spania, przez to zachowanie chcą zmienić swoją skrajną – zimną pozycję. Walkę u osobników można zaobserwować bardzo sporadycznie, częścię stają do niej osobniki dominujące, które rywalizują z osobnikami subdominującymi. Na uwagę zasługuje również fakt, że anomalia behawioralna została zaobserwowana bardzo nielicznie, były to przede wszystkim „zabawa różnymi przedmiotami w kojcu”. Nie zaobserwowano gryzienia przez osobniki ogonów oraz uszu.

Zachowania te zostały zaobserwowane dopiero podczas 3 etapu doświadczenia tj. scalenie obu miotów. Zaobserwowano wystąpienie silnej agresji między osobnikami dominującymi, subdominującymi oraz opanowanymi. Silne walki powodowały obrażenia ciała i przyspieszenie oddechu. Walki te trwały ok. 1 godz., aż do momentu ustalenia się nowej hierarchii. Osobniki marginesowe miotu I oraz miotu II nie podjęły walki między sobą, natomiast nawiązały „relacje przyjacielskie”.

5. Podsumowanie

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że behavior prosiąt ssących uzależniony jest od pozycji zajmowanej w stadzie. Osobniki dominujące częścię „ssą” niż osobniki marginesowe, które w celu uzupełnienia niedoboru pokarmowego, częścię sięgają po paszę dodatkową oraz wodę. Ponadto osobniki z „dołu hierarchii” wykazują większą aktywność motoryczną. Interakcje fizyczne i socjalne częścię występują u osobników dominujących i subdominujących niż u osobników marginesowych i opanowanych. Najbardziej stabilną behawioralnie grupą osobników są osobniki podporządkowane. Ponadto dowiedziono, że prosięta potrafią tworzyć między sobą silne więzy emocjonalne.

Literatura

1. Frind A., Zoń A., Bielański P., Stres jako forma zachowania się zwierzęcia, „Wiadomości Zootechniczne”, 2006, XLIV, 1, s. 15-18
2. Kołacz R., Dobrzański Z., *Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich*, Wrocław, wyd. AR Wrocław, 2006
3. Kropiwek K., *Behawior adaptacyjny prosiąt – zwierzęta się uczą*, [W:] III Lubelski Kongres Studenckich Kół Naukowych TYGIEL 2011 – czyli jak rozwijać naukę?, red. Kamil Maciąg, Mirosław Szala, Lublin, wyd. Politechnika Lubelska, 2011
4. Grudniewska B., *Hodowla i użytkowanie świń*, Olsztyn, WART, 1998
5. Pietrzak K., *Analiza wybranych czynników oddziałujących na stres okołoporodowy loch*, II Lubelski Kongres Studenckich Kół Naukowych TYGIEL 2010 - czyli jak rozwijać naukę?, red. Jacek Caban, Mirosław Szala, Lublin, wyd. Politechnika Lubelska, 2010
6. Krzymowski T., *Fizjologia zwierząt*, Warszawa, PWRiL, 1998
7. Bargiel Z., *Stres – problem otwarty*, Toruń, UMK, 1997
8. Bogucka-Ścieżyńska A., *Analiza zachowania się koni rasy pełnej krwi angielskiej pod wpływem bodźców stresogennych na TWK Służewiec z uwzględnieniem czynników genetycznych i środowiskowych*, praca doktorska, Warszawa.SGGW,1999
9. Kropiwek K., Ciołkowska A., Firlej M., *Czynniki wewnętrzne wpływające na proces porozumiewania się świń*, [W:] IV Lubelski Kongres Studenckich Kół Naukowych TYGIEL 2012 – czyli jak rozwijać naukę?, red. Kamil Maciąg, Mirosław Szala, Lublin, wyd. Politechnika Lubelska, 2012
10. Tymczyna L., Babicz M., Grela E., Pisarski R., Różański P., „*Dobrostan zwierząt – trzoda chlewna. Materiały szkoleniowe*”, 2005
11. Vanheukelom V., Driessen B., Geers R., *The effects of environmental enrichment on the behaviour of suckling piglets and lactating sows: a review*, „Livestock science”, 2012, 143, 2-3, s.116-131
12. *Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 lutego 2010 roku w sprawie wymagań i postępowania przy utrzymywaniu zwierząt gospodarskich, dla których normy ochrony zostały określone w przepisach Unii Europejskiej* (Dz. U z 2010 Nr 56, poz. 344 z późn. zm.).
13. *Ustawa z dnia 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt* (Dz. U z 2003 Nr 106, poz. 1002 z późn. zm.)
14. Kaleta T., *Zachowanie się zwierząt – zarys problematyki*, Warszawa, SGGW, 2003
15. Babicz M., Pietrzak K., *Próby neutralizacji stresu prosiąt odsadzonych w różnych systemach utrzymania*, „Przegląd Hodowlany”, 2010.4,1, s. 3-16
16. Parent J. P., Meunier - Salaün M. Ch., Vasseur E., Bergeron R., *Stability of social hierarchy in growing female pigs and pregnant sows*, „Applied Animal Behaviour Science, 2012, 42, 1-2, s.1-10
17. Rokicki E., Kolbuszowski T., *Higiena zwierząt*”, Warszawa, Fundacja „Rozwój SGGW”, 1996

**Recenzent pracy: dr hab. Marek Babicz, prof. nadzw. UP,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

Wpływ hierarchii społecznej prosiąt na ich behavior

Streszczenie

Naturalnym sposobem chowu świń jest utrzymywanie grupowe. Każda grupa technologiczna wykazuje określony behavior i tworzy swoistą pięcio poziomową strukturę hierarchiczną. Celem przeprowadzonych badań było próba określenia wpływu pozycji zajmowanej w hierarchii stada na behavior prosiąt. Dodatkowym elementem pracy była próba ustalenia relacji społecznych powstającymi między osobnikami, podczas łączenia miotów. Obserwacje bezpośrednie przeprowadzono na 2 miotach, prosiąt rasy puławskiej w wieku 21-28 dni. Uzyskane wyniki wykazują, że zachowanie prosiąt istotnie uzależnione jest od pozycji zajmowanej w stadzie, ponadto dowiedziono, że prosięta potrafią tworzyć między sobą silne więzy emocjonalne.

Słowa Kluczowe: świnia domowa, behavior, hierarchia socjalna

Influence of social hierarchy piglets on their behavior

Abstract

Natural method is to keep in pig farming groups. Each group has a specific behavior and creates a specific five-tier hierarchical structure. The aim of the study was to attempt to determine the effect of the position occupied in the hierarchy of the herd on the behavior of piglets. An additional element of the study was to determine the social relations as emerging between individuals, while connecting the herd. Direct observation was performed on piglets race pulawy aged 21-28 days. The results obtained show that the behavior of piglets significantly depends on the position occupied in the herd. Also demonstrated that piglets can create among themselves a strong emotional bonds.

Keywords: pigs, behavior, social hierarchy