

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część IV



www.mlodzi naukowcy.com

Poznań 2019

Redakcja naukowa

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak, UPP

dr hab. Jacek Leśny prof. UPP

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66139-81-7)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-37-3)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-38-0)

Ilość znaków w książce: 771 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 19.3

Data wydania: sierpień 2019

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Farmakoterapia chorób otępiennych	7
<i>Aleksandra Dymek, Magdalena Maciejewska-Turska, Gabriela Widelska, Dominik Straszak, Monika Drózd, Magdalena Dymek</i>	
2. Metody izolacji i badania bioaktywności alkaloidów z rodzaju <i>Narcissus</i> sp. i <i>Lycopodium</i> sp.	13
<i>Aleksandra Dymek, Magdalena Maciejewska - Turska, Gabriela Widelska, Dominik Straszak, Monika Drózd, Magdalena Dymek</i>	
3. The ribosome evolution	19
<i>Filipek Kamil, Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Deryło Kamil</i>	
4. ER stress and Unfolded Protein Response	25
<i>Filipek Kamil, Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Michalec-Wawiórka Barbara</i>	
5. Metaloproteaza ZapA <i>Proteus mirabilis</i>: czynnik wirulencji i potencjalny cel nowych związków antybakteryjnych	31
<i>Dawid Gmiter, Paulina Sobczyk, Magdalena Stawiarz</i>	
6. Przystosowanie bakterii kwasu mlekowego do środowisk roślinnych	38
<i>Gustaw Klaudia, Iwona Niedźwiedź</i>	
7. Aspects of protein phosphorylation	44
<i>Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Grela Przemysław, Michalicha Anna, Filipek Kamil</i>	
8. Need for speed – translational GTPases in action	49
<i>Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Grela Przemysław, Michalicha Anna, Filipek Kamil</i>	
9. Diverse receptors in insect phagocytosis	54
<i>Patrycja Kaczmarek, Jakub Kordaczuk, Michał Sułek</i>	
10. Naprawa DNA w komórkach człowieka	59
<i>Mateusz Kciuk</i>	
11. Kapsułkowanie substancji bioaktywnych-metody oraz możliwości aplikacyjne	64
<i>Ilona Kosińska, Żaneta Król-Kilińska, Karolina Drewniaczek</i>	
12. Charakterystyka białek szoku zimna u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich: struktura, regulacja syntezy i funkcja w komórce	70
<i>Marta Kozieł, Paulina Lipa, Monika Janczarek</i>	
13. Wpływ niskiej temperatury na symbiotyczne interakcje pomiędzy roślinami bobowatymi a rizobiami	78
<i>Marta Kozieł</i>	
14. Wybrane rodzaje śmierci komórki	85
<i>Aleksandra Maciejczyk, Klaudia Zajęc, Adrian Zajęc, Magda Madoń</i>	
15. Apoptoza – charakterystyka procesu	91
<i>Aleksandra Maciejczyk, Klaudia Zajęc, Magda Madoń, Adrian Zajęc</i>	
16. Petrografia popiołów dennych i lotnych ze spalania węgla kamiennego, biomasy drzewnej i mieszanek, zawierającej po 50% wag. węgla i biomasy	97
<i>Maciejczyk Natalia, Bielowicz Barbara</i>	
17. Podatność białek błon podskorupowych na działanie proteaz różnego pochodzenia	104
<i>Michał Matysiak, Łukasz Bobak, Aleksandra Zambrowicz</i>	
18. Alternatywne metody izolacji yolkiny z żółtek jaj kurzych	113
<i>Michał Matysiak, Hanna Michalak, Łukasz Bobak, Agnieszka Zabłocka, Aleksandra Zambrowicz</i>	

19. Porównanie skuteczności prebiotyków i probiotyków w łagodzeniu zmian behawioralnych i immunologicznych wywołanych stresem u gryzoni	119
<i>Mazur Maciej, Ruciński Jan</i>	
20. Komunikacja pomiędzy mikrobiomem jelitowym a ośrodkowym układem nerwowym – rola nerwu błędnego	125
<i>Mazur Maciej, Ruciński Jan</i>	
21. Optymalizacja produkcji kwasu dokozaheksaenowego przez mikroalgę <i>Cryptocodinium cohnii</i> - praca przeglądowa	131
<i>Półbrat Tomasz, Morawska Martyna</i>	
22. Saponiny – roślinne biosurfaktanty	137
<i>Rekiel Edyta</i>	
23. Soforolipidy – budowa, właściwości i zastosowanie	142
<i>Rekiel Edyta</i>	
24. Aktywność enzymatyczna na składowisku odpadów pohutniczych	148
<i>Siebielec Sylwia, Siebielec Grzegorz, Stuczyński Tomasz, Grzęda Emilia</i>	
25. Receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji w świetle najnowszego piśmiennictwa	155
<i>Zofia Strojny, Anna Koperska, Tomasz Stefański, Marcin Strojny, Dominika Kanikowska, Andrzej Bręborowicz, Janusz Witowski</i>	
26. Prozdrowotne właściwości zielonej herbaty <i>Camellia sinensis</i> (L.) i jej wielokierunkowe działanie - przegląd piśmiennictwa	161
<i>Zofia Strojny, Anna Koperska, Martyna Marciniak, Dominika Kanikowska, Andrzej Bręborowicz, Janusz Witowski</i>	
27. General characteristics of the <i>Pseudomonas entomophila</i>	167
<i>Michał Sułek, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek</i>	
28. Entomopathogenic properties of fungi <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Metarhizium anisopliae</i>	172
<i>Michał Sułek, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek</i>	
29. Biofilm bakteryjny wielogatunkowy – metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część III – przegląd metod mikroskopowych	178
<i>Zuzanna Sycz, Monika Sępek</i>	
30. Bakteryjne modułowe syntazy poliketydowe	185
<i>Zuzanna Sycz, Monika Sępek</i>	
31. Rola limfocytów Tγδ w alergiach skórnych i pokarmowych	192
<i>Oskar Wiśniewski</i>	
32. Biogeography of scorpions with special consideration for species of medical importance in Europe and in the Middle East	197
<i>Oskar Wiśniewski</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk przyrodniczych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Farmakoterapia chorób otępiennych

Pharmacotherapy dementias diseases

Aleksandra Dymek⁽¹⁾, Magdalena Maciejewska-Turska⁽¹⁾, Gabriela Widelska⁽²⁾, Dominik Straszak⁽³⁾, Monika Drózd⁽⁴⁾, Magdalena Dymek⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab.n.farm. Tomasz Mroczek

Aleksandra Dymek: aleksandra.dymek91@interia.pl

Streszczenie

Otępienie definiowane jest jako stan poważnego upośledzenia procesów kognitywnych, prowadzących do stopniowego osłabienia pamięci, będącego wczesnym objawem rozwijającej się demencji. Schorzenie ma charakter postępujący i przyczynia się do pogorszenia funkcjonowania chorego w życiu codziennym, prowadząc w konsekwencji do jego pełnej zależności od osoby sprawującej nad nim opiekę. Etiologia zespołów otępiennych w dalszym ciągu pozostaje niejasna. Zazwyczaj są one konsekwencją uszkodzenia struktur mózgu, wynikającego bezpośrednio z procesów neurodegeneracyjnych zachodzących w obszarach OUN. Wśród zespołów otępiennych wyróżniamy chorobę Alzheimera, Parkinsona, Picka (potocznie nazywaną dziecięcym Alzheimerem) czy płasawicę Huntingтона. Choroby te są nieuleczalne i mają złe rokowania, a dotychczas stosowane, dość ograniczone metody terapeutyczne, umożliwiają jedynie spowolnienie przebiegu choroby, nie dając nadziei na całkowite wyzdrowienie pacjenta. Produkty lecznicze obecne na rynku farmaceutycznym działają tylko objawowo. Podstawą farmakoterapii są inhibitory cholinesterazy, stosowane niekiedy w skojarzeniu z antagonistą receptora NMDA – memantyną. Dodatkowo w celu opanowania zaburzeń behawioralnych wykorzystuje się pomocniczo leki przeciwdepresyjne, anksjolityczne i przeciwpsychotyczne. We wczesnym stadium choroby wykorzystuje się również preparaty pochodzenia roślinnego, mające na celu stymulację funkcji poznawczych, zawierające w swoim składzie np. liście miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba* L.), czy korzeń żeń-szenia (*Panax ginseng*). Biorąc pod uwagę progresywny charakter choroby i dość słabą skuteczność preparatów pochodzenia roślinnego, konieczne jest wczesne wdrożenie leczenia farmakologicznego przez lekarza specjalistę. Odpowiednio dobrana i bezpieczna farmakoterapia w dużym stopniu poprawia jakość i wydłuża czas życia pacjenta. W ostatnich latach poszukuje się alternatywnych, naturalnych źródeł inhibitorów acetylo- i butylocholinoesterazy (AChE i BChE). Obiektem zainteresowania stały się również ligandy receptorów nikotynowych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu zaburzeń pamięci. Jednakże nowe perspektywy skutecznej terapii wiązane są głównie z poszukiwaniem terapii przyczynowej w której zastosowanie miałyby substancje degradujące strukturę β -amyloidu, hamujące jego tworzenie się i modulujące współtowarzyszącą odpowiedź zapalną.

1. Wstęp

Otępienie zwane również demencją jest poważnym schorzeniem, związanym z zaburzeniem wyższych funkcji korowych, które nieuchronnie prowadzi do obniżenia jakości życia pacjenta i do jego ubezwłasnowolnienia. Choroba Alzheimera (AD) uznawana jest za jedną z najczęstszych przyczyn zaburzeń otępiennych wieku podeszłego. Jest to podstępna, rozwijająca się latami choroba, której pierwsze symptomy ujawniają się dopiero po 60 roku życia. Na bardzo wczesnym etapie, przed pojawieniem się typowych dla procesu otępiennego zaburzeń poznawczych, obserwuje się upośledzenie powonienia, uznawane za jeden z pierwszych symptomów choroby (Suzuki i in. 2004).

Charakterystycznym dla AD objawem klinicznym jest stopniowy zanik pamięci krótkotrwałej powiązany z pogłębiającym się zaburzeniem procesów kognitywnych, w wyniku których pojawiają się trudności w wykonywaniu prostych, codziennych czynności. Dodatkowo w przebiegu choroby obserwuje się zmianę osobowości pacjenta. Opieka nad nim nastręcza coraz większych trudności, ze względu na rosnące pobudzenie oraz występowanie zaburzeń psychicznych oraz behawioralnych tj. agresji werbalnej czy fizycznej, które często stają się niezwykle trudne do zaakceptowania i zrozumienia. Zaburzenia te są na tyle poważne, że uniemożliwiają choremu wykonywanie pracy, wykluczają go z życia zawodowego, towarzyskiego a nawet rodzinnego. Dane epidemiologiczne wyraźnie wskazują, iż największy odsetek chorych po 65 r.ż. (bo aż 70 %) cierpi na otępienia typu alzheimerowskiego, a w związku ze starzeniem się społeczeństwa naukowcy szacują, że w kolejnych latach liczba ta może drastycznie wzrosnąć. Pomimo ogromnego postępu wiedzy, wciąż trwają badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów procesów neurodegeneracyjnych, leżących u podstaw etiopatogenezy zespołów otępiennych. Obecne leczenie farmakologiczne nie jest satysfakcjonujące. Dotychczas nie znaleziono skutecznego leczenia przyczynowego, a leki znajdujące zastosowanie w terapii zespołów otępiennych mają za zadanie jedynie spowolnić przebieg choroby, złagodzić niektóre objawy i poprawić kondycję psychiczną pacjenta, jednak nie są w stanie odwrócić trwałych zmian, które nastąpiły w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (Długosz-Mazur i in. 2013; Gabrylewicz 2007; Kowalczyk i in. 2014; Wojtera i Sobów 2014).

2. Opis zagadnienia z przeglądem literatury

Przed podjęciem leczenia farmakologicznego, warto sięgnąć po metody niekonwencjonalne, zwłaszcza we wczesnym stadium choroby. W celu usprawnienia procesów pamięciowych i poprawy koncentracji można stosować regularne ćwiczenia pobudzające pracę naszego mózgu. Badania potwierdzają, iż rozwiązywanie łamigłówek, krzyżówek czy nauka języków obcych znacznie usprawniają pracę półkul mózgowych i wpływają na poprawę funkcji poznawczych. Niekiedy w celu wsparcia leczenia farmakologicznego zalecana jest rehabilitacja i terapia zajęciowa, przywoływanie wspomnień przy użyciu muzyki czy fotografii. Wraz z postępem technologii popularne staje się wykorzystanie gier komputerowych, angażujących pamięć i koncentrację, mobilizując do szybkiego rozwiązywania problemów. Tego typu trening jest obecnie stosowany na szeroką skalę również przez osoby zdrowe, w celu stymulowania mózgu do bardziej efektywnej pracy. Często jednak metody te są niewystarczające i wraz z zaostrzeniem przebiegu choroby konieczne jest wdrożenie odpowiedniej farmakoterapii (Długosz-Mazur i in. 2013; Gabrylewicz 2014; Kowalczyk et al. 2014; Ruda i Rymaszewska 2013; Wojtera i Sobów 2014).

Kluczową rolę w terapii chorób otępiennych odgrywają leki z grupy inhibitorów acetylocholinoesterazy, które efektywnie hamują degradację neurotransmitera - acetylocholiny w mózgu i normalizują przekazywanie w układzie cholinergicznym. Istnieje wiele substancji pochodzenia naturalnego, które wykazują aktywność hamującą AChE. Za przykład może posłużyć, alkaloid wyizolowany z nasion *Physostigma venenosum* Balf. - fizostygmina. Pierwotnie stosowana jako antidotum na atropinę, w latach 90-tych XIX wieku po raz pierwszy została użyta w terapii AD. Jednakże ze względu na jej znaczącą toksyczność i mały indeks terapeutyczny, fizostygmina nie jest obecnie stosowana w lecznictwie (Howes i Houghton 2009). Jednakże posłużyła ona jako modelowy związek do opracowania nowych, bezpieczniejszych pochodnych odznaczających się mniejszą ilością działań niepożądanych, tj. rywastygmina, która została opatentowana przez firmę Novartis® i wypuszczona na rynek farmaceutyczny pod nazwą Exelon™. Rywastygmina wpływa zarówno na aktywność AChE jak i BChE, które są zaangażowane w metabolizm acetylocholiny. Tego typu aktywność jest bardzo pożądana biorąc pod uwagę doniesienia o paradoksalnie znacząco wyższej aktywności BChE w przebiegu chorób otępiennych. Dodatkowo zastosowana u pacjentów z chorobą Alzheimera w dawce 4 i 6 mg/dzień odznaczała się dobrą tolerancją i brakiem negatywnego wpływu na funkcje wątroby czy nerek. Poza formą doustną, jest ona dostępna również w postaci plastrów transdermalnych. Aktualnie oprócz wspomnianej już rywastygminy do dyspozycji mamy dwie zarejestrowane substancje o udowodnionej aktywności anty-AChE: galantaminę (Nivalin i Reminyl™), oraz donepezil (Aricept™) (Howes i Houghton 2009). Galantamina, alkaloid początkowo izolowany z cebulek niektórych gatunków przebiśniegu (m.in. *Galanthus nivalis* L.)

posiada szeroki profil działania. Jako kompetycyjny odwracalny inhibitor AChE ogranicza degradację acetylocholiny i wydłuża jej aktywność w synapsie. Działanie to stało się podstawą do wykorzystania galantaminy w terapii schorzeń otępiennych. Rosnące zainteresowanie tym związkiem dało początek wielu badaniom przedklinicznym jak i klinicznym, potwierdzającym wpływ galantaminy na hamowanie postępu demencji, w tym choroby Alzheimera. Galantamina posiada zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg co pozwala na osiągnięcie jej najwyższego stężenia w strukturach mózgu. Dodatkowo jest ona pozytywnym allosterycznym modulatorem (*positive allosteric modulators* -PAMs) niektórych neuronalnych podtypów receptorów nikotynowych acetylocholiny (nAChRs), zaangażowanych w proces uczenia się i pamięci, co tłumaczy zauważalną poprawę funkcji poznawczych u pacjentów leczonych galantaminą (Baranowska i Wiśniewska 2017). Zarówno donepezyl jak i galantamina wykazują efekt neuroochronny. W leczeniu objawowym łagodnej do ciężkiej postaci otępienia stosuje się galantaminę i rywastigminę, gdyż efekt ich działania pojawia się po pewnym czasie. Jedynie donepezyl jest inhibitorem AChE zatwierdzonym do leczenia wszystkich stadiów AD (Gaweł i Potulska-Chromik 2015; Kubis i Janusz 2008; Wichur i Malawska 2015).

Terapia ww. lekami w znacznym stopniu poprawia funkcjonowanie chorego i zwiększa jego aktywność fizyczną, pozwalając tym samym w miarę możliwości na jego samodzielne funkcjonowanie. Niestety duża ilość działań niepożądanych oraz niska biodostępność sprawia, iż poszukiwane są nowe źródła inhibitorów cholinoesterazy. Istnieje liczna grupa substancji aktywnych pochodzenia roślinnego dla których potwierdzono silne zdolności hamowania aktywności AChE w warunkach *in vitro*. Dominującą grupę stanowią alkaloidy pozyskiwane z różnych gatunków przebiśniegów i narcyzów, głównie dobrze znana galantamina oraz jej pochodne: 11-hydroksygalantamina i assoanina. Również gatunki kokoryczy (*Corydalis* sp.) z rodziny makowatych są badane pod kątem zawartości potencjalnych związków mających zdolność hamowania AChE oraz BChE, gdzie jednym z bardziej aktywnych okazała się być berberyna obecna też w ziele glistnika (*Chelidonium majus* L.). Również liczne gatunki należące do rodziny bukowatych (głównie *Sarcococca* sp. i *Buxus* sp.) mogą stanowić bogate źródło aktywnych związków alkaloidowych o budowie steroidowej, przejawiających silniejszą zdolność inhibicji BChE w przeciwieństwie do AChE. Niejednokrotnie sięgano także do korzeni medycyny ludowej w celu znalezienia potencjalnych źródeł inhibitorów AChE. Jednym z ciekawszych przykładów jest hupercyna A, alkaloid wyizolowany z widłaka wronca (*Huperzia serrata*), surowca znanego już w tradycyjnej medycynie chińskiej i wykorzystywanego w wielu przypadłościach, m.in. do leczenia demencji. Zdolność inhibicji AChE hupercyny A jest porównywalna do aktywności galantaminy, czy fizostygminy. Ponadto wykazuje ona dodatkowo efekt antyoksydacyjny i przeciwzapalny. Moduluje powstawanie prekursorowego białka amyloidowego, poprzez wpływ na aktywność kaspazy-3, wykazując tym samym działanie neuroochronne. Obecnie hupercyna A jest szeroko stosowana w krajach azjatyckich jako środek nootropowy, o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób otępiennych. (Howes i Houghton 2009; Ng et al. 2015; Orhan et al. 2009; Wszelaki 2009).

Przedmiotem licznych badań są również rośliny lecznicze należące między innymi do rodziny jasnotowatych (Ożarowski i in. 2009). Frakcje flawonoidowe oraz olejek eteryczny pozyskiwany z melisy lekarskiej, liści rozmarynu lekarskiego czy różnych gatunków szalwii, są testowane pod kątem ich hamujących zdolności w stosunku do AChE (Kennedy i Scholey 2006). Na szczególną uwagę zasługuje szalwia lekarska (*Salvia officinalis* L.) która już w medycynie ludowej stosowana była w łagodzeniu zaburzeń pamięci. Liczne dane literaturowe wskazują na jej wysoki potencjał antyoksydacyjny i przeciwzapalny. Mechanizm aktywności neuroprotektoryjnej związany jest z synergia działania zawartych w badanych standaryzowanych wyciągach związków polifenolowych, głównie kwasu rozmarynowego i pochodnych flawonoidów, które w warunkach *in vitro*, wykazywały hamujący wpływ na aktywność acetylocholinoesterazy (Perry i Howes 2011). Poza tym na rynku farmaceutycznym znanych jest wiele preparatów pochodzenia roślinnego, które mogą być stosowane w łagodzeniu wczesnych objawów choroby. Środki te korzystnie wpływają na pracę naszego mózgu. Warto sięgnąć po preparaty, które w swoim składzie zawierają korzeń żeń-szenia (*Ginseng radix*). *Panax ginseng* z grec. *panakes* – wszystko leczący, obecnie jest jedną z najbardziej popularnych roślin dostępnych na całym świecie w różnych postaciach

farmaceutycznych, tj. herbat, nalewek czy tabletek musujących. Korzeń żeń-szenia w swoim składzie zawiera saponiny triterpenowe – ginsenozydy, które biorą udział w zwiększeniu zdolności uczenia się, zapamiętywania i poprawie koncentracji. Przeciwdziałają objawom zmęczenia podnosząc wydolność fizyczną i psychiczną. Zaleca się stosowanie preparatów z żeń-szeniem w okresie zmęczenia psychicznego i wzmoczonego wysiłku również przez osoby zdrowe (Baj 2009; Lisiecka i in. 2016; Perry i Howes 2011).

Poza typowymi inhibitorami AChE, w terapii chorób otępiennych wykorzystywana jest również memantyna, związek zaliczany do niekompetycyjnych antagonistów receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA). Jej działanie polega na modyfikowaniu patologicznie wysokiego stężenia glutaminianu - neurotransmitera, który w dużych dawkach posiada udowodnione działanie proapoptotyczne. Poza korzystnym wpływem na funkcje poznawcze, memantyna obniża ryzyko występowania urojeń, pobudzenia czy agresji. Jednakże wraz z rozwojem choroby zaburzenia te ulegają nasileniu, dlatego też do ich opanowania konieczne staje się wprowadzenie kolejnych grup leków o różnicowanym mechanizmie działania (Gabrylewicz 2014; Ng et al. 2015; Wojtera i Sobów 2014).

W łagodzeniu objawów depresji towarzyszącej chorobom otępiennym, zastosowanie znajdują leki przeciwdepresyjne z grupy inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny (SSRI). W szczególności citalopram i sertralina charakteryzują się dobrym profilem bezpieczeństwa i dużym potencjałem w niwelowaniu zaburzeń psychotycznych. W celu opanowania ciężkich psychoz czy agresji, stosuje się leki neuroleptyczne czy anksjolityczne. Nie są to leki pierwszego rzutu, ani leki z wyboru w przypadku leczenia objawów psychotycznych o charakterze przewlekłym. Leki te charakteryzują się szybkim efektem działania już od momentu podania, z tego względu wykorzystywane są w sytuacjach nagłych, w celu opanowania ostrych objawów choroby. Za przykład leku należącego do grupy klasycznych neuroleptyków może posłużyć haloperidol, który stosowany jest w krótkotrwałym leczeniu ostrych objawów pobudzenia czy agresji. Jednakże zastosowanie leków neuroleptycznych I generacji obejmujących haloperidol czy chlorpromazynę, ze względu na mnogość działań niepożądanych tj. sedacja, wzrost ryzyka upadków czy zaburzenia świadomości, powinno zostać ograniczone. Grupą najlepiej przebadaną i najczęściej stosowaną w leczeniu zaburzeń poznawczych w otępieniu są znacznie bezpieczniejsze w porównaniu z klasycznymi neuroleptykami - atypowe leki neuroleptyczne. Jednakże ich stosowanie nie jest pozbawione jakichkolwiek przeciwwskazań. Badania wykazały, iż przyjmowanie ich przez pacjentów w podeszłym wieku, wśród osób u których choroby otępienne są najbardziej rozpowszechnione, wiąże się z istotnymi działaniami niepożądanymi. Istnieje duże ryzyko wystąpienia zmian w obszarach mózgowo-naczyniowych niejednokrotnie prowadzących do udarów czy ataków niedokrwiennych. Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (*Food and Drug Administration-FDA*) w 2004 roku wydała rozporządzenie na temat ostrzeżenia przed możliwością wystąpienia chorób serca czy płuc wśród osób stosujących leki przeciwpsychotyczne w leczeniu chorób otępiennych, podwyższając tym samym ryzyko ich śmierci. Mimo to czasami korzyści z zastosowania tych leków przeważają nad ryzykiem wystąpienia efektów ubocznych, co wpływa na ich ciągle wykorzystanie w praktyce lekarskiej. Kwetiapina, olanzapina czy risperidon to przykłady niektórych atypowych leków neuroleptycznych II generacji, wykazujących wysoką skuteczność w eliminowaniu ciężkich objawów towarzyszących demencji tj. urojeń, halucynacji czy agresji. Niekiedy istnieje konieczność zastosowania leków przeciwpadaczkowych głównie karbamazepiny czy pochodnych kwasu walproinowego. Jednak stosowane są one z dużą rezerwą, jako środki drugiego rzutu. W zaburzeniach zasypiania alternatywą do barbituranów czy benzodiazepin stały się substancje klasyfikowane jako niebenzodiazepinowe leki nasenne tj. zolpidem, zopiklon czy zaleplon. Związane jest to z mniejszą ilością występowania działań niepożądanych oraz zmniejszeniem ryzyka przedawkowania będącego wynikiem rozwijającej się w przypadku barbituranów tolerancji (Gabrylewicz 2014; Wojtera i Sobów 2014).

Nieustanne poszukiwanie odpowiedzi nad przyczyną powstawania chorób otępiennych skłoniła naukowców do wysunięcia tezy, iż wpływ witamin z grupy B może mieć związek z występowaniem AD. Niektóre prace naukowe wskazują, że duży wpływ na poprawę funkcji poznawczych, a dokładniej na właściwe funkcjonowanie układu nerwowego ma kwas foliowy oraz

witaminy należące do grupy B. Wykazano ich wpływ na wysoki poziom homocysteiny, która odpowiedzialna jest za wzrost ryzyka demencji. Z kolei witamina B12 jest odpowiedzialna za wytwarzanie neuroprzekazników w organizmie. Naukowcy udowodnili, że niski poziom tej witaminy w organizmie ludzkim może być cechą związaną z występowaniem choroby Alzheimera oraz demencji. Niedobór witamin z grupy B sprzyja również gromadzeniu się białek β -amyloidu, które należą do głównych czynników wywołujących choroby otępienne. Wielu naukowców podjęło próbę badań w celu potwierdzenia tezy, iż witaminy z grupy B mogą znacząco wpływać na poprawę procesów poznawczych, jak i zapobiegać objawom demencji. Niestety do tej pory nie wykazano istotnego wpływu suplementacji witamin z grupy B na występowanie chorób otępiennych. Dodatkowo naukowcy potwierdzili, iż witamina B12 nie jest w stanie poprawić postaci już istniejących zaburzeń OUN (Długosz-Mazur i in. 2013; Lisiecka i in. 2016; Vetulani 2010).

3. Podsumowanie

W związku z rosnącą tendencją starzenia się społeczeństw, zauważalny jest znaczny wzrost liczby chorych cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Powoduje to istnienie ciągłej potrzeby poszukiwania nowych środków, które staną się szansą w łagodzeniu objawów na każdym etapie choroby. Efektywna jak i bezpieczna farmakoterapia zaburzeń otępiennych wiąże się z koniecznością podnoszenia kwalifikacji personelu medycznego oraz powstawania nowych, wyspecjalizowanych placówek umożliwiających wczesną diagnostykę AD. Leczenie demencji musi opierać się na współpracy wielu osób, poczynając od opiekunów, lekarzy, farmaceutów na rehabilitantach kończąc. W początkowym stadium choroby, w pierwszej kolejności warto zastosować różne formy terapii tj. muzykoterapię czy terapię zajęciową, mające na celu poprawę funkcji poznawczych. Rynek farmaceutyczny dysponuje wieloma preparatami pochodzenia roślinnego, które są popularnie wykorzystywane w łagodzeniu zaburzeń pamięci i koncentracji. Należy jednak pamiętać aby ich zastosowanie było konsultowane z lekarzem prowadzącym tak by nie kolidowało z wdrożoną przez niego farmakoterapią. Niestety codzienna praktyka lekarska wyraźnie wskazuje, że wraz z postępem choroby konieczne staje się podjęcie leczenia z zastosowaniem inhibitorów AChE, niekiedy w połączeniu z memantyną. Dodatkowo współistniejące zaburzenia zachowania pacjenta wymagają niekiedy włączenia dodatkowych grup lekowych. Do leków obecnie stosowanych i najlepiej udokumentowanych w leczeniu łagodnych do ciężkich objawów otępień zaliczamy leki przeciwpsychotyczne. Należy pamiętać jednak, że korzyści jakie płyną z ich stosowania są co najwyżej umiarkowane. Obecnie stosowane, jedynie objawowe metody leczenia powodują, iż istnieje zasadna potrzeba ciągłego poszukiwania leku, który stałby się antidotum w leczeniu chorób otępiennych. Takie odkrycie doprowadziłoby nie tylko do nadzwyczajnego przełomu we współczesnej medycynie, ale również uratowałoby życie wielu ludziom, niekiedy naszym najbliższym.

4. Literatura

- Baj T (2009) Herbarium - „Radix Ginseng – korzeń życia”. Aptekarz Polski; 36(14) online.
- Baranowska U, Wiśniewska RJ (2017) Receptor nikotynowy $\alpha 7$ -nACh i jego znaczenie w funkcjonowaniu pamięci oraz wybranych chorobach ośrodkowego układu nerwowego. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*; 71.
- Długosz-Mazur E, Bojar I, Gustaw K (2013) Niefarmakologiczne metody postępowania u chorych z otępieniem. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*; 19(4), 458-462.
- Gaweł M, Potulska-Chromik A (2015) Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona. *Postępy Nauk Medycznych*; 28(7), 468-476.
- Gabryelewicz T (2007) Zaburzenia zachowania oraz zaburzenia psychotyczne i afektywne w otępieniu. *Polski Przegląd Neurologiczny*; 3(2), 90-96.
- Gabryelewicz T (2014) Farmakologiczne leczenie zaburzeń zachowania u osób z otępieniem. *Przegląd lekarski* 71(4), 215-220.

- Howes MJR, Houghton PJ (2009) Acetylcholinesterase inhibitors of natural origin. *International Journal Biomedical Pharmaceutical Sciences*, 3(SI1), 67-86.
- Kennedy DO, Scholey AB (2006) The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Current pharmaceutical design*, 12(35), 4613-4623.
- Kowalczyk N, Brzezicka A, Kossut M (2014) Neuroplastic changes as a result of intensive cognitive training: a comparison of traditional and innovative approaches to cognitive training using video games. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia*; 9,3-4, 104-111.
- Kubis AM, Janusz M (2008) Alzheimer's disease: new prospects in therapy and applied experimental models. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*; 62, 372-392.
- Lisiecka J, Androsiuk A, Perkowski R i in. (2016) Wpływ suplementów diety na poprawę funkcji poznawczych u osób starszych. *Gerontologia Polska*; 24, 64-70.
- Ng YP, Or TChT, Ip NY (2015) Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 89, 260-270.
- Orhan G, Orhan I, Subutay-Oztekin N, Ak F, et al. (2009) Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*; 4(1), 43-51.
- Ożarowski M, Mikołajczak PŁ, Bobkiewicz-Kozłowska T et al. (2009) Neuroaktywne związki roślin leczniczych z rodziny Lamiaceae wykazujące potencjalnie korzystne działanie w leczeniu choroby Alzheimera. *Herba Polonica*; 55(4); 149-163.
- Perry E, Howes MJR (2011) Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging? *CNS neuroscience & therapeutics*; 17(6), 683-698.
- Ruda K, Rymaszewska J (2013) Wybrane zagadnienia z terapii muzyką osób chorujących na zaburzenia otępienne. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia*; 8(1), 40-46.
- Suzuki Y, Yamamoto S, Umegaki H, et al. (2004) Smell identification test as an indicator for cognitive impairment in Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry*; 19(8), 727-733.
- Vetulani J (2010) Leki nootropowe i prokognitywne. *Farmakoterapia choroby Alzheimera*. Kostowski W, Herman Z: *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa (2): 154–169.
- Wojtera M, Sobów T (2014) Farmakoterapia choroby Alzheimera i innych otępień w praktyce: który lek, kiedy i dla kogo? *Aktualności Neurologiczne*; 14(4), 218-227.
- Wichur T, Malawska B (2015) Ligandy wielofunkcyjne–nowa strategia poszukiwania leku w terapii chorób o złożonej etiologii. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69.
- Wszelaki N (2009) Hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez surowce roślinne i ich substancje czynne, *Postępy Fitoterapii*, s. 24-38.

2. Metody izolacji i badania bioaktywności alkaloidów z rodzaju *Narcissus* sp. i *Lycopodium* sp.

Isolation and bioactivity methods of alkaloids from *Narcissus* and *Lycopodium* species

Aleksandra Dymek⁽¹⁾, Magdalena Maciejewska - Turska⁽¹⁾, Gabriela Widelska⁽²⁾, Dominik Straszak⁽³⁾, Monika Drózd⁽⁴⁾, Magdalena Dymek⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab.n.farm. Tomasz Mroczek

Aleksandra Dymek: aleksandra.dymek91@interia.pl

Streszczenie

W celu wyodrębnienia mieszaniny lub poszczególnych alkaloidów z rodzaju *Narcissus* sp. i *Lycopodium* sp. stosuje się metody izolacji należących do technik separacyjnych w tym chromatograficznych. Znanych jest wiele technik służących wyizolowaniu badanych substancji i oznaczaniu ich ilości w próbkach o złożonym składzie. Najczęściej stosowanymi metodami jest chromatografia kolumnowa oraz metody ekstrakcji analitów z matrycy roślinnej rozpuszczalnikami organicznymi. Modyfikacja tych metod i użycie odpowiednio dobranych rozpuszczalników pozwala na uzyskanie oczekiwanych efektów. Do wyodrębnienia frakcji alkaloidowej w dalszym ciągu stosuje się metody klasyczne tj. ekstrakcja przez wytrząsanie czy ekstrakcja w aparacie Soxhleta, które skutecznie zostają zastępowane przez nowe, proekologiczne metody, charakteryzujące się mniejszym zużyciem rozpuszczalników i krótszym czasem separacji. ASE czy PLE, to niektóre z wielu alternatywnych w stosunku do klasycznych technik służących do wstępnej izolacji badanych substancji. Etap wstępnej obróbki, przygotowanie analitu (metody ekstrakcji) i izolacja alkaloidów pozwala w następnej kolejności na przeprowadzenie badań nad bioaktywnością alkaloidów. Wspólną cechą alkaloidów obecnych w gatunkach należącym do rodzajów *Narcissus* sp. i *Lycopodium* sp., jest zdolność do hamowania enzymu acetylocholinoesterazy, odgrywającego kluczową rolę w chorobach neurodegeneracyjnych. Testy bioaktywności czyli oznaczanie inhibitorów acetylocholinoesterazy przeprowadza się w oparciu o zmodyfikowaną metodę Ellmana z wykorzystaniem technik pozwalających na wizualizację otrzymanych wyników, które w przyszłości mogą pozwolić na odkrycie nowych inhibitorów AChE skutecznych w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

1. Wstęp

Mianem alkaloidów określa się szereg związków chemicznych, głównie pochodzenia roślinnego, które w swojej budowie zawierają heterocykliczny układ pierścieniowy z atomem azotu lub tlenu, który nadaje im charakter zasadowy. Ponadto, związki te wykazują silne działanie fizjologiczne na organizm ludzki poczynając od stymulującego, poprzez narkotyczne a nawet toksyczne. Znanych jest mnóstwo alkaloidów występujących naturalnie na przykład w maku, kawie czy herbacie. Zostało przeprowadzonych wiele badań, potwierdzających obecność alkaloidów w tych surowcach roślinnych, udokumentowano wiele prac przedstawiających techniki izolacji tych związków jak i badań określających wpływ na organizm ludzki. Wiadomo już, na przykład że alkaloidy takie jak morfina, kodeina czy papaweryna pochodzą z opium, czyli suszonego mlecza, pozyskiwanego z niedojrzałych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum*). Dzięki postępującemu rozwojowi nauki wiadomo nie tylko o sposobie działania tych związków, sposobie ich pozyskiwania a nawet o ich toksycznym wpływie na organizm ludzki. Przeprowadzone badania

pozwołyły ustalić dawki terapeutyczne a nawet śmiertelne. Do dziś są one z sukcesem stosowane w leczeniu wielu jednostek chorobowych (Kohlmunzer 1985; Kotlińska i in. 2016; Sjogren i Żylicz 2004).

Alkaloidy należące do dwóch gatunków *Lycopodium* sp. i *Narcissus* sp. nie są do końca poznane. Przeprowadzone do tej pory badania pozwoliły częściowo ustalić ich skład i stwierdzić że są one bogatym źródłem alkaloidów wykazujących zdolność do hamowania acetylocholinoesterazy, enzymu odpowiedzialnego za rozkład neuroprzekaznika układu cholinergicznego jakim jest acetylocholina (ACh). Właściwość tych związków jest na tyle interesująca iż została wykorzystana w leczeniu wielu chorób neurodegeneracyjnych, jak na przykład w terapii choroby Alzheimera. Obecne leczenie polega jedynie na zmniejszeniu tempa rozwoju choroby, poprzez hamowanie zmian neurodegeneracyjnych nie doprowadzając jednak do likwidacji przyczyn choroby i całkowitego wyleczenia pacjenta. Nadzieją w terapii choroby Alzheimera są właśnie inhibitory acetylocholinoesterazy, które poprzez zablokowanie enzymu AChE, zwiększają poziom mediatora ACh w szczelinach synaptycznych. Do tej pory znanych jest kilka aktywnych biologicznie związków pochodzących z tych surowców roślinnych. Przykładem jest alkaloid - galantamina, która obecnie otrzymywana jest na drodze syntezy chemicznej bądź z trzech rodzajów roślin należących do rodziny *Amoryllidaceae* w tym między innymi z rodzaju *Narcissus* sp. Zarejestrowana jako lek i stosowana w chorobach neurodegeneracyjnych charakteryzuje się dużą efektywnością w poprawie funkcji poznawczych oraz behawioralnych, dlatego poszukiwanie i izolowanie nowych inhibitorów AChE pochodzenia naturalnego budzi ogromne zainteresowanie wśród naukowców (Vetulani 2010; Wszelaki 2009; Zabłocka 2006).

2. Opis zagadnienia

Alkaloidy *Lycopodium* sp. i *Narcissus* sp. stanowią liczną, niejednorodną grupę związków, których izolacja może nastręczać wiele trudności. Bez względu na zróżnicowaną budowę chemiczną, większość z alkaloidów wykazuje charakterystyczne reakcje wspólne, które pozwalają na potwierdzenie ich obecności w materiale roślinnym. W związku z tym, że większość z nich w swoim szkielecie posiada heterocykliczny atom azotu i wykazuje właściwości zasadowe, wstępną izolację składników z matrycy roślinnej stosuje się z wykorzystaniem procesu ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Podstawą większości procesów izolacji oraz identyfikacji związków chemicznych są techniki separacyjne, które polegają na selektywnym rozdzielaniu substancji chemicznej z jednoczesnym zaklasyfikowaniem ich do danego rodzaju substancji. Sam proces ekstrakcji oznacza sposób wyodrębniania poszczególnych substancji poprzez ich rozpuszczenie w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku i oddzielenie ich od pozostałych nierozpuszczalnych składników próbki. Substancja ekstrahowana ulega rozdzieleniu pomiędzy dwie niemieszające się fazy, z tego względu niezwykle istotnym etapem zapewniającym optymalne warunki procesu izolacji jest prawidłowy dobór rozpuszczalnika. W preparatyce związków pochodzenia naturalnego zastosowanie znajdują techniki separacyjne oparte na mechanizmach sorpcyjnych (ekstrakcja typu ciecz - ciało stałe) oraz ciekło - fazowych mechanizmach podziałowych (ekstrakcja typu ciecz - ciecz) (Stepnowski i in. 2010; Witkiewicz 2017).

Najwięcej trudności przysparza odpowiedni dobór techniki ekstrakcyjnej. W dużej mierze zależy on od właściwości fizyko-chemicznych badanej substancji, jej stanu skupienia oraz od końcowego celu tego procesu, czy zależy nam na wyodrębnieniu i identyfikacji pojedynczych składników czy określonej grupy związków, a może na oznaczenie ich składu pod względem ilościowym. Do wyodrębnienia frakcji alkaloidowej w dalszym ciągu stosuje się metody klasyczne na przykład ekstrakcja przez wytrząsanie czy ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Jednak metody te, należące do metod klasycznych coraz częściej skutecznie zostają wypierane przez nowe, bardziej ekologiczne metody, które charakteryzują się dużym ograniczeniem zużycia odczynników chemicznych, w tym rozpuszczalników oraz krótszym czasem wyodrębniania aktywnych związków z matrycy. Aktualnie obserwuje się wzrost zainteresowania metodami alternatywnymi w których zastosowanie selektywnych sorbentów lub zmiana właściwości fizycznych ekstrahenta (np. jego temperatury czy ciśnienia) umożliwia uzyskanie zdecydowanie wyższych odzysków oraz lepszej selektywności. Współczesna nauka kieruje się rozwojem nowoczesnych technik ekstrakcyjnych

mając na celu zmniejszenie zużycia energii danego procesu chemicznego jak i zmniejszenie nakładu pracy, umożliwiając jak największą automatyzację metody pozwalając na oznaczenie jak największej ilości substancji w danym czasie. Ponadto rosnąca świadomość ekologiczna pozwala na odstawienie odczynników toksycznych dla człowieka jak i środowiska, ograniczając emisję par, gazów czy odpadów, powstałych w wyniku procesu analitycznego (Carabias-Martínez et al. 2005; Giergielewicz – Możajska i in. 2001; Mustafa and Turner 2011; Stepnowski i in. 2010; Wang and Weller 2006).

Tab.1. Podział technik ekstrakcyjnych.

Techniki ekstrakcyjne	
Klasyczne metody	Nowoczesne metody
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (PLE lub ASE)
Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie	Ekstrakcja pod zwiększonym ciśnieniem (VLC)
Homogenizacja próbki z rozpuszczalnikiem	Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE)
Ekstrakcja strumieniem rozpuszczalnika	Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE)
Zmydlanie (saponifikacja)	Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

3. Przegląd literatury

Zastosowanie technik separacyjnych w analizie chemicznej sięga początku XX wieku, wraz z odkryciem zjawiska chromatografii przez rosyjskiego botanika Michaiła Cwieta, który jako pierwszy zastosował tę metodę do rozdzielania barwników roślinnych z liści na kolumnie wypełnionej węglanem wapnia. Kolejne lata były przełomowe dla tej dziedziny nauki, pozwalając otrzymać Nagrodę Nobla szwedzkim uczonym za rozwój teorii jak i praktyki chromatografii podziałowej, które dały solidne podstawy nowoczesnym metodom rozdzielania. Na szczególną uwagę zasługuje profesor z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, twórca Lubelskiej Szkoły Chromatograficznej Edward Soczewiński. Wybitny chemik, który jest współtwórcą komory poziomej do chromatografii cienkowarstwowej, używanej obecnie na całym świecie, dzięki której nastąpił duży przełom w technikach ekstrakcyjnych. Obecnie w celu wstępnej izolacji związków należących do alkaloidów wykorzystuje się zarówno klasyczne jak i nowoczesne metody ekstrakcji. Jedną z najstarszych metod ekstrakcji zaliczanych do technik klasycznych jest analiza w aparacie Soxhleta. Po raz pierwszy technika ta została użyta w drugiej połowie XIX wieku przez niemieckiego chemika Ritтера von Soxhleta. Pierwotnie miała ona służyć ekstrakcji tłuszczu z próbek stałych, jednak w późniejszych latach stała się uniwersalną metodą izolacji w wielu dziedzinach nauki. Ograniczeniem tej metody jest długi czas trwania procesu, przeważający nad prostotą aparatu. Jednak deklasuje ona ekstrakcję przez wytrząsanie, która jest ciągle najprostszą stosowaną techniką klasyczną, choć bardzo niewygodną. Wymaga ona dużego nakładu pracy i zużycia znacznych ilości rozpuszczalnika. Ekstrakcja strumieniem rozpuszczalnika polega na ciągłym przepływie przez próbkę, umieszczoną na kolumnie porcjami rozpuszczalnika. Metoda ta zwana również perkolacją umożliwia ciągły kontakt analizowanej próbki z ekstrahentem, a w celu zwiększenia wydajności procesu można prowadzić ją w podwyższonej temperaturze. Kolejna ekstrakcja przez homogenizację próbki polega na zalewaniu badanej próbki odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem i następnie jej rozdrobnienie przez ucieranie. Proces ten jest również pracochłonny ponieważ uzyskany ekstrakt w kolejnym etapie rozdziela się od nierozpuszczonej pozostałości przez sączenie bądź przez wirowanie. Etap ekstrakcji należy powtórzyć kilkakrotnie świeżą porcją rozpuszczalnika w celu zwiększenia wydajności procesu. Wspomniana wyżej saponifikacja zwana również zmydleniem stosowana jest w przypadku oznaczenia steroli w komórkach roślinnych, jednak w celu izolacji

i identyfikacji alkaloidów z rodzaju *Licopodium* sp. i *Narcissus* sp. stosuje się coraz częściej nowoczesne metody ekstrakcji w połączeniu z metodami chromatograficznymi. Proces ekstrakcji jest kluczowym etapem przygotowania próbki umożliwiając jak najlepsze oczyszczenie próbki z balastowych związków, tak aby następnie poddać ją kolejnym procesom i identyfikacji poszczególnych związków (Hulanicki 2003; Stepnowski i in. 2010; Wang and Weller 2006).

Opisane metody klasyczne pozwalają w głównej mierze oddzielić jedynie główne alkaloidy, od których nie zawsze zależy działanie farmakologiczne danego surowca. Dlatego rozdzielanie większej liczby alkaloidów, które zazwyczaj licznie występują w roślinie, jest niemożliwe tymi technikami. Dlatego niezbędne było zmodyfikowanie klasycznych metod izolacji substancji poprzez zastosowanie metod wspomagających jak na przykład poddanie próbki działaniom fal ultradźwiękowym, promieniowania ultrafioletowego czy poprzez zwiększenie ciśnienia ekstrahenta. Pozwoliło to na zwiększenie wydajności procesu, lepszą penetrację rozpuszczalnika i transport analitu oraz skrócenie jej czasu trwania. Jedną z głównych technik ekstrakcji alkaloidów z rodzaju *Licopodium* sp. i *Narcissus* sp. jest przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE – ang. *Accelerated Solvent Extraction*) inaczej zwana ciśnieniową ekstrakcją cieczą (PLE – ang. *Pressurized Liquid Extraction*) służącą do wstępnej izolacji substancji ze stałych i półstałych matryc. Umieszczony w specjalnym naczyniu ekstrakcyjnym (celce) materiał roślinny ekstrahuje się za pomocą rozpuszczalników poddanych działaniu podwyższonej temperatury (50-200°C) i ciśnienia (10-14 MPa). Poprzez regulację obu parametrów można uzyskać poprawę efektywności izolacji. Wzrost ciśnienia w układzie zapewnia utrzymanie w fazie ciekłej zastosowanych, ogrzanych powyżej temperatury wrzenia rozpuszczalników, natomiast podwyższona temperatura poprawia zdolność rozpuszczania analitów i wpływa na szybkość dyfuzji. Dodatkowo obniżona lepkość ekstrahenta umożliwia efektywną penetrację rozpuszczalnika w głąb próbki. Dochodzi do rozerwania silnych oddziaływań typu Van der Waals'a i wiązań wodorowych, czego konsekwencją jest oddzielenie się analitu od matrycy roślinnej. Analit zostaje wypłukany z naczynia ekstrakcyjnego porcją świeżego rozpuszczalnika, którego przepływ wymuszany jest nadciśnieniem azotu. Główną zaletą ASE w porównaniu z innymi metodami ekstrakcyjnymi jest niewątpliwie krótki czas ekstrakcji, która zajmuje od 5-15 minut. Niezwykle istotna jest także redukcja zużycia rozpuszczalników, prostota oraz pełna automatyzacja procesu. Niewątpliwą wadą tej metody jest niestety wysoki koszt aparatury. Znacznie tańszą metodą jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE – ang. *Solid Phase Extraction*), która polega na zatrzymaniu analizowanych składników próbki na sorbencie, a następnie jej wymywaniu za pomocą rozpuszczalnika bądź mieszaniny rozpuszczalników posiadających wysokie powinowactwo do fazy stałej. Rozwój tej techniki nastąpił dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku, kiedy to używane w tej metodzie sorbenty takie jak tlenek glinu, węgiel aktywny czy żel krzemionkowy stały się łatwo dostępne. Mechanizm działania metody wykorzystuje zjawisko podziału analitu między dwie fazy: fazę ciekłą i stałą. Ekstrakcja SPE jest możliwa, gdy wiązanie pomiędzy badanym analitem a fazą stałą jest silniejsze niż oddziaływania z rozpuszczalnikami. Zwykle stosowanymi ekstrahentami są metanol, aceton, dichlorometan, bądź mieszaniny tych rozpuszczalników. W celu przyspieszenia procesu ekstrakcji często prowadzi się ją pod zwiększonym ciśnieniem z użyciem pompy próżniowej (VLC- ang. *Vacuum Liquid Chromatography*), dzięki czemu zwiększa się szybkość przepływu ekstrahenta, powodując szybsze wymywanie próbki ze zbędnych substancji. Zaletą tego procesu jest prostota upakowania kolumny wypełnionej odpowiednio dobranym sorbentem, jak i duża oszczędność czasu w porównaniu z klasyczną metodą SPE. Proces ten obejmuje kilka podstawowych etapów: aktywacja sorbentu poprzez przemycie odpowiednim rozpuszczalnikiem, naniesienie próbki na kolumnę, wymywanie analitu za pomocą rozpuszczalników i zbieranie gotowych frakcji. Celem tej techniki jest przygotowanie próbki do kolejnych analiz w jak najczystszej możliwej postaci. Charakteryzuje się wysokim stopniem odzysku badanej substancji oraz daje możliwość oczyszczenia ekstraktu w możliwie krótkim czasie (Maurya et al. 2018; Pelletier et al. 1986; Stepnowski i in. 2010; Wang and Weller 2006; Żwir-Ferenc and Biziuk 2006).

Takie przygotowanie próbki wyżej wymienionymi technikami pozwala na wyizolowanie alkaloidów z rodzaju *Narcissus* sp. i *Lycopodium* z jednoczesnym oczyszczeniem i pominięciem pozostałych związków zawartych w mieszaninie, będących zbędnymi składnikami analizowanej

próbki i przejście do właściwej analizy związków. Wspólną cechą tych alkaloidów jest zdolność do inhibicji acetylocholinoesterazy, enzymu odgrywającego kluczową rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. W związku z rosnącym starzeniem się społeczeństw i dużym problemem jaki nastręcza farmakoterapia chorób neurologicznych, naukowcy nieustannie podejmują próby wykrycia nowych związków aktywnych zdolnych do zatrzymania postępu choroby i jej zapobiegania. W tym celu służą testy oceniające aktywność badanych związków do inhibicji AChE, inaczej badania bioaktywności, czy bioautografii TLC (ang. *Thin Layer Chromatography Bioautography*). Technika ta jak i inne metody pozwalające na wizualizację otrzymanych wyników (między innymi derywatywacja rozwiniętych chromatogramów TLC przy użyciu nowoczesnej komory derywatywacyjnej) znajdują zastosowanie w badaniach mających na celu identyfikację związków o potencjalnym działaniu hamującym AChE, jak i innych kluczowych inhibitorów hamujących określone szlaki enzymatyczne. Obecnie znane są trzy metody oznaczania aktywności inhibitorów AChE, z czego w piśmiennictwie najczęściej spotyka się metodę Ellmana. W związku z pojawiającymi się problemami jak niestabilność otrzymanych żółtych stref wywołanych obecnością inhibitora w danym surowcu roślinnym, fitochemik Tomasz Mroczek zmodyfikował tę metodę przez użycie innego substratu, który w wyniku reakcji z odczynnikami daje głęboko fioletową barwę, a trwałe, białe plamy na fioletowym tle świadczą o obecności inhibitorów AChE. Dzięki metodzie bioautografii TLC wykryto wiele inhibitorów acetylocholinoesterazy z substancji roślinnych. Obecnie w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie trwają badania mające na celu poszukiwanie nowych inhibitorów AChE z gatunków *Narcissus* sp. i *Lycopodium* sp. pod patronem odtwórcy tej metody fitochemika Tomasza Mrocza, które odgrywałyby kluczową rolę w terapii choroby Alzheimer'a nie tylko w łagodzeniu objawów choroby, ale także stałyby się bezkonkurencyjne w próbach leczenia przyczynowego (Mroczek 2009,2016; Paradowska i Ginalska 2016; Smyrska- Wieleba 2017).

4. Podsumowanie

Metody izolacji alkaloidów z rodzaju *Narcissus* sp. i *Lycopodium* sp. są jednym z najważniejszych etapów, z którymi boryka się każdy fitochemik na początku swojej drogi doświadczalnej. Od tego etapu zależy każdy kolejny proces: metody identyfikacji czy badania bioaktywności TLC aktywnych inhibitorów AChE. Odpowiednio dobrana metoda ekstrakcyjna oraz zapewnienie specjalnych warunków procesu jak odpowiedni dobór rozpuszczalników, podwyższone ciśnienie czy temperatura zapewniają duży sukces w otrzymaniu satysfakcjonujących wyników. Współczesne techniki separacyjne, obecnie zastępowane są skomplikowaną aparaturą, pozwalającą uzyskać szybki rozdział składników badanej próbki niezależnie od stanu skupienia. Jej połączenia z metodami bioautografii czy technikami spektroskopowymi nie tylko pozwalają na izolację i identyfikację badanych alkaloidów czy innych aktywnych związków, ale także stają się narzędziem preparatywnego otrzymywania i oczyszczania wielu substancji w tym również leków pochodzenia roślinnego, dając nadzieję w leczeniu wielu jednostek chorobowych w tym chorób cywilizacyjnych. Według obecnych danych WHO (*World Health Organization*) zaburzenia neurodegeneracyjne są coraz szybciej narastającym problemem zarówno medycznym jak i społecznym. Ze względu na obserwowany wzrost starzenia się społeczeństw dotyczą coraz większej liczby osób. Dlatego odkrycie związków alkaloidowych pochodzenia roślinnego o właściwościach hamujących enzym AChE ma przełomowe znaczenie w leczeniu różnego typu demencji. Poszukiwanie nowych inhibitorów i izolacja alkaloidów obecnie znanych o wysokiej bioaktywności jest całkowicie zasadna, gdyż daje dużą nadzieję, na odkrycie leku, który da początek całej grupie środków pochodzenia roślinnego znajdujących zastosowanie w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

5. Literatura

Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P et al. (2005) Pressurized Liquid Extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A* 1089, 1-17.

- Giergielewicz–Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J (2001) Przegląd technik ekstrakcyjnych wykorzystywanych na etapie wyodrębniania analitów z próbek stałych. Część II. Ekologia i technika. 9, 3-11.
- Hulanicki A (2003) Stulecie odkrycia chromatografii (1903-2003). Kwartalnik Historii Nauki i Techniki 48/3-4, 252-255.
- Kohlmunzer S (1985) Farmakognozja, PZWL (300; 449)
- Kotlińska A, Marciniak P, Adamski Z i in. (2016) Alkaloidy- naturalne substancje kardioaktywne. 65 (2): 247-256
- Maurya A, Kalani K, Verma ChS et al. (2018) Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. Organic and Medicinal Chemistry;7,2, 1-3.
- Mroczek T, (2009) Highly Efficient, Selective and Sensitive Molecular Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors of Natural Origin by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography/electrospray Ionisation-Octopole-Orthogonal Acceleration Time-of-Flight-Mass Spectrometry and Novel Thin-Layer Chromatography-Based Bioautography. Journal Chromatography A (1216): 2519–2528.
- Mroczek T, (2016) Qualitative and quantitative two-dimensional thin-layer chromatography/high performance liquid chromatography/diode-array/electrospray-ionization-time-of-flight mass spectrometry of cholinesterase inhibitors. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (129):155-162.
- Mustafa A, Turner C, (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Analytica Chimica Acta; 703, 8-18.
- Paradowska K, Ginalska G (2016) Zastosowanie metody TLC bioautografii do identyfikacji inhibitorów enzymatycznych-praca przeglądowa. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju Tygiel, 287-312.
- Pelletier SW, Chokshi HP, Desai HK (1986) Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. Journal of Natural Products; 49, 5, 892-900.
- Sjogren P, Żylicz Z (2004) Następstwa kliniczne metabolizmu morfiny. Polska Medycyna Paliatywna; 3,2,101-117.
- Smyrka- Wieleba N, Wojtanowski KK, Mroczek T (2017) Comparative HILIC/ESI-QTOF-MS and HPTLC studies of pyrrolizidine alkaloids in flowers of Tussilago farfara and roots of Arnebia euchroma. Phytochemistry Letters; 20, 339-349.
- Stepnowski P, Synak E, Szafranek B i in. (2010) Techniki separacyjne. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; 9-120.
- Vetulani J (2010) Leki nootropowe i prokognitywne. Farmakoterapia choroby Alzheimerera. Kostowski W, Herman Z: Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy. Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa (2): 154–169.
- Wang L, Weller CL, (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology, 17, 300-312.
- Witkiewicz Z, Kałużna-Czaplińska (2017) Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych. Wydawnictwo Naukowe PWN; 6; 406-444.
- Wszelaki N (2009) Hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez surowce roślinne i ich substancje czynne, Postępy Fitoterapii, s. 24-38.
- Zabłocka A (2006) Choroba Alzheimerera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej;60, 209-216.
- Żwir-Ferenc A, Biziuk M (2006) Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. Polish Journal of Environmental Studies;5,15 ,677-690.

3. The ribosome evolution

Filipek Kamil, Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Deryło Kamil

Molecular Biology Department, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Scientific supervisor: dr Barbara Michalec-Wawiórka

Filipek Kamil: kamilfilipek@wp.pl

Key words: accretion model, subunits, ancestral expansion segments

Abstract

The origin and evolution of ribosome started about 3-4 billion years ago and is one of the most important things to understand the living world. During these changes, the ribosome evolved by accretion, adding expansion segments to the main core of ribosomal RNA (rRNA) without any perturbations. The accretion of rRNA might be visualized by comparing structures of bacteria, yeast and metazoans ribosome. Functions of these growing elements in the ancestral ribosome are assigned by correspondence with their functions in the extant ribosome. This model of ribosome development explains the evolution of the small (SSU) and large subunit (LSU), tRNA and mRNA. Prokaryotic ribosome evolved in six phases, while eukaryotic ribosome needed additional two phases. During each step, the ribosome gained new features such as catalysis, subunit association, decoding, energy-driven translocation, ribosomal proteinization. The primitive ribosome acquired also important feature - ratchet system, which inhibited the reverse translocation of tRNA. This system and extended, rigidified exit tunnel allows the ribosome to produce the longer protein peptides.

1. Introduction

The evolution and formation of ribosome is essential for understanding the living world. It is believed that the ribosome was the first organelle which appeared within the cell. A significant number of hypothesis states that the peptidyl-transferase center was created at the beginning of large subunit formation. In the next step, subsequent RNA sequences were attached to the ribosome and they allowed to make interaction with proteins or tRNA. Also, together with the ribosome, the tRNA and genetic code evolved, which developed just before the functional process of protein synthesis (Vesigian et al. 2006). The translational process replaced a primitive replication based only on RNA sequences (Harish and Caetano-Anolles 2012). The whole process of ribosome evolution has been called the accretion model. This process describes increase of rRNA component of the ribosome in the form of rRNA segment expansion. These expansion segments are small, folded RNA fragments which are incorporated to the rRNA core during ribosome evolution. An increase in rRNA length did not interfere with the structure and function of the main core of the pre-ribosome. The length of these inserts is significantly higher in eukaryotic organisms than in prokaryotes and also larger in the large subunits than in the small subunits (Fig.1).

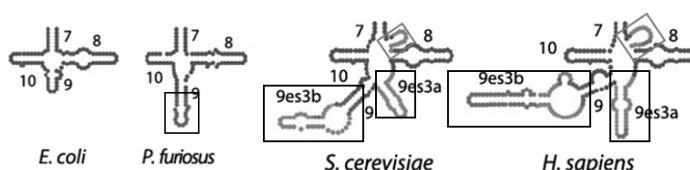


Fig. 1 Accretion model of small subunit rRNA as indicated by rectangles in *E. coli* (bacteria), *P. furiosus* (archaea), *S. cerevisiae* (lower eukarya) and *H. sapiens* (higher eukarya) (Petrov et al. 2015). The common core formed by helices 7-10 has expanded by adding the insert fragments. Length of inserts are bigger in eukaryotic organisms than in prokaryotic organisms.

The functional regions of ribosomes such as peptidyl-transferase center, decoding center and the tRNA binding sites do not contain the insert segments. These kind of insertion segments could interfere in proper functioning. In general, in the small subunit, 27 ancestral expansion segments (aes) can be found, while in large subunit, 59 ancestral expansion segments (AES) are presented. The biggest insertion in 40S subunit is es6, 170-504 nucleotides (nt) shaped like two alpha helices. In contrast, in 60S subunit the biggest insert is ES27, 560 nt, which is located in H63 helix (Fig.2) (Bąkowska-Żywicka 2008).

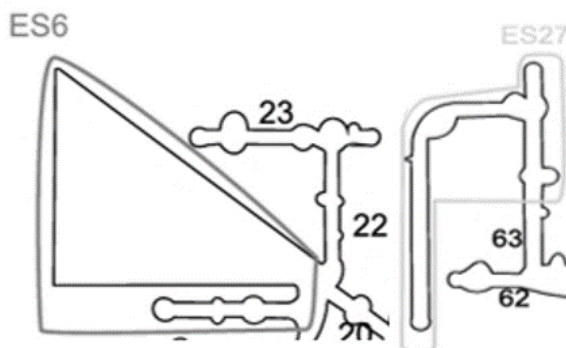


Fig. 2 The biggest insertion segments in eukaryotic ribosomal RNA (Bąkowska-Żywicka and Tyczewska 2008). A small subunit contains es6, whereas a large subunit contains ES27.

2. Types of insertions

The insertion fragments are grouped by relationships between trunks and branches. In accretion model there are four groups of inserts (X, Y, T, L), which are ordinated by relative ages and expansions of RNA elements. In the *Y group* a branch helix is inserted into helix and then they form a three-way junction. The helical axis in the branch is almost perpendicular to the trunk. Stacking is still ongoing. In the *T group* a branch helix caps a trunk helix, which results in three-way junction. Stacking is continuous and the branch axis is perpendicular to the trunk. When the branch is inserted to trunk, the inserted fingerprint belongs to the T_1 group, but when the branch caps trunk, the inserted fingerprint belongs to the T_2 group. Different type of junction is observed in *X group*. Here the branch helix insertion to the trunk helix results in forming a four-way junction. The branch axis is parallel to the trunk. Whereas in the *L group* the branch helix is joined into a loop and extends the trunk. The branch is stacking continuity with the original trunk (Ramakrishnan 2002; Petrov et al. 2014; Petrov et al. 2015).

3. Ribosome evolution

By the analysis of joining time of subsequent segments, it is possible to indicate the six stages of the ribosome main core evolution and two additional stages of the eukaryotic ribosome evolution (Petrov et al. 2014).

In the first phase, the primary RNA was folded. The original aes1 loop gives rise to a small subunit and became the oldest h44 helix. This helix is the main functional relay, which combines the decoding process with protein synthesis or releasing translational factors. On the other hand, the large subunit precursor is AES1 loop, which is located in the main part of the peptidyl-transferase center. The spatial structure of the rRNA protects its against chemical degradation and the folding process is stabilized by metal cations (Fig.3) (Petrov et al. 2015).

The second phase is called also “catalyze and dynamic”. In the large subunit, four segments (AES 2-5) are included at the same time. The simultaneous interaction of these inserts with the peptidyl-transferase center makes it more stable (Agmon et al. 2006). The aminoacyl site was formed by AES 3-5 inserts and the peptidyl site was formed by the AES 1-2. During this phase the small subunit is enriched with three inserts of rRNA, which are initially unstable, but next rearrangements allow to stabilize the entire structure. At this stage of the ribosome evolution there is also a prototype

tRNA that is built of the tail of the CCA amino acid acceptor and T-loop formed by mini-helix. The CCA proto-tRNA fragment provides activated amino acids to the peptidyl-transferase center (Petrov et al. 2014). Also, both subunits do not interact with each other, but only the large subunit performs nonspecific condensation of amino acids (Fig. 4) (Fox et al. 2012).

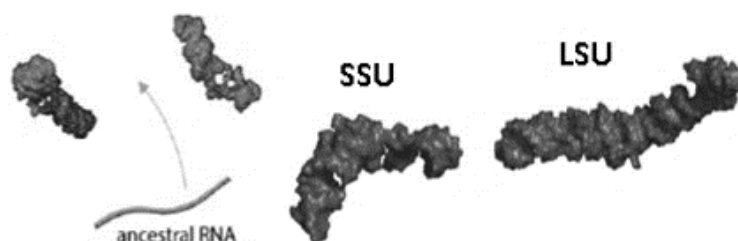


Fig. 3 Phase 1 – folding and chemical stability. Folding of linear RNA and appearance of small and large ribosomal subunit at the end of first stage (Petrov et al. 2015).

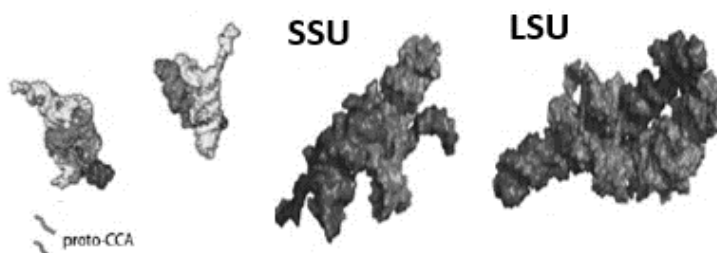


Fig. 4 Phase 2 – catalysis and dynamics. Interaction of proto-tRNA with large subunit. Construction of LSU and SSU at the end of second stage (Petrov et al. 2015).

In the third stage of the evolution of ribosome there is the first association of the large and the small subunits and also the proto-mRNA appears (Fig. 5). Before connection of two subunits, further expansion of ribosomal parts takes place. The exit tunnel in 60S subunit is extended by addition of AES 6-10 inserts and these segments expand the contact surface between ribosomal subunits. The peptidyl-transferase center is closed and stiffened. At the same time, in the small subunit take place the completion of aes 4 in the rRNA 3' end. This is important incorporation, because this ensures the stability and integrity of decoding center. To this moment of ribosome evolution, the subunits have evolved independently, but now they are attached to each other by creation of the oldest ribosomal B5 bridge (Petrov et al. 2015).

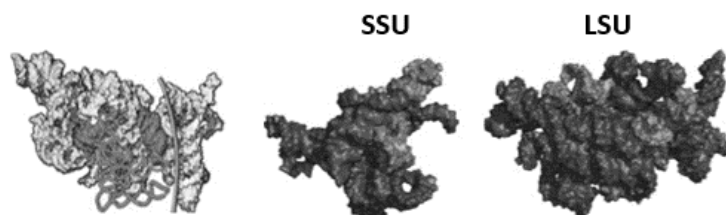


Fig. 5 Phase 3 – meeting up (pre-association). First association of primitive subunits with proto-tRNA and proto-mRNA. Spatial structure of ribosomal subunits (Petrov et al. 2015).

Additionally, the association of ribosomal subunits is mainly supported by the B3 bridge, which is responsible for connecting of aes 1 and AES 15. Moreover, appearing of the B2b and B2c bridges and magnesium ion strengthens subunits contact (Fig. 6) (Schuwirth et al. 2005).

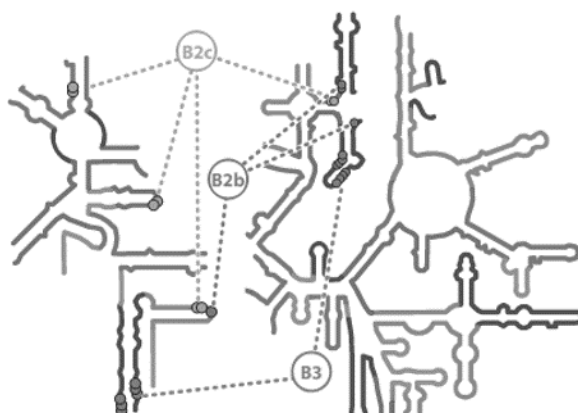


Fig. 6 First ribosomal bridges B2b, B2c and B3 showed in the rRNA secondary structure (Petrov et al. 2015).

Besides subunits evolution, the proto-mRNA appears as a population of random single-stranded oligomers. As well as the proto-tRNA, proto-mRNA are undergoing significant changes. To proto-tRNA structure, some additional RNA segments are incorporated. As a consequence of these changes the proto-tRNA has the L-shaped form, which allows to shorten the distance between subunits. This proto-tRNA plays a significant role, because it is responsible for recruiting a small subunit and proto-mRNA to the large subunit. Both subunits may stabilize the tRNA in the aminoacyl and peptidyl sites at the peptidyl-transferase center. Such a catalytic complex increases the ribosome yield and the final product- protein is going to be longer and longer. Since this moment, the evolution of all the ribosomal components begins to be correlated.

The fourth phase is the stage of structural and functional formation of cooperation between subunits, mRNA and tRNA. Adding new insertion segments to the large ribosomal subunit causes its the semicircular shape. The exit tunnel is still expanded by attaching new inserts and becomes stiffened as a result promotes the synthesis of longer polypeptide. Whereas in the small subunit, both the peptidyl site and aminoacyl site are stabilized by extending the 3' domain and the 5' domain in rRNA, respectively. Thus, new rRNA increments in these domains in the small subunit form functional pockets for binding tRNA. At the end of this phase, the incorporation of ancestral expansion segment 7 (aes 7) allows to set up a point of binding elongation factors such as EF-G and EF-Tu (Hartman and Smith 2010; Agirrezabala et al. 2011). The subunits contact surfaces are fully developed due to many RNA-RNA interactions. However, the proto-mRNAs are still single-stranded oligomers, but help in positioning of tRNA in aminoacyl and peptidyl sites. In contrary, the triple code is optimized in the tRNA (Fig. 7) (Bernhardt and Tate 2010).

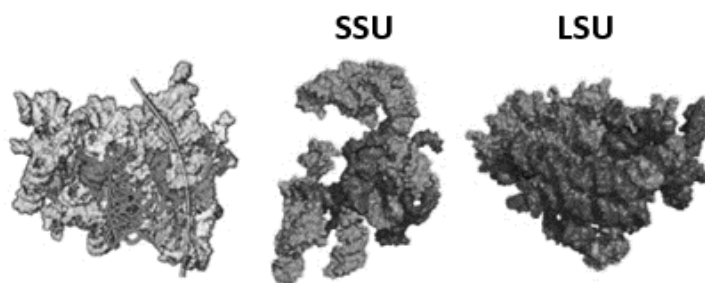


Fig. 7 Phase 4 – Integrating structure and function. Complex of ribosome with proto-mRNA and tRNA. Correlated evolution of both subunits from this phase (Petrov et al. 2015).

The fifth phase of ribosome evolution is the stage where the process of decoding the genetic information and tRNA translocation are completed (Fig. 8). The large subunit acquires new feature,

a so-called ratchet system. This kind of system makes impossible of reverse tRNA translocation and also is assisted by pseudoknot created by new inserts in aes 7 (Jenner et al. 2010; Mohan et al. 2014). Moreover, all the sites of binding of elongation factors are fully formed and in the same time the central protuberance is strengthened by attaching the smallest part of rRNA - 5S rRNA. The association of both subunits is tightened by B2a, B4 bridges and then by ribosomal proteins (Petrov et al. 2015). Since this phase the ribosome is not a diffusion catalyst system and becomes an energy-dependent machinery with a ratchet system, in which the proteins cooperate with nucleic acid. This translational machinery can work dynamically and due to flexible structure of L12 protein and long exit tunnel the synthesis of amino acid polymers is possible (Valle et al. 2003; Lancaster et al. 2008).

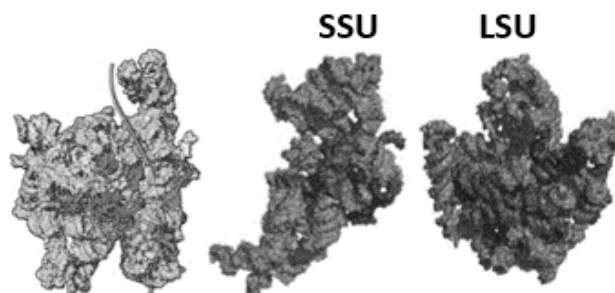


Fig. 8 Phase 5 – Coding and Translocating. View of associated ribosome with mRNA and tRNA. Construction of large and small subunit at the end of fifth stage (Petrov et al. 2015).

In the sixth phase the ribosome is mainly filling with the proteins (Fig. 9). The rRNA basic core is finished as well as the genetic code. Many gained ancestral expansion segments function as binding sites for the different domains of ribosomal proteins. In case of large subunit, the AES 39, 43, 44 build the L1 stalk, which is responsible for translocating the tRNA from peptidyl site to the exit site. AES 40 and 46 stabilize the central protuberance with 5S rRNA. The exit tunnel for peptides are still expanding. The similar things occur in the small subunit. All the 16S rRNA domains acquire new insertion segments, which stabilize its structure. These rRNA new segments in both subunits are integrated with new ribosomal proteins. Additionally, the bridges B6, B7a, B7b and B8 are tighten the interaction between the two ribosomal subunits. Except B7a bridge, all these bridges involve ribosomal proteins (Schuwirth et al. 2005; Petrov et al. 2015).

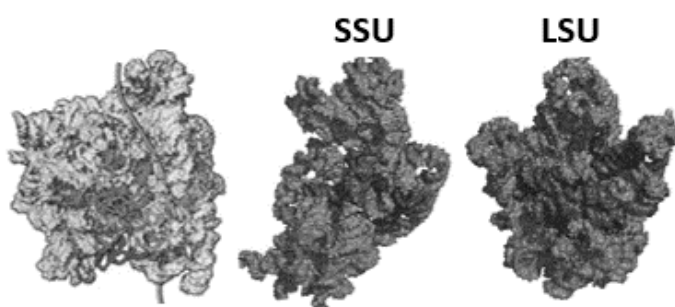


Fig. 9 Phase 6 – Proteinizing the common core. The mature ribosomal complex. Complete and functional ribosomal subunits (Petrov et al. 2015).

4. Conclusion

The accretion model describes the evolution of ribosome and also ribosomal components such as mRNA, tRNA and translational GTPases. The main component of ribosome, rRNA grows by accretion, expanding and adding step by step new layers to the main core of rRNA. The ribosomal main core evolves in six phases. During phase 1 the most important parts of ribosome such as

peptidyl-transferase center and decoding center began to be formed. Whereas during phase 2-4 the tRNA extended from a small helix and delivered substrates to the primitive large subunit, while short mRNA was positioned on the small subunit. These components allowed the primitive ribosome to start synthesizing short peptides. In the phase 5 the ribosome changes from a diffusive machine to energy-driven decoding machine, which conducts the protein synthesis by using the limited genetic code. Phase 6 is called the decoding optimization, where the modern cassette of amino acids is used. Also, during all the phases of ribosome evolution the exit tunnel is extended, what allows the ribosome to synthesize longer protein peptides.

Summarizing, the ribosome evolution showed the change from the synthesis of non-coded heterogenous oligomers to the large proteins. The ribosome gradually gained features for RNA folding, catalysis, subunits correlated association, evolution and decoding, giving rise to the extant collaboration of functional nucleic acids and stabilizing proteins.

5. References

- Agirrezabala X et al. (2011) Structural insights into cognate versus near-cognate discrimination during decoding. *The EMBO Journal* 30(8): 1497-1507
- Agmon I, Bashan A, Yonath A (2013) On ribosome conservation and evolution. *Israel Journal of Ecology and Evolution* 52: 359-374
- Bąkowska-Żywicka K, Tyczewska A (2009) The structure of the ribosome-short history. *Biotechnologia* 24: 14-23
- Bernhardt HS, Tate WP (2010) The transition from noncoded to coded protein synthesis: Did coding mRNAs arise from stability-enhancing binding partners to tRNA?. *Biology Direct* 5: 1-18
- Fox EG, Tran Q, Yonath A (2012) An exit cavity was crucial to the polymerase activity of the early ribosome. *Astrobiology* 12(1): 57-60
- Harish A, Caetano-Anolles G (2012) Ribosomal history reveals origins of modern protein synthesis. *PLoS One* 7: 1-17
- Hartman H, Smith TF (2010) GTPases and the origin of the ribosome. *Biology Direct* 5: 36
- Jenner L et al. (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nature Structural & Molecular Biology* 17: 1072-1078
- Lancaster L et al. (2008) The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit. *RNA* 14(10): 4640-4649
- Mohan S, Donohue JP, Noller HF (2014) Molecular mechanics of 30S subunit head rotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111(37): 13325-13330
- Petrov SA et al. (2014) Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111: 10251-10256
- Petrov SA et al. (2015) History of the ribosome and the origin of translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112: 15396-15401
- Ramakrishnan V (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108(4): 557-572
- Schuwirth BS et al. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310: 827-834
- Valle M et al. (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 114: 123-134
- Vestigian K, Woese C, Goldenfeld N (2006) Collective evolution and the genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103(28): 10696-10701

4. ER stress and Unfolded Protein Response

Filipek Kamil, Horbowicz-Drożdżal Patrycja, Michalec-Wawiórka Barbara

Molecular Biology Department, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Scientific supervisor: dr Barbara Michalec-Wawiórka

Filipek Kamil: kamilfilipek@wp.pl

Key words: ATF6, PERK, IRE-1 α , UPR, endoplasmic reticulum

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is a very important organelle inside the eukaryotic cell being involved in stress response to various stimuli. Its proper functioning is essential for cellular homeostasis, survival and development. The enormous number of proteins are folded and assembled inside the ER. Only correctly folded proteins are transported to suitable organelles. When ER homeostasis is disturbed, misfolded or unfolded proteins are stored in ER lumen, what induce the so called ER stress. In such situation cells react and activate the unfolded protein response (UPR). The aim of this response is to reestablish cellular homeostasis by activating various signal transduction pathways. The effectors of the UPR regulate the expression of many genes involved in restoring cellular homeostasis. If adaptive response is insufficient for cell survival, UPR pathways induce cells apoptosis. This dual role of the UPR attracts attention of many scientific groups and is worth a wider knowledge.

1. Introduction

The endoplasmic reticulum (ER), found in eukaryotic cells, is a complex compartment in structure and function. It forms flattened membrane-enclosed sacs or tube-like structures known as cisternae. The ER membranes are continuous with the outer nuclear membrane. ER is involved in secretory protein translocation and quality control of secretory protein folding (Schroder 2008). Analyzing the ER structure, it can be divided into the rough (RER) and the smooth (SER) endoplasmic reticulum. Smooth ER does not contain the ribosomes and is involved in the synthesis and storage of lipids (cholesterol and phospholipids), which are used in the production of new cell membrane (Alberts et al. 2002) (Figure 1).

On the other hand, RER contains many ribosomes, which are responsible for protein synthesis. The association of ribosomes with ER is dynamic, ribosomes are constantly being bound to ER and released from it (Lodish 2003). The ribosome binding to RER is dependent on first 5-30 amino acids at the N-terminal part of nascent polypeptide, which acts as a signal peptide. This special sequence is recognized by signal recognition particle (SRP), which targets ribosomes to the translocon within RER. The nascent peptide goes to the RER lumen, where is processed by peptidases. Its folding to three-dimensional shapes is supported by two chaperones BiP/Grp78 and Hsp70 (Araki and Nagata 2011 ; Sevier and Kaiser 2002).

2. ER stress

Even small condition changes can alter the ER homeostasis and its proper functioning, leading to induction of ER stress. Among factors inducing ER stress are hypoxia, oxidative stress, inflammation, Ca²⁺ depletion as well as high level of protein expression or accumulation of misfolded proteins (Cao and Kaufman 2012) (Figure 2). The ER homeostasis is essential for cell survival thus if ER stress occurs, cells activate series of mechanisms to restore the ER functioning. One of these mechanisms is the unfolded protein response (UPR).

The UPR promotes survival of the cell by reducing the overall protein synthesis, increasing chaperones expression and protein degradation (Bravo et al. 2013). If these pro-survival ways fail, the UPR switches to pro-death response, including apoptosis. The important pro-survival processes

are ER-associated degradation (ERAD) and autophagy. In ERAD pathway, the improperly folded proteins are degraded by 26S proteasome after prior labelling by ubiquitin (Smith et al. 2011). Because ERAD is limited to aggregates of misfolded or mutated proteins, the more robust degradation process is needed. This system is autophagy, responsible for degradation of intracellular components like huge aggregates and dysfunctional organelles (Deegan et al. 2013).

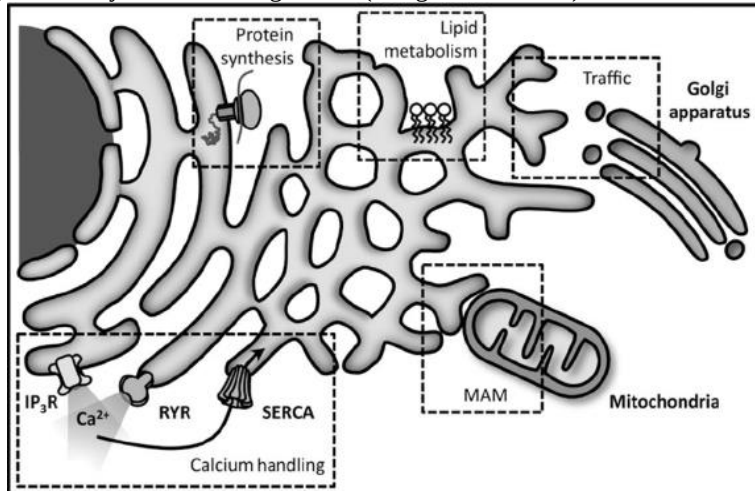


Fig. 1 The schematic representation of structure and function of rough and smooth endoplasmic reticulum (Bravo 2013). The rough ER contains many ribosomes and is involved in protein synthesis. Tubular – smooth ER is involved in lipid and calcium metabolism. ER contacts with Golgi apparatus during export of proteins. ER regulates also the mitochondria functioning by special zones called MAM (mitochondria-associated ER membrane). SERCA- sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase, RYR-ryanodine receptor, IP₃R- inositol triphosphate receptor

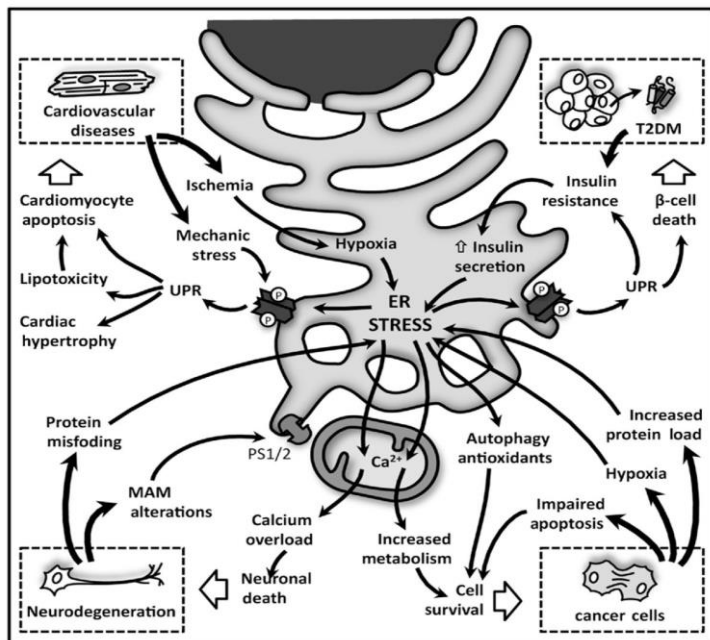


Fig.2 Endoplasmic reticulum stress and its pathologies (Bravo 2013). As it is shown on the picture ER stress could be activated by hypoxia, protein misfolding, high insulin secretion or ischemia. These various perturbations are observed in neurodegeneration, cardiovascular diseases, type-2 diabetes (insulin resistance) or cancer.

In mammalian cells the three branches of UPR have been described: inositol-requiring enzyme-1 α (IRE-1 α), activating transcription factor 6 α (ATF6 α) and protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), named after the three sensors of unfolded protein accumulation (Fig.3). During normal conditions luminal domains of PERK and ATF6 are bound by BiP chaperone (binding immunoglobulin protein), which keeps them inactive. When the unfolded or misfolded proteins appear in ER lumen, the BiP chaperone dissociate from PERK and ATF6 leading to their activation. In contrary to PERK and ATF6, the IRE-1 α activation occurs, when the unfolded proteins directly interact with it. After activation of these sensors, the cell is trying to alleviate the ER stress by inhibiting protein translation or/and inhibiting their entry into the ER lumen, increasing ER chaperones expression and removing “bad” proteins from reticulum to proteasome (Gardner et al. 2013).

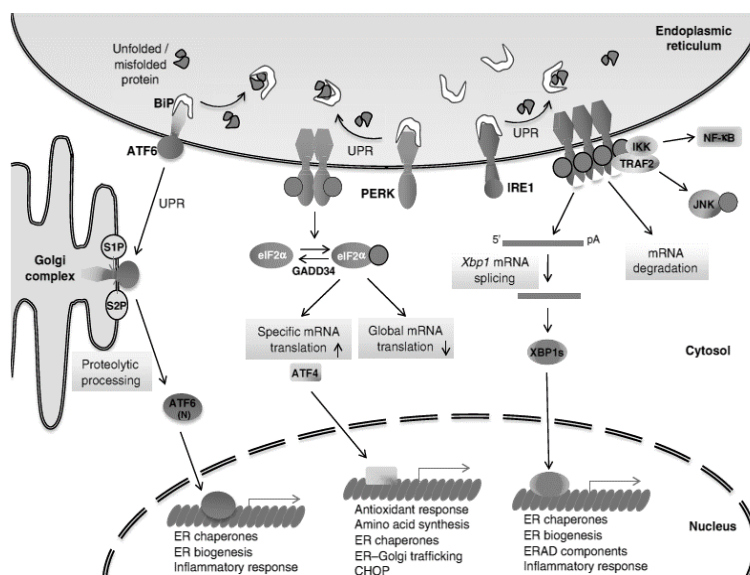


Fig. 3 The unfolded protein response within a cell (Cao and Kaufmann 2012). Three different pathways (ATF6, PERK, IRE1) sense the protein folding degree in the ER lumen and then transmit information to the nucleus. Each UPR branch uses a different type of signal transduction: ATF6 by proteolysis in Golgi apparatus, PERK by regulation of translation and IRE1 by mRNA degradation and splicing.

3. IRE-1 α activity during UPR

The IRE-1 α stress sensor is presented in all eukaryotic organisms and is the most conserved UPR branch. IRE-1 α is a ER transmembrane protein, which consists of luminal sensor domain (N-terminal domain), the transmembrane domain and C-terminal domain with kinase and endoribonuclease activity. The IRE-1 α pathway was observed for the first time in *Saccharomyces cerevisiae*, when the increased expression of ER chaperones enhanced the cells viability (Walter and Ron 2011). In mammalian cells there are two types of IRE1: IRE1 α and IRE1 β , which share the structural similarity but have different functions. Upon the ER stress the IRE1 α is responsible for splicing X-box-binding protein 1 (XBP1) mRNA, a stress responsive gene, whereas IRE1 β catalyzes the cleavage of 28S rRNA and attenuates the translation. Additionally, IRE1 α is capable to control its own expression by cleaving its mRNA and is expressed ubiquitously while the IRE1 β is expressed in the intestinal epithelium (Bravo et al. 2013; Cao and Kaufman 2012).

In the IRE1 α pathway (Fig.3), the accumulation of misfolded and/or unfolded proteins in ER lumen is sensed by BiP/GRP78 chaperone, which is bound to IRE1 α . Releasing this chaperone leads to dimerization of IRE1 α in ER membranes and causes auto-phosphorylation of the IRE1 α cytosolic domain (Pincus et al. 2010). After this, IRE1 α undergoes the conformational changes, which activates its endoribonuclease domain. Activated IRE1 α RNase cut out of the 26-nucleotide intron within the

XBP1 mRNA, which allows to translate the stable XBP1 protein functioning as a transcription factor. As a transcription factor XBP1 binds to the UPR and ER-stress response elements in the regions of promoter of target genes i.e. ER chaperones (Fig.3). The mature chaperones help in proper protein folding in the ER lumen, alleviating the ER stress. The active XBP1 protein controls expression of genes involved in synthesis, folding, and secretion of proteins, lipid synthesis and ERAD process (Hetz et al. 2011). The IRE1 α -XBP1 pathway is very important in cell metabolism, cell differentiation, during inflammation process and tumorigenesis. The deletion of *IRE1 α* or *XBP1* genes in embryonic mouse cell leads to their death at 12 day of gestation. The XBP1 protein induces also the α -fetoprotein expression, promotes hepatocyte differentiation showing that it is very important also for liver development (Cao and Kaufman 2012).

The IRE1 α activity is not only limited to XBP1 mRNA processing. Recent studies show that IRE1 α is furthermore capable of inducing the RIDD (regulated IRE1-dependent decay). This process includes degradation of many kinds of RNAs, such as: mRNAs, rRNAs and microRNAs. The IRE1 α switching from XBP1 processing to RIDD activity is controlled its oligomeric states. The function of IRE1 α in its oligomeric states is shifted towards XBP1 mRNA cleaving, whereas IRE1 α dimers state trigger the RIDD activity. This dual model of IRE1 α functioning is supported by studies, in which enhanced XBP1 mRNA splicing was correlated with IRE1 α oligomers and simultaneous decreased RIDD activity (Hetz et al. 2015).

4. PERK pathway

The second UPR pathway is represented by PERK transducer. It is found and conserved in all eukaryotic organisms, but is absent in *Saccharomyces cerevisiae*. The PERK luminal domain is similar to the IRE1 luminal domain and is responsible for stress-sensing. A catalytic domain shows the serine-threonine kinase activity, which phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor-2 (eIF2 α). PERK belongs to the type I transmembrane proteins and contains the big C-terminal lobe and small N-terminal lobe. The C-terminal lobe is formed by seven α -helices and two β -strands whereas the N-terminal lobe is formed by three α -helices and five β -strands. The C-terminal domain of PERK also contains a trans-phosphorylation site, in the position of threonine 980 (Thr980), and stabilizes the eIF2 α -binding site (Cui 2011).

During ER homeostasis, when the UPR is not activated the luminal domain of PERK is bound by BiP/GRP78 chaperone. When misfolded proteins start to accumulate in ER, BiP chaperone releases and binds these proteins. Then PERK undergoes oligomerization and trans-phosphorylation in Thr980 position, which switches on its kinase activity. Activated PERK phosphorylates eIF2 α in the Ser51 position, what results in the inhibition of GDP/GTP exchange in eIF2 α . Phosphorylation of eIF2 α stops the formation of the active 43S translation-initiation complex (Fig.3). Therefore, the protein synthesis is diminished, which is reflected by the decrease in formation of active ribosomes.

On the other hand, eIF2 α phosphorylation allows for translation of UPR-dependent genes such as ATF4 (activating transcriptional factor 4). ATF4 factor has upstream open reading frames (ORFs) in 5'-untranslated region (UTR). Its expression is possible only when eIF2 α is phosphorylated. In such conditions, ATF4 supports the transcription of downstream genes like *GADD34* (growth arrest and DNA damage-inducible 34) and *CHOP* (transcriptional factor C/EBP homologous protein) (Sano and Reed 2013). *GADD34* encodes the regulatory subunit of PP1C (protein phosphatase 1 complex), which is involved in eIF2 α dephosphorylation. The consequence of eIF2 α dephosphorylation is accumulation of unfolded proteins, but at the same time this modification allows to translate the proapoptotic proteins. On the other hand, *CHOP* can induces apoptosis directly by Bcl-2 transcription inhibition. Therefore, the first step in PERK pathway is a prosurvival mode, but in prolong ER stress, the proapoptotic response is turned on (Walter and Ron 2011).

Many studies concerning eIF2 α phosphorylation showed that it is very significant process for the cell. For example examinations conducted on mice with mutated eIF2 α , where important serine51 was replaced to alanine, indicated that these mice died 18 hours after birth due to hypoglycemia with defective gluconeogenesis in the liver. Also, another studies showed that lack of phosphorylated eIF2 α in pancreatic islets leads to a severe diabetes via proinsulin perturbed

translation or folding, problems with ER-Golgi transport, and impaired ER stress response (Cao and Kaufmann 2012).

5. ATF 6 pathway

The ATF6 is the third major pathway of unfolded protein response. This protein bears no homology neither with IRE1 nor PERK. Activation of ATF6 depends on its subcellular localization, proteolysis and chaperone dissociation (Gardner et al. 2013). ATF6 protein represents the type II of transmembrane proteins and is a member of the bZIP transcription factors. In the ATF6 protein three domains were described, the cytoplasmic N-terminal domain, the transmembrane domain and the luminal C-terminal domain (Bravo et al. 2013).

In non-stressed conditions the ATF6 α protein is present in the ER membrane in association with BiP/GRP78. Upon ER stress induction the BiP chaperone is released from ATF6 α and then ATF6 α is transported to the Golgi apparatus, what is directed by its two Golgi localization sequences (GLS1 and GLS2). Inside the Golgi, the ATF6 α is cleaved by two specific proteases S1P and S2P. The S1P protease removes the luminal domain (C-terminal), whereas S2P protease removes the transmembrane domain. These changes release the 50kDa cytoplasmic domain of ATF6 α (ATF6f), which is later transported to the nucleus. Inside the cell nucleus ATF6f acts as a transcription factor of ER stress-response elements such as BiP/GRP78 chaperone, CHOP factor and SERCA ATP-ase (Fig.3). ATF6 protein can increase cellular adaptation to chronic ER stress in an XBP-1 independent manner and also promote the misfolded protein degradation in the pathway of α -mannosidase-like protein 1 (EDM1) and protein disulphide isomerase-associated 6 (PDIA6) (Bravo et al. 2013; Hillary and FitzGerald 2018).

In mammalian cells two homologous ATF6 proteins are expressed: ATF6 α of 90kDa and ATF6 β of 110 kDa. They exhibit sequence homology, but interestingly both ATF6 isoforms show different role in the UPR pathway. The N-terminal region of transactivation domain (TAD) of ATF6 α has a transcription activity and promote ATF6 α degradation by ubiquitin-proteasome pathway. When UPR is activated ATF6 β acts as ATF6 α transcriptional repressor and blocks ATF6 α binding to the promoter region of BiP/GRP78 chaperone. Recent studies showed that ATF6 β can regulate the strength of ATF6 α response and also susceptibility to cell death, what is correlated with its glycosylation. When ATF6 β is not glycosylated, it is not cleaved, retains in ER and thus cannot function as a repressor of ATF6 α (Yamamoto et al. 2007; Bravo et al. 2013; Hillary and FitzGerald 2018).

Interestingly, in acute ER stress ATF6 α is necessary for proper protein folding, secretion and degradation. Cells with mutation in *ATF6* gene have a problem to survive in acute ER stress. Moreover, ATF6 α isoform plays role in cytoprotection and growth-modulation (Bravo et al. 2013).

6. Conclusion

The endoplasmic reticulum, one of the most important organelle within the cell, is a heterogenous compartment, divided into rough and smooth sections, which differ in their functions. RER is involved in protein synthesis, whereas SER is linked with lipid metabolism. These processes are necessary for every cell to live. This makes ER sensitive to every kind of environmental changes and that is why ER can be regarded as the largest stress sensor within the cell.

When stress conditions appear, the ER starts the unfolded protein response, which is an important regulator in restoring the cellular homeostasis. The UPR can restore cellular homeostasis by reducing misfolded proteins load to ER lumen and/or improving protein degradation by proteasome. If homeostasis cannot be restored, because of accumulation of an excess of unfolded proteins, the UPR switches on the programmed cell death and apoptosis is induced. Because of its various faces, the UPR plays an essential role in cell signaling at the transcriptional, translational and post-translational levels. Therefore, some perturbations in UPR pathway can lead to pathological states such as neurodegeneration, diabetes mellitus, cardiovascular diseases or tumor cell survival. Thus, it is very important to still investigate the UPR, especially its molecular pathways, what might help to elaborate targeted medicines or therapies for diseases connected with faulty UPR.

7. References

- Alberts B et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. New York: Garland Science
- Araki K and Nagata K (2011) Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 3(11)
- Bravo R et al. (2013) Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamic and metabolic integration. *International Review of Cell and Molecular Biology* 301: 215-290
- Cao SS and Kaufman JR (2012) Unfolded protein response. *Current Biology* 22(16): 622-625
- Cui W et al. (2011) The structure of the PERK kinase domain suggest the mechanism for its activation. *Acta Crystallographica D* 67: 423-428
- Deegan S et al. (2013) Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(14): 2425-2441
- Gardner MB et al. (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 5(3)
- Hetz C et al. (2011) The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiological Reviews* 91: 1219-1243
- Hetz C, Chevet E, Oakes AS (2015) Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology* 17(8): 829-836
- Hillary RF and FitzGerald U (2018) A lifetime of stress ATF6 in development and homeostasis. *Journal of Biomedical Science* 25(48): 1-10
- Lodish H et al. (2003) *Molecular Cell Biology* 5th edition. New York: W.H. Freeman and CO
- Pincus D et al. (2010) BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biology* 8(7)
- Sano R and Reed CJ (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833: 3460-3470
- Schroder M (2008) Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 862-894
- Sevier CS and Kaiser CA (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(11): 836-847
- Smith MH et al. (2011) Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334: 1086-1090
- Walter P and Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1086
- Yamamoto K et al. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental Cell* 13: 365-376

5. Metaloproteaza ZapA *Proteus mirabilis*: czynnik wirulencji i potencjalny cel nowych związków antybakteryjnych

ZapA metaloprotease of *Proteus mirabilis*: virulence factor and potential therapeutics target

Dawid Gmiter, Paulina Sobczyk, Magdalena Stawiarz

Zakład Mikrobiologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Opiekun naukowy: prof. zw. dr hab. Wiesław Kaca

Dawid Gmiter: dawid.gmiter@ujk.edu.pl

Słowa Kluczowe: zakażenia układu moczowego, aktywność proteolityczna, wzrost rozpełzły

Streszczenie

Metaloproteaza ZapA stanowi ważny element gwarantujący szczepom *Proteus mirabilis* efektywną możliwość kolonizacji dróg moczowych. Enzym ten wykazuje szerokie spektrum aktywności substratowej, dzięki czemu degraduje liczne białka organizmu gospodarza. Efekt ten jest potęgowany przez koregulację ekspresji proteazy ZapA z innymi czynnikami wirulencji, takimi jak aktywność ureolityczna oraz wzrost rozpełzły. Wyniki dotychczasowych badań pozwoliły stosunkowo dobrze scharakteryzować ten enzym pod względem mechanizmu działania. Wszystko to razem sprawia, że projektowanie metod terapeutycznych ukierunkowanych na ingerencję w prawidłowe funkcjonowanie ZapA wydaje się być ciekawym rozwiązaniem. Projektowanie nowoczesnych metod eradykacji bakterii jest niezbędne w dobie narastającej lekooporności szczepów bakteryjnych. Taki stan rzeczy dotyczy również *P. mirabilis*. Niniejsza praca stanowi krótkie wprowadzenie w omawianą tematykę, jej celem jest przedstawienie najważniejszych informacji dotyczących ogólnej charakterystyki proteaz bakteryjnych oraz podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat proteazy ZapA produkowanej przez *P. mirabilis*.

1. Wstęp

Proteus mirabilis jest Gram-ujemną bakterią stanowiącą istotny patogen zakażeń układu moczowego. Z uwagi na zdolność do wzrostu rozpełzłego, pozwalającą komórkom na migrację po powierzchniach stałych, bakteria ta z łatwością kolonizuje powierzchnię cewników. Wzrost rozpełzły uznawany jest za jeden z czynników wirulencji *P. mirabilis*, do których możemy dodatkowo zaliczyć zdolność do formowania biofilmu (w układzie moczowym jest to biofilm krystaliczny), lipopolisacharyd (LPS), aktywność ureolityczną, aktywność hemolityczną oraz aktywność proteolityczną. Komórki *P. mirabilis*, podobnie jak i komórki innych gatunków bakteryjnych, wykazują co raz mniejszy stopień wrażliwości na stosowane aktualnie antybiotyki. Z tego też względu istotne wydaje się poszukiwanie nowych związków wykazujących efekt bakteriobójczy lub bakteriostatyczny. Jedną ze strategii projektowania nowych środków antybakteryjnych polega na opracowaniu związków interferujących z czynnikami wirulencji, przez co komórki bakteryjne miałyby utracić swój potencjał do kolonizacji organizmu człowieka. W przypadku *P. mirabilis* metaloproteaza ZapA jest enzymem, względem którego mogą być skierowane potencjalne związki przeciwwirulentne. Enzym ten wykazuje szerokie spektrum aktywności proteolitycznej, w tym jest zdolny do lizy przeciwciał produkowanych przez organizm nosiciela. Efekt taki powoduje, że organizm nosiciela nie jest w stanie w efektywny sposób niszczyć komórki *P. mirabilis* w pierwszym etapie kolonizacji (Różalski i in. 2007). Jego zniesienie, np. poprzez zastosowanie specyficznego inhibitora proteazy ZapA, wpłynie będzie pozytywnie na efektywność eliminowania komórek *P. mirabilis* przez układ odpornościowy organizmu nosiciela.

2. Przegląd literatury

2.1 Podział proteaz bakteryjnych

Proteazy katalizują rozszczepianie wiązań peptydowych w białkach i peptydach. W zależności od reakcji, którą katalizują, wydzielić można proteazy będące: 1) endopeptydazami (zwane również proteinazami), które preferencyjnie hydrolizują wiązania peptydowe w wewnętrznych regionach łańcuchów peptydowych i 2) egzopeptydazami, których aktywność jest skierowana na koniec aminowy lub karboksylowy białek. Na podstawie wykazywanych mechanizmów katalitycznych, proteazy są podzielone na siedem grup: 1) proteazy kwasu asparaginowego, 2) proteazy cysteinowe, 3) proteazy kwasu glutaminowego, 4) metaloproteazy, 5) proteazy serynowe, 6) proteazy treoninowe i siódma grupa, która stanowi pewną liczbę peptydaz, które nie mogą być jeszcze przypisane do żadnego konkretnego typu katalitycznego. Pośród organizmów prokariotycznych, powszechne są proteazy 6 typów katalitycznych (z wyjątkiem proteaz kwasu glutaminowego). Pod względem specyficzności enzymatycznej, cięcie wiązań peptydowych przez proteazy może być 1) specyficzne, np. ograniczona proteoliza, która zależy od sekwencji aminokwasów otaczających zhydrolizowane miejsce, lub 2) niespecyficzne, co powoduje całkowitą degradację białek do oligopeptydów i / lub aminokwasów. Dzięki cięciu wiązań peptydowych proteazy mogą zmieniać właściwości biologiczne łańcuchów polipeptydowych. Specyficzna proteoliza często powoduje aktywację lub inaktywację białek i peptydów, natomiast niespecyficzna proteoliza ich degradację. Enzymy te są potencjalnie niebezpieczne dla komórek i mogą zmienić ich środowisko działania (Władyka i Pustelny 2008).

2.2 Mechanizmy działania proteaz bakteryjnych

Enzymy degradujące białko są mechanistycznie, strukturalnie i funkcjonalnie bardzo zróżnicowane. Działają według jednego z kilku ogólnych chemicznych mechanizmów. Proteinazy serynowe aktywują pierwszorzędowy hydroksyl centrum aktywnego w łańcuchu zawierającym serynę, co zwykle odbywa się za pośrednictwem następujących przekazników: Ser-His-Asp lub Ser-Lys. Zwiększa to nukleofilowość centrum aktywnego i umożliwia atak na wiązania amidowe peptydu. Proteinazy cysteinowe treoninowe i wykazują analogiczny mechanizm działania. Z drugiej strony proteazy kwasu glutaminowego i metaloproteazy nie działają poprzez mechanizm kowalencyjny. Aktywują one cząsteczkę wody przez katalizę elektrofilową (Culp i Wright 2016).

Różnorodności funkcjonalnej proteaz towarzyszy szeroki zakres różnorodności strukturalnej, którą można ogólnie pogrupować na podstawie tego, czy znajdują się zewnątrzkomórkowo lub wewnątrzkomórkowo. Są to zewnątrzkomórkowe proteazy, ogólnie monomeryczne, z wysoką specyficznością substratową dla pojedynczego białka lub rodziny białek. Często są syntetyzowane jako nieaktywne zymogeny, chroniące komórkę przed nieuregulowaną aktywnością. Wewnątrzkomórkowe proteazy natomiast są kompleksami multimerycznymi z małą specyficznością substratową, ale której aktywność i specyficzność substratowa jest ściśle uregulowana. Aby osiągnąć ten poziom regulacji, miejsca katalityczne są ukryte w beczkowatych strukturach. Uzyskanie dostępu do tak ukrytego centrum aktywnego wymaga obecności specyficznego substratu i zmian strukturalnych w enzymie (Culp i Wright 2016).

2.3 Znaczenie proteaz bakteryjnych w wirulencji

Wymienić można cztery rodziny wewnątrzkomórkowych kompleksów proteolitycznych powszechnie obecnych wśród bakterii: Lon, HslUV (ClpQY), ClpXP i FtsH oraz dodatkowo HtrA (DegP) będącą periplazmatycznym kompleksem proteolitycznym. Dodatkowo wiele bakterii produkuje różnego rodzaju proteazy zewnątrzkomórkowe. Patogeny bakteryjne w różnym stopniu wykorzystują proteolizę podczas procesu infekcji. Przykładowo, ważnymi wewnątrzkomórkowymi czynnikami aktywności proteolitycznej są konserwatywne proteazy Clp i Lon, które bezpośrednio przyczyniają się do zwiększenia zjadliwości bakterii patogennych poprzez degradację regulatorów wirulencji produkowanych przez komórki gospodarza. Błonowe proteazy, HtrA, pełnią podobne funkcje. Tymczasem proteazy zewnątrzkomórkowe, występujące w bliskim sąsiedztwie z komponentami gospodarza, zdolne są utorować drogę do rozprzestrzeniania się infekcji poprzez degradację komórek i tkanek, lub poprzez zakłócanie sygnalizacji komórkowej gospodarza, co

prowadzi do zaburzenia naturalnych procesów międzykomórkowych. Wspólna dla proteaz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych jest ścisła kontrola ich aktywności proteolitycznej. Ogólnie rzecz biorąc, rozpoznawanie substratu przez proteazy wewnątrzkomórkowe jest wysoce selektywne. Te cechę częściowo przypisuje się białku opiekuńczemu. W przeciwieństwie do tego, rozpoznawanie substratu przez zewnątrzkomórkowe proteazy jest mniej selektywne. Z tego względu są one syntetyzowane jako zymogeny, aby zapobiec przedwczesnej aktywności proteolitycznej, która byłaby szkodliwa dla komórki bakteryjnej, która ją produkuje. Zewnątrzkomórkowe proteazy są aktywowane w złożonych kaskadach obejmujących przetwarzanie i dojrzewanie proteolityczne (Dougan 2013; Culp i Wright 2016).

Najwyraźniejszym przykładem pozwalającym przypisać proteazom bakteryjnym charakter czynnika wirulencji jest proteaza produkowana przez patogenną bakterie *Yersinia pestis*, będącą czynnikiem etiologicznym dżumy. Szczep ten posiada plazmid, który zawiera w sobie gen kodujący pestycynę (*pst*), gen kodujący białko ochronne względem pestycyny oraz białko wykazujące aktywność proteolityczną (Pla). Białko to zwiększa patogenność *Y. pestis*. Wykazano, że funkcjonuje ono jako aktywator plazminogenu i charakteryzuje się nietypową kinetyką aktywności enzymatycznej. Dotychczas nie przedstawiono badań dotyczących specyficzności działania proteazy Pla, jednak jak dowiedziono, jego obecność warunkuje zdolność *Y. pestis* do kolonizacji organizmu poza obszar, w którym miejsce miała infekcja pierwotna. Efekt ten został potwierdzony w sposób bezpośredni poprzez zastosowanie mutantu szczepu *Y. pestis*, który pozbawiony był genu *pla* (Lantz 1997).

Kolejne badania pokazują pośrednie znaczenie zewnątrzkomórkowych proteaz w patogenezie wielu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Dwie zależne od cynku metaloproteazy produkowane przez bakterie z rodzaju *Clostridium*, botulina B oraz toksyna tężcowa, degradują synaptobrewinę – błonową proteinę małych pęcherzyków synaptycznych. Natomiast w przypadku *Staphylococcus aureus* znaczenie proteaz w wirulencji tej bakterii wykazano pośrednio poprzez zastosowanie inhibitorów aktywności proteolitycznej (Lantz 1997).

2.4 Inhibitory proteaz bakteryjnych

Występujące u organizmów wyższych proteazy, o zróżnicowanej strukturze i roli klinicznej, stanowią cel dla 5-10% związków terapeutycznych. Jednak w przypadku bakterii, żaden związek wykazujący działanie hamujące aktywność enzymatyczną jakiegokolwiek z proteaz nie został dotychczas dopuszczony jako powszechnie stosowana metoda terapeutyczna. Znaczenie proteaz w patogenezie bakterii oferuje niewykorzystaną dotychczas perspektywę celów dla nowych leków. W literaturze znaleźć można wiele przykładów związków o potencjale inhibitorów proteaz. Przykładowo, najbardziej oczywistym podejściem do ukierunkowania leku względem proteaz ClpP jest opracowanie inhibitora miejsca aktywnego ClpP. Dowód na to wykazano w badaniach nad *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Listeria monocytogenes*, w których szczep zawierający nokaut *clpP* nie był w stanie spowodować infekcji. Pionierskie wysiłki Böttchera i Sieber w celu ukierunkowania strategii terapeutycznych na ClpP doprowadziły do opracowania szeregu inhibitorów β -laktonowych. Zainspirowani obserwowaną reaktywnością β -laktonów występujących w przyrodzie, zsyntetyzowali oni bibliotekę związków które zostały zbadane pod kątem możliwości inhibicji kilku proteaz bakteryjnych. Również Sieber i jego współpracownicy odkryli nową klasę silnych inhibitorów ClpP, którymi były estry fenyłowe. Na podstawie screeningu 137 000 syntetycznych związków odkryto szereg estrów fenyłowych, które wykazywały analogiczny mechanizm działania jak opisywane powyżej β -laktony (Culp and Wright 2016).

W innych badaniach, przeprowadzonych przez Bijina i wsp. (2011), analizowano rośliny należące do różnych rodzin *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Rutaceae*, *Graminae* i *Moringaceae* pod kątem produkcji inhibitorów proteaz. W *Moringa oleifera*, należącej do rodziny *Moringaceae*, odnotowano wysoki poziom aktywności hamującej aktywność enzymatyczną proteaz. *Moringa oleifera* rośnie na większości obszarów tropikalnych i ma kilka przemysłowych i farmakologicznych zastosowań. W badaniach zaprezentowano, że ekstrakt wyizolowany z dojrzałych liści i nasion wykazywał najwyższy poziom inhibicji aktywności proteolitycznej względem tripsyny. Dla tego inhibitora

proteazy odnotowano również wysoką zdolność do hamowania aktywności wobec proteaz serynowych, trombiny, elastazy, chymotrypsyny i cysteiny (Bijina *i in.* 2011).

W kolejnych badaniach wykazano, że inhibitor proteazy bakteryjnej z *Brucella* spp., zwany U-Omp19, może stanowić doskonały składnik preparatu szczepionki przeciwko chorobom zakaźnym. Inhibitor U-Omp19 podawany doustnie z antygenem, poprzez hamowanie proteaz żołądkowych oraz jelitowych, wydłuża okres półtrwania jednocześnie podawanego antygeny w immunologicznych miejscach indukcyjnych (Esteban *i in.* 2015).

Wiele opracowanych związków jest w stanie zahamować aktywność wspomnianej wcześniej toksyny botulinowej, jednak żaden z tych inhibitorów nie przeszedł do badań klinicznych. W pracy przedstawionej przez Bremera *i in.* (Bremer *i in.* 2015) wykazano, że pochodne benzochinonu (BQ) charakteryzują się aktywnością hamującą proteazy. W badaniach kinetycznych związki BQ działały jako nieodwracalne inhibitory, które modyfikują kowalencyjnie cysteinę w pozycji 165 w sekwencji toksyny. W celu zwiększenia aktywności BQ zastosowano badania obliczeniowe celem wskazania takich modyfikacji BQ, które mogłyby stabilizować wiązanie się inhibitora poprzez dodatkowe wiązanie się z miejscami sąsiadującymi z cysteiną. Na podstawie symulacji zaproponowano 2-amino-N-aryloacetamid jako modyfikator zwiększający co najmniej 20-krotnie aktywność inhibitora. W przeciwieństwie do samego BQ, jego modyfikowana wersja wykazała słabe nieodwracalne hamowanie i na tej podstawie wysnuto wniosek, że związek modyfikowany działał jako inhibitor niekowalencyjny. Najważniejsze elementy tego badania obejmują odkrycie modyfikowanych związków BQ jako nieodwracalnych inhibitorów toksyny oraz wskazały kierunek racjonalnego projektowania inhibitorów proteaz (Bremer *i in.* 2015).

2.5 Charakterystyka proteazy ZapA *Proteus mirabilis*

Zainteresowanie aktywnością proteolityczną szczepów *P. mirabilis* pojawiło się już w latach 90. ubiegłego wieku. Pierwsze badania prowadzone przez Seniora skupiały się jednak jedynie na izolacji szczepów *P. mirabilis* z próbek pochodzenia klinicznego i screeningu w kierunku aktywności enzymatycznej pozwalającej na degradację przeciwciał IgA. Wstępne obserwacje pozwalały wysnuć wnioski o roli aktywności proteolitycznej w uropatogenezie *P. mirabilis*. Degradacja przez szczepy bakteryjne ważnych elementów systemu immunologicznego gospodarza pozwalała szczepom proteolitycznym na efektywne „ukrywanie się” przed systemem odpornościowym i w konsekwencji umożliwiało kolonizację dróg moczowych. Z uwagi na fakt, że proteazy *P. mirabilis* wskazywały optimum aktywności w pH 8, postulowano o synergistycznym efekcie pomiędzy nimi a ureazą. Ureaza jest enzymem hydrolizującym mocznik, co wywołuje podwyższenie pH środowiska (Loomes *i in.* 1990; Senior *i in.* 1991).

Kolejne eksperymenty pozwoliły na lepsze scharakteryzowanie enzymów proteolitycznych wydzielanych przez różne szczepy należące do rodzaju *Proteus* spp. Wykazano m.in., że enzymy te są podatne na obecność EDTA, silnego związku chelatującego jony metali, stąd przypisano enzymy produkowane przez *Proteus* spp. do grupy metaloproteaz. Dodatkową, istotną obserwacją był fakt, że w wielu przypadkach aktywność proteolityczna była cechą charakteryzującą szczepy hodowane na podłożach umożliwiających wzrost rozpełzły, zaś inhibicja wzrostu rozpełzłego wiązała się z inhibicją produkcji proteaz. Obserwacje te po raz kolejny sugerowały istotną rolę proteaz w kolonizacji dróg moczowych przez szczepy wykazujące zdolność do wzrostu rozpełzłego. Należy tutaj wyjaśnić, że wzrost rozpełzły *P. mirabilis* polega na cyklicznych przejściach komórek *P. mirabilis* z klasycznej formy pływającej w formę wysoce wyspecjalizowaną i zdolną do aktywnej oraz efektywnej migracji po powierzchniach stałych. Zdolność ta pozwala na zajmowanie kolejnych obszarów środowiska, a w układzie moczowym na migrację w jego głąb. Dodatkowo, w omawianych badaniach zaobserwowano, że zewnątrzkomórkowe proteazy wydzielane przez *Proteus* spp. występować mogą w postaci dwóch izoform, o masie cząsteczkowej w zakresie 46 do 53 kDa. Co więcej, badania kinetyki enzymów proteolitycznych zasugerowały, że komórki bakteryjne produkują również dodatkowe proteazy związane ze ścianą komórkową (Senior 1999).

Dokładniejszych danych na temat proteaz produkowanych przez *P. mirabilis* dostarczyły wyniki badań prowadzonych przez Wassifa *i in.* (1995). Zespół ten przeprowadził szeroką analizę funkcjonalną, biochemiczną i strukturalną proteazy, która została pozyska z zastosowaniem metody

inżynierii komórkowej (klonowanie DNA oraz produkcja białka rekombinowanego). Z wykorzystaniem otrzymanego enzymu wykazano, że jego aktywność stymulowana była przez dwuwartościowe kationy ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$) i hamowana przez chelator tych kationów. Jak zaprezentowano, enzym wykazywał specyficzność substratową zarówno dla immunoglobuliny A1 (IgA1) i IgA2, jak również IgG. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasów budujących badane białko przedstawiono także sekwencję genu, który go kodował. Gen ten określono jako *zapA*. Komputerowe badania homologii ujawniły, że metaloproteaza *P. mirabilis* należy do rodziny proteaz serynowych i może być częścią operonu zawierającego geny kodujące zależny od ATP transporter ABC. Analiza porównawcza sekwencji enzymu pokazała jego filogenetyczne podobieństwo do proteaz syntetyzowanych przez takie gatunki bakteryjne jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* oraz *Serratia marcescens* (Wassif *i in.* 1995).

Badania prowadzone przez Walkera i wsp. (1999) stanowiły rozwinięcie wcześniej wspomnianych badań, które pozwoliły na obserwację, że aktywność proteolityczna jest cechą charakteryzującą szczepy zdolne do wzrostu rozpełzłego. Z wykorzystaniem konstruktów opracowanego z zastosowaniem metod inżynierii komórkowej, który pozwalał na śledzenie ekspresji genu *zapA* w komórkach *P. mirabilis*, wykazali oni, że białko *zapA* jest w pełni wyrażone tylko w komórkach wykazujących zdolność do wzrostu rozpełzłego. Ponadto stwierdzono, że ekspresja *zapA* na pożywce agarowej jest skoordynowana zgodnie z cyklami różnicowania się komórek, ich migracją i konsolidacją (okres, w którym komórki przybierają formę niezdolnych do wzrostu rozpełzłego). Aktywność ZapA nie jest wymagana do różnicowania komórek, ponieważ szczepy zawierające delecję genu *zapA* wytwarzają kolonie takie jak szczepy typu dzikiego. Szczepy z delecją genu *zapA* nie degradują IgA i wykazują zmniejszoną przeżywalność, w porównaniu ze szczepem dzikim, podczas infekcji w mysim modelu zakażeń dróg moczowych (Walker *i in.* 1999).

Jedne z pierwszych badań nad specyfiką substratową działania proteolitycznego ZapA prowadzono z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych peptydów. Zasugerowały one, że rola ZapA w patogeniczności *P. mirabilis* nie wynika jedynie z hydrolizy IgA, która niszczyłaby ważny element obrony gospodarza. Pokazano natomiast, że enzym może skutecznie degradować inne bioaktywne cząsteczki, takie jak defensyny lub strukturalne składniki komórek gospodarza (Lebrun *i in.* 2001).

Dalsze badania nad specyfiką substratową proteazy ZapA podjęte przez Belasa i wsp. (2004), ujawniły, że wiele innych białek znajdujących się w drogach moczowych stanowić może substrat proteolizy ZapA. Do takich białek zaliczyć można elementy dopełniacza (C1q i C3), macierzy komórkowej (kolagen, fibronektyna i laminina) oraz białka cytoszkieletowe (aktyna i tubulina). Dodatkowo wykazano, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ludzka -defensyna 1 (hBD1) i LL-37) są łatwo degradowane przez enzym. W wyniku proteolizy białka hBD1 powstawało ok. sześć peptydów, podczas gdy w wyniku proteolizy LL-37 powstawało co najmniej dziewięć produktów. Dokładne analizy pokazały, że ZapA nie preferuje żadnego wyraźnego wiązania peptydowego. Wyniki opisanych powyżej badań po raz pierwszy pokazały szerokie spektrum substratowe jakim dysponuje proteaza ZapA, dodatkowo wzmacniając hipotezę o roli tego białka w patogeniezie *P. mirabilis* (Belas *i in.* 2004).

2.6 Inhibitory proteazy ZapA

Pierwsze próby opracowania skutecznych inhibitorów proteazy ZapA podejmowane były od 2011 roku przez zespół Carsona i wsp. (2012). W swoich badaniach przedstawili oni wyniki kompleksowego profilowania inhibitorów metaloproteazy ZapA z użyciem biblioteki 160 związków opartych na dipeptydach *N*-alfa merkaptamidowych. Z analizowanej biblioteki wyselekcjonowano sześć związków, które wykazywały najsilniejszy efekt względem enzymu. Wyniki badań wykazały, że analizowane inhibitory mogą być zdolne do ochrony białek gospodarza przed ZapA podczas kolonizacji i infekcji (Carson *i in.* 2011).

W kolejnych badaniach, będących bezpośrednią kontynuacją powyżej opisanych analiz, przedstawiono natomiast proces projektowania, syntezy i charakterystykę kilku inhibitorów, które oparte były na dwóch inhibitorach macierzystych z oryginalnej biblioteki. Powstałe pochodne zawierały odpowiednio podstawioną fenyloalaninę co pozwalało na wykorzystanie reakcji

podstawienia pierścienia aromatycznego celem osiągnięcia wydajnej aktywności hamującej działanie enzymu. Zastosowano także cykloheksylo-L-alaninę by umożliwić odłączenie pierścienia aromatycznego od struktury inhibitora. Wyniki eksperymentów pozwoliły na lepszą charakterystykę centrum aktywnego ZapA i stanowiły istotny krok w kierunku możliwości opracowania inhibitorów proteazy ZapA o szerokim spektrum działania (Comparison *i in.* 2012).

3. Podsumowanie

Bakteryjne enzymy proteolityczne w wielu przypadkach stanowią ważny czynnik wirulencji. Efekt ten wynika w dużej mierze z degradacji białek systemu immunologicznego, jednak szeroki zakres substratów, które są degradowane przez te enzymy powoduje, że również inne białka mogą być celem ich aktywności. Aktywność proteolityczna ułatwia bakteriom patogennym kolonizację organizmu gospodarza i szybkie rozprzestrzenianie się infekcji. W przypadku szczepów *P. mirabilis* wykazano istotną rolę proteazy ZapA w patogenezie zakażeń układu moczowego. Rola ta nie wynika jedynie z degradacji białek produkowanych przez gospodarza (zarówno białek układu odpornościowego jak i białek strukturalnych). Rola proteazy ZapA w patogenezie *P. mirabilis* w wyraźny sposób wynika z efektu sprzężenia syntezy proteazy ZapA z innymi czynnikami wirulencji. Poprzez ścisłą koregulację ekspresji takich czynników wirulencji jak ureaza, wzrost rozpełzły oraz aktywność proteolityczna, bakteria ta wykształciła bardzo ciekawy „globalny” mechanizm wirulencji. Przegląd literatury pokazuje, że dotychczasowe badania pozwoliły stosunkowo dobrze poznać i scharakteryzować strukturę oraz mechanizm działania enzymu ZapA, choć nie jest wykluczone, że wiele aspektów funkcjonowania białka nie zostało dotychczas odkryte. Dodatkowo pierwsze próby syntezy związków hamujących aktywność enzymatyczną ZapA wskazały potencjalne możliwości w zakresie projektowania związków terapeutycznych skierowanych względem metaloproteazy syntetyzowanej przez *P. mirabilis*. W świetle narastającej lekooporności tego gatunku niezbędne jest projektowanie nowych terapeutyków, a ukierunkowanie ich działania względem tak istotnego czynnika wirulencji jakim jest proteaza ZapA wydaje się być obiecującą strategią.

4. Literatura

- Belas R, Manos J, Suvanasuthi R (2004) *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infection And Immunity* 72:5159–5167
- Bijina B, Chellappan S, Krishna JG i in. (2011) Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. *Saudi J Biol Sci* 18:273–281
- Bremer, Paul T, Hixon, Mark S, Janda K (2015) Benzoquinones as inhibitors of botulinum neurotoxin serotype A. *Bioorg Med Chem* 22:3971–3981
- Carson L, Cathcart GR, Scott CJ i in. (2011) Biochimie comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA. *Biochimie* 93:1824–1827
- Comparison BF, Carson L, Cathcart GR i in. (2012) Comparison of the binding specificity of two bacterial metalloproteases, LasB of *Pseudomonas aeruginosa* and ZapA of *Proteus mirabilis*, using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitor analogues DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.157
- Culp E, Wright GD (2016) Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *Nat Publ Gr* 70:366–377
- Dougan DA (2013) Bacterial proteases and virulence. *Regulated Proteolysis in Microorganisms*, 161–94
- Esteban A, Mirta L, Verónica M i in. A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *J Control Release* 220:18–28
- Lantz MS (1997) Are bacterial proteases important virulence factors? *J Periodontal Res* 32:126–132
- Lebrun I, Juliano L, Palma MS i in. (2001) ZapA, a possible virulence factor from *Proteus mirabilis* exhibits broad protease substrate specificity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34:1397–1403

- Loomes LM, Senior BW, Kerr MA (1990) A Proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2 , and IgG isotypes. *Infection And Immunity* 58:1979–1985
- Różalski A, Kwil I, Torzewska A i in.(2007) Bakterie z rodzaju *Proteus* – cechy i czynniki chorobotwórczości. *Postępy Hig Med Dosw* 61:204–219
- Senior BW (1999) Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. *Bact Pathog ICITY Investig* 48:623–628
- Senior BW, Loomes LM, Kerr MA (1991) The production and activity in vivo of *Proteus mirabilis* IgA protease in infections of the urinary tract. *J Med Microbiol* 35:203–207
- Walker KE, Moghaddame-Jafari S, Lockatell CV i in.(1999) ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis* , is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol.* 32:825–836
- Wassif C, Cheek D, Belas R (1995) Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *Journal of Bacteriology* 177:5790–5798
- Władyka B, Pustelny K (2008) Regulation of bacterial protease activity. *Cell Mol Biol Lett* 13:212–229

6. Przystosowanie bakterii kwasu mlekowego do środowisk roślinnych

Adaptation of lactic acid bacteria to the plant environment

Gustaw Klaudia, Iwona Niedźwiedź

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Adam Waśko

Gustaw Klaudia: klaudiagustaw1@gmail.com

Słowa Kluczowe: szlaki metaboliczne, LAB, fermentacja, związki fenolowe

Streszczenie

Bakterie kwasu mlekowego odgrywają ważną rolę w historii zdrowia ludzkiego, a także w przetwarzaniu żywności i pasz. Nawet jeśli bakterie kwasu mlekowego są tylko niewielką częścią autochtonicznej mikroflory roślinnej, stanowią one najważniejsze mikroorganizmy zdolne do wykonywania istotnych zmian prozdrowotnych w właściwościach żywności roślinnej. Powoduje ona zmiany zarówno w profilu, jak i rodzajach związków bioaktywnych. Ze względu na różnorodność składników chemicznych roślin i możliwe drogi biokonwersji, fermentacja roślin jest jak przenikające się między sobą szlaki metaboliczne podejmowane przez te bakterie. Różnorodne preferencje metaboliczne obejmują kilka drugorzędowych metabolitów roślinnych (np. związki fenolowe). Sukces tych profili metabolicznych jest zawdzięczany adaptacyjnym umiejętnościom przetrwania bakterii kwasu mlekowego. Zespół różnych podejść współdziałających ze sobą odkrywa specyficzne cechy bakterii kwasu mlekowego przystosowujące się do roślin, które pozwalają na optymalne projektowanie strategii fermentacji dla docelowych surowych matryc.

1. Wstęp

Fermentacje mogą prowadzić do znaczących zmian w cechach prozdrowotnych dla żywności roślinnej. Najbardziej rozpowszechniona jest fermentacja kwasu mlekowego. Obecnie nie jest to starożytna metoda konserwacji żywności, ale dobrze zaprojektowana biotechnologia produkcji żywności funkcjonalnej. Zależność „fermentowana żywność roślinna a zdrowie człowieka” jest łatwa do wyobrażenia ze względu na nieodłączny skład chemiczny surowych matryc roślinnych oraz metaboliczną i funkcjonalną wszechstronność bakterii kwasu mlekowego (LAB). Rośliny są doskonałym źródłem składników prozdrowotnych (np. witamin, minerałów, antyoksydantów, związków fenolowych i błonnika pokarmowego). Zawierają one również różne poziomy czynniki antyżywnościowe (np. szczawian, proteaza, inhibitory α -amylazy, lektyny, garbniki, kwas fitynowy). Takie nieodłączne rezerwuary roślin umożliwiają wytworzenie u bakterii kwasu mlekowego różnorodnych szlaków metabolicznych, które składają się na złożony labirynt. Każdy szlak metaboliczny roślin obejmuje specyficzne enzymy bakteryjne dla wybranych substratów. Zdolność bakterii do podążania ścieżkami metabolicznymi jest specyficzna dla danego gatunku lub szczepu i zależy od ich profilu enzymatycznego.

Korzystając z własnych szlaków metabolizmu bakterie kwasu mlekowego, z sukcesem przystosowały się do środowiska roślinnego, w wyniku czego fermentowane pokarmy roślinne wzbogacone są w wysoko przyswajalne związki bioaktywne i / lub ze słabymi ilościami czynników antyodżywczych. Przegląd ten podkreśli, w jaki sposób LAB może skutecznie napędzać fermentację roślin w kierunku produktów funkcjonalnych o właściwościach prozdrowotnych oraz przybliży ścieżki metaboliczne leżące u podstaw roli bakterii w procesie biotechnologicznym. Pomimo mnogości szlaków metabolicznych, które mogą potencjalnie wpływać na prozdrowotne właściwości pokarmów roślinnych, tylko najbardziej innowacyjne i istotne wyniki zostaną pogłębione.

2. Przegląd literatury

2.1 Bakterie kwasu mlekowego charakterystyczne dla środowisk roślinnych

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) i ludzie mają długą i skomplikowaną historię. Dobrze znane są pierwsze odnotowane w starożytności procesy fermentacji żywności, które przyczyniły się do zachowania i poprawy jakości surowych substratów roślinnych, mięsnych i mlecznych. Najprawdopodobniej przejście od myśliwych-zbieraczy do rolniczego stylu życia, około 10.000 lat temu, przyczyniło się do dalszego rozwoju fermentowanej żywności, które są obecnie praktykowane na całym świecie na skalę przemysłową. Wszystkie mikrośrodowiska związane z roślinami zawierają wiele pożytecznych i chorobotwórczych drobnoustrojów, które mają kluczowe znaczenie dla odżywiania roślin, stanu zdrowia i obrony. Pomimo niezmierzonego arsenału drobnoustrojów, każda roślina posiada charakterystyczną mikrobiotę, gdzie LAB reprezentuje tylko niewielką część (2-4 log cfu g⁻¹). Gatunki heterofermentacyjne i homofermentacyjne, należące do rodzajów *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, to gatunki najczęściej identyfikowane jako epifity w obrębie mikrobioty, w zależności od gatunku rośliny (Di Cagno et al. 2013). Pomimo tej różnorodności, najczęściej spotykanymi gatunkami są *Weissella cibaria/confusa*, a zwłaszcza *Lactobacillus plantarum*. Chociaż doniesienia na temat populacji endofitów LAB są stosunkowo rzadkie, postęp w zakresie interakcji między roślinami i mikroorganizmami uwypoklił ich znaczenie jako nowej klasy mikrobów stymulujących wzrost roślin. Dotychczas *Lb. plantarum* było jedyną endofityczną bakterią kwasu mlekowego zidentyfikowaną w całym cyklu życia roślin oregano i pszenicy. Do produkcji fermentowanej żywności pochodzenia roślinnego, posiadającej właściwości prozdrowotne, kultury starterowe muszą być wyposażone w dedykowane portfolio enzymów, które umożliwiają im skuteczne podążanie tymi ścieżkami metabolicznymi. Zazwyczaj należy je wybierać spośród gatunków LAB, które dominują głównie w spontanicznej fermentacji roślin, takich jak *Leuconostoc* spp., *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, i *W. cibaria*. Zdolność do adaptacji do wewnętrznych cech surowych matryc roślinnych oraz do stabilnego przetrwania jako endofity na wszystkich etapach fenologicznych roślin, stanowią dodatkowe kryteria wyboru solidnych kandydatów LAB do tych procesów. Wśród bakterii kwasu mlekowego pojawiała się grupa fruktofilnych bakterii (FLAB) które stanowią nowe potencjalne źródło cech funkcjonalnych. Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego to nowa specjalna grupa LAB, która zamiast glukozy preferuje fruktozę jako główne źródło węgla. Bakterie te zostały wyizolowane głównie z nisz bogatych w fruktozę takich jak owoce, nektar i kwiaty, a także produkty fermentowane z owoców o wysokim stężeniu cukrów np. durian. Grupa FLAB licznie zasiedla przewody pokarmowe owadów spożywających nektar, pszczoł, trzmieli czy tropikalnych mrówek i muszek (Endo et al. 2009). Fermentacja substratów roślinnych zależy od zdolności LAB do szybkiej adaptacji i metabolizowania dostępnych składników odżywczych. Adaptacja do ekosystemów warzywnych i owocowych jest specyficzna dla gatunku i szczepów, a także znacznie zróżnicowana w zależności od niszy rośliny. Wynika to z różnorodności środowisk roślinnych oraz z występowania nieodłącznych parametrów chemicznych i fizycznych, takich jak występowanie czynników hamujących (np. fenoli), braku węglowodanów ulegających fermentacji, indukcji stresu osmotycznego i środowiska kwaśnego, które mogą prowadzić do trudnych warunków dla rozwoju bakterii. Znaczenie reakcji adaptacyjnych, jak również aktywacja specyficznych szlaków metabolicznych, które wpływają na cechy sensoryczne, odżywcze i funkcjonalne sfermentowanych matryc roślinnych, pobudziły szeroko zakrojone badania. Strategie adaptacyjnego wzrostu i przetrwania LAB podczas fermentacji roślin, z naciskiem na *Lb. plantarum*, zostały ostatnio zbadane poprzez panel różnych podejść interakcyjnych, w tym metabolomicznych, i profilowania transkryptomycznego. W szczególności, zbiór transkrypcyjnych zestawów danych został wygenerowany w biologicznie istotnych warunkach odtwarzających nisze roślinne. Określono specyficzne cechy LAB do adaptacji do roślin, co pozwala na optymalne projektowanie strategii fermentacji dla docelowych surowych matryc. Adaptacja LAB jest w głównej mierze wynikiem obniżonej regulacji genów centralnego metabolizmu, indukcji alternatywnego transportu i metabolizmu substratów, stymulacji specyficznych odpowiedzi funkcjonalnie związanych z nieodłącznymi cechami materiałów roślinnych oraz, w mniejszym stopniu, ekspresji genów ogólnej odpowiedzi na stres. Specyficzne dla gatunku lub szczepu cechy metaboliczne LAB, w synergii

z aktywnością enzymów roślinnych, mogą poprawić biodostępność i bioaktywność fitochemikaliów, jak również mogą prowadzić do znacznego wzrostu funkcjonalnych metabolitów drobnoustrojów o korzystnym wpływie dla zdrowia ludzkiego (Rein et al. 2013).

2.2 Wpływ mikroorganizmów na matrycę roślinną

Wzrost gęstości składników odżywczych w wyniku fermentacji mlekowej wynika głównie ze spadku zawartości cukru. Katabolizm disacharydów takich jak sacharoza czy laktoza był szeroko badany dla wielu gatunków LAB. Sacharoza jest jednym z głównych oligosacharydów w owocach. Co ciekawe, w przypadku krótkotrwałych procesów fermentacji, tj. 17-24 h, w warunkach kwaśnych stężenie cukru zasadniczo spada w trakcie długotrwałego przechowywania w warunkach chłodniczych. Można by przypuszczać że zużycie cukru w trakcie przechowywania jest związane z zapotrzebowaniem na energię, sacharoza, glukoza czy fruktoza są całkowicie zużywane podczas długotrwałej fermentacji kapusty. Szeroka gama związków chemicznych obejmuje kilka wtórnych metabolitów roślinnych. Ostatnio badano metabolizm ginsenozydów podczas fermentacji ekstraktu z żeń-szenia przy użyciu *Lb. plantarum*. Mieszanina racemiczna produktów powstała w wyniku deglikozytacji lub odwodnienia ginsenozydów Rd, Rb1, i Re w pozycji C-20. Metabolity bakteryjne z ginsenozydów, które są syntetyzowane przez mikroby jelitowe poprzez hydrolizę ugrupowań glikozytowych w C-3 i C-20, są prawdopodobnie głównymi składnikami odpowiedzialnymi za aktywność farmakologiczną żeń-szenia (Bai et al. 2015). Dysbioza jelit prawdopodobnie pogarsza metabolizm jelitowy i wchłanianie ginsenozydów. Tak więc fermentacja kwasu mlekowego żeń-szenia pozwala na kontrolowaną biokonwersję ginsenozydów do bardziej biodostępnych i bioaktywnych metabolitów.

Fermentacja przyczynia się również do zwiększenia zawartości białka, peptydów i aminokwasów w żywności z roślin strączkowych. Prowadzi to do możliwości wykorzystania sfermentowanych produktów roślinnych jako alternatywnego i bardziej zrównoważonego źródła białka w stosunku do białek zwierzęcych. Co więcej uzyskano także wzbogacenie w sprzężony kwas linolowy w kilku substratach roślinnych (np. orzechy oraz oleje rycynowy i słonecznikowy) sfermentowanych przez *Lb. plantarum*, który posiada aktywność izomerazy linolowej (Hosseini et al. 2015). Rodzaj *Lactobacillus* nawadnia również wielonienasycone kwasy tłuszczowe do hydroksylovych kwasów tłuszczowych poprzez hydratazy kwasów tłuszczowych. Konwersja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przez bakterie kwasu mlekowego prawdopodobnie wiąże się z homeostazą błonową, ale prowadzi również do powstawania kwasów pośrednich (hydroksy-tłuszczowych i sprzężonych kwasów tłuszczowych) o uznanej aktywności immunomodulacyjnej i przeciwtleniającej u ludzi. Ostatnie prace koncentrowały się na akumulacji aminokwasów i peptydów o działaniu funkcjonalnym. Kilka sfermentowanych substratów roślinnych, takich jak owoce daktylowe i kładody kaktusowe, wzbogacono w kwas γ -aminomasłowy (GABA), aminokwas nieproteinowy o dobrze znanych funkcjach fizjologicznych u ludzi (Garcia et al. 2013). Identyfikacja bioaktywnych peptydów pochodzących z białek żywności pochodzenia roślinnego wynika z rosnącego zainteresowania środowiska naukowego i opinii publicznej żywnością roślinną. Chociaż głównym celem badań są zazwyczaj zboża i rośliny strączkowe, bioaktywne peptydy uwalniane w procesie fermentacji lub hydrolizy enzymatycznej pochodziły również z innych matryc roślinnych. LAB są mikroorganizmami najbardziej przydatnymi w wzbogacaniu bioaktywnych peptydów, a ich potencjał jest stale badany.

Uważa się, że poliole (np. ksylitol, erytrytol, mannitol) mają szereg działań prozdrowotnych (np. mają obniżoną wartość kaloryczną, mają niski indeks glikemiczny, są niskoinsulinowe, antykardiogenne i prebiotyczne) (Monedero et al. 2010). Fermentacyjny metabolizm LAB, polegający na utrzymaniu ścisłej równowagi redoks, sprawia, że są to wydajne fabryki komórkowe do syntezy polioli, ponieważ ta ostatnia ścieżka pozwala również na utlenianie NADH nagromadzonego podczas katabolizmu cukrów (Monedero et al. 2010). Redukcja prekursorów aldozy do polioli jest ścieżką powszechnie stosowaną przez heterofermentacyjne LAB związane z roślinami.

Metabolizm związków fenolowych przez bakterie kwasu mlekowego jest stale badany. Co ciekawe, wśród LAB, *Lb. plantarum* cieszy się dużym zainteresowaniem, ponieważ posiada enzymy prowadzące do produkcji związków o wysokiej wartości dodanej, takich jak silne przeciwtleniacze

(hydroksyrosol i pyrogallol) lub dodatki do żywności dopuszczone jako środki aromatyzujące (4-winylofenol i 4-winylo-gwajakol) (Rodriguez et al. 2009). Metabolizm związków fenolowych wykazano u bakterii kwasu mlekowego podczas fermentacji kilku matryc roślinnych takich jak brokuły, żółta soczewica, nasiona słonecznika, kaktus, wiśnie i wiele innych (Fritsch et al. 2016). Adaptacja i metabolizm fenoli były badane głównie pod kątem *Lb. plantarum*. Ostatnio uwagę zwrócono na *Weissella* spp. i *Leuconostoc mesenteroides*. W zależności od struktury chemicznej i stężenia fenoli, wzrost bakterii i ich żywotność są różnie kształtowane. Niskie stężenia fenoli wywierają stymulujący wpływ na wzrost LAB. Z drugiej strony, wysokie stężenia negatywnie wpływają na integralność ściany komórkowej i błony komórkowej, rozpraszają gradient pH i opóźniają metabolizm węglowodanów przez bakterie kwasu mlekowego (Filannino et al. 2014). Dlatego też tolerancja na wysokie stężenia fenoli jest niezbędna do uzyskania optymalnego wzrostu drobnoustrojów w podłożach szczególnie bogatych w te związki. Najczęściej występujące gatunki LAB w surowych matrycach roślinnych, takie jak *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Weissella* spp., *Lb. curvatus* *Lb. brevis*, *L. mesenteroides*, również okazały się najbardziej tolerancyjne na wysokie poziomy związków fenolowych (Sánchez-Maldonado et al. 2011) (Reverón et al. 2012). Fizjologiczne znaczenie metabolizmu fenoli przez bakterie kwasu mlekowego zostało wyjaśnione głównie jako skuteczny mechanizm detoksykacji tych związków. Istotnie, metabolity konwersji kwasów fenolowych wykazują mniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z ich prekursorami. Niemniej jednak, hipoteza, że metabolizm związków fenolowych przez LAB może również odgrywać rolę w zachowaniu komórkowej równowagi energetycznej, zyskuje coraz większą akceptację. Najnowsze badania wskazują, że LAB wykorzystuje kwasy hydroksycynamonowe jako zewnętrzne akceptory elektronów, umożliwiając recykling kofaktora i uzyskanie dodatkowej energii metabolicznej w celu przeciwdziałania stresującym warunkom generowanym przez związki fenolowe (Filannino et al. 2016). Zgodnie z hipotezą o roli w zachowaniu równowagi energetycznej, ekspresja i organizacja genów zaangażowanych w metabolizm kwasów galusowych leży u podstaw chemiosmotycznego mechanizmu wytwarzania energii u *Lb. plantarum* (Reveron et al. 2015). Z jednej strony, metabolizm związków fenolowych podczas fermentacji roślin ma znaczenie fizjologiczne dla LAB, ale z drugiej strony, końcowe produkty przemiany materii mogą również przynieść korzyści dla zdrowia ludzkiego. Coraz częściej uznaje się, że wpływ fenoli na zdrowie jest silnie uzależniony od konwersji drobnoustrojów. Konwersja mikrobiologiczna związków fenolowych może zachodzić zarówno *in situ*, po uszkodzeniu tkanki roślinnej lub podczas fermentacji roślin, jak i przez ludzką mikroflorę jelitową po spożyciu (Tomás-Barberán et al. 2016). Podczas fermentacji roślin fenole są przekształcane w biologicznie aktywne metabolity poprzez hydrolazę glikozyłową, dekarboksylazę i reduktazę kwasu fenolowego oraz aktywność esterazy.

Aktywność esterazy kwasu ferulowego była szczególnie poszukiwana u bakterii probiotycznych. Aktywność ta zwiększa zawartość wolnych przyswajalnych kwasów fenolowych, ale także związanych kwasów fenolowych uwalnianych z włókien (Scalbert et al. 2005). Jednak wzrost biodostępności może być równoważony przez aktywność dekarboksylazy kwasu fenolowego, również obecnego w LAB. Kwasy fenolowe stanowią prawie jedną trzecią fenoli żywieniowych. Występują one albo w postaci rozpuszczalnej w cytoplazmie, albo są kowalencyjnie związane ze ścianą komórkową rośliny. Wolne kwasy hydroksybenzoesowy i hydroksycynamonowy mogą być dekarboksylowane do odpowiednich pochodnych fenolu lub winylu (Campanella et al. 2017). LAB wykazują również niedefiniowaną indukowaną aktywność reduktazy kwasu fenolowego, zdolną do uwodornienia podwójnego wiązania kwasów hydroksycynamonowych i ich pochodnych winylowych. W zależności od substratu fermentacyjnego, metabolizm związków fenolowych może przejść od dekarboksylazy do aktywności reduktazy. W rzeczywistości metabolizm związków fenolowych jest uzależniony od składu i wewnętrznych czynników wpływających na owoce i warzywa, a zatem informacje pochodzące z laboratoryjnych środowisk nie mogą być w pełni przeniesione do fermentacji żywności (Rodriguez et al. 2009). Biorąc pod uwagę to ograniczenie, szczegółową charakterystykę konwersji kwasów fenolowych w warunkach zbliżonych do roślinnych przeprowadzono podczas fermentacji soku wiśniowego i przecieru z brokułów. Pochodne kwasu fenolowego wykazują ogólnie większą aktywność biologiczną niż ich prekursorzy. Na przykład wykazano, że katechole alkilowe (np. 4-winylkatechol i 4-etylo-katechol) są efektywnymi

naturalnymi współczynnikami aktywacji szlaku obrony komórkowej Nrf2, głównego regulatora obrony przed utleniaczem w komórkach ssaków (Senger et al. 2016).

Pomimo cennego składu odżywczego macierze roślinne mogą zawierać związki o działaniu przeciwożywym. Wśród nich kwasy fitynowe i szczawinowe, saponiny, lektyny, alkaloidy i inne związki chemiczne mogą zmniejszać strawność owoców i warzyw lub mogą wywierać niekorzystny wpływ na odżywianie, prowadząc również do niektórych stanów chorobowych. Zawartość składników odżywczych i substancji fitochemicznych w owocach i warzywach zależy od odmiany, praktyk rolniczych i etapu dojrzewania. Warto również wspomnieć o toksycznych aminach biogennych, które mogą gromadzić się w wysokich stężeniach w fermentowanej żywności ze względu na aktywność drobnoustrojów. Zastosowanie LAB o obniżonej aktywności aminowej jako kultury startowej w fermentowanych owocach i warzywach może znacznie zmniejszyć nagromadzenie amin biogennych.

3. Podsumowanie

Spożycie materiałów roślinnych, czy to owoców, warzyw, liści, łodyg, może zapobiec chorobom przewlekłym, takim jak zespół metaboliczny. Korzyści te wynikają z obecności włókien i mikroelementów, takich jak witaminy, minerały, ale także substancje fitochemiczne. Fermentacja mlekowa modyfikuje skład fermentowanych materiałów, a dzięki metabolicznemu działaniu drobnoustrojów może poprawić korzystne dla zdrowia właściwości żywności. Poprawa właściwości funkcjonalnych żywności poprzez fermentację mlekową wynika z kilku mechanizmów: eliminacji czynników antyżywnościowych, produkcji metabolitów o pozytywnym działaniu (bioaktywne peptydy, egzopolisacharydy), poprawy biodostępności poprzez hydrolizę polimerów (estry związków fenolowych), zwiększenia zawartości witamin, składników mineralnych i fenolowych, co prowadzi do zwiększenia zdolności antyoksydacyjnej produktu oraz ewentualnego wpływu na florę jelitową i wchłanianie związków bioaktywnych przez jelita (Juvonen et al. 2015). Natura zapewnia ludzkości dużą różnorodność macierzy roślinnych, które są doskonałym źródłem wielu związków prozdrowotnych, a jednocześnie są siedliskiem wielu drobnoustrojów. Projektowanie sfermentowanych pokarmów roślinnych obejmuje z użyciem bakterii kwasu mlekowego, które są niezbędnymi czynnikami napędzającymi biokonwersję naturalnych związków roślinnych poprzez różne szlaki metaboliczne i funkcjonalne. Nie wszystkie szczepy są wyposażone w optymalne profile enzymatyczne czy cechy metaboliczne. Z jednej strony rośliny kryją w sobie ogromny potencjał genetyczny cennych, ale dotychczas nieodkrytych szczepów LAB. Duża część przyszłych wysiłków powinna koncentrować się na poszukiwaniu odmian dostosowanych do różnych wewnętrznych i zewnętrznych warunków środowiskowych roślin, które powinny wykorzystać potencjał fermentacji roślin.

4. Literatura

- Bai Y, Gänzle MG, (2015) Conversion of ginsenosides by *Lactobacillus plantarum* studied by liquid chromatography coupled to quadrupole trap mass spectrometry. *Food Research International*, 76: 709-718.
- Campanella D, Rizzello CG, Fasciano C, et al. (2017). Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. *Food microbiology*, 65: 25-35.
- Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, et al. (2013) Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33: 1-10.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM, (2009) Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Systematic and Applied Microbiology*, 32: 593-600.
- Filannino P, Di Cagno R, Addante R, et al. (2016). Metabolism of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the *Apis mellifera* L. bee gut: Phenolic acids as external electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82: 6899-6911.

- Filannino P, Gobbetti M, De Angelis M, et al. (2014) Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80: 7574-7582.
- Fritsch C, Heinrich V, Vogel RF, et al. (2016) Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. *Food microbiology*, 57: 178-186.
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328-349.
- Hosseini ES, Kermanshahi RK, Hosseinkhani S, et al. (2015) Conjugated linoleic acid production from various substrates by probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Annals of microbiology*, 65: 27-32.
- Juvonen R, Honkapää K, Maina NH, et al. (2015) The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). *International journal of food microbiology*, 207: 109-118.
- Monedero V, Pérez-Martínez G, Yebra MJ, (2010) Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 86: 1003-1015.
- Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, et al. (2013) Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British journal of clinical pharmacology*, 75: 588-602.
- Reverón I, de las Rivas B, Matesanz R, Muñoz R, de Felipe FL, (2015). Molecular adaptation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to gallic acid revealed by genome-scale transcriptomic signature and physiological analysis. *Microbial cell factories*, 14: 160.
- Reverón I, de las Rivas B, Muñoz R, et al. (2012) Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *L. actobacillus plantarum* exposed to p-coumaric acid stress. *Molecular nutrition & food research*, 56: 1848-1859.
- Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, et al. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 132(2-3): 79-90.
- Sánchez-Maldonado AF, Schieber A, Gänzle MG, (2011) Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 111: 1176-1184.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, et al. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45: 287-306.
- Senger DR, Li D, Jaminet SC, et al. (2016). Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet. *PLoS one*, 11: e0148042.
- Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC, (2016) Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 19: 471-476.

7. Aspects of protein phosphorylation

Horbowicz-Drożdżał Patrycja, Grela Przemysław, Michalicha Anna, Filipek Kamil

Department of Molecular Biology, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin

Supervisor: Przemysław Grela, PhD

Horbowicz-Drożdżał Patrycja : patrycja.horbowicz@gmail.com

Keywords: post-translational modifications, phosphate, kinases

Abstract

Process of protein phosphorylation represents one of the most abundant post-translational modifications. Due to its reversibility and multifunctionality, it has evolved as main regulatory mechanism in many signal transduction pathways. Attachment or removal of a phosphate group acts as a molecular switch, regulating the activity and/or subcellular location of the protein by altering its structural properties, stability and dynamics, which allows signal transduction in response to extracellular stimuli. The physicochemical effects of phosphorylation of proteins are very diverse; therefore, it is not possible to determine one general mechanism describing the effect of this modification on protein function. Here, we present the recent knowledge about the implication of phosphorylation on protein structure and function.

1. Introduction

Eukaryotic cells constantly receive stimuli from their environment, to which they must respond in a sufficiently fast, effective and specific manner. The diversity of receptors, ion channels and molecular transporters in mammalian cells and tissues underlines the sophistication of signal transduction systems which allow cells for communication and receiving information from their environment. The precision of metabolism regulation in response to external stimuli is determined by the complexity of the cellular proteome. Proteome represents an extremely complex regulation network that requires constant modifications to meet the metabolic needs of the cell. One of the key factors affecting the complexity of cellular proteome, and at the same time the main mechanism involved in signal transduction pathways, are changes in protein post-translational modification pattern. Post-translational modifications provide a fast and energetically beneficial way to regulate protein activity, their stability and subcellular location (Olsen *et al.* 2006). One of the most abundant and the best-studied post-translational modifications of proteins is phosphorylation. Due to its specificity, multifunctionality and reversibility, as well as availability of ATP as a phosphate group donor, this modification has evolved as the most ubiquitous mechanism for regulating cellular metabolism. Phosphoproteomic analyses have shown that over 2/3 of the 21,000 proteins encoded in the human genome are phosphorylated, and it is likely that over 90% of human proteins undergo this post-translational modification (Ardito *et al.* 2017, Olsen *et al.* 2006). The ubiquity and specificity of phosphorylation are associated with a huge number of genes (>500) encoding kinases, which is almost 2% of genes encoding proteins in humans (Manning *et al.* 2002). The number of genes for phosphatases is almost 10x lower. The problem of protein phosphorylation, despite being the subject of interest of numerous research groups for over 100 years, still holds many secrets, and our understanding of the role of phosphorylation in signaling networks is in its infancy.

The phosphorylation reaction occurs due to the activity of protein kinases and involves the attachment of a phosphate group ($-PO_4$) to the polar side chain of various amino acids. Over 1/3 of protein phosphorylation reactions occur on serine, threonine and tyrosine residues (O-phosphorylation). In eukaryotic organisms, serine residues (86.4%), followed by threonine (11.8%), are phosphorylated most frequently, whereas only 1.8% of tyrosine residues are phosphorylated (Olsen *et al.* 2006). Phosphorylation of tyrosine is relatively rare compared to other post-translational modifications; it is typical of the epidermal growth factor receptors (EGFR) family that contain a

domain called tyrosine kinase domain. From the chemical point of view, it is also possible to phosphorylate six other amino acids, namely histidine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, lysine (N-phosphorylation) and cysteine (S-phosphorylation), however, these modifications are less stable than phosphorylation of serine, threonine and tyrosine residues. Phosphorylation of histidine, lysine and arginine residues may have been important under prebiotic conditions, as it allows generation "high energy" phosphoramidate bonds. Arginine phosphate represents an energy storage compound in plants. Phosphohistidine, in turn, acts as a key player in a large number of prokaryotic two-component signaling systems (Hunter 2012). The specificity of protein phosphorylation depends on many factors, including the phosphorylated residue itself (serine, threonine, tyrosine), the surrounding primary sequence, and the conformation of the phosphorylated motif (Schwartz 2011). While most phosphocomplexes in humans contain only a few phosphorylation sites, in some proteins more than half of the serine, threonine and tyrosine residues are phosphorylated (Nishi *et al.* 2011). Phosphorylation may occur in both well-ordered and disordered regions of proteins. Disordered regions usually participate in protein-protein interactions (e.g., in the formation of protein complexes), and contain much more phosphorylation sites (mainly serine and threonine residues) than well-structured regions. Well-structured regions are usually responsible for catalytic, structural and conformational interactions and are rich in tyrosine residues (Collins *et al.* 2008, Iakoucheva *et al.* 2004).

2. Why phosphorylation?

The specific properties of the phosphate group make this modification a good tool for the regulation of key biological cell functions. Phosphates are salts of phosphoric acid with three distinct ionization states (pK_a 2.15, 7.20 and 12.33). At physiological pH, the phosphate groups are usually dianionic, which is a property not found in any naturally occurring amino acid. Protein phosphorylation is chemically stable under physiological conditions, which allows reliable control of protein activity. The stability of the phosphate monoester bonds results from the fact that the ionized phosphate group presumably repels anionic nucleophiles (Westheimer 1987). What is more, an enzymatic dephosphorylation of phosphoproteins can be quite easy - 17 orders of magnitude faster than non-enzymatic hydrolysis (Lad *et al.* 2003). This enables precise enzymatic regulation of the protein phosphorylation level. Thus, a single phosphate group is an ideal molecular "switch" that affects extremely complex signaling networks through flexible, rapid, transient phosphorylation reactions that drive the formation and reorganization of dynamic protein-protein interaction networks.

Protein phosphorylation is also beneficial from an energetic point of view. The energetics of phosphorylation are well balanced due to the fact that the phosphodiester bond energy is similar to the energy of β - γ anhydride bond in ATP. Indeed, the equilibrium constant for the reaction: protein kinase + ATP $\rightarrow$ P-protein + ADP is from 2 to 50, and numerous protein phosphatases can quickly dephosphorylate phosphoprotein in the presence of ADP, generating ATP. Thus, in the cell the phosphorylation depends on a high ATP/ADP ratio that prevents reverse reaction (Hunter 2012). Another factor that makes phosphorylation evolutionarily preferred is the fact that ATP is very abundant in the cell and present at high concentrations in the cytoplasm. The amount of ATP in cells is usually in the range of 1 and 4 mM, but can be very diverse and reach even up to 12mM. The source of the phosphate group is therefore readily available, and the phosphate transfer reaction is thermodynamically favorable.

In addition to phosphorus, several other elements neighboring in the periodic table are also able to form polyoxyanions, and thus potentially could be an alternative to the phosphate group in the post-translational modification of proteins. The most prominent example is sulfur, which in form of sulphate esters can be present in numerous biological molecules, e.g. in the sulfonated tyrosine of secretory proteins. However, the energy of the sulfonation reaction is not as favorable as in the case of phosphorylation; moreover, sulfonated compounds are chemically unstable. Like sulfur, also silicon creates unstable esters in aqueous solutions. From a chemical point of view, arsenate is the most preferred alternative to phosphate. Arsenic, like phosphorus, belongs to group 15. Arsenate (V) AsO_4^{3-} can form esters and its pK_a values (2.1, 6.9 and 11.5) are similar to phosphate. Like phosphate, arsenate can form mono-, di- and triesters. However, arsenic triesters and diesters are very unstable

in aqueous solutions. Furthermore, arsenate has undesirable chemical properties, such as reaction with cysteine thiol groups. As (V) is rapidly reduced by free thiols, forming As (III) trithiolates and oxidized dithiols, which is the basis for arsenic toxicity; these properties therefore exclude arsenates as a potential alternative to phosphate groups (Hunter 2012).

3. The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins

Attaching or removing a phosphate group to the protein molecule can significantly alter its local physicochemical properties, thereby affecting stability, kinetics and dynamics (Johnson 2009). These changes are mainly influenced by the double negative charge of the phosphate group and the ability of the oxygens of the phosphate group to form extensive networks of hydrogen bonds and salt bridges with neighboring amino acid residues belonging to the same or different polypeptide chains. One of the dominant types of interaction between the phosphorylated residue and other amino acids is the interaction with nitrogen at the termini of the α -helix dipole to neutralize the combined effect of carbonyl dipoles (Johnson, Lewis 2001). Modification in N-terminus may result in stabilization of α -helical structure, whereas C-terminal modification may have the opposite effect. Another common interaction model is formation of hydrogen bonds and salt bridges between phosphate group oxygens and side chains of arginine or lysine. Thanks to its planar structure and the ability to create numerous hydrogen bonds, the arginine guanidine group is well adapted to this type of interaction. Computational analyses have shown that the bidentate interactions between arginine and the phosphate are stronger than the interaction between phosphate and the -NH_3^+ lysine group (Mandell *et al.* 2007). Furthermore, other polar amino acid residues, such as lysine, tyrosine, histidine, serine and threonine, may also be included in the hydrogen bonding network (Johnson 2009). The functional roles of these residues include stabilization of the protein structure, facilitation of correct substrate identification and promoting conformational changes (Humphrey *et al.* 2015).

Recent large-scale comparative analyses have shown that phosphorylation can cause both local and global changes in protein structure. The structural changes resulting from phosphorylation were the highest compared to the effects of other post-translational modifications (Xin, Radivojac 2012). However, the shift of protein atoms in response to phosphorylation may be either small or large. There is no universal response allowing a general mechanism of control by phosphorylation. The phosphate residue may play the role of a covalently attached allosteric effector, which induces initially local conformational changes that can in turn induce greater rearrangements of the tertiary and quaternary structure (Nussinov *et al.* 2012). This is the way of activation of some enzymes, such as glycogen phosphorylase or kinases that require upstream phosphorylation for their activation (Johnson 2009). On the other hand, phosphorylation can also inhibit enzyme activity, as in case of isocitrate dehydrogenase, where phosphorylation causes a steric conformation blockade (Hurley *et al.* 1990), or CDK2, where phosphorylation impairs substrate recognition (Welburn *et al.* 2007). In addition, it has been shown that disordered proteins or flexible protein regions are often phosphorylated, and this modification can result in a reversible conformational shift of protein from unordered to ordered state (Collins *et al.* 2008). Computational analyses performed by Tyanova *et al.* have revealed that the phosphorylation sites localized within regular secondary structures exhibit less variable changes of phosphorylation level during the cell cycle than sites that lie in disordered regions (Tyanova *et al.* 2013). Furthermore, phosphorylation may not induce conformational changes *per se*, but provide a signal for the action of an enzyme that induces such changes (Lu *et al.* 2002). In addition, protein phosphorylation may not only cause a change between different conformational states, but also modulate the transition between different oligomeric states of homo- and heterooligomeric complexes, thus constituting an important mechanism for regulating protein activity (Nishi *et al.* 2014). Nishi *et al.* showed that on the surface of protein molecules in transient homo- and heterooligomers there are much more phosphorylation sites compared to non-interfacial sites. Binding hot spots in heterooligomers have a tendency to be phosphorylated and the phosphorylation may regulate the strength of interactions. It is assumed that phosphorylation at binding hot spots might potentially disrupt the complex formation (Nishi *et al.* 2011).

Calculation of binding energy differences after phosphorylation showed that the majority of phosphorylation modifications does not affect protein-protein binding. However, the study performed by Nishi *et al.* showed that for one third of examined protein complexes, phosphorylation brings about relatively large changes in binding energy of more than 2kcal/mol. (Nishi *et al.* 2011). This, in turn, can lead to conformational changes or prevent from unwanted interactions due to steric constraints. Responses to phosphorylation may vary from the 10⁵ fold increase in catalytic efficiency with CDK2/cyclin A to >10⁶ fold inhibition of IDH. Nevertheless, even if phosphorylation does not affect the stability of the complex, it can cause a change in binding specificity. Binding domains with the specificity towards phosphorylated amino acids, such as 14-3-3 domain for phosphoserine, SH2 and PTB domains for phosphotyrosine or MH2 domain for phosphothreonine, are common functional modules, widely distributed among signal molecules. Typically, these domains contain arginine or lysine residues in binding regions that form hydrogen bonds with phosphates, and may also contain adjacent residues (e.g., hydrophobic residues for phosphotyrosine) that help to recognize phosphorylated sites, or specific residues in binding motifs (Johnson *et al.* 2010).

It should be emphasized that the function of protein phosphorylation is site-dependent, i.e., the protein fulfils the particular role only if phosphorylation takes place on a specific site. Different phosphosites on one protein may show different kinetics, underlining the fact that they might have different functional roles (Olsen *et al.*, 2006). In some eukaryotic systems, protein activation cannot be achieved by phosphorylation on a single site. MS-based proteomic analyses have shown that key regulatory proteins are often phosphorylated on multiple sites. Further phosphoproteomic studies have revealed that, on average, proteins can be phosphorylated on at least five different sites; however, these phosphorylation events do not have to occur on the same molecule (Humphrey *et al.* 2015). The multiple phosphorylation events can occur sequentially or in a random way. In sequential way of phosphorylation, modification of one site depends on the phosphorylation state of another site; therefore, phosphorylation events must occur in a strict order. In contrast, random phosphorylation does not require a specific order of reactions. Phosphorylation on multiple sites can amplify the signal, thereby increasing the affinity of phosphoprotein to its binding partners, as well as extend the regulation pattern, conferring more precise modulation of conformational changes (Nishi *et al.* 2014). Such specific signaling at the amino acid level is a good indicator that the previous stage in cellular signaling network has completed successfully.

Protein phosphorylation can also be involved in post-translational modification crosstalk, e.g. by changing the activity of proteins that regulate other types of modifications. As a result, phosphorylation can promote or inhibit the modification of other sites. Recent studies have revealed the crosstalk of phosphorylation with eleven other PTM types. In example, in some cases protein phosphorylation can promote its ubiquitylation, thereby directing the protein to degradation. Protein GlcNAcylation, in turn, may cause either increase or decrease of phosphorylation, depending on the particular phosphosite (Nishi *et al.* 2014).

4. Summary

Reversible phosphorylation of proteins plays an important role in the regulation of almost all processes in eukaryotic cells. Conformational changes occurring as a result of phosphorylation often cause a change in protein function, which is an important mechanism for regulating the activity of numerous enzymes. The regulatory mechanisms of protein phosphorylation are quite diverse; in some cases, phosphorylation can lead to protein activation, whereas in others it may cause disruption of protein activity. Although protein phosphorylation has been a subject of intense research for many years, our understanding of the molecular basis of signal propagation through phosphorylation and the consequences of this process is still in its infancy. One of the most important challenges in the aspect of protein phosphorylation research is the precise determination of protein substrates for individual kinases and phosphatases. Defects in protein kinase function may result in a variety of diseases, therefore, the development of drugs modulating the activity of specific kinases and phosphatases can be a milestone in the development of new therapeutic strategies.

5. Literature

- Ardito F, Giuliani M, Perrone M et al. (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 40: 271-280.
- Collins MO, Yu L, Campuzano I et al. (2008) Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Molecular & Cellular Proteomics* 7:1331-1348.
- Hunter T (2012) Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 2513-2516.
- Hurley JH, Dean AM, Thorsness PE et al. (1990) Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation involves no long-range conformational change in the free enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 265, 3599-3602.
- Iakouchava LM, Radivojac P, Brown CJ et al. (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acid Research* 32(3): 1037-1049.
- Johnson C, Crowther S, Stafford M et al. (2010). Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochemical Journal* 427, 69-78.
- Johnson LN (2009) The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* 37(4): 627-641.
- Lad C, Williams NH, Wolfenden R (2003) The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases. *PNAS* 100(10): 5607-5610.
- Lu KP, Liou YC, Zhou XZ (2002) Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends in Cell Biology* 12: 164-172.
- Mandell DJ, Chorny I, Groban ES et al. (2007) Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains. *Journal of the American Chemical Society* 129(4): 820-827.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR (2014) Physicochemical mechanisms of protein regulation by Phosphorylation. *Frontiers in Genetics* 5: 270.
- Nishi H, Hashimoto K, Panchenko AR (2011) Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* 19(12): 1807-1815.
- Nussinov R, Tsai CJ, Xin F et al. (2012) Allosteric posttranslational modification codes. *Trends in Biochemical Science* 37: 447-455.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F et al. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648.
- Schwartz PA, Murray BW (2011) Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Biorganic Chemistry* 39: 192-210.
- Tyanova S, Cox J, Olsen J et al. (2013) Phosphorylation variation during the cell cycle scales with structural propensities of proteins. *PLoS Computational Biology* 9: e1002842.
- Welburn JP, Tucker JA, Johnson T et al. (2007) How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *Journal of Biological Chemistry* 282, 3173-3181.
- Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235 (4793): 1173-1178.
- Xin F, Radivojac P (2012) Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics* 28(22): 2905-2913.

8. Need for speed – translational GTPases in action

Horbowicz-Drożdżal Patrycja, Grela Przemysław, Michalicha Anna, Filipek Kamil

Department of Molecular Biology, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin

Supervisor: Przemysław Grela, PhD

Horbowicz-Drożdżal Patrycja : patrycja.horbowicz@gmail.com

Keywords: translational factors, protein synthesis, GTP hydrolysis

Abstract

Process of protein synthesis to proceed in a fast and efficient manner requires a number of protein factors. The most prominent group of factors involved in facilitating and regulation of the protein synthesis are translational GTPases (trGTPases), i.e., translational factors possessing the GTPase activity. The energy released upon the hydrolysis of GTP by trGTPases is necessary for conferring the unidirectional trajectory of translation. Here, we present the recent knowledge about the structure, function and regulation of translational GTPases.

1. Introduction

Translation - the process of protein biosynthesis on the basis of the genetically encoded information - is regarded as one of the most important and most complex biochemical processes occurring in cells. The core of translational machinery in all domains of life is comprised by the ribosome, whose main functions in protein biosynthesis are decoding the genetic information and formation of peptide bonds. These functions are conferred by the ribosomal RNA, therefore, ribosomes are considered to be ribozymes (Nissen *et al.* 2000). The catalytic activity of rRNA during protein biosynthesis suggests that ribosome has its origin in the so-called RNA world. It is assumed that initially the translation process was based exclusively on interactions between different types of RNA, and protein elements appeared in the course of evolution to increase the speed and accuracy of protein synthesis, leading to the present diversity of life forms.

One of the ribosomal structures, the appearance of which determines the greatest breakthrough in the way between the rRNA world and the protein world, is the GTPase-associated center (GAC) on the large ribosomal subunit. It is a site of ribosome interaction with numerous protein factors that allow the regulation of protein biosynthesis and optimization of translation speed and fidelity at all its stages. A particularly important group of translational factors are so-called translational GTPases (trGTPases) - universally conserved protein factors with GTPase activity that control transitions between ribosome structural states in a manner dependent on GTP hydrolysis (Maracchi and Rodnina 2016).

2. Canonical and non-canonical translational GTPases

The process of protein biosynthesis in all domains of life includes four steps: initiation, elongation, termination and recycling. Each of these steps is regulated by a broad range of protein factors, including translational GTPases (Liljas and Ehrenberg 2013). The GTP hydrolysis catalyzed by trGTPases provides energy for maintaining the unidirectional trajectory of translation. The translation initiation step includes binding of ribosomal subunits to the mRNA and formation of the translation-competent ribosome. The assembly of the initiation complex is regulated by trGTPases: IF2/aIF5B/eIF5B and eIF2. Bacterial IF2 and its eukaryotic and archaeal homologues, eIF5B and aIF5B, respectively, are universally conserved GTPases that are involved in the assembly of ribosomal subunits, and their activation is ribosome-dependent. Prokaryotic IF2 is also involved in selection of initiator tRNA; it regulates the attachment of formylmethionyl-tRNA_{fMet} to the P site on the small ribosomal subunit during initiation, thereby controlling the selection of correct reading frame. In Eukaryotes, the initiation step is more complex and involves a greater number of protein

factors. The initiator methionyl-tRNA_{Met} is delivered to the eukaryotic ribosome by eIF2 - GTPase which does not show similarity to the bacterial factor IF2, and, unlike other trGTPases, is activated by the specialized GTPase-activating protein (GAP), eIF5, not by the ribosome.

After forming the initiation complex, the ribosome enters the elongation cycle. Subsequent amino acids are delivered to the ribosomal A site in the form of a ternary complex consisting of trGTPase (EF-Tu in bacteria, eEF1A in Eukaryotes, and EF1A in Archaea), GTP and aminoacyl-tRNA. After forming the peptide bond between the delivered amino acid and the nascent polypeptide chain, another GTPase - EF-G in bacteria, eEF2 in Eukaryotes and aEF2 in Archaea - catalyzes the translocation of the ribosome on the mRNA by precisely one codon. The elongation cycle is repeated until the ribosome reaches the STOP codon, which is recognized by a specific release factor (RF1/RF2 in bacteria, eRF1 in Eukaryotes), releasing the nascent polypeptide chain. In bacteria, releasing factors are separated by GTPase RF3, whereas in Eukaryotes trGTPase eRF3 allows peptidyl-tRNA to be hydrolyzed by eRF1. During the recycling stage, the ribosomal complex is divided into subunits with the aid of EF-G factor, which, cooperating with RRF, causes the dissociation of the post-translational complex, allowing the ribosome to enter a new translational cycle (Maracci and Rodnina 2016).

Translational factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3, as well as their archaeal and eukaryotic counterparts, constitute a set of so-called canonical translational GTPases, forming the "core" of the translational apparatus. In addition, other factors with GTPase activity, called non-canonical trGTPases, are involved in protein biosynthesis. These include, among others, SelB, LepA and TypA (Atkinson 2015). The SelB protein is a specialized bacterial elongation factor that delivers selenocysteine to the ribosomal A site in a ternary complex with aa-tRNA and GTP; its eukaryotic counterpart is the EF_{sec} factor (Ibba and Soll 2004). LepA factor (EF4) promotes reverse translocation *in vitro* - backward movement of peptidyl-tRNA and deacylated tRNA from P and E sites to sites A and P, contrary to the movement catalyzed by EF-G (Qin *et al.* 2006). It is believed that the main function of LepA can be the retention of the ribosome in the intermediate conformational state during translocation which leads to transient inhibition of elongation (Liu *et al.* 2011). It is speculated that such pauses in elongation may support cotranslational folding of the nascent polypeptide chain. The physiological significance of LepA remains unclear due to the lack of a distinguishable phenotype as a result of its deletions, but it seems to be involved in response to extreme environmental conditions such as temperature or ionic stress. Less is known about the factor TypA (also known as BipA), except that it is associated with the ribosome and, like LepA, seems to be involved in the response of bacteria to stress and environmental conditions. TypA is also important for the virulence of bacterial pathogens (Neidig *et al.* 2013).

3. The structure of trGTPases and the mechanism of nucleotide exchange

All translational GTPases, from bacteria to Eukaryotes, share the universally conserved core part, consisting of the GTPase domain (the G domain, common for all proteins with GTPase activity) and the β -barrel domain (domain II). Many translational GTPases have one or more additional domains that are typically unique for a given factor. The G domain forms the functional center of trGTPases, responsible for the binding of GTP and its hydrolysis, enabling the factor to perform certain functions in the translation process (Maracci and Rodnina 2016).

In terms of the sequence and the architecture, the G domain of trGTPases is similar to small G proteins from the Ras-like group; both groups of proteins belong to the GTPase P-loop superfamily. In the classic approach, G proteins act as molecular switches that oscillate between the inactive state, associated with GDP, and a structurally different active state, associated with GTP. The exchange of GDP into GTP is accompanied by conformational changes within two conserved elements, called switch 1 and 2, which undergo specific interaction with the γ -phosphate group of GTP. Returning to the GDP-bound state requires GTP hydrolysis and the release of inorganic phosphate, which allows the switch 1 and switch 2 regions to return to the inactive conformation. Due to these structural changes, only G proteins with GTP bound are able to interact with the effector molecule and fulfill their biological functions (Kuhle and Ficner 2014).

With the exception of the EF-Tu, translational GTPases, such as IF2, SelB, EF-G and their archaeal and eukaryotic homologs, typically bind GTP with similar or greater affinity than GDP.

Nucleotide exchange occurs spontaneously and is associated with a higher concentration of GTP inside the cell. However, EF-Tu has much higher affinity for GDP than for GTP. As GDP dissociation rate from EF-Tu is very slow compared with the rate of elongation, which would delay the recycling of EF-Tu during elongation, the formation of the active EF-Tu-GTP complex requires the presence of additional protein, belonging to the group of so-called GTP-exchanging factors (GEFs) - EF-Ts, which accelerates the dissociation of GDP more than four times. This feature is also conserved for eEF1A, which requires eEF1B as GEF, and eIF2, which uses eIF2B to catalyze the exchange of nucleotides. Despite the different structures of the EF-Ts, eEF1B and eIF2B, the nucleotide exchange mechanism itself is conservative for all trGTPases as well as other GTPases, such as Ras proteins. In all cases, GEF introduces a conformational change in the nucleotide pocket, thereby disrupting the Mg^{2+} ion coordination shell and initiating the release of GDP (Maracci and Rodnina 2016).

Interestingly, the ribosome can spontaneously accelerate the exchange of nucleotides in RF3. Initial reports suggested that the affinity of RF3 for GDP is much higher than for GTP, and that ribosomes in the state in which the peptide releases can increase the rate of nucleotide exchange at least a hundredfold. Subsequent studies confirmed that ribosome complexes with RF1 or RF2 (factors that promote peptide release during termination) can accelerate the exchange of nucleotides in RF3 even when the internal rate of RF3-GDP dissociation is high enough to support *in vivo* termination (Zavialov *et al.* 2001). However, the difference in RF3 affinity for GTP and GDP turned out to be smaller than it was originally thought (Peske *et al.* 2014). Thus, in cells RF3 is primarily in the form associated with GTP. The rapid exchange of nucleotides in RF3 on the ribosome may probably act as a backup mechanism in situations when RF3-GDP binds to the termination complex.

Unlike RF3, binding of GTP to IF2 and EF-G is stabilized by the ribosome. This may reflect structural differences in the interactions of these factors with the ribosome. The G-domain of RF3 binds to the ribosome in a different spatial orientation than EF-Tu and EF-G G-domains, which interferes with the interaction of key histidine (position H92 in RF3) within the sarcin-ricin loop, comprising the part of GTPase-associated center (Schmeing *et al.* 2009; Gao *et al.* 2009). Thus, the ribosome can alter the properties associated with nucleotide binding and GTPase activity of trGTPases, depending on the details of their docking to the SRL.

4. The role of the ribosome in activation of translational GTPases

The energy released during GTP hydrolysis by translational GTPases is not a limiting factor for the protein biosynthesis; the process may occur, although at a much lower level, without the participation of GTP hydrolysis. It is assumed that GTP acts as an allosteric effector that binds to the ribosome and induces conformational changes that allow sequential overlap of subsequent steps in the translation process. GTP hydrolysis results in the return of the ribosome to the initial conformation (Maracci and Rodnina 2016).

The intrinsic GTPase activity of trGTPases is low, and its radical increase is associated with the attachment of the factor to the ribosome. A particularly significant increase in GTPase activity in the presence of the ribosome is observed for the elongation factors EF-Tu and EF-G. As demonstrated for bacterial factors, the rate of GTP hydrolysis by the individual GTPases ranges from 0.1 s^{-1} for RF3 (Peske *et al.* 2014), 36 s^{-1} for IF2, 250 s^{-1} for EF-G to over 500 s^{-1} for EF-Tu (Maracci and Rodnina 2016). The maximum stimulation of EF-Tu activity occurs when the aminoacyl-tRNA in the EF-Tu-GTP-aa-tRNA complex is 100% complementary to the codon at A site, which increases the rate of GTPase activity by about six orders of magnitude. For comparison, when the codon is near- or non-cognate to aa-tRNA, the extent of GTPase activation by ribosome is significantly lower, 2-4 orders of magnitude (Pape *et al.* 1998).

With the exception of the eIF2, which attaches to the small ribosomal subunit and is released during the assembly of the subunits, translational GTPases bind to the ribosome in GTPase-associated center (GAC). This center is a universally conserved active site of the ribosome, involved in recruitment and stimulation of catalytic activity of translational factors with GTPase activity (Diaconu *et al.* 2005). The GTPase-associated center is located on a large ribosomal subunit and includes two main elements: the rRNA region, called the sarcin-ricin loop (SRL) and the protein complex of lateral protuberance, the ribosomal stalk. Both elements of the GAC are critical for activation of trGTPases

and the cooperativity of the SRL and the stalk proteins has been shown to be crucial in stimulation of GTP hydrolysis by trGTPases. The SRL is a highly conserved part of the rRNA, which is the site of binding of trGTPases to the ribosome. SRL contains the longest known universally conserved ribosomal sequence (A₂₆₅₄-A₂₆₆₅ in *E. coli* 23S rRNA and A₄₃₁₈-A₄₃₂₉ in rat 28S rRNA). It may be specifically modified by some toxins, i.e. sarcin or ricin, which inhibits the binding of elongation factors, resulting in inhibition of protein synthesis *in vitro* (Clementi and Polacek 2010). Biochemical studies have shown that the SRL represents a critical element responsible for the interaction and stimulation of trGTPases activity in all domains of life.

Another structure comprising the part of the GAC, involved in the activation of translational GTPases, is the ribosomal stalk complex. Its main function is binding and transient stabilization of translational factors with GTPase activity. The structure of ribosomal stalk, consisting of acidic proteins, is conserved among the three domains of life. In all organisms, the base of the complex is the uL10 protein (previously described as P0), anchoring the protein dimers. The bacterial stalk consists of the uL10, uL11 and two copies of the bL12 dimer. Archaea and Eukaryotes have functional analogues of the bacterial bL12 protein - aP1 in Archaea and P1 and P2 in Eukaryotes (Diaconu *et al.* 2005).

It has been shown that deletion of bacterial bL12 proteins causes a dramatic decrease in GTPase activity of EF-G, IF2 and RF3, while as a result of recombinant L12 protein reconstitution, GTPase activity of all GTPases returned to full activity (Mohr *et al.* 2002). These results were confirmed by structural analyzes that showed the presence of specific interactions between the C-terminal domains of the ribosomal stalk proteins and translational GTPases (Helgstrand *et al.* 2007). Analogous experiments carried out with the ribosomal stalk proteins from Archaea and Eukaryota also confirmed the contribution of these proteins in the binding and stimulation of trGTPases (Nomura *et al.* 2012). Based on these results, it can be concluded that the lateral ribosomal stalk proteins in all domains of life are responsible for the recruitment of trGTPases and stimulation of the hydrolysis of associated GTP, regardless of the structural differences between them.

5. Summary

Protein synthesis is one of the most energy-consuming processes occurring in the cell. Nevertheless, it can take place without the contribution of any additional protein factors, however, less efficiently. Translational GTPases have emerged in the course of evolution in order to increase the rate and efficiency of protein synthesis, as well as ensure the unidirectionality of this process. It is also possible that the development of a complex translation apparatus, involving numerous trGTPases, could facilitate the rapid adaptation of the cellular metabolism to changing environmental conditions and enable organisms to settle new ecological niches. As translational GTPases are key components of translational machinery, elucidating the mechanism of action and regulation of trGTPases is crucial for understanding the mechanism of protein synthesis in all living cells.

6. Literature

- Atkinson GC (2015) The evolutionary and functional diversity of classical and lesser-known cytoplasmic and organellar translational GTPases across the tree of life. *BMC Genomics* 16: 78.
- Clementi N, Polacek N (2010) Ribosome-associated GTPases. The role of RNA for GTPase activation. *RNA Biology* 7:5, 521-527.
- Diaconu M, Kothe U, Schlunzen F *et al.* (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121: 991-1004.
- Gao YG, Selmer M, Dunham CM *et al.* (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the post-translocational state. *Science* 326(5953): 694-699.
- Helgstrand M, Mandava CS, Mulder FA *et al.* (2007) The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *Journal of Molecular Biology* 365: 468-479.
- Ibba M, Soll D (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes & Development* 18(7): 731-8.

- Kuhle B, Ficner R (2014) A monovalent cation acts as structural and catalytic cofactor in translational GTPases. *EMBO Journal* 33(21): 2547–2563.
- Liljas A, Ehrenberg M (2013) Structural aspects of protein synthesis, 2nd ed. World Scientific, Singapore
- Liu H, Chen C, Zhang H et al. (2011) The conserved protein EF4 (LepA) modulates the elongation cycle of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 108(39): 16223–8.
- Maracci C, Rodnina MV (2016) Review: translational GTPases. *Biopolymers* 105: 463– 475.
- Mohr D, Wintermeyer W, Rodnina MV (2002) GTPase activation of elongation factors Tu and G on the ribosome. *Biochemistry* 41: 12520 –12528.
- Neidig A, Yeung AT, Rosay T et al. (2013) TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 13: 77.
- Nissen P, Hansen J, Ban N et al. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930.
- Nomura N, Honda T, Baba K et al. (2012) Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 109: 3748–3753.
- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO Journal* 17: 7490 –7497.
- Peske F, Kuhlenkoetter S, Rodnina MV et al. (2014) Timing of GTP binding and hydrolysis by translation termination factor RF3. *Nucleic Acids Research* 42, 1812–1820.
- Qin Y, Polacek N, Vesper O et al. (2006) The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell* 127(4): 721–33.
- Schmeing TM, Voorhees RM, Kelley AC et al. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science* 326(5953): 688–694.
- Zavialov AV, Buckingham RH, Ehrenberg MA (2001) Posttermination Ribosomal Complex Is the Guanine Nucleotide Exchange Factor for Peptide Release Factor RF3. *Cell* 107, 115–124.
- Zhou J, Lancaster L, Trakhanov S et al. (2012) Crystal structure of release factor RF3 trapped in the GTP state on a rotated conformation of the ribosome. *RNA* 18: 230–240.

9. Diverse receptors in insect phagocytosis

Patrycja Kaczmarek, Jakub Kordaczuk, Michał Sułek

Maria Curie-Skłodowska University, Department of Immunobiology, Lublin,
Poland

Scientific supervisor: dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS

Kaczmarek Patrycja: patrycjakaczmarek1b@gmail.com

Keywords: *Drosophila*, fruit fly, immunity

Abstract

Organisms have basic physiological reactions against invading pathogens. The number of immunity mechanisms that invertebrates have, is limited by the lack of acquired immunity. The immune system of invertebrates consists of anatomical barriers that form the body's shell and the two main branches of innate immunity: humoral and cellular response. Specialized hemolymph cells called hemocytes mediate the cellular immune response of insects and employ germline encoded receptors to recognize microbes which are further eliminated through the process of phagocytosis. It has been studied over the past decades in model systems, for example the fruit fly *Drosophila melanogaster* or the greater wax moth *Galleria mellonella*. Due to the studies of insect phagocytes, scientists have gathered valuable information. Facts that are especially worth mentioning are associated with the roles of receptors in phagocytosis and their diversity.

1. Introduction

Insects are invertebrates that inhabit all ecological niches, apart from the sea (Hoffmann 1995). Their ability to inhabit such a wide variety of environments indicates that they have a highly effective immune response. They are constantly exposed to harmful impact of microorganisms such as viruses or bacteria. The insect immune response consists of two colligating components: the cellular and the humoral branches (Hoffman 1995). The humoral defenses consist of soluble effector molecules, for example melanin, antimicrobial peptides and the phenoloxidase (PO) pathway (that disable or kill pathogens). In contrast, the cellular response is mediated by the special kind of cells found in hemolymph, called hemocytes and includes phagocytosis, encapsulation, and nodulation (Lavine et al., 2002). It was first described over 100 years ago by a Russian zoologist, Élie Metchnikoff. Pattern-recognition receptors (PRRs) detect molecules characteristic for pathogens, so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipoteichoic acid (LTA), lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN). These receptors bind to ligands and initiate signalling events that end in the disposal of pathogens. Thanks to a series of analyses of insect immune responses, we have enhanced our understanding of the roles of phagocytic cells. A lot of interesting information has been gathered from comprehensive examination of immune receptors in the fruit fly, with the help of genetic tools and the fully sequenced genomes of 12 *Drosophila melanogaster* species (Hoffman 1995).

2. Hemocytes and phagocytic receptors

We can highlight three different types of hemocytes in the fruit fly, that are: plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes (Lanot et al. 2001). Plasmatocytes adhere to the heart tissue in the dorsal vessel and function as the primary effector of cellular immunity in adult fruit flies and they actually are the equivalent of mammalian macrophages (Elrod-Erickson et al. 2000). Experiments, where plasmatocytes were genetically ablated show that phagocytosis is crucial for the fight of the Gram-positive bacteria (Defaye et al. 2009). Phagocytosis begins with cell surface receptors recognizing their complementary ligands. After that, engulfment of molecules into the phagosome is triggered. There are two ways in which phagocytic receptors bind to ligands: they can either recognize targets coated by opsonins that attach to foreign cell's body or directly bind to ligands on the target cells. To

enable uptake, multiple receptors are simultaneously binded to ligands on the surface of target particles due to the diversity of molecules that are taken up by phagocytosis. The overlap and redundancy in a receptor ligand specificities are very helpful in the formation of strong interactions between the target particle and the phagocyte. Receptor redundancy is particularly important, as it allows the host cell to defeat pathogens that evade detection by a particular receptor by developing special mechanisms. Apoptotic cells and microorganisms are two main classes of molecules that are targeted by phagocytes. It is crucial to remove apoptotic cells during embryogenesis and development (Arandjelovic and Ravichandran 2015). In *D. melanogaster* larvae plasmotocytes are the primary phagocytic immune cells that migrate to sites of infection. In adults, plasmotocytes stick to tissues such as the dorsal vessel instead of circulating freely (Elrod-Erickson et al. 2000; Lanot et al. 2001). In a subset of heart-associated plasmotocytes, mitosis is triggered by bacteria. In the fruit fly all hemolymph flows through the heart. Microbes swept by the hemolymph are phagocytosed by hemocytes aggregated along the heart. Some of the receptors in phagocytosis have mammalian orthologs. However, others are unique only to insects (Nazario-Toole et al. 2017).

3. Peptidoglycan-Recognition Receptors

The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) are important microbial receptors that were first identified in the hemolymph of silkworms– *Bombyx mori* (Yoshida et al. 1996). PGRPs were subsequently found in moth (Trichoplusiani) larvae challenged with the Gram-positive bacteria *Enterobacter*. PGRPs bind to peptidoglycan (PGN), a polymer consisting of sugars and aminoacids that is an important component of the cell wall of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Yoshida et al. 1996). Peptidoglycan is made up of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues that are cross linked to each other by peptide bridges of three to five amino acids. PGN of Gram-positive bacteria contains a lysine residue as the third aminoacid in the peptide chain and is known as lysine type peptidoglycan (Lys-PGN). Most of Gram-negative bacteria have a different peptidoglycan types which contain a diaminopimelic acid as the third amino acid (DAP-type PGN). Peptidoglycans of Gram-positive and Gram-negative bacteria differ in their location in the cell wall. DAP-type PGN often forms a single layer that is inside the periplasmic space beneath the outer membrane and lipopolysaccharyide layer of the cell wall of Gram-negative bacteria. In Gram-positive bacteria, PGN can provide more than 50% mass of the cell wall because they tend to form a multilayer PGN membrane to protect the bacteria from hazardous environment conditions. Recognition of PGN plays a critical role in immune defence in *D. melanogaster* (Nazario-Toole et al. 2017). Most comprehensive information about genes encoding PGRP has been provided by research conducted on the fruit fly model system. Insect immune response depends on the Toll and immune deficiency (IMD) signalling pathways. *D. melanogaster* PGRPs recognize their microbial ligands upstream and due to the pathways' activation, the production of immune responsive effectors starts. The difference between the Toll and the IMD pathway is that the first one is activated after infection of fungi or Gram-positive bacteria and the other one by Gram-negative bacteria (Nazario-Toole et al. 2017). There are thirteen *D. melanogaster* PGRP genes, six of which code for long (L) and seven short (S) forms (predicted to be secreted). Four of the long PGRP genes are transmembrane proteins. Members of the noncatalytic PGRPs group (like PGRP-SA, SD, LA and others) serve as microbial sensors, they are unable to degrade PGN. What is more, in the enzymatic pocket of the PGRP domain, they don't have the cysteine residue. On the contrary, catalytic group of PGRPs like PGRP-SC1, LB or SB1 to have amidase activity needed to degrade PGN (Bischoff et al. 2006).

4. Integrins

The integrin heterodimer, α PS3 and β v, is a receptor for *Staphylococcus aureus* bacteria and apoptotic cells in *Drosophila melanogaster*. Integrin fully functions as the heterodimer of transmembrane subunits: α and β integrin. In the *D. melanogaster* genome there are five genes responsible for coding the α subunit and two genes for the β subunit. Integrins plays an important role in cellular responses in insects. They are responsible for microbial recognition. Furthermore, they

mediate the binding and removal of microbes in phagocytosis and encapsulation, the main cellular responses to pathogen infections (Shattil et al. 2010).

5. Down Syndrome Adhesion Molecule 1 (Dscam 1)

Members of the immunoglobulin superfamily (IgSF) such as antibodies and the antigen receptors found on T and B lymphocytes are an essential part of mammalian adaptive immune response. Nevertheless, some of the proteins, which wither secondary structures resemble variable regions of antibodies that exist in insects and belong to the so called immunoglobulin superfamily (IgSF) (Nazario-Toole et al. 2017). Down syndrome adhesion molecules 1 (Dscam1) are IgSF members found in *Drosophila melanogaster*. The *D. melanogaster* genome contains four Dscam-like genes. The most characterized and known gene is the Dscam1. The Dscam1 gene is arranged into clusters of four variable exons (exons 4, 6, 9, and 17) that are flanked by constant exons. Alternative splicing of the exons generates a large repertoire of protein isoforms that have the potential to recognize and bind varied ligands (Schmucker et al. 2000). Main function of Dscam is the recognition of the invading bacteria and direct recognized microbes to removal in phagocytosis process. What is more, Dscam plays an important role for nervous system development and is an essential formation of neural connections in *D. melanogaster* (Wojtowicz et al. 2004). Studies using the mosquito *Anopheles gambiae* demonstrated that Dscam isoforms show specificity for different pathogens. The immune competent line of *Anopheles Gambiae* mosquitoes was infected with various microbes including Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and parasite *Plasmodium berghei*. Each infection induced splicing of Dscam 1 resulting in production of AgDscam molecules with highly specific binding properties to different microbes. This mechanisms suggest that splicing of AgDscam plays a crucial role in mosquitos immune receptors diversity and specifity in response to infections (Nazario-Toole et al. 2017).

6. Scavenger receptors

Scavenger receptors are a group of molecules that bind multiple polyanionic ligands and exhibit broad ligand specificity. They are structurally unrelated; however, they share functional attributes and can be divided into nine classes (Classes A–I) based on shared domain architecture. We can mention *Croquemort*, paralog of mammalian Class B scavenger receptor CD36 (which recognizes Gram-negative and Gram-positive bacteria) It is worth mentioning that CD36 is essential for phagocytosis of apoptotic cells *in vivo* (Nazario-Toole et al. 2017). The Class C scavenger receptors are unique to insects. Scavenger receptor class C, type I (SR-CI) from *Drosophila melanogaster* is the only broadly characterized one so far. It is a receptor for Gram-negative and Gram-positive bacteria. When expressed in mammalian Chinese hamster ovary (CHO) cells, SR-CI show high binding affinity for low-density lipoprotein (LDL). There are four members of the Class C SR family in *D. melanogaster*: dSR-CI, CII that are membrane-bound as well as CIII and CIV that encode secreted proteins. SR-CIII and SR-CIV are expressed at low levels in Schneider 2 cells (also know as S2 cells; one of the most commonly used *D. melanogaster* cell lines) (Graveley et al. 2011). It has been uncovered by analysis of tissue and temporal expression that SR-CI is expressed in larval hemocytes and throughout the whole life of the fly. Meanwhile, the other Class C SRs are only expressed in the early stages of life, not in the final adult form (Nazario-Toole et al. 2017). Scientist identified another CD36 homolog, class B scavenger receptor Peste. It turned out to be a PRR for *Mycobacteria*. *Mycobacterium marinum* (free-living bacterium) causes opportunistic infections in humans and also a lethal infection in *D. melanogaster*. The bacteria grew in phagocytes in the early stages of infection (Dionne et al. 2003).

7. Nimrod Receptor superfamily

Epidermal growth factor (EGF) repeats have roles in extracellular adhesion and receptor–ligand interactions. Proteins that are characterized by the presence of EGF-like repeats (called NIM repeats) are called Nimrod superfamily (Kurucz et al. 2007a). The NIM repeat is a special type of the EGF domain. The Nimrod family consists of three types based on the structural characteristics:

Draper-type genes (with several EGF domains and one copy of the NIM motif) and proteins containing many NIM domains (Poly-NIM), Nimrod B-types (with a lack of transmembrane domains) and Nimrod C-types (that are transmembrane proteins with a variable number of NIM repeats) (Strosch14). The Draper-type proteins are important for phagocytosis in several organisms, including humans and *D. melanogaster*, meanwhile Nimrod B-type proteins recognize pathogens in mosquitoes (Midega et al. 2013). It is believed that the Nimrod C-type emerged first. One of the Nimrod C family gene, called *eater*, shows strong reduction terms of *Staphylococcus aureus* (Gram-positive bacteria) and *Escherichia coli* phagocytosis. The Eater protein is restricted to the plasmatocyte lineage and consists of an N-terminal signal peptide, 32 EGF-like domains, a transmembrane domain, and an intracellular C-terminal domain (Nazario-Toole et al. 2017).

8. Opsonins

Opsonization is the process in which host molecules mark the pathogen for better ingestion and elimination by the phagocytes. Insect thioester-containing proteins (TEPs), responsible for recruiting immune cells, phagocytosis and lysis of microorganisms, share similar sequences with the vertebrates complement factors C3/C4/C5 and the $\alpha 2$ -family of serine proteases (Nazario-Toole et al. 2017). In *Drosophila melanogaster*, the TEP family contains six genes: TEPI, TEPII, TEPIII, TEPIV, TEPV and TEPVI, although TEPV is not always expressed. Genes of TEP family possess a signal peptide which proves their affiliation to secreted proteins. TEPVI, known as macroglobulin complement related (Mcr), is different than other TEP genes family because it lacks a cysteine residue in the thioester-binding site. (Stroschein-Stevenson et al. 2006). A genetic analysis of TEP family proteins showed that TEPI is under positive selection of evolving genes in *D. melanogaster* genome, which suggests that TEPI gene is responsible for adaption of species to new dangerous pathogens encountered in the environment. (Nazario-Toole et al. 2017). In *D. melanogaster* larvae TEPI-TEPIV and TEPVI (Mcr) are expressed in hemocytes, mostly in plasmatocytes. TEPI, TEPII and TEPIV proteins are expressed in fat body. The localization and function of these molecules proves their important role in innate immunity. Expression of TEPI-IV and Mcr is upregulated in larval fat body and hemocytes. Mcr plays an important role in phagocytosis of *Candida albicans* due to its ability to recognize unique features of fungus cell wall (Stroschein-Stevenson et al. 2006). The studies of *Anopheles gambiae* have given the best evidence of TEPs function. Infection in *A. gambiae* with *Plasmodium berghei* (a protozoan parasite that causes malaria in certain rodents) has shown that ookinetes of this parasite were bound in insects' midgut epithelium by AgTEP1, resulting in parasite death. During bacterial infections, expression of TEP1 molecules increased after infection of *Escherichia coli* (Gram-negative bacteria) and *Micrococcus luteus* (Gram-positive bacteria), which proves their anti Gram-negative and anti Gram-positive bacterial properties (Nazario-Toole et al. 2017).

9. Summary

Insects' immune system is an extremely powerful tool for fighting invading microorganisms. We have significantly improved our understanding of the specificity of insect immune responses over the last decades due to classical and molecular genetics approaches that use insect models, but a great deal of issues remain uncovered and are still to be discovered. Valuable insights have been provided into the complex cell biology of phagocytes thanks to the *Drosophila melanogaster*. It will be required to examine phagocytosis and hemocyte-mediated responses even further in order to characterize functional similarities among species and explore how insect immune responses are adapted for specific pathogens. An interesting phenomenon that recently has been discovered in insects is immune priming. The mechanisms of immune priming depend on infection of insects with a nonlethal dose of a pathogen, resulting in increased resistance after infection with a lethal dose of the same or different pathogen. It is likely that some of the factors determining the mechanism of priming are the components of cellular immunity, including phagocytosis (Dhinaut et al. 2018).

10. References

- Arandjelovic S, Ravichandran KS (2015) Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* 16: 907–917.
- Babcock DT, Brock AR, Fish GS, et al. (2008) Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10017–10022.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, et al. (2006) Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.* 2, e14.
- Defaye A, Evans I, Crozatier M, et al. (2009) Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *J. Innate Immun.* 1: 322–334.
- Dhinaut J, Chogne M, Moret Y (2018) Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *J Anim Ecol.* 87(2):448-463.
- Dionne MS, Gori N, Schneider DS (2003) *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.* 71: 3540–3550.
- Elrod-Erickson M, Mishra S, Schneider DS (2000) Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10: 781–784.
- Estevez-Lao TY, Hillyer JF (2014) Involvement of the *Anopheles gambiae* Nimrod gene family in mosquito immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 44: 12–22.
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7: 61–98.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, et al. (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471: 473–479.
- Hoffmann JA (1995) Innate immunity of insects, *Curr Opin Immunol* 7(1): 4-10.
- Kaufmann SH (2008) Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* 9: 705–712.
- Kurucz E, Markus R, Zsamboki J, et al. (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr. Biol.* 17: 649–654.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, et al. (2001) Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230: 243–257.
- Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity.
- Mellroth P, Karlsson J, Steiner H (2003) A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.* 278: 7059–7064.
- Nazario-Toole AE, Wu LP (2017) Phagocytosis in Insect Immunity. *Insect Immunity*: 35–82.
- Royet J, Dziarski R (2007) Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 264–277.
- Schmucker D, Clemens JC, Shu H, et al. (2000) *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 10: 671–684.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 288–300.
- Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, et al. (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 4: e4.
- Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, et al. (2004) Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* 118: 619–633.
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271: 13854–13860.

10. Naprawa DNA w komórkach człowieka

DNA repair in human cells

Mateusz Kciuk

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Kontek

Mateusz Kciuk: mateusz.kciuk94@gmail.com

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, nowotwory, syntetyczna letalność

Streszczenie

Komórki ludzkiego ciała stale narażane są na czynniki uszkadzające ich materiał genetyczny. Czynniki te mogą pochodzić zarówno ze środowiska wewnętrznego komórki (czynniki endogenne) oraz występować w środowisku zewnętrznym komórki (czynniki egzogenne). Powstałe w wyniku ich działania uszkodzenia DNA naprawiane są z wysoką efektywnością przez system nazywany odpowiedzią na uszkodzenia DNA (DDR), w skład którego wchodzi skomplikowana maszyna białkowa. Naprawa jednak nie zawsze działa w sposób bezbłędny, pewne uszkodzenia nie są naprawiane, czego najgroźniejszą dla człowieka konsekwencją jest nowotwór.

1. Wstęp

Kwas deoksyrybonukleinowy będący nośnikiem informacji genetycznej, podatny jest na liczne modyfikacje powstające na skutek działania wielu związków chemicznych. Ze względu na pochodzenie czynnika uszkadzającego, uszkodzenia DNA zostały podzielone na: endogenne i egzogenne. Większość endogennych uszkodzeń powstaje w wyniku reakcji hydrolitycznych z udziałem wody oraz oksydacyjnych z reaktywnymi formami tlenu (ROS). Egzogenne uszkodzenia DNA powodowane są przez czynniki pochodzące ze środowiska zewnętrznego (Chatterjee i Walker 2017).

2. Uszkodzenia DNA

Komórki eukariotyczne replikują swój materiał genetyczny z wysoką wiernością. Główną rolę w replikacji odgrywają polimerazy replikacyjne δ (delta) and ϵ (epsilon). Wierność polimeraz zapewnia komórce stabilność genomową i zapobiega mutagenzie. Pomimo to, polimerazy mogą popełniać błędy, które jeśli nie zostaną skorygowane, mogą prowadzić do niekorzystnych efektów w komórce. W komórce eukariotycznej występuje wiele polimeraz DNA, a każda z nich posiada unikatowe cechy oraz pełni często odmienne funkcje. Błędy w procesie replikacji mogą prowadzić do nieprawidłowego parowania zasad azotowych. Ponadto podczas replikacji sekwencji powtarzających się może dojść do tzw. poślizgu polimerazy, prowadząc do mutacji typu in-del (insercji i delecji) przyczyniających się do zmian ramki odczytu (Chatterjee i Walker 2017).

Topoizomerazy natomiast to enzymy, które usuwają napięcia torsyjne DNA powstałe w procesie jego replikacji i transkrypcji. Podczas działania topoizomeraz może dochodzić do stabilizacji przesuwanego się po nici kompleksu topoizomerazy związanej z DNA, a w konsekwencji zatrzymania widełek replikacyjnych (Chatterjee i Walker 2017).

Jednym z głównych procesów przyczyniających się do spontanicznej mutagenyzy w komórkach człowieka jest deaminacja zasad azotowych. Polega na zastąpieniu atomu azotu, tlenem w cząsteczce egzocyklicznych amin. Prowadzi to do błędnego parowania zasad azotowych, czego konsekwencją są mutacje (Bauer i in. 2015).

W DNA na skutek hydrolizy wiązania N-glikozydowego łączącego zasadę azotową z rdzeniem cukrowo-fosforanowym mogą powstawać miejsca apurynowe -apirymidynowe. Konsekwencją powstania miejsc AP są natomiast pęknięcia jednoniciowe DNA (Liu i in. 2016).

Pęknięcia jednoniciowe mogą powstawać również w wyniku oddziaływania DNA z reaktywnymi formami tlenu (RFT), generowanymi jako produkt uboczny oddychania komórkowego (Chatterjee i Walker 2017). Najczęściej występującymi RFT są anionorodniki ponadtlenkowe ($\bullet\text{O}_2^-$), nadutlenek wodoru (H_2O_2) oraz najbardziej reaktywny z nich rodnik hydroksylowy ($\bullet\text{OH}$) (Cadet i in. 2013). Oksydacja pirymidyn prowadzi do powstania hydratów oraz pochodnych glikolowych. Konsekwencją oksydacji puryn może być natomiast otwarcie pierścienia purynowego i utworzenie pochodnych: formamidopirymidyny oraz 2-hydroksyadeniny. Oksydacja guaniny prowadzi do powstania 8-oksoguaniny, która paruje z adeniną w kolejnej turze replikacyjnej (Bauer i in. 2015).

Ostatnim typem uszkodzeń zamykającym pulę endogennych uszkodzeń DNA są uszkodzenia spowodowane metylacją zasad azotowych. Metyltransferazy DNA są enzymami katalizującymi reakcję przeniesienia grup metylowych ($-\text{CH}_3$) na cząsteczki związków chemicznych. Głównym donorem grup metylowych w komórce eukariotycznej jest S-adenozyl-L-metionina (SAM). W reakcji katalizowanej przez metyltransferazy, grupy metylowe z SAM przyłączane są do zasad azotowych w tym: cytozyny, guaniny oraz adeniny tworząc pochodne o charakterze mutagennym:

N_7 -metyloguaninę, N_3 -metyloadeninę oraz O_6 -metyloguaninę (Chatterjee i Walker 2017).

Uszkodzenia egzogenne mogą powstawać m.in. w wyniku:

- Promieniowania jonizującego, które w skutek bezpośredniego przekazania energii lub poprzez generowanie ($\bullet\text{OH}$) przyczyniać się mogą do powstawania podwójnych pęknięć w DNA (Chatterjee i Walker 2017).
- Promieniowania UV, którego absorpcja prowadzi do wzbudzania materii i jej fotochemicznej modyfikacji. Promieniowanie UVC prowadzi do wytworzenia dwóch głównych fotoproduktów: dimerów pirymidynowych (CPD) oraz 6-4' fotoproduktów zaburzających strukturę DNA (Chatterjee i Walker 2017).

3. Naprawa DNA

W odpowiedzi na działanie czynników uszkadzających DNA, komórka wykształciła system wykrywania, sygnalizacji oraz naprawy uszkodzeń wspólnie nazywany systemem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Rodzaj uszkodzenia DNA determinuje sposób jego naprawy, jednakże wszystkie systemy naprawcze łączy podobny ogólny schemat działania. Większość odpowiedzi na uszkodzenia opiera się na złożonej sekwencji zdarzeń, w której uczestniczy wiele wyspecjalizowanych białek. Tworzą one swoistą kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do naprawy uszkodzenia, „przetwarzania” RNA, remodelowania chromatyny, transkrypcji, autofagii, starzenia komórkowego czy apoptozy (Jackson i Bartek 2009).

W odpowiedzi DDR biorą udział białka odpowiedzialne za wykrycie uszkodzenia, proksymalne i dystalne kinazy transdukcyjne, białka efektorowe cyklu komórkowego, czynniki transkrypcyjne oraz mediatory/regulatory szlaku (Harper i Elledge 2007).

Naprawa uszkodzeń DNA może przebiegać na drodze dwóch odrębnych mechanizmów. Uszkodzenie może zostać bezpośrednio odwrócone w jednoetapowej reakcji (bezpośrednia rewersja uszkodzenia) lub fragment zawierający uszkodzenie może zostać wycięty i naprawiony w akcie syntezy naprawczej (Romanowicz-Makowska i wsp., 2009). Naprawa DNA składa się z trzech głównych etapów: detekcji uszkodzenia, usunięcia uszkodzonego DNA oraz naprawy lub resyntezy fragmentu DNA (Jackson i Bartek, 2009).

3.1 Systemy naprawy DNA

Bezpośrednia rewersja uszkodzeń

Najprostszym i najszybszym rodzajem naprawy jest bezpośrednia rewersja uszkodzeń. Dotyczy ona głównie uszkodzeń alkilacyjnych w tym uszkodzeń charakterystycznych dla dwuniciowego DNA: O_6 -metyloguaniny (O_6meG) oraz 3-metyloadeniny (3meA) oraz jednoniciowego DNA: 1-metyloadeniny (1meA) oraz 3-metylocytozyny (3meC). O_6meG jest uszkodzeniem, które nie blokuje znacząco syntezy DNA, lecz prowadzi do błędnego parowania nukleotydów w kolejnych rundach replikacyjnych. Grupy metylowe O_6meG usuwane są w sposób

bezpośredni przez metylotransferazę O₆meG (MGMT). Białko to przyłącza do siebie grupę metylową (grupa cysteinowa aktywnego enzymu), co przyczynia się do jego dezaktywacji. Nieaktywny enzym kierowany jest następnie do proteosomu, gdzie ulega degradacji (Roos i Kaina 2013).

Naprawa przez wycinanie zasad azotowych (BER)

BER bierze udział w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych, alkilacyjnych, miejsc AP oraz powstałych w wyniku deaminacji zasad. Szczególnie ważnymi enzymami w ww. naprawie są glikozylazy DNA. Funkcją glikozylaz jest hydroliza wiązania N-glikozydowego, który łączy zasadę azotową z pierścieniem cukrowym. Biorąc pod uwagę funkcjonalność glikozylazy dzielimy je na mono lub bifunkcyjne (Chatterjee i Walker 2017; Roos i Kaina 2013; Jackson i Bartek, 2009). W szlaku krótkim BER powstałe w wyniku działania glikozylazy monofunkcyjnej miejsce AP przekształcane jest przez endonukleazę AP (APE-1 w komórkach ludzkich), która rozrywa wiązanie fosfodiesterowe po stronie 5' miejsca AP. W wyniku rozerwania wspomnianego wiązania powstaje koniec 3' zakończony grupą hydroksylową oraz koniec 5'-dRP zakończony fosforanem deoksyrybozy. Usuwany jest on dzięki aktywności liazowej POL β. Polimeraza β wypełnia następnie istniejącą lukę, a ligacja odbywa się dzięki aktywności ligazy III, współpracującej z XRCC1. W szlaku długim BER przemieszony na skutek napotkania przez polimerazę δ oraz ε uszkodzony fragment DNA (w postaci Flapu) zostaje usunięty przez endonukleazę FLAP (FEN1). Fragment syntetyzowany ma długość do 13 nukleotydów, w porównaniu do szlaku krótkiego w którym synteza obejmuje pojedynczy nukleotyd (Chatterjee i Walker 2017; Romanowicz-Makowska i in. 2009).

Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)

Naprawa przez wycinanie nukleotydów jest systemem naprawy uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie UV takich jak: dimery pirymidynowe (CPDs) oraz 6'-4' fotoprodukty (6'-4')PP. NER bierze udział w naprawie adduktów zasad, zasad uszkodzonych przez ROS oraz wiązań krzyżowych. NER może być podzielony na globalny genomowy NER (GG-NER) oraz NER sprzężony z transkrypcją (TC-NER) (Park i Kang 2016). W GG-NER uszkodzenie DNA rozpoznawane jest przez XPC działające w kompleksie z RAD23B (Chatterjee i Walker 2017) TC-NER inicjowany jest natomiast uszkodzeniem powodującym zatrzymanie polimerazy RNA II. Ten wariant NERu rozpoczyna się rekrutacją CSA (ERCC8) oraz CSB (ERCC6) do miejsca uszkodzenia. W kolejnych etapach zarówno GG-NER i TC-NER biorą udział białka komplementacyjne XP. Za wycięcie uszkodzenia odpowiadają białka ERCC1-XPF (nacięcie DNA po stronie 5' uszkodzenia) oraz XPG (nacięcie po stronie przeciwnej). Powoduje to uwolnienie fragmentu zawierającego uszkodzenie. Usunięty fragment DNA jest dobudowywany przez polimerazy γ, κ oraz ε oraz łączony przy udziale kompleksu ligazy IIIα z XRCC1 lub ligazę I (Schärer 2013).

Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)

Substratami dla MMR są głównie błędne sparowane zasady oraz pętle insercyjno-delecyjne (IDLs). Powstające błędne sparowania oraz proste 1-2 nukleotydowe pętle in-del wykrywane są przez heterodimer hMutSa zbudowany z białek MSH2 oraz MSH6. Heterodimer hMutSb utworzony przez białka MSH2/MSH3 rozpoznaje IDLs obejmujące większą liczbę nukleotydów. Kolejnym białkiem zaangażowanym w MMR jest hMutLa (zbudowany z białek MLH1/PMS2), a którego rolą jest rearanżacja kompleksu, który tworzy z hMutSa/b. MMR człowieka może działać dwukierunkowo (w kierunku 3'-5' lub 5'-3'), a główną nukleazą jest Exo1. Resynteza nici przeprowadzana jest z udziałem polimerazy DNA oraz PCNA (Chatterjee i Walker 2017; Popławski i Błasiak 2003).

Naprawa pęknięć jednoniciowych (SSBR)

SSBR jest przez wielu uważany za wyspecjalizowany wariant BER, ze względu na udział tych samych lub podobnych białek w procesie naprawy. Charakteryzuje się jednak obecnością wyspecjalizowanej maszynery białkowej zaangażowanej w przekształcanie prawie zawsze uszkodzonych końców DNA w tym: aprataksyny (APTX), kinazy/fosfatazy polinukleotydowej (PNKP), czy fosfodiesterazy tyrozylowej DNA1 (TDP1) (Bauer i in. 2015).

Naprawa pęknięć dwuniciowych (DSBR)

Pęknięcia dwuniciowe (DSB) stanowią najpoważniejsze zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Zaledwie pojedyncze DSB może prowadzić do śmierci komórki, a nieefektywna naprawa skutkować może delecją materiału genetycznego lub zmianami chromosomalnymi prowadzącymi do transformacji nowotworowej. Naprawa pęknięć dwuniciowych przebiega dwiema głównymi drogami, za pomocą niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) oraz przy pomocy rekombinacji homologicznej (HR)

Naprawa NHEJ rozpoczyna się przyłączeniem heterodimeru białek Ku (Ku70/80) do tępych końców DNA w miejscu uszkodzenia. Heterodimer DSB-Ku70/80 rekrutuje i aktywuje DNA-PKcs oraz posiada aktywność enzymatyczną, przez co może przekształcać uszkodzone końce DNA. Końce DNA zostają połączone przez ligazę IV współdziałającą z XRCC4 (Barnes 2001).

Mechanizm HR może zostać podzielony na 4 główne etapy: resekcję 5'-3', inwazję nici na nic homologiczną, syntezę naprawczą oraz rozdzielenie nici. Poszukiwanie sekwencji homologicznej wymaga jednoniciowego fragmentu DNA. Produkt pośredni może być generowany przez nukleolityczną degradację 5' końca nici DSB. W procesie tym kluczową rolę odgrywa kompleks MRN. Mre11 składnik kompleksu posiada aktywność endo i egzonukleazy szczególnie ważne w początkowych etapach resekcji końców oraz dla rekrutacji CtIP. Utworzone fragmenty 3'-ssDNA okrywane są przez białka RPA, które biorą udział w ich stabilizacji oraz tworzą platformę do której może przyłączyć się RAD51. Wchodzi ono również w interakcję z białkiem BRCA2, które promuje inwazję pojedynczej nici na dupleks (Ciccio i Elledge 2010).

Szlak Anemii Fanconiego

Międzyniciowe wiązania krzyżowe (ICL) DNA stanowią wysoce toksyczne uszkodzenia DNA. Kowalencyjne połączenie przeciwległych nici DNA może hamować proces replikacji oraz transkrypcji DNA. ICL są uszkodzeniami, które obejmują swoim zakresem obie nici helisy DNA, co sprawia, że są szczególnie ciężkie w naprawie. Brak naprawy wiązań krzyżowych może prowadzić do mutacji, pęknięcia chromosomów oraz katastrofy mitotycznej.

W odpowiedzi na indukcję wiązań krzyżowych, komórka wykształciła szlak Anemii Fanconiego (FA) stanowiący główny system ich naprawy. Szlak FA łączy w sobie elementy naprawy innych systemów naprawczych w tym: rekombinacji homologicznej oraz naprawy przez wycinanie zasad. Szlak Anemii Fanconiego składa się z około 19 białek FA oraz wielu białek pomocniczych (Lopez-Martinez i in. 2017).

Synteza na uszkodzonej matrycy

Synteza na uszkodzonej matrycy (synteza przez uszkodzenie, tolerancja uszkodzenia - TLS) jest sposobem na zapobieganie konsekwencjom zatrzymania widełek replikacyjnych, ze względu na uszkodzenie obecne w matrycy, blokujące postęp procesu replikacji. Zapewnia ona komórce dodatkowy czas na naprawę uszkodzenia, nim replikaza powróci duplikować genom. Ze względu na niską wierność uczestniczących w syntezie TLS polimeraz DNA, proces ten jest zwykle mutageny. Miejsca aktywne polimeraz TLS są obszerne, co pozwala im akomodować większe uszkodzenia, których polimerazy replikacyjne nie są w stanie objąć. W porównaniu do replikaz, polimerazy TLS nie posiadają właściwości egzonukleolitycznych, co uniemożliwia im wycinanie błędów powstałych podczas duplikacji nieuszkodzonej matrycy (Goodman i Woodgate 2013).

4. Zastosowanie wiedzy o naprawie DNA

Istotną cechą komórek nowotworowych jest ich nieograniczony potencjał replikacyjny osiągany m.in. dzięki systemom naprawy DNA. Istnieje paradoks – komórka nowotworowa powstaje dzięki błędnemu funkcjonowaniu systemów naprawy, nagromadzeniu mutacji, lecz by zachować zdolność do replikacji polega na sprawnym funkcjonowaniu tych samych systemów naprawczych. Uszkodzenia DNA zwykle naprawiane są przez wiele szlaków naprawczych, kluczowych dla przetrwania komórki. Ze względu na genomową niestabilność w komórkach nowotworowych prawdopodobne jest, że wiele szlaków naprawczych nie funkcjonuje prawidłowo. Zablockowanie alternatywnego do już zmutowanego (wyłączonego) szlaku naprawczego uniemożliwia komórce

naprawę uszkodzenia, powodując jej śmierć. Prowadzi to do tzw. syntetycznej letalności (Shaheen i in. 2011).

Zjawisko to zostało po raz pierwszy opisane przez Calvina Bridges'a w 1992, który zaobserwował, że niektóre kombinacje mutacji u *Drosophila melanogaster* prowadzą do jej śmierci.

Syntetyczna letalność jest w istocie konsekwencją tendencji organizmów do wykształcania układów buforowych, pozwalających na zachowanie fenotypu mimo zmian w środowisku czy przypadkowych mutacji. Obecność alternatywnych białek o podobnej funkcji, kamufluje niekorzystne efekty mutacji. W ten sposób kluczowe dla komórki procesy nie zależą od pojedynczego czynnika składowego (genu) (Nijman 2011). „Wyłączenie” alternatywnego odpowiednika (np. przez zastosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów) stanowi zatem interesujące podejście terapeutyczne charakteryzujące się wyższą selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych, które z natury gromadzą liczne mutacje (Shaheen i in. 2011).

5. Literatura

- Barnes DE (2001) Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Current biology*, 11(12):R455-7.
- Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW (2015) The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic acids research*, 43(21):10083-101.
- Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5):235-263
- Ciccio A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2):179-204.
- Goodman MF, Woodgate R (2013) Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(10):a010363.
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, 14;28(5):739-45
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267):1071-8.
- Liu B, Xue Q, Tang Y, Cao J, Guengerich FP, Zhang H (2016) Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 768:53-67
- Lopez-Martinez D, Liang CC, Cohn MA (2016) Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cellular and molecular life sciences*, 73(16):3097-114.
- Nijman SM (2011) Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS letters*, 585(1):1-6.
- Park JM, Kang TH (2016) Transcriptional and Posttranslational Regulation of Nucleotide Excision Repair: The Guardian of the Genome against Ultraviolet Radiation. *International journal of molecular sciences*, 17(11).
- Popławski T, Błasiak J (2003) Naprawa błędnie sparowanych zasad. *Postępy Biochemii*, 49(3):126-135.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Makowski M, Pertyński T (2009) The significance of DNA repair system in transformation to cancer cells in menopausal women. *Menopause Review*, 1:26-32
- Roos WP, Kaina B (2013) DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*, 332(2):237-48.
- Schärer OD (2013) Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(10):a012609.
- Shaheen M, Allen C, Nickoloff JA, Hromas R (2011) Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood*. 117(23):6074-82.

11. Kapsułkowanie substancji bioaktywnych-metody oraz możliwości aplikacyjne

Encapsulation of bioactive substances – methods and application possibilities

Ilona Kosińska, Żaneta Król-Kilińska, Karolina Drewniaczyk

Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

Kosińska Ilona: ilona.kosinska1902@gmail.com

Słowa Kluczowe: biodostępność, immobilizowanie, kontrolowane uwalnianie, struktura kapsułek, żywność wzbogacona.

Streszczenie

Proces mikrokapsułkowania umożliwia utrwalanie niestabilnych związków bioaktywnych i ich efektywne wykorzystywanie jako dodatków do żywności. Polega na tworzeniu wokół substancji otoczkowanej powłoki jedno lub wielowarstwowej, co powoduje powstawanie kulistych lub nieregularnych kapsułek o różnej średnicy w zależności od wybranej metody. W artykule opisano wybrane techniki i możliwości kapsułkowania składników bioaktywnych. Procesy immobilizacji w przemyśle żywnościowym są stosowane w celu kontrolowanego uwalniania w miejscu i warunkach docelowych, łatwiejszego przechowywania oraz dozowania dodatków do żywności podczas procesów produkcyjnych.

1. Wstęp

Współczesny rynek przemysłu żywnościowego charakteryzuje się stosunkowo wysokim poziomem innowacyjności. Dąży się do ograniczenia kosztów produkcji, zwiększenia wydajności oraz poprawy trwałości, bez jednoczesnego negatywnego wpływu na właściwości organoleptyczne przetworów. Coraz bardziej świadomi i wymagający konsumenci stawiają przed producentami wysokie wymagania. Poszukują produktów, które nie tylko będą smaczne i zaspokoją głód, ale równocześnie będą ekologiczne, dietetyczne, szybkie w przygotowaniu lub gotowe do spożycia. Często motywowani działaniami marketingowymi wybierają żywność funkcjonalną, tj. produkty wzbogacone w składniki mineralne, witaminy czy ekstrakty roślinne o udokumentowanym działaniu prozdrowotnym lub produkty o obniżonej kaloryczności lub zawartości np. sodu, cholesterolu (Gutkowska 2011; Tomaszewska i in. 2014).

2. Opis zagadnienia

Enkapsulacja stwarza możliwości kontrolowania dynamiki uwalniania związków bioaktywnych, co zwiększa zakres i efektywność ich zastosowań. Umożliwia również izolowanie wrażliwych substancji od niekorzystnych czynników zewnętrznych, co stabilizuje ich strukturę i aktywność w czasie użytkowania. Materiał powłokowy dobierany jest na podstawie techniki kapsułkowania oraz właściwości funkcjonalnych, jakie powinna posiadać mikrokapsułka. Podczas wyboru metody uwzględnia się finalną jakość produktów, trwałość, jednorodność, rozpuszczalność i rozmiar kapsułek, wydajność procesową a także koszty, ponieważ otoczka może stanowić nawet 95% masy kapsułki. Materiał powłokowy powinien tworzyć z rdzeniem stabilną emulsję lub dyspersję natomiast nie być z nim reaktywny podczas przetwarzania i przechowywania (Korus i in. 1997; Barbosa-Cánovas i in. 2005).

3. Przegląd literatury

3.1 Metody kapsułkowania

Metoda żelowania jonowego to mikrokapsułkowanie przy zastosowaniu procesów suspensyjnych. Wykorzystywana jest przede wszystkim w biotechnologii, farmacji, ale również ze

względem na niski koszt oraz prostotę produkcji mikrokapsulek, w przemyśle żywnościowym. Technika ta polega na polimeryzacji w zawiesinie w której monomer tworzy krople. Zawiesinę uzyskuje się poprzez intensywne mieszanie monomeru w substancji dla niego nierozpuszczalnej. Polimeryzacja odbywa się wewnątrz kropli monomeru, w wyniku czego powstają gotowe mikrokapsułki. Przygotowanie żelu o właściwej konsystencji wymaga użycia polimeru o odpowiedniej lepkości i stężeniu. Zwykle stosowane są roztwory od 0,5% do 2%. Jako substancje żelujące wykorzystuje się najczęściej polimery naturalne np. alginian, agar, karagen, żelatynę, chitozan. Metoda polega na rozpuszczeniu lub zdyspergowaniu substancji aktywnej w roztworze polimeru powlekającego np. witaminy C w alginianie, następnie w postaci mikrokroplek aplikowane są do roztworu sieciującego np. chlorku wapnia, w którym są utwardzane. Czas mieszania wpływa na ilość jonów Ca^{2+} przechodzących z roztworu do mikrokapsulek. Rodzaj soli, stężenie, temperatura oraz pH ma duży wpływ na właściwości tworzonych żeli. Powstałe mikrokapsułki w zależności od wielkości zostają oddzielone za pomocą filtracji lub wirowania, następnie są przemylane i suszone. Cechy mikrokapsulek otrzymywanych metodą żelowania jonowego są uzależnione od właściwości żeli, stężenia polimeru, a także czasu mieszania w roztworze sieciującym. Metoda ta stosowana w przemyśle żywnościowym jest używana do hermetyzacji dodatków, kontrolowanego uwalniania środków odżywczych, produkcji żywności funkcjonalnej, aromatów, witamin, białek, koncentratów a nawet mleka w proszku (Dembczyński i Jankowski 2004; Korus i in. 1997).

Metoda suszenia rozpyłowego to najprostsza i najczęściej stosowana technika kapsułkowania. Jest prowadzona w suszarkach rozpyłowych i umożliwia produkcję kapsulek o wysokiej jakości, kulistym kształcie, porowatej powierzchni i dobrej rozpuszczalności w wodzie. Wielkość kapsulek jest uzależniona od parametrów procesu i może wynosić od 10 μm do 2 mm (Dłużewska 2008). Metoda polega na zdyspergowaniu substancji aktywnej w stężonym roztworze materiału powłokowego. Otrzymana w ten sposób emulsja jest rozpylana w gorącej komorze suszarki rozpyłowej. W wyniku gwałtownego odparowania wody pod wpływem wysokiej temperatury wokół cząsteczek rdzenia tworzą się otoczki z materiału powlekającego (Korus i in. 1997). Materiałami powlekającymi są najczęściej maltodekstryny, guma arabska i skrobia modyfikowana. Substancja aktywna nie może być rozpuszczalna w materiale powłokowym. Polarna otoczka jest słabo przepuszczalna dla niepolarnych olejków eterycznych. Hydrofobowe substancje aktywne wykazują niską zdolność dyfuzji przez hydrofilową otoczkę. Za pomocą suszenia rozpyłowego możliwe jest kapsułkowanie substancji aromatycznych złożonych z lotnych związków mimo wysokiej temperatury powietrza od 160 °C do 280 °C. Ze względu na krótkotrwałe działanie (maksymalnie kilka sekund) temperatura rdzenia nie osiąga 100 °C. Materiał powlekający powinien charakteryzować się wysoką rozpuszczalnością w wodzie, niską lepkością przy dużym stężeniu, wysoką barierowością w stosunku do tlenu i substancji lotnych oraz dobrymi właściwościami emulgującymi. Stopień uwalniania rdzenia zależy m.in. od wilgotności otoczenia, stężenia polimeru, stopnia zdyspergowania substancji aktywnej i wielkości rozpylanych kapsulek. W wyniku suszenia rozpyłowego otrzymuje się dobrej jakości mikrokapsułki o dużej porowatości (Barbosa-Cánovas i in. 2005; Gouin 2004; Korus i in. 1997).

Metoda ekstruzji jest szczególnie istotna w mikrokapsułkowaniu związków termowrażliwych np. aromatów, witamin, barwników ze względu na niską temperaturę procesu. Zapewnia dużą stabilność składnikom aromatów (nawet do 5 lat), gdyż tlen stosunkowo trudno dyfunduje przez szklaną matrycę hydrofilową (Dłużewska 2008). Urządzenie wykorzystywane w tej metodzie składa się z generatora kropli i zbiornika z kąpielą utwardzającą. Utwardzanie zachodzi w wyniku żelowania, zestalania kropli przez chłodzenie lub na drodze chemicznej np. przez chelatowanie (Korus i in. 1997). Materiałami powlekającymi są najczęściej węglowodany takie jak sacharoza, maltodekstryna, syrop skrobiowy. Metoda polega na dodaniu emulgatora do masy cukrowej o zawartości wody do 10%. W komorze ekstrudera (temp. ok. 130 °C) dyspergowany jest aromat (15-35%), a następnie zhomogenizowana masa jest ekstrudowana do zimnego izopropanolu. Zachodzi schładzanie, utwardzanie i łamanie włókien, które w końcowym etapie są wirowane i suszone próżniowo. W wyniku ekstruzji otrzymuje się mikrokapsułki o zawartości rdzenia 10-15% oraz trwałości do 2 lat. Stosując modyfikacje parametrów tego procesu można osiągnąć nawet dwukrotnie wyższą wydajność (Dłużewska 2008; Korus i in. 1997).

Metoda koacerwacji jest obiecującą technologią mikrokapsułkowania najczęściej stosowaną do enkapsulacji związków aromatycznych, ale również witamin, konserwantów, enzymów i składników odżywczych. Można wyróżnić koacerwację prostą zachodzącą w systemie zawierającym jeden koloid np. żelatynę i złożoną kiedy koloidów jest dwa lub więcej np. guma arabska i żelatyna. Metoda polega na wydzieleniu fazy ciekłej materiału powłokowego z roztworu i zamknięciu w niej substancji aktywnej. Jeżeli wartość pH jest mniejsza niż pI, żelatyna jest naładowana dodatnio, a guma arabska ujemnie. Częsteczki o przeciwnych ładunkach przyciągają się, a następnie wytrąca się nierozpuszczalny kompleks o lepkiej konsystencji, który powleka cząsteczki substancji kapsułkowanej znajdującej się w wodzie. Tak powstałe mikrokapsułki zostają od siebie oddzielone poprzez wirowanie lub sączenie, następnie są przemywane i suszone. W wyniku rozdziału fazowego otrzymywane są mikrokapsułki o zawartości rdzenia ok. 80%, słabo rozpuszczalne w zimnej wodzie i o małej porowatości. Substancja rdzenia może być uwalniana pod wpływem temperatury, ciśnienia lub czynników chemicznych (Gouin 2004; Korus i in. 1997).

Metoda mikrokapsułkowania przez powlekanie w złożu fluidalnym to jedna z niewielu technologii, w której można powlekać substancje aktywne prawie każdym rodzajem materiału powłokowego m. in. pochodnymi celulozy i skrobi, dekstrynami, emulgatorami, tłuszczami. Metoda polega na umieszczeniu substancji aktywnej w dolnej części komory, a następnie jej unoszeniu gorącym powietrzem doprowadzanym przez perforowane dno z równoczesnym wtryskiwaniem roztworu polimeru powlekającego od spodu i kierowaniu ku górze. Cząsteczki rdzenia podczas unoszenia są równocześnie powlekane i suszone, a częściowo powleczone spadają na dno i są zawracane aż do uzyskania przez nie pożądanej grubości ścian. O jakości otrzymywanych mikrokapsulek decyduje szybkość, wilgotność i temperatura wprowadzanego powietrza oraz szybkość dozowania substancji powlekającej. Metoda mikrokapsułkowania przez powlekanie może być wykorzystywana do otoczkowania cząsteczek rdzenia o średnicy 50-5000 μm , a cały proces trwa od 2 do 12 h (Gouin 2004; Korus i in. 1997).

Metoda kokrystalizacji polega na wspólnej krystalizacji substancji aktywnej z materiałem matrycy np. sacharozą. Dodanie substancji aktywnej do przesyconego roztworu sacharozy (97 °Bx w temp. 121 °C) powoduje obniżenie temperatury i rozpoczyna proces samoczynnej krystalizacji. Powstające mikrokryształy o średnicy 3-30 μm powoli łączą się w agregaty o gąbczastej strukturze. Substancja rdzenia wykryształowuje w wolnych przestrzeniach i na powierzchni kryształów jest częściowo chroniona przed wpływem środowiska lecz nie tworzy klasycznych kapsulek. Produkt jest suszony, rozdrabniany i przesiewany (Korus i in. 1997).

Metoda inkluzji w β -cyklodekstrynach wykorzystywana jest przede wszystkim do mikrokapsułkowania związków aromatycznych. Cyklodekstryny to polisacharydy złożone z cząsteczek glukopiranozowych, produkowanych przez enzymatyczną konwersję skrobi. Tworzą gotowe mikrokapsułki kształtem przypominające ścięty stożek z wolnym miejscem w centrum. Metoda polega na utworzeniu emulsji nasyconego roztworu β -cyklodekstryn z substancją rdzenia w podwyższonej temperaturze. Cząsteczki wody zostają wyparte z wnętrza i zastąpione substancją aktywną. Stabilny kompleks najczęściej otrzymuje się przez ochłodzenie w celu zainicjowania procesu krystalizacji lub przez ucieranie substancji aktywnej z cyklodekstryną w stanie stałym po odfiltrowaniu i wysuszeniu kompleksów. W wyniku inkluzji w cyklodekstrynach otrzymywane są bezwonne i higroskopijne mikrokapsułki o dużej trwałości, odporności na utlenianie oraz stabilności w podwyższonej temperaturze (Janiszewska i Witrowa-Rejchert 2006; Korus i in. 1997).

3.2 Możliwości kapsułkowania wybranych substancji aktywnych w żywności

Mikrokapsułkowanie olejków eterycznych w przemyśle spożywczym jest stosowane w celu poprawy funkcjonalności i stabilności aromatów w produkcie. Substancje aromatyczne są lotne, mało stabilne i łatwo ulegają degradacji podczas procesów technologicznych. Używanie kapsułkowanych aromatów daje możliwość bezpieczniejszego przechowywania, powoduje mniejsze odparowanie i ochronę przed niepożądanymi reakcjami z innymi składnikami produktu, a także poszerza możliwości aplikacyjne kapsułkowanych substancji (Dłużewska 2008; Zuidam 2009).

Mikrokapsułkowanie olejku eterycznego z oregano ma zapewnić ochronę składnikom, które oprócz pożądanego aromatu mają właściwości przeciwtleniające i bakteriobójcze. Za

antyoksydacyjny charakter odpowiadają fenole: tymol i karwakrol. Beirão-da-Costa (2013) proces mikrokapsułkowania przeprowadził metodą suszenia rozpyłowego, a jako otoczki użył inuliny. Roztwór zemułgowanej inuliny z olejkim eterycznym wysuszył w temperaturze 190 °C. Otrzymywane mikrokapsułki charakteryzowały się regularnością, gładką powierzchnią i rozmiarem 3-4,5 µm. Według naukowca, wytworzone w ten sposób preparaty mogą być używane do poprawiania właściwości organoleptycznych lub jako naturalny konserwant (Beirão-da-Costa 2013).

Mikrokapsułkowanie olejku eterycznego z rozmarynu ma na celu ograniczenie utraty lotnych składników aromatu. Najważniejszymi substancjami aktywnymi zawartymi w rozmarynie są kwas karnozynowy i karnozyl. Olejek posiada istotne właściwości antyoksydacyjne, antyseptyczne i przeciwbólowe. Janiszewska i Witrowa-Rejchert (2006) proces mikrokapsułkowania przeprowadziły metodą suszenia rozpyłowego, która pozwala na szybkie zestalenie otoczki i ograniczenie strat substancji aktywnej. Jako nośnika użyły maltodekstryny. Zhomogenizowany roztwór maltodekstryny i olejku rozmarynowego, wysuszyły w temperaturze 200 °C. Wytworzone w ten sposób preparaty wykorzystywane są w przemyśle spożywczym do utrwalania mięsa oraz jako przyprawa (Janiszewska i Witrowa-Rejchert 2006; Samotyja i Urbanowicz 2005).

Mikrokapsułkowanie witamin w przemyśle spożywczym jest stosowane w celu zwiększenia trwałości i stabilności substancji aktywnej w niekorzystnych warunkach fizykochemicznych oraz zwiększenia biodostępności i możliwości kontrolowanego uwalniania w miejscach docelowych. Może również chronić przed wpływem tlenu i promieniowania UV oraz maskuje niepożądany smak i zapach substancji aktywnych. Rozwój sektora żywności funkcjonalnej stwarza nowe możliwości aplikacyjne dla stabilnych preparatów uzyskanych metodą enkapsulacji (Estevinho i in. 2016; Lazim i Muhamad 2017).

Witamina B₁₂ pełni istotną rolę w regulacji procesów krwiotwórczych i uczestniczy w biosyntezie kwasów nukleinowych. Głównym źródłem kobalaminy są produkty pochodzenia zwierzęcego, dlatego jej suplementacja jest szczególnie ważna dla osób rezygnujących z konsumpcji mięsa. Konsekwencjami niedoboru tej witaminy są dysfunkcje neurologiczne oraz niedokrwistość megaloblastyczna. Mikrokapsułkowanie kobalaminy ułatwia jej dozowanie oraz poprawia trwałość w produkcji żywności wzbogaconej. Jedną z technik mikrokapsułkowania witaminy B₁₂ jest suszenie rozpyłowe w temperaturze 120 °C, gdzie jako nośnika używa się chitozanu i alginianu sodu. Otrzymane w ten sposób mikrokapsułki są gładkie i mają 3 µm średnicy. Wytworzone w ten sposób preparaty mają wyższą stabilność oraz możliwość kontrolowanego uwalniania witaminy B₁₂ w wybranym środowisku (Estevinho i in. 2016).

Witamina A jest niezbędna w procesie widzenia, odgrywa istotną rolę w podziałach i różnicowaniu komórek oraz zachowaniu ich prawidłowej struktury. Aktywne formy przeważające w organizmie człowieka to przede wszystkim retinol i estry retinylu. Imobilizowanie witaminy A pozwala na jej kontrolowane uwalnianie i zapewnia stabilność w procesach produkcyjnych. Związki retinoidowe posiadają właściwości przeciwutleniające, chronią przed działaniem reaktywnych form tlenu. Proces mikrokapsułkowania może być prowadzony metodami kapsułkowania w liposomach oraz inkluzji w β-cyklodekstrynach. W branży spożywczej wykorzystywane są również łatwo przyswajalne mikroemulsje składające się z fazy olejowej zdyspergowanej w wodnym roztworze alginianu. Krople oleju tworzą mikrokapsułki dzięki alginianowi, który inicjuje sieciowanie układu. W rdzeniu tych kapsułek zamykany jest octan retinolu (Tataruch 2013).

Mikrokapsułkowanie barwników w przemyśle spożywczym jest stosowane w celu poprawy ich rozpuszczalności i przedłużenia trwałości. Barwniki naturalne otrzymywane głównie przez ekstrakcję surowców roślinnych i zwierzęcych wykazują wyższą stabilność w formie krystalicznej niż płynnej lecz łatwo ulegają zbrzyleniu i pyleniu. Używanie kapsułkowanych barwników pozwala na modyfikowanie koloru w zależności od rodzaju otoczki i umożliwia ich łatwiejsze dozowanie (Dłużewska 2008).

Mikrokapsułkowanie β-karotenu ma na celu ograniczenie utraty barwy w wyniku utleniania podczas procesów technologicznych. Barwniki naturalne w porównaniu do syntetycznych charakteryzują się niską odpornością na działanie zewnętrznych czynników fizykochemicznych oraz niższą stabilnością przechowalniczą. Przybysz i in. (2012) opisuje proces mikrokapsułkowania prowadzony metodą suszenia rozpyłowego, a jako najczęściej stosowane materiały powlekające

wymienia gumę arabską, żelatynę, maltodekstrynę i skrobię modyfikowaną. Niekorzystne działanie temperatury, wysokiego ciśnienia i czynników oksydacyjnych na barwniki może powodować obniżenie ich aktywności biologicznej (Dłużewska 2008; Przybysz i in. 2012).

Mikrokapsułkowanie betaniny ma na celu przede wszystkim ochronę barwy i jej właściwości przeciwutleniających, dzięki którym może zmniejszać ryzyko wystąpienia chorób układu krwionośnego i nowotworów. Janiszewska i Witrowa-Rejchert (2006) proces mikrokapsułkowania przeprowadziły metodą suszenia rozpyłowego w temperaturze 160 °C, jako nośnika używa się maltodekstryny i gumy arabskiej. Przewagę pigmentów żółtych otrzymuje się w przypadku otoczki z maltodekstryn, a fioletowych w mikrokapsułkach powleczonych gumą arabską. Kapsułki otrzymane z użyciem gumy arabskiej charakteryzują się niższą higroskopijnością i wyższą stabilnością. Wytworzone w ten sposób preparaty zachowują cenne właściwości soku z buraków i mogą być bezpiecznie dodawane jako naturalny barwnik w żywności (Dłużewska 2008; Janiszewska i Witrowa-Rejchert 2006).

Mikrokapsułkowanie enzymów w przemyśle spożywczym jest stosowane w celu ochrony białek przed denaturacją, ponieważ ich stabilność w postaci immobilizowanej jest wyższa. Substancje hydrofobowe mogą być kapsułkowane w podwójnej warstwie fosfolipidowej, a hydrofilowe w rdzeniu liposomu. Stabilność, przepuszczalność i aktywność powierzchniowa liposomów zależy od wielkości kapsułek, a wydajność mikrokapsułkowania jest proporcjonalna do stężenia i składu frakcji tłuszczowej. Zastosowanie mikrokapsułkowania pozwala na 100-krotne zmniejszenie ilości potrzebnego enzymu oraz na regulowanie szybkości reakcji, a także uzyskanie pożądanych cech organoleptycznych (Dłużewska 2008; Meesters i in. 2010).

Mikrokapsułkowanie enzymu β -galaktozydazy najczęściej produkowanej przez bakterie, grzyby i pleśnie ze względu na niski koszt oraz wysoką wydajność, ma na celu zwiększenie stabilności i zakresu pH działania. Enzym katalizuje hydrolizę laktozy, dlatego w przemyśle spożywczym służy do produkcji artykułów mlecznych o obniżonej zawartości laktozy, szczególnie ważnych dla osób cierpiących na jej nietolerancję. Synowiecki i Wołosowska (2007) opracowali technikę unieruchamiania β -galaktozydazy z bakterii *Pseudoalteromonas* sp. na nośniku chitozanowym. Preparat charakteryzuje się wysoką stabilnością oraz umożliwia zmniejszenie zawartości laktozy w mleku o ponad 90% w 4 °C po 24 h. Korzyścią stosowania tych preparatów jest również eliminacja niepożądanego działania laktozy m.in. obniżanie jakości produktów poprzez krystalizację laktozy w niskich temperaturach oraz jej zdolność do wiązania obcych zapachów z otoczenia (Sindhu i in. 2018; Synowiecki i Wołosowska 2007).

Mikrokapsułkowanie enzymu α -amylazy ma na celu zwiększenie jego aktywności i stabilności podczas procesów technologicznych. Enzym hydrolizuje wiązania α -1,4-glikozydowe rozkładając skrobię do krótkołańcuchowych dekstryn. W przemyśle spożywczym enzym ten wykorzystywany jest jako środek glazurujący oraz wzmacniacz smaku. Mardani i in. (2018) opracowali technikę immobilizowania α -amylazy na nanokompozytach chitozanolomontmorylonitowych. Chitozan jest najczęściej stosowanym materiałem powłokowym, posiada w swojej strukturze grupę aminową i hydroksylową, dlatego z łatwością wiąże się z enzymami. Wytworzone w ten sposób preparaty stwarzają większe możliwości stosowania enzymów w przemyśle spożywczym np. do produkcji syropów glukozowo-fruktozowych (Mardani i in. 2018; Sindhu i in. 2018).

4. Podsumowanie

Enkapsulacja jest skutecznym narzędziem umożliwiającym podaż z żywnością związków bioaktywnych, takich jak: antyoksydanty, witaminy, składniki mineralne, probiotyki, prebiotyki, wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 czy fitosterole w taki sposób by ich biodostępność i efekt fizjologiczny były jak najbardziej efektywne. Znaczne ilości preparatów produkowane są w skali laboratoryjnej w celach doświadczalnych. Hermetyzacja związków aktywnych jest obecnie obiecującym sektorem badań wymagającym interdyscyplinarnego podejścia w zakresie wielu dziedzin nauki m.in. materiałoznawstwa, chemii i technologii produkcji (Meesters i in. 2010).

5. Literatura

- Barbosa-Cánovas GV, Ortega-Rivas E i in. (2005) Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality. Springer: 19-59.
- Beirão-da-Costa S, Duarte C, Bourbon AI i in. (2013) Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. Food Hydrocolloids: 1-30.
- Dembczyński R, Jankowski T (2004) Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 4(41): 5-17.
- Dłużewska E (2008) Mikroapsułkowanie dodatków do żywności. Przemysł Spożywczy 62(5): 30–35.
- Estevinho B, Carlan I, Blaga A i in. (2016) Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. Powder Technology 289(C): 71–78.
- Gouin S (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology 15(7): 330–347.
- Gutkowska K (2011) Innowacyjność konsumentów wobec produktów żywnościowych jako warunek rozwoju rynku żywności. Konsumpcja i rozwój: 108-119.
- Janiszewska E, Witrowa-Rajchert D (2006) Mikroapsułkowanie aromatów. Przemysł Spożywczy 60(5): 40–45.
- Korus J, Achremowicz B, Sikora M (1997) Mikroapsułkowanie substancji spożywczych. Żywność. Technologia. Jakość. 1(10): 30–40.
- Lazim NAM, Muhamad II (2017) Encapsulation of vitamin e using maltodextrin/sodium caseinate/selenomethionine and its release study. Chemical Engineering Transactions 56: 1951-1956.
- Mardani T, Mahmood SK, Mokarram RR i in. (2018) Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. International Journal of Biological Macromolecules 120: 354-360.
- Meesters GMH, Zuidam N, Nedovic V (2010) Encapsulation of Enzymes and Peptides. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer: 253-268.
- Przybysz MA, Dłużewska E, Korszen M (2012) Wpływ rodzaju nośnika na trwałość przechowalniczą naturalnego beta-karotenu mikroapsułkowanego metodą suszenia rozpyłowego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 5(84): 84 – 98.
- Samotyja U, Urbanowicz A (2005) Przeciwnutleniające właściwości handlowych ekstraktów z rozmarynu. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2(43): 184–192.
- Sindhu R, Binod P, Sabeela Beevi U i in. (2018) Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. Food Technology & Biotechnology 56(1): 16-30.
- Synowiecki J, Wołosowska S (2007) Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów. Biotechnologia 2(77): 7-26.
- Tataruch K (2013) Kapsułkowanie – metoda stabilizacji witaminy A w technologii wzbogacenia żywności. Zeszyty Naukowe Towaroznawstwo 906: 87-99.
- Tomaszewska M, Bilińska B, Grzesińska W i in. (2014) Żywność funkcjonalna jako możliwość rozwoju polskich firm spożywczych. Roczniki Naukowe XVI(3): 293-298.
- Trojanowska A, Giamberini M, Tsibranska I i in. (2017) Microencapsulation in food chemistry. Journal of Membrane Science and Research 3(4): 265–271.
- Zuidam NJ, Nedovic V (2010) Active Food Ingredients and Food Processing. Springer: 3-30.

12. Charakterystyka białek szoku zimna u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich: struktura, regulacja syntezy i funkcja w komórce

Characterization of cold shock proteins in Gram-negative and Gram-positive bacteria: structure, regulation of synthesis and function in cells

Marta Kozieł, Paulina Lipa, Monika Janczarek

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS

Marta Kozieł: martakoziełbiot@gmail.com

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, białka CSP, chaperony RNA, niska temperatura

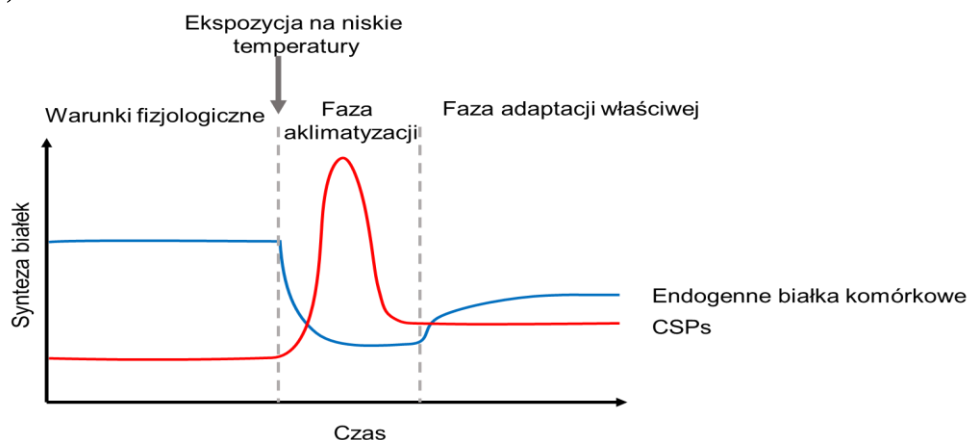
Streszczenie

Synteza białek szoku zimna (ang. *Cold Shock Proteins*, CSP) jest indukowana głównie w odpowiedzi na niskie temperatury, w celu eliminowania niekorzystnego wpływu tego czynnika abiotycznego na fizjologię mikroorganizmów bakteryjnych. Do najlepiej poznanych białek CSP należy rodzina białek szoku zimna występująca u *Escherichia coli*, w obrębie której wyróżniamy co najmniej dziewięć białek tego typu oraz szereg innych polipeptydów. Głównym białkiem szoku zimna u *E. coli* jest CspA, które preferencyjnie wiąże się do cząsteczek jednoniciowego (ang. *single-stranded*, ss) ssRNA/DNA. Ponadto sugeruje się, że białka te biorą udział w regulacji transkrypcji i translacji oraz degradacji mRNA. Obecność homologów CspA potwierdzono u ponad 50 różnych gatunków Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich bakterii, przy czym największą homologię strukturalną i funkcjonalną do CspA *E. coli* wykazano dla CspB *Bacillus subtilis*. W niniejszej pracy zostały przedstawione najważniejsze informacje dotyczące struktury, funkcji i mechanizmów indukcji syntezy białek szoku zimna, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka CspA *E. coli*.

1. Wstęp

Bakterie występujące w różnych ekosystemach poddane są działaniu szeregu stresów środowiskowych, do których należą m.in.: ekstremalne temperatury, zasolenie, czy ograniczona dostępność składników odżywczych. W związku z tym aby przeżyć, mikroorganizmy te wykształciły mechanizmy adaptacyjne umożliwiające im prawidłowy wzrost w niekorzystnych warunkach otoczenia. W wyniku ekspozycji organizmów na działanie temperatur niższych od optymalnej dochodzi m.in. do obniżenia płynności ich błon komórkowych (a tym samym zaburzenia prawidłowej aktywności metabolicznej komórki bakteryjnej) oraz zwiększenia liczby ujemnych superskrętów w DNA i powstawania stabilnych drugorzędowych struktur kwasów nukleinowych, co zmniejsza efektywność procesów: translacji, transkrypcji i replikacji DNA. W celu zniwelowania szkodliwych skutków zmiany temperatury, mikroorganizmy wytwarzają białka w odpowiedzi na ten czynnik stresowy, określane mianem białek szoku zimna (ang. *Cold Shock Proteins*, CSP). W przypadku mikroorganizmów psychrofilnych zidentyfikowano również tzw. białka aklimatyzacji do zimna (ang. *Cold Acclimation Proteins*, CAP), wykazujące znaczne podobieństwo do białek CSP obecnych u *Escherichia coli* (Kaufman i Turkiewicz 2004; Phadtare i in. 1999; Thieringer i in. 1998). Dodatkowo udział w adaptacji do zimna przypisuje się rybonukleazom (np. PNPaza, RNaza E, RNaza R, RNaza II) i helikazom RNA (np. SrmB, CsdA), które współdziałając z białkami CSP stymulują degradację RNA w niskich temperaturach. Białka CSP mogą funkcjonować jako chaperony RNA, które ułatwiają translację poprzez destabilizację drugorzędowych struktur powstających w tych cząsteczkach w niskich temperaturach. Białka te pełnią także rolę transkrypcyjnych aktywatorów, co zostało wykazane na przykładzie dwóch genów, których produkty (GyrA, H-NS) są zaangażowane w zmianę topologii DNA (Ermolenko i Makhataдзе 2002). Ponadto, białka CSP biorą udział w odpowiedzi bakterii na stres wywołany niedoborem składników odżywczych, promieniowaniem UV, ciśnieniem oraz zasoleniem. Na skutek ekspozycji bakterii na niskie temperatury dochodzi do

zahamowania syntezy większości ich białek komórkowych. Etap ten zwany fazą wstępnej adaptacji (aklimatyzacji) charakteryzuje się zatrzymaniem wzrostu mikroorganizmów i trwa w zależności od gatunku od kilkunastu minut do kilku godzin (Dziugan 2006; Kaufman i Turkiewicz 2004). Podczas tej fazy obserwuje się wzmożoną, przejściową syntezę białek szoku zimna, w tym również szeregu rybosomalnych czynników (np. RbfA, CsdA), które wiążąc się z rybosomami nadają im odporność na zimno i tym samym, przywracają bakteriom zdolność do wzrostu w niskich temperaturach (Phadtare i Severinov 2010). Wówczas komórki wchodzą w tzw. fazę właściwej adaptacji, w której to ilość białek CSP ulega obniżeniu, a synteza endogennych białek komórkowych osiąga poziom podobny do stanu sprzed wystąpienia szoku temperaturowego (Rys.1) (Horn i in. 2007; Dziugan 2006).



Rys. 1. Zmiany ilości białek CSP oraz endogennych białek komórkowych w czasie po ekspozycji na niską temperaturę. Opracowanie własne na podstawie (Dziugan 2006).

Wśród białek CSP dominują głównie małe białka, których obecność wykazano u różnych gatunków bakteryjnych. Do najlepiej scharakteryzowanych białek szoku zimna należą CSP występujące u *E. coli*. Głównym białkiem zaangażowanym w adaptację do zimna jest CspA, które zostało opisane u *E. coli* po raz pierwszy w 1987 roku przez P. Jones oraz współpracowników i jak wykazano, białko to stanowi do 13% wszystkich białek produkowanych w fazie aklimatyzacji (Jones i in. 1987). Drugim dobrze scharakteryzowanym białkiem szoku zimna jest CspB *Bacillus subtilis* wykazujące 61% homologii do wspomnianego wcześniej CspA *E. coli*. Obecność homologów CspA wykazano również u wielu innych (ponad 50 gatunków) Gram-ujemnych i Gram-dodatnich psychro-, mezo- i termofilnych szczepów bakteryjnych, takich jak: *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus lactis* i *Bacillus caldolyticus* (Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002; Phadtare i in. 1999). Ostatnio potwierdzono również obecność białek CSP u najwcześniej odgałęziających się od archeonów, termofilnych bakterii z rodzaju *Thermatoga* oraz *Aquifex*. Białka te wykazują około 62-68% podobieństwa sekwencji do białek CSP Gram-dodatnich mikroorganizmów, co wskazuje, że ich „przodek” mógł być obecny już w początkowych etapach ewolucji organizmów jednokomórkowych (około 3,5 mld lat temu) (Dziugan 2006; Phadtare 2004). Ponadto, wysoki stopień podobieństwa struktury i funkcji białek CSP oraz konserwatywność promotorów genów kodujących te polipeptydy wskazują na ich istotną rolę także w innych mechanizmach adaptacyjnych, niż adaptacja do zimna, które determinują prawidłowy wzrost komórki w warunkach bezstresowych. W niniejszej pracy przedstawione zostały ogólne informacje dotyczące struktury, regulacji ekspresji genów kodujących białka CSP oraz ich roli w adaptacji mikroorganizmów do niskich temperatur, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka CspA *E. coli*.

2. Białka szoku zimna

Rodzina białek CSP *E. coli* obejmuje dziewięć niskocząsteczkowych (około 7 kDa) polipeptydów o długości od 69 do 74 aminokwasów, których podobieństwo sekwencji do siebie wynosi od 29% do 83%. Polipeptydy te różnią się między sobą wartościami punktu izoelektrycznego

(od 5,53 do 10,72) oraz mechanizmem regulacji ich biosyntezy. Na przykład synteza nie wszystkich białek z tej grupy ulega indukcji pod wpływem niskich temperatur. Jedynie cztery z nich, tj. CspA, CspB, CspG oraz CspI są typowymi białkami szoku zimna. Natomiast synteza CspE i CspC utrzymuje się na stałym poziomie w warunkach fizjologicznych bakterii i białka te odgrywają istotną rolę w kondensacji nukleoidu (Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002; Yamanaka 1999). Z kolei zwiększony poziom syntezy białka CspD jest obserwowany podczas stresu wywołanego brakiem składników odżywczych. (Yamanaka 1999). Przypuszcza się, że białka CspH i CspF oddziałują z dwuniciowym (ang. *double-stranded*, ds) DNA, lecz obecnie nie ma dowodów świadczących o ich roli w adaptacji *E. coli* do stresu niskiej temperatury (Horn i in. 2007; Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002). Białko CspA stanowi około 13% wszystkich białek syntetyzowanych przez bakterie po ich ekspozycji na niskie temperatury. Przy czym, zaobserwowano występowanie niewielkich stężeń (50 μ M) tego białka w początkowych fazach logarytmicznego wzrostu mikroorganizmów w warunkach bezstresowych. W temperaturze 37 °C zaobserwowano również konstytutywną ekspresję genu kodującego białko CspE. Sugeruje to, że białka CSP oprócz adaptacji do stresu zimna, pełnią dodatkowe funkcje w regulacji procesów komórkowych bakterii (Horn i in. 2007, Kaufman i Turkiewicz 2004, Bae i in. 1999).

Analiza frakcji białek cytoplazmatycznych *E. coli* metodą elektroforezy dwukierunkowej umożliwiła zidentyfikowanie także innych białek niż CSP, których synteza jest indukowana niską temperaturą. Należą do nich m.in.: czynnik inicjacji translacji IF2 (ang. *Initiation factor 2*), helikaza DEAD-box CsdA (ang. *Cold shock domain protein A*), białko RecA uczestniczące w rekombinacji, podjednostka α gyrazy GyrA, niskocząsteczkowe białko histonopodobne H-NS (ang. *Histone-like protein*), fosforylaza polinukleotydowa PNP (ang. *purine nucleoside phosphorylase*) oraz białko NusA (ang. *N utilization substance protein A*) (Tab.1) (Kaufman i Turkiewicz 2004, Thieringer i in. 1998).

Białka *E. coli*, których synteza jest indukowana zimnem, można podzielić na dwie klasy. Do I klasy zaliczamy białka, których ilość w optymalnej temperaturze wzrostu bakterii (37 °C) jest znikoma, natomiast w wyniku ekspozycji na zimno ich synteza zachodzi na bardzo wysokim poziomie (ponad 10-krotnie większym w porównaniu do warunków kontrolnych). Białka te pełnią rolę chaperonów oraz aktywatorów transkrypcji i translacji. Umożliwiają one biosyntezę specyficznych polipeptydów, które nie wymagają obecności dodatkowych czynników translacyjnych nieaktywnych w niskich temperaturach, co pozwala na produkcję endogennych białek komórkowych. Z kolei do II klasy zaliczamy te białka, których obecność wykazano także w 37 °C, a ich ilość w komórce wzrasta jedynie nieznacznie w odpowiedzi na niską temperaturę. Są one wówczas produkowane w sposób ciągły, co umożliwia syntezę i prawidłowe fałdowanie powstających w tych warunkach łańcuchów polipeptydowych. Przykłady białek z poszczególnych grup zostały przedstawione w tabeli 1 (Kaufman i Turkiewicz 2004, Yamanaka 1999; Thieringer i in. 1998).

Tab. 1. Przedstawiciele poszczególnych klas białek szoku zimna *E. coli* (Kaufman i Turkiewicz 2004, Thieringer i in. 1998).

Klasa	Białko	Funkcja
Klasa I	Rodzina białek CSP	Chaperony RNA/DNA
	RbfA	czynnik o masie 15 kDa wiążący rybosomalną podjednostkę 30S
	CsdA	białko (70 kDa) o aktywności helikazy RNA, związane z rybosomami
	PNP	Rybonukleaza
	NusA	Białko uczestniczące w terminacji i antyterminacji transkrypcji
Klasa II	H-NS	Białko wiążące DNA
	IF-2	Czynnik inicjacji translacji
	RecA	Czynnik rekombinacji
	GyrB	Podjednostka α gyrazy DNA o aktywności topoizomerazy II

Indukcja syntezy białek pod wpływem zimna została wykazana również u Gram-dodatniej bakterii *B. subtilis*. Obecność co najmniej jednego z tych białek jest niezbędne dla utrzymania żywotności komórek, a dwa z nich (CspB i CspC) są również indukowane w fazie stacjonarnej, co wskazuje, że synteza tych białek ulega zwiększeniu także w odpowiedzi na inne czynniki stresowe. Wydaje się, że białko CspB odgrywa główną rolę w adaptacji *B. subtilis* do niskich temperatur i ma podobną funkcję jak białko CspA *E. coli*. W sytuacji braku syntezy wszystkich trzech CSP nie zaobserwowano wzrostu *B. subtilis* w 37 °C, co potwierdza istotną rolę tych białek również w warunkach fizjologicznych bakterii (Grauman i Marahiel 1999).

3. Struktura białek CSP

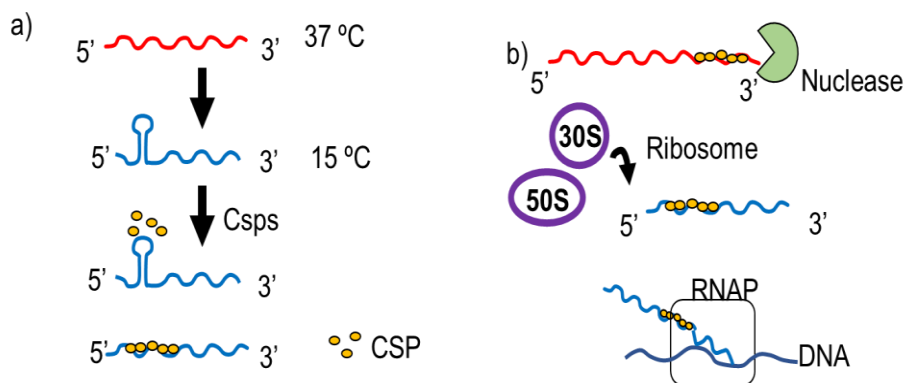
Przy użyciu metod krystalografii oraz spektroskopii NMR określono trójwymiarową strukturę 70-aa białka CspA o masie 7,4 kDa występującego u *E. coli*, a także białek CspB obecnych u *B. subtilis*, *B. caldolyticus* oraz *Thermatoga maritima*. Wykazano, że białka CspA *E. coli* oraz CspB *B. subtilis* zawierają odpowiednio pięć i trzy β -harmonijki ułożone antyrównolegle i tworzące strukturę typu β -baryłki, która występuje również jako domena szoku zimna (ang. *Cold-Shock Domain*, CSD) w białkach niezwiązanych ze stresem temperaturowym (*OB fold*), zdolnych do wiązania się z oligosacharydami i/lub oligonukleotydami (Kaufman i Turkiewicz 2004). Obecność domen CSD wykazano m.in. w rybosomalnych białkach *Thermus thermophilus* S1, S12 i S17, czynnika inicjacji translacji α IF1a *Methanococcus jannaschii* oraz eIF1a *Homo sapiens*, czynnika terminacji transkrypcji Rho *E. coli* oraz w kilku innych białkach indukowanych stresem zimna (NusA, PNPase, IF1). Wykazano również znaczącą homologię sekwencji (43% identyczności) pomiędzy bakteryjnymi białkami CSP a domenami CSD eukariotycznych białek rozpoznających motyw Y-box o sekwencji 5'-ATTGG-3', które należą do rodziny czynników transkrypcyjnych wiążących kwasy nukleinowe (Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002; Thieringer i in. 1998, Jiang i in. 1997). Domeny CSD znaleziono również w kilku innych białkach eukariotycznych, nie należących do rodziny Y-box, na przykład w ludzkim białku Unr wiążącym RNA, które jest wymagane do translacji zależnej od wewnętrznego miejsca wiązania rybosomu (ang. *Internal Ribosomal Entry Site*, IRES). Natomiast pierwszym zidentyfikowanym eukariotycznym białkiem, wykazującym w pełni homologię do bakteryjnych białek CSP jest białko Clah 8 występujące u *Cladosporium herbarum*, które składa się wyłącznie z domen CSD (Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002). Białka CSP należą do dużej rodziny białek wykazujących powinowactwo do cząsteczek jednoniciowych kwasów nukleinowych (RNA/ssDNA) bogatych w pirymidyny. W oddziaływaniu tych białek z RNA/ssDNA uczestniczą dwa motywy zlokalizowane w strukturze β -harmonijek (β_2 i β_3): motyw RNP1(K/R-G-F/Y-G/A-F-V/I-X-F/Y) i motyw RNP2 (L/I-F/Y-V/I-G/K-N/G-L), które występują we wszystkich poznanych do tej pory białkach szoku zimna. Prawdopodobnie umieszczone po jednej stronie tych białek zasadowe i aromatyczne reszty aminokwasowe (fenyloalaniny, tryptofanu, tyrozyny, histydyny, lizyny, argininy), obecne we wcześniej wspomnianych motywach stanowią miejsca wiążące kwasy nukleinowe. Zdolność do preferencyjnego wiązania jednoniciowych kwasów nukleinowych, wskazuje na rolę tych białek w destabilizowaniu drugorzędowych struktur RNA, które utrudniają inicjację translacji, co wskazuje na chaperonowy charakter działania CSP (Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002).

4. Rola białek CSP w adaptacji do stresu niskich temperatur

Inkubacja bakterii w niskich temperaturach wywołuje wiele niekorzystnych zmian w fizjologii tych mikroorganizmów, do których zaliczamy m.in.: zmniejszenie płynności błon i aktywności enzymów komórkowych, zwiększenie superhelikalnej gęstości DNA, nieefektywne fałdowanie białek oraz tworzenie i stabilizacja drugorzędowych struktur kwasów nukleinowych. Istotną rolę w niwelowaniu skutków tych zmian, związanych głównie z kwasami nukleinowymi, przypisuje się białkom CSP (Phadtare i Severinov 2010; Kaufman i Turkiewicz 2004; Ermolenko i Makhatadze 2002; Phadtare i in. 1999).

Białka CSP mogą funkcjonować jako aktywatory transkrypcji, co wykazano na przykładzie genu *h-ns*, którego produkt jest zdolny do preferencyjnego wiązania cząsteczek ds DNA. Wykazano, że stosunek H-NS:DNA, określony w warunkach szoku zimna, jest czterokrotnie wyższy w porównaniu do warunków fizjologicznych (Horn i in. 2007). Wzrost ekspresji genu *h-ns* jest stymulowany przez białko CspA, które to rozpoznaje jego region promotorowy. Podobny efekt można uzyskać w wyniku heterologicznej ekspresji genu *cspB* *B. subtilis*, co wskazuje na ściśle podobieństwo funkcjonalne tych białek pochodzących z różnych gatunków bakteryjnych (Horn i in. 2007). Potwierdzony został także udział CspA w aktywacji transkrypcji *gyrA* kodującego podjednostkę α gyrazy DNA, w wyniku oddziaływania tego białka z regionem promotorowym regulowanego genu. Enzym ten uczestniczy w adaptacji komórki do stresu niskiej temperatury, zmniejszając superhelikalną gęstość DNA, co umożliwia replikację DNA w takich warunkach (Horn i in. 2007, Kaufman i Turkiewicz 2004). Ponadto, białka te, zwłaszcza CspA, CspC oraz CspE, mogą funkcjonować w niskich temperaturach jako antyterminatory transkrypcji. Zapobiegają one tworzeniu się drugorzędowych struktur typu „szpilki do włosów” powodujących przedwczesną terminację. Innym białkiem indukowanym zimnem, które uczestniczy w antyterminacji transkrypcji zależnej od białka Q jest NusA (Barria i in. 2013, Horn i in. 2007).

Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* potwierdziły chaperonowy charakter białka CspA *E. coli* (Jiang i in. 1997). Opracowano model działania CspA, w którym białko to wiąże się do regionu 5'-UTR cząsteczki mRNA i w ten sposób zapobiega tworzeniu się stabilnych drugorzędowych struktur, które utrudniają rybosomowi odnalezienie sekwencji Shine–Dalgarno (Rys.2a). Z drugiej strony, powinowactwo białek CSP do RNA jest dość niskie (zakres μM), co może w konsekwencji pozwolić rybosomom na ich wypieranie i translację liniowego mRNA. Ponadto, destabilizujące działanie CSP na drugorzędowe struktury kwasów rybonukleinowych sprzyja ich degradacji przez RNazy (Rys.2b). Wyjątek stanowi białko CspE, które wiąże się do ogona poliA i w ten sposób zakłóca trawienie RNA przez PNPazę i RNazę E (Barria i in. 2013; Ermolenko i Makhatadze 2002).



Rys. 2. Rola białek CSP w regulacji transkrypcji w warunkach niskich temperatur. Opracowanie własne na podstawie (Barria i in. 2013).

Jednym z wielu negatywnych skutków działania niskiej temperatury jest obniżenie ilości polisomów i akumulacja monosomów oraz podjednostek rybosomalnych (30S, 50S, 70S), co wpływa niekorzystnie na efektywność translacji (Dziugan 2006). Jednakże wykazano istnienie wielu czynników związanych z rybosomami, które ułatwiają im prawidłowe funkcjonowanie podczas szoku wywołanego niską temperaturą. Przykładem jest helikaza CsdA, która bierze udział w biogenezie dużej podjednostki rybosomalnej 50S. Wykazano, że delecja genu *csdA* prowadzi do deficytu tej podjednostki w niskiej temperaturze (Charollais i in. 2004). Ponadto, sugeruje się rolę białka CsdA w interakcjach z podjednostkami rybosomu 30S oraz 70S. Z kolei, białko RbfA (ang. *Ribosomal binding factor A*) w warunkach niskiej temperatury bierze udział w dojrzewaniu podjednostki 30S. Także czynniki inicjacji translacji (IF2, IF3), wiążąc się z rybosomami, umożliwiają ich przejście do

stanu funkcjonalnego, który umożliwia efektywny proces translacji w tych warunkach stresowych (Barria i in. 2013; Dziugan 2006; Kaufman i Turkiewicz 2004).

5. Regulacja ekspresji genów *csp*

Białka CSP zostały pierwotnie zidentyfikowane jako makrocząsteczki, których wzmożona synteza jest obserwowana w wyniku ekspozycji bakterii na zimno. Należy zauważyć, iż ten rodzaj odpowiedzi mikroorganizmów na niekorzystne warunki środowiskowe jest wywołany przez obniżenie temperatury o 10 lub więcej stopni °C. Im większa amplituda zmian temperatury, tym wyższy wzrost ilości białek CSP (Ermolenko i Makhatadze 2002). Mechanizm indukcji syntezy białek szoku zimna *E. coli* zależny od temperatury podlega ścisłej kontroli na poziomie transkrypcji, stabilności struktur mRNA oraz translacji (Phadtare i Severinov 2010, Ermolenko i Makhatadze 2002). Ponadto, ekspresja genów kodujących białka szoku zimna może być wywołana również poprzez dodanie do hodowli bakteryjnej antybiotyków (Horn i in. 2007; VanBogelen i Neidhardt 1990). Zaobserwowano, że dodanie do hodowli *E. coli* prowadzonej w 37 °C antybiotyków blokujących translację na etapie: wiązania aminoacylo-tRNA (tetracyklina), reakcji katalizowanej przez transferazę peptydylową (chloramfenikol, erytromycyna) i translokacji (kwas fusydowy) indukuje syntezę białek CSP, podobnie jak ma to miejsce podczas adaptacji bakterii do zimna (VanBogelen i Neidhardt 1990).

Istotną rolę w regulacji transkrypcji genów *cspA*, *cspB*, *cspG*, *cspI* odgrywa długi (w przypadku *cspA* liczący aż 159 nukleotydów) region 5'-UTR (5'-*untranslated region*) mRNA, który zawiera wysoce konserwatywną sekwencję o długości 11 par zasad, zwaną „cold-box” (Kaufman i Turkiewicz 2004, Xia i in. 2001). Jest to tzw. miejsce przerywania transkrypcji, które bierze udział w represji ekspresji genu *cspA*. Wykazano, że ekspresja genów kodujących CspA nie wymaga żadnych dodatkowych czynników transkrypcyjnych, jak ma to miejsce w przypadku genów dla białek szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Proteins*, HSPs), lecz podlega autoregulacji. W warunkach braku białka CspA, tempo translacji jego mRNA w początkowej fazie aklimatyzacji utrzymuje się na wysokim poziomie, gdyż wówczas polimeraza RNA „omija” sekwencje „cold-box” hamujące transkrypcję. Natomiast wraz ze wzrostem stężenia białka CspA w komórce dochodzi do jego związania się z własnym mRNA, a tym samym do destabilizacji kompleksu elongacyjnego i atenuacji transkrypcji. Na podstawie analizy mutantów *E. coli* posiadających delecję w regionie 5'-UTR wykazano, że fragment ten jest odpowiedzialny za zwiększoną niestabilność mRNA *cspA* w 37 °C (okres półtrwania 12 sekund) i ma pozytywny wpływ na stabilność tego mRNA w niskiej temperaturze (ponad 20 min w 15 °C) (Barria i in. 2013; Horn i in. 2007; Kaufman i Turkiewicz 2004; Phadtare 2004; Yamanaka 1999). Wykazano, że helikaza RNA zawierająca motyw DEAD-box (kwas asparaginowy--kwas glutaminowy-alanina-kwas asparaginowy) kodowana przez gen *csdA* również wpływa na stabilność mRNA (Horn i in. 2007; Ermolenko i Makhatadze 2002). Zaburza ona tworzenie się struktur typu „spinki do włosów” w obrębie regionu 5'-UTR występującego w mRNA *csp*, zapewniając im ochronę przed atakiem endonukleaz (np. RNazy III) (Ermolenko i Makhatadze 2002). Pozytywną rolę regionu 5'-UTR w indukcji CSP wykazano również w przypadku mRNA dla białka CspB *B. subtilis*. Białko to preferencyjnie wiąże się do sekwencji bogatych w uracyl w regionie 5'-UTR jego mRNA, co zapobiega tworzeniu stabilnych, drugorzędowych struktur w tej cząsteczce, ograniczających dostępność sekwencji Shine-Dalgarno wymaganej do inicjacji translacji. Jak już wspomniano, struktury te są również celem dla RNazy III, dlatego też ich destabilizacja z udziałem białka CspB zwiększa wydajność translacji i hamuje degradację mRNA. W podobny sposób białko to może uczestniczyć w indukcji syntezy pozostałych białek CSP podczas szoku wywołanego niską temperaturą (Horn i in. 2007, Ermolenko i Makhatadze 2002).

Z kolei, w regulacji ekspresji genu *cspA* na poziomie translacji bierze udział 14-nukleotydowa sekwencja zwana „downstream-box” (DB), zlokalizowana 12 pz poniżej kodonu inicjacyjnego (Phadtare i Severinov 2010, Kaufman i Turkiewicz 2004, Etchegarar i Inouye 1999). Obecność motywu DB wykazano również w mRNA genów *cspB*, *cspG*, *rbfA* i *csdA* *E. coli*. Uważa się, że sekwencja ta zwiększa efektywność translacji poprzez interakcje z fragmentem cząsteczki 16S rRNA (1496-1483 nt), co ułatwia tworzenie się stabilnego kompleksu inicjacyjnego w fazie aklimatyzacji (Phadtare i Severinov 2010, Kaufman i Turkiewicz 2004, Etchegarar i Inouye 1999).

Innym elementem zaangażowanym w regulację translacji jest motyw „*upstream-box*” (UP) zlokalizowany w regionie 5'-UTR genów *cspA*, *cspB*, *cspG* i *cspI* *E. coli*, 11 nt powyżej sekwencji Shine–Dalgarno, który podobnie jak motyw DB, jest komplementarny do regionu 1035-1023 nt genu 16S rRNA *E. coli* (Ermolenko i Makhatadze 2002). Wykazano, że delecja kilku pz z regionu 5'-UTR (w pozycji 118-143 nt) zmniejsza efektywność translacji CspA *E. coli* w warunkach obniżonej temperatury. W oparciu o te dane zasugerowano, że sekwencja UP może pełnić rolę wzmacniacza translacji białek CPS (Kaufman i Turkiewicz 2004, Ermolenko i Makhatadze 2002).

W regulacji translacji mRNA białek szoku zimna biorą udział również cząsteczki niekodującego RNA, przykładem których jest 87-nt RNA DsrA występujący u *E. coli* (Ermolenko i Makhatadze 2002). W niskich temperaturach reguluje on translację dwóch globalnych regulatorów transkrypcyjnych, tj. czynnika σ polimerazy RNA – RpoS (ang. *RNA polymerase sigma factor*) oraz jego antagonisty białka H-NS, wiążąc się z ich mRNA. Skutkiem tych interakcji jest wzrost ilości RpoS w komórce oraz blokowanie translacji H-NS, który reguluje negatywnie ekspresję genu *cspA* *E. coli* (Tyczewska i Figlerowicz 2009, Horn i in. 2007, Ermolenko i Makhatadze 2002).

6. Podsumowanie

Podsumowując, białka CSP są syntetyzowane głównie w logarytmicznej fazie wzrostu bakterii, a następnie (w fazie stacjonarnej) dochodzi do zahamowania ich syntezy na poziomie transkrypcyjnym przez białko H-NS. Głównym mechanizmem indukcji syntezy CSP podczas szoku zimna jest stabilizacja ich własnego mRNA. Okres półtrwania mRNA białek CSP jest krótki w 37 °C, ale znacznie wzrasta w niskiej temperaturze. Ważnym elementem w tej adaptacji może być helikaza CsdA, która zapobiega degradacji cząsteczek mRNA dla CspA. Białka te mogą również stymulować własną translację oraz stabilność mRNA. Jednak mimo licznych badań mechanizm indukcji syntezy białek CSP w stresowych warunkach pozostaje nadal nie w pełni poznany (Ermolenko i Makhatadze 2002). Wśród tych białek najważniejsze znaczenie przypisuje się białkom CSP pełniącym rolę chaperonów RNA, które destabilizują drugorzędowe struktury w kwasach rybonukleinowych, co ułatwia transkrypcję i translację, umożliwiając tym samym wzrost mikroorganizmów w niskiej temperaturze. Obecne badania wstępnie wskazują, że prawidłowe funkcjonowanie tych białek jest ważne nie tylko w niskich temperaturach, ale również w warunkach fizjologicznych bakterii.

Jednakże mimo licznych badań, nadal istnieje wiele niewyjaśnionych aspektów dotyczących regulacji ekspresji genów kodujących białka CSP i ich funkcji w komórkach bakteryjnych. Wydaje się, że inicjacja translacji jest hamowana podczas szoku zimna, ale nadal nie wiadomo, czy jest to konsekwencja obniżenia temperatury czy bezpośrednia odpowiedź komórki. Do tej pory nie określono również wpływu białek CSP na translację różnych mRNA dla innych genów w zmiennych temperaturach. Znalezienie odpowiedzi na te pytania przyczynią się do lepszego zrozumienia fizjologii białek w warunkach szoku wywołanego niską temperaturą. Dodatkowo, badania mechanizmów adaptacyjnych mikroorganizmów do takiego stresu abiotycznego mogą stanowić ważne źródło informacji dotyczących zastosowań białek CSP oraz syntetyzujących je bakterii w rolnictwie, przemyśle i medycynie (Barria i in. 2013); (Ermolenko i Makhatadze 2002).

7. Literatura

- Bae W, Phadtare S, Severinov K, et al. (1999) Characterization of *Escherichia coli* *cspE*, whose product negatively regulates transcription of *cspA*, the gene for the major cold shock protein. *Mol. Microbiol.* 31(5): 1429-1441.
- Barria C, Malecki M, Arraiano CM (2013) Bacterial adaptation to cold. *Microbiology* 159: 2437-2443.
- Charollais J, Dreyfus M, Iost L (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* 32(9): 2751-2759.
- Dziugan P (2006) Adaptacja niskotemperaturowa mikroorganizmów. *Chłódnictwo* 11: 54-59.
- Ermolenko DN, Makhatadze GI (2002) Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1902-1913.

- Etchegaray JP, Inouye M (1999) Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274(15): 10079-10085.
- Graumann PL, Marahiel MA (1999) Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2): 203-209.
- Horn G, Hofweber R, Kremer W, et al. (2007) Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1457-1470.
- Jiang W, Hou Y, Inouye M (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272(1): 196-202.
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1987) Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169(5): 2092-2095.
- Kaufman A, Turkiewicz M (2004) Białka szoku zimna mikroorganizmów. *Postępy Biochemii* 50(1): 32-44.
- Phadtare S (2004) Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6: 125-136.
- Phadtare S, Alsina J, Inouye M (1999) Cold-shock responses and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 175-180.
- Phadtare S, Severinov K (2010) RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA* 16(6): 788-795.
- Thieringer HA, Jones PG, Inouye M (1998) Cold shock and adaptation. *BioEssays* 20: 49-57.
- Tyczewska A, Figlerowicz M (2009) Nowe oblicze „świata RNA”. *Nauka* 2: 93-108.
- VanBogelen RA, Neidhardt FC (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(15): 5589-5593.
- Xia B, Ke H, Jiang W et al. (2001) The Cold Box stem-loop proximal to the 5'-end of the *Escherichia coli* cspA gene stabilizes its mRNA at low temperature. *J. Biol. Chem.* 277(8): 6005-6011.
- Yamanaka K (1999) Cold shock response *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2): 193-202.

13. Wpływ niskiej temperatury na symbiotyczne interakcje pomiędzy roślinami bobowatymi a rizobiami

Effect of low temperature on symbiotic interactions between legumes and rhizobia

Marta Kozieł

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS

Kozieł Marta: martakozielbiot@gmail.com

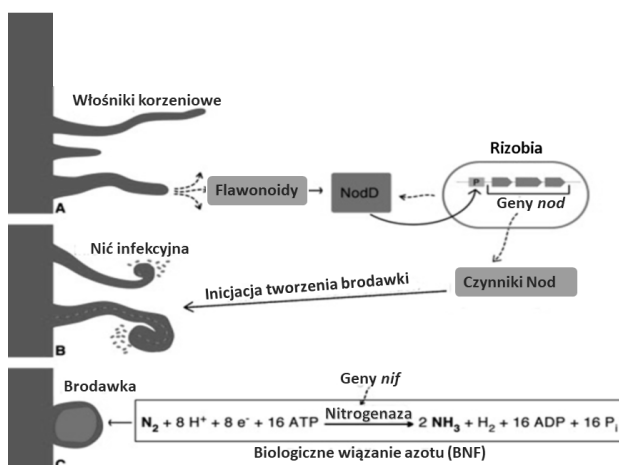
Słowa Kluczowe: białka szoku zimna, symbioza, lucerna, stres zimna, Rhizobiaceae

Streszczenie

W obrębie rodziny roślin bobowatych wyróżniamy liczne gatunki o istotnym znaczeniu gospodarczym. Stanowią one cenne źródło białka dla zwierząt i ludzi oraz mogą być stosowane do rekultywacji zanieczyszczonych gleb. Ich charakterystyczną cechą jest zdolność nawiązywania interakcji symbiotycznych z glebowymi, Gram-ujemnymi bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*, co umożliwia im pozyskiwanie niezbędnego do prawidłowego wzrostu i rozwoju azotu. Zachodzące pomiędzy makro- a mikrosymbiontem interakcje podlegają licznym, niekorzystnym zmianom wywołanym przez abiotyczne czynniki stresowe, przykładem których jest niska temperatura. Oddziałuje ona zarówno bezpośrednio na fizjologię obu partnerów symbiozy jak i poszczególne jej etapy, co prowadzi do zmniejszenia efektywności wiązania azotu i tym samym ograniczenia produktywności upraw rolnych. Jednym ze sposobów poprawy wydajności tych symbiotycznych interakcji zachodzących w niskich temperaturach jest zastosowanie w praktyce rolnej rizobiów odpornych na zimno. Wykazano, że inokulacja roślin bobowatych takimi bakteriami poprawia ich produktywność i przeżywalność w zimnych środowiskach. Z uwagi na globalne zmiany klimatu oraz ciągle rosnącą liczbę ludności świata potrzeba optymalizacji procesu biologicznego wiązania azotu poprzez selekcję i charakterystykę szczepów tolerujących niskie temperatury stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej nauki i rolnictwa. Odpowiednio dobrane do warunków środowiskowych rizobia umożliwią wytwarzanie bionawozów pozwalających nie tylko na uzyskanie większej wydajności plonów rolnych, ale również ograniczających chemizację rolnictwa.

1. Wstęp

Azot jest jednym z głównych składników odżywczych limitujących prawidłowy rozwój roślin i wydajność upraw rolnych. Rośliny bobowate (*Fabaceae*) pokrywają większość swojego zapotrzebowania na ten pierwiastek w sposób naturalny, nie wymagający stosowania syntetycznych nawozów chemicznych, wchodząc w symbiozę z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*. Symbiotyczne interakcje występujące pomiędzy tymi glebowymi Gram-ujemnymi mikroorganizmami, powszechnie zwanymi rizobiami, a roślinami bobowatymi umożliwiają wiązanie i redukcję azotu cząsteczkowego (ang. *biological nitrogen fixation*, BNF) do form łatwo dostępnych dla makrosymbionta. Symbioza jest wieloetapowym procesem, w którym na skutek skoordynowanej wymiany sygnałów molekularnych, m.in. bakteryjnych czynników Nod (ang. *Nod factor*, NF) oraz roślinnych flawonoidów dochodzi do chemotaksji i adhezji rizobiów do korzenia, tworzenia nici infekcyjnej i intensywnych podziałów komórek kory korzenia, co w rezultacie prowadzi do powstawania brodawek korzeniowych. W strukturach tych zachodzi redukcja azotu atmosferycznego do jonów amonowych w reakcji redukcji katalizowanej przez enzym nitrogenazę syntetyzowaną przez rizobia (Stasiak i in. 2016).



Rys.1. Etapy symbiozy rośliny bobowate – rizobia **A.** Wymiana sygnałów molekularnych pomiędzy partnerami symbiozy. **B.** Inicjacja tworzenia brodawki korzeniowej. **C.** Wiązanie i redukcja azotu atmosferycznego. Modyfikacja własna na podstawie (Stasiak i in. 2016; Laranjo i in. 2014).

Proces BNF stanowi tańszą i przyjazną dla środowiska metodę zapewniającą odpowiednią podaż azotu niezbędną do otrzymania wydajnych plonów roślin uprawnych i pastewnych, takich jak: ciecierzycę, fasolę czy koniczynę (Andrés i in. 2012). Szacuje się, że w wyniku BNF jest wiązane rocznie około 100–290 Tg N₂, a 85 Tg tego pierwiastka jest dostarczane do upraw rolnych w postaci nawozów azotowych (Stasiak i in. 2016). Przy czym rośliny wykorzystują mniej niż 50% azotu wprowadzanego do gleby w postaci syntetycznych nawozów chemicznych, a pozostała jego część ulega wymywaniu bądź nityfikacji i denityfikacji, co przyczynia się m.in. do wzrostu efektu cieplarnianego oraz zanieczyszczenia i eutrofizacji środowisk wodnych, powodując zmniejszenie różnorodności organizmów (Vance 2001).

Rośliny bobowate stanowią cenne źródło białka dla ludzi i zwierząt. Stosuje się je również do rekultywacji i ponownego zalesiania zanieczyszczonych gleb. Ich obecność odnotowano w większości ekosystemów ziemskich, począwszy od klimatu tropikalnego po arktyczny (Prévost i in. 1999). Toteż na efektywność tych oddziaływań ma wpływ szereg środowiskowych czynników abiotycznych, wśród których jednym z najważniejszych jest temperatura. Reguluje ona zarówno metabolizm mikrosymbionta jak i gospodarza roślinnego oraz poszczególne etapy zachodzącej pomiędzy nimi symbiozy. Zakres temperaturowy, w którym to obserwuje się optymalną wydajność symbiozy zależy głównie od danego szczepu bakteryjnego i gatunku makrosymbionta. Poniżej optymalnej dla BNF temperatury następuje spadek efektywności omawianych interakcji symbiotycznych, co prowadzi do obniżenia ilości dostępnego azotu, a tym samym zmniejszenia wydajności upraw rolnych (Lipsanen i Lindström 1986). Zwiększenie produktywności plonów można osiągnąć poprzez zastosowanie gatunków roślin i szczepów rizobiów cechujących się wysoką tolerancją na środowiskowe czynniki stresowe, np. niską temperaturę. Przykładowo, w chłodnym klimacie umiarkowanym kiełkowanie roślin bobowatych zachodzi, gdy temperatura gleby jest znacznie niższa niż optymalna temperatura wzrostu rizobiów i wiązania azotu cząsteczkowego. Wykazano, że nawiązanie efektywnej symbiozy w sezonie wegetacyjnym wcześniej niż zwykle ma to miejsce, podwaja ilość związanego N₂, co tym samym powoduje wzrost wydajności upraw roślin bobowatych (Prévost i in. 1999). Poszukiwanie szczepów odpornych na niskie temperatury polega na filogenetycznej i fenotypowej analizie porównawczej rizobiów zakazających określony gatunek roślin z rodziny *Fabaceae* pochodzących zarówno z klimatu umiarkowanego jak i arktycznego (Lipsanen i Lindström 1986). Psychrofilne rizobia wyizolowane z brodawek korzeniowych roślin bobowatych występujących w regionach arktycznych mogą stanowić rezerwuariusz genów warunkujących odporność na zimno, które to mogą ulegać transferowi do innych bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* specyficznych dla gospodarzy roślinnych o ważnym znaczeniu rolniczym (Prévost i in. 1999).

W niniejszej pracy omówiono wpływ stresu zimna na symbiozę roślin bobowatych z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae* oraz przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący rizobiów odpornych na zimno i korzyści wynikające z ich zastosowania w rolnictwie.

2. Wpływ niskiej temperatury na symbiotyczne interakcje bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* – roślina bobowata

Symbiotyczne interakcje występujące pomiędzy korzeniami roślin bobowatych a bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae* podlegają licznym, niekiedy niekorzystnym zmianom wywołanym przez abiotyczne czynniki środowiskowe, wśród których istotną rolę odgrywa niska temperatura (Andrés i in. 2012; Prévost i in. 1999).

Optymalna temperatura wzrostu dla większości rizobiów wynosi od 25°C do 30°C. Wyjątek stanowi *Ensifer meliloti* preferujący temperaturę około 35°C. W związku z tym ekspozycja tych mikroorganizmów na zimno może powodować niekorzystne zmiany zarówno w fizjologii samych bakterii jak i w zachodzącym z ich udziałem procesie BNF (Prévost i in. 1999, Alves i in. 2014). Na podstawie licznych badań mających na celu określenie wpływu niskiej temperatury na mikroorganizmy bakteryjne stwierdzono, że do najpowszechniejszych skutków wywołanych przez wyżej wspomniany czynnik należą: (i) utrata płynności cytoplazmatycznych błon komórkowych, a tym samym zaburzenie aktywności metabolicznej bakterii, (ii) powstawanie stabilnych, drugorzędowych struktur kwasów nukleinowych zmniejszających tempo replikacji DNA oraz transkrypcji i translacji białek, (iii) obniżenie aktywności enzymów bakteryjnych oraz (iv) tworzenie się kryształków lodów powodujących mechaniczne uszkodzenia komórek (Kaufman i Turkiewicz 2004). Niska temperatura oddziałuje również na wzrost i produktywność roślin wchodzących w symbiozę z rizobiami powodując głównie syntezę reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak: nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($OH^\bullet$), czy anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$). Obecność RFT w komórkach roślinnych prowadzi m.in. do dysfunkcji białek, uszkodzenia DNA i peroksydacji lipidów, co skutkuje zaburzeniem struktury błon komórkowych oraz powstaniem wysoce reaktywnego i powodującego wtórne uszkodzenia oksydacyjne dialdehydu malonowego (MDA) (Liu i in. 2019). Biorąc pod uwagę, iż ekspozycja na zimno zakłóca prawidłowe funkcjonowanie obu partnerów symbiozy, nie dziwi fakt, iż niskie temperatury mają wpływ również na poszczególne etapy procesu BNF wpływając m.in. na konkurencyjność rizobiów, brodawkowanie gospodarza roślinnego oraz aktywność nitrogenazy.

Wykazano znaczący wpływ niskiej temperatury strefy korzeniowej roślin na konkurencyjność dwóch odmian handlowych szczepów *E. meliloti* BALSAC i NRG-185. W 8°C aż 63% brodawek korzeniowych lucerny było zasiedlone przez oba badane szczepy. Natomiast wraz ze wzrostem temperatury z 8°C do 25°C w powstałych brodawkach zaczynał przeważać *E. meliloti* NRG-185 (zasiedlał on od 9% do 75% brodawek), podczas gdy ilość szczepu BALSAC utrzymywała się na względnie stałym poziomie 25% w zakresie od 8°C do 21°C (Prévost i in. 1999). Również w przypadku soi temperatura ryzosfery stanowi istotny czynnik kontrolujący konkurencyjność rizobiów i wydajność symbiozy. W badaniach oceniających zasiedlanie brodawek soi przez *Bradyrhizobium japonicum* wykazano, iż szczepy rzadko izolowane z zimnych środowisk (10°C) tworzyły najwięcej brodawek na korzeniach roślin występujących w glebach o temperaturze 30°C. Natomiast sytuacja była odwrotna w przypadku rizobiów występujących głównie w 10°C lub 15°C, które to formowały zdecydowanie mniejszą liczbę brodawek w 30°C (Weber i Miller 1972). Wyniki te potwierdziły, że stopień konkurencyjności rizobiów jest zależny od temperatury ryzosfery, co tym samym wskazuje, iż selekcja szczepów inokulujących rośliny bobowate powinna uwzględniać wpływ niskich temperatur na inicjację nodulacji (Prévost i in. 1999).

W badaniach określających wpływ zimna na wczesne etapy interakcji symbiotycznych zachodzących pomiędzy soją a *Bradyrhizobium japonicum* zaobserwowano stopniowe opóźnianie infekcji strefy korzeniowej przez bakterie w zakresie temperatur wynoszącym od 25°C do 17,5°C. Natomiast w temperaturach poniżej 17°C doszło do całkowitego zahamowania kolonizacji włóśników korzeniowych soi (Zhang i Smith 1999; Prévost i in. 2003). W przypadku roślin bobowatych nawiązywanie efektywnej symbiozy wymaga skoordynowanej wymiany szeregu sygnałów

molekularnych, w tym roślinnych flawonoidów indukujących ekspresję bakteryjnych genów *nod*, których produkty biorą udział w formowaniu w pełni funkcjonalnych brodawek. Wykazano, że występowanie niskich temperatur w strefie korzeniowej hamuje biosyntezę genisteiny, tj. izoflawonoidu będącego jednym z głównym składników ekstraktu korzeniowego soi, co tym samym uniemożliwia powstanie prawidłowych brodawek korzeniowych (Prévost i in. 1999; Andrés i in. 2012; Alexandre i Oliveira 2013). McKay i Djordjevic (1993) badając wytwarzanie NF przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* w niekorzystnych warunkach środowiskowych wykazali, że obniżenie temperatury z 28°C do 18°C powoduje redukcję ilości czynników Nod w szczepach wrażliwych na zimno, nawiązujących interakcje symbiotyczne z *Trifolium subterraneum*. Jak wykazano na przykładzie lucerny uprawianej w 8°C w konsekwencji niedoboru NF zmniejszeniu ulega liczba powstających brodawek korzeniowych (Prévost i in. 2003). Z kolei Roughley (1970) badając symbiotyczne interakcje pomiędzy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a *T. subterraneum* w różnych temperaturach (w zakresie od 7°C do 19°C) stwierdził, że niskie wartości tego czynnika abiotycznego wpływają również na strukturę brodawek oraz hamują różnicowanie rizobiów w zdolne do wiązania N₂ bakteroidy. Toteż wydaje się, że zdolność poszczególnych szczepów rizobiów do wytwarzania NF stanowi główny czynnik warunkujący tworzenie i zasiedlanie brodawek korzeniowych w niskich temperaturach (Prévost i in. 1999). Oprócz czynników Nod, istotne znaczenie w procesie BNF ma nitrogeza katalizująca redukcję azotu atmosferycznego do form łatwo dostępnych dla roślin. Aktywność tego enzymu ulega znacznemu zmniejszeniu podczas stresu zimna. Layzell i wsp. (1984) wykazali zwiększenie wartości (z 1,3 do 2,4) temperaturowego współczynnika reakcji (Q₁₀) katalizowanej przez nitrogezę w brodawkach korzeniowych soi wraz ze wzrostem temperatury z 15°C do 25°C. Przy czym sugeruje się, że aktywność enzymu zależy od geograficznego pochodzenia szczepów. Lipsanen i Lindstrom (1986) porównując wydajność symbiozy przeprowadzonej przez mikrosymbionta koniczyny czerwonej *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pochodzącego z różnych siedlisk biologicznych zlokalizowanych na obszarze Finlandii wykazali, że szczepy występujące na obszarach wysuniętych najdalej na północ cechowały się w temperaturze 5–10°C większą aktywnością nitrogenazy w porównaniu do rizobiów obecnych w południowych częściach tego kraju. Natomiast odwrotne wyniki zaobserwowano podczas inkubacji tych bakterii w cieplejszych warunkach klimatycznych (15–18°C). Dowody świadczące o istnieniu zależności pomiędzy geograficznym pochodzeniem bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* a aktywnością nitrogenazy i tym samym wydajnością procesu BNF przedstawił również Prévost wraz z współpracownikami. Wykazali oni, iż izolaty rizobiów pochodzące z obszarów arktycznych infekujących roślinę klimatu umiarkowanego *Onobrychis viciifolia* charakteryzują się wyższą aktywnością nitrogenazy w porównaniu do jej homologicznych mikrosymbiontów występujących w tych samych warunkach środowiskowych co gospodarz roślinny. Przy czym aktywność enzymu wykazywała zależność z szybkością wzrostu hodowli szczepów arktycznych w niskich temperaturach (Prévost i in. 1987). Silną korelację pomiędzy pochodzeniem poszczególnych szczepów bakteryjnych a ich efektywnością symbiotyczną, wykazał również Roughley (1970) obserwując, iż hamujący wpływ niskiej temperatury na różnicowanie bakteroidów w brodawkach *T. subterraneum* został zniesiony w wyniku jej inokulacji rizobiami wyizolowanymi z roślin występujących w zimnym klimacie. Tym samym sugeruje to, iż zastosowanie bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* cechujących się tolerancją wobec niskiej temperatury umożliwi podtrzymanie, bądź zwiększenie wydajności wiązania azotu atmosferycznego, a tym samym wzrostu roślin bobowatych w zimnych fazach ich okresu wegetacyjnego.

3. Mechanizmy adaptacji rizobiów do zimna

W wyniku ekspozycji bakterii na niskie temperatury dochodzi do zwiększenia sztywności błon komórkowych. W celu zniwelowania szkodliwych efektów tego zjawiska mikroorganizmy bakteryjne są zdolne do modyfikacji składu lipidowego membran m.in. poprzez zwiększenie ilości krótkołańcuchowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych (Alexandre i Oliveira 2013; Mishra i in. 2010; Kaufman i Turkiewicz 2004). Utrzymanie prawidłowego stopnia płynności membran komórkowych stanowi jeden z głównych mechanizmów adaptacyjnych bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* do zimnego środowiska, ze względu na obecność w tych błonach symbiotycznych

białek rizobiów warunkujących specyficzność symbiozy. Drouin i wsp. (2000) wykazali, że niska temperatura wpływa w podobny sposób na skład kwasów tłuszczowych błony komórkowej wszystkich badanych szczepów niezależnie od ich poziomu adaptacji na zimno. Ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych znacząco zwiększała się wraz ze spadkiem temperatury wzrostu rizobiów z 25°C do 5°C. Przy czym głównym kwasem obecnym w błonie komórek bakteryjnych poddanych działaniu zimna był kwas *cis*-wakcenowy.

Kolejnym mechanizmem umożliwiającym wzrost rizobiów w niskich temperaturach jest synteza białek szoku zimna (ang. *cold shock proteins*, CSP). Główna funkcja tych niskocząsteczkowych molekuł polega na wiązaniu kwasów nukleinowych i tym samym zapobieganiu tworzenia się ich stabilnych, drugorzędowych struktur uniemożliwiających replikację DNA oraz transkrypcję i translację białek (Mishra i in. 2010). CSP zostały dobrze scharakteryzowane przede wszystkim u *Escherichia coli*, natomiast białka te są słabo zbadane u rizobiów. Homolog genu *cspA* *E. coli* zidentyfikowano u *E. meliloti*, przy czym ekspresja tego genu, kodującego białko o masie 10,6 kDa, jest indukowana w wyniku obniżenia temperatury otoczenia (Alexandre i Oliveira 2013). Drouin i wsp. (2000) porównując rizobia wrażliwe (szczep referencyjny *R. leguminosarum* bv. *viciae* ATCC 10004 i komercyjnie dostępny *R. leguminosarum* bv. *viciae* 175P1) oraz wykazujące tolerancję na zimno (*R. leguminosarum* bv. *viciae* wyizolowane z *Lathyrus japonicus* i *Lathyrus pratensis*) zaobserwowali indukcję białek CSP we wszystkich badanych szczepach na skutek obniżenia temperatury z 25°C do 10°C, 5°C oraz 0°C. Przy czym liczba powstałych CSP w 0°C była wyższa u rizobiów odpornych na zimno, jednakże u wszystkich wykorzystanych w doświadczeniu szczepach stwierdzono obecność białka CSP o masie 6,1 kDa. Mikroorganizmy oprócz CSP wytwarzają również białka aklimatyzacji do zimna (ang. *cold acclimation proteins*, CAP), które ulegają ciągłej syntezie podczas długotrwałego wzrostu bakterii w niskich temperaturach i warunkują zachowanie prawidłowej aktywności metabolicznej komórki. Produkcję CAP obserwowano również u wszystkich rizobiów zdolnych do wzrostu w 5°C (Drouin i in. 2000).

W wyniku ekspozycji *Rhizobium* DDSS69 na zimno zmianie uległa aktywność takich enzymów jak dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa oraz dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa, odgrywających kluczową rolę w szlaku pentozofosforanowym. Prawdopodobnie umożliwiło to badanym szczepom zwiększenie tempa metabolizmu w celu szybszego niwelowania skutków szoku zimna (Mishra i in. 2010).

4. Znaczenie rizobiów tolerujących niskie temperatury w rolnictwie

Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących, że inokulacja roślin bobowatych bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae* wykazującymi adaptację do zimna poprawia ich produktywność i przeżywalność w niskich temperaturach, co ma istotne znaczenie zwłaszcza w przypadku upraw rolnych prowadzonych w klimacie umiarkowanym (Prévost i in. 2003; Prévost i in. 1999). Przykładem szczepów charakteryzujących się tolerancją na zimno są m.in. wcześniej wspomniany już *R. leguminosarum* bv. *viciae* infekujący groszek nadmorski (*L. japonicus*) i groszek żółty (*L. pratensis*) oraz rizobia wyizolowane z arktycznych gatunków roślin bobowatych, takich jak *Astragalus* i *Oxytropis*, które to na podstawie ich minimalnej oraz maksymalnej temperatury wzrostu wynoszącej, odpowiednio 0°C i 27-30°C, zaklasyfikowano do psychrotrofów. Wykazano, iż bakterie te są zdolne do brodawkowania dwóch roślin pastewnych występujących w klimacie umiarkowanym, tj. esparcety siewnej (*Onobrychis viciifolia*) oraz traganka pęcherzykowatego (*Astragalus cicer*) (Drouin i in. 2000; Prévost i in. 1999).

Interakcje symbiotyczne występujące pomiędzy wspomnianymi powyżej bakteriami a esparcetą siewną zostały wykorzystane jako model do określenia agronomicznego potencjału zastosowania rizobiów wykazujących tolerancję na zimno w celu poprawy wydajności procesu BNF przeprowadzanego przez rośliny klimatu umiarkowanego w niskich temperaturach. W 9°C szczepy arktyczne zasiedlały ponad 65% brodawek powstałych na korzeniach esparcety siewnej, podczas gdy w temperaturze 15°C sytuacja była odwrotna, tj. dominowały rizobia charakterystyczne dla klimatu umiarkowanego. Dodatkowo, rośliny inokulowane bakteriami z obszarów arktycznych charakteryzowały się większą aktywnością nitrogenazy i suchą masą pędów w porównaniu do makrosymbiontów infekowanych przez szczepy pochodzące z regionów umiarkowanie ciepłych

(Prévost i in. 1999). Oceniono również wydajność symbiotyczną rizobiów infekujących rośliny z rodzaju *Lathyrus*. Wykazano, iż komercyjnie dostępny szczep 175P1 w temperaturze 15–20°C charakteryzował się zwiększonym poziomem aktywności nitrogenazy i powodował wzrost ilości suchej masy pędów w porównaniu do wyizolowanego z *L. pratensis* arktycznego szczepu LP0610. Natomiast odmienne wyniki zaobserwowano w niższych wartościach temperatury (15–17°C), w których to LP0610 cechował się większą efektywnością symbiotyczną niż szczep 175P1 (Prévost i in. 1999). Dodatkowo sugeruje się, że zwiększona tolerancja roślin bobowatych na stres zimna może być regulowana przez symbiotyczne interakcje zachodzące pomiędzy nimi a bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*. Przykładowo, w rezultacie infekcji włóśników korzeniowych lucerny szczepami *E. meliloti* zaobserwowano: (i) akumulację substancji osmotycznie czynnych, takich jak prolina, które chronią roślinę przed odwodnieniem i usuwają wolne rodniki, (ii) wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, tj. dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy oraz (iii) zwiększenie ekspresji roślinnych genów takich jak: *CBF2* (czynn timeranskrypcyjny związany z tolerancją roślin na niskie temperatury), *CorF* (kodujący syntazę galaktinolu), *Cas15a* (produktem genu jest białko należące do rodziny dehydryn syntetyzowanych w odpowiedzi na stres suszy, bądź zimna). Procesy te przyczyniały się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego, a tym samym do większej przeżywalności roślin w zimnym środowisku. Przy czym sugeruje się, że wzrost tolerancji makrosymbionta na niskie temperatury wynika ze zdolności rizobiów do zwiększania odporności systemowej swoich gospodarzy roślinnych poprzez indukcję genów o funkcjach obronnych w różnych gatunkach roślin bobowatych, takich jak: *Arachis hypogaea* czy *Stylosanthes guianensis* (Liu i in. 2019).

Przedstawione przykłady udowadniają, że istnieje możliwość zwiększenia efektywności interakcji symbiotycznych (w tym konkurencyjności szczepów, nodulacji i wiązania azotu atmosferycznego) w niskich temperaturach poprzez selekcję rizobiów zdolnych do adaptacji do panujących w danym ekosystemie warunków klimatycznych. Ta poprawa właściwości symbiotycznych znajduje odzwierciedlenie w rozwoju roślin strączkowych. Ilość suchej masy lucerny uprawianej w warunkach polowych została zwiększona o około 23% w wyniku jej inokulacji szczepem klimatu umiarkowanego *E. meliloti* NRG-34 wybranym na podstawie zależności pomiędzy tempem wzrostu, konkurencyjnością, zdolnością brodawkowania gospodarza roślinnego i wydajnością określoną w temperaturze 12°C w porównaniu do komercyjnie dostępnego szczepu *E. meliloti* NRG-185 (Prévost i in. 1999). Także badania przeprowadzone z udziałem arktycznych mikrosymbiontów *Astragalus* oraz *Oxytropis* wykazały zwiększenie o 30% wzrostu roślin bobowatych występujących w klimacie umiarkowanym (Prévost i in. 1999).

5. Podsumowanie

Biorąc pod uwagę globalne zmiany klimatu oraz ciągle rosnącą liczbę ludności świata, potrzeba optymalizacji procesu BNF stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnego rolnictwa. Niska temperatura jest czynn timeraznacznie ograniczającym wydajność upraw rolnych, natomiast rizobia są ważnym źródłem azotu, które mogą pomóc w zwiększeniu plonów roślin bobowatych, zwłaszcza w niekorzystnych warunkach środowiskowych występujących np. w początkowym okresie wegetacyjnym klimatu umiarkowanego (Alexandre i Oliveira 2013). Największe zwiększenie efektywności interakcji symbiotycznych można uzyskać w sytuacji, gdy zarówno mikro- jak i makrosymbiont wykazują adaptację do niskich temperatur.

Jak sugerują przytoczone badania, wytwarzanie bionawozów zawierających odpowiednio dobrane do warunków środowiskowych rizobia pozwoli nie tylko na uzyskanie większej produktywności plonów rolnych, ale również przyczyni się do ograniczenia chemizacji rolnictwa (Andrés i in. 2012; Mishra i in. 2010). Jednakże nadal pozostaje wiele niewyjaśnionych kwestii związanych z mechanizmami tolerancji tych szczepów na zimno oraz ich wpływem na poszczególne etapy symbiozy. Dalsze badania powinny być ukierunkowane przede wszystkim, na: (i) określenie molekularnych podstaw większej konkurencyjności rizobiów tolerujących niskie temperatury, (ii) charakterystykę funkcji i struktury białek CSP i CAP syntetyzowanych przez bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* klimatu umiarkowanego i polarnego oraz (iii) wyjaśnienie mechanizmów warunkujących prawidłową aktywność nitrogenazy w powstających w zimnym środowisku brodawkach, formowanych przez rizobia zaadaptowane do niskich temperatur (Prévost i in. 1999).

6. Literatura

- Alexandre A, Oliveira S (2013) Response to temperature stress in rhizobia. *Critical Reviews in Microbiology* 39(3): 219–228.
- Alves LMC, de Souza JAM, Varani AM, i in. (2014) The Family Rhizobiaceae. W: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (red) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Andrés JA, Rovera M, Guíñazú LB i in. (2012) Interactions Between Legumes and Rhizobia Under Stress Conditions. W: Maheshwari D. (red) *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Drouin P, Prévost D (2000) Physiological adaptation to low temperatures of strains *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 32(2): 111-120.
- Kaufman A, Turkiewicz M (2004) Białka szoku zimna mikroorganizmów. *Postępy Biochemii* 50(1): 32-44.
- Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* 169(1): 2-17.
- Layzell DB, Rochman P, Canvin DT (1984) Low root temperatures and nitrogenase activity in soybean. *Canadian Journal of Botany* 62(5): 965-971.
- Lipsanen P, Lindstrom K (1986) Adaptation of red clover rhizobia to low temperatures. *Plant and Soil* 92: 55-62.
- Liu, Y, Geng, J, Sha, X, et al. (2019). Effect of rhizobium symbiosis on low-temperature tolerance and antioxidant response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 1-13.
- McKay IA, Djordjevic MA (1993) Production of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Applied and Environmental Microbiology* 59(10): 3385-3392.
- Mishra PK, Joshi P, Bisht S.C, i in. (2010) Cold-Tolerant Agriculturally Important Microorganisms. In: Maheshwari D. (red) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Prévost D, Antoun H, Bordeleau LM (1987) Effects of low temperatures on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 205-210.
- Prévost D, Drouin P, Antoun H (1999) The potential use of cold-adapted rhizobia to improve symbiotic nitrogen fixation in legumes cultivated in temperate regions. W: Margesin R., Schinner F. (red) *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Prévost D, Drouin P, Laberge S i in. (2003) Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Canadian Journal of Botany* 81(12): 1153-1161.
- Roughley RJ (1970) The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Annals of Botany* 136: 631-646.
- Stasiak G, Mazur A, Koper P, i in. (2016) Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii* 55(3): 289-299.
- Vance CP (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant. Physiol.* 127(2): 390-397.
- Weber, DF, Miller VL (1972). Effect of Soil Temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. *Agonomy Journal* 64(6):796-798.
- Zhang F, Smith DL (1999) Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Physiology and Symbiotic Dinitrogen Fixation. W: Smith D.L., Hamel C. (red) *Crop Yield*. Springer, Berlin, Heidelberg.

14. Wybrane rodzaje śmierci komórki

Selected types of cell death

Aleksandra Maciejczyk⁽¹⁾, Klaudia Zajac⁽²⁾, Adrian Zajac⁽¹⁾, Magda Madoń⁽³⁾

⁽¹⁾ Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽²⁾ Studenckie Koło Naukowe Biochemików, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽³⁾ Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil

Aleksandra Maciejczyk: olamaciejczyk77@gmail.com

Słowa kluczowe: apoptoza, nekroza, autofagia

Streszczenie

Zarówno śmierć komórkowa jak i proliferacja komórek są w pełni fizjologicznymi procesami zachodzącymi w każdym żywym organizmie. Utrzymanie równowagi pomiędzy tymi procesami jest niezmiernie ważne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenie szeregu mechanizmów homeostazy leży u podłoża wielu chorób, w tym nowotworowych. Najczęściej występującymi typami śmierci komórkowej są apoptoza, autofagia oraz nekroza. Dlatego też, zgłębienie mechanizmów tych procesów może stanowić podstawę lepszego poznania podłoża chorób oraz skonstruowanie nowoczesnych terapii celowanych.

1. Wstęp

Liczba komórek w organizmie człowieka nie jest stała. Ulega ona ciągłym zmianom w wyniku nieustannie zachodzącej proliferacji oraz śmierci komórkowej. Fizjologiczna równowaga pomiędzy tymi procesami pozwala zachować ważną dla organizmu homeostazę. Do fizjologicznych procesów śmierci komórkowej możemy zaliczyć zaprogramowaną śmierć komórkową, która jest naturalnym procesem usuwania uszkodzonych komórek. Jednakże, w szczególnych warunkach może dojść do martwiczej śmierci, która jest zjawiskiem patologicznym i prowadzi do rozwoju wielu różnych schorzeń, w tym również chorób nowotworowych.

Programowana śmierć komórki (z ang. programmed cell death, PCD) to wieloetapowy, genetycznie zaprogramowany proces pozwalający na eliminowanie nieprawidłowych komórek poprzez destrukcję jej składników. Choć proces ten przez wiele lat pozostawał tajemnicą, dziś już wiadomo, iż jest to rodzaj samobójczej śmierci przynoszącej korzyści dla reszty prawidłowych komórek, nie zaburzając ich funkcjonowania. Głównym celem PCD jest utrzymanie równowagi wewnętrznej organizmu – homeostazy. Programowana śmierć występuje zarówno w organizmach wielokomórkowych jak i jednokomórkowych. Programowana śmierć komórkowa zachodzi podczas całego procesu ontogenezy, rozpoczynając się już w okresie rozwoju płodowego. Odgrywa ważną rolę w adaptacji do stale ewoluującego środowiska (Godlewski i in. 2016; Paduch i in. 2015).

PCD jest inicjowana przez wiele czynników zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych. Kluczowym aspektem jest siła działania bodźca, wywołującego w komórce odpowiedni rodzaj śmierci. Możemy wyróżnić wiele typów PCD, jednak najlepiej scharakteryzowanymi są apoptoza oraz autofagia.

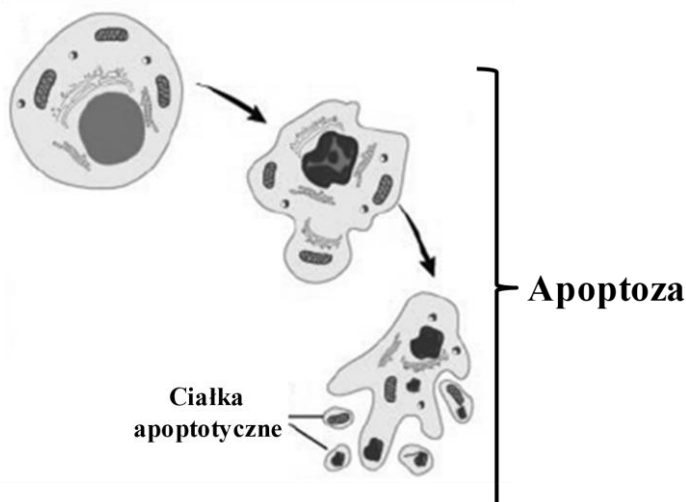
Najczęściej obserwowanym z kolei rodzajem śmierci niezależnej od komórki jest nekroza. Jest ona często procesem przypadkowym, patologicznym, doprowadzającym do martwicy dużych obszarów komórek, tkanek, a nawet całych narządów. Może ona prowadzić do wystąpienia oraz rozwoju różnego rodzaju schorzeń np. miejscowego ostrego stanu zapalnego, czy chorób nowotworowych (Paduch i in. 2015).

2. Apoptoza

Apoptoza (z greckiego *apóptsis* – proces opadania, więdnienia liści) to najczęściej występujący i najlepiej scharakteryzowany obecnie typ programowanej śmierci komórkowej. Jest powszechnie obserwowany podczas wielu mechanizmów rozwoju i różnicowania się komórek. Jest to proces wieloetapowy, aktywny, ściśle kontrolowany i zależny od genów komórki. Pozwala na wyeliminowanie zmienionych czy uszkodzonych komórek bez naruszania sąsiadujących, prawidłowo funkcjonujących komórek (Stępień i in. 2007; Sulejczak 2000).

Komórka umierająca na drodze apoptozy wykazuje charakterystyczne cechy morfologiczne. Komórka obkurcza się, co jest związane z utratą wewnątrzkomórkowej wody. Chromatyna jądrowa ulega kondensacji a materiał genetyczny zostaje pofragmentowany na odcinki o długości 180 – 200 pz. Następuje fragmentacja cytoplazmy, a organelle rozdzielają się na tak zwane ciała apoptotyczne (Rys. 1.). Ciągłość błony komórkowej pozostaje nienaruszona, a zawartość komórki nie wydostaje się na zewnątrz. Nie tworzy się wówczas stan zapalny, zaś pozostałości po rozpadzie komórki mogą być usuwane przez napływające makrofagi na drodze fagocytozy (Elmore 2007; Godlewski i in. 2016).

Komórka normalna



Rys. 1. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórce podczas apoptozy (Saikumar et al. 1999).

W przebiegu apoptozy można wyróżnić trzy podstawowe etapy: indukcyjny, wykonawczy oraz końcowy etap degradacji. Proces śmierci rozpoczyna się już po zadziałaniu czynnika indukującego, który może być zarówno czynnikiem zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowym. Wyróżnia się dwie główne drogi przekazywania sygnału wprowadzającego komórkę na drogę apoptozy: szlak zewnętrzny (receptorowy, z ang. *extrinsic*) oraz wewnątrzpochodny (mitochondrialny, z ang. *intrinsic*). Pierwszy z nich związany jest bezpośrednio z receptorami śmierci zlokalizowanymi w błonie komórkowej. Drugi powiązany jest z czynnikami AIF (z ang. apoptosis inducing factor), które zostają uwolnione z mitochondrium do cytoplazmy (Elmore 2007; Rudnicka 2011).

Początkowy etap indukcyjny związany jest bezpośrednio z aktywacją kaspaz, enzymów z grupy proteaz cysteinowych. Enzymy te są syntetyzowane w postaci proenzymów, więc do ich działania niezbędny jest proces aktywacji. Aktywacja kaspaz przebiega kaskadowo. Szlak receptorowy prowadzi do aktywacji kaspazy 8, zaś w szlaku mitochondrialnym w końcowym etapie aktywowana jest prokaspaza 9 do kaspazy 9. Faza wykonawcza związana jest z aktywacją kaspaz efektorowych (aktywowanie kaspazy 3, która odpowiedzialna jest za proteolizę białek niezbędnych do funkcjonowania komórki) (Elmore 2007; Rudnicka 2011).

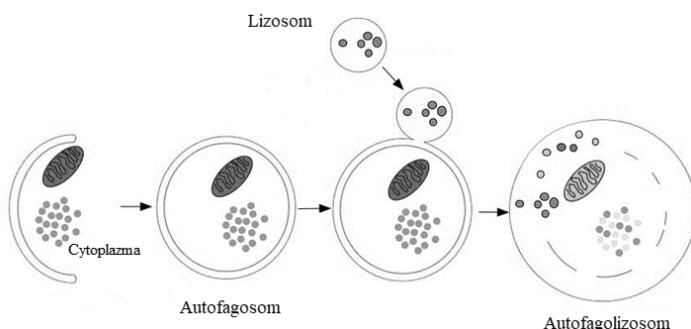
Proces apoptozy jest ściśle regulowany przez wiele białek zarówno proapoptotycznych jak i antyapoptotycznych. Szczególnie przez rodzinę białek regulatorowych – Bcl-2 (z ang. B-cell lymphoma 2), które uczestniczą w uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów. Wśród nich można wyróżnić białka proapoptotyczne : Bax (z ang. bcl-2-like protein X), Bak (z ang. Bcl-2 antagonist/killer protein), Bad (z ang. Bcl-2 associated agonist of cel death) oraz antyapoptotyczne : Bcl-2, Bcl-xL (z ang. B-cell lymphoma-extra large) czy Mcl-1 (induced myeloid leukemia cel diferentiation protein) (Czabotar et al. 2014).

3. Autofagia

Autofagia z języka greckiego oznacza *autós*-samo, *phagos*- zjadanie i odnosi się do konserwatywnego procesu polegającego na wewnątrzkomórkowej degradacji uszkodzonych organelli, składników cytoplazmy, a w szczególności białek o długim okresie półtrwania.

Możemy wyróżnić trzy podstawowe postacie autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych. Klasyfikacji tej dokonano na podstawie sposobu w jaki substrat dostarczany jest do lizosomów (Polewska 2012; Rudnicka i in. 2011).

Makroautofagia jest najczęściej występującą postacią autofagii. Charakteryzuje się wyodrębnieniem z siateczki śródplazmatycznej lub aparatu Golgiego fagofora. Otacza on wybrany fragment cytoplazmy lub organellum przeznaczonego do strawienia i przekształca się w autofagosom - strukturę podwójnie obłonioną, która ulega fuzji z lizosomem tworząc autofagolizosom. W nim degradacji ulegają organella, kompleksy białkowe, białkowo-lipidowe z użyciem enzymów hydrolitycznych obecnych w lizosomach. Zwyczajowo makroautofagię określa się terminem „autofagii” (Rys. 2.) (Borek i in. 2015; Rudnicka i in. 2011).



Rys. 2. Schemat przebiegu autofagii (<https://bhavanajagat.com/2016/12/09/life-and-death-knowledge-in-action/life-and-death-knowledge-in-action-cell-compartments/>)

Mikroautofagia jest najmniej poznaną postacią autofagii. Podczas tego procesu małe organella, fragmenty jądra komórkowego czy cytoplazmy z zawartymi w niej białkami zostają otoczone przez błonę lizosomalną i w wyniku endocytozy wnikają do wnętrza lizosomów gdzie ulegają trawieniu (Borek i in. 2015; Rudnicka i in. 2011).

Podczas autofagii zależnej od białek opiekuńczych- chaperonów (z ang. *chaperone mediatel autophagy*, CMA) trawieniu ulegają znajdujące się w cytoplazmie wybrane białka i peptydy. Dzięki obecności odpowiednich receptorów na lizosomach transportowane są one do ich wnętrza. Charakterystyczna jest obecność odpowiedniego fragmentu sygnałowego w sekwencji aminokwasowej białka substratowego rozpoznawanego przez chaperon. Receptor wiąże kompleks chaperon-substrat, a drugie białko opiekuńcze obecne w lizosomie odpowiada za translokację tego substratu (Borek i in. 2015; Rudnicka i in. 2011).

Autofagia ma na celu utrzymanie homeostazy w komórce, poprzez zachowanie równowagi między degradowanymi składnikami a ich wewnątrzkomórkową syntezą. Zwraca się uwagę przede wszystkim na to, że autofagia jest procesem o dwojakim charakterze. Z jednej strony pozwala

przetrwąć ciężkie warunki środowiska, jest procesem adaptacyjnym do warunków stresowych i umożliwia w ten sposób dostarczenie potrzebnych substancji odżywczych do utrzymania niezbędnych procesów życiowych. Bierze udział w takich procesach jak: dojrzewanie czerwonych krwinek, wewnątrzkomórkową biogenezę surfaktantu na powierzchni pneumocytów II, czy biosyntezę neuromelaniny w dopaminergicznych neuronach (Lamparska- Przybysz i in. 2005).

Z drugiej strony autofagia jest mechanizmem śmierci komórki, wówczas określana jest programowaną śmiercią komórki typu II. Może także pełnić funkcję ochronną organizmu przed patogenami. Angażuje się również w eliminację uszkodzonych bądź nieprawidłowo funkcjonujących organelli. Zakłócenia w procesie autofagii mogą prowadzić do rozwoju chorób immunologicznych, miopatii lub chorób neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinson, choroba Alzheimera, płasawica Huntingtona) (Lamparska- Przybysz i in. 2005; Mariño i López-Otín 2004; Polewska 2012).

W przeciwieństwie do apoptozy, autofagia jest procesem niezależnym od kaspaz. Chromatyna nie ulega kondensacji, ale następuje wakuolizacja cytoplazmy. Podobnie jak w apoptozie organella lub cała komórka ulega degradacji bez uwolnienia zawartości do środowiska, tak więc również nie wywołuje reakcji zapalnej (Lamparska- Przybysz i in. 2005; Polewska 2012).

W komórkach nowotworowych może odgrywać dwojaką rolę: jako supresor transformacji nowotworowej, szczególnie na wczesnej fazie inicjacji, a z drugiej strony rolę onkogenną poprzez stymulację wzrostu komórek i umożliwienie przeżywalności w niekorzystnych warunkach. Rola tego procesu może zmieniać się w zależności od stadium rozwoju choroby i rodzaju nowotworu (Lisiak i in. 2014).

Zahamowanie autofagii może wpłynąć na wzmocnienie aktywności stosowanych leków przeciwnowotworowych w indukowanej chemioterapii aktywacji szlaków sygnałowych autofagii. Natomiast promowanie autofagii może wzbudzać eliminację komórek nowotworowych, a tym samym ograniczyć wielkość guza. Tak więc obie strategie mają duże znaczenie w leczeniu chorób nowotworowych (Polewska 2012; Lisiak i in. 2014).

Do czynników indukujących autofagię należą między innymi: deficyt składników odżywczych, hormony, cytokiny, niedotlenienie, uszkodzenie materiału genetycznego, aktywacja onkogenów. Niezależnie od rodzaju czynnika indukującego możemy wyróżnić fazy takie jak: powstawanie autofagosomu (indukcja, enukleacja, elongacja), fuzja autofagosomu z lizosomom (dojrzewanie) oraz degradacja (trawienie) (Polewska 2012).

4. Nekroza

Nekroza to rodzaj śmierci martwiczej, biernej i niekontrolowanej przez komórkę. Proces ten indukowany jest przez czynniki fizyczne, biologiczne oraz mechaniczne, które uszkadzają organelle komórkowe. Nekrozę od pozostałych typów śmierci komórki (apoptozy czy autofagii) odróżnia to, iż jest ona prawie zawsze związana z procesem patologicznym. Martwica nie posiada cech autofagii czy apoptozy, ponieważ dotyczy całych grup komórek, tkanek, a nawet narządów (Adigu i Murray 2019).

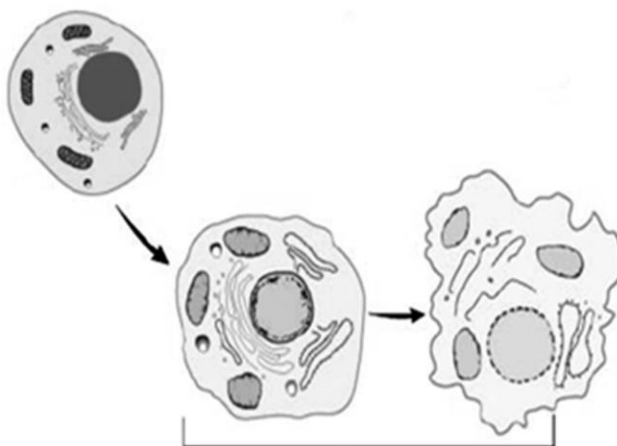
Prawdopodobną przyczyną śmierci martwiczej jest utrata równowagi osmotycznej w komórce, której metabolizm zostaje zahamowany, a tym samym zaburzona jest równowaga osmotyczna i dochodzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej. Skutkiem tego procesu jest spadek poziomu ATP, a także napływ jonów i wody do wnętrza komórki. Komórka wraz z organellami pęcznieje, a elementy strukturalne trawione są przez enzymy uwolnione z lizosomów. Konsekwencją tych procesów jest całkowity rozpad komórki (Rys. 3.), przez co materiał znajdujący się wewnątrz zostaje w sposób niekontrolowany uwalniany do środowiska pozakomórkowego, a to z kolei prowadzi do powstawania stanów zapalnych w obrębie tkanki (Paduch i in. 2015). Te same czynniki uszkadzające mogą wywoływać zarówno nekrozę jak i apoptozę. Jednak to, czy komórka wejdzie w fazę apoptozy czy ulegnie natychmiastowej śmierci martwiczej zależy m.in. od czasu ekspozycji na dany bodziec, jego siły i rodzaju komórki (Adigu i Murray 2019).

Obecnie wiadomo, że martwica nie zawsze jest losowym i przypadkowym procesem patologicznej śmierci komórki. Wraz z odkryciem kluczowych mediatorów nekrozy - kinazy RIP3 (z ang. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3), polimerazy poli-ADP-rybozy, zauważono, że istnieją przypadki zaprogramowanej genetycznie nekrozy (nekroptoza). Jednym

z mechanizmów nekroptozy jest odpowiedź na połączenie się receptora TNFR1 (z ang. tumor necrosis factor receptor 1) z ligandem. W fizjologicznych warunkach powstaje trimer, do którego przyłączają się m.in. białka TRADD (z ang. tumor necrosis factor receptore type 1-associated DEATH domain protein). Następnie dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), dzięki któremu komórka przystosowuje się do czynników stresowych. Ważną rolę odgrywa tutaj kaspaza 8, która może wprowadzić komórkę na szlak apoptozy, zaś jej unieczynnienie powoduje rozpoczęcie programowanej nekrozy (Giżycka i in.2015; Ouyang et al. 2012).

Coraz częściej mówi się, że programowana nekroza ma znaczący wpływ na przebieg wielu chorób, w tym także nowotworów. Do badań nad nekroptozą wykorzystuje się komórki charakteryzujące się niedoborem proapoptotycznych genów Bcl-2, Bax i Bak. Gdy takie komórki poddane zostaną chemioterapii, natychmiast pojawiają się zaburzenia metabolizmu, które powodują wyczerpywanie się NAD⁺ i ATP. Kluczową rolę odgrywa tutaj polimeraza PARP (z ang. poly (ADP-ribose) polymerase). Jej aktywacja w wyniku uszkodzenia DNA, powoduje wyczerpywanie się NAD⁺ (kofaktora procesu glikolizy tlenowej), a w konsekwencji przejściowe zahamowanie glikolizy. W ten sposób powstałe zaburzenie homeostazy prowadzi w konsekwencji do śmierci w wyniku nekrozy (Ouyang et al. 2012).

Komórka normalna



Nekroza

Rys. 3. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórce podczas nekrozy (Saikumar et al. 1999).

5. Podsumowanie

Rodzaj śmierci komórkowej odgrywa fundamentalną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Zaburzenia w regulacji tego procesu prowadzą do rozwoju wielu schorzeń. Zbyt wysoki poziom komórek apoptotycznych jest często obserwowany w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych. Natomiast zahamowanie tego procesu jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych, które ulegają niekontrolowanej proliferacji i nie reagują na sygnały wprowadzające je na drogę śmierci. Komórki nowotworowe opracowały wiele strategii unikania zaprogramowanej śmierci. Dodatkowo, nekroza jako czynnik prozapalny, może również indukować lub wzmacniać intensywność niektórych schorzeń. Dlatego też dokładne poznanie molekularnych mechanizmów śmierci komórkowej pozwoliłoby na stworzenie skuteczniejszych leków np. chemioterapeutyków, co mogłoby być ogromnym krokiem w kierunku zmniejszenia liczby zachorowań na różne rodzaje nowotworów.

Zaprogramowana śmierć komórkowa jest bardzo ciekawym aspektem funkcjonowania komórek. Najnowsze badania pokazują jak niezwykle dynamicznym i wysoce zmiennym procesem

jest PCD. Ciekawostką jest również umiejętność „przełączania” pomiędzy jednym rodzajem śmierci a drugim. Stąd coraz więcej badań związanych z dokładniejszą i obszerniejszą klasyfikacją typów programowanej śmierci.

6. Literatura

- Adigun R, Murray J (2019) Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). StatPearls Publishing LLC.
- Borek S, Ruta-Piosik M, Paluch E i in. (2015) Selektywne rodzaje autofagii, *Postępy biologii komórki*, 42(3): 505- 538.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15:49–63.
- Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicology Pathology* 35(4): 495–516.
- Giżycka A, Kopiński P, Chorostowska-Wynimko J (2015) Zaprogramowana martwica i nekroptoza – mechanizmy molekularne. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej*, 69: 1353-1363.
- Godlewski M, Kobylińska A (2016) Programowana śmierć komórek – strategia utrzymania komórkowej homeostazy organizmu, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 70: 1229-1244.
- Lamparska-Przybysz M, Motyl T (2005) Autofagia - narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej?, *Postępy biologii komórki*, 32(1): 13-22.
- Lisiak N, Totoń E, Rybczyńska M (2014) Autofagia, nowe perspektywy w terapii przeciwnowotworowej, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 68: 925-935.
- Mariño G, López-Otín C (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology, *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 1439–1454.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation*, 45(6):487-98.
- Paduch R, Klatka M, Klatka J (2015) Rodzaje śmierci komórki, *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(4): 411–418.
- Polewska J (2012) Autofagia- mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 66: 921-936.
- Rudnicka K, Szczęsna E, Miszczyk E i in. (2011) Apoptoza i autofagia - mechanizmy i metody detekcji, *Postępy Biologii Komórki*, 38(2): 247-265.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V et al. (1999) Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease, *The American Journal of Medicine*, 107(5): 489-506.
- Sulejczak D (2000) Apoptoza i metody jej identyfikacji, *Postępy Biologii Komórki*, 27(4): 527-568.
- Stępień A, Izdebska M, Grzanka A (2007) Rodzaje śmierci komórki, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 61: 420-428.
- <https://bhavanajagat.com/2016/12/09/life-and-death-knowledge-in-action/life-and-death-knowledge-in-action-cell-compartments/>

15. Apoptoza – charakterystyka procesu

Apoptosis – characteristic of the process

Aleksandra Maciejczyk⁽¹⁾, Klaudia Zajac⁽²⁾, Magda Madoń⁽³⁾, Adrian Zajac⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽²⁾ Studenckie Koło Naukowe Biochemików, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽³⁾ Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil

Aleksandra Maciejczyk: olamaciejczyk77@gmail.com

Słowa kluczowe: apoptoza, programowana śmierć komórki, kaspazy

Streszczenie

W każdym żywym organizmie zachodzą naturalne procesy fizjologiczne takie jak wzrost, namnażanie czy śmierć komórkowa. Umożliwia to utrzymanie homeostazy poprzez zachowanie odpowiedniej ilości komórek zarówno prawidłowych jak i zmutowanych. Programowana śmierć komórki (PCD, ang. programmed cell death) to rodzaj samobójczej wykorzystywanej przez organizm w celu utrzymania równowagi proliferacyjnej. Najczęściej występującym i obecnie najlepiej poznanym rodzajem PCD jest apoptoza. Istnieje szereg czynników kierujących komórkę na drogę tego procesu, zaś jego indukcja zachodzi na kilka sposobów w zależności od szlaku przekazywania sygnału.

1. Wstęp

Apoptoza z języka greckiego *apoptosis* dosłownie oznacza „opadanie” i po raz pierwszy opisano ją w odniesieniu do opadania liści z drzew jesienią. Ta analogia podkreśla, że śmierć komórki jest integralną i niezbędną częścią cyku życia organizmów (Marek 2013; Wong 2011). Jako pierwsi określenia tego użyli w 1972 roku Kerr, Wyllie oraz Currie. Apoptoza nazywana jest również programowaną śmiercią komórki typu 1 (Gewies 2003).

Jest procesem w pełni aktywnym, podlegającym ścisłej kontroli komórkowej. Odgrywa ważną rolę w rozwoju organizmów oraz w regulacji i utrzymaniu prawidłowej ilości komórek w warunkach fizjologicznych i patologicznych (Marek 2013). Jej celem jest usuwanie niepotrzebnych, starych i uszkodzonych komórek, a także tych występujących w nadmiarze. Jest dobrze zdefiniowaną i prawdopodobnie najczęstszą formą programowanej śmierci komórki. Stanowi ważny element prawidłowego rozwoju organizmu i utrzymania równowagi wewnętrznej. Zaburzenia procesu apoptozy mogą doprowadzić do zmniejszenia odporności organizmu, rozwoju chorób autoimmunologicznych czy nowotworów (Horodyjewska i in. 2005; Marek 2013).

1.1 Czynniki wywołujące apoptozę

Występuje wiele czynników, które kierują komórkę na drogę apoptozy. Mogą być to między innymi związki uszkodzające materiał genetyczny lub zaburzające cykl podziału komórki, szok termiczny, stres oksydacyjny, aktywacja określonych receptorów (Gewies 2003). Istnieje kilka możliwości ich podziału, jednym z nich jest zgrupowanie na fizyczne, chemiczne oraz biologiczne.

Do czynników inicjujących zaprogramowaną śmierć komórki należą:

- **czynniki fizyczne:**
 - promieniowanie ultrafioletowe
 - promieniowanie γ
 - obecność wolnych rodników
- **czynniki chemiczne:**
 - aplikowane chemioterapeutyki stosowane w leczeniu nowotworów (np. Etoposyd,

- Melfalan, Chlorambucyl)
- związki takie jak: metanol, azydek sodu, cyjanki, akroleina, rapamycyna, aktynomycyna D, N-acetylosfingozyna
- **czynniki biologiczne:**
 - infekcje wirusowe (np. wirus HIV, wirus HTLV, wirus SV - 40),
 - obecność wybranych bakterii (np. *Helicobacter pylori*)
 - niedobór czynników wzrostu (np. IL-2, IL-6, które prowadzą do zatrzymania podziałów)
 - uszkodzenie DNA
 - zaburzenia gospodarki jonowej (np. wzrost stężenia jonów Ca^{2+})
 - niedobór hormonów (np. zmiany stężenia hormonów steroidowych)
 - wzmożona aktywność czynnika martwicy nowotworów (TNF, ang. tumor necrosis factor)
 - wzmożona aktywacja onkogenów
 - inaktywacja genów supresorowych

Czynniki indukujące apoptozę są często analogiczne jak w przypadku innych rodzajów śmierci komórkowej. Kluczowym aspektem jest jednak siła działania bodźca. Delikatny sygnał może skierować komórkę na drogę apoptozy. Ten sam czynnik, jednak o znacznie wyższym natężeniu, może wywołać śmierć martwiczą – całkowicie niezależną od komórki (Gewies 2003; Małecki i in. 2005; Stępień i in. 2007).

Podczas procesu apoptozy w komórkach zachodzi wiele charakterystycznych zmian morfologicznych jak i biochemicznych.

1.2 Morfologia komórki apoptotycznej

Komórki umierające na drodze śmierci apoptotycznej posiadają wiele charakterystycznych cech morfologicznych i biochemicznych (Ryc. 1) (Jyotirmoy et al. 2012). Proces apoptozy przebiega według określonego schematu. Zazwyczaj od inicjacji śmierci komórki do jej fragmentacji mija kilka godzin, zależy to jednak od kilku czynników m.in. rodzaju komórki czy też bodźca, który wprowadza ją na ten szlak (Wong 2011).

Komórka umierająca na drodze apoptozy przyjmuje owalny lub kulisty kształt, z wyraźnie widocznymi gęstymi fragmentami chromatyny jądrowej (Elmore 2007; Marek 2013). Dochodzi do powolnego obkurczania się komórki, co spowodowane jest stopniową utratą wewnątrzkomórkowej wody, dodatkowo odłącza się od pozostałych, sąsiadujących struktur (Koperwas 2013; Marek 2013).

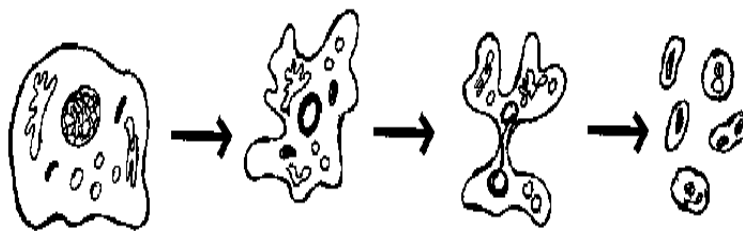
Jednym z pierwszych sygnałów, świadczących o rozpoczynającym się procesie apoptozy jest spadek potencjału elektrochemicznego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej co jest bezpośrednio związane z przeniesieniem fosfatydylseryny na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej. Fosfolipid ten jest transportowany na zewnątrz poprzez białko błonowe- flipazę. Na tym etapie dochodzi już do pierwszych zmian w obrębie jądra komórki (Gewies 2003; Koperwas 2013; Wong 2011). Na obrzeżach błony jądrowej rozpoczyna się kondensacja chromatyny tworząc wyraźną strukturę podobną do pierścienia lub półksiężyca. Stopniowo ulega ona dalszej kondensacji i wypełnia całe jądro. Prowadzi to do jego obkurczenia i powstania tzw. jądra pyknotycznego (Koperwas 2013; Wong 2011). Jeszcze większa kondensacja chromatyny powoduje rozerwanie otoczki jądrowej i rozpad jądra. DNA ulega fragmentacji na odcinki o długości 180 – 200 par zasad lub ich wielokrotności. Warto zaznaczyć, iż podczas śmierci komórki przebiegającej na drodze apoptozy nie dochodzi do znacznego naruszenia struktury pozostałych organelli komórkowych (Koperwas 2013; Stępień i in. 2007; Wong 2011).

Jednym z najważniejszych momentów w czasie apoptozy jest formowanie ciałek apoptotycznych. Zawierają one fragmenty cytoplazmy z organellami oraz zdegradowane elementy jądra komórkowego. Ciała są rozpoznawane przez makrofagi, monocyty i sąsiadujące komórki. Umożliwia to wychwytywanie i ich fagocytozę (Madej i in. 2015).

1.3 Szlaki przekazywania sygnału

Najważniejszymi białkami uczestniczącymi w procesie apoptozy są kaspazy. Są to enzymy z grupy proteaz cysteinowych, które powodują hydrolizę białek strukturalnych i funkcjonalnych, w konsekwencji prowadząc do śmierci komórki. Syntezowane są w postaci nieaktywnej i aby pełnić

swoje funkcje muszą zostać aktywowane. Do ich aktywacji zachodzi poprzez dwie drogi: szlak zewnętrzny (extrinsic) związany z błoną komórkową oraz szlak wewnętrzny (intrinsic) zależny od mitochondriów (Horodziejewska i in. 2005).



Rys. 1. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórce podczas procesu apoptozy (http://www.samper.pl/strony/Piasecka_Marzena/umieranie.htm).

Wewnętrzny szlak apoptotyczny

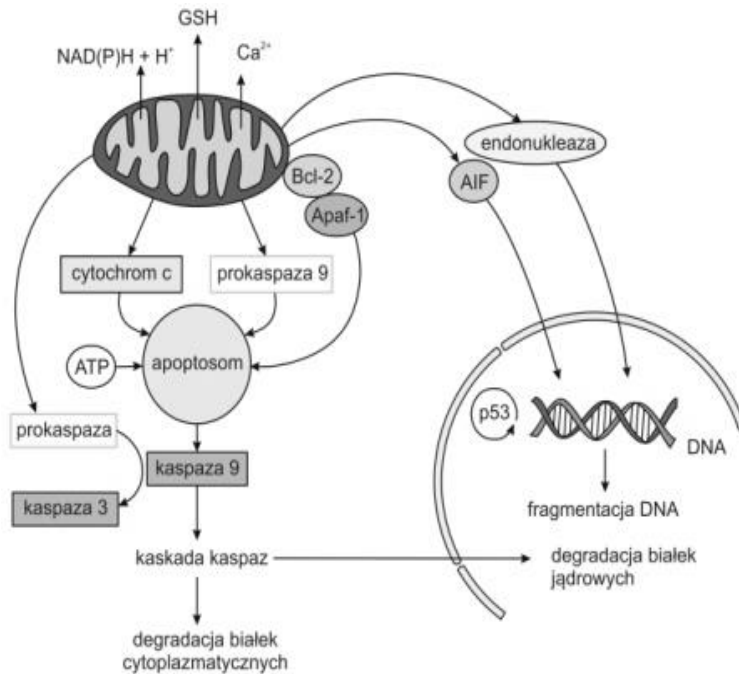
Wewnętrzny szlak przekazywania sygnału (Ryc. 2) jest bezpośrednio związany z funkcjonowaniem mitochondrium. Szczególną rolę w tym procesie odgrywa rodzina białek Bcl-2 (ang. B-cell lymphoma 2), która kontroluje jego cały przebieg. Wśród nich wyróżnia się białka o działaniu proapoptotycznym np. Bax (ang. Bcl-2-associated X protein) czy Bad (ang. Bcl-2 associated agonist of cell death) oraz antyapoptotycznym takie jak Bcl-2 czy Bcl-xL (ang. B-cell lymphoma-extra large). Ilość tych białek oraz oddziaływania między nimi decydują ostatecznie o tym czy komórka ma rozpocząć proces śmierci (Tomek et al. 2012).

W początkowym etapie apoptozy aktywacji ulegają białka proapoptotyczne Bcl-2, które hamują aktywność polipeptydów (Loreto et al. 2014; Tomek et al. 2012). Dochodzi do powstania charakterystycznych porów w błonie mitochondrium, przez które do cytoplazmy zostaje uwolniony cytochrom c. Ten etap jest wyraźnym sygnałem do powstania apoptosomu w skład którego wchodzi białko Apaf-1 (ang. apoptotic protease activating factor-1), cytochrom c, prokaspaza – 9 oraz odpowiednie źródło energii. W obrębie powstałej struktury dochodzi do aktywacji kaspazy 9, która z kolei uruchamia tzw. kaskadę kaspaz. Ostatnim etapem tego procesu jest aktywacja kaspazy 3, która nazywana jest kaspazą bez powrotu. Z chwilą jej pobudzenia jest pewne, iż komórka umrze na drodze śmierci apoptotycznej. Kaspaza 3 inicjuje proces degradacji białek jądrowych i cytoplazmatycznych co wiąże się z tworzeniem ciałek apoptotycznych (Elmore 2007, Fluda et al. 2006; Gillies et al. 2014; Loreto et al. 2014; Tomek et al. 2012).

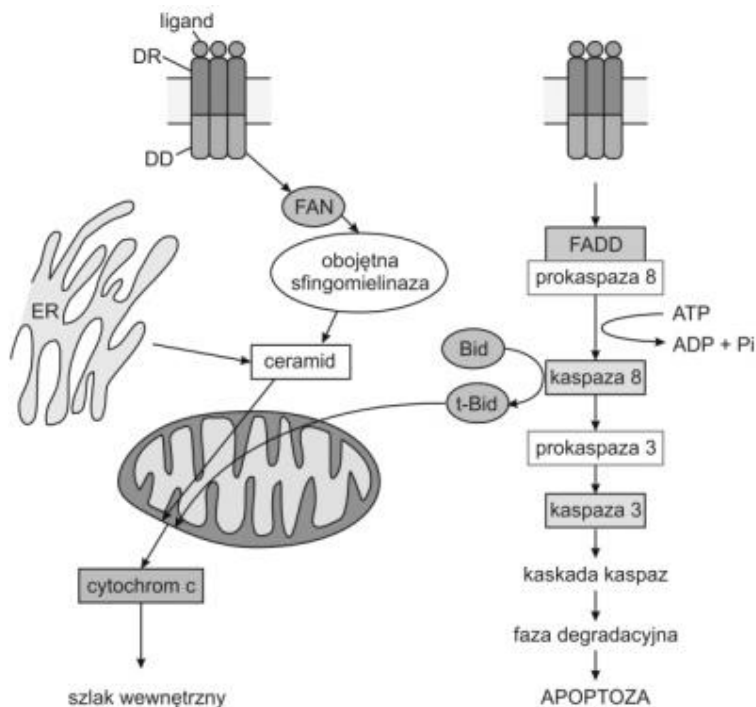
Zewnętrzny szlak apoptotyczny

Do aktywacji zewnętrznego szlaku apoptotycznego (Ryc. 3) dochodzi pod wpływem tzw. receptorów śmierci np. TNF (ang. tumor necrosis factor), TRAIL-R (ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand). Receptory te posiadają dwie domeny zewnątrzkomórkową bogatą w cysteinę i cytoplazmatyczną „domenę śmierci” (składającą się z 80 aminokwasów), która odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu sygnału o śmierci z powierzchni komórki na wewnętrzne szlaki sygnałowe. Przyłączenie odpowiedniego liganda do receptora powoduje przekazanie sygnału śmierci do części cytoplazmatycznej a dokładnie do domeny efektorowej śmierci (ang. death effector domain – DED) białka FADD (ang. fas -associated death domain) (Hongmei 2012; Fulda et al. 2006). Utworzenie kompleksu z prokaspazą 8 prowadzi do powstania aktywnej formy tego enzymu, która to zapoczątkowuje kaskadę kaspaz. Ostatnim etapem tego procesu jest aktywacja kaspazy 3, która jest jednym z ostatnich sygnałów wykonawczych apoptozy. Ostatecznie aktywowany jest odpowiedni czynnik odpowiadający za fragmentację materiału genetycznego i dochodzi do degradacji komórki.

Apoptozę indukowaną szlakiem zewnętrznym można zahamować przy pomocy komórkowego białka c-FLIP (z ang. ang. cellular FLICE-like inhibitory), które wiążąc się z kaspazą-8, inaktywuje ją, a tym samym zatrzymuje cały mechanizm zaprogramowanej śmierci (Hongmei Z. 2012).



Rys 2. Wewnętrzny szlak indukcji apoptozy (<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/apoptoza>).



Rys 3. Zewnętrzny szlak indukcji apoptozy (<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/apoptoza>).

1.4 Rola apoptozy w procesach fizjologicznych

Śmierć komórkowa, jak już wcześniej wspomniano, jest w pełni fizjologicznym procesem i rozpoczyna się już podczas rozwoju płodowego. Znaczna część komórek organizmu ginie w czasie embriogenezy. Apoptoza odgrywa więc istotną rolę w prawidłowym kształtowaniu tkanek i narządów. Jest ona niezbędna między innymi w trakcie rozwoju układu nerwowego czy rozrodczego. Ciekawym przykładem udziału tego procesu w embriogenezie jest proces formowania się palców u wyżej uorganizowanych kręgowców, gdzie wykazano, iż apoptoza komórek znajdujących się pomiędzy palcami rozwijającego się zarodka jest niezbędna do właściwego ukształtowania dystalnych części kończyn (Baś i in. 2004; Horodyjewska i in. 2005).

Programowana śmierć komórki pełni także niezwykle istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu w pełni wykształconych narządów. Przykładem może być grasica, która wraz z wiekiem ulega inwolucji, zaś jej limfoepitelialne obszary zostają zastępowane przez tkankę łączną i tłuszczową. Fizjologiczny zanik obserwuje się także w gruczole krokowym, w ciałku żółtym czy w błonie śluzowej macicy. Zmianami w dużym stopniu zależnymi od procesu apoptozy jest również inwolucja macicy po porodzie czy też gruczołu mlekowego po spełnieniu swojej roli (Baś i in. 2004; Horodyjewska i in. 2005; Wong 2011).

Procesy apoptotyczne odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu układu krwiotwórczego, dzięki czemu możliwe jest zachowanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem i obumieraniem komórek krwi. Obniżenie poziomu erytropoetyny stymuluje procesy apoptotyczne różnicujących się komórek krwi, a szczególnie prekursorów krwinek czerwonych. Apoptoza jest również niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, przez m.in. czynny udział w procesie dojrzewania limfocytów T (Baś i in. 2004; Horodyjewska i in. 2005).

Apoptoza jest również bardzo ważna w procesie starzenia. To dzięki nim usuwane są komórki stare czy uszkodzone. Eliminowane są również komórki które utraciły swoją funkcjonalność, wykazujące nieprawidłowe działanie i mogą stanowić zagrożenie dla pozostałych (Baś i in. 2004; Horodyjewska i in. 2005; Wong 2011).

1.5 Rola apoptozy w procesach patologicznych

Niestety proces śmierci apoptotycznej spotykany jest również w stanach niepożądanych, patologicznych.

W momencie, gdy szlak apoptozy nie może być uruchomiony, dochodzi do wystąpienia różnorodnych skutków ubocznych. W złożonych procesach programowanej śmierci komórek może dojść do zaburzeń będących skutkiem na przykład mutacji genów białek uczestniczących w tym procesie albo być związane z ich upośledzoną interakcją w czasie trwania apoptozy (Chwiłkowska i in. 2011; Horodyjewska i in. 2005)

Zarówno wzmożona śmierć jak również jej brak leżą u podłoża wielu niebezpiecznych stanów. Standardowym przykładem obniżonej aktywności apoptotycznej jest proces nowotworzenia, gdzie częstotliwość podziałów komórkowych wymyka się spod kontroli organizmu. W wyniku transformacji nowotworowej nadekspresji ulegają czynniki hamujące zaprogramowaną śmierć co w konsekwencji prowadzi do patologicznego rozrostu tkanki i jej inwazyjności (Chwiłkowska i in. 2011; Elmore 2007; Horodyjewska i in. 2005)

Zbyt wysoki poziom procesów apoptotycznych leży zaś u podłoża wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, choroba Huntingtona czy stwardnienie zanikowe boczne. Te stany chorobowe charakteryzują się deficytem prawidłowo funkcjonujących komórek. Zaburzenia w przebiegu apoptozy kojarzą się również z chorobami autoagresywnymi. Przykładem jest tu reumatoidalne zapalenie stawów. W czasie tej choroby, dochodzi do zbyt silnej odpowiedzi układu odpornościowego na własne antygeny (Elmore 2007).

2. Podsumowanie

Programowana śmierć to proces równoważący proliferację komórek. Dzięki niej możliwe jest zachowanie homeostazy komórkowej oraz prawidłowe kontrolowanie procesów proliferacyjnych. Zaburzenia w przebiegu apoptozy mogą prowadzić do powstawania nieprawidłowo zbudowanych oraz funkcjonujących narządów (Horodyjewska i in. 2005). Zarówno zahamowanie

tego procesu jak i jego zbyt wysoki poziom leży u podłoża wielu zaburzeń takich jak choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne. Dlatego tak ważne jest dokładne poznanie mechanizmów apoptozy, co pozwoli na opracowanie nowych strategii sterowania tym procesem w celu walki z wieloma schorzeniami.

3. Bibliografia

- Baś M, Cywińska A, Sokołowska J i in. (2004) Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część III. Rola apoptozy w procesach fizjologicznych i patologicznych, *Życie Weterynaryjne*, 79(12): 671 – 675
- Bratton SB, Salvesen GS (2010) Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome, *Journal of Cell Science*, 123(19): 3209–3214
- Chwiłkowska A, Kulbacka J, Saczko J (2011) Śmierć komórek nowotworowych. Udział reakcji fotodynamicznej w indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych, *Polski Merkuriusz Lekarski*, XXX(175):45
- Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495–516
- Fluda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* volume, 25: 4798–4811
- Gewies A (2003) Introduction to apoptosis, *ApoReview*, 1-26
- Gillies LA, Kuwana T (2014) Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(4):632-640
- Hongmei Z (2012) Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, *Apoptosis and Medicine*, 10.5772/50129
- Horodyjewska A, Pasternak K (2005) Apoptotyczna śmierć komórki, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 14(3):545–554
- Jyotirmoy D, Choudhury, Kumar S et al. (2012) A review on apoptosis & its different pathway, Dipankar Bardalai *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 3(7):848-861
- Koperwas L (2013) Apoptoza- programowana śmierć komórek wróg czy sprzymierzeniec?, *Laboratoria.net* - <http://laboratoria.net/artukul/13513.html>
- Loreto C, La Rocca G, Anzalone R et al. (2014) The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 616149
- Madej JA, Madej JP (2015) Mechanizmy obrony przeciwnowotworowej – przyczyny niepowodzeń, *Medycyna Weterynaryjna*, 71 (9):534-542
- Małecki M, Rzońca S (2005) Indukcja apoptozy jako cel terapii genowej nowotworów, *Postępy Biologii Komórki*, 32(2): 327-341
- Marek Ł (2013) Rola apoptosomu w aktywacji prokaspazy 9, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67:54-64
- Stępień A, Izdebska M, Grzanka A (2007) Rodzaje śmierci komórki, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61:420-428
- Tomek M, Akiyama T, Dass CR (2012) Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(12):1695-1702
- Wong R (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:87
- www.samper.pl/strony/Piasecka_Marzena/umieranie.htm
- www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/apoptoza

16. Petrografia popiołów dennych i lotnych ze spalania węgla kamiennego, biomasy drzewnej i mieszanki, zawierającej po 50% wag. węgla i biomasy

Petrographic composition of bottom and fly ash from bituminous coal combustion, wood biomass combustion, and co-combustion of blend containing 50% of coal and biomass

Maciejńczyk Natalia, Bielowicz Barbara

Katedra Geologii Żyłowej i Górniczej, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. inż. Marian Wagner, dr inż. Barbara Bielowicz

Maciejńczyk Natalia: nmaciejnczyk@gmail.com

Słowa Kluczowe: petrografia węgla, współspalanie węgla i biomasy, badania petrograficzne popiołów

Streszczenie

Analizom petrograficznym poddano popioły dennie i lotne pochodzące ze spalania węgla kamiennego, biomasy drzewnej w formie pelletu oraz mieszanki tych dwóch paliw w proporcjach wagowych 50:50. Eksperymentalne spalanie przeprowadzono w retortowym kotle podajnikowym Galmet Galaxia o mocy 15 kW. Analizy petrograficzne popiołów dennych i lotnych ze spalania węgla wykazały przewagę substancji mineralnej i charów typu inertoid. W przypadku popiołów ze spalania biomasy, w popiołach dennych dominowały chary o strukturze tkankowej i grubych ściankach, z kolei w popiołach lotnych częściej obserwowane były składniki mineralne oraz chary o strukturze porowatej. Popioły ze spalania mieszanki węgla z biomasą mają odmienny skład petrograficzny. Zarówno popioły dennie, jak i lotne zawierają mniej substancji mineralnej, w porównaniu z popiołami ze spalania węgla i biomasy. Chary pochodzące z węgla częściej reprezentowane były przez silnie porowate morfotypy, z kolei chary z biomasy cechowały się zbliżonym udziałem form tkankowych i porowatych. Wyższy udział porowatych charów węglowych w popiołach ze współspalania węgla z biomasą, w porównaniu z popiołami ze spalania węgla, sugeruje wyższą temperaturę podczas współspalania. Wyższy udział porowatych charów pochodzących z biomasy sugeruje jej gwałtowne odgazowanie podczas współspalania. Niższy udział substancji mineralnej w popiołach ze współspalania, w porównaniu z popiołami ze spalania węgla i biomasy, sugeruje niższą efektywność procesu.

1. Wstęp

Współspalanie węgla kamiennego i biomasy rozpatrywane jest jako bardziej przyjazna środowisku alternatywa dla spalania samego węgla. Dotychczasowe eksperymenty wskazują, że współspalanie może prowadzić do redukcji emisji SO₂ i NO_x (Demirbaş 2003; Jurado i in. 2017; Munir i in. 2011; Rokni i in. 2018; Savolainen 2003; Xie i in. 2007). Z tego też względu, zainteresowanie różnymi aspektami współspalania rośnie.

Jednym z aspektów badań, poświęconych współspalaniu, jest analiza petrograficzna popiołów (Grammelis i in. 2005; Wang i in. 2011). Może być ona przydatna m.in. w predykcji potencjalnych zastosowań popiołów. Ponadto, występujące w popiołach *chary*, czyli zmienione pozostałości węgla czy biomasy, umożliwiają wnioskowanie na temat przebiegu procesu spalania (Lester et al., 2018, 2010).

W poniższej pracy przyrównano skład petrograficzny popiołów ze współspalania mieszanki zawierającej po 50% wag. węgla i biomasy z popiołami powstałymi w wyniku spalania tej samej biomasy i tego samego węgla w danym piecu. Umożliwiło to porównanie wpływu domieszki węgla/biomasy na formy występujących w popiele *charów*, a w konsekwencji – wnioskowanie na temat przebiegu procesu spalania.

2. Materiał i metody

Pierwszym etapem badań było przeprowadzenie spalania próbek węgla kamiennego (ekogroszku), pelletu drzewnego oraz mieszanki węgla i pelletu, zawierającej po 50% wag. węgla i biomasy. Paliwa spalano w retortowym kotle podajnikowym Galmet Galaxia o mocy 15 kW, stanowiącym część mobilnego laboratorium PoLoNEs, znajdującego się w Centrum Zrównoważonego Rozwoju i Poszanowania Energii WGGiOŚ, AGH w Miękinii.

Następnie, z popielnika kotła pobrano próbki popiołów dennych, a z jego wyczystek – próbki popiołów lotnych. Pobrano również próbki pelletu i węgla, które poddano analizie technicznej na Wydziale Energetyki i Paliw AGH. Analiza obejmowała oznaczenie wilgoci całkowitej, wilgoci analitycznej, zawartości popiołu, zawartości części lotnych, ciepła spalania i wartości opałowej. Z próbek węgla oraz próbek popiołów wykonano polerowane zgłady do badań mikroskopowych. Badania petrograficzne przeprowadzono za pomocą mikroskopu Opton-Zeiss z obiektywem immersyjnym. Analizy węgla kamiennego wykonano zgodnie z zaleceniami International Committee for Coal and Organic Petrology (ICCP 1998, 2001; Pickel i in. 2017). Do analizy popiołów ze spalania węgla zastosowano *Coal Char Classification* Lestera i in. (Lester i in. 2010), z kolei popioły ze spalania biomasy klasyfikowano za pomocą *Biomass Char Classification* Lestera i in. (Lester i in. 2018). W przypadku popiołów ze spalania mieszanki węgla z biomasą, zastosowano obie klasyfikacje.

Klasyfikacja *charów* ze spalania węgla dzieli obserwowane mikroskopowo składniki na podstawie ich stopnia przereagowania i porowatości na następujące typy:

- mineroid – ponad 50% substancji mineralnej,
- solid / fusinoid – porowatość <5% (solid) lub relikty macerału fuzynitu (fusinoid),
- inertoid – porowatość 5-40%, zmieniony lub nie,
- mixed dense – częściowo zmieniony (w 25-75%), porowatość 40-60%,
- mixed porous – częściowo zmieniony (w 25-75%), porowatość >60%,
- crassinetwork – struktura sieciowa, >50% ścianek >3 μm, porowatość >40%,
- tenuinetwork – struktura sieciowa, >50% ścianek <3 μm, porowatość >70%.
- crassisphere – sferyczny, >50% ścianek >3 μm, porowatość >60%,
- tenuisphere – sferyczny, >50% ścianek <3 μm, porowatość >80% (Lester i in. 2010).

Klasyfikacja *charów* ze spalania biomasy dzieli mikroskładniki na cienkościenne, o ściankach o grubości < 3 μm (*thin*, Th) i o grubych ściankach, grubszych niż 3 μm (*thick*, T), na porowate (*porous*, P) lub o strukturze komórkowej (*cellular*, C) oraz na te o wysokim stosunku długości do szerokości (*high aspect ratio*, H) bądź o niskim stosunku długości do szerokości (*low aspect ratio*, L). Osobną kategorię stanowią *chary* typu solid, niewykazujące porowatości. Podział ten umożliwia wyróżnienie następujących typów *charów* ze spalania biomasy:

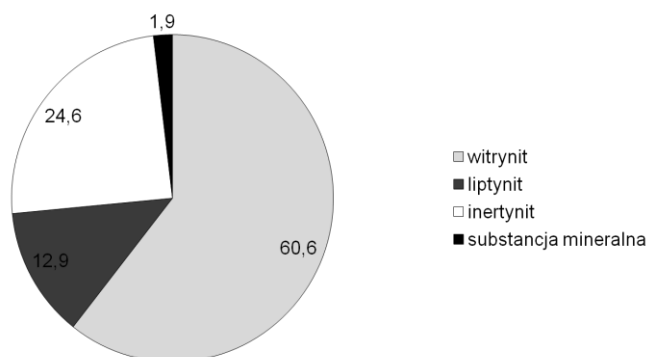
- solid – cząstki stałe, o znikomej porowatości,
- TPL – grubościenne, porowate, o małej długości,
- TCL – grubościenne, o strukturze komórkowej i małej długości,
- TPH – grubościenne, porowate, wydłużone,
- TCH – grubościenne, o strukturze komórkowej, wydłużone,
- ThPL – cienkościenne, porowate, o małej długości,
- ThCL – cienkościenne, o strukturze komórkowej i małej długości,
- ThPH – cienkościenne, porowate, wydłużone,
- ThCH – cienkościenne, o strukturze komórkowej, wydłużone (Lester i in. 2018)

3. Wyniki

3.1 Analizy węgla kamiennego i biomasy

W składzie petrograficznym badanego węgla kamiennego dominowały macerały grupy wityrynytu (60,6%). Macerały grupy inertynitu stanowiły 24,6%, grupy liptynytu – 12,9%, z kolei substancja mineralna stanowiła 1,9% objętości badanego węgla (Rys. 1).

Wyniki analizy technologicznej węgla kamiennego i biomasy przedstawiono w Tab. 1.



Rys. 1. Skład petrograficzny spalanego węgla kamiennego.

Tab. 1. Wyniki analizy technologicznej paliw

Parametr	Jednostka	Wartość – węgiel	Wartość – biomasa
Wilgoć całkowita	%	3,8	7,4
Wilgoć analityczna	%	3,9	7,5
Zawartość popiołu (stan analityczny)	%	3,2	1,3
Zawartość części lotnych (stan analityczny)	%	31,2	75,2
Ciepło spalania	kJ/kg	31367	18808
Wartość opałowa	kJ/kg	30235	17228

3.2 Popioły denne i lotne ze spalania węgla kamiennego

W składzie petrograficznym popiołów dennych ze spalania węgla kamiennego przeważała substancja mineralna oraz *chary* typu inertoid. Typ solid, reprezentowany głównie przez niezmiennione macerały, stanowił 4,2% objętości próbki. Często obserwowane były *chary* typów mixed dense and mixed porous, stanowiące odpowiednio 11,7 i 8,7% objętości badanego popiołu dennego. *Chary* o wyższej porowatości (crassinetwork, tenuinetwork, crassisphere, tenuisphere) występowały rzadko (Tab. 2).

Popioły lotne ze spalania węgla również zdominowane były przez substancję mineralną i *chary* typu inertoid, jednak rzadziej występowały w nich typy mieszane (mixed dense, mixed porous), z kolei typy o większej porowatości i sferycznym kształcie (crassisphere, tenuisphere) były znacznie częstsze (odpowiednio 11,9 i 9,3%).

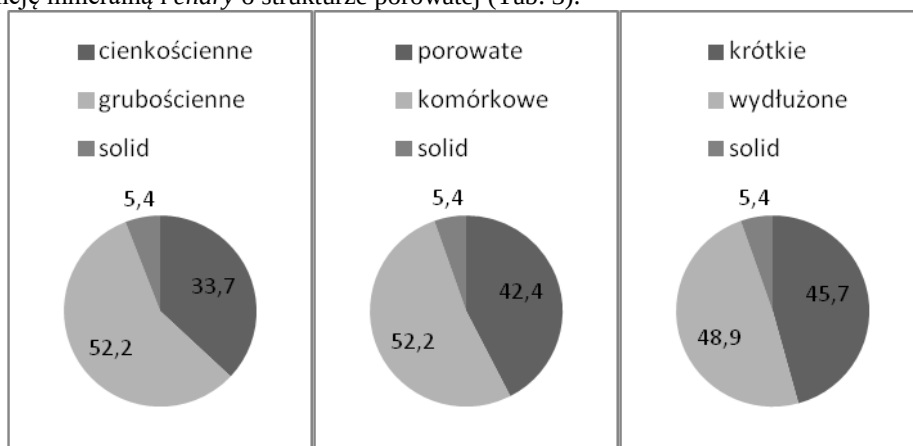
Tab. 2. Skład petrograficzny popiołów dennych (PD) i popiołów lotnych (PL) ze spalania węgla kamiennego.

Rodzaj <i>charu</i>	Udział [% obj.]		Udział <i>charów</i> z pominięciem typu mineroid [% obj.]	
	PD	PL	PD	PL
Mineroid	51,1	46,4	-	-
Solid / fusinoid	4,2	2,6	8,6	4,8
Inertoid	18,4	18,6	37,7	34,6
Mixed dense	11,7	1,0	23,8	1,9
Mixed porous	8,7	1,5	17,9	2,9
Crassinetwork	2,6	4,1	5,3	7,7
Tenuinetwork	2,3	4,6	4,6	8,7
Crassisphere	0,3	11,9	0,7	22,1
Tenuisphere	0,6	9,3	1,3	17,3

3.3 Popioły denne i lotne ze spalania biomasy

W popiołach dennych ze spalania pelletu drzewnego substancja mineralna występowała rzadziej, niż w popiołach ze spalania węgla- stanowiła ona 22,0% objętości próbki. Najczęściej występującymi typami *charów* były TPL (grubościenny, porowaty, o małej długości) i ThCH (cienkościenny, o strukturze komórkowej, wydłużony). Generalnie, w składzie próbki przeważały *chary* grubościenne i o strukturze komórkowej. Udział cząsteczek wydłużonych i krótkich był zbliżony (Tab. 3, Rys. 2).

Popioły lotne cechowały się mało zróżnicowanym składem, zdominowanym przez substancję mineralną i *chary* o strukturze porowatej (Tab. 3).



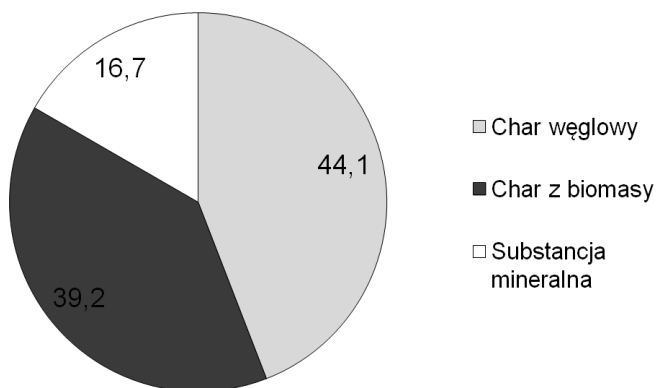
Rys. 2. Udział poszczególnych rodzajów *charów* z biomasy w badanych popiołach dennych.

Tab. 3. Skład petrograficzny popiołów dennych (PD) i popiołów lotnych (PL) ze spalania biomasy.

Rodzaj <i>charu</i>	Udział [% obj.]		Udział <i>charów</i> z pominięciem typu mineroid [% obj.]	
	PD	PL	PD	PL
Substancja mineralna	22,0	48,3	-	-
Solid	4,2	2,8	5,4	5,4
TPL	17,8	20,5	22,8	39,6
TCL	6,8	14,8	8,7	28,7
TPH	7,6	-	9,8	-
TCL	6,8	-	8,7	-
ThPL	5,1	13,6	6,5	26,3
ThCL	5,9	-	7,6	-
ThPH	2,5	-	3,3	-
ThCH	12,7	-	16,3	-

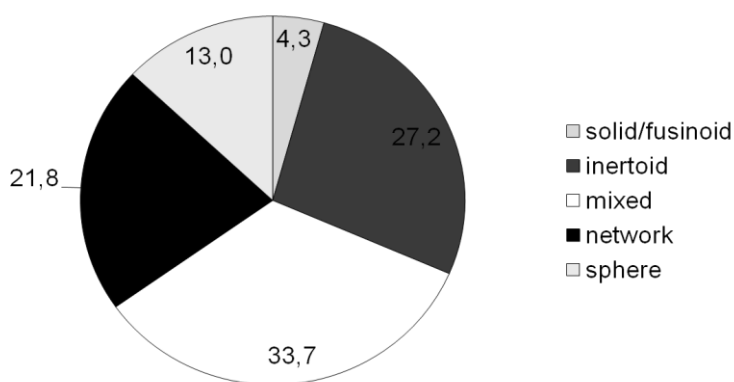
3.4 Popioły denne i lotne ze współspalania węgla kamiennego i biomasy

W popiołach dennych z współspalania nieznacznie przeważały *chary* pochodzące z węgla (44,1%). Zwraca uwagę niska zawartość substancji mineralnej w popiele – 16,7% w porównaniu z 51,1% w popiele ze spalania węgla i 22,0% w popiele ze spalania biomasy (Rys. 3).



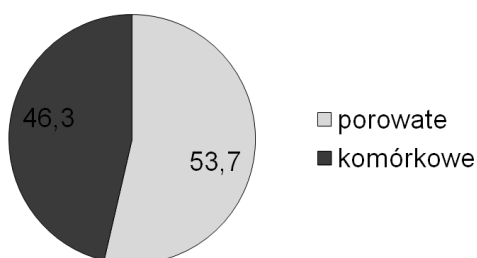
Rys. 3. Skład petrograficzny popiołu dennego z współspalania węgla i biomasy.

Obserwowane w popiele *chary* węglowe reprezentowane były głównie przez morfotypy mieszane (mixed dense, mixed porous), stanowiące łącznie 33,7% obj. próbki. Często obserwowano również inertoidy (27,2%), jednak ich udział był niższy, niż w popiele ze spalania samego węgla (37,7%). Znacznie częściej obserwowano silnie porowate *chary* o strukturze sieciowej (crassinetwork, tenuinetwork) i sferycznej (crassisphere, tenuisphere) (Rys. 4).



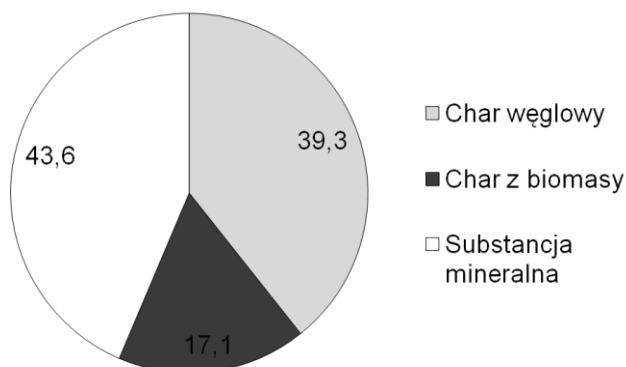
Rys. 4. Uszczegółowiony skład petrograficzny popiołów dennych – *chary* ze spalania węgla.

W przypadku *charów* pochodzących ze spalania biomasy, zauważalny jest wzrost udziału typów o strukturze porowatej – w próbce z współspalania, stanowią one 53,7% obj., z kolei w próbce ze spalania biomasy, stanowią one 42,4% (Rys. 5).



Rys. 5. Udział *charów* porowatych i komórkowych w całkowitym udziale *charów* z biomasy w popiele dennym z współspalania.

Popiół lotny cechował się wyższą zawartością substancji mineralnej (43,6%), niż popiół denny, jednak niższą niż w przypadku popiołów ze spalania samego węgla (46,4%) i samej biomasy (48,3%). *Chary* węglowe stanowią 39,3% jego objętości, z kolei te pochodzące ze spalania biomasy – 17,1% (Rys. 6).



Rys. 6. Skład petrograficzny popiołów z współspalania węgla i biomasy.

Generalnie, *chary* węglowe występujące w popiele lotnym ze współspalania mają podobne morfologie do tych obserwowanych w popiele ze spalania węgla – dominują inertoidy (23,9%) oraz formy sferyczne, crassidphere i tenuisphere, stanowiące odpowiednio 21,7 i 15,2%. *Chary* ze spalania biomasy mają mało zróżnicowane morfologie, a udział form porowatych i o strukturze komórkowej jest zbliżony.

4. Dyskusja i wnioski

Skład petrograficzny popiołów ze spalania węgla wskazuje na niską temperaturę podczas spalania. Obserwowany skład próbek jest zbliżony do *charów* powstałych w wyniku spalania wysokowitrynitowego węgla kolumbijskiego (o zbliżonym składzie petrograficznym do badanego węgla) w temperaturach rzędu 800-1150°C, opisanego w pracy Rosenberga, Petersena i Thomsena (1996). Jednakże udział *charów* o niskiej porowatości (solid i inertoid) był wyższy w przypadku badanych próbek, przede wszystkim popiołu dennego, niż w wymienionej wyżej pracy.

Jako że w poddanym spalaniu węgla dominowały macerały grupy witrynit, można przypuszczać, że *chary* o niskiej porowatości powstały właśnie z nich. W przypadku zgazowania węgla brunatnych, *chary* typu inertoid prawdopodobnie powstają głównie z ulminitu (Bielowicz 2016), można więc przypuszczać, że w przypadku węgla kamiennych, powstają one przede wszystkim z kolotelinitu. Ponadto, badania Eversona i in. (Everson i in. 2008) wskazują, że witrynit w temperaturach ok. 700°C (do maksymalnie 900°C) nie zmienia swojej morfologii, wzrasta jedynie jego refleksyjność, co jest zbieżne z charakterystyką inertoidu.

Chary o niskiej porowatości częściej występowały w popiele dennym, niż w lotnym, co sugeruje, że mają one tendencję do akumulacji w popiele dennym – prawdopodobnie ze względu na większą gęstość, w porównaniu z *charami* o wysokiej porowatości.

W przypadku popiołów dennych ze spalania biomasy, w ich składzie dominowały *chary* o strukturze komórkowej, co wskazuje na spokojne odgazowanie poprzez istniejące komórki – bez wytwarzania nowych porów (Lester i in. 2018). Generalnie, *chary* obserwowane w popiele dennym miały przeważnie grube ścianki, co również w przypadku morfotypów porowatych wskazuje na mniej gwałtowne odgazowanie. Formy *charów* sugerują więc spokojny proces spalania.

W popiołach lotnych dominowały *chary* o strukturze porowatej. Ich wyższy udział w składzie popiołów lotnych sugeruje, iż składniki o dużej porowatości mają skłonność do unoszenia się z popiołem lotnym.

Różnice w składzie petrograficznym są szczególnie widoczne przy porównaniu składu popiołów dennych z współspalania z popiołem dennym ze spalania samego węgla i biomasy. Wyższy

udział *charów* węglowych o podwyższonej (typy mixed) oraz wysokiej porowatości (typy –network i –sphere) wskazuje na wyższą temperaturę spalania, prawdopodobnie powyżej 900°C (Everson i in. 2008; Rosenberg i in. 1996). Ponadto, podwyższony udział *charów* ze spalania biomasy o strukturze porowatej wskazuje na bardziej gwałtowne odgazowanie biomasy w trakcie spalania.

Podsumowując, skład petrograficzny popiołów ze spalania węgla, w szczególności stosunkowo wysoki udział *charów* o niskiej porowatości wskazuje na niższe temperatury spalania, rzędu 700-900°C.

W przypadku popiołów ze spalania biomasy, stwierdzono w nich przewagę *charów* o strukturze komórkowej, co wskazuje na spokojne odgazowanie spalanej biomasy.

W porównaniu ze składem petrograficznym popiołów ze spalania węgla i biomasy, popioły ze współspalania:

- charakteryzują się wyższym udziałem *charów* węglowych o strukturze porowatej, co sugeruje wyższą temperaturę spalania (powyżej 900°C),
- zawierają więcej porowatych *charów* z biomasy, co wskazuje na gwałtowne odgazowanie biomasy w trakcie spalania,
- zawierają znacznie mniej substancji mineralnej, co sugeruje niższą efektywność procesu współspalania, w porównaniu ze spalaniem węgla czy biomasy w tym samym kotle.

Podziękowania

Badania sfinansowane zostały z grantu nr 15.11.140.187.

4. Literatura

- Bielowicz B (2016) Petrographic characteristics of lignite gasification chars. *Int. J. Coal Geol.* 168: 146–161.
- Demirbaş A (2003) Sustainable cofiring of biomass with coal. *Energy Convers. Manag.* 44: 1465–1479.
- Everson RC, Neomagus HWJP, Kaitano R i in. (2008) Properties of high ash char particles derived from inertinite-rich coal: 1. Chemical, structural and petrographic characteristics. *Fuel* 87: 3082–3090.
- ICCP (1998) The new vitrinite classification (ICCP System 1994). *Fuel* 77: 349–358.
- ICCP (2001) New inertinite classification (ICCP System 1994). *Fuel* 80: 459–471.
- Jurado N, Simms NJ, Anthony EJ i in. (2017) Effect of co-firing coal and biomass blends on the gaseous environments and ash deposition during pilot-scale oxy-combustion trials. *Fuel* 197: 145–158.
- Lester E, Alvarez D, Borrego AG i in. (2010) The procedure used to develop a coal char classification-Commission III Combustion Working Group of the International Committee for Coal and Organic Petrology. *Int. J. Coal Geol.* 81: 333–342.
- Lester E, Avila C, Pang CH i in. (2018) A proposed biomass char classification system. *Fuel* 232: 845–854.
- Munir S, Nimmo W, Gibbs BM (2011) The effect of air staged, co-combustion of pulverised coal and biomass blends on NO_x emissions and combustion efficiency. *Fuel* 90: 126–135.
- Pickel W, Kus J, Flores D i in. (2017) Classification of liptinite – ICCP System 1994. *Int. J. Coal Geol.* 169: 40-61.
- Rokni E, Ren X, Panahi A i in. (2018) Emissions of SO₂, NO_x, CO₂, and HCl from Co-firing of coals with raw and torrefied biomass fuels. *Fuel* 211: 363–374.
- Rosenberg P, Petersen HI, Thomsen E (1996) Combustion char morphology related to combustion temperature and coal petrography. *Fuel* 75: 1071–1082.
- Savolainen K (2003) Co-firing of biomass in coal-fired utility boilers. *Appl. Energy* 74: 369–381.
- Wang C, Wu Y, Liu Q i in. (2011) Study of the characteristics of the ashing process of straw/coal combustion. *Fuel* 90: 2939–2944.
- Xie J, Yang X, Zhang L i in. (2007) Emissions of SO₂, NO and N₂O in a circulating fluidized bed combustor during co-firing coal and biomass. *J. Environ. Sci.* 19: 109–116.

17. Podatność białek błon podskorupowych na działanie proteaz różnego pochodzenia

Susceptibility of eggshells membrane proteins to the action of proteases of various origins

Michał Matysiak, Łukasz Bobak, Aleksandra Zambrowicz

Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37-41, 51-630 Wrocław, Polska

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Aleksandra Zambrowicz

Michał Matysiak: michal.matysiak@upwr.edu.pl

Słowa Kluczowe: enzymy, hydroliza enzymatyczna, bioaktywne peptydy, jaja kurze

Streszczenie

Błony podskorupowe jaj kurzych, uważane za problematyczny materiał odpadowy przemysłu jajczarskiego, stanowią wartościowy materiał do pozyskiwania substancji bioaktywnych. Zawierają one między innymi znaczne ilości białek głównie kolagenu oraz kwasu hialuronowego. Wykazano, że odpowiednio pozyskane hydrolizaty posiadają specyficzne właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne.

Badania koncentrowały się na określeniu podatności błon podskorupowych na działanie proteaz różnego pochodzenia oraz określeniu optymalnych warunków hydrolizy enzymatycznej ukierunkowanej na otrzymanie biologicznie aktywnych peptydów. Wykorzystano: papainę z *Carica papaya*, pepsynę z żołądków wieprzowych oraz serynową proteazę z dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*). Określono zdolność proteolityczną enzymów względem błon podskorupowych oraz oceniono właściwości antyoksydacyjne produktów enzymatycznej degradacji białek. Wykazano, że zastosowane enzymy cechowały się zróżnicowanymi uzdolnieniami proteolitycznymi, przy czym najlepszym enzymem do degradacji błon podskorupowych była proteaza z dyni figolistnej. Otrzymane hydrolizaty posiadały znaczną aktywność antyoksydacyjną, której poziom zależny był głównie od rodzaju proteazy oraz od stopnia hydrolizy.

1. Wstęp

Błony podskorupowe stanowią około 0,6% masy jaja kurzego i są skomplikowanym pod względem budowy biomateriałem (Balaz 2014). Błony podskorupowe mają strukturę zwięzłą i zbudowane są z mukopolisacharydów oraz siateczki keratynowo-kolagenowej. Składają się one z warstwy wewnętrznej i zewnętrznej oraz błony granicznej. Błona zewnętrzna zlokalizowana jest tuż pod skorupą, a grubość jej włókien waha się pomiędzy 1-7 μm , natomiast grubość całej warstwy wynosi 50-70 μm . Różnią się one morfologią. Grubość obu błon wynosi od 60 do 90 μm , gdzie błona wewnętrzna jest cieńsza od zewnętrznej. Włókna błony podskorupowej wewnętrznej przeplatają się z błoną zewnętrzną (Liong et al. 1997). Na tępych końcach jaja błony podskorupowe rozdzielają się tworząc komorę powietrzną (Balaz 2014).

Włókna błon podskorupowych składają się w 80-85% z białek, przy czym około 10% stanowi kolagen. Wewnętrzna warstwa błony nie ulega zwapnieniu, natomiast włókna zewnętrzne są częściowo zmineralizowane i połączone ze skorupą. Pod względem składu aminokwasowego błony podskorupowe wyróżniają się wysoką zawartością proliny, kwasu glutaminowego oraz glicyny, których udział wynosi $>10\%$. W błonach podskorupowych odnotowano obecność kwasu sjałowego, kwasu uronowego i niewielkie ilości sacharydów (Nys et al. 2003)

Dzięki charakterystycznej budowie błony podskorupowe stanowią dobrą barierę mechaniczną dla drobnoustrojów, umożliwiając jednocześnie przepuszczalność wody i gazów. Błony podskorupowe wzmacniają skorupę jaja oraz nadają jej elastyczność. Pełnią one również znaczącą

rolę w budowie strukturalnej jaja, otaczając jego zawartość oraz uniemożliwiając odkładanie się materiału skorupotwórczego (Balaz 2014).

Kolagen, którego alternatywnym źródłem mogą być błony podskorupowe, jest białkiem z grupy białek fibrylarnych, stanowiących u kręgowców około 30% wszystkich protein. Występuje licznie w tkankach i narządach jako element mi.in. kości, zębów, chrząstek, ścięgien, skóry, więzadeł czy rogówki oka. Jest on również głównym składnikiem substancji zewnątrzkomórkowej. Zasadniczą funkcją kolagenu jest zapewnienie odpowiedniej integralności oraz sprężystości tkanki łącznej. Uczestniczy także w procesach regeneracyjnych, gojenia się ran oraz wzrostu komórek (Czubak i Żbikowska 2014).

Kolagen ma specyficzną strukturę, każdy z jego typów składa się z trzech lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych, które nawinięte są na prawoskrętną helisę. Wspólna oś łańcuchów utrzymywana jest poprzez wiązania wodorowe. Budowa włókien kolagenowych jest ściśle powiązana ze składem aminokwasowym. Łańcuchy tworzące pojedyncze włókno kolagenu składają się z około 1000 aminokwasów, w których występuje powtarzająca się sekwencja $(-Gly - X - Y)_n$. W sekwencji tej oprócz glicyny, część X stanowią najczęściej reszty proliny (ok. 28%), natomiast Y stanowią na ogół reszty hydroksyproliny (ok. 38%). Dodatkowo w kolagenie wstępują aminokwasy polarne a zawartość aminokwasów kwasowych i zasadowych równoważy się (Czubak i Żbikowska 2014). Typy kolagenów rozróżnia się na podstawie miejsca występowania w organizmie, struktury oraz funkcji jakie pełnią. Kolageny dzieli się na dwie podstawowe grupy – fibrylarne oraz niefibrylarne. W składzie kolagenów fibrylarnych znajdują się typy I, II, III, V, XI, XXIV oraz XXVII i to głównie one zlokalizowane są wewnątrz organizmów zwierzęcych (Czubak i Żbikowska 2014).

Hydroliza kolagenu może być przeprowadzona metodami chemicznymi i enzymatycznymi. Hydroliza chemiczna wykorzystuje kwasy (kwas solny, cytrynowy bądź octowy) lub zasady (wapno, węglan sodu, wodorotlenek sodu lub tlenek magnezu). Hydrolizy chemiczne są reakcjami szybkimi oraz wydajnymi. Niestety generują one duże koszty oraz prowadzą do całkowitego zniszczenia struktury kolagenu i otrzymania samych aminokwasów. Hydroliza przeprowadzona w ten sposób mocno ogranicza możliwości wykorzystania hydrolizatów (Łączkowska i in. 2016). Natomiast hydrolizę enzymatyczną kolagenu prowadzi się z udziałem proteaz o zróżnicowanej specyficzności. Przebiega w łagodnych i łatwych w kontroli warunkach, przez co jest mniej inwazyjną metodą. Cechuje się także większą selektywnością. Produkty hydrolizy enzymatycznej są bardziej stabilne oraz można je uzyskiwać w czystszej postaci. Wadami hydrolizy enzymatycznej jest długi czas reakcji i niska podatność kolagenu na działanie większości z dostępnych enzymów proteolitycznych (Łączkowska i in. 2016).

Biopreparaty pozyskiwane z błon podskorupowych oraz preparaty kolagenowe, w tym hydrolizaty, są użytecznymi biomateriałami. Istnieje możliwość zastosowania błon jako matrycy do syntezy nanocząsteczek oraz sorbentów ciężkich metali, substancji organicznych, barwników, sulfonianów i fluorków (Balaz 2014). Biomateriały kolagenowe cechują się bardzo niską toksycznością oraz antygenowością, jednocześnie wykazując wysoką biogodność i zdolność do biodegradacji. Jednym z głównych zastosowań preparatów kolagenowych jest zastosowanie ich jako suplementów żywieniowych oraz do produkcji pasz (Kończak i Surówka 2014). Wykazano, że kolagen może być prekursorem peptydów o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Biopeptydy te posiadają zdolności antyoksydacyjne, uczestniczą w leczeniu schorzeń skóry, oczu, układu nerwowego i krwionośnego oraz mogą być wykorzystywane w procesach regeneracji tkanek i kości (Darewicz i in. 2015).

2. Materiały i Metody

Materiałem badawczym były liofilizaty błon podskorupowych jaj kurzych wyizolowane w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zastosowano dostępne w handlu proteazy takie jak papaina z *Carica papaya* (SERVA, numer kat. 31610) i pepsyna z żołądków wieprzowych (BIOCATALYSTS, numer kat. 11129345) oraz niekomercyjna serynowa proteaza z dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*).

2.1 Izolacja i przygotowanie błon podskorupowych

Skorupy rozdrabniano w homogenizatorze, poddano prażeniu i przemyto je wodą. Błony izolowano za pomocą 0,5 M kwasu cytrynowego w warunkach chłodniczych. Następnie doprowadzono zawiesinę błon do odczynu obojętnego i wysuszono sublimacyjnie.

2.2 Oznaczenie białka metodą Kiejdahla

Próby poddano mineralizacji stężonym kwasem siarkowym (VI) z dodatkiem katalizatora w wysokiej temperaturze. Następnie oznaczono białko metodą Kiejdahla.

2.3 Oznaczenie składu aminokwasowego

Błony podskorupowe hydrolizowano metodą chemiczną (6M HCl). Wolne aminokwasy poddano derywatyzacji i analizowano w systemie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) na kolumnie PicoTag o wymiarach: 3,9 x 150 mm (Waters, Milford, MA, USA).

2.4 Izolacja serynowej proteinazy z dyni figolistnej (Dryjański et al., 1990)

Serynową proteinazę z dyni figolistnej wyizolowano stosując ekstrakcję 0,1M buforem Tris-HCl o pH 8,0 oraz wysalanie przy użyciu siarczanu amonu. Następnie wytrącony osad stanowiący białko enzymatyczne odseparowano poprzez wirowanie. Przed użyciem preparat dializowano do wody.

2.5 Oznaczenie aktywności enzymatycznej (Chrzanowska i Kołaczowska 1998)

Aktywność proteolityczną oznaczano wobec 2% r-r kazeiny i hemoglobiny zawieszonych odpowiednio w buforze 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,0, 0,1M buforze cytrynianowym o pH 3,0 i w 0,1M buforze Tris-HCl o pH 8,0. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie reakcję przerywano przy użyciu 5% kwasu trichlorooctowego (TCA), a następnie próbki odwirowano (5500 obr./min, t= 15 min, T= 15°C). W uzyskanych supernatantach dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Przyjęto, że jedna jednostka enzymatyczna to taka ilość proteazy, która powoduje zmianę absorbancji (w odniesieniu do próby kontrolnej) równą $\Delta E = 0,1$.

2.6 Hydroliza enzymatyczna

Błony podskorupowe zdeintegrowano w moździerzu i sporządzono z nich 20% roztwory dodając odpowiednie bufony: 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,0 z dodatkiem EDTA oraz L-cysteiny dla papainy, 0,1M bufor cytrynianowy o pH 3,0 dla pepsyny oraz bufor 0,1M Tris-HCl o pH 8,0 dla proteazy dyni figolistnej. Hydrolizę rozpoczynano poprzez dodatek enzymów w ilości 50 j/mg hydrolizowanego białka. Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 4 godziny, pobierając hydrolizaty odpowiednio po czasie 30 min oraz 1, 2 i 4 godziny. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina błon w odpowiednim buforze bez dodatku enzymu. Reakcję hamowano poprzez inkubację prób we wrzącej łaźni wodnej (T=100°C) przez 15 minut. Otrzymane hydrolizaty odwirowano (5500 obr./min, t= 15 min, T= 10°C). Próby przechowywano w warunkach zamrażalniczych.

2.7 Wyznaczanie stopnia hydrolizy (DH) poprzez oznaczenie stężenia peptydów rozpuszczalnych w 10% kwasie trichlorooctowym (TCA) (Silvestre 1997)

Do hydrolizatów z błon podskorupowych dodano w ilości 1:1 (v/v) 10% kwas trichlorooctowy. W celu wytrącenia niehydrolizowanych białek, próby pozostawiono na czas 30 min. Następnie próby odwirowano (5500 obr./min, t=15 min, T=5°C). W uzyskanych supernatantach dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

2.8 Wyznaczenie stężenia wolnych grup α -aminowych w reakcji z TNBS (Kuchroo i Rahilly, 1983)

Do 2 mL odpowiednio rozcieńczonej w 0,1M boraksie próby hydrolizatu dodano 500 μ L 0,03M wodnego roztworu kwasu 2,4,5-trójnitrobenzanosulfonowego (TNBS). Następnie próby pozostawiono w zaciemnionym miejscu na czas 2 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie dodano r-r stabilizujący (0,1 M r-r NaH_2PO_4 , zawierający 1,5 mM Na_2SO_3) i wykonano pomiar

absorbancji przy długości fali $\lambda = 420$ nm. Ilość wolnych grup aminowych odczytano z krzywej wzorcowej sporządzonej dla znanych stężeń roztworu glicyny.

2.9 Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach RP-HPLC

Analizę profili peptydowych RP-HPLC wykonano z wykorzystaniem chromatografu Agilent Technologies 1200 series. Rozdział składników hydrolizatów przeprowadzono na kolumnie Zorbax XDB-C18 (1,8 μ m; 4,6 x 50 mm), w układzie 0,1 % roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA) w wodzie (A) i 0,1 % roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA) w acetonitrylu (B), przy liniowym gradiencie fazy B wynoszącym 10% B/minutę (od 0 % do 100% B) w temperaturze 25° C i przepływie wynoszącym 0,8 ml/min. Eluenty monitorowano przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

2.10 Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej jako zdolności do wymiatania wolnych rodników DPPH (Yen i Chen 1995)

Hydrolizaty odpowiednio rozcieńczono w wodzie do objętości 1 mL i doprowadzono 0,1M HCl lub NaOH do pH 7.0. Następnie dodano 1 mL 96% etanol, wymieszano i dodano 500 μ L 0,3 mM etanolowego roztworu rodników DPPH. Po upływie 30 min zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 517$ nm. Aktywność antyoksydacyjną obliczono na podstawie krzywej standardowej sporządzonej dla Troloxu.

2.11 Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej metodą FRAP (Benzie i Strain 1996)

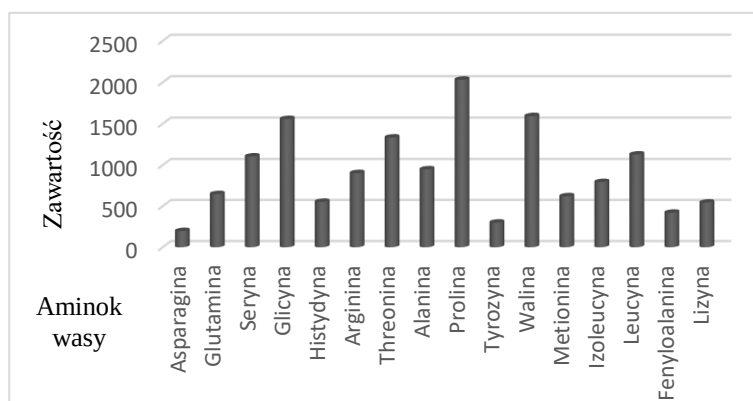
Do 3 mL odczynnika roboczego (10 mM TPTZ w 40 mM HCl, 20 mM FeCl₃, 0,3 M bufor octanowy o pH 3,6) dodano 1 mL hydrolizatu i wymieszano. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, zmierzono absorbancję roztworu przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Aktywność przeciwutleniającą wyrażono jako zdolność redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza Fe³⁺ do Fe²⁺. Stężenie jonów Fe²⁺ wyliczono w próbie na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla znanych stężeń FeSO₄.

2.12 Frakcjonowanie

Hydrolizaty frakcjonowano na membranach ultrafiltracyjnych Amicon Pro oraz Amicon Ultra o punktach odcięcia 30, 10 i 3k Da.

3. Wyniki i dyskusja

W liofilizacie błon podskorupowych oznaczono zawartość białka metodą Kiejdahla, która wyniosła 95,39%. Pod względem składu aminokwasowego preparat błon podskorupowych cechował się szczególnie wysoką zawartością proliny (2031,99 nM/mg), waliny (1592,71 nM/mg) i glicyny (1557,54 nM/mg) (Rys.1). Natomiast asparagina (196,95 nM/mg) i tyrozyna (299,74 nM/mg) stanowiły najniższy udział. Wysoki udział glicyny i proliny w składzie aminokwasowym wskazuje na znaczną zawartość kolagenu w badanym materiale. Aminokwasy te występują w powtarzających się sekwencjach charakterystycznych dla kolagenu (Czubak i Żbikowska 2014).



Rys.1. Skład aminokwasowy błon podskorupowych.

Przeprowadzono reakcje hydrolizy błon podskorupowych z udziałem papainy, pepsyny i proteazy z dyni figolistnej. Wykazano, że wraz z wydłużeniem czasu reakcji stopień hydrolizy wzrastał i najwyższe wartości dla każdego z wariantów uzyskano po 4 h reakcji (Tab. 1). Najwyższy finalny stopień hydrolizy odnotowano dla 4h hydrolizatu otrzymanego z udziałem proteazy z dyni figolistnej (9,77%), najniższy zaś dla pepsynowego hydrolizatu (4,76%).

Proteazy wykazują zróżnicowane zdolności do degradacji kolagenu. Enzymy trawienne człowieka nie hydrolizują helisowych obszarów kolagenu, które z kolei są podatne na działanie kolagenaz bakteryjnych. Proteazy roślinne mogą być wykorzystane do degradacji kolagenu, przy czym wykazują wyższą zdolność proteolityczną w stosunku kolagenu termicznie zdenaturowanego niż natywnego (Bailey et al. 1989). Uzyskane rezultaty znajdują częściowe potwierdzenie literaturowe. Martinez-Ortiz et. al (2015) dowiedli, że pepsyna i papaina działają jedynie na region niehelikalny łańcuchów polipeptydowych, co skutkowało stabilnością strukturalną oraz biologiczną aktywnością wyekstrahowanego kolagenu. Natomiast wyniki badań przeprowadzonych przez Krasnowską (2004) potwierdziły, że hydroliza kolagenu pochodzącego ze skór wieprzowych przy wykorzystaniu pepsyny prowadzona w pH=3, powodowała uwolnienie największej ilości białka do roztworu.

Tab.1. Stopień hydrolizy (DH%) w enzymatycznych hydrolizatach błon podskorupowych.

Czas [h]	Enzym		
	Papaina	Pepsyna	Enzym z dyni
0 (kontrola)	0a	0a	0a
0,5	5,41f	3,34b	5,57g
1	7,83i	3,57c	6,86h
2	8,17j	4,15d	9,77l
4	8,58k	4,76e	9,77l

Postęp hydrolizy potwierdzono także otrzymaniem przyrostu stężenia wolnych grup aminowych (Tab. 2). Najwyższymi zdolnościami do uwalniania tych grup cechowała się proteaza z dyni figolistnej (2,279 $\mu\text{M GLY/g}$), natomiast najniższymi pepsyna (1,551 $\mu\text{M GLY/g}$). Otrzymane wyniki potwierdzają, że niekomercyjna proteaza z dyni figolistnej posiada wysokie uzdolnienia proteolityczne. Silne właściwości proteolityczne tej proteazy potwierdzono między innymi względem kazeiny i białek jaja (Dryjański i in. 1990; Pokora i in. 2014). W prezentowanej pracy wykazano, że także z udziałem tej proteazy możliwa jest degradacja kolagenu, który jest białkiem bardzo opornym na działanie enzymów proteolitycznych.

Tab.2. Stężenie wolnych grup α -aminowych [$\mu\text{M GLY/g}$] w enzymatycznych hydrolizatach błon podskorupowych.

Czas [h]	Enzym		
	Papaina	Pepsyna	Enzym z dyni
0 (kontrola)	0a	0a	0a
0,5	1,51e	1,20c	1,38d
1	1,58g	1,07b	1,66h
2	1,54f	1,53ef	2,18i
4	1,60g	1,55fg	2,22j

Efektem hydrolizy enzymatycznej białek jest powstawanie produktów degradacji względem próby kontrolnej (chromatogram K), które zazwyczaj cechują się większą hydrofobowością niż białkowe substraty. Odzwierciedla się to obecnością w profilach peptydowo-białkowych hydrolizatów pików o krótszych czasach retencji niż piki odpowiadające degradowanemu białkom. Dlatego do oceny postępu reakcji często wykorzystuje się analizę RP-HPLC (Durham et al. 2015). Najbardziej odmienny profil peptydowy uzyskano dla papainowego hydrolizatu (PA), gdzie można zauważyć wyraźny przyrost pików, eluowanych w początkowym etapie rozdzielu (Rys.2). Odmienne profile peptydowe tych hydrolizatów świadczą także o odmiennej specyficzności enzymów, które uwalniały z błon podskorupowych produkty degradacji o odmiennej hydrofobowości.

Oceniono aktywność antyoksydacyjną enzymatycznych hydrolizatów z błon podskorupowych wykorzystując metodę z wolnymi rodnikami DPPH oraz FRAP. Wykazano, że największy potencjał antyoksydacyjny mierzony metodą FRAP posiadały hydrolizaty z największym stopniem degradacji białka (Tab. 3). Najwyższy poziom tej aktywności odnotowano dla 4-h hydrolizatu otrzymanego z zastosowaniem proteazy z dyni figolistnej (3,12 µg FeSO₄/mg białka).

Tab.3. Aktywność antyoksydacyjna oznaczona metodą FRAP [µg FeSO₄/mg białka] enzymatycznych hydrolizatów z błon podskorupowych.

Czas [h]	Enzym		
	Papaina	Pepsyna	Enzym z dyni
0 (kontrola)	0a	0a	0a
0,5	0a	0,75c	1,51d
1	0a	0,79c	1,83e
2	0a	0,65b	2,73f
4	0a	0,77c	3,12g

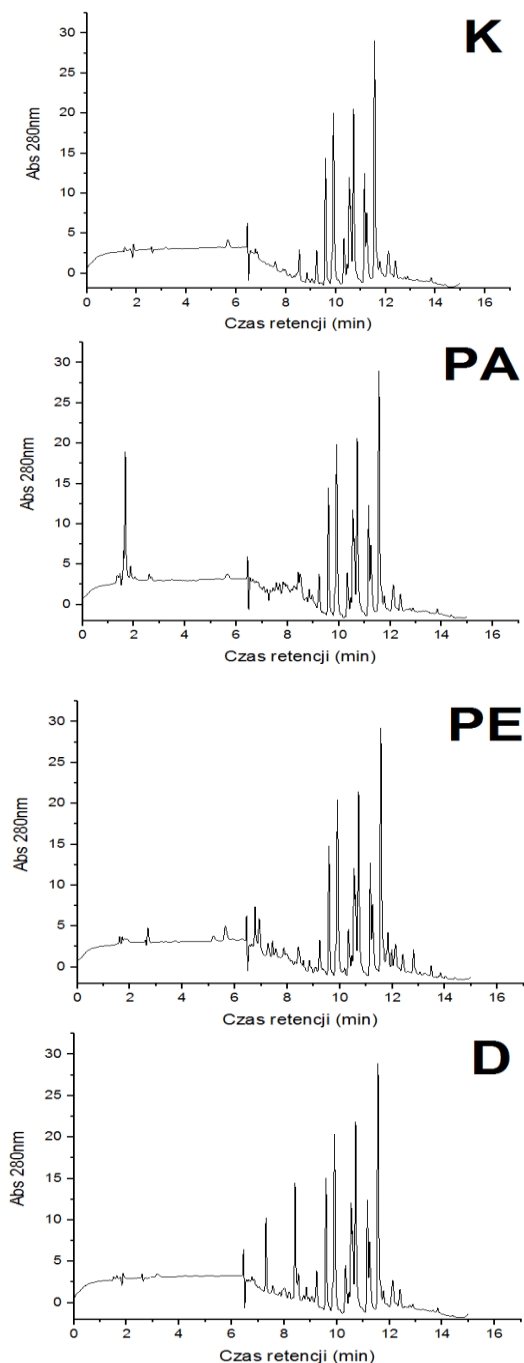
Z kolei hydrolizaty błon podskorupowych otrzymane z udziałem papainy charakteryzowały się najwyższą zdolnością do wymiatania wolnych rodników DPPH, która zwierzała się w zakresie od 0,0252. Do 0,0525 (µM Trolox/mg białka) (Tab. 4). Aktywność ta nie była wprost zależna od stopnia degradacji białka. Pozostałe hydrolizaty wykazały znacząco niższą zdolność do wymiatania tych rodników. W pracy potwierdzono aktywność antyoksydacyjną otrzymanych hydrolizatów. Dane literaturowe wskazują również, że hydrolizaty błon podskorupowych posiadają właściwości immunostymulujące i przeciwbakteryjne (Jiang et al. 2014).

Tab.4. Zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH [µM Trolox/mg białka] enzymatycznych hydrolizatów z błon podskorupowych.

Czas [h]	Enzym		
	Papaina	Pepsyna	Enzym z dyni
0 (kontrola)	0a	0a	0a
0,5	0,0252i	0,0119e	0,0019d
1	0,0454k	0,0145h	0,0007c
2	0,0525l	0,0136f	0,0004b
4	0,0386j	0,0138g	0,0001b

Celem częściowej charakterystyki pod względem mas cząsteczkowych produktów degradacji białek błon podskorupowych 4h hydrolizaty poddano frakcjonowaniu z zastosowaniem amikonu. Zastosowano sekwencję membran o punktach odcięcia 30, 10 i 3,0 kDa. Wykazano, że najwyższy udział w hydrolizatach mają produkty degradacji białka o masach cząsteczkowych

w zakresie od 30kDa do 10kDa. Z kolei najniższy udział w składzie hydrolizatów miały drobnocząsteczkowe frakcje o masach poniżej 3kDa. Dla hydrolizatów otrzymanych z udziałem papainy rozkład białek wynosił 30 kDa>64%>10 kDa, 10 kDa>33%>3 kDa, 3 kDa>3%. W przypadku hydrolizatów pepsyny jest to stosunek 30 kDa>54%>10 kDa, 10 kDa>36%>10 kDa, 3 kDa>3%. Natomiast w hydrolizatach enzymu z dyni 30 kDa>72%>10 kDa, 10 kDa>23%>3 kDa, 3 kDa>3%.



Rys.2. Profile peptydowo-białkowe hydrolizatów na RP-HPLC. **K** – kontrola, **PA** – papaina, **PE** – pepsyna, **D** – proteaza z dyni figolistnej.

4. Wnioski

Potwierdzono, że w składzie aminokwasowym błon podskorupowych dominują aminokwasy takie jak: prolina, glicyna i kwas glutaminowy. Wskazane aminokwasy: glicyna oraz prolina występują w powtarzających się sekwencjach kolagenu. Więc alternatywnym źródłem tego białka mogą być błony podskorupowe będące wraz ze skorupami odpadem przetwórstwa jaj.

Zastosowanie wytypowanych proteaz pozwoliło na uzyskanie zróżnicowanego stopnia degradacji białek błon podskorupowych. Najwyższymi uzdolnieniami proteolitycznymi względem tego substratu charakteryzowała się proteaza z dyni figolistnej.

Enzymatyczne hydrolizaty błon podskorupowych posiadały znaczną aktywność antyoksydacyjną, której poziom zależny był głównie od rodzaju proteazy oraz od stopnia hydrolizy.

5. Literatura

- Bailey AJ, Light ND (1989) *Connective Tissue in Meat and Meat Products*. Elsevier Science Publishers Ltd. London.
- Balaz M (2014) Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. Institute of Geotechnics.
- Benzie I, and Strain J (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Chrzanowska J, Kołaczowska M, (1998) Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. *Acta Mycol.*, 33, 277-285.
- Czubak K, Żbikowska H (2014) Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. *Ann. Acad. Med. Siles.* 68, 4: 245-254.
- Darewicz M, Borawska J, Minkiewicz P, i in. (2015) Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*: 3, 26-41
- Dryjański et al. (1990) Serine proteinase from cucurbita ficifolia seed: purification, properties, substrate specificity and action on native squash trypsin inhibitor (CMTI I). *Biol. Chem Hoppe Seyler* 371:889-896.
- Durham PL, Long FD, O'Reilly A, et al. (2015) Eggshell membrane hydrolyzates activate nF-κB in vitro: possible implications for in vivo efficacy. *Journal of Inflammation Research*: 8, 49-57.
- Jiang B, Kovacs-Nolan J, Mine Y, et al. (2014) Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of Functional Food*: 10, 35-45.
- Kołczak T, Surówka K (2004) Enzymatyczna hydroliza niestandardowych osłonek kolagenowych i odpadów powstających przy produkcji osłonek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*: 4, 72-78.
- Krasnowska G (2004) Charakterystyka funkcjonalnych i technologicznych właściwości preparatów kolagenowych uzyskiwanych metodą kwasowo-enzymatyczną. Wydawnictwo Akademii Rolniczej. Wrocław.
- Kuchroo CN, Rahilly J, Fox PF (1983) Assessment of Proteolysis in Cheese by Reaction with Trinitrobenzene Sulphonic Acid. *Irish Journal of Food Science and Technology*: (7) 2, 129-133.
- Łączkowska M, Grendaszewska D, Grzesiak E, i in. (2016) Przegląd metod ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych. *Technologia i Jakość Wyróbów* 61.
- Liong JWW, Frank JF, Bailey S (1997) Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella enteritidis* using confocal scanning laser microscopy. *J Food Prot.*
- Martínez-Ortiz MA, Hernández-Fuentes AD, Pimentel-González DJ, et al. (2015) Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. *Journal of food*: 13, 253-258.
- Nys Y, Gautron J, McKee MD, et al. (2001) Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *Worlds Poult Sci J.*
- Pokora, M., Zambrowicz, A., Dąbrowska, A., Eckert, E., Setner, B., Szołtysik, M., Szewczuk, Z., Zabłocka, A., Polanowski, A., Trziszka, T., Chrzanowska, J. (2014). An attractive way of egg

- white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. Food Chemistry. 151, 500-505.
- Ramshaw JAM, Peng YY, Glattauer V, et al. (2009) Collagens as biomaterials. J. Mater. Sci: Mater. Med.: 20, 3-8.
- Silvestre MPC (1997) Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chemistry (60) 2, 263-271.
- Yen GC, Chen HY (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 27-32.

18. Alternatywne metody izolacji yolkiny z żółtek jaj kurzych

Alternative methods of isolation of yolkin from hen's egg yolks

Michał Matysiak⁽¹⁾, Hanna Michalak⁽¹⁾, Łukasz Bobak⁽¹⁾, Agnieszka Zabłocka⁽²⁾, Aleksandra Zambrowicz⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,

⁽²⁾Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu im. Ludwika Hirszfelda

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Aleksandra Zambrowicz

Michał Matysiak: michal.matysiak@upwr.edu.pl

Słowa Kluczowe: immunoglobulina Y, witellogenina, polipeptydy z żółtka, immunomodulator, ekstrakcja

Streszczenie

Naturalne substancje wykazujące właściwości endogennych regulatorów budzą ogromne zainteresowanie, ponieważ mogą być alternatywą dla syntetycznych preparatów farmakologicznych. Przykładem takiej substancji jest yolkina występująca w żółtku jaja kurzego. Podjęto próbę usprawnienia procesu izolacji yolkiny, który jest długotrwały i efektywny w skali laboratoryjnej. Modyfikacje metody dotyczyły etapów wysalania, rozcieńczania oraz mrożenia. Zamiast sączenia molekularnego zastosowano ekstrakcję różnymi rozpuszczalnikami organicznymi lub chromatografię jonowymienną. Najwyższą wydajność izolacji kompleksu immunoglobuliny Y (IgY) i yolkiny uzyskano modyfikując etap wysalania, do którego użyto chlorek sodu. Z kolei na etapie rozdzielania yolkiny z kompleksu IgY + yolkina obserwowano odwrotną zależność pomiędzy wydajnością etapu a stężeniem rozpuszczalnika. Na podstawie analizy obrazów elektroforetycznych preparatów yolkiny wykazano, że zastosowanie rozpuszczalników do izolacji yolkiny jest bardziej skuteczne niż chromatografia jonowymienna, w wyniku której otrzymano preparaty yolkiny z przeważającym udziałem IgY.

1. Wstęp

Yolkina, która naturalnie występuje w kompleksie z immunoglobuliną Y (IgY) we frakcji plazmatycznej żółtka jaja, składa się z polipeptydów o masach cząsteczkowych w zakresie od kilku do 36 kDa. Cechuje się stosunkowo wysoką zawartością aminokwasów kwaśnych i śladową zawartością metioniny (Polanowski et al. 2013). Białkiem prekursorowym yolkiny jest witellogenina typu II, która ulega fragmentacji prawdopodobnie pod wpływem katepsyny D, podczas procesu formowania się jaja (Yamamura et al. 1995). Sekwencja N-końcowych fragmentów 6 oczyszczonych elektroforetycznie peptydów wykazała, że są one homologiczne do C-terminalnej domeny witellogeniny II. Frakcja o masie około 3700 Da odpowiada fragmentowi rozpoczynającemu się od pozycji 1732 a pozostałe o masach około 15600, 19300, 22800, 32000 i 36000 to glikoproteiny rozpoczynające się od pozycji 1572 sekwencji aminokwasowej białka prekursorowego (Polanowski et al. 2013). Yolkina wykazuje właściwości immunomodulacyjne i jest silnym induktorem komórek krwi ludzkiej do wydzielania kluczowych dla układu immunologicznego cytokin: TNF- α , IL-6 i IL-1 β (Polanowski et al. 2012; 2013).

Właściwości immunoregulatorowe yolkiny wynikają także ze zdolności pobudzania komórek makrofagowych linii J774 i mysich makrofagów BMDM do wydzielania tlenu azotu (Zambrowicz et al. 2018). Ostatnio wykazano, że yolkina posiada aktywność neuroprotekcijną poprzez stymulowanie komórek pełnej krwi obwodowej do wydzielania neurotrofyny – mózgowego neurotroficznego czynnika wzrostu (BDNF) oraz udział w procesach antyoksydacyjnych zachodzących w komórkach będących pod wpływem stresu oksydacyjnego (Zambrowicz et al. 2017; Zabłocka et al. 2018). Dodatkowo udowodniono prokognitywne działanie yolkiny na modelu

zwierzęcym (Lemieszewska et al. 2016). Stąd potrzeba opracowania metody izolacji yolkiny, która umożliwiłaby wprowadzenie tego potencjalnego preparatu farmakologicznego na rynek.

Celem pracy było otrzymanie yolkiny, stosując techniki, które można byłoby zastosować w skali przemysłowej.

2. Materiały i Metody

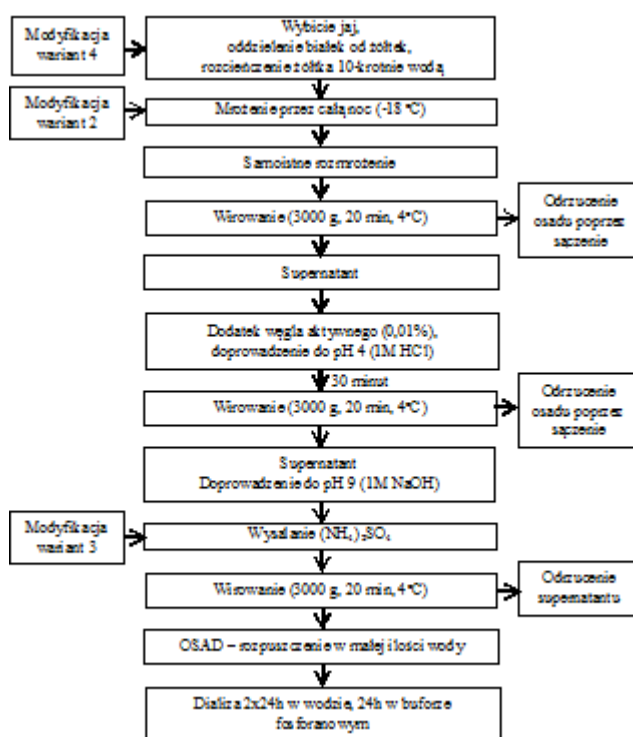
Materiałem badawczym były jaja kurze zakupione w lokalnym markecie.

2.1 Otrzymywanie yolkiny z jaj kurzych

Yolkinę izolowano z żółtek jaj według metody opisanej przez Polanowskiego et al. (2013) (Wariant 1).

2.2 Modyfikacje izolacji kompleksu IgY i yolkiny

Przeprowadzono trzy modyfikacje metody izolacji kompleksu IgY i yolkiny (Rys. 1.). Pierwsza dotyczyła etapów zamrażania i rozmrażania, które w odniesieniu do kontroli, zostały pominięte (Wariant 2). Druga modyfikacja metody zakładała zmiany w prowadzeniu procesu wysalania, w którym do wysalania białek zamiast klasycznego $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ użyto NaCl, pozostałe czynniki nie uległy zmianie (Wariant 3). Ostatnia modyfikacja dotyczyła początkowego etapu rozcieńczania, gdzie stosunek rozcieńczenia żółtka wodą destylowaną zmniejszono dwukrotnie (Wariant 4).



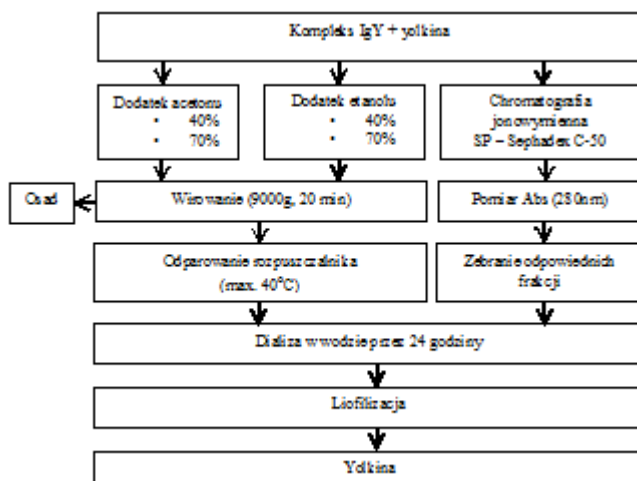
Rys. 1. Schemat izolacji kompleksu IgY i yolkiny oraz miejsca wprowadzenia modyfikacji. Jako Wariant 1 przyjęto yolkinę wyizolowaną według metody Polanowskiego et al. (2013).

2.3 Modyfikacje etapu izolacji yolkiny z kompleksu IgY + yolkina

Frakcjonowanie etanolem i acetonem

Proces frakcjonowania kompleksu IgY i yolkiny prowadzono z użyciem rozpuszczalników organicznych: aceton i etanol (Rys. 2.). Do materiału wyjściowego dodawano odpowiednio aceton

lub etanol w ilości pozwalającej otrzymać końcowe stężenia w próbach wynoszące 40% lub 70%. Próby pozostawiono na 60 minut w temp. pokojowej. Po tym czasie próby wirowano (9000g, 20 min., temp. 20°C). Następnie osad odrzucano a z supernatantów usuwano reagenty poprzez odparowanie ich w wyparce próżniowej (temp. max. 40 °C). Następnie próby wymrażano i poddano liofilizacji.



Rys.2. Etapy rozdzielania kompleksu IgY + yolkina.

Chromatografia cieczowa

Izolację yolkiny z kompleksu IgY + yolkina prowadzono z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej (Rys. 2.). Próbę nanoszono na kolumnę ze złożem SP-Sephadex C-50, uprzednio kondycjonowanym 0,05 M buforem octanowym o pH 3,5. Związane ze złożem białka i peptydy eluowano 0,05 M buforem octanowym o pH 3,5, zawierającym 1M NaCl. Proces prowadzono w gradiencie NaCl od 0 do 100%, wynoszącym 1%/min, w temperaturze pokojowej, przy przepływie równym 1 mL/min. Eluent zbierano w postaci frakcji (co 2 min), dla których mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Na podstawie analizy chromatogramu uzyskanego z pomiaru absorbancji, odpowiednie frakcje zlewano, dializowano do wody destylowanej przez 24h i liofilizowano.

2.4 Oznaczanie stężenia białka

Wydajność procesu wyrażono w % oznaczając udział białka w preparatach wg. spektrofotometrycznej metody Bradforda (1976).

2.5 Elektroforeza SDS-PAGE

Preparaty yolkiny analizowano jakościowo z wykorzystaniem elektroforezy białek wg. Laemmli (1970). Próby przygotowano warunkach denaturujących, następnie prowadzono elektroforezę w 12% żelu poliakryloamidowym.

3. Wyniki i dyskusja

Głównymi etapami izolacji yolkiny są: 10 x rozcieńczenie żółtek, wymrażanie, wirowanie, wysalanie plazmy i chromatografia żelowa (złożenie Sephacryl S-100 HR). Ze względu na duże rozcieńczenie żółtek, niewielką zawartość w nich yolkiny oraz długotrwałe sączenie molekularne, proces ten jest niedostatecznie wydajny i trudny do odtworzenia w skali przemysłowej. Podjęto próbę modyfikacji izolacji yolkiny celem skrócenia i usprawnienia procesu. Metodę izolacji yolkiny można podzielić na dwa zasadnicze etapy: otrzymywanie kompleksu IgY + yolkina oraz izolację yolkiny. W pierwszym etapie modyfikacje dotyczyły wysalania, rozcieńczania oraz mrożenia (Rys.1.). Natomiast w drugim etapie izolacji zamiast sączenia molekularnego zastosowano ekstrakcję różnymi rozpuszczalnikami organicznymi lub/i chromatografię jonowymienną (Rys.2.).

Wydajność izolacji kompleksu IgY + yolkina zawierała się w zakresie od 2,73% do 3,71% (Tab.1.). Najwyższą wydajność izolacji tego kompleksu uzyskano stosując klasyczną metodę wg. Polanowskiego et al. (2013). W obrębie modyfikacji najlepszą wydajność (3,54%) uzyskano zmieniając etap wysalania, do którego użyto NaCl.

Tab.1. Wydajność izolacji kompleksu IgY + yolkiny z żółtek jaj.

Wariant		W1	W2	W3	W4
Wodny roztwór żółtek	Białko całkowite [mg/V _{próby}]	60375	43440	66225	50050
Kompleks IgY + yolkina	Białko całkowite [mg/V _{próby}]	2244,0	1437,16	2345,7	1366,13
WYDAJNOŚĆ [%]		3,71	3,31	3,54	2,73

Z kolei na etapie rozdziału yolkiny z kompleksu IgY + yolkina, stosując frakcjonowanie acetonem i etanolem, obserwowano odwrotną zależność pomiędzy wydajnością etapu a stężeniem rozpuszczalnika (Tab.2.). Wydajność ta zawierała się w zakresie od 4,80 do 24,67%. Zaskakująco wysokie wydajności izolacji yolkiny uzyskano frakcjonując etanolem lub acetonem preparat wyjściowy, który uprzednio otrzymano poprzez wysalanie chlorkiem sodu.

Tab.2. Wydajność izolacji (ekstrakcji) yolkiny z kompleksu IgY + yolkina.

Stężenie etanolu	40%				70%			
Wariant	W1	W2	W3	W4	W1	W2	W3	W4
Białko całkowite [mg/V _{próby}]	186,6	90,65	578,57	83,35	107,6	99,64	370,26	83,35
Wydajność [%]	8,32	6,93	24,67	6,10	4,80	6,3	15,78	6,83
Stężenie acetonu	40%				70%			
Wariant	W1	W2	W3	W4	W1	W2	W3	W4
Białko całkowite [mg/V _{próby}]	213,2	123,8	324,31	88,8	152,02	119,1	241,33	91,56
Wydajność [%]	9,5	8,61	13,83	6,70	6,77	8,29	10,29	6,50

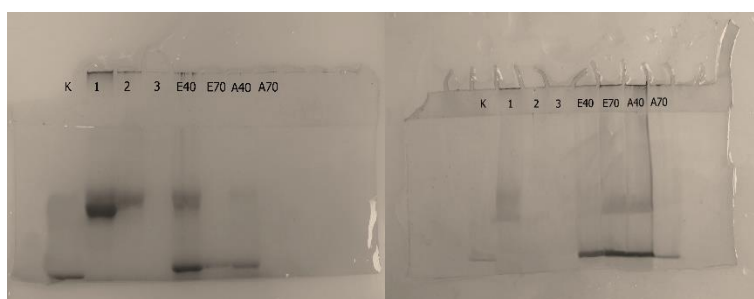
Chromatografia jonowymienna to kolejna zaproponowana w tej pracy metoda izolacji yolkiny, będąca alternatywą dla tradycyjnej chromatografii żelowej. Wydajność procesu wyznaczano osobno dla zebranych frakcji oznaczonych jako 2 i 3. Zawierała się ona w szerokim zakresie od 3,91 do 44,66% (Tab.3.). Znacznie większy udział w materiale wyjściowym miała frakcja eluowana z kolumny przy niższym gradiencie NaCl (frakcja 2), co odzwierciedla wydajność procesu. Modyfikacje metody otrzymywania kompleksu IgY + yolkina na etapach mrożenia i rozcieńczania (W2 i W3) spowodowały osiągnięcie znacznie większej wydajności izolacji yolkiny w odniesieniu do metody klasycznej (W1). Modyfikacja etapu wysalania, podczas której zastosowano NaCl wpłynęła niekorzystnie na wydajność dalszej izolacji yolkiny metodą chromatografii jonowymiennej (Tab.3.).

Na podstawie analizy obrazów elektroforetycznych preparatów yolkiny wykazano, że zastosowanie rozpuszczalników do jej izolacji jest bardziej skuteczne niż chromatografia

jonowymienna, w wyniku której otrzymano preparaty yolkiny z przeważającym udziałem IgY (Rys.3.). Próbę kontrolną stanowił preparat yolkiny wyizolowany z jaja metodą klasyczną. Jego obraz elektroforetyczny ujawnił obecność tylko jednego pasma białka odpowiadającego yolkinie.

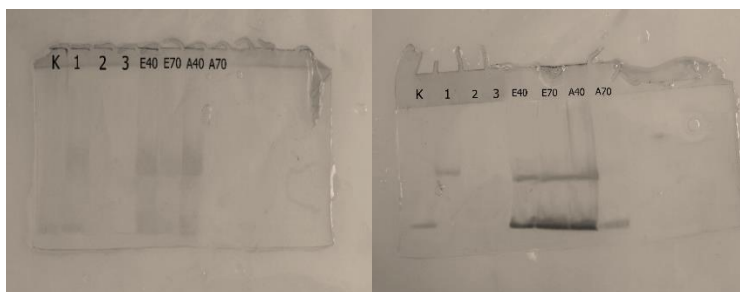
Tab.3. Wydajność izolacji yolkiny z kompleksu IgY + yolkina metodą chromatografii jonowymiennej.

Wariant	W1		W2		W3		W4	
Zbierana frakcja	2	3	2	3	2	3	2	3
Białko całkowite [mg/V _{próby}]	136,8	46,2	193,6	114	91	19,68	154,8	48,4
Wydajność [%]	28,69	9,69	41,76	24,59	18,10	3,91	44,66	13,96



a) Preparaty yolkiny wyizolowane z kompleksu IgY + yolkina otrzymanego wg wariantu 1

b) Preparaty yolkiny wyizolowane z kompleksu IgY + yolkina otrzymanego wg wariantu 2



c) Preparaty yolkiny wyizolowane z kompleksu IgY + yolkina otrzymanego wg wariantu 3

d) Preparaty yolkiny wyizolowane z kompleksu IgY + yolkina otrzymanego wg wariantu 4

Rys.3. Obrazy elektroforetyczne preparatów yolkiny. **K** – próba kontrolna, preparat czystej yolkiny otrzymany według metody Polanowskiego et al. (2013), **1** – frakcja niezwiązana ze złożem z chromatografii jonowymiennej, **2** – frakcja nr 2 z chromatografii jonowymiennej, **3** – frakcja nr 3 z chromatografii jonowymiennej, **E40** – ekstrakcja 40% etanolem, **E70** – ekstrakcja 70% etanolem, **A40** – ekstrakcja 40% acetonem, **A70** – ekstrakcja 70% acetonem.

Próby opracowania alternatywnej metody izolacji yolkiny z jaj kurzych podjęto stosunkowo niedawno (Zabłocka et al. 2014; Zambrowicz et al. 2017). Zabłocka et al. (2014) do wydzielenia yolkiny z kompleksu IgY + yolkina zastosowali ultrafiltrację w amikonie lub strącanie białek kwasem nadchlorowym. Otrzymano znacząco różniące się składem preparaty yolkiny, w odniesieniu do

preparatów otrzymanych w tej pracy. Obserwowano obecność dwóch głównych białek o masach cząsteczkowych wynoszących 20 i 37 kDa oraz kilku białek (MW 23, 24, 25 i 35 kDa), stanowiących mniejszy udział w preparatach (Zabłocka et al. 2014).

Z kolei w innych badaniach przeprowadzonych przez Zambrowicz et al. (2017) kompleks IgY i yolkina poddano precypitacji acetonem lub etanolem dodawanych do końcowych stężeń w próbie wynoszących: 50%, 60% i 70%. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia acetonu lub etanolu w próbie wydajność izolacji yolkiny, mieszcząca się w zakresie od 2,13- 4,59%, malała. Zatem wyniki otrzymane w tej pracy dobrze korespondują z wynikami opisanymi przez Zambrowicz et al. (2017). Zastosowanie alternatywnej metody izolacji yolkiny opracowanej przez Zambrowicz et al. (2017) pozwoliło na całkowite oddzielenie IgY od yolkiny. Efektywność izolacji wzrastała wraz ze wzrostem stężenia tych substancji w oczyszczanym materiale. W odróżnieniu do preparatów yolkiny otrzymanych w tej pracy, w preparatach uzyskanych przez Zambrowicz et al. (2017) znajdowały się dwie główne frakcje polipeptydowe o masach cząsteczkowych wynoszących około 35 i 40 kDa. Preparaty yolkiny otrzymane proponowaną metodą zachowały zdolność indukcji komórek krwi ludzkiej do wydzielania cytokin IL- 6 i IL -10. Ponadto wykazano, że yolkina wydzielona alternatywną metodą wykazuje właściwości neuroprotektoryjne, ponieważ wywiera korzystny wpływ na wydzielanie neurotrofyny BDNF przez komórki ludzkiej pełnej krwi obwodowej (Zambrowicz et al. 2017).

4. Wnioski

Zmiany etapu rozcieńczania oraz pominięcie wymrażania roztworu żółtka zastosowane w tej pracy wydają się być perspektywicznymi modyfikacjami, które mogą stanowić bazę do dalszych poszukiwań metody izolacji yolkiny z jaj kurzych, możliwej do zastosowania w skali przemysłowej.

5. Literatura

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7;72:248-54.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lemieszewska, M, Jakubik-Witkowska M, Zambrowicz, A et al. (2016) Pro-cognitive properties of the immunomodulatory polypeptide complex, yolklin, from chicken egg yolk and colostrum-derived substances: analyses based on animal model of age- related cognitive deficits. *Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis*, 64 (5), 425–434
- Polanowski A, Zabłocka A, Sosnowska A et al. (2013) Immunologically active peptides that accompany hen egg yolk IgY- separation and identification. *Biological Chemistry*, 394(7): 879–887.
- Polanowski A, Zabłocka A, Sosnowska A, et al. (2012) Immunoregulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y. *Poultry Science*, 91. 3091-3096.
- Yamamura J, Adachi T, Aoki N, et al. (1995) Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1244. 384-94.
- Zabłocka A, Sosnowska A, Urbaniak A, et al. (2014) Peptides accompanying chicken egg yolk IgY alternative methods of isolation and immunoregulatory activity. *Food & Function*, 5 (4), 724-733.
- Zabłocka A, Zambrowicz A, Macała J, el al. (2018) Yolklin polypeptide complex isolated from chicken egg yolk with potential neuroprotective and antioxidant activity. *Neuropsychiatry*, 8 (3) 833-842,
- Zambrowicz A, Zabłocka A, Bobak Ł, et al. (2017) A simple and rapid method of isolation of active polypeptide complex, yolklin, from chicken egg yolk. *Food Chemistry*, 230, 705–711,
- Zambrowicz A, Zabłocka A, Sudoł M, et al. (2018) The effect of carbohydrate moieties on immunoregulatory activity of yolklin polypeptides naturally occurring in egg yolk. *LWT Food Science and Technology*, 88,165-173.

19. Porównanie skuteczności prebiotyków i probiotyków w łagodzeniu zmian behawioralnych i immunologicznych wywołanych stresem u gryzoni

Comparison of prebiotics and probiotics effectiveness in alleviating behavioural and immunological changes induced by stress in rodents

Mazur Maciej, Ruciński Jan

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

Opiekun naukowy: dr hab. Edyta Jurkowlanec, prof. UG

Mazur Maciej: maciejmazur@interia.eu

Słowa kluczowe: oś jelitowo-mózgowa, mikrobiom, układ odpornościowy, behavior

Streszczenie

Mikrobiom jelitowy tworzy zespół żywych organizmów występujących m.in. w ludzkim układzie pokarmowym. Spośród tysiąca gatunków, większość przedstawicieli bakterii jest beztlenowcami, a najliczniej reprezentowane są typy *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Probiotyki to bakterie i drożdże wchodzące w skład mikrobiomu, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza. Prebiotyki należą do wyspecjalizowanej grupy włókien roślinnych zawierających głównie cukry złożone. Nie ulegają one trawieniu przez organizm, lecz stanowią pożywkę dla probiotyków, warunkując ich wzrost. Prebiotyki, probiotyki i niektóre ich metabolity mogą również modulować funkcjonowanie mózgowia, układu immunologicznego i endokrynnego. W niniejszej pracy przedstawiono i porównano działanie probiotyków i prebiotyków w kontekście łagodzenia zmian behawioralnych i immunologicznych wywołanych stresem.

1. Wstęp

Mikrobiom jelitowy stanowi zespół mikroorganizmów zasiedlających ludzki układ pokarmowy, na który składają się głównie bakterie komensalne. Bakterie te nie wykazują cech patogenności i odpowiadają przede wszystkim za utrzymanie prawidłowej pracy mikrobiomu, jak również układu pokarmowego i immunologicznego. Ponadto coraz więcej wyników badań potwierdza wpływ zmian w obrębie mikrobiomu na powstawanie chorób związanych ze stanami zapalnymi czy otyłością oraz na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), przede wszystkim za pośrednictwem osi jelitowo-mózgowej. Komunikacja ta obejmuje obukierunkowe szlaki endokrynnie, neuronalne i immunologiczne (Cryan i Dinan 2012, Ruciński i Myślińska 2016, Rudzki i Szulc 2013). Oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (PPN) jest głównym systemem regulacji odpowiedzi organizmu na stresory o charakterze psychicznym i fizycznym (w tym infekcje). Reakcja stresowa stanowi podstawowy mechanizm adaptacyjny do zmieniających się warunków środowiska. Efektem pobudzenia osi PPN jest wydzielanie glikokortykoidów z kory nadnerczy (kortyzolu u ludzi, kortykosteronu u gryzoni). Jednakże przewlekły stres może powodować zaburzenia zdolności poznawczych, mechanizmów odpornościowych, a także prowadzić do destabilizacji mikroflory jelitowej (Liang i in. 2015, McVey-Neufeld i in. 2017). Zwierzęta pozbawione mikrobioty jelitowej (ang. germ free, GF) lub poddane antybiotykoterapii wykazują zaburzenia nastroju, zachowań związanych z lękiem, funkcji poznawczych, a także aktywności osi PPN, zaś zastosowanie suplementacji probiotykami czy prebiotykami prowadziło do złagodzenia tych zaburzeń (Bravo i in. 2011). Badania takie potwierdzają istotną rolę mikrobiomu w regulacji funkcjonowania OUN. Poznanie i zrozumienie w jaki sposób bakterie komensalne oddziałują na oś jelitowo-mózgową może wpłynąć na rozwinięcie nowych terapii pomocniczych wykorzystywanych w leczeniu różnych zaburzeń, w tym również tych o podłożu neurogenym.

2. Mikrobiom jelitowy, probiotyki i prebiotyki

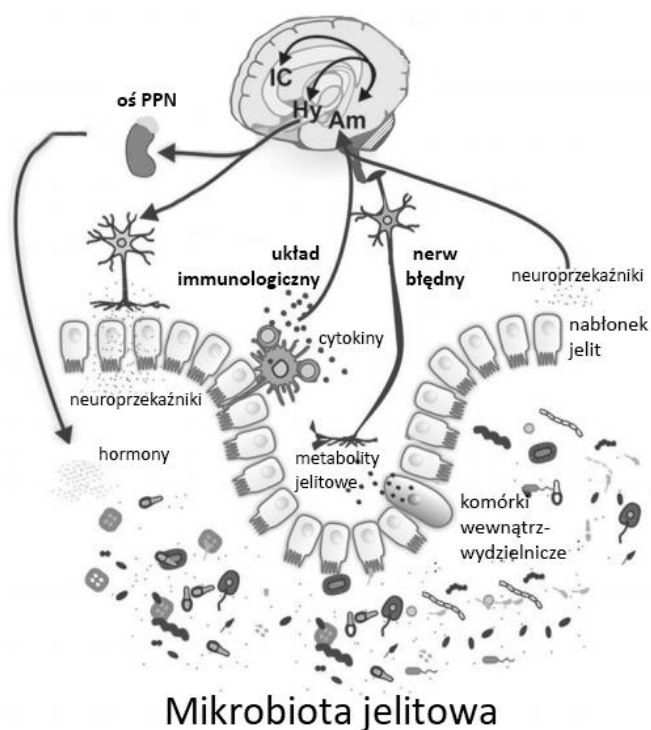
Liczebność bakterii jelitowych sięga nawet do tysiąca gatunków i stukrotnie przekracza liczbę komórek eukariotycznych tworzących ludzki organizm. Najwięcej mikroorganizmów zasiedla

jelito grube, występujące tam bakterie w większości są beztlenowcami. Najliczniejszymi przedstawicielami bakterii w mikrobiomie są typy: *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, które stanowią 70-75% mikroflory jelitowej (Liang i in. 2015). Zarówno komensalne, jak i patogenne drobnoustroje stymulują miejscową i ogólną odpowiedź odpornościową. Immunoglobuliny typu A (IgA) oraz mukopolisacharydy śluzu jelitowego tworzą warstwę chroniącą nabłonek jelit. Niwelując szkodliwe produkty powstające podczas niszczenia bakterii, zubożniają działanie toksyn i enzymów proteolitycznych, alergenów i składników pokarmu, które mają właściwości antygenowe. Bakterie jelitowe indukują wzrost wydzielania czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α), który oddziałuje na aktywność limfocytów i metabolizm komórek, jak również na apoptozę komórek nowotworowych (Gliński i Kostro 2015). Wyniki badań z ostatnich lat ujawniły, że bakterie same decydują o zasiedlaniu określonej niszy w wyniku procesu cross-talk i wpływają na ekspresję określonych gatunków gospodarza. W przypadku bakterii jelitowych można wykazać ich wpływ na powstawanie glikokoniugatów (pattern recognition receptors - PRPs), o wzorze pasującym do molekularnych wzorców mikrobiontów (microbiota-associated molecular patterns - MAMPs) na komórkach nabłonka jelit i komórkach układu immunologicznego (Binek 2011). Probiotyki to żywe bakterie i drożdże, które są niezbędne do zachowania prawidłowego funkcjonowania i utrzymania dobrego stanu zdrowia gospodarza. W jelitach żyją setki gatunków probiotycznych, głównie z rodzaju *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*) i *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longus*, *B. lactis*, *B. breve*). Probiotyki znajdują się w sfermentowanych produktach mlecznych (np. jogurty, kefir, maślanka), jak również w produktach kiszonych – w kapuście czy ogórkach. Efekty działania probiotyków zbliżone są do efektów uzyskiwanych w wyniku zastosowania antybiotyków paszowych. W obu przypadkach dochodzi do redukcji liczby bakterii patogennych, jednak metoda ich działania jest różna. Probiotyki jako naturalne stymulatory wzrostu nie powodują skutków ubocznych, odkładania się szkodliwych substancji obcych, stąd nie ma niebezpieczeństwa ich przedawkowania. Stosowanie naturalnych probiotyków przyczynia się do obniżenia dawkowania lub całkowitej eliminacji antybiotyków z diety zwierząt hodowlanych i tym samym do uzyskania bezpiecznej żywności. Biologiczny i biochemiczny mechanizm działania probiotyków jest różnorodny i pełni różnorakie funkcje w organizmie ludzi lub zwierząt. Mikroorganizmy probiotyczne wpływają na rozkład i fermentację niestrawionych resztek pokarmowych, biorą udział w wytwarzaniu niezbędnych związków dla gospodarza (m.in. witamin i aminokwasów), wpływają na kontrolę snu, ciągłości nabłonka jelit, zapewnienie wczesnej odpowiedzi immunologicznej oraz utrzymanie prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego (Cryan i Dinan 2012, Śliżewska i in. 2006). Prebiotyki to wyspecjalizowana grupa włókien roślinnych lub związków pochodzących z mleka zawierających cukry złożone, do których należą głównie fruktooligosacharydy (FOS) i galaktooligosacharydy (GOS). Nie są one trawione przez organizm, lecz stanowią pożywkę dla probiotyków, promując ich wzrost. Bogatymi w prebiotyki są korzeń cykorii, guma arabska, owies, szparagi i rośliny strączkowe. Prebiotyki w produktach spożywczych funkcjonują jako błonnik pokarmowy. Każdy z tych terminów dotyczy składnika pokarmowego, który nie podlega strawieniu w przewodzie pokarmowym, z tą różnicą, że prebiotyki są fermentowane przez określone bakterie mikrobiomu, zaś błonnik pokarmowy wykorzystywany jest przez większość mikroorganizmów bytujących w okrężnicy. Stąd też wszystkie prebiotyki stanowią błonnik pokarmowy, lecz nie każdy błonnik jest prebiotykiem. Do błonnika pokarmowego zalicza się wielocukry nieskrobiowe: celulozę, hemicelulozę, pektyny, gumy, czy substancje uzyskiwane z glonów morskich, jak również FOS, GOS, ksylooligosacharydy, izomaltooligosacharydy, laktulozę, oligosacharydy sojowe, skrobie oporne, inuliny oraz pektyny. Produkty, będące połączeniem prebiotyków i probiotyków nazywane są synbiotykami (Śliżewska i in. 2013).

3. Oś jelitowo-mózgowa oraz relacje pomiędzy jej elementami

Oś jelitowo-mózgowa obejmuje dwukierunkową, bezpośrednią i pośrednią komunikację pomiędzy mikrobiotą jelitową a OUN, wśród której wyróżnić można szlaki hormonalne, immunologiczne i neuronalne. Główne elementy osi to: jelitowy układ nerwowy, nerw błędny, układ neuroendokrynnny (przede wszystkim oś PPN), układ immunologiczny oraz metabolity mikroorganizmów jelitowych (Rys. 1). Mikrobiom może wchodzić w interakcje z układem

neuroendokrynnym gospodarza, co powoduje modyfikacje jego zachowania. Ponadto, mikrobiota jelitowa wytwarza kilka metabolitów hormonopodobnych, które dostają się do układu krążenia i mogą oddziaływać w odległych miejscach i narządach, w tym w mózgu (Cussotto i in. 2018). We wczesnym okresie rozwoju układ nerwowy, a szczególnie mózgowie jest najbardziej plastyczne i wrażliwe na wydarzenia o charakterze stresowym, które wywierają długotrwały wpływ na OUN. Jądro przykomorowe podwzgórza (PVN), wydzielając kortykoliberynę (ang. corticotrophin-releasing factor, CRF) w odpowiedzi na stres, indukuje sekrecję hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z komórek przysadki do krążenia ogólnoustrojowego. ACTH następnie wzbudza wydzielanie glikokortykoidów z kory nadnerczy - kortyzolu u ludzi i kortykosteronu u gryzoni. Hormony te oddziałują na układ immunologiczny, w tym na sekrecję cytokin. Mogą również wpływać na zmianę składu mikrobioty oraz stan i ciągłość nabłonka jelit. Natomiast mikrobiom jelitowy może modulować obwodowy poziom cytokin. Sygnały takie są przekazywane za pośrednictwem nerwu błędnego do OUN, co w efekcie może wpływać na funkcje mózgowia, takie jak: nastrój, emocje czy procesy poznawcze. Ponadto niektóre produkty wtórne fermentacji bakteryjnej o działaniu neuroaktywnym, jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short-chain fatty acids, SCFA), stanowiące pozostałość niestrawionych węglowodanów, przedostając się do krwiobiegu mogą wpływać na funkcjonowanie mózgowia i zachowanie (Cryan i Dinan 2012, Cussotto i in. 2018, Johnson i Foster 2018).



Rys. 1. Oś jelitowo-mózgowa (schemat na podstawie Montiel-Castro i in., 2013; zmodyfikowano). Am – ciało migdałowe, Hy – podwzgórze, IC – kora wyspy, oś PPN – oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa.

4. Probiotyki i prebiotyki a zmiany behawioralne i immunologiczne wywołane stresem

Burokas i in. (2017) wykazali przeciwdepresyjne i przeciwlękowe właściwości FOS i GOS u myszy poddanych przewlekłemu, łagodnemu stresowi. Trzy tygodnie suplementacji tymi probiotykami wpłynęły na obniżenie poziomu zachowań lękowych w teście uniesionego labiryntu krzyżowego – zwierzęta suplementowane spędzały więcej czasu na otwartych ramionach aparatu testowego w porównaniu do myszy otrzymujących wodę. FOS i GOS spowodowały także redukcję

zachowań związanych z depresją w teście zawieszenia za ogon i teście wymuszonego pływania, co przejawiało się krótszym czasem bezruchu, kojarzonym z brakiem motywacji u pacjentów z depresją. Oddzielenie młodych gryzoni od matki jest wiarygodnym modelem stresu we wczesnym etapie życia. Stres wywołuje zmiany zarówno fizjologiczne, jak i behawioralne. Mikrobiota potomstwa oddzielonego od matki cechuje się zredukowaną bioróżnorodnością. Zbadano wpływ polidekstrozy (PDX) i GOS, samych lub w połączeniu z żywymi bakteriami *Lactobacillus rhamnosus* w szczurzym modelu stresu związanego z odseparowaniem od matki. Doświadczenie polegało na ocenie poziomu zachowań lękowych w teście otwartego pola oraz funkcjonowania pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa u dorosłych gryzoni. W badaniach wykazano, że suplementacja probiotykami, prebiotykami, jak i synbiotykami odwraca niekorzystne zmiany wywołane przez stres we wczesnym etapie życia, w tym redukuje poziom zachowań lękowych oraz korzystnie wpływa na procesy poznawcze szczurów (McVey-Neufeld i in. 2017). Przy wykorzystaniu bakterii ze szczepu *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 udowodniono, że suplementacja probiotykami przyczynia się do obniżenia behawioru lękowego u szczurów w teście uwarunkowanego obronnego zakopywania. Skuteczność suplementacji probiotykami w łagodzeniu zmian wywołanych stresem (drażnienie prądem) była porównywalna do wyników uzyskanych u zwierząt, którym podawano lek przeciwłękowy, diazepam. Natomiast u zdrowych ludzi w codziennych, normalnych warunkach przyjmujących probiotyki odnotowano obniżenie zachowań depresyjnych, lękowego, gniewu, agresji, a także spadek stężenia kortyzolu w osoczu (Messaudi i in. 2011).

W badaniach wykorzystujących ekstrakt z liści *Veronia amygdalina* zawierający prebiotyki (FOS i GOS) wykazano, że przyjmowanie doustne prebiotyków przez gryzonie, już po 7 dniach przyczynia się do zwiększenia ogólnej liczby leukocytów, w tym limfocytów odpowiedzialnych m.in. za wytwarzanie przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10) we krwi obwodowej w warunkach spoczynkowych (Im i in. 2016). Suplementacja doustna probiotykiem *Lactobacillus helveticus* NS8 promuje zwiększenie wydzielania przeciwzapalnej IL-10, regulując w ten sposób odpowiedź immunologiczną zaburzoną przez długotrwały stres spowodowany unieruchomieniem. Nie wykazano wpływu tego probiotyku na stężenie cytokin prozapalnych: TNF- α oraz interferonu gamma (IFN- γ). Aktywacja mechanizmów przeciwzapalnych przyczynia się do wywierania korzystnego wpływu na OUN - autorzy wykazali, że suplementacja probiotykiem przyczyniła się do przywrócenia poziomu serotoniny, noradrenaliny i czynnika troficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) u szczurów poddanych przewlekłemu stresowi (Liang i in. 2015). W przypadku zwierząt wystawionych na działanie stresu, odnotowano wyższe stężenie interleukiny 6 (IL-6) oraz TNF- α po stymulacji komórek odpornościowych konkanawaliną A, natomiast zwierzęta, którym podano mieszaninę FOS/GOS miały zbliżony poziom tych cytokin do zwierząt kontrolnych. Nie stwierdzono wpływu tych prebiotyków na stężenie IL-10 (Burokas i in. 2017). Zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) powoduje m.in. uszkodzenia układu pokarmowego, translokację drobnoustrojów i aktywację immunologiczną, które nie są całkowicie łagodzone przez terapię antyretrowirusową (ARV). Zwiększona zachorowalność i śmiertelność osób zakażonych wirusem HIV leczonych ARV jest związana z tymi dysfunkcjami. W celu wzmocnienia fizjologicznej bariery przewodu pokarmowego, leczono zakażone wirusem HIV makaki po 100 dniach od momentu zakażenia, wykorzystując ARV. Drugą grupę makaków leczono przy użyciu ARV i probiotyków, prebiotyków lub synbiotyków przez 60 dni. Leczenie synbiotyczne skutkowało zwiększeniem liczby i poprawą funkcji komórek prezentujących antygen (ang. antygen-presenting cell, APC) przewodu pokarmowego, wzmocnioną rekonstytucją i funkcjonalnością limfocytów T CD4+ i zmniejszonym zwłóknieniem pęcherzyków limfoidalnych w okrężnicy. Terapia synbiotyczna ARV u osób zakażonych wirusem HIV może poprawić funkcje odpornościowe przewodu pokarmowego i tym samym złagodzić następstwa zapalenia, ostatecznie poprawiając rokowania pacjentów (Klatt i in. 2013). Uważa się, że prebiotyki mogą być skutecznym narzędziem do walki z rakiem odbytu (ang. colorectal cancer, CRC). Dzięki rozległym metaanalizom stwierdzono, że spożycie ponad 27 g błonnika dziennie powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia CRC o 50% w porównaniu ze spożyciem mniejszym niż 11 g. Wykazano, że fruktany, np. inulina, obecne w żywności takiej jak czosnek, cebula, szparagi i karczoch zwiększają liczebność bakterii z rodzaju

Bifidobacterium i stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) w świetle jelita. Wykazano, że inulina i oligofruktoza zmniejszają ekspansywność raka okrężnicy indukowanego 1,2-dimetylohydrazyną u szczurów. Dalsze badania wykazały zdolność prebiotycznej opornej skrobi typu 3 (Novelose 330) do zmniejszenia częstości występowania karcynogenezy okrężnicy poprzez indukowaną apoptozę uszkodzonych komórek u szczurów. Efekt ten przypisano zwiększonej produkcji maślanu – jednego z metabolitów bakteryjnych. W innym badaniu spożycie modyfikowanych otrębów ryżowych z arabinoksydanu wpłynęło na zwiększenie aktywności komórek natural killer (NK) – limfocytów o właściwościach cytotoksycznych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Świadczy to o zdolności prebiotyków do zwiększenia odpowiedzi immunologicznej i przeciwnowotworowej gospodarza (Fotiadis i in. 2008). Przeprowadzono również badania mające na celu ocenę długotrwałych skutków suplementacji synbiotykami u noworodków. Badania przeprowadzono w latach 2000-2003 na ciężarnych kobietach, których dzieci z dużym prawdopodobieństwem obciążone będą alergiami. Zostały one przydzielone do dwóch grup: w pierwszej, kobiety otrzymywały mieszaninę 4 gatunków bakterii probiotycznych (*Lactobacillus rhamnosus* GG i LC705, *Bifidobacterium breve* Bb99 i *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii*) z galaktooligosacharydami, zaś druga grupa otrzymywała placebo. Suplementacja trwała przez 4 tygodnie przed planowanym porodem i 6 miesięcy po urodzeniu. Spośród 925 niemowląt zaobserwowano, że dzieciom suplementowanym synbiotykami rzadziej przepisywano antybiotyki w porównaniu do dzieci suplementowanych placebo (23% vs 28%), jak również infekcje układu oddechowego występowały w mniejszym stopniu: 3,7% vs 4,2% (Kukkonen i in. 2008).

5. Podsumowanie

Zarówno probiotyki, prebiotyki jak i synbiotyki przyczyniają się do niwelowania zmian wywołanych stresem. Na poziomie behawioralnym redukują poziom zachowań lękowych i objawów przypominających depresję oraz oddziałują korzystnie na pamięć przestrzenną u gryzoni. Suplementacja probiotykami, prebiotykami oraz synbiotykami wywiera pozytywny wpływ na układ immunologiczny. Wyniki badań sugerują, że probiotyki indukują odpowiedź przeciwzapalną, natomiast prebiotyki wpływają na obniżenie poziomu mediatorów zapalnych. Przyjmowanie probiotyków promuje wzrost jednego lub kilku gatunków korzystnych bakterii, podczas gdy prebiotyki przyczyniają się do namnażania wszystkich bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz niektórych gatunków z rodzaju *Lactobacillus* (Savignac i in. 2016). Korzystny wpływ probiotyków, probiotyków i synbiotyków na organizm człowieka został potwierdzony w wielu pracach, w związku czym mogą one stanowić istotny element diety o właściwościach terapeutycznych u pacjentów z zaburzeniami immunologicznymi i behawioralnymi spowodowanymi stresem.

6. Literatura

- Binek M. (2012) Mikrobiom człowieka—zdrowie i choroba. Post. Mikrob. 51: 27-36.
- Bravo JA, Forsythe P, Chew MV et al. (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proc. Natl Acad. Sci. USA 108: 16050–16055.
- Burokas A, Arbolea S, Moloney RD et al. (2017) Targeting the microbiota-gut-brain axis: prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. Biol. Psychiatry 82: 472–487.
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 13: 701-712.
- Cusotto S, Sandhu KV, Dinan TG et al. (2018) The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective. Front. Neuroendocrinol., pii: S00913022(18)30039-6. [Epub ahead of print]
- Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG et al. (2008) Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 14: 6453.
- Gliński Z, Kostro K. (2015) Mikrobiom – charakterystyka i znaczenie. Życie Weterynaryjne 90: 446-450.

- Im E, Ae A, Bn U et al. (2016) Immuno-modulatory properties of prebiotics extracted from *Vernonia amygdalina*. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 13: 11-17.
- Johnson KV, Foster KR (2018) Why does the microbiome affect behaviour? *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 647-655.
- Klatt NR, Canary LA, Sun X et al. (2013) Probiotic/prebiotic supplementation of antiretrovirals improves gastrointestinal immunity in SIV-infected macaques *J. Clin. Invest.* 123: 903-907.
- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T et al. (2008) Long-term safety and impact on infection rates of postnatal probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics* 122: 8-12.
- Liang S, Wang T, Hu X et al. (2015) Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* 310: 561-577.
- McVey-Neufeld KA, O'Mahony SM, Hoban AE et al. (2017) Neurobehavioural effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. *Nutr. Neurosci.* 27: 1-10.
- Messaoudi M, Lalonde R, Violle N et al. (2011) Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.*, 105: 755-764.
- Ruciński J, Myślińska D (2016) Strategie badawcze wykorzystywane w ocenie wpływu mikrobiomu na oś jelitowo-mózgową w regulacji procesów fizjologicznych i patologicznych. *Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców* 8: 70-74.
- Rudziński L, Szulc A (2013) Wpływ jelitowej flory bakteryjnej na ośrodkowy układ nerwowy i jej potencjalne znaczenie w leczeniu zaburzeń psychicznych. *Farmakoter. Psychiatr. Neurol.* 2: 69-77.
- Savignac HM, Couch Y, Stratford M et al. (2016) Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL-1 β levels in male mice. *Brain Behav. Immun.* 52: 120-131.
- Śliżewska K, Biernasiak J, Libudzisz Z (2006) Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej* 984: 79-81.
- Śliżewska K, Nowak A, Barczyńska R et al. (2013) Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 1: 5-20.

20. Komunikacja pomiędzy mikrobiomem jelitowym a ośrodkowym układem nerwowym – rola nerwu błędnego

Communication between the intestinal microbiome and the central nervous system - the role of the vagus nerve

Mazur Maciej, Ruciński Jan

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
Opiekun naukowy: dr hab. Edyta Jurkowlanec, prof. UG

Mazur Maciej: maciejmazur@interia.eu

Słowa kluczowe: mikrobiom jelitowy, ośrodkowy układ nerwowy, nerw błędny

Streszczenie

Między ośrodkowym układem nerwowym a mikrobiotą jelitową występuje dwukierunkowa, bezpośrednia i pośrednia komunikacja, wśród której wyróżnić można szlaki hormonalne, immunologiczne i neuronalne. Głównym elementem szlaku neuronalnego jest nerw błędny, najdłuższy z nerwów czaszkowych, unerwiający niemal wszystkie narządy jamy brzusznej, uznawany obecnie za regulator stanów motywacyjnych i emocjonalnych. Najnowsze badania polegające na modulacji aktywności poszczególnych, doośrodkowych dróg nerwu błędnego przeprowadzono przy użyciu technik optogenetycznych. Wykazano istotną rolę nerwu błędnego w komunikacji pomiędzy jelitami a ośrodkowym układem nerwowym (OUN) w kontekście procesów o charakterze emocjonalnym, motywacyjnym i napędowym. Odkrycie konkretnych połączeń neuronalnych nerwu błędnego zaangażowanych w szybką aktywację mózgowego układu nagrody, otwiera możliwości dla nowych, bardziej specyficznych terapii zaburzeń odżywiania, a także zaburzeń emocjonalno-motywacyjnych.

1. Wstęp

Nabłonek jelit człowieka zawiera ponad 100 milionów komórek nerwowych, stąd często jelitowy układ nerwowy bywa określany mianem „drugiego mózgu”. Mikrobiom jelitowy (zespół mikroorganizmów zasiedlających jelita) komunikuje się z mózgiem, wydzielając do krwioobiegu hormony, które w ciągu około 10 minut informują nas o głodzie lub sytości (Zanchi i in. 2017). Nowe badania ujawniają, że jelita posiadają znacznie bardziej bezpośrednie połączenie z ośrodkowym układem nerwowym (OUN) poprzez grupę neuronów odpowiadających za przekazywanie sygnału w zaledwie kilka sekund. Nerw błędny, najdłuższy z nerwów czaszkowych, zbudowany jest z włókien ruchowych i czuciowych przechodzących przez szyję i klatkę piersiową do narządów jamy brzusznej. Dotychczas uważano, że nerw ten pośredniczy wyłącznie we wpływie hamującym (związanym z układem przywspółczulnym) na funkcjonowanie jelit, wiążącym się z poczuciem sytości. Natomiast za przekazywanie sygnałów z jelit do mózgowia (w tym również do limbicznego układu nagrody) odpowiadać miały głównie hormony krążące we krwi obwodowej. Wykazano jednak istnienie populacji neuronów tzw. „neuronów nagrody”, znajdujących się wśród komórek czuciowych prawej gałęzi nerwu błędnego. W efekcie udowodniono, że pobudzenie nerwu błędnego, a dokładnie jego górnej gałęzi jelitowej, skutkuje silnym pobudzeniem neuronów nagrody leżących w podkorowych strukturach mózgowia (Han i in. 2018). Komórki enteroendokrynowe (EEC) stanowią część układu neuroendokrynnego przewodu pokarmowego, który wytwarza ponad 100 rodzajów peptydów o aktywności hormonalnej. Peptydy te są wydzielane przez EEC w odpowiedzi na składniki odżywcze, aromaty i produkty metabolizmu bakterii. Niedawno wykazano, że EEC są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, utrzymania homeostazy, jak również pełnią istotną rolę w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Ostatnio wiele uwagi poświęcono funkcji tych komórek, ze względu na to, że kilka hormonów żołądkowo-jelitowych moduluje wydzielanie insuliny i przyjmowanie pokarmu, co może mieć ogromne znaczenie w kontekście opracowania nowych terapii w leczeniu cukrzycy (Bohórquez i Liddle 2011).

2. Nerw błędny – główny neuronalny szlak komunikacyjny pomiędzy jelitami a mózgiem

Gałęzie żołądkowo-jelitowe nerwu błędnego uważane są za rdzeń osi jelitowo-mózgowej, jednak jedyną funkcją przypisywaną drogom aferentnym nerwu błędnego było przekazywanie sygnałów pochodzących z trawienia pokarmu do OUN, co stanowiło główny mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego w regulacji wielkości przyjmowanych posiłków (Schwartz 2000). W tym klasycznym ujęciu, nerwy aferentne jelita, odbierając sygnały mechaniczne i chemiczne, wpływały na układ nagrody poprzez angażowanie końcowych dróg docierających do międzymózgowia (Norgren i Smith 1988, Schwartz 2000). Warto dodać, że to komponenta hormonalna, a nie neuronalna związana z transmisją poprzez nerw błędny, była zwykle utożsamiana z przekazywaniem sygnałów dotyczących odczuwania przyjemności do mózgowia (Sclafani 2013). Stosunkowo niedawno zaczęto rozpatrywać rolę osi jelitowo-mózgowej oraz nerwu błędnego znacznie szerzej, przede wszystkim potwierdzono ich udział w modulowaniu procesów neuropsychologicznych, do których zaliczamy zachowania lękowe, depresję, funkcje poznawcze oraz reakcje o charakterze motywacyjno-napędowym (Mayer 2011, Sharon i in. 2016). Pomimo tego, połączenia nerwowe, pozwalające żołądkowi i jelitom na kontrolę nad procesami motywacyjnymi i emocjonalnymi, nie zostały szczegółowo oznaczone. Postępy w tej dziedzinie znacznie ograniczały trudności techniczne związane z wyizolowaniem gałęzi nerwu błędnego w środowisku pozaustrojowym (de Lartigue i Diepenbroek 2016). Aby odpowiedzieć na nurtujące pytania, Han wraz z zespołem (2018) posłużyli się wektorami wirusowymi i przy pomocy technik optogenetycznych scharakteryzowali funkcje behawioralne i ośrodkowe jelitowych aferentnych gałęzi nerwu błędnego. Metody optogenetyczne polegają na wprowadzeniu do komórki nerwowej egzogennych kanałów jonowych, które następnie ulegają wbudowaniu w błonę neuronu i reagują otwarciem na bodziec świetlny. Efektem tego jest przepływ jonów, a w konsekwencji aktywacja bądź inhibicja neuronu. Wykorzystywanymi w optogenetyce kanałami błonowymi są opsyny. Występują one w naturze u niektórych mikroorganizmów, które aby przetrwać w trudnych warunkach środowiska oraz ze względu na utrudniony dostęp do światła, produkują różne typy opsyn, czyli białek światłoczułych. Do takich organizmów należą m.in. jednokomórkowe zielenice, jak *Chlamydomonas reinhardtii* bytująca w glebie i słodkowodnych zbiornikach wodnych, czy też zielenice z rodzaju toczkowatych *Volvox* tworzące sferyczne cenobia. Opsyny wytwarzają także halobakterie żyjące w ekstremalnych warunkach jak wysoko zasolone jeziora Egiptu czy Kenii. Kanały błonowe w postaci opsyn u wymienionych mikroorganizmów regulują przepływ jonów pomiędzy wnętrzem a zewnątrz komórki, co generuje różnicę potencjału elektrycznego po obydwu stronach błony celem pozyskania energii ze środowiska. Różne typy opsyn różnią się wrażliwością na światło – reagują na światło o określonej długości fal. Najpopularniejszymi białkami światłoczułymi wykorzystywanymi w neurobiologii są mutanty czyli inne warianty białek światłoczułych (tab. 1), które ulepszone metodami inżynierii genetycznej (np. substytucja aminokwasów w sekwencji białka) przez co różnią się one wrażliwością na światło i zastosowaniem. Do manipulacji takich należy np. skrócenie lub wydłużenie czasu zamknięcia kanału co zmienia ich parametry i zastosowanie (Deisseroth 2010, Deubner i in. 2019).

W badaniach nad rolą nerwu błędnego w komunikacji jelita-mózg, wykorzystano techniki optogenetyczne, aby manipulować pobudliwością tylko tych części nerwu błędnego, które odpowiadają za przekazywanie sygnałów z jelit. W tym celu najpierw transfekowano żołądek i dwunastnicę myszy typu dzikiego za pomocą transportowanego wstecznie wirusa związanego z adenowirusem, niosącego konstrukt rekombinazy Cre z białkiem niebieskiej fluorescencji (Cre-EBFP). W ten sposób rekombinaza Cre była wstecznie i obustronnie transportowana do zwojów czuciowych nerwu błędnego, a dokładniej do zwojów węzłowych (ganglion nodosum, NG). Następnie osobno transfekowano prawy i lewy zwój nerwu błędnego (NG) przez iniekcję wirusa niosącego konstrukt wrażliwego na światło kanału depolaryzacyjnego Channelrhodopsin2 (DIO-ChR2), indukowany obecnością Cre. Do struktur pnia mózgu: pola najdalszego (AP) lub jądra pasma samotnego (NTS), nad zakończeniami neuronów NG, zaimplantowano światłowodowy, dzięki którym możliwe było oddziaływanie impulsami laserowymi na światłoczułe kanały jonowe. Aby sprawdzić,

czy iniekcje zostały poprawnie wykonane przy pomocy mikroskopii konfokalnej sprawdzono współwystępowanie białka Cre i kanałów rodopsynowych (ChR2) w prawym zwoju węzłowym nerwu błędnego (R-NG). Następnie sprawdzono, czy stymulacja światłem powoduje pobudzenie transfekowanych neuronów. W tym celu zaimplantowano elektrody rejestrujące pobudzenie neuronów. Po pozytywnej weryfikacji obu tych założeń, zbadano behawioralne efekty pobudzenia R-NG w kontekście aktywacji układu nagrody za pomocą testu preferencji miejsca. Początkowo zwierzęta mogły swobodnie eksplorować aparat testowy (Pre-test) i z podobną częstością pojawiały się w obu jego częściach. W przypadku testu właściwego, kiedy obecność zwierząt w prawej części aparatu testowego inicjowała stymulację światłem, myszy istotnie statystycznie częściej przebywały w tych miejscach, w których aktywowany był laser. Kolejnym efektem behawioralnym świadczącym o silnym pobudzeniu układu nagrody była samostymulacja. Badacze sprawdzali czy myszy będą naciskać tę dźwignię, która prowadziła do emisji impulsów laserowych. Okazało się, że szybka aktywacja optyczna zakończeń R-NG nerwu błędnego powodowała u myszy zachowania związane z podtrzymywaniem samostymulacji. Zachowanie to było coraz silniejsze każdego kolejnego dnia testu i co ciekawe występowało także ostatniego dnia testu, pomimo wyłączanego lasera. Przy pomocy mikrodializ w połączeniu z detekcją elektrochemiczną wykazano również, że optyczna aktywacja neuronów czuciowych nerwu błędnego przekazujących sygnały z jelit indukuje uwalnianie dopaminy w strukturach układu nagrody. Dopamina wytwarzana w istocie czarnej śródmózgowia aktywuje prążkowie odpowiedzialne za reakcje motoryczne (wykonywanie czynności) oraz pobudza struktury układu nagrody (odczuwanie przyjemności, utrzymanie motywacji do dalszego wykonywania czynności). Podsumowując, badania te wykazały istotną rolę nerwu błędnego w komunikacji jelita-OUN w kontekście procesów o charakterze emocjonalnym, motywacyjnym i napędowym (Han i in. 2018).

Tab. 1. Opsyny wykorzystywane w neurobiologii, ich cechy i zastosowanie.

Opsyna i jej warianty	Źródło	Odpowiedź na światło	Zastosowanie
Ultrafast channelrhodopsin (ChR2) mutants	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm (maximum aktywacji)	Szybkie pobudzenie/hamowanie neuronów, bardzo duża precyzja mierzona w milisekundach do 200 razy/sek.
Step function opsins – zwiększenie czasu zamknięcia kanału (ultraslow ChR2 mutants)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm - pobudzenie; 546 nm – hamowanie (niektóre mutanty)	Aktywacja/dezaktywacja stanu wzbudzenia za pomocą krótkiego błysku światła; Ze względu na wysoką czułość, szczególnie użyteczne w badaniach, w których światło musi przeniknąć przez duże objętości tkanki, jak np. mózgowie ssaków.
VChR1 channelrhodopsin	<i>Volvox carteri</i>	535 i 589 nm	Wzbudzanie potencjałów czynnościowych; Ponieważ VChR1 reaguje na żółte światło, a ChR2 reaguje na zakres niebieski, oba typy opsyn są używane w połączeniu, aby jednocześnie kontrolować wzbudzenia w mieszanych populacjach neuronów.
Halorodopsyna (opsyna hamująca)	<i>Natronomonas pharaonis</i> (Halobacteriaceae)	580nm	Działa na zasadzie pompy Cl ⁻ (wyst. u Halobakterii) mającą zdolność do przenoszenia jonów Cl ⁻ lub protonów do wewnątrz komórki, co powoduje hiperpolaryzację.
OptoXRs	Syntetyczny kompleks rodopsyny sprzężony z białkiem G	500 nm	Szybka i zależna od typu komórek kontrola szlaków biochemicznych; może być wykorzystywana w badaniach na zwierzętach czuwających (wolno poruszających się).

3. Rola komórek enteroendokrynowych

Komórki enteroendokrynowe będące częścią układu neuroendokrynnego przewodu żołądkowo-jelitowego, są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zablockowanie różnicowania się EEC u myszy przez indukowane mutacje w neurogeninie-3 powoduje upośledzenie wchłaniania lipidów, zmniejszony przyrost wagi i wysoką śmiertelność podczas pierwszego tygodnia po porodzie. U ludzi mutacje neurogeniny-3 są związane z brakiem EEC w jelitach i trzustce, a także z zagrażającą życiu biegunką z powodu upośledzonej syntezy hormonów jelitowych (Mellitzer i in. 2010, Wang i in. 2006). Hormony te regulują niektóre podstawowe funkcje fizjologiczne, w tym: opróżnianie żołądka i wchłanianie składników odżywczych (np. cholecystokinina, CCK; peptydy tyrozyna tyrozyna, PYY), uczucie sytości i apetyt (np. PYY, CCK, grelina, oksyntomodulina), a także uwalnianie insuliny (np. glukagonopodobny peptyd-1, GLP-1; zależny od glukozy polipeptyd insulinotropowy, GIP). Wpływ na funkcje fizjologiczne poszczególnych hormonów jelitowych sprawiły, że EEC stały się atrakcyjnym celem opracowywanych terapii wykorzystywanych w leczeniu zaburzeń metabolicznych, zwłaszcza otyłości i cukrzycy. Jednak wiedza na temat biologii tych komórek nadal jest niewystarczająca. Dotychczas, EEC jelita cienkiego i grubego były trudne do scharakteryzowania ze względu na to, że w porównaniu do innych komórek nabłonka jelitowego, występują rzadziej, a ich ułożenie jest rozproszone. Badania nad EEC w dużej mierze odbywały się za pomocą metod pośrednich, takich jak: (1) pomiar poziomu hormonów w osoczu w odpowiedzi na spożycie pokarmu, składniki odżywcze lub leki; (2) zastosowanie nieśmiertelnych linii komórkowych (np. komórki STC-1), które mają wspólne cechy z EEC, ale nie są ułożone w ciągłą warstwę nabłonkową i mają zmieniony fenotyp; lub (3) identyfikacja EEC poprzez ich immunoreaktywność z przeciwciałami skierowanymi przeciwko peptydom hormonalnym, która jest w dużej mierze ograniczona przez liczbę przeciwciał pierwszorzędowych, które mogą być stosowane jednocześnie (co najwyżej trzy). Ponadto pęcherzyki hormonalne są zlokalizowane u podstawy komórki, a zatem barwienia immunohistochemiczne nie określają jej pełnej anatomii (wszystkich granic struktury). W konsekwencji, EEC są ogólnie uważane za komórki nabłonkowe w kształcie wrzecionowatym lub kolbkowatym, zawierające tylko jeden lub dwa typy hormonów (Bertrand 2009, Schwartz i Holst 2010). W 2010 roku neurobiolog Diego Bohórquez z Duke University w Durham w Północnej Karolinie dokonał zaskakującego odkrycia - komórki enteroendokrynowe posiadają wypukłości przypominające kształtem synapsy nerwowe oraz służące do komunikacji między komórkami. Dojelitowa iniekcja wirusa wścieklizny pozwoliła na obserwację drogi transportu wirusa, który posiada zdolność do przemieszczania się poprzez błony synaps neuronalnych. W efekcie otrzymano barwną odpowiedź nie tylko w EEC jelita, ale również gałęzi nerwu błędnego. Na szalce Petriego komórki enteroendokrynowe sięgały do neuronów nerwu błędnego, tworząc połączenie synaptyczne. Dodatkowo komórki te wydzielają glutaminian, neurotransmitter zaangażowany m.in. w rozpoznawanie smaku i zapachu, który został przyłączony do receptorów znajdujących się na błonie neuronów nerwu błędnego w ciągu 100 milisekund (Bohórquez i Liddle 2011). Ten rodzaj transportu okazał się szybszy niż w przypadku komunikacji hormonalnej z jelit do mózgowia za pośrednictwem krwioobiegu. Istnieją oczywiste zalety tak szybkiej sygnalizacji jelitowej uzasadniające jej udział w wykrywaniu związków toksycznych dla gospodarza, ale mogą istnieć inne korzyści wynikające z faktu, że OUN otrzymuje informacje o zawartości naszych jelit w czasie rzeczywistym. Opracowanie transgeniczných modeli myszy produkujących białko zielonej fluorescencji (GFP) pod wpływem specyficznych hormonów (np. PYY) rzuca światło na uprzednio pomijane właściwości EEC. Obecność wyrostków cytoplazmatycznych w EEC została po raz pierwszy opisana w komórkach wydzielających somatostatynę. Długie, rozgałęzione i bulwiasto zakończone wyrostki służą do dostarczania somatostatyny bezpośrednio do komórek wydzielających gastrynę i komórek okładzinowych żołądka na zasadzie działania parakrynnego. Wiadomo, że kilka EEC posiada w podstawie wyrostki, w tym komórki enterochromafinowe, należące do komórek rozsianego układu wewnątrzwydzielniczego grupy APUD. Znajdują się głównie w neuronach układu autonomicznego żołądka i jelit. Odpowiedzialne są za wytwarzanie takich substancji jak: serotonina, motylina, somatostatyna, substancja P, wazoaktyny, peptyd jelitowy, peptyd uwalniający gastrynę, komórki typu K wydzielające GIP, komórki I wydzielające CCK i komórki L (Raybould 2010).

W szczególności komórki L stanowią przedmiot zainteresowań w badaniach nad cukrzycą i otyłością, ponieważ wydzielają hormon stymulujący insulinę GLP-1 i hormon odpowiedzialny za uczucie sytości - PYY. Transgeniczny model myszy PYY-eGFP, pozwala na izolację komórek typu L spośród innych komórek nabłonka za pomocą selekcji poprzez aktywację fluorescencji w komórkach i identyfikację ich w tkance jelitowej przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej (Bohorquez i in. 2011). Powierzchnia wierzchołków większości EEC znajduje się w kontakcie ze światłem jelit. Składniki odżywcze obecne w świetle jelit mają bezpośredni kontakt z powierzchnią komórek endokrynnych, przez co stymulują wydzielanie hormonów. Jednak niektóre doniesienia sugerują, że wchłanianie składników odżywczych może stymulować procesy związane z wydzielaniem hormonów jelitowych (Bohorquez i in. 2011). Obecność wyrostków w części bazalnej komórek, może wpływać na wykrywanie obecności składników odżywczych za pośrednictwem określonych receptorów. Wiadomo, że EEC posiadają receptory dla składników odżywczych, jak również bakterii w tym bakterii jelitowych. Biorąc pod uwagę, że powierzchnie apikalne komórek L mają długość około 3 μm natomiast wyrostki bazalne powyżej 50 μm , można wysnuć hipotezę, że w wyrostkach mogą znajdować się przynajmniej niektóre z receptorów dla składników pokarmowych, które stymulują wydzielanie hormonów. Wykazano również, że resekcja jelita cienkiego szczura z lipidami stymuluje wydzielanie CCK, oraz że działanie to blokowane jest przez hamowanie tworzenia chylomikronów (Raybould i in. 1998). Badania immunohistochemiczne wykazały obecność niektórych receptorów kwasów tłuszczowych we wnętrzu EEC, a głównie w ich bazalnej części. Oprócz identyfikacji składników odżywczych w jelitach, szczytowa część komórek będąca w kontakcie ze środowiskiem światła jelit może reagować na cząsteczki pochodzenia bakteryjnego. Część receptorów bakteryjnych typu "Toll-like" (np. TLR 4, 5 i 9) ulega ekspresji w linii STC-1 w EEC, a stymulacja ligandami bakteryjnymi (np. lipopolisacharydem lub flageliną) powoduje wydzielanie CCK, chemokin pochodzenia keratynowego i β -defensyny-2 (Palazzo i in. 2007). Warto podkreślić, że cytokiny i defensyny są wydzielane z komórek STC-1 tylko w odpowiedzi na ligandy bakteryjne, a nie na kwasy tłuszczowe. Wyciszenie mediatora TLR MyD88 zmniejsza wydzielanie CCK stymulowane przez ligandy bakteryjne, ale nie przez kwasy tłuszczowe. Co ciekawe, genetyczna delecja genu kodującego TLR 5 u myszy indukuje fenotyp objawiający się hiperfagią i wszystkimi cechami zespołu metabolicznego (Vijay-Kumar i in. 2010). Wyrostki EEC ze względu na kształt „aksonalny” zaangażowane są w przekazywanie informacji elektrochemicznej do neuronów dochodzących do blaszki właściwej nabłonka jelit lub miofibroblastów podnabłonkowych na zasadzie połączenia komórka-komórka. Ponieważ jelita stanowią jedyny w swoim rodzaju ośrodek integracji czynników odżywczych i żywych mikroorganizmów (niczym bioreaktor organizmu), przyszłe działania mające na celu zrozumienie mechanizmów komunikacji EEC z komórkami w blaszce właściwej, mogą przyczynić się do badań nad nowymi strategiami leczenia m.in. zaburzeń metabolicznych.

4. Podsumowanie

Nowo zidentyfikowane „neurony układu nagrody” prawego odgałęzienia nerwu błędnego podlegają tym samym mechanizmom, które charakteryzują neurony ośrodkowego układu nagrody, co oznacza, że łączą one obwodowe komórki czuciowe z uprzednio zmapowanymi populacjami neuronów nagrody w mózgowiu. Neurony lewego odgałęzienia nerwu błędnego są związane z uczuciem sytości, ale nie z nagradzaniem. Dopamina jest przekaźnikiem nerwowym, o którym wiadomo, że jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu nagrody i motywacji-układu limbicznego mózgowia. Odkrycie specyficznych neuronów w żołądkowo-jelitowym odcinku nerwu błędnego jako przekaźników sygnałów nagrody do mózgu otwiera możliwość dla nowych, bardziej specyficznych terapii związanych ze stymulacją części układu nerwowego (a konkretnie jelitowego układu nerwowego), które mogą okazać się bardziej skuteczne. Terapie tego typu polegają na dostarczaniu impulsów elektrycznych do nerwu błędnego u pacjentów cierpiących na zaburzenia emocjonalne oraz zaburzenia odżywiania. Szczególnie poprzez wzgląd na to, że dotychczasowe terapie polegają na stymulacji jedynie lewych aferentów nerwu błędnego, ponieważ charakteryzują się one łatwiejszą dostępnością. Z kolei badania dotyczące komórek enteroendokrynowych mogą

przyczynić się do tworzenia leków ukierunkowanych na określone typy receptorów i modulację wydzielania hormonów odpowiedzialnych za regulację apetytu i wydzielania insuliny.

5. Literatura

- Bertrand P (2009) The cornucopia of intestinal chemosensory transduction . *Front. Neurosci.* 3: 1–9.
- Bohórquez D, Chandra R, Samsa L, et al. (2011) Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells . *J. Mol. Histol.* 1: 3–13.
- Bohórquez DV, Liddle RA (2011) Axon-like basal processes in enteroendocrine cells: characteristics and potential targets. *Clin Transl Sci.* 4: 387-391.
- de Lartigue G, Diepenbroek C (2016) Novel developments in vagal afferent nutrient sensing and its role in energy homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 31: 38-43.
- Deisseroth K (2010) Controlling the brain with light. *Sci. Am.* 303: 48-55.
- Deubner J, Coulon P, Diester I (2019) Optogenetic approaches to study the mammalian brain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57: 157-163.
- Han W, Tellez LA, Perkins MH, et al. (2018) A neural circuit for gut-induced reward. *Cell* 175: 665-678.
- Mayer EA (2011) Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat. Rev. Neurosci.* 12: 453-466.
- Mellitzer G, Beucher A, Lobstein V, (2010) Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J. Clin. Invest.* 120: 1708-1721.
- Norgren R, Smith GP (1988) Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. *J. Comp. Neurol.* 273: 207-223.
- Palazzo M, Balsari A, Rossini A, et al. (2007) Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion . *J. Immunol.* 178: 4296-4303.
- Raybould HE (2010) Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. *Auton. Neurosci.* 153: 41-46.
- Raybould HE, Meyer JH, Tabrizi Y, et al. (1998) Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation. *Am. J. Physiol.* 274: R1834-1838.
- Sclafani A (2013) Gut-brain nutrient signaling. Appetition vs. satiation. *Appetite* 71: 454-458.
- Schwartz GJ (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 2000 16: 866-873.
- Schwartz T , Holst B (2010) An enteroendocrine full package solution. *Cell Metabol.* 11: 445–447.
- Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, et al. (2016) The central nervous system and the gut microbiome. *Cell* 167: 915-932.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328: 228–231.
- Wang J, Cortina G, Wu SV, (2006) Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 355: 270-280.
- Zanchi D, Depoorter A, Egloff L, et al. (2017) The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80: 457-475.

21. Optymalizacja produkcji kwasu dokozaheksaenowego przez mikroalgę *Cryptocodinium cohnii* - praca przeglądowa

Optimization of the production of docosahexaenoic acid by the microalgae

Cryptocodinium cohnii - review work

Półbrat Tomasz, Morawska Martyna

Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Opiekun naukowy: mgr Martyna Wilk

Półbrat Tomasz: tomasz.polbrat3@gmail.com

Słowa kluczowe: DHA, SCO, glony

Streszczenie

Olej mikroalg *C. cohnii* z uwagi na wysoki udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i bezpieczeństwo stał się produktem wzbogacającym produkty żywnościowe i suplementy diety. Wysoka cena mikroalg uniemożliwiająca dodawanie ich do pasz dla zwierząt gospodarskich, może zostać obniżona za pomocą procesu optymalizacji produkcji. Opracowanie metod wydajnej i powtarzalnej produkcji oleju z mikroalgi *C. cohnii* zależy w znacznej mierze od poznania wpływu warunków środowiska (tj. rodzaj, stężenie i sposób podania źródła węgla i azotu, napowietrzenie, odczyn oraz temperatura medium) na intensywność namnażania mikroorganizmów, uzyskaną biomasę oraz produkcyjność DHA. Celem pracy jest przyjrzenie się dotychczasowym ustaleniom dotyczącym optymalizacji produkcji oleju z mikroalg *C. cohnii*.

1. Wstęp

Pod koniec lat 90. ubiegłego wieku dogłębnie poznano rolę jaką pełnią wielonienasycone kwasy tłuszczowe w prawidłowym funkcjonowaniu błon komórkowych, oraz efekt ich niedoborów (Lands, 2000). Wiedza ta skutkowała nasilonymi działaniami informacyjnymi organizacji zajmujących się żywieniem człowieka i propagowaniem włączenia mięsa i olejów z ich wątrób do codziennej diety, by zniwelować ogromną dysproporcję przyjmowanych kwasów omega-6 do omega-3. Rosnąca dzięki temu świadomość konsumencka do dziś powoduje zwiększający się popyt na ryby, których chów wymaga połowów mało cennego surowca rybnego (szprot, sardelowate) w ilości 20 milionów ton każdego roku (www.scientificamerican.com). Przełowienie naturalnych zasobów ryb jest problemem, który można opanować jedynie znajdując inne równocenne źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acids, PUFA) omega-3, co mięso ryb. Naturalnym zamiennikiem wydają się być mikroalgi, które są powodem bogactwa ryb w PUFA, z uwagi na bycie przez nie jednym z pierwszych elementów łańcucha troficznego akwenów wodnych.

2. Opis zagadnienia

Tzw. olej z organizmów jednokomórkowych (Single Cell Oil, SCO) jest produktem pozyskiwanym od mikroorganizmów, które nadmiar substancji odżywczych z otoczenia magazynują w postaci PUFA. Atrakcyjność mikroorganizmu ze względów komercyjnych wzrasta wraz z jego umiejętnością do większej akumulacji droższych kwasów tłuszczowych. Skład i zawartość kwasów tłuszczowych różni się w zależności od wybranego mikroorganizmu. Poszukiwania organizmów z wysokim potencjałem do magazynowania PUFA spowodowały pod koniec XX wieku wyróżnienie kilkunastu mikroorganizmów określanych mianem gatunków olejogennych. Skupiając się na producentach kwasu dokozaheksaenowego (DHA) możemy wyróżnić trzy mikroalgi: *Schizochytrium sp.*, *Thraustochytrium aureum* i *Cryptocodinium cohnii*. Wszystkie trzy na początku obecnego wieku zaczęto użytkować komercyjnie w celu pozyskania SCO. Pierwsze dwie mikroalgi (z uwagi na

większy udział kwasu eikozapentaenowego (EPA) i kwasu dokozapentaenowego (DPA) w składzie wolnych kwasów tłuszczowych) stosowano głównie jako dodatki zootechniczne oraz źródło PUFA w paszy dla kur niosek w celu wytworzenia jaj wzbogaconych. Olej z *C. cohnii* z uwagi na większy udział DHA w wolnych kwasach tłuszczowych (ang. Free Fatty Acids, FFA)(ok. 55%) szybko stał się dodatkiem do żywności (w tym do mleka modyfikowanego dla niemowląt).

C. cohnii jest mikroorganizmem występującym w toni większości słonych zbiorników wodnych na kuli ziemskiej. Jako organizmy saprofityczne zwykle można je znaleźć w rozkładającej się materii i w pobliżu glonów *Fucus spp.* Rozmnażają się bezpłciowo i płciowo, a na inicjowanie rozmnażania płciowego wpływa wyczerpanie składników pokarmowych w środowisku. Są to organizmy heterotroficzne pozyskujące energię i węgiel do budowy nowych komórek w procesie fermentacji tlenowej. Ich wzrost dokonuje się bez dostępu do światła, z uwagi na jego hamujące działanie w stosunku do większości szczepów (Tuttle i Loeblich, 1975). Intensywność i skład materiałów zapasowych *C. cohnii*, którymi są w większości PUFA, w znacznej mierze zależą od warunków środowiska. Celem pracy jest przyjrzenie się dotychczasowym ustaleniom dotyczącym optymalizacji produkcji oleju z mikroalg *C. cohnii*.

3. Przegląd literatury

Źródło węgla dla *C. cohnii* może stanowić glukoza, dekstroza, etanol, kwas octowy, octan sodu lub syrop z chleba świętojańskiego (Mendes i in., 2009). Umiejętność wykorzystania tak wielu różnych źródeł węgla wynika ze sposobu wzrostu w środowisku naturalnym tj. na martwej materii. Safdar i in. (2017a) zbadali wpływ sześciu źródeł węgla (sacharozy, glukozy, galaktozy, etanolu, glicerolu i kwasu octowego) na intensywność produkcji biomasy mikroalg. Spośród przebadanych, najwyższą biomasę uzyskano dzięki medium z zawartością glicerolu (15,1 g L⁻¹). Podobnymi wynikami charakteryzowały się glukoza (12,6 g L⁻¹) i etanol (12,4 g L⁻¹), natomiast medium oparte na galaktozie i sacharozie powodowało o ponad 50% niższy wynik uzyskanej biomasy. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pod względem udziału DHA w biomasie, dla różnych źródeł węgla. Specyficzna szybkość wzrostu mikroalg dla etanolu, glukozy i kwasu octowego było zbliżone (0,64-0,68 d⁻¹). Glicerol natomiast uzyskał wynik o około 10% wyższy (0,72 d⁻¹). Indeks specyficznej szybkości wzrostu służy do obliczenia wpływu stężenia substancji w pożywce na wzrost mikroorganizmów, a wyraża się go wzorem:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S * S}$$

,gdzie:

μ - specyficzna szybkość wzrostu (d⁻¹)

μ_{max} - maksymalna szybkość wzrostu (d⁻¹)

S - koncentracja substratu w medium (g L⁻¹)

K_S -wartość stężenia rozpuszczalnego substratu przy połowie maksymalnego stopnia specyficznego wykorzystania substratu (g L⁻¹)

Podobne wyniki uzyskali Jiang i Chen (2000), badając wpływ stężenia początkowego glukozy w medium (5-40 g L⁻¹) na wydajność namnażania komórek i produkcję DHA przez *C. cohnii*. Najwyższy wynik dla cechy specyficznej szybkości wzrostu osiągnęły mikroalgi rosnące w medium o początkowym stężeniu glukozy wynoszącym 20 g L⁻¹ (0,12 h⁻¹). Grupy badawcze o wartościach skrajnych stężenia glukozy osiągnęły podobny wynik (o ponad 25% niższy od wartości optymalnej). Najwyższa ostateczna sucha masa mikroalg na litr pożywki również została odnotowana gdy zastosowano medium o stężeniu 20 g L⁻¹. Najniższy wynik natomiast uzyskano stosując o połowę niższe stężenie (10 g L⁻¹). Stężenie początkowe 20 g L⁻¹ nie było najbardziej optymalnym dla każdego z parametrów produkcyjnych. Udział DHA w FFA wynosił 53,4% przy stężeniu początkowym równym 5 g L⁻¹ i zmniejszał się liniowo wraz ze wzrostem początkowego stężenia glukozy, a jego miejsce zajmowały nasycone kwasy tłuszczowe. Przy początkowym stężeniu glukozy w medium równym 40 g L⁻¹ udział DHA w FFA wynosił już zaledwie 36,5%. Autorzy sugerują, że może być to

wynik niekorzystnego dla formowania się PUFA, wysokiego stosunku C:N, który wraz ze wzrostem stężenia początkowego glukozy rósł, by w szczytowym momencie osiągnąć wartość 20:1 (dla stężenia 5 g L⁻¹ stosunek ten wynosił 2,5:1).

Mikroorganizmy potrzebują do wzrostu azotu w postaci organicznej lub nieorganicznej. *C. cohnii* potrafi wykorzystywać azot w obu formach (peptony, syrop kukurydziany, wywar z drożdży, kwas glutaminowy, mocznik, KNO₃ i NH₄Cl) (Mendes i in., 2009). Safdar i in., (2017b) sprawdzili wpływ 4 różnych źródeł azotu na wzrost i syntezę DHA przez *C. cohnii*. Badanie objęło siarczan amonu, mocznik, wodorowęglan amonu i azotan sodu. Spośród przebadanych źródeł azotu największą masą mikroalg w 6 dniu uprawy charakteryzowała się pożywka z dodatkiem azotanu sodu. Uzyskano o ponad 24% więcej suchej masy mikroalg używając azotanu sodu niż pozostałych źródeł azotu. Azotan sodu dał również lepsze wyniki dla parametrów: ilość gramów DHA uzyskanych na litr medium (g L⁻¹), produkcja DHA (g L⁻¹ d⁻¹), wydajność konwersji źródła węgla na tłuszcz surowy (t.s.) (mg g⁻¹) oraz wydajność konwersji źródła węgla na DHA (mg g⁻¹). Druga faza badań zakładała optymalizację stężenia azotanu sodu w celu maksymalizacji produkcji PUFA. Grupy badawcze stanowiły stężenia: 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 g L⁻¹. W ciągu pierwszych 24 godzin uprawy nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy grupami. Po 36 godzinach zaobserwowano wyczerpanie się azotu w próbce o najniższym stężeniu NaNO₃. Po 6 dniach kultury najwyższy przyrost biomasy zanotowano dla stężenia 0,8 g L⁻¹ (23,7 g L⁻¹). Stężenie 0,8 g L⁻¹ NaNO₃ spowodowało również najwyższą produkcję tłuszczu surowego (0,79 g L⁻¹ d⁻¹), najwyższą produkcję DHA (0,236 g L⁻¹ d⁻¹) i największą wydajność konwersji źródła węgla na DHA (52,49 mg g⁻¹). Wyższe stężenia NaNO₃ wykazały niższy przyrost biomasy o ponad 15% co wskazuje na inhibicyjny wpływ wysokich stężeń azotu na wzrost *C. cohnii*. Odnotowane niższe wyniki ww. parametrów w grupach o stężeniach 1,2-1,6 g L⁻¹ mogą wskazywać na korzystne działanie głodu azotowego na akumulację lipidów (w tym DHA). Dostarczenie azotu *ad libidum* powoduje spadek udziału t.s. w tym DHA jako materiału zapasowego, z uwagi na ciągłe i intensywne namnażanie. Mikroorganizmy przy zapewnionym odpowiednim stosunku C:N kontynuują namnażanie kumulując jedynie minimalne ilości substancji zapasowych. W przypadku mikroalgi *C. cohnii* w czasie fazy namnażania kumulowana jest głównie skrobia florydzka (ang. floridean starch). Powszechną praktyką stało się zatem ograniczanie azotu w pożywce po pierwszych dwóch dniach uprawy przy jednoczesnym zapewnieniu źródła węgla. Takie działanie powoduje zwiększoną akumulację substancji węglowych i przekształcanie ich w lipidy (zwykle trójglicerydy) (De Swaaf i in., 2003).

Liu i in., (2018) również zbadali wpływ wysokiego stężenia źródła azotu na zahamowanie wzrostu *C. cohnii*. Jako źródło azotu użyto ekstraktu drożdżowego w stężeniu inicjującym równym 3, 6 i 12 g L⁻¹. Dla dwóch najwyższych stężeń odnotowano opóźnienia we wzroście mikroalg wynoszące odpowiednio 24 i 72 godziny. Opóźnienie to polegało na braku intensywnego wzrostu w pierwszych godzinach od inokulacji. Pomimo opóźnienia, najwyższą uzyskaną biomasą charakteryzowały się mikroalgi utrzymywane na pożywce o stężeniu 6 g L⁻¹ (25,1 g L⁻¹ biomasy), natomiast najniższą o stężeniu 3 g L⁻¹ (18,52 g L⁻¹ biomasy). Fakt ten jest najprawdopodobniej konsekwencją szybkiego zużycia azotu przez mikroorganizmy w medium o stężeniu 3 g L⁻¹ (12 godzina uprawy). Czas zużycia azotu w medium rósł liniowo w stosunku do rosnącego stężenia początkowego azotu. Najniższe stężenie azotu charakteryzowało się również najwyższym udziałem procentowym t.s. i DHA w biomasie, jednak pomimo tego, osiągnięty niski poziom biomasy spowodował, że największą produktywność DHA uzyskano przy stężeniu 6 g L⁻¹ (19,01 mg L⁻¹ h⁻¹) (przy stężeniu 3 g L⁻¹ ekstraktu z drożdży uzyskano 18,63 mg L⁻¹ h⁻¹). W drugiej fazie eksperymentu zbadano wpływ ciągłego podawania do medium 50 % roztworu ekstraktu drożdżowego (1,5; 2,1 i 2,7 mL h⁻¹) i wpływ tego działania na parametry produkcyjne mikroalgi *C. cohnii*. Najwyższa specyficzna prędkość wzrostu została odnotowana dla ilości 2,1 mL h⁻¹ wynosząc dla pierwszych 48 godzin 1,136 d⁻¹, a dla całego okresu wzrostu 0,537 d⁻¹. Dla powyższej próby odnotowano również największy wzrost biomasy (71,20 g L⁻¹), co wynosiło wartość o ponad 35% większą niż dla pozostałych ilości dawkowania roztworu. Za interesujące należy również uznać fakt wyższego udziału t.s. w grupach badawczych 1,5 i 2,1 mL h⁻¹ w biomasie niż w pierwszej fazie badania, gdzie azot dostarczono jednokrotnie, wraz z inokulacją. Wskazuje to na możliwą do zastosowania metodę optymalizacji produkcji i zwiększenia uzyskanego DHA na litr medium.

Odnotowanie występowania mikroalgi *C. cohnii* na bardzo różnych szerokościach geograficznych wskazuje na dobre dostosowanie się do warunków środowiska, w tym różnorodnych temperatur otoczenia. Optymalizacja procesu produkcyjnego wymusiła poznanie temperatur w których uzyskuje się największą ilość DHA na litr pożywki. Jiang i Chen (2000b) zbadali wpływ temperatury środowiska na wzrost mikroalgi *C. cohnii*. Cztery grupy (15, 20, 25 i 30°C) mikroalg uprawiano przez 96 h po czym porównano uzyskaną ilość biomasy oraz jej skład. Najwyższą produktywnością biomasy charakteryzowała się grupa utrzymywana w 30°C uzyskując 2,42 g L⁻¹. Najwyższa temperatura wpłynęła pozytywnie również na wynik specyficznej prędkości wzrostu która osiągnęła wartość o ponad 10% wyższą od pozostałych grup (0,092 h⁻¹). Potwierdzają to badania Tuttle i Loeblich (1975), którzy ustalili, że najkorzystniejszą temperaturą do wzrostu i osiągnięcia największej biomasy od *C. cohnii* jest temperatura 27°C. Jiang i Chen (2000b) po 72 godzinach uprawy odnotowali najwyższą wartość udziału DHA w FFA dla medium o temperaturze 15°C. Po 96 godzinach uprawy w 15°C, DHA w FFA stanowiło 52,97%, a więc o 36,18 punktu procentowego więcej, niż w przypadku medium o temperaturze 30°C. Dysproporcja w zawartości DHA spowodowała, że pomimo wysokiej produktywności biomasy w najwyższej badanej temperaturze, produkcja DHA w porównaniu z utrzymaniem w 15°C była 3,5-krotnie niższa (odpowiednio 0,39 mg L⁻¹ h⁻¹ i 1,37 mg L⁻¹ h⁻¹). Wynik ten spowodował drugą fazę badania, w której sprawdzono produktywność mikroalg w warunkach zmiennej temperatury. Zmiana temperatury z 25°C na 15 °C nastąpiła po 48 godzinie od inokulacji medium po fazie najbardziej intensywnego wzrostu. Po 24 godzinach od zmiany temperatury mikroalgi charakteryzowały się poprawioną produktywnością DHA (1,47 mg L⁻¹ h⁻¹), co wskazuje na użyteczność tej metody w produkcji SCO. Autorzy zwracają jednak uwagę na koszty, które trzeba ponieść przy ochładzaniu medium.

C. cohnii jest obligatoryjnym aerobem. Pierwsze badania optymalizujące produkcję DHA przy użyciu tego mikroorganizmu wskazały na pozytywny wpływ wysokiego natlenienia medium na wzrost mikroalg. Beach i Holz (1973) porównali wzrost mikroalgi *C. cohnii* uprawianej przy zastosowaniu pożywki nasyconej tlenem (z agitacją i bez agitacji medium) oraz azotem (jedynie z agitacją). Agitacja medium podczas natleniania spowodowała wzrost liczby komórek w 1 mililitrze o ponad 536% w porównaniu do grupy natlenionej bez agitacji (z 3,95 10⁵ do 21,19 10⁵ komórek ml⁻¹). Zmiana podawanego gazu z tlenu na azot spowodowała spadek w liczebności komórek w mililitrze medium do 2,23 10⁵ komórek ml⁻¹, co wskazuje na istotną rolę tlenu w rozmnażaniu *C. cohnii*. Podobnie jak w przypadku pozostałych producentów SCO, dla *C. cohnii* tlen odgrywa zasadniczą rolę w procesie fermentacji tlenowej, podczas gdy jego nadmiar prowadzi do inhibicji syntezy PUFA omega-3. Produkcja PUFA odbywa się bowiem przy użyciu niezależnych od tlenu enzymów dwoma szlakami enzymatycznymi - FAS (Szlak Syntazy Kwasów Tłuszczowych, ang. Fatty Acid Synthase Patchway) i PKS (Szlak Syntazy Poliketydowej, ang. Polyketide Synthase Pathway) (Ratledge i Wynn, 2002). Ta nieregularność w zapotrzebowaniu na tlen została zbadana w ramach próby optymalizacji produkcji DHA mikroalgi *Schizochytrium sp.* (rodzina *Thraustochytriaceae*), czego efektem stało się wprowadzenie tzw. natleniania fazowego. Polega ono na intensywnym natlenianiu medium w fazie pierwszej, trwającej około 48 godzin, gdy mikroorganizmy namnażają się najintensywniej i gdy (za sprawą tych intensywnych podziałów komórki) nie obserwuje się znacznej akumulacji materiału zapasowego. W drugiej fazie trwającej od spowolnienia namnażania komórek do zakończenia uprawy, odnotowuje się wzmożony proces akumulacji materiału zapasowego, dlatego obniża się poziom natlenienia o około 60%, co przynosi wymierne korzyści w uzyskanej ilości DHA w mg g⁻¹ suchej masy komórek (Qu i in., 2010). Z uwagi na brak badań tego zagadnienia w przypadku mikroalgi *C. cohnii* dla różnych faz wzrostu, należy oczekiwać w przyszłości dalszych prac w tym kierunku.

Najczęściej praktykowaną metodą zwiększenia natlenienia medium w pierwszej fazie wzrostu jest zwiększenie częstotliwości i skuteczności mechanicznej agitacji medium oraz ilości przepływającego powietrza przez pożywkę. Tuttle i Loeblich (1975) wskazują jednak na negatywne działanie zbyt wysokiej częstotliwości mechanicznego mieszadła na wzrost liczby komórek mikroalgi. Ograniczenia w postaci wydajności i kosztów pracy pompy wtłaczającej powietrze do medium pozwalają na rozpatrzenie alternatywy w postaci dodatku n-dodekanu. Da Silva i in. (2006) zbadali wpływ dodatku tej substancji na dostępność tlenu w medium dla *C. cohnii*. W początkowej

fazie wzrostu mikroalg, 1% dodatek n-dodekanu (do 86 godziny uprawy) nie miał pozytywnego wpływu na wydajność produkcji DHA. Po tym czasie grupa z dodatkiem uzyskiwała lepsze wyniki parametrów produkcyjnych, by ostatecznie, po 135 godzinach uprawy osiągnąć o 34,5% wyższą ilość biomasy, o 9% większy udział DHA w biomasie, uzyskując tym samym o ponad 47% większą produktywność DHA na litr medium na godzinę. Wektor tlenu (jakim jest n-dodekan) w kulturach drobnoustrojów zwiększa szybkość transferu tlenu z fazy gazowej do mikroorganizmów bez potrzeby dodatkowego dostarczania energii i wynikającego z tego wzrostu naprężeń ścinających, które mogą wpływać na wrażliwe organizmy, takie jak mikroalgi *C. cohnii*. Wektory tlenu mogą działać jako środki powierzchniowo czynne, aby obniżyć napięcie powierzchniowe wody i zwiększyć specyficzny gazowy obszar międzyfazowy.

Odczyn środowiska wpływa na właściwości powierzchni komórki, takie jak adhezja do szkła lub metalu, przenikanie jonów z i do komórki tym samym wpływając na jej metabolizm. Odczyn wewnątrzkomórkowy jest utrzymywany przy użyciu pomp protonowych zależnych od podaży energii. Konieczność ich pracy może zmniejszać wydajność syntezy i magazynowania PUFA. Jiang i Chen, (2000) zbadali wpływ początkowego odczynu medium na wzrost komórek *C. cohnii* oraz udział DHA w t.s. Grupy badawcze obejmowały przedział o wartości 4-10 pH medium o temperaturze 25 °C zaopatrzonym w 20 g L⁻¹ glukozy. Najbardziej optymalny do wzrostu okazał się początkowy odczyn równy 7,2 pH (specyficzna prędkość wzrostu mikroalgi wynosiła 0,086 h⁻¹, a sucha masa komórek 2,73 g l⁻¹). Odczyn pożywki wpłynął również na udział DHA w t.s. mikroalgi. Grupa o odczynie pożywki równym 7,2 pH uzyskała wyższą o około 11 punktów procentowych zawartość DHA w FFA w porównaniu do grup granicznych (4 i 10 pH). Zmiana odczynu środowiska wpłynęła również na udziały pozostałych kwasów tłuszczowych powodując, że udział nasyconych kwasów tłuszczowych wzrastał dla wartości granicznych badanych odczynów. Wyniki te są w zgodzie z wynikami badań Safdara i in. (2017a), którzy potwierdzi, że najbardziej optymalnym odczynem do wzrostu na podobnej pożywce było początkowe pH medium równe 6,5. Uzyskana w ten sposób sucha masa komórek równała się 22,4 g l⁻¹, a udział DHA w FFA wyniósł 43,6%. Pozostałe grupy badawcze uzyskały niższe wyniki dla tych parametrów produkcyjnych. W odróżnieniu od badań Jiang i Chen, (2000), nie odnotowano różnic dla udziału nasyconych kwasów tłuszczowych pomiędzy badanymi grupami.

Temperatura środowiska jest kolejnym elementem warunków środowiska, przy użyciu którego możemy manipulować wzrostem i składem mikroalg. Optymalną temperaturą do namnażania się komórek *C. cohnii* jest temperatura 25-30°C (Safdar i in., 2017a). Badanie przeprowadzone na pożywce glukozowej (25 g l⁻¹) wskazało na inhibicyjne działanie temperatur środowiska spoza tego przedziału. Należy jednak zaznaczyć, że sucha masa komórek osiągnięta dla grup 14°C i 40°C stanowiła 40% wagi uzyskanej dla najbardziej optymalnej temperatury (30°C), co wskazuje na wysokie możliwości wzrostu *C. cohnii* w niesprzyjających warunkach termicznych. Podobne wyniki uzyskali Jiang i Chen, (2000), wskazujące na 30°C jako na najbardziej optymalną temperaturę środowiska do namnażania mikroalgi. Ilość biomasy otrzymaną dla tej grupy badawczej była o 8% i 35% wyższa niż gdy produkcja odbywała się w temperaturze odpowiednio 25°C i 20°C. Oba badania wskazują jednak na dużo wyższy udział PUFA w biomasie alg utrzymywanych w niższych temperaturach niż optymalne do wzrostu. Fakt ten sprowokował zbadanie wpływu zmiany temperatury środowiska na uzyskaną ilość DHA. Wyniki wskazały na podniesienie produktywności DHA z 1,38 mg l⁻¹ h⁻¹ (dla stałej temperatury 25°C) do 1,47 mg l⁻¹ h⁻¹ (zmiana temperatury z 25°C na 15°C), a więc wzrost o 6,5%.

4. Podsumowanie

Optymalizacja produkcji mikroalg w tym *C. cohnii* oprócz zwiększenia zysków producentów SCO, może mieć również wymiar ekologiczny. W związku z rosnącym problemem przełowienia poszukuje się alternatyw dla paszy stosowanej w chowie wielkotowarowym ryb na bazie mączki rybnej. Badania żywieniowe wskazują, że mikroalgi stanowią doskonałe źródło PUFA i ich dodatek może pozytywnie wpłynąć na intensywność wzrostu i skład chemiczny mięsa (Prates i in., 2018). Warunkiem użycia dodatku mikroalg jest oczywiście ich cena, która powinna być korzystniejsza z uwagi na ciągły proces optymalizacji warunków środowiskowych oraz możliwą poza

granicami Polski modyfikację genetyczną organizmów uprawianych na cele paszowe. Podczas procesu optymalizacji produkcji należy skupić się maksymalizacji uzyskanego surowca, ale również na minimalizacji poniesionych kosztów.

5. Literatura

- De Swaaf ME, Sijtsma L, Pronk JT (2003) High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnology and Bioengineering* 81: 666–672.
- Gold K, Baren CF (1966) Growth requirements of *Gyrodinium cohnii*. *The Journal of Protozoology* 13: 255–257.
- Jiang Y, Chen F (2000) Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry* 35(10): 1205-1209.
- Lands WEM (2000) Lipid mediators in a paradigm shift: Balance between n-6 and n-3. W: *Egg nutrition and biotechnology*. Red. JS Sim. CABI International 1: 35-52.
- Liu L, Wang F, Yang J i in. (2018) Nitrogen feeding strategies and metabolomic analysis to alleviate high-nitrogen inhibition on docosahexaenoic acid production in *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(40): 10640-10650.
- Mendes A, Reis A, Vasconcelos R i in. (2009) *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology* 21: 199–214.
- Prates A, Schorer M, Moura GS i in. (2018) Microalgae *Schizochytrium* sp. in Feed for Piau *Leporinus friderici*. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 13(4): 130-135.
- Qu L, Ji XJ, Ren LJ i in. (2011) Enhancement of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a two-stage oxygen supply control strategy based on oxygen transfer coefficient. *Letters Applied Microbiology* 52(1): 22-27.
- Ratledge C, Wynn J (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51: 1 – 51.
- Safdar W, Shamoan M, Zan X i in. (2017b) Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration. *AMB Express* 7: 85-100.
- Safdar W, Zan X, Song Y (2017a) Synergistic Effects of pH, Temperature and Agitation on Growth Kinetics and Docosahexaenoic Acid Production of *C. cohnii* Cultured on Different Carbon Source. *International Journal of Research in Agricultural Sciences* 4(2): 94-101.
- Tuttle RC, Loeblich AR (1975) An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia* 14(1): 1-8.
- www.scientificamerican.com/article/faux-fish-might-help-aquaculture-keep-feeding-the-world(dostęp: 02.04.2019)

22. Saponiny – roślinne biosurfaktanty

Saponins – plant-based biosurfactants

Rekiel Edyta

Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: Prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: surfaktanty, aktywność biologiczna, rośliny

Streszczenie

Surfaktanty lub inaczej związki powierzchniowo czynne to substancje o charakterystycznej asymetrycznej budowie. Amfifilowa budowa surfaktantów przyczyniła się do ich ogromnego wykorzystania w różnego rodzaju gałęziach przemysłowych, np. przemyśle kosmetycznym, spożywczym, produkcji pasz czy też przemyśle farmaceutycznym. Postęp technologiczny, wzmożona industrializacja i wzrost wykorzystywania syntetycznych surfaktantów wymusiły poszukiwanie rozwiązań bardziej proekologicznych. Biosurfaktanty, produkowane przez mikroorganizmy i niektóre gatunki roślin okazały się bardziej biokompatybilne, łatwiej ulegające biodegradacji i nietoksyczne. Jednakże koszty związane z produkcją i niska wydajność otrzymywanych związków powoduje, że ciągle stosuje się je w mniejszych ilościach niż klasyczne surfaktanty. Zainteresowanie naukowców wzbudzą również saponiny – związki jakie mogą być uzyskane z wielokomórkowych organizmów ze świata roślin.

1. Wstęp

Rośliny syntetyzują wiele różnorodnych związków chemicznych, głównie wykorzystywanych do samoobrony w atakach mikroorganizmów, owadów czy zwierząt roślinożernych. Część związków produkowanych przez rośliny może służyć do nadania im konkretnego smaku lub ubarwienia. Rozmieszczenie poszczególnych związków zależy również od osobniczych cech danego gatunku, część roślin gromadzi odpowiednie związki w korzeniach, kielkach, korze lub liściach (Cowan 1999). Wiele roślin wykorzystywanych jest przez ludzi jako przyprawy, sporo z nich znajduje zastosowanie w ziołolecznictwie przez swoje pozytywne właściwości prozdrowotne, działanie przeciw-bakteryjne oraz postrzeganie konsumencie. Od początków ludzkiej cywilizacji, człowiek wykorzystywał rośliny w postaci okładów lub naparów do celów medycznych. Obecnie, związkami zawartymi w tych eukariontach interesują się szczególnie chemicy i mikrobiolodzy, zwłaszcza pod kątem wykorzystania ich jako alternatywy dla związków syntetycznych, mogących powodować alergie, zmiany środowiskowe i będących trudnymi w biodegradacji. Interesującym aspektem ekstraktów ziołowych i owocowych jest ich bogactwo w polifenole, które opóźniają degradację oksydacyjną lipidów. Ponadto, mają duże znaczenie ze względu na swoje potencjalne właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (Roidaki i in. 2008). Na szczególną uwagę, spośród związków roślinnych, zasługują saponiny, należące do dużej grupy fito-protektorów odpowiadających za system obronny roślin.

2. Opis zagadnienia

Saponiny to substancje zbudowane ze sztywnego szkieletu składającego się z przynajmniej czterech pierścieni węglowodorowych. Do szkieletu przyłączone są reszty cukrowe w podwójnych lub pojedynczych grupach, w zależności od gatunku rośliny, z której dana saponina pochodzi. Na resztę cukrową może składać się glukoza, galaktoza, kwas glukuronowy, ksyloza, ramnoza lub metylopentoza, które przyłączone są za pomocą wiązania glikozydowego. Hydrofobowy szkielet (aglikon) może być triterpenowy lub sterydowy, może również zawierać więcej niż jedno wiązanie nienasycone C=C. Położenie reszty cukrowej pozwala na podział saponin. Jeśli przyłączona jest ona

w pozycji C₃ jest to saponina monodesmozydowa; większość saponin ma jednak dodatkową resztę cukrową przyłączoną w pozycji C₂₆ lub C₂₈. Saponiny tego typu nazywane są bidesmozydowymi. Ich ogromna złożoność wynika z różnorodności istniejących aglikonów, natury łańcuchów pobocznych oraz pozycji, w której inne grupy funkcyjne są przyłączone (Francis i in. 2002). Można wyróżnić 11 klas saponin: dammarany, tirurkalany, lupany, hopany, oleanany, teraksasterany, ursany, cykloartany, lanostany, kukurbinaty i sterydy (Vincken i in. 2007).

Sama struktura chemiczna saponin może zmienić się w czasie przetwarzania lub przechowywania. Wiązania glikozydowe pomiędzy resztą cukrową a aglikonem jak również wiązania glikozydowe w samych cukrach łatwo ulegają przekształceniom pod wpływem enzymów lub działalności mikroorganizmów, są wrażliwe na zmiany pH i hydrolizę (Kregiel i in. 2017). Amfifilowa budowa wynikająca z obecności hydrofilowych cząsteczek cukru i hydrofobowego szkieletu aglikonu nadaje saponinom pożądane właściwości fizykochemiczne, szczególnie w przypadku wykorzystania ich jako naturalnych detergentów. Nazwa saponina wywodzi się od słowa *sāpō*, po łacinie oznaczającego mydło. Związane jest to ze zdolnością saponin do emulgowania oraz tworzenia mydlanej piany w kontakcie z wodą. Saponiny odznaczają się też szerokimi właściwościami biologicznymi: stosuje się je w produkcji hormonów (przede wszystkim sterydowych), konserwantach, lekach przeciwzapalnych i pobudzających system odpornościowy. Do tego mają szerokie zastosowanie antygrzybiczne, antybakteryjne, a także bada się je pod kątem wiązania cholesterolu (Cheeke 2006).

3. Przegląd literatury

Obecność saponin opisano w ponad 100 rodzinach roślin. Istnieją też morskie źródła – saponiny produkuje kilka gatunków strzykw i rozgwiazd. Rozmieszczenie saponin sterydowych i triterpenowych zależy od samego gatunku rośliny. Saponiny triterpenowe można znaleźć przede wszystkim w roślinach strączkowych, np. soi, grochu, fasoli. Saponiny sterydowe charakterystyczne są dla czosnku, pochryznu chińskiego, kozieradki i żeń-szenia. Spore ilości tych saponin zawierają również ziemniaki, pomidory, bakłażany i papryka. Część roślin potrafi gromadzić zarówno saponiny triterpenowe jak i sterydowe, np. owies. Inne zboża nie zawierają dużej ilości saponin. Różnorodność saponin uzależniona jest w dużej mierze od różnorodności gatunków roślin. Niektóre badania nad saponinami sugerują, że ich rozmieszczenie odzwierciedla potrzeby danej rośliny. W niektórych przypadkach, duże stężenie saponin występuje w owocach i bulwach, co sugerowałoby, że saponiny mogą pełnić funkcję ochronną dla organów reprodukcyjnych. Produkcję dużych ilości saponin zaobserwowano również podczas patogennego lub liściożerczego ataku. Niekorzystne warunki środowiskowe również mają wpływ na wzmogłą produkcję saponin (niskie stężenie składników odżywczych, brak światła, nieodpowiednia temperatura).

Głównymi źródłami saponin w ludzkiej diecie są: fasola czerwona, soczewica i bób. Duże ilości przyjmowane są wraz z cebulą, czosnkiem, owsem, szpinakiem oraz herbatą (Kregiel i in. 2017). Charakter saponin zależy od regionu ich występowania. Tym samym soja warzywna pochodząca z Chin jest bogatsza w saponiny od tej pochodzącej ze Stanów Zjednoczonych czy Kanady, a japońska odmiana pozbawiona jest enzymu glukotransferazy odpowiedzialnej za katalizę reszty cukrowej sapogenolu soi (Yoshiki i in. 1998). Dinchev i współpracownicy przeprowadzili badania saponin sterydowych w próbkach *Tribulus terrestris* (buzdyganka naziemnego) pochodzących z Bułgarii, Grecji, Turcji, Serbii, Macedonii, Gruzji, Iranu, Indii i Wietnamu. W trakcie trwania badań, stwierdzili, że saponiny z próbek z Bułgarii, Turcji, Grecji, Serbii, Macedonii, Gruzji i Iranu wykazały podobny profil chemiczny. Próbki saponin z Wietnamu i Indii posiadały zupełnie różny profil chemiczny. Tym samym, sugerowało to istnienie jednego chemotypu powszechnego dla wschodnio-południowej Europy i zachodniej Azji (Dinchev i in. 2008).

Calendula officinalis, nazywana również nagietkiem lekarskim jest dobrze znaną rośliną w polskim ziołolecznictwie. Spotkać ją można również jako roślinę ozdobną, np. w przydomowych ogródkach. Tradycyjnie jednak, nagietek jest używany przy stanach zapalnych skóry, otarciach, bólach menstruacyjnych i problemach żołądkowych. Roślina ma działanie antyseptyczne, a także łagodne właściwości napotne i rozkurczowe. Zawiera w swoim składzie znaczące ilości saponin oleananowych nazywanych „glukozydami” lub „glukoronidami” w zależności od budowy

odpowiedniego prekursora. Ekstrakty z nagietka ciągle stosowane są do produkcji kremów, maści oraz szamponów ziołowych (Kregiel i in. 2017)

Okazuje się, że liście buraków cukrowych posiadają saponiny na poziomie 5%, korzenie na poziomie 0,1 do 0,3%. Co ciekawe, w procesie przetwarzania buraków cukrowych, saponiny głównie można znaleźć w pozostałościach przetwórczych na poziomie 1,2% (Brezhneva i in. 2001). Podobne ilości saponin zauważono w melasie oraz roztworze filtracyjnym. Biorąc pod uwagę ogromne rozpowszechnienie produkcji opartych na buraku cukrowym, jest on potencjalnym źródłem wytwarzania saponin na skalę przemysłową.

Europa Południowa, szczególnie region Morza Śródziemnego, słynie z winogron. Zawarte w czerwonym winie saponiny glikozydowe działają ochronnie na serce, pozwalają na obniżanie poziomu cholesterolu LDL i pomagają zwiększać poziom cholesterolu HDL. Ponadto, saponiny glikozydowe zapobiegają sklejaniu się erytrocytów. Wiele gatunków roślin bogatych w saponiny ma swoje zastosowania od czasów starożytnej Grecji w postaci herbatek ziołowych lub środków aromatyzujących. Jedną z takich roślin jest tymianek. Tymianek rośnie na suchych i skalistych miejscach w okresie od maja do sierpnia. Stosowany jest w kuchni przez swój mocny, przyjemny zapach, który zawdzięcza olejkom eterycznym. Działanie farmakologiczne tymianku polega przede wszystkim na właściwościach przeciwbakteryjnych, rozkurczowych, wykrztuśnych i przeciwrzeczowych. Inne rośliny regionu śródziemnomorskiego takie jak: melisa, majeranek, dziki bratek i szalwia są bogate w saponiny o właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Rodzaj *Ruscus* jest źródłem saponin steroidowych, które powszechnie stosuje się w leczeniu żylaków, hemoroidów i hipotonii ortostatycznej (Kregiel i in. 2017).

Wiele roślin bogatych w saponiny pochodzi z Azji, przede wszystkim z regionu Chin. Wiele gatunków stosuje się jako środki moczopędne, wywołujące biegunkę, hamujące gorączkę i działające przeciwzapalnie. Ekstrakty z juki wykazują dużą aktywność przeciwwirusową, szczególnie w przypadku wirusa mozaiki tytoniowej, oraz odznaczają się działaniem przeciwwgrzybiczym wobec drożdży. Rośliny z rodziny *Fabaceae* mają długą tradycję w medycynie chińskiej, gdzie stosowano ich ekstrakty do leczenia raka piersi i raka szyjki macicy. Ich nasiona są źródłem saponin triterpenowych. Rodzina *Leguminosae*, przede wszystkim reprezentowana przez lukrecję, jest bogata w saponiny o właściwościach przeciwutleniających, przeciwnowotworowych, przeciwzapalnych i przeciwwirusowych. Wiele roślin z rodzaju *Panax* jest stosowana od wieków w Chinach jako leki, ale również środki zapobiegające zmęczeniu, starzeniu się komórek, działające pozytywnie na wątrobę i układ nerwowy. *Camellia oleifera*, nazywana po polsku kamelią olejodajną, jest ważnym źródłem jadalnego oleju, który uzyskuje się z jej nasion. Roślinę wykorzystuje się również jako naturalny środek czyszczący, a jej ekstrakt jest bogaty w saponiny i komercyjnie wykorzystywany jako emulgator i środek stabilizacyjny dla pian. Surowy ekstrakt mączki uzyskanej z nasion kamelii posiada saponiny na poziomie 8,34% (Chen i in. 2010).

Ze względu na swoją charakterystyczną amfifilową budowę, saponiny posiadają właściwości emulgujące, pianotwórcze i dyspersyjne. Te o pojedynczym łańcuchu cukrowym wykazują najlepsze właściwości pianotwórcze. Większa liczba reszt cukrowych powoduje osłabienie tych właściwości. Cząsteczki saponin umieszczone w roztworze wodnym zaczynają ustawiać się tak, aby ich hydrofobowa część (ogon) zorientowana była jak najdalej od wody co prowadzi do zmniejszenia jej napięcia powierzchniowego. Po przekroczeniu CMC – krytycznego stężenia micelizacji – saponiny tworzą micelle obdarzone liofilowym centrum. Sama struktura i rozmiar tworzącej się miceli zależy od typu samej saponiny – niektóre tworzą micelle składające się z dwóch cząsteczek, a inne z pięćdziesięciu. Kształt miceli również zależy od typu saponiny, głównie struktury aglikonu – mogą one być wydłużone (saponiny *Saponaria*, *Quillaya*), włóknikowate lub kuliste (*G. max*). Obecność różnorodnych grup funkcyjnych, m.in. grupy karboksylowej może mieć wpływ na aktywność powierzchniową tych związków. Jeśli umiejscowienie grupy hydrofilowej pozwala na dysocjację, tworzy się wolny anion karboksylowy, który zwiększa rozpuszczalność saponin w roztworach wodnych. Jeśli jednak, grupa karboksylowa połączona jest z aglikonem, jej zdolność do dysocjacji jest niewielka (Kregiel i in. 2017).

Jedną z najważniejszych cech niektórych saponin jest tworzenie stabilnych mieszanych micel z kwasem żółciowym. Micelle te przypominają kształtem stosiki monet lub kanapki, ale mogą

być to również struktury otwarte lub włóknienkowate. Zdolność do tworzenia stabilnych micel może być szczególnie ważna dla zrozumienia mechanizmów żywieniowych. Struktury te są duże i łatwiej wydalone przez organizm, dodatkowo powodują podwyższenie lepkości i poziomu agregacji, co prowadzi do zwiększenia rozpuszczalności samego cholesterolu (Mitra i Dungan 2001).

Saponiny wykazują dużą aktywność biologiczną i niekoniecznie zawsze jest ona korzystna dla organizmu. Przede wszystkim, niektóre ekstrakty saponin powodują rozrywanie erytrocytów i uwalnianie hemoglobiny w procesie hemolizy. Z drugiej strony, zauważa się ich pozytywne działanie w leczeniu cukrzycy, otyłości (poprzez zmiany poziomu lipidów) i osteoporozy (Marrelli i in. 2016). Dodatkowo, saponiny mają zdolność do hamowania szybkiego namnażania się komórek nowotworowych, pobudzają apoptozę i przeciw- działają angiogenezie (Du, Long i Chen 2014). Pod tym kątem zbadano saikosaponiny, diosgeniny, ginsenosydy, saponiny sojowe oraz kwas glicyryzynowy oraz poddano badaniom ekstrakty żeń-szenia i lukrecji (Nasri i in. 2014). Aglikony takie jak kwas oleanowy i kwas betuliny posiadają aktywność przeciwnowotworową i odznaczają się działaniem przeciw- zapalnym, antywirusowym, przeciwrzodowym, hepatoprotekcyjnym i antykancerogennym (Kregiel i in. 2017).

Trudność w badaniu działania antybakteryjnego saponin polega na ich ogromnej różnorodności. Część saponin, np. saponiny *Yucca* działają dobrze na bakterie Gram+, ale nie wykazują tych właściwości wobec bakterii Gram- (Guil-Guerrero i in. 2016). Samo antybakteryjne działanie jest słabe lub bardzo wybiórcze, za to można zaobserwować dobrą aktywność przeciwgrzybiczą, opierającą się głównie na pozbawieniu błony komórkowej integralności. Mechanizm oparto na działaniu triterpenowej saponiny owsa – awenacyny. Na początku, fragmenty aglikonu trafiają do błony komórkowej, gdzie łączą się z zawartymi w niej sterolami (Korchowiec i in. 2015). Następnie aglikon reaguje z resztami cukrowymi tworząc kompleksy sterolowe, co powoduje przemieszczenie lipidów błonowych i w konsekwencji prowadzi do tworzenia się porów i lizy (Coleman i in. 2010).

W zastosowaniach komercyjnych prym wiodą saponiny *Y. schidigera* i *Q. saponaria*, wykorzystywane zarówno w przemyśle żywnościowym jak i kosmetycznym. *Y. schidigera* posiada dobre właściwości pianotwórcze, przez co stanowi istotny dodatek w produkcji napojów bezalkoholowych (typu piwo korzenne) (Tenon i in. 2017). Ze względu na przeciwgrzybicze właściwości saponin sterydowych *Yucca*, ekstrakty te często wykorzystywane są jako „przedłużacze czasu do spożycia” na rynku japońskim. Stosuje się je również w cukiernictwie przy produkcji polew oraz jako związki podnoszące jakość i stabilność produktów. Wynika to z obecności saponin sterydowych, które wpływają na twardość, gęstość i porowatość produktów oraz antyoksydantów, które wpływają na utlenianie lipidów (Sucharzewska i in. 2003). Saponiny *Quillaja* szeroko stosuje się przy produkcji napojów, żywności, szamponów, detergentów oraz w gaśnicach jako czynnik pianotwórczy. W krajach Unii Europejskiej, ekstrakt *Quillaja* o oznaczeniu E999, stosowany jest jako środek pianotwórczy w aromatyzowanych bezalkoholowych napojach i napojach na bazie wody (FAO 2004).

4. Podsumowanie

Saponiny posiadają bardzo szerokie zastosowania, szczególnie jako naturalne detergenty, dodatki do płynów i proszków. Efektywnie pozwalają na uzyskanie produktów klarujących wodę i czyszczących powierzchnie płaskie. Wykorzystanie substancji, które naturalnie występują w przyrodzie i wytwarzane są przez rośliny, może pozwolić na uzyskanie produktów konkurencyjnych dla związków syntetycznych, a do tego bezpieczniejszych dla środowiska i tańszych. Ich biologiczne i fizykochemiczne właściwości można szeroko eksploatować w wielu przemysłach, a zróżnicowanie rodzajów tych związków pozwala sądzić, że znajdują jeszcze szersze zastosowanie w przyszłości.

5. Literatura

Brezhneva TA, Nikolaevskii VA, Selemenov VF i in. (2001) Isolation of saponins from sugar beet roots and preliminary characterization of their adaptogen properties, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 35(3): 159-161.

- Cheeke PR, Piacente S, Oleszek W (2006) Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of yucca schidigera: A review, *Journal of Inflammation* 3 (1): 6.
- Chen YF, Yang CS, Chang MS i in. (2010) Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*, *International Journal of Molecular Sciences* 11: 4417-4425
- Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP i in. (2010) Characterization of Plant-Derived Saponin Natural Products against *Candida albicans*, *ACS Chemical Biology* 5 (3): 321–332.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Dinchev D, Janda B, Evstatieva L i in. (2008) Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions, *Phytochemistry* 69: 176–186.
- Du JR, Long FY, Chen C (2014) Research Progress on Natural Triterpenoid Saponins in the Chemoprevention and Chemotherapy of Cancer, *Enzymes* 36: 95–130.
- FAO (2004), 61st JECFA. Quillaia extracts Type 1 and Type 2, Chemical and Technical Assessment (CTA)
- Francis G, Kerem Z, Makkar H i in. (2002) The biological action of saponins in animal systems: A review, *British Journal of Nutrition* 88(6): 587–605.
- Guil-Guerrero JL, Ramos L, Moreno C i in. (2016) Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics, *Livestock Science* 189: 32–49.
- Korchowiec B, Gorczyca M, Wojszko K i in. (2015) Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1848 (10A): 1963–1973.
- Kregiel D, Berłowska J, Witonska I i in. (2017) Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants, Application and Characterization of Surfactants 1, InTech Open Access.
- Marrelli M, Conforti F, Araniti F, Statti GA (2016) Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in the Treatment of Obesity, *Molecules* 21 (10): 1404.
- Mitra S, Dungan SR (2001) Cholesterol Solubilization in Aqueous Micellar Solutions of Quillaia Saponin, Bile Salts, or Nonionic Surfactants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1): 384–394.
- Nasri H, Baradaran A, Shirzad H i in. (2014) New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals, *International Journal of Preventive Medicine* 5 (12): 1487–1499.
- Roidaki A, Kollia E, Panagopoulou E i in. (2016) Super foods and super herbs: antioxidant and antifungal activity, *Current Research in Nutrition and Food Science* 4 (SI.2): 138–145.
- Sucharzewska D, Stochmal A, Oleszek W (2003) The effect of *Yucca schidigera* extract on the physical structure and on the oxidative stability of sugar-candy foam products, *LWT – Food Science and Technology* 36 (3): 347–351.
- Tenon N, Feuillère N, Roller M, i in. (2017) Rapid, cost-effective and accurate quantification of *Yucca schidigera* Roetzl. Steroidal saponins using HPLC-ELSD method, *Food Chemistry* 221: 1245–1252.
- Vincken JP, Heng L, De Groot A i in. (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry* 68 (3): 275–297.
- Yoshiki Y, Kudou S, Okubo K (1998) Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (12): 2291–9.

23. Soforolipidy – budowa, właściwości i zastosowanie

Saphorolipids – build, properties, and application

Rekiel Edyta

Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: Prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: surfaktanty, kosmetyki, drożdże, *Candida bombicola*

Streszczenie

Pod względem wielkości produkcji, surfaktanty syntetyczne należą do jednej z najważniejszych klas przemysłowych środków chemicznych z całkowitą światową produkcją wynoszącą około 10 milionów ton rocznie. Połowa tej ilości jest zużywana w gospodarstwach domowych i pralniach, druga znajduje zastosowanie w różnego rodzaju przemysłach, przede wszystkim: chemicznym, tekstylnym, spożywczym, papierniczym, przemyśle kosmetyków, środków pielęgnacyjnych, przemyśle farmaceutycznym, rolnictwie, itd. Większość obecnie stosowanych środków powierzchniowo czynnych to związki otrzymywane na bazie ropy naftowej. Są one często toksyczne dla środowiska i ich użycie może prowadzić do poważnych problemów ekologicznych, szczególnie w przypadku zanieczyszczeń wód powierzchniowych i gruntowych. Toksyczność, bioakumulacja i biodegradacja to największe współczesne problemy użytkowania syntetycznych surfaktantów. Tym samym, coraz częściej sięga się po substancje pochodzenia naturalnego – biosurfaktanty – które są związkami biodegradowalnymi, o niskiej toksyczności i można je bezpiecznie produkować z zasobów odnawialnych.

1. Wstęp

Soforolipidy to związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez wybrane gatunki drożdży. Zne są one od ponad 40 lat, ale dopiero ze względu na silnie rosnącą świadomość ekologiczną, zwróciły na siebie szczególną uwagę badaczy (Van Bogaert i in. 2007). Na początku lat 60-tych ubiegłego wieku opisano pierwszy glikolipid zewnątrzkomórkowy syntetyzowany przez drożdże *Torulopsis magnoliae* (Gorin i in. 1961). W 1968 autorzy zgłosili błąd w identyfikacji tego szczepu, którym faktycznie był *Torulopsis apicola*, obecnie znany jako *Candida apicola*. W tym samym roku odkryto nowy soforolipid produkowany przez *Candida bogoriensis* (drożdże te obecnie są klasyfikowane jako szczep *Rhodotorula bogoriensis*). Ogólna struktura tego soforolipidu jest podobna do soforolipidu produkowanego przez *Candida apicola*, ale różni się resztą hydroksykwasu tłuszczowego: jednostka soforozy jest związana z kwasem 13-hydroksydokosanowym (Tulloch i in. 1968).

Jako trzeci szczep produkujący soforolipidy zidentyfikowano *Candida bombicola* (nazywany na początku *Torulopsis bombicola*); glikolipidy i charakterystyka ich syntezy jest niemal taka sama jak szczepu *Candida apicola* (Spencer i in. 1970). W 1998 opisano nowy gatunek drożdży *Starmerella bombicola* oraz przedstawiono go jako teleomorfa (płciową postać rozwojową grzyba) *Candida bombicola* w oparciu o wysoką tożsamość tych szczepów (Rosa i Lachance 1998). Wykazano również produkcję soforolipidów przez szczep *Wickerhamiella domericqiae* (Chen i in. 2006).

2. Opis zagadnienia

Soforolipidy to związki o budowie amfifilowej, oddziałujące z granicą faz w układach niejednorodnych. Składają się z hydrofobowego kwasu tłuszczowego (ogona) o 16 lub 18 atomach węgla i hydrofilowego cukru (głowy) soforozy. Soforoza to disacharyd składający się z dwóch jednostek glukozy połączonych wiązaniem β -1,2- glikozydowym, które – w przypadku

soforolipidów – może być acetylowane w pozycji 6' i/lub 6". Grupa hydroksylowa kwasu tłuszczowego jest połączona wiązaniem β -glikozydowym do cząsteczki soforozy. Grupa karboksylowa jest wolna (forma kwasowa lub otwarta) lub wewnętrznie zestryfikowana w pozycji 4", a w kilku rzadkich przypadkach w pozycji 6' lub 6" (forma laktonowa). Sam hydroksykwas tłuszczowy liczy 16 lub 18 atomów węgla i może mieć jedno lub więcej wiązań nienasyconych. Soforolipidy syntetyzowane przez *Candida bombicola* są w rzeczywistości mieszaniną powiązanych cząsteczek różniących się od siebie charakterystyką kwasu tłuszczowego (długością łańcucha, nasyceniem oraz pozycją hydroksylacji) i strukturą laktonizacji oraz acetylacji. Asmer i współpracownicy (Asmer i in. 1998) byli pierwszymi, którzy rzucili światło na istnienie tych różnic. Rozdzielili oni mieszaninę soforolipidów za pomocą średniociśnieniowej chromatografii cieczowej i chromatografii cienkowarstwowej, i bazując głównie na wzorach laktonizacji i acetylacji, wyróżnili 14 komponentów. Nie uwzględnili oni jednak różnic w długości kwasu tłuszczowego i wzorze hydroksylacji. Davila i współpracownicy (Davila i in. 1993) rozdzielili mieszaninę soforolipidów za pomocą elucji gradientowej w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz zastosowali detektor rozpraszania światła. Zwrócili szczególną uwagę na długość kwasu tłuszczowego i wyróżnili ponad 20 składników.

Główne metody stosowane w separacji soforolipidów obejmują wspomnianą już wcześniej chromatografię cienkowarstwową (TLC) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) sprzężoną z detektorem rozpraszania światła (ELSD). Do wyjaśnienia struktury soforolipidów stosuje się również różne metody analityczne, np. spektrometrię mas sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC-MS) lub chromatografią gazową (GC-MS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) i spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). TLC można wykorzystać jako wstępną metodę oceny i/lub screening. Wykorzystywany jest tu najczęściej żel krzemionkowy typu GEL 50 lub F254, często w połączeniu z fazą ruchomą chloroform/metanol/woda. Do wykrywania pasm glikolipidowych za pomocą TLC stosuje się kilka roztworów barwiących, np. antron, naftol i aldehyd anyżowy. Brak chromoforów i fluoroforów powoduje, że wykłuczone jest stosowanie promieniowania ultrafioletowego lub widzialnego (UV-Vis) i detektorów fluorescencyjnych. Możliwe byłoby wykorzystanie detektora współczynnika załamania światła, ale niezgodności przy elucji gradientowej i brak czułości sprawiają, że taka analiza jest niezwykle trudna. ELSD stało się popularnym uniwersalnym detektorem do analizy soforolipidów. Co ciekawe, nie ma komercyjnie dostępnych standardów dla soforolipidów, a sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas spowodowało wzrost charakteryzacji tych związków w złożonych mieszaninach (Ribeiro i in. 2012).

3. Przegląd literatury

Gdy soforolipidy zostają rozpuszczone w wodzie, obniżają jej napięcie powierzchniowe z 72.8 mN m^{-1} do $30\text{--}40 \text{ mN m}^{-1}$. Forma laktonowa 1,4" soforolipidu jest surfaktantem niejonowym o krytycznym stężeniu micelizacji (CMC) od $40\text{--}100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, co sprawia, że jest szczególnie użyteczna jako emulgator mieszanin olej/woda (Price i in. 2012). Edycja molekularna naturalnych soforolipidów produkowanych przez *Candida bombicola* pozwoliła na otrzymanie n-alkilowych estrów, które zbadano by określić wpływ zmian strukturalnych na napięcie powierzchniowe, dyfuzję, adsorpcję i emulgację na granicy faz olej cytrynowy/woda. Etylowy ester soforolipidu obniżał napięcie powierzchniowe o 95.1% i posiadał krytyczne stężenie agregacji (CAC) na poziomie 0.026 mg mL^{-1} . Ester heksoowy miał niższe CAC (na poziomie 0.02 mg mL^{-1}), ale wyższe napięcie powierzchniowe (Koh i Gross 2016). Różne klasy strukturalne soforolipidów powodują szeroką zmienność właściwości fizykochemicznych. Soforolipidy laktonowe mają inne właściwości biologiczne i fizykochemiczne w porównaniu do form kwasowych. Równowaga hydrofilowo-lipofilowa, zdolność do tworzenia piany i właściwości antybakteryjne są pod silnym wpływem stopnia tworzenia laktonu. Ogólnie, laktonowe soforolipidy bardziej obniżają napięcie powierzchniowe i wykazują działanie przeciwbakteryjne, a formy kwasowe charakteryzują się lepszą zdolnością pianotwórczą i rozpuszczalnością. Grupa acetylowa obniża hydrofilowość soforolipidów

i pobudza ich działanie antywirusowe i stymulujące cytokiny – białka odpowiedzialne za pobudzenie komórek związanych z odpowiedzią odpornościową organizmu (Shah i in. 2005).

Pomimo posiadania atrakcyjnych komercyjnie właściwości i wyraźnych zalet nad syntetycznymi odpowiednikami, synteza biosurfaktantów na skalę komercyjną nie jest realizowana głównie ze względu na znacząco niski odzysk w procesie fermentacyjnym i wysokie koszty produkcji. Potrzebne jest znalezienie efektywnej metody, która pozwoli na produkcję soforolipidów na wysoką skalę przy rozsądnych kosztach (Maddikeri i in. 2015). Ogólnie, synteza biosurfaktantów związana jest z asymilacją substratów hydrofobowych, ale teoria ta nie jest powszechnie akceptowana w przypadku soforolipidów, zwłaszcza, że cząsteczki te są tworzone nawet gdy brak tych substratów i ich ilości przekraczają stężenia wymagane do emulgacji. Jako, że synteza soforolipidów jest związana z niedoborem azotu, sugeruje to, że tworzenie glikolipidów jest pewnego rodzaju metabolizmem nadmiarowym przy pomocy zewnątrzkomórkowego materiału magazynującego (Van Bogaert i in. 2007). Hipotezę tę potwierdzają odkrycia Hommela i współpracowników (Hommel i in. 1994) dotyczące biosyntezy ugrupowania soforozowego, która przypomina syntezę trehalozy przez *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach beztlenowych. *Candida bombicola* i *Candida apicola* w naturze występują w środowiskach o wysokiej sile osmotycznej, a produkcja soforolipidów mogłaby być sposobem na radzenie sobie z wysokimi stężeniami cukru, poprzez przemianę, magazynowanie i zmniejszanie ich dostępności dla innych organizmów. Ponadto soforolipidy wykazują działanie bakteriobójcze wobec niektórych drożdży takich jak szczepy *Candida* i *Pichia* oraz Gram+ bakterii. Mono- i diacetylowane laktony mają największe właściwości inhibicyjne (Van Bogaert i in. 2007).

Soforolipidy były syntetyzowane w przeszłości poprzez wykorzystanie różnych olei takich jak: olej palmowy, sojowy, z krokosza barwierskiego, słonecznikowy, kukurydziany, rzepakowy, zwierzęcy i kwas oleinowy. Ashby i współpracownicy (Ashby i in. 2013) zaproponowali model procesowy szacowania kosztów produkcji syntezy fermentacyjnej soforolipidów o rocznej zdolności produkcyjnej 90700 ton/rok z glukozy, używając kwasu oleinowego zawierającego olej słonecznikowy lub izolowany kwas oleinowy. Okazało się, że największy wkład do kosztów produkcji to koszt surowych materiałów, który osiągnął 89% i 87% szacowanych wydatków przy użyciu oleju słonecznikowego o wysokiej zawartości kwasu oleinowego i kwasu oleinowego pochodzącego z fermentacji. Biorąc pod uwagę te aspekty, rafinowane oleje roślinne lub kwasy tłuszczowe nie są zalecane do produkcji soforolipidów. WCO (wasted cooking oils) oferują tanią alternatywę dla surowych lub rafinowanych olei roślinnych w produkcji soforolipidów. W przybliżeniu, na świecie generuje się 4.1 kg (9 funtów) WCO na osobę. Biorąc pod uwagę, że dzisiejsza światowa populacja to około 7 miliardów ludzi, w ciągu roku powstaje praktycznie 29 milionów ton WCO. Zużyty olej spożywczy może okazać się cennym surowcem do uzyskiwania związków chemicznych, a także źródłem lipidów w produkcji soforolipidów (Maddikeri i in. 2015).

Soforolipidy hamują tworzenie się biofilmów, szczególnie biofilmów mikroorganizmów, które składają się z grubej sieci komórek i istoty zewnątrzkomórkowej. Biosurfaktanty te pełnią istotną rolę w zmienianiu hydrofobowości powierzchni i wpływają na adhezję mikroorganizmów. W badaniach Pontes i współpracowników (Pontes i in. 2016), wykazano, że w momencie pokrycia silikonowej powierzchni, soforolipidy są w stanie generować mniej hydrofobowe warstwy przez zwiększanie właściwości antyadhezyjnych bakterii (w przypadku *Staphylococcus aureus*). Co więcej, poprzez wykorzystanie różnych metod wykrywających i oznaczających masę tworzonego biofilmu, udało się potwierdzić, że ładunek biofilmu *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* został zmniejszony, gdy próbki silikonu pokryte soforolipidami, były poddane działaniu tych szczepów. Tym samym, może to sugerować wykorzystanie soforolipidów do hamowania wzrostu biofilmów bakteryjnych na urządzeniach medycznych.

Soforolipidy mają działanie immunomodulujące i posiadają zdolność do zmniejszania śmiertelności w zwierzęcych modelach sepsy. Poprawa poziomu przeżywalności wydaje się być związana ze zmniejszoną produkcją prozapalnych cytokin i tlenków azotu. Soforolipidy zdają się również modulować inne czynniki zapalenia, w tym adhezję komórkową i zmniejszenie ilości genów prozapalnych. Nie jest jednak jasne czy zmniejszona śmiertelność w modelu szoku septycznego nie była wtórna do aktywności antybakteryjnej soforolipidów. Poziomy soforolipidów w surowicy, gdzie

biosurfaktanty dawały pozytywny wynik nie były oceniane, a w dawkach $> 375 \text{ mg kg}^{-1}$, badania histopatologiczne wykazywały ich toksyczność (Sleiman i in. 2009).

Za pomocą soforolipidów próbuje się rozwiązać problem oporności bakterii na antybiotyki. Podobnie jak inne biosurfaktanty, posiadają one właściwości przeciwbakteryjne. Ich działanie przeciwdrobnoustrojowe nie ogranicza się jedynie do bakterii; posiadają one również działanie przeciwwgrzybicze

i przeciwwirusowe. Proponowany główny mechanizm działania soforolipidów opiera się na zaburzeniu porządku lipidów membranowych, co pogarsza żywotność komórek bakterii. US FDA zatwierdziła te biosurfaktanty i estry cukrów jako odpowiednie do stosowania w żywności i w farmaceutykach. Soforolipidy nie działają drażniąco na skórę, nie wywołują reakcji alergicznych i ich poziom bezpieczeństwa doustnego jest większy lub równy do 5 ml kg^{-1} masy ciała. Cytotoksyczność sprawdzano na keratynocytach naskórka i okazała się ona niska. Zainteresowaniem badaczy od wielu lat cieszą się również liposomy, które są obiecującymi kandydatami jeśli chodzi o dostępność i dostarczanie leków. Soforolipidy mają dwie różne głowy polarne na dwóch końcach lipofilowego rdzenia. Mając naturę amfifilową, mają one tendencję do tworzenia agregatów o unikalnym charakterze strukturalnym i fizykochemicznym, właściwościach oraz funkcjonalności. Podczas dalszej modyfikacji, mogłyby zostać zorganizowane w liposomy, co może prowadzić do wykorzystania ich jako układów dostarczających leki. Co więcej, soforolipidy posiadają szereg korzystnych właściwości, m.in. po podaniu z lekiem, mogą rozciągać się poprzez strukturalnie podobną podwójną warstwę lipidową błony komórkowej i dostarczać cząsteczki leku bezpośrednio do wnętrza komórki (Joshi-Navare i Prabhune 2013).

Najbardziej rozpoznawalną cechą soforolipidów jest ich działanie jako surfaktant. Surfaktanty są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i czyszczącym. Przez długi czas produkowano środki powierzchniowo czynne z surowców petrochemicznych. W ciągu ostatnich lat świadomość ekologiczna znacznie wzrosła. Pod tym względem biosurfaktanty takie jak soforolipidy oferują biodegradowalność, niską toksyczność i produkcję przy odnawialnych substratach. Japońska firma Saraya skomercjalizowała soforon – środek czyszczący zawierający soforolipidy wykorzystywany w zmywarkach. Soforolipidy można również stosować w środkach do prania. Jako niejonowe biosurfaktanty zachowują swoje właściwości obniżające napięcie powierzchniowe nawet przy wysokim stężeniu soli. Ponadto ich aktywność jest niezmienna w szerokim zakresie temperatury. Trzeba jednak pamiętać o ich niestabilności przy pH wyższym od 7.0 do 7.5; powyżej tego pH następuje nieodwracalna hydroliza grup acetylowych i obserwuje się grupy estrowe. Właściwości emulgujące soforolipidów można wykorzystać w przemyśle ropy naftowej: do jej odzysku, a także do usuwania węglowodorów z osadów i mulów. Soforolipidy można również wykorzystywać do odkażania faz porowatych takich jak gleby i wody gruntowe zanieczyszczone węglowodorami oraz do usuwania metali ciężkich z osadów. Dodatkowo, właściwości emulgujące można stosować w przemyśle spożywczym w celu poprawienia jakości produktów z mąki pszennej oraz w systemach klimatyzacyjnych w chłodniach. Francuska firma Soliance produkuje kosmetyki do ciała i skóry na bazie soforolipidów. Oprócz swojej roli jako emulgator, glikolipid ten działa jako środek bakteriobójczy przy leczeniu trądziku, łupieżu i nieprzyjemnego zapachu ciała. Dodatkowo, soforolipidy mają właściwości ochronne dla włosów i skóry, co czyni je atrakcyjnymi składnikami produktów kosmetycznych, higienicznych i farmaceutyczno-dermatologicznych. Pobudzają metabolizm fibroblastów skórnych i neo-syntezy kolagenu, hamują działanie wolnych rodników i elastazy, posiadają zdolność do aktywacji makrofagów i właściwości fibrynolitycznych, działają również łuszcząco na naskórek oraz są efektywnymi środkami depigmentującymi. Uważa się, że soforolipidy stymulują syntezę leptyny przez komórki tłuszczowe, tym samym zmniejszając ilość podskórnego tłuszczu. Soforolipidy mają działanie przeciwdrobnoustrojowe. Z tego powodu mogą być stosowane w mieszaninach bakteriobójczych odpowiednich do czyszczenia owoców i warzyw. To działanie nie ogranicza się jedynie do bakterii, soforolipidy działają również jako środki przeciwwgrzybicze, a także hamują rozkwit glonów. Twierdzi się, że wpływają na ludzki wirus niedoboru odporności i mają działanie plemnikobójcze. Inne korzystne działania medyczne dotyczące soforolipidów to ich zdolność do wywołania różnicowania się komórek zamiast ich proliferacji i hamowanie kinazy białkowej C – linii komórkowej

odpowiedzialnej za ludzką białaczkę promielocytową HL60. Działanie przeciwnowotworowe przypisane jest konkretnej interakcji z błoną plazmatyczną. Na koniec, soforolipidy są źródłem trudnych do syntezy omega i omega-1 hydroksykwasów tłuszczowych. Te kwasy tłuszczowe można wykorzystywać w reakcjach polimeryzacji lub mogą być laktonizowane do estrów makrocyclicznych, które znajdują zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym i zapachowym (Van Bogaert i in. 2007). Zerkowski i współpracownicy (Zerkowski i in. 2006) wyprodukowali aminy tłuszczowe zaczynając od 17-hydroksykwasu oleinowego otrzymanego z soforolipidów. Związki te mogą być interesujące do wytwarzania wysoce funkcjonalnych polimerów i środków powierzchniowo czynnych.

4. Podsumowanie

Środki powierzchniowo czynne należą do najbardziej reprezentatywnych substancji chemicznych, które wykorzystuje się w dużych ilościach na całym świecie. Są to związki amfifilowe, zawierające ugrupowania hydrofobowe i hydrofilowe, które zmniejszają napięcie powierzchniowe. Przemysł spożywczy, farmaceutyczny i kosmetyczny korzysta z mieszanin surfaktantów o właściwościach emulgujących, rozpuszczających, zwilżających, pieniących i dyspergujących. Większość tradycyjnych komercyjnych środków powierzchniowo czynnych w kosmetykach to etery glikolu polietylenowego. W szczególności preparaty do pielęgnacji skóry czyli produkty dermokosmetyczne muszą spełniać szereg wymogów. Przede wszystkim muszą mieć przyjemny wygląd i zachować go podczas okresu przechowywania, dawać przyjemne uczucie podczas aplikacji i mieć długoterminowe korzyści dla skóry. Dlatego też tak ważne jest wykorzystywanie substancji pochodzenia naturalnego. Naturalne soforolipidy produkowane są już komercyjnie przez Ecover (Belgia), Soliance/WheatOleo (Francja), Saraya (Japonia), SyntheZyme (USA), MG Intobio (Korea Południowa) i Allied Carbon Solutions (ACS, Japonia) (Koh i Gross 2016).

5. Literatura

- Ashby RD, McAloon AJ, Solaiman DKY i in. (2013) A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids, *Journal of Surfactants and Detergents* 16 (5): 68–691.
- Asmer HJ, Lang S, Wagner F i in. (1988) Microbial-production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65 (9): 1460–1466.
- Chen J, Song X, Zhang H i in. (2006) Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells, *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 52–59.
- Davila AM, Marchal R, Monin N, Vandecasteele JP (1993) Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection, *Journal of Chromatography A* 648 (1): 139–149.
- Gorin PAJ, Spencer JFT, Tulloch AP (1961) Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*, *Canadian Journal of Chemistry* 39: 846–855.
- Hommel RK, Weber L, Weiss A i in. (1994) Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola* grown on glucose, *Journal of Biotechnology* 33 (2): 147–155.
- Joshi-Navare K, Prabhune A (2016) A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency, *BioMed Research International* 2013, Article ID 512495, 8 pages.
- Koh A, Gross R (2016) A versatile family of sophorolipid esters: Engineering surfactant structure for stabilization of lemon oil-water interfaces 507: 152–163.
- Maddikeri GL, Gogate PR, Pandit AB (2015) Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 263: 479–487.
- Pontes C, Alves M, Santos C i in. (2016) Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes?, *International Journal of Pharmaceutics* 513 (1–2): 697–708.

- Price NPJ, Ray KJ, Vermillion KE i in. (2012) Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast, *Carbohydrate Research* 348 (1): 33–41.
- Ribeiro IA, Bronze MR, Castro MF i in. Optimization and correlation of HPLC-ELSD and HPLC–MS/MS methods for identification and characterization of sophorolipids, *Journal of Chromatography B* 899: 72–80.
- Rosa C, Lachance M (1998) The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tulloch) Meyer & Yarrow, *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1413–1417.
- Shah V, Doncel GF, Seyoum T i in. (2005) Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm–immobilizing activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4093–4100.
- Sleiman JN, Kohlhoff SA, Roblin PM i in. (2009) Sophorolipids as Antibacterial Agents, *Annals of Clinical & Laboratory Science* 39 (1): 60–63.
- Spencer JFT, Gorin PAJ, Tulloch AP (1970) *Torulopsis bombicola* sp., *Antonie Van Leeuwenhoek* 36 (1) :129–133.
- Tulloch AP, Spencer JFT, Deinema MH (1968) A new hydroxy fattyacid sophoroside from *Candida bogoriensis*, *Canadian Journal of Chemistry* 46: 345–348.
- Van Bogaert IN, Saerens K, De Muynck C i in. (2007) Microbial production and application of sophorolipids, *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (1): 23–34.
- Zerkowski JA, Solaiman DKY, Ashby RD i in. (2006) Head group-modified sophorolipids: Synthesis of new cationic, zwitterionic, and anionic surfactants, *Journal of Surfactants and Detergents* 9 (1): 57–62.

24. Aktywność enzymatyczna na składowisku odpadów pohutniczych

Enzymatic activity of smelter wasteland

Siebielec Sylwia⁽¹⁾, Siebielec Grzegorz⁽²⁾, Stuczyński Tomasz⁽³⁾, Grzęda Emilia⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

⁽²⁾ Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

⁽³⁾ Wydział Matematyki Informatyki i Architektury Krajobrazu, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Grzegorz Siebielec, prof. dr hab. Tomasz Stuczyński

Grzegorz Siebielec: gs@iung.pulawy

Słowa kluczowe: odpad poflotacyjny, odpad żużlowy, dehydrogenaza, rośliny spontaniczne

Streszczenie

Składowiska odpadów pohutniczych oraz gleby o ekstremalnie wysokich zawartościach cynku, ołowiu, kadmu i arsenu stanowią poważny środowiskowy problem w obszarach o dużym zagęszczeniu przemysłu hutniczego, czego przykładem jest obszar Górnego Śląska. Jedną z możliwości ograniczenia zagrożeń związanych z tymi terenami są procesy remediacyjne uwzględniające fitotechnologie. Polegają one na wykorzystaniu zdolności wybranych gatunków roślin do wzrostu i rozwoju na terenach silnie zanieczyszczonych. Uzyskanie trwałej pokrywy roślinnej o wieloletnim charakterze, ograniczającej dyspersję metali, może być oparte na udziale zarówno roślin remediacyjnych, jak i roślinności spontanicznej, które zapewniają w pełni funkcjonujący, trwały ekosystem. Niemniej jednak znacząca rola mikroorganizmów w zasiedlaniu składowisk odpadów pohutniczych zarówno przez rośliny spontaniczne, jak i remediacyjne nie została szczegółowo poznana.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności enzymatycznej gleb pochodzących ze składowisk odpadów pohutniczych (poflotacyjne i żużlowe), stanowiących podłoże dla roślin spontanicznie zasiedlających badany obszar. Wysoką aktywność zarówno dla dehydrogenaz, fosfatazy kwasnej i zasadowej stwierdzono w glebie spod Macierzanki piaskowej; Lepnicy rozdętej; oraz Nawłoci pospolitej w porównaniu do obszarów kontrolnych (poflot i żużel). Badane obiekty charakteryzowały się wysoką zawartością ołowiu oraz cynku.

1. Wstęp

Tereny Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego, stanowią jeden z najbardziej zdegradowanych regionów naszego kraju. Głównie na skutek górnictwa węgla kamiennego, rud galmanu, cynku i ołowiu, jak również odkrywkowego wydobywania piasków i żwirów (Bąba i in. 2003). Jak donoszą dane literaturowe, do najbardziej niebezpiecznych, a tym samym stanowiących poważny problem środowiskowy należą odpady popłuczkowe, poflotacyjne oraz odpady z hutnictwa cynkowo - ołowiowego. Znaczne przekroczenia dopuszczalnych zawartości metali ciężkich na składowiskach pohutniczych spowodowały, iż region ten należy do obszarów o priorytetowej potrzebie podjęcia działań rekultywacyjnych. Ograniczenie toksyczności związków i pierwiastków zakumulowanych na terenach silnie zanieczyszczonych jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania ekosystemów silnie powiązanych relacjami troficznymi. Efektywna stabilizacja odpadów jest szczególnie utrudniona poprzez ich drobnoziarnistość, ekstremalnie wysoką zawartość metali ciężkich, zredukowaną zawartość makro- i mikro- składników oraz wysoce zróżnicowane oddziaływanie czynników abiotycznych (Krzaklewski i Pietrzykowski 2001; Janecka i Sobik Szołtysek 2009). W związku z tym, nieodzownym działaniem na terenach poprzemysłowych staje się ich rekultywacja. Rekultywacja składowisk odpadów pohutniczych związana z działaniami ograniczającymi erozję wietrzną i wodną istotnie zapobiega ich negatywnemu oddziaływaniu na otoczenie. W 2017 roku

Komisja Europejska (KE) opublikowała raport dokumentujący najlepsze praktyki w dziedzinie zagospodarowywania skażonych obiektów poprzemysłowych. Jednym z rozwiązań prezentowanych w raporcie KE są prace Prof. Tomasza Stuczyńskiego oraz Dr hab. Grzegorza Siebielca i ich zespołów nad rekultywacją składowisk odpadów pohutniczych w Piekarach Śląskich. Dwudziestoletnie badania wskazują, że zastosowane metody rekultywacji zapewniają trwałe zagospodarowanie obiektów oraz trwałe ograniczenie ryzyka związanego z wtórną dyspersją zanieczyszczeń (Komisja Europejska, 2017). Uzyskanie pokrywy roślinnej o wieloletnim charakterze, ograniczającej dyspersję związków szkodliwych powinno być oparte zarówno na udziale roślin remediacyjnych, jak i roślinności spontanicznej, których synergiczne działania zapewniają w pełni funkcjonujący, trwały ekosystem.

Dotychczas nie została rozpoznana rola mikroorganizmów w zasiedlaniu składowisk odpadów pohutniczych (żużli i odpadów poflotacyjnych) przez rośliny spontaniczne różnych gatunków. Są to działania niezwykle ważne z uwagi istotny problem środowiskowy tego typu obszarów, który nie tylko wiąże się ze znacznymi przekroczeniami całkowitych zawartości pierwiastków toksycznych w podłożu, w tym głównie metali ciężkich, lecz także z ich mobilnością oraz bioprzyswajalnością (Karczewska i Kabała 2010; Kabata-Pendias i Pendias 1999; Stuczyński i in. 2004). Jednym z zabiegów ograniczających ruchliwość metali jest wapnowanie gleb. Ponadto wprowadzenie do gleby materiałów organicznych o dużej pojemności sorpcyjnej również zmniejsza ich mobilność. Niekiedy stosuje się dodatki bogate w minerały ilaste i/lub fosforany. Każde z podjętych działań ma na celu efektywne przywrócenie życia biologicznego oraz ograniczenie dyspersji zanieczyszczeń (McBride 1994; Kabata-Pendias i Pendias 1999; Alloway i Ayres 1999; Buczkowski i in. 2002; Karczewska; 2008).

Jak donoszą dane literaturowe, aż 90% wszystkich procesów zachodzących w glebie odbywa się przy udziale mikroorganizmów. Istotne zatem jest poznanie oddziaływania czynników, które mogą wpływać na ich liczebność oraz aktywność. Mikroorganizmy żyjące w środowisku glebowym są odpowiedzialne za szereg ważnych procesów a odzwierciedleniem ich działania jest produktywność i żyzność gleb (Doran i Parkin 1994; Masto i in. 2006; Smith i Paul 1990; Marinari i in. 2006). Aktywność biologiczną gleb ocenia się m.in. na podstawie aktywności dehydrogenaz biorących udział i przyspieszających reakcje odwodorowania określonych substratów w procesach biochemicznego utleniania składników organicznych. W porównaniu do innych enzymów dehydrogenazy charakteryzują się aktywnością tylko wewnątrz żywych komórek. Według danych literaturowych dehydrogenazy są istotnym wyznacznikiem intensywności oddychania glebowego w głównej mierze bakterii i promieniowców. Istnieje ścisła zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz a obecnością glebowej materii organicznej, liczebnością mikroorganizmów czy zachodzącymi procesami nitrifikacji oraz denitrifikacji. Fosfatazy natomiast odpowiadają za katalizację hydrolizy organicznych połączeń fosforu oraz są wyznacznikiem potencjalnego tempa mineralizacji tych związków w środowisku glebowym (Januszek 1999, Nannipieri i in. 1990; Dick i Tabatabai 1993).

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności enzymatycznej gleb pochodzących ze składowisk odpadów pohutniczych (poflotacyjne i żużłowe), stanowiących podłoże dla roślin spontanicznie zasiedlających badany obszar. Na obszarze badań objętym spontaniczną roślinnością wybrane zostały najczęściej występujące gatunki roślin ze względu na brak informacji na temat syntetycznej oceny szaty roślinnej występującej na terenach zdegradowanych oraz spontanicznej sukcesji zbiorowisk roślinnych i dynamiki zmienności składu gatunkowego (Dyguś i in. 2012).

2. Materiał i Metody

W prowadzonych badaniach szczegółowo określono roślinność spontaniczną występującą na niezrekultywowanych składowiskach odpadów pohutniczych w Piekarach Śląskich oraz Dąbrówce Wielkiej. Rośliny występowały w niewielkich skupiskach lub jako pojedyncze osobniki. Do dalszych badań gleb, wytypowano obszary zasiedlane przez rośliny dominujące (5 roślin – odpad poflotacyjny i 3 rośliny – odpad żużłowy): 1. Macierzanka piaszkowa *Thymus serpyllum* (odpad poflotacyjny); 2. Lepnica rozdęta *Silene vulgaris* (odpad poflotacyjny); 3. Nawłóć pospolita *Solidago virgaurea* (odpad poflotacyjny); 4. Żmijowiec zwyczajny *Echium vulgare* (odpad poflotacyjny); 5.

Szczaw zwyczajny *Rumex acetosa* (odpad poflotacyjny); 6. Dziewanna drobnokwiatowa *Verbascum thapsus* (odpad żużłowy); 7. Nawłóć późna *Solidago gigantea* (odpad żużłowy); 8. Sadziec konopiasty *Eupatorium cannabinum* (odpad żużłowy).

Próbki gleby stanowiących podłoże dla w/w roślin pobrano latem 2018 roku z głębokości 0-20 cm w 3 powtórzeniach. Kontrolę stanowiły obszary bez pokrywy roślinnej, z których pobrano glebę w 3 powtórzeniach z głębokości 0-20 cm. (Tab. 1.). W celu kontroli jakości otrzymanych wyników oraz rzetelnego opracowania statystycznego analizy dotyczące aktywności enzymatycznej (dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej i zasadowej) wykonano w 3 powtórzeniach. Próbki glebowe przeznaczone do analiz mikrobiologicznych przesiano przez sito o średnicy oczek 2mm i przechowywano w zamkniętych woreczkach foliowych w temperaturze $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. próbki glebowe przeznaczone do analiz fizykochemicznych wysuszono i przechowywano w woreczkach papierowych w temperaturze $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tab.1. Schemat doświadczenia.

	Roślina nazwa polska	Roślina nazwa łacińska	Rodzina nazwa polska/nazwa łacińska	Odpad	Miejsce poboru próbek
1	Macierzanka piaskowa	<i>Thymus serpyllum</i>	Jasnotowate <i>Lamiaceae</i>	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
2	Lepnica rozdęta	<i>Silene vulgaris</i>	Goździkowate <i>Caryophyllaceae</i>	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
3	Nawłóć pospolita	<i>Solidago virgaurea</i>	Astrowate <i>Asteraceae</i>	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
4	Żmijowiec zwyczajny	<i>Echium vulgare</i>	Ogórecznikowate <i>Boraginaceae</i>	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
5	Szczaw zwyczajny	<i>Rumex acetosa</i>	Rdestowate <i>Polygonaceae</i>	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
-	kontrola	<i>brak</i>	-	Odpad poflotacyjny	Piekary Śląskie
6	Dziewanna drobnokwiatowa	<i>Verbascum thapsus</i>	Trędownikowate <i>Scrophulariaceae</i>	Odpad żużłowy	Dąbrowka Wielka
7	Nawłóć późna	<i>Solidago gigantea</i>	Astrowate <i>Asteraceae</i>	Odpad żużłowy	Dąbrowka Wielka
8	Sadziec konopiasty	<i>Eupatorium cannabinum</i>	Astrowate <i>Asteraceae</i>	Odpad żużłowy	Dąbrowka Wielka
-	kontrola	<i>brak</i>	-	Odpad żużłowy	Dąbrowka Wielka

Badanie aktywności dehydrogenaz wykonano według Casida i in. (1964) metodą kolorymetryczną, z zastosowaniem jako substratu 3-procentowego TTC (chlorku trójfenylotetrazolu), po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C , przy długości fal 485 nm. Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej wykonano metodą kolorymetryczną z zastosowaniem PNP (p-nitrofenylofosforan sodu), po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C , przy długości fali 410 nm (Tabatabai i Bremner, 1969).

W badanych glebach oznaczono stężenie jonów wodorowych w zawiesinie wodnej charakteryzujące wartość parametru pH. Ponadto, wykonano analizy zawartości metali ciężkich tj.: cynku i ołowiu, po ekstrakcji próbek w wodzie królewskiej, które oznaczono metodą spektrometrii mas sprzężoną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) przy użyciu aparatu AGILENT 7500CE.

Wyniki opracowano z zastosowaniem analizy wariancji z testem Tukeya ($P < 0,05$) przy użyciu oprogramowania Statistica v.13.0.

3. Wyniki i dyskusja

Aktywność enzymatyczna, którą można wyrazić poprzez parametr aktywności dehydrogenaz oraz aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej, jest jednym z głównych wskaźników

służącym bezpośredniemu określeniu jakości gleb. W przeprowadzonych badaniach, wysoką aktywność dehydrogenaz stwierdzono w 38% pobranych próbek. Materiał pobrany spod Macierzanki piaskowej (24,45 ug TPF/g s.m. gleby /24h), Lepnicy rozdętej (13,55 ug TPF/g s.m. gleby /24h) oraz Nawłoci pospolitej (18,75 ug TPF/g s.m. gleby /24h), pochodzący z odpadu poflotacyjnego, charakteryzował się najwyższą aktywnością biologiczną, zarówno w porównaniu do gleby ryzosferowej spod pozostałych roślin, jak również gleby pochodzącej z obiektów kontrolnych. Najmniejszą aktywnością dehydrogenaz charakteryzowały się obiekty kontrolne stanowiące odpad żużlowy (0,07 ug TPF/g s.m. gleby /24h) oraz odpad poflotacyjny (0,15 ug TPF/g s.m. gleby /24h). Aktywność dehydrogenaz spod pozostałych roślin tj. Żmijowiec zwyczajny, Szczaw zwyczajny, Dziewanna drobnokwiatowa, Nawłoc późna oraz Sadziec konopiasty nie różniła się istotnie statystycznie od obiektów kontrolnych (Rys.1.).

Badania fosfatazy kwaśnej wykazały podobne zależności, jak w przypadku analizy aktywności dehydrogenaz. Najwyższą aktywnością fosfatazy kwaśnej charakteryzowały się próbki gleby ryzosferowej pochodzące spod Macierzanki piaskowej (32,60 ug PNP /g s.m. gleby /h) oraz Nawłoci pospolitej (23,15 ug PNP /g s.m. gleby /h). Ponadto, aktywność fosfatazy kwaśnej w glebie spod roślin rosnących na odpadzie poflotacyjnym była wyższa w porównaniu do obiektu kontrolnego (odpad poflotacyjny) oraz roślin rosnących na odpadzie żużlowym. Aktywność fosfatazy kwaśnej w glebie spod roślin rosnących na odpadzie żużlowym było zbliżona do aktywności badanej w glebie pochodzącej z obszaru kontrolnego. Najmniejszą aktywność fosfatazy kwaśnej zanotowano w glebie spod Dziewanny drobnokwiatowej (8,98 ug PNP /g s.m. gleby /h) (Rys.2.).

Najwyższą aktywność fosfatazy zasadowej stwierdzono w glebie ryzosferowej spod Macierzanki piaskowej (73,23 ug PNP /g s.m. gleby /h) oraz Nawłoci pospolitej (71,88 ug PNP /g s.m. gleby /h), podobnie jak w przypadku oznaczenia aktywności dehydrogenaz oraz fosfatazy kwaśnej. Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności fosfatazy zasadowej dla gleb spod roślin rosnących na odpadzie żużlowym w porównaniu do obiektu kontrolnego. Najmniejszą aktywność tego enzymu wykazały próbki gleby z obszaru kontrolnego tj.: odpad poflotacyjny (11,48 ug PNP /g s.m. gleby /h) oraz odpad żużlowy (11,41 ug PNP /g s.m. gleby /h).

Jak dotąd istnieją bardzo ograniczone dane literaturowe na temat aktywności biologicznej składowisk odpadów po hutniczych zasiedlonych przez roślinność spontaniczną, stąd wynika problem z porównywaniem i odnoszeniem otrzymanych wyników do badań innych autorów. Nie mniej jednak, istnieje silna potrzeba prowadzenia tego typu analiz, ponieważ stanowią one cenne źródło informacji na temat możliwości oraz efektywności rekultywacji terenów silnie zdegradowanych przez przemysł wydobywczy i metalurgiczny.

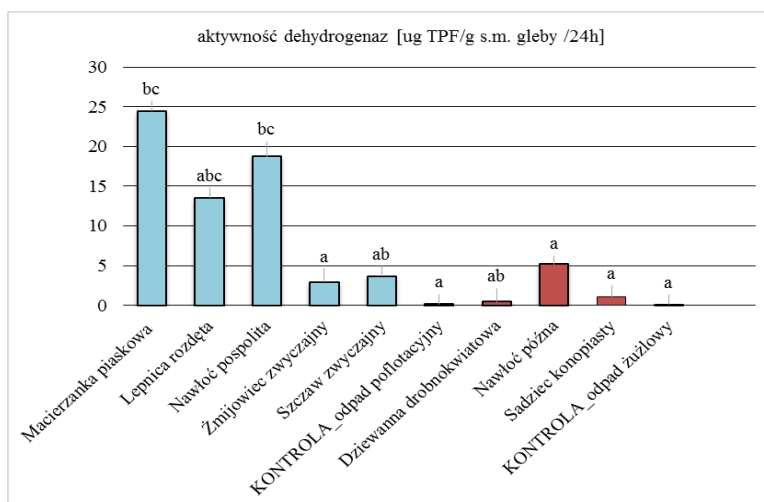
Odczyn badanych gleb wykazywał niewielkie zróżnicowanie w zakresie 8,0-8,5, co wskazuje, że wszystkie badane gleby miały charakter lekko zasadowy. Najwyższe wartości odczynu występowały w glebach zlokalizowanych pod Nawłocią późną i Sadzcem konopiastym, wynosząc odpowiednio 8,4 i 8,5 jednostek skali pH. Były to gleby spod roślin rosnących na odpadzie żużlowym. Na obu obiektach kontrolnych wartość pH mierzonego w wodzie wynosiła 8,2. Jak wynika z danych literaturowych odczyn gleby jest głównym czynnikiem wpływającym w sposób szczególny na biodostępność metali ciężkich. Należy zaznaczyć, iż rozpuszczalność soli rośnie w momencie obniżania się wartości pH (Benadives 2005). Ponadto w glebach kwaśnych proces nityfikacji staje się powolny, a w konsekwencji następuje ograniczenie przekształcania azotu amonowego do azotanowego, najbardziej przyswajalnego przez rośliny. Nadmierne stężenie azotu w glebie w formie amonowej może być przyczyną dużych strat gazowych składnika, co wiąże się również z fitotoksycznością dla roślin.

Znaczna część enzymów jest zależna od wskaźnika pH w danym środowisku glebowym. Gleby o odczynie kwaśnym odznaczają się niewielką liczbą mikroorganizmów glebowych, co odzwierciedla się w dość niskiej aktywności enzymatycznej omawianych gleb. Z reguły im odczyn jest bardziej zbliżony do obojętnego tym możemy zaobserwować zwiększoną aktywność enzymatyczną gleb (Kaniuczak i in. 2005).

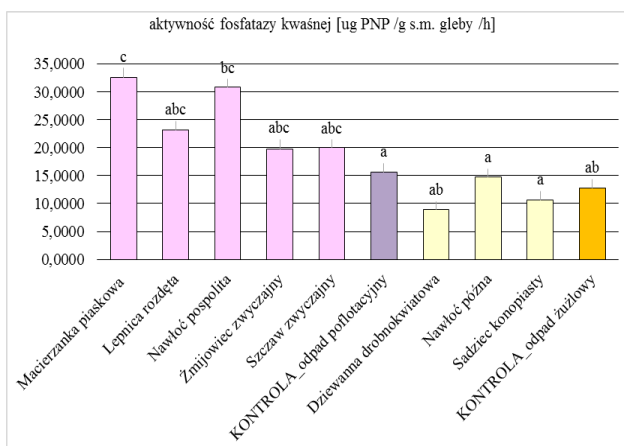
Zawartość cynku w odpadzie żużlowym była wyższa na obiekcie kontrolnym (32564 mg/kg) w porównaniu do zawartości cynku w glebie ryzosferowej spod Sadzca konopiastego (25989 mg/kg), Nawłoci późnej (18541 mg/kg) oraz Dziewanny drobnokwiatowej (18291 mg/kg). Zawartość cynku

w odpadzie poflotacyjnym oraz glebie ryzosferowej spod pozostałych roślin rosnących na odpadzie poflotacyjnym była dość zróżnicowana a najwyższą zawartość cynku stwierdzono w glebie spod Szczawiu zwyczajnego (112211 mg/kg). Podobnie, zawartość ołowiu w odpadzie żużlowym była wyższa na obiekcie kontrolnym (20894 mg/kg) w porównaniu do zawartości ołowiu w glebie ryzosferowej spod Sadzca konopiastego (11954 mg/kg), Nawłoci późnej (12391 mg/kg) oraz Dziewanny drobnokwiatowej (11515 mg/kg). Zawartość ołowiu w odpadzie poflotacyjnym oraz glebie ryzosferowej spod pozostałych roślin rosnących na odpadzie poflotacyjnym była również dość zróżnicowana a najwyższą zawartość pierwiastka stwierdzono w glebie spod Szczawiu zwyczajnego (24129 mg/kg).

Problem zanieczyszczenia gleb w większości przypadków w Polsce w głównej mierze dotyczy terenów przemysłowych bądź poprzemysłowych. Jak donoszą dane literaturowe istnieją znaczne różnice w akumulacji metali ciężkich w roślinach, a akumulacja ta zależy przede wszystkim od gatunku rośliny. Badania dowodzą, iż metale ciężkie znajdujące się w glebie wpływają niekorzystnie na rozwój mikroorganizmów, a w konsekwencji powodują zaburzenia w prawidłowym działaniu ekosystemu glebowego. Obniżona aktywność mikroorganizmów glebowych powoduje słabszy wzrost roślin oraz ich obniżoną odporność na stresowe warunki związane z obecnością metali ciężkich (Górka i in. 2017; Ociepa Kubicka i Ociepa, 2012). W przeprowadzonych badaniach analiza botaniczna wykazała, że najczęściej występujące na składowisku rośliny były przedstawicielami następujących rodzin: *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Polygonaceae*, *Scrophulariaceae*, *Fabaceae* (Tab.1.). Fakt ten potwierdza wcześniejsze wyniki badań opublikowane przez autorów niniejszej pracy, z których wynika, iż najczęściej pojawiające się rośliny rozpoznane na składowiskach odpadów poflotacyjnych należą do rodziny *Poaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Apiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Caprifoliaceae*, *Scrophulariaceae*, *Fabaceae* (Siebielec i in. 2018). Te ostatnie należące do rodziny roślin *Fabaceae* (gatunek *Vicia cracca*), spotykane są najczęściej ponieważ bardzo łatwo zasiedlają obszary o niekorzystnych warunkach przyrodniczych, występuje na trudnych zarówno pod względem wilgotnościowym i termicznym obszarach, ale także mniej żyznych, zapobiegając w ten sposób ich erozji. Rośliny te mogą utrzymywać się nawet w ekstremalnych warunkach, niekiedy pełnią funkcję hiperakumulatorów w procesach fitoremediacji (Kozłowski in. 2011). Należy zaznaczyć, iż składowiska, na których prowadzono badania zarówno w Piekarach Śląskich, jak również Dąbrówce Wielkiej są to obszary, na których uzyskanie trwałej pokrywy roślinnej jest powiązane ze znacznym udziałem roślin spontanicznych, które zasiedlają te obszary w warunkach dla nich często stresowych. Dodatkowo są to obszary, na których nie stosuje się zabiegów w postaci uzupełniania przez sztuczne nawożenie.



Rys.1. Aktywność dehydrogenaz (ug TPF/g s.m. gleby /24h).



Rys.2. Aktywność fosfatazy kwaśnej (ug PNP /g s.m. gleby /h).

4. Wnioski

- A. W analizowanym doświadczeniu w przypadkach wszystkich oznaczanych enzymów glebowych (fosfataza kwaśna, fosfataza zasadowa oraz dehydrogenazy) najwyższą aktywność stwierdzono dla gleby ryzosferowej spod dwóch roślin spontanicznie zasiedlających składowisko obszarów pohutniczych tj. Macierzanka piaskowa oraz Nawłoc pospolita, co wskazuje na wzajemne stymulujące oddziaływanie tych roślin i mikroorganizmów.
- B. Najwyższy odczyn glebowy zanotowano w glebie ryzosferowej dwóch roślin rosnących na odpadzie żuźlowym tj.: w glebie ryzosferowej spod Nawłoci późnej oraz Sadzka konopiastego.
- C. Składowiska odpadów pohutniczych zarówno w Piekarach Śląskich (odpad poflotacyjny) jak również w Dąbrowce Wielkiej (odpad żuźlowy) charakteryzowały się odczynem lekko zasadowym oraz wysoką zawartością cynku i ołowiu.

Badania zostały sfinansowane ze środków projektu nr 2015/17/N/ST10/03182 Narodowego Centrum Nauki (NCN) otrzymanego w ramach konkursu Preludium 9, pt.: „Rola mikroorganizmów w zasiedlaniu składowisk odpadów pohutniczych przez rośliny oraz ich wpływ na biodostępność pierwiastków śladowych”.

5. Literatura

- Alloway BJ, Ayres DC (1999) Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska. PWN, Warszawa.
- Baldria P, Merhautová V, Cajthamal T, Petránková M, Šnajdar J (2010). Small – scale disturbance of extracellular enzymes, fungal, and bacteria biomass in *Quercus petraea* forest topsoil. *Biology and Fertility of Soils* 46: 717-726.
- Bąba W., Błońska A., Kompała A., (2003) Wpływ przemysłu na kształtowanie się spontanicznej roślinności nieużytków przemysłowych. Materiały IV Konferencji Naukowej Śląskie seminarium ochrony środowiska nt. Restrukturyzacja przemysłu a problemy ochrony środowiska i transportu, wyd. Wyższa Szkoła Ekonomii i Administracji, Bytom 25-26.
- Benavides A, Gallego SM, Tamaro ML (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Physics* 17(1): 21-34.
- Buczkowski R, Kondzielski I, Szymański T (2002) Metody remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Wyd. UMK Toruń 95.
- Casida L, Klein D, Santoro T, (1964) Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science* 98: 371-376.

- Dick WA, Tabatabai MA, (1993) Significance and potential uses of soil enzymes. W: Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management. Red. F.B. Metting. Dekker, New York: 95-125.
- Doran JW, Parkin TB (1994) Defining and assessing soil quality. W: Defining soil quality for a sustainable environment. Red. J.W. Doran, D.C. Coleman, D.E. Bezdicek, B.A. Stewart. Soil Science Society of America, Madison, WI, 3-21.
- Dyguś KH, Siuta J, Wasiak G, Madej. M (2012) Roślinność składowisk odpadów komunalnych i przemysłowych. Wyższa Szkoła Ekologii i Zarządzania, Warszawa 134.
- Górka A, Kogut A, Krzystyniak A, (2017) Zawartość wybranych metali ciężkich – ołowiu i kadmu w glebach i ich toksyczny wpływ na rozwój roślin. Analit 3: 32-39.
- Janecka B, Sobik-Szołtysek J, (2009) badania przydatności wybranych technik remediacji terenów zdegradowanych działalnością przemysłu cynkowo-ołowiowego. Inżynieria i Ochrona Środowiska 4: 281-294.
- Januszek K., (1999) Aktywność enzymatyczna wybranych gleb leśnych Polski południowej w świetle badań polowych i laboratoryjnych. Zeszyty Naukowe AR Kraków, 250.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., (1999) Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa.
- Kaniuczak J, Kostecka J, Niemiec W (2005) Wybrane aspekty zagospodarowania odpadów organicznych a produkcja biomasy wierzby energetycznej. Katedra Agroekologii URz, Rzeszów.
- Karczevska A, (2008) Ochrona gleb i rekultywacja terenów zdegradowanych. Podręcznik. Wydawnictwo UP we Wrocławiu.
- Karczevska A, Kabała C, (2010) Gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi i arsenem na Dolnym Śląsku – potrzeby i metody rekultywacji. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Rolnictwo XCVI 576: 59-78.
- Komisja Europejska (2017) European achievements in soil remediation and brownfield redevelopment “Siebielec G, Stuczyński T; The decommissioned Piekary Śląskie Zinc and Lead ore smelting plant”, Poland, 137.
- Kozłowski S, Swedrzyński A, Zielewicz W (2011) Rośliny motylkowate w środowisku przyrodniczym. Water-Environment-Rural Areas 4(36): 162-181.
- Krzaklewski W, Pietrzykowski M, (2001) Problemy oraz możliwość biologicznej stabilizacji osadników odpadów po flotacji rud cynku i ołowiu. Miesięcznik WUG 3: 10-17.
- Marinari S, Mancinelli R, Campiglia E, Grego S (2006) Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Italy. Ecol. Indic 6: 701-711.
- Masto RE, Chhonkar PK, Singh D, Patra AK, (2006) Changes in soil biological and biochemical characteristics in long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. Soil Biol. Biochem 38: 1577-1584.
- Mc Bride MB (1994) Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York, NY.
- Nannipieri P, Grego S, Ceccanti B (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. W: Soil biochemistry, 6. Red. J.M. Bollag, G. Stotzky. Dekker, New York: 293-355.
- Ociepa-Kubicka A, Ociepa E, (2012) Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. Inżynieria i Ochrona Środowiska 15 (2): 169-180.
- Siebielec S, Siebielec G, Stuczyński T, Sugier P, Grzęda E, Grządziel J, (2018) Long term insight into biodiversity of a smelter wasteland reclaimed with biosolids and by-product lime. Science of the Total Environment 636: 1048–1057.
- Smith JL, Paul EA, (1990) The significance of soil microbial biomass estimations. W: Soil biochemistry. Red. J. Bollag, G. Stotzky. Dekker, New York 357-396.
- Stuczyński T, Siebielec G, Maliszewska-Kordybach B, Smreczak B, Gawrysiak L (2004) Wyznaczanie obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb. Poradnik metodyczny dla administracji. Biblioteka Monitoringu Środowiska. IOS, Warszawa 2004.
- Tabatabai MA, Bremner JM, (1969) Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soilphosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry 1: 301-307.

25. Receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji w świetle najnowszego piśmiennictwa

Receptor for advanced glycation end products: A literature review

Zofia Strojny⁽¹⁾, Anna Koperska⁽¹⁾, Tomasz Stefański⁽¹⁾, Marcin Strojny⁽²⁾, Dominika Kanikowska⁽¹⁾, Andrzej Bręborowicz⁽¹⁾, Janusz Witowski⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

⁽²⁾ Klinika Chirurgii Urazowej, Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. med. Dominika Kanikowska

Zofia Strojny: zofiastrojny@gmail.com

Słowa kluczowe: RAGE, otyłość, czynnik transkrypcyjny NFκB

Streszczenie

Receptor RAGE jest wieloligandowym receptorem błonowym dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji. Jego występowanie stwierdzono na wielu typach komórek, w obrębie różnych układów. Pełnej długości RAGE składa się z domeny wewnątrzkomórkowej, krótkiej hydrofobowej domeny transbłonowej oraz domeny zewnątrzkomórkowej zawierającej fragment V odpowiadający za wiązanie ligandów.

W wyniku przyłączenia ligandów do receptora następuje pobudzenie różnych szlaków sygnalizacyjnych. Najważniejszy z nich prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB, który w konsekwencji powoduje zwiększoną syntezę cytokin oraz białek adhezyjnych związanych z procesem zapalnym. Dowodzi to roli, jaką pełni receptor w progresji rozmaitych chorób, m.in. cukrzycy i powikłań z nią związanych.

Ważna pod względem klinicznym wydaje się być również izoforma receptora pozbawiona domeny cytozolowej i transbłonowej, określana rozpuszczalną formą RAGE (sRAGE). Sprawuje ona w naczyniach funkcję ochronną i uznawana jest za element wrodzonego układu odpornościowego. Co więcej, obserwuje się widoczną korelację pomiędzy stężeniem sRAGE w surowicy a ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2 i zespołu metabolicznego oraz otyłością brzuszną, która świadczy o nagromadzeniu aktywnej metabolicznie wisceralnej tkanki tłuszczowej. Przegląd dostępnej literatury wskazuje, iż niskie stężenia sRAGE mogą być czynnikiem prognostycznym rozwoju przewlekłych stanów chorobowych w ustroju.

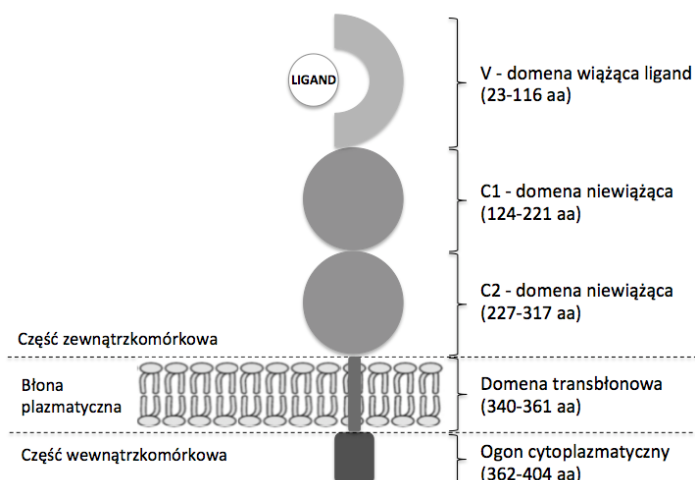
1. Wstęp i opis zagadnienia

Receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (RAGE) jest receptorem błonowym, wyizolowanym ze śródbłonna płuc bydłowych i opisanym po raz pierwszy w 1992 roku (Schmidt i in. 1992). Pod względem strukturalnym stanowi białko powierzchniowe o masie cząsteczkowej 45-50 kDa, należące do nadrodziny immunoglobulin. Jego występowanie stwierdzono na wielu typach komórek, m.in. w obrębie układu odpornościowego: na makrofagach, monocytach, komórkach T, a także limfocytach jednojądrzastych, fagocytach, hepatocytach, komórkach śródbłonna i mięśni gładkich ściany naczyń, komórkach układu nerwowego oraz w nerkach w obrębie komórek kanalikowych, mezangialnych i podocytów (Kalea i in. 2009; Xie i in. 2013). Ze względu na zdolność inicjacji kaskady sygnalizacji zapalnej po przyłączeniu określonych ligandów, receptor RAGE pełni istotną rolę w rozwoju chorób metabolicznych, takich jak otyłość, cukrzyca czy miażdżycę, chorób neurodegeneracyjnych, a także wielu typów nowotworów (Pietkiewicz i in. 2008).

2. Przegląd literatury

Pełnej długości RAGE, czyli tzw. natywny receptor, składa się z domeny wewnątrzkomórkowej, krótkiej hydrofobowej domeny transbłonowej oraz domeny

zewnątrzkomórkowej, o określonej zawartości reszt aminokwasowych. Wyeksponowana na zewnątrz komórki część N-końcowa receptora, zbudowana jest z trzech regionów immunoglobulinopodobnych: niewiążących C1 i C2 oraz fragmentu V odpowiadającego za wiązanie ligandów (Rys.1) (Rojas i in. 2017).



Rys.1 Schematyczna budowa receptora RAGE (Kalea i in. 2009).

Ważna pod względem klinicznym wydaje się być izoforma receptora pozbawiona domeny cytozolowej i transbłonowej, określana w literaturze rozpuszczalną formą RAGE (sRAGE). Zostanie ona szerzej opisana w dalszej części pracy.

RAGE stanowi receptor wieloligandowy, co oznacza że wchodzi w interakcje i tworzy kompleksy z szeroką grupą zróżnicowanych strukturalnie związków (Maillard-Lefebvre i in. 2009). Do najważniejszych z nich zalicza się końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE), a także pozostałe zebrane w tabeli (Tab.1).

Tab.1 Ligandy receptora RAGE (Pietkiewicz i in. 2008).

Ligandy	Skutki kliniczne oddziaływań z RAGE
AGE - końcowe produkty zaawansowanej glikacji	procesy starzenia, powikłania cukrzycowe, miażdżyca, rozrost neurytów, osteoporoza, choroba reumatyczna, nowotwory
Białka z rodziny S100/kalgranuliny	odpowiedź zapalna, miażdżyca, nowotwory
Włókna amyloidu (amyloid A, β -amyloid, priony)	choroby neurodegeneracyjne, choroba Alzheimera
Amfoteryna	odpowiedź zapalna, karcinogeneza, miogeneza, metastaza, ontogeneza CSN
Transtyretyna	odpowiedź zapalna
Cząsteczka adhezyjna makrofagów Mac-1	odpowiedź zapalna

W wyniku oddziaływania ligand-RAGE dochodzi do pobudzenia różnych szlaków sygnalizacyjnych. Najważniejszy z nich prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B, który jest związany z inhibitorem I κ B α w cytoplazmie (Asgeirsson i in. 2011). W wyniku fosforylacji inhibitora dochodzi do dysocjacji kompleksu i uwolnienia aktywnego NF κ B. W konsekwencji czynnik transkrypcyjny przemieszcza się do jądra komórki i powoduje zwiększoną syntezę cytokin

(TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1) oraz białek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) związanych z procesem zapalnym (Rys.2) (Pietkiewicz i in. 2008). Dodatkowo, jak zaznacza Xie w swojej pracy, receptor RAGE reguluje wiele procesów zachodzących w komórkach, takich jak apoptoza, proliferacja czy autofagia (Xie i in. 2013).

W warunkach homeostazy, za wyjątkiem okresu życia płodowego, ekspresja genu RAGE w tkankach jest niewielka. Dostępna literatura wskazuje jednak na widoczny wzrost stężenia RAGE spowodowanego akumulacją jego ligandów w warunkach stresu i stanów zapalnych organizmu. Dowodzi to roli, jaką pełni receptor w progresji rozmaitych chorób, m.in. chorób sercowo-naczyniowych oraz cukrzycy i powikłań z nią związanych (angiopatii, retinopatii czy nefropatii) (Yonekura i in. 2005).

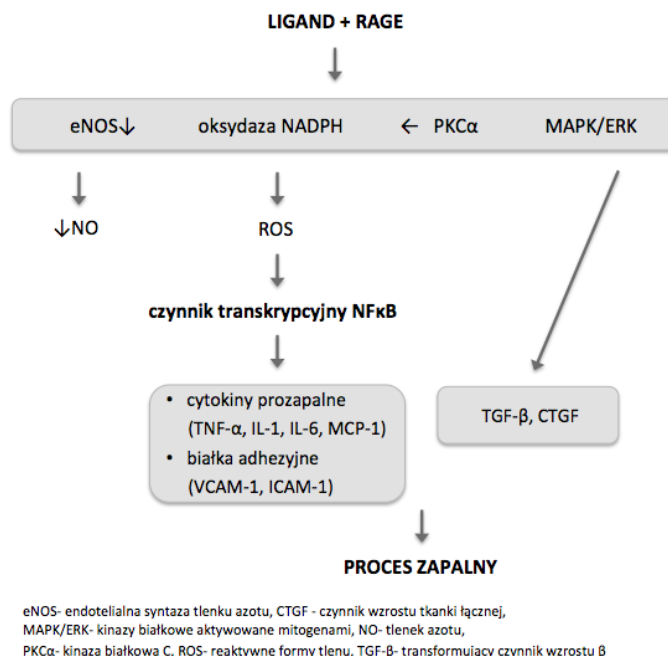
sRAGE stanowi zewnątrz błonową, rozpuszczalną izoformę receptora RAGE, pozbawioną części cytozolowej i transbłonowej. Powstaje w wyniku dwóch odrębnych mechanizmów: alternatywnego splicingu mRNA lub aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie ADAM-10. (Schmidt i in. 2015). Izoforma wytwarzana w procesie alternatywnego składania, skrócona od strony C-końca, określana jest endogennym, sekrecyjnym RAGE (esRAGE/RAGEv1), natomiast postać uwalniana z powierzchni komórki - odcięty RAGE (cRAGE) (Fuller i in. 2018). Co więcej, jak podkreśla Schmidt (2015), esRAGE stanowi 20% całkowitej puli sRAGE. W tej zmodyfikowanej postaci receptor sRAGE może krążyć poza komórką i działać jako „wabik” dla ligandów, jednocześnie zapobiegając tworzeniu się toksycznych kompleksów AGE-pełnej długości RAGE. Receptory te, łącząc się z AGEs, uniemożliwiają ich przyłączanie się do receptora powierzchniowego, a w konsekwencji jego aktywację związaną z ekspresją cytokin prozapalnych (m.in. TNF- α , IL-1, IL-6). Ostatecznie trafiają do śledziony i wątroby, gdzie podlegają degradacji. sRAGE pełni w ten sposób w naczyniach funkcję ochronną oraz uznawany jest za element wrodzonego układu odpornościowego (Hagen i in. 2015). Z uwagi na swoje właściwości protekcyjne, stanowi jednocześnie element rosnącego zainteresowania wśród wielu badaczy i klinicystów.

Jak pokazują wyniki obserwacji przeprowadzonych przez Selvin na licznej grupie badanych, wyróżnia się kilka czynników predysponujących do niskiego stężenia sRAGE w surowicy. Należą do nich płeć męska, rasa czarna, otyłość ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$), palenie tytoniu w przeszłości oraz podwyższony poziom osocznego białka C-reaktywnego (CRP) (Selvin i in. 2013). Dostępna literatura wskazuje, iż niskie wartości sRAGE w surowicy mogą być predyktorem rozwoju przewlekłych stanów chorobowych organizmu. Odnotowano je m.in. w dysfunkcjach układu sercowo-naczyniowego, reumatoidalnym zapaleniu stawów, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc czy chorobie Alzheimera. Natomiast Prasad sugeruje, że jedynie podwyższony stosunek AGE/sRAGE może być uznawany za uniwersalny biomarker procesów zapalnych, w związku z czym parametry te nie powinny być rozpatrywane indywidualnie. Zaobserwował również, iż na ogół stosunek AGE/sRAGE był wyższy u pacjentów z podwyższonym stężeniem sRAGE w surowicy (Prasad i in. 2016). Potwierdzeniem jego tezy są również spostrzeżenia innych autorów, wskazujące na wyraźny wzrost stężenia rozpuszczalnej formy receptora w przebiegu cukrzycy typu 1 i 2 oraz schyłkowej postaci niewydolności nerek (Challier i in. 2005). Konieczne są zatem dalsze badania, które pozwoliłyby na weryfikację powyższych informacji.

Należy również wspomnieć o metodyce pomiarów poziomu sRAGE w surowicy, które są powszechnie stosowane w diagnostyce laboratoryjnej. Obecnie wyróżnia się dwa rodzaje testu ELISA, przeznaczone do określania wartości rozpuszczalnych RAGE we krwi. Pierwszy z nich - *Quantikine ELISA* (R&D Systems), wykorzystuje przeciwciała monoklonalne wzbudzone przeciwko całej zewnątrzkomórkowej domenie RAGE i rozpoznaje w ten sposób wszystkie izoformy rozpuszczalnego RAGE. Natomiast *Human esRAGE ELISA* (B-Bridge International), ze względu na zastosowanie przeciwciała skierowanego przeciwko unikalnej sekwencji C-końca RAGEv1, nie reaguje krzyżowo z pozostałymi rozpuszczalnymi formami, dzięki czemu mierzy wyłącznie pulę białka esRAGE.

Przyglądając się wnikliwiej aspektowi otyłości przedstawionemu w piśmiennictwie, widoczna jest wyraźna korelacja pomiędzy poziomem krążących sRAGE, a stopniem otyłości organizmu. Jak zaznacza Dozio, u osób z nadmierną masą ciała odnotowuje się niższy poziom

sRAGE w surowicy w porównaniu do osób o BMI w granicach normy (Dozio i in. 2017). Pogląd ten uzupełniają badania Mirandy, który wskazuje na stężenie rozpuszczalnej formy receptora RAGE o 24-35% niższe w grupie badanych z nadwagą i otyłością (Miranda i in. 2017). Autor zauważył również, że wiek badanych znacząco wpływał na poziom sRAGE. Osoby w średnim wieku (36-64 lat) i starsze (powyżej 65 lat), prezentowały stężenie izoformy receptora RAGE o 25-45% niższe niż osoby młode. Dowiódł on również, że zmiana stężenia sRAGE ujemnie koreluje ze zmianą poziomu IL-6 i leptyny, a dodatkowo - adiponektyny (Miranda i in. 2018). Dodatkowo, Miranda jako pierwszy przedstawił dowody na bezpośredni związek pomiędzy zmniejszonym stężeniem sRAGE w krążeniu i wyższym ryzykiem zapadalności na cukrzycę typu 2 (DM 2, ang. *Diabetes Mellitus type 2*). W badaniach którym przewodził, wzrost całkowitego sRAGE o 100 pg/mL wiązał się z 9% zmniejszeniem prawdopodobieństwa pojawienia się DM 2, podczas gdy ten sam wzrost cRAGE był związany z 16% redukcją rozwoju cukrzycy wśród badanych. Co więcej, osoby z prawidłową tolerancją glukozy (NGT, ang. *Normal Glucose Tolerance*) cechowały o 33% wyższe wartości rozpuszczalnej formy receptora RAGE w porównaniu do chorych z nieprawidłową tolerancją glukozy (IGT, ang. *Impaired Glucose Tolerance*) oraz o 31% w porównaniu z osobami cierpiącymi na DM 2. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku zespołu metabolicznego. Osoby z zespołem metabolicznym prezentują niższe wartości sRAGE w porównaniu do osób bez zespołu metabolicznego. Momma wykazał, iż wyższe stężenie sRAGE wśród mężczyzn narodowości Japońskiej było związane z niższą częstością występowania zespołu metabolicznego i jego wykładników, m.in. otyłości wisceralnej (Momma i in. 2014). Co więcej, spostrzeżono także, że poziom sRAGE wzrósł istotnie w następstwie zmniejszenia insulinooporności wśród pacjentów skrajnie otyłych po zabiegu chirurgii bariatrycznej (Brix i in. 2012). Procedura ta została przeprowadzona metodą zespolenia omijającego żołądkowo-jelitowego z pętlą Roux-en-Y (RYGB, ang. *Roux-en-Y Gastric Bypass*). Pomiarów antropometrycznych dokonano dwa lata po zabiegu, odnotowano średnią utratę masy ciała o 31% w stosunku do wartości wyjściowych (Brix i in. 2012).



Rys.2 Szlaki sygnałowe ligand-RAGE (Pietkiewicz i in. 2008).

Istotne znaczenie ma nie tylko zawartość, ale również rozmieszczenie tkanki tłuszczowej w organizmie. Obserwuje się odwrotną współzależność dotyczącą stężenia sRAGE i otyłości brzusznej identyfikowanej na podstawie obwodu talii. Niski poziom rozpuszczalnej formy omawianego receptora jest odzwierciedleniem wysokiej zawartości aktywnej metabolicznie

wisceralnej tkanki tłuszczowej. Szczególnie wartym uwagi rodzajem trzewnej tkanki tłuszczowej jest nasierdziowa tkanka tłuszczowa (EAT), która stanowi czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Badania Dozio przeprowadzone wśród kobiet o prawidłowej masie ciała wskazują, iż niski poziom sRAGE wynikał głównie z nagromadzenia nasierdziowej tkanki tłuszczowej, w mniejszym stopniu z całkowitej zawartości tłuszczu w organizmie, czy dystrybucji podskórnej. Tak więc wydaje się, że również w przypadku osób zdrowych, prezentujących prawidłowe wartości BMI, sRAGE może być wczesnym czynnikiem prognostycznym powikłań kardiometabolicznych.

3. Podsumowanie i wnioski

Choroby cywilizacyjne, do których zalicza się m.in. choroby układu krążenia, neurodegeneracyjne, nowotworowe czy metaboliczne, jak np. cukrzyca, stanowią podstawową przyczynę śmiertelności na całym świecie. Ich wspólnym mianownikiem jest przewlekły stan zapalny. Ważne zatem wydaje się być poszukiwanie czynników biorących udział w reakcji ligand-receptor RAGE, co przypuszczalnie jest istotne w aspekcie terapeutyczno-diagnostycznym.

Cytowani w pracy autorzy są zgodni, że redukcja masy ciała w następstwie restrykcji dietetycznej wpływa korzystnie na wzrost stężenia rozpuszczalnej formy RAGE w surowicy. Zjawisko to dowodzi, iż ilościowe oznaczanie sRAGE prawdopodobnie odgrywa rolę w prognozowaniu powikłań metabolicznych. Ocena wartości sRAGE może mieć znaczenie nie tylko diagnostyczne, ale także stanowić wczesny wskaźnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, a jego niskie stężenie poprzedzać pojawienie się pierwszych objawów klinicznych tych chorób. Konieczne są jednak dalsze badania, które dokładnie określą tkankowe lub komórkowe źródła izoform sRAGE oraz wskażą, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za ich uwalnianie.

4. Literatura

- Asgeirsson T, Zhang S, Khoo SK i in. (2011) Serum Adiponectin, Resistin, and Circulating Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Colectomy Patients. *Mediators of Inflammation* 916807.
- Brix JM, Höllner F, Kopp HP i in. (2012) The soluble form of the receptor of advanced glycation endproducts increases after bariatric surgery in morbid obesity. *International Journal of Obesity* 36(11): 1412-1417.
- Challier M, Jacqueminet S, Benabdesselam O i in. (2005) Increased serum concentrations of soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with type 1 diabetes. *Clinical Chemistry* 51(9): 1749-1750.
- Dozio E, Briganti S, Delnevo A i in. (2017) Relationship between soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), body composition and fat distribution in healthy women. *European Journal of Nutrition* 56(8): 2557-2564.
- Fujisawa K, Katakami N, Kaneto H i in. (2013) Circulating soluble RAGE as a predictive biomarker of cardiovascular event risk in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 227(2): 425-428.
- Fuller KNZ, Valentine RJ, Miranda ER i in. (2018) A single high-fat meal alters human soluble RAGE profiles and PBMC RAGE expression with no effect of prior aerobic exercise. *Physiological Reports* 6(14):e13811.
- Hagen I, Schulte DM, Müller N i in. (2015) Soluble receptor for advanced glycation end products as a potential biomarker to predict weight loss and improvement of insulin sensitivity by a very low calorie diet of obese human subjects. *Cytokine* 73(2): 265-269.
- Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI (2009) RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clinical Science* 116(8): 621-637.
- Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M i in. (2009) Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology* 48(10): 1190-1196.

- Miranda ER, Fuller KNZ, Perkins RK i in. (2018) Endogenous secretory RAGE increases with improvements in body composition and is associated with markers of adipocyte health. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 28(11): 1155-1165.
- Miranda ER, Somal VS, Mey JT i in. (2017) Circulating soluble RAGE isoforms are attenuated in obese, impaired-glucose-tolerant individuals and are associated with the development of type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 313(6): E631-E640.
- Momma H, Niu K, Kobayashi Y i in. (2014) Higher serum soluble receptor for advanced glycation end product levels and lower prevalence of metabolic syndrome among Japanese adult men: a cross-sectional study. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6(1): 33.
- Pietkiewicz J, Seweryn E, Bartyś A i in. (2008) Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji - znaczenie fizjologiczne i kliniczne. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. (Online) 62: 511-523.
- Prasad K (2019) Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases? *Molecular and Cellular Biochemistry* 451(1-2): 139-144.
- Prasad K, Dhar I, Zhou Q i in. (2016) AGEs/sRAGE, a novel risk factor in the pathogenesis of end-stage renal disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* 423(1-2): 105-114.
- Schmidt AM (2015) Soluble RAGEs- Prospects for treating & tracking metabolic and inflammatory disease. *Vascular Pharmacology* 72: 1-8.
- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M i in. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung, which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 14987-14997.
- Selvin E, Halushka MK, Rawlings AM i in. (2013) sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes*. 62(6): 2116-2121.
- Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V i in. (2013) Cellular signaling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling*. 25(11): 2185-2197.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S i in. (2005) Roles of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Diabetes-Induced Vascular Injury. *Journal of Pharmacological Sciences* 97(3): 305-311.

26. Prozdrowotne właściwości zielonej herbaty *Camellia sinensis* (L.) i jej wielokierunkowe działanie - przegląd piśmiennictwa

Health properties and its multiple effects of green tea - a literature review

Zofia Strojny⁽¹⁾, Anna Koperska⁽¹⁾, Martyna Marciniak⁽²⁾, Dominika Kanikowska⁽¹⁾, Andrzej Bręborowicz⁽¹⁾, Janusz Witowski⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Patofizjologii, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁽²⁾ Katedra i Klinika Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Opiekun naukowy: dr hab. med. Dominika Kanikowska

Zofia Strojny: zofiastrojny@gmail.com

Słowa kluczowe: galusan epigallokatechiny, choroby sercowo-naczyniowe, otyłość, zapalenie przyzębia

Streszczenie

Zielona herbata (*Camellia sinensis* L.) pochodzi z krajów azjatyckich i jest jednym z najbardziej popularnych napojów na świecie. Stanowi rodzaj herbaty niepoddawanej procesowi fermentacji podczas produkcji, co pozwala na zachowanie wielu składników bioaktywnych. Spośród wszystkich zawartych w niej związków polifenolowych, kluczową rolę pełni galusan epigallokatechiny (EGCG), który wyróżnia się znaczną aktywnością przeciwutleniającą. Co więcej, jak wskazują badania, zielona herbata ma silne działanie antybakteryjne, przeciwzapalne, a także stanowi cenny środek wspomagający profilaktykę oraz leczenie chorób sercowo-naczyniowych. Celem pracy był przegląd najnowszego piśmiennictwa, dotyczącego właściwości zielonej herbaty, decydujących o jej coraz szerszym zastosowaniu w wielu dziedzinach medycyny.

1. Wstęp i opis zagadnienia

Zielona herbata uprawiana jest od tysięcy lat w krajach azjatyckich, głównie w Japonii, Chinach, Korei i Indiach. Szacuje się, iż stanowi około 20% całkowitej konsumpcji herbaty na świecie (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Stosowana jest nie tylko jako napój i dodatek do żywności, ale także znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym (Dekant i in. 2017).

Do jej produkcji wykorzystuje się liście i pączki krzewu *Camellia sinensis* (L.), które w przeciwieństwie do innych rodzajów herbat, nie są poddawane procesowi fermentacji podczas produkcji, a wyłącznie gotowania na parze i następczego suszenia (Dekant i in. 2017). Pozwala to na zachowanie wielu biologicznie aktywnych składników. Swoje cenne właściwości prozdrowotne zawdzięcza flawonoidom (m.in. kwercetynie, katechinom), wśród których kluczową rolę pełni galusan epigallokatechiny (EGCG), cechujący się największą aktywnością antyoksydacyjną. Katechiny występujące w zielonej herbacie zostały przedstawione w tabeli (Tab.1) (EFSA 2018).

Zawartość katechin, jak i pozostałych komponentów, w zielonej herbacie wykazuje znaczne różnicowanie ze względu na warunki uprawy rośliny, wiek zebranych liści, jej przetwarzanie oraz sposób parzenia (EFSA 2018). Komitet naukowy Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności wydał dokument dotyczący zielonej herbaty i jej suplementacji, w którym uznał iż:

- nie można zidentyfikować bezpiecznej dawki EGCG z ekstraktów zielonej herbaty
- nie ma dowodów na toksyczność EGCG wobec wątroby w dawkach poniżej 800 mg/dobę (do 12 miesięcy)
- poziom 800 mg EGCG/dzień jest poza zakresem średniej dziennej podaży EGCG (90-300 mg/dzień) wynikającej ze zwyczajowego spożywania naparów zielonej herbaty w krajach Unii Europejskiej

- poziom ewentualnego działania hepatotoksycznego wśród konsumentów dorosłych mieści się w górnej granicy zakresu 300-866 mg EGCG/dzień (EFSA, 2018).

Tab.2 Katechiny zielonej herbaty (EFSA 2018).

Katechiny występujące w zielonej herbacie
(-) - epikatechina (EC)
(-) - epikatechin-3-galusan (EKG)
(-) - epigalokatechina (EGC)
(-) - epigalokatechina-3-galusan (EGCG)
(+) - katechina (C)
(+) - galokatechina (GC)
(-) - galokatechin-3-galusan (GCG)
(+) - katechin-3-galusan (CG)

Zielona herbata jest bogata w antyoksydanty, posiadające zdolność neutralizowania wolnych rodników, które z kolei przyspieszają starzenie skóry oraz inicjują procesy nowotworzenia (Khurshid i in. 2016). Co więcej, jak wskazują najnowsze badania, napój ten posiada silne działanie antybakteryjne, przeciwzapalne, a także protekcyjne względem chorób sercowo-naczyniowych (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Sugeruje się również, że zmniejsza ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego krwi oraz miażdżycy.

2. Przegląd literatury

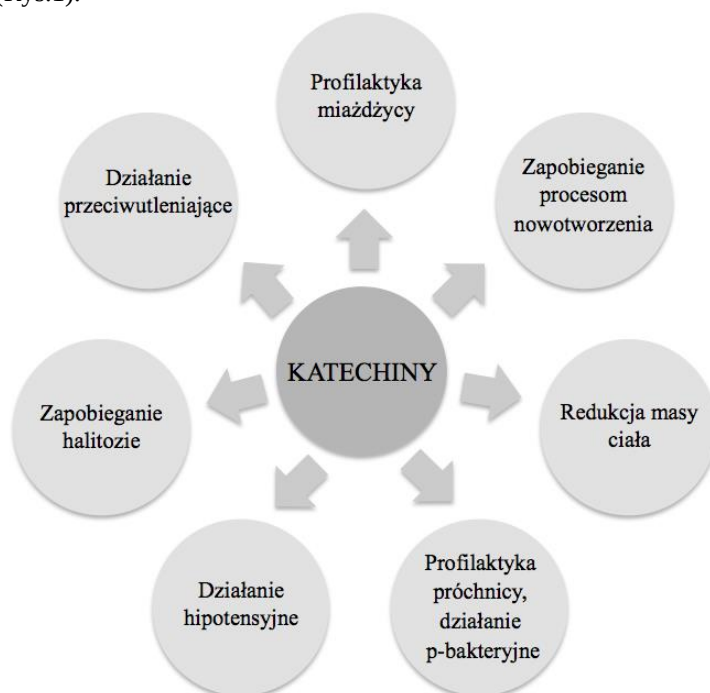
2.1 Zielona herbata a choroby układu krążenia

Zielona herbata charakteryzuje się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym. Autorzy podkreślają ochronny wpływ flawonoidów w niej zawartych na układ sercowo-naczyniowy (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Przewlekły proces zapalny leży u podłoża rozwoju miażdżycy, a dysfunkcja śródbłonna naczyniowego odpowiada za progresję chorób układu krążenia (Biegańska-Hensoldt i Rosołowska-Huszcz 2017). Regularne spożywanie zielonej herbaty może zmniejszyć ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy jej konsumpcją a umieralnością z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Dane naukowe wskazują, że EGCG oraz inne katechiny zwiększają syntezę i dostępność tlenu azotu (NO), zmniejszają oksydację cholesterolu frakcji LDL, obniżają stężenie czynników adhezyjnych (Stępień i in. 2012). Obserwuje się, iż zielona herbata ma zdolność hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, jak również agregacji płytek krwi, dzięki czemu przypisywany jest jej efekt przeciwmiażdżycowy (Florkowska i in. 2017). Działanie zielonej herbaty opiera się m.in. na neutralizowaniu przez katechiny reaktywnych rodników tlenkowych, ponadtlenkowych, azotowych, hydroksylowych i innych oraz hamowaniu aktywności enzymów uczestniczących w ich powstawaniu (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Wywierają one niekorzystny wpływ na ustrój, przyczyniając się do rozwoju różnorodnych jednostek chorobowych (Tab.2).

Tab.3 Wpływ wolnych rodników na organizm (Sadowska i in. 2012).

Wpływ wolnych rodników na:	Choroby wywołane działalnością wolnych rodników:
skórę	starość, wiotkość, suchość, trądzik, alergie
serce i układ krążenia	nadciśnienie, miażdżycę, zawał serca
organy trawienia	wrzody żołądka
układ kostny	uszkodzenia chrząstki stawowej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów, reumatyzm, artretyzm
układ nerwowy	choroba Parkinsona, udar mózgu
układ immunologiczny	podatność na infekcje, AIDS
przemianę materii	naczyniowe powikłania cukrzycy
oczy	jaskra, zaćma
schorzenia wieku starczego	choroba Alzheimera
cały organizm	choroby nowotworowe

Katechiny zwiększają aktywność enzymów antyoksydacyjnych m.in. peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej, katalazy (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Ich wielokierunkowe działanie na organizm zostało przedstawione w sposób schematyczny na poniższym rysunku (Rys.1).



Rys.3 Właściwości prozdrowotne katechin (Khurshid i in. 2016).

Mechanizm przeciwwzapalny związków zawartych w zielonej herbacie polega na inhibicji czynnika NF- κ B oraz białka aktywującego AP-1, a także hamowaniu oksydazy NADPH (Stępień i in. 2012). Wykazano, że pełnią rolę w obniżeniu stężenia białka C-reaktywnego i cytokin TNF- α , IL-6 (Biegańska-Hensoldt i Rosołowska-Huszcz 2017; Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Zaobserwowano również, iż zwiększone spożycie zielonej herbaty pozytywnie wpływa na parametry profilu lipidowego (Maciążek-Jurczyk i in. 2011). Katechiny redukują poziom cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL (Sicińska i in. 2015; Stępień i in. 2012). Składniki w niej zawarte mogą korzystnie wpływać na stężenie lipoprotein o dużej gęstości (Sicińska i in. 2015). Wyniki badań dowodzą, że regularne i długotrwałe spożywanie zielonej herbaty przyczynia się do obniżania wartości ciśnienia tętniczego (Stępień i in. 2012). Prawdopodobnie mechanizm działania hipotensyjnego wiąże się z inhibicyjnym wpływem EGCG na enzym konwertazy angiotensyny (ACE) biorącej udział w regulowaniu ciśnienia tętniczego krwi (Stępień i in. 2012). W badaniu Bogdańskiego (2012) otyli pacjenci z nadciśnieniem tętniczym, którzy przez okres trzech miesięcy otrzymywali ekstrakt z zielonej herbaty, prezentowali niższe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi w porównaniu do grupy kontrolnej (Bogdanski i in. 2012). Co więcej, wśród badanych zaobserwowano obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, jego frakcji LDL oraz trójglicerydów, natomiast wzrost stężenia HDL cholesterolu (Bogdanski i in. 2012).

2.2 Zielona herbata a otyłość

Przeglądając się wnikliwiej aspektowi otyłości przedstawionemu w piśmiennictwie, widoczny jest wyraźny wpływ zielonej herbaty na przebieg procesów metabolicznych i wspomaganie redukcji masy ciała. W próbie Tehraniego (2017) wzięło udział 60 kobiet z zespołem policystycznych jajników (PCOS) oraz insulinoopornością. Grupa badana otrzymywała 500 mg zielonej herbaty w postaci kapsułek przez okres 12 tygodni, natomiast grupa kontrolna przyjmowała placebo. Zauważono, że suplementacja zieloną herbatą zastosowana u kobiet z nadwagą lub otyłością i PCOS, przyczynia się do efektywniejszej redukcji masy ciała, zmniejszenia poziomu insuliny na czczo, a także obniżenia stężenia wolnego testosteronu (Tehrani i in. 2017). Do podobnych wniosków doszedł Chen (Chen i in. 2016). Zaproponowane przez badacza doświadczenie, oparte było na spożywaniu wysokich dawek galusanu epigallokatechiny (856,8 mg) przez kobiety z otyłością centralną. Po interwencji odnotowano utratę masy ciała, zmniejszenie obwodu talii oraz obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i LDL wśród badanych pacjentek.

2.3 Zielona herbata a stan jamy ustnej i tkanek przyzębia

Dostępna literatura dostarcza wielu dowodów, że istnieje wyraźny związek pomiędzy dietą, a stanem jamy ustnej i tkanek przyzębia (Hrishi i in. 2016). Cytowani w poniższej pracy autorzy są zgodni, że regularne spożywanie zielonej herbaty może mieć pozytywny wpływ na leczenie chorób przyzębia, poprzez skuteczne wzmocnienie efektów postępowania niechirurgicznego (Taleghani i in. 2018; Hrishi i in. 2016). Zawarty w zielonej herbacie galusan epigallokatechiny, dzięki swoim właściwościom przeciwwzapalnym, pozwala na efektywną poprawę parametrów klinicznych, takich jak wskaźnik krwawienia podczas sondowania (BOP), głębokość kieszonek przyzębnych (PD) czy utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL) (Hrishi i in. 2016). Pogląd ten uzupełniają badania Fournier-Larente'a (2016), w których zauważyła, że zarówno ekstrakt z zielonej herbaty, jak i EGCG, przyczyniają się do hamowania przylegania bakterii *Porphyromonas gingivalis* do nabłonka jamy ustnej odpowiednio o 91% i 62,5% (Fournier-Larente i in. 2016). Patogeny te, stanowią jeden z kluczowych czynników etiologicznych przewlekłego zapalenia przyzębia. Co więcej, katechiny powodują obniżenie ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji opisanych bakterii.

Istotna jest także rola zielonej herbaty w skutecznym zapobieganiu rozwojowi procesu próchnicowego (Narotzki i in. 2012). Katechiny wykazują działanie przeciwkariogenne poprzez bezpośrednią aktywność bakteriobójczą przeciwko szczepom *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*, a także pośrednio na drodze zapobiegania adhezji bakterii do zębów (Hamilton-Miller i in. 2001). Teoria ta znajduje uzasadnienie również w obserwacjach poczynionych przez Zhang i Kashket (1998). Wykazali oni, że ekstrakt z zielonej herbaty zmniejsza aktywność α -amylazy w ludzkiej ślinie, a zatem zmniejsza potencjał próchnicotwórczy produktów bogatych w węglowodany (Zhang i Kashket 1998). Dodatkowo, zapobiega nadmiernemu spadkowi pH w jamie ustnej, na drodze

hamowania enzymu dehydrogenazy mleczanowej. Dzięki temu, cechuje się działaniem protekcyjnym względem hydroksypatytów szkliwa. Ważna jest również wysoka zawartość fluoru w liściach *Camellia sinensis*, który znany jest ze swoich właściwości remineralizacyjnych względem twardych tkanek zęba (Esfehani i in. 2018). Obecnie, częstą dolegliwością zgłaszaną lekarzom denty stom przez pacjentów jest halitoza, czyli nieprzyjemny zapach z jamy ustnej. Jak wskazują badania, problem ten dotyczy niemalże 50% populacji (Aylikci i in. 2013). Także w przypadku tej przypadłości doceniana jest zielona herbata, z uwagi na zdolność eliminacji lotnych związków siarki, takich jak siarkowodor, siarczek dimetylu, merkaptan metylu (Khurshid i in. 2016). Wyjaśnia to coraz powszechniejsze stosowanie polifenoli pochodzących z herbaty jako składników produktów do higieny jamy ustnej, zwalczających nieświeży oddech (Narotzki i in. 2012).

Warto także zwrócić uwagę na dobroczynny wpływ zielonej herbaty w profilaktyce i zwalczaniu procesów nowotworzenia. Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (OSCC) jest najczęstszym nowotworem złośliwym w obrębie głowy i szyi, w przypadku którego śmiertelność szacowana jest na ponad 50% przypadków zachorowań (Narotzki i in. 2012). Dane literaturowe zaprezentowane przez Li (1999) oraz Srinivasan (2008) wskazują na wyraźne zmniejszenie objętości guza w obrębie policzka na modelach zwierzęcych, pod wpływem regularnie stosowanego ekstraktu polifenoli (Li i in. 1999; Srinivasan i in. 2008). Efekty te wydają się być obiecujące w aspekcie wspomagania leczenia przeciwnowotworowego, jednak konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu potwierdzenia uzyskanych obserwacji.

3. Podsumowanie i wnioski

Zielona herbata słynie nie tylko ze swoich walorów smakowych, ale doceniana jest także ze względu na liczne właściwości prozdrowotne, które zostały przedstawione w powyższej pracy. Zawarte w niej związki biologicznie aktywne są przedmiotem wielu badań. Ze względu na swoje wielokierunkowe, korzystne dla całego organizmu działanie, zielona herbata może być zaliczona do żywności funkcjonalnej. Sugeruje się, że wspomaga leczenie otyłości i zespołu metabolicznego. Wpływa pozytywnie na redukcję masy ciała, obniżanie poziomu insuliny na czczo, stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL. Co więcej, wykazuje dobroczynny efekt zarówno w profilaktyce, jak również terapii chorób układu sercowo-naczyniowego. Poprzez zdolność oddziaływania na funkcje śródbłonna naczyń krwionośnych, zapobiega rozwojowi miażdżycy i nadciśnienia tętniczego. Bezsprzecznym wydaje się być także coraz popularniejsze zastosowanie wyciągu z zielonej herbaty w stomatologii. Pozwala ona na zachowanie prawidłowej kondycji zdrowotnej zębów, dziąseł oraz tkanek przyzębia. Cytowani w pracy autorzy są zgodni, że jej regularne spożywanie przynosi rozmaite, wymierne korzyści dla naszego zdrowia.

4. Literatura

- Aylikci BU, Colak H (2013) Halitosis: From diagnosis to management. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 4(1): 14-23.
- Biegańska-Hensoldt S, Rosołowska-Huszcz D (2017) Polyphenols in preventing endothelial dysfunction. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* (Online) 71(0): 227-235.
- Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M i in. (2012) Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition Research* 32(6): 421-427.
- Chen JJ, Liu CY, Chiu JP i in. (2016) Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical Nutrition* 35(3): 592-599.
- Dekant W, Fujii K, Shibata E i in. (2017) Safety assessment of green tea based beverages and dried green tea extracts as nutritional supplements. *Toxicology Letters* 277: 104-108.
- EFSA Panel (2018) Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA Journal* 16(4): 5239.
- Esfehani M, Ghasemzadeh S, Mirzadeh M (2018) Comparison of Fluoride Ion Concentration in Black, Green and White Tea. *International Journal of Ayurvedic Medicine* 9(4): 263-265.

- Fournier-Larente J, Morin MP, Grenier D (2016) Green tea catechins potentiate the effect of antibiotics and modulate adherence and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology* 65: 35-43.
- Hamilton-Miller JM (2001) Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Medical Microbiology* 50: 299-302.
- Hrishi TS, Kundapur PP, Naha A i in. (2016) Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients - A Randomized Controlled Pilot Study. *International Journal of Dental Hygiene* 14(3): 178-183.
- Khurshid Z, Zafar MS, Zohaib S i in. (2016) Green Tea (*Camellia Sinensis*): Chemistry and Oral Health. *The Open Dentistry Journal* 10: 166-173.
- Li N, Han C, Chen J (1999) Tea preparations protect against DMBA - induced oral carcinogenesis in hamsters. *Nutrition and Cancer-an International Journal* 35(1): 73-79.
- Maciążek-Jurczyk M, Maliszewska M, Szkudlarek-Haśnik A i in. (2011) Działanie profilaktyczne zielonej herbaty w chorobie wieńcowej. *Postępy Fitoterapii* 1: 58-64.
- Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D i in. (2012) Green tea: A promising natural product in oral health. *Archives of Oral Biology* 57(5): 429-435.
- Sadowska A, Zebrowska-Krasuska M, Swiderski F (2012) Przeciwułtleniacze w żywności. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* 22(2): 98-102.
- Sicińska P, Pytel E, Maćczak A i in. (2015) The use of various diet supplements in metabolic syndrome. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 69: 25-33.
- Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PV i in. (2008) Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chemico-Biological Interactions* 172(3): 224-234.
- Stępień M, Szulińska M, Bogdański P i in. (2012) Wpływ zielonej herbaty na układ sercowo-naczyniowy. *Farmacja Współczesna* 5: 39-45.
- Taleghani F, Rezvani G, Birjandi M i in. (2018) Impact of green tea intake on clinical improvement in chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery* 119(5): 365-368.
- Tehrani HG, Allahdadian M, Zarre F i in. (2017) Effect of green tea on metabolic and hormonal aspect of polycystic ovarian syndrome in overweight and obese women suffering from polycystic ovarian syndrome: A clinical trial. *Journal of Education and Health Promotion* 6:36.
- Zhang J, Kashket S (1998) Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. *Caries Research* 32(3): 233-238.

27. General characteristics of the *Pseudomonas entomophila*

Michał Sułek, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek

Maria Curie-Skłodowska University, Department of Immunobiology, Lublin, Poland
Scientific supervisor: dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS

Michał Sułek: michal.sulek95@gmail.com

Keywords: bacteria, entomopathogen virulence, *Drosophila*

Abstract

Pseudomonas entomophila is a newly discovered entomopathogenic bacterium closely related to *Pseudomonas putida*. A characteristic feature of this strain is the ability to infect insects. The complete sequence of the *P. entomophila* is 5.9 Mb and provide valuable information about the evolutionary relationship and virulent factors that *P. entomophila* possesses. This bacterium is able to synthesise many virulence factors that help it to settle and kill the host organism. So far, studies on the mechanisms of interaction in the host–pathogen system are conducted using *Drosophila melanogaster*. In spite of the valuable information provided by studies with the fruit fly, many important information about this strain has not yet been found. There is a need for research with the participation of other model organisms. These studies will answer to the question of whether *P. entomophila* exhibits the same mechanism of action relative to other insects (Vodovar et. al. 2006).

1. Introduction

In recent years, the most of scientific teams use invertebrates as model organisms in their studies. *Drosophila melanogaster* insects are one of the most commonly used invertebrates, the use of which has contributed to increase the knowledge of a number of pathogenic bacteria and fungi. One of the recently discovered pathogens is *Pseudomonas entomophila*. This strain was isolated in 2005 from *D. melanogaster* in Guadelupe. This fact provides, that *P. entomophila* bacteria are the natural pathogens of the fruit fly. The research on the mechanism of the host-pathogen interactions provided many important information and properties of this bacterial strain. It turned out that the newly-known strain of bacteria, infects the host organism through oral road and cause massive destruction of *D. melanogaster* epithelium gut. The name of the strain comes from the ability to natural infect insects (Dieppois et. al. 2014).

2. Phenotypic Analysis of *Pseudomonas entomophila* strain

Pseudomonas entomophila strain is classified as Gram-negative rods. The bacterial structure is distinguished by one polar flagellum at the pole of the cell. This strain is strictly aerobic, catalase and oxidase positive. This bacterium has haemolytic abilities as shown after incubation on agar together with blood plates. The extracellular protease activity has been detected. It has been found that *P. entomophila* possesses fluorescence abilities. This bacteria is able to tolerate a wide range of temperature (4°C– 42°C) and pH (3–10), however the optimal growth temperature is 30 °C and pH range 5–9 (Shanbhag and Tripathi 2009; Shahbaz-Mohammadi and Omidinia 2011). The *P. entomophila* genome was sequenced in 2006. It is a single circular chromosome with a size of 5,888,780 base pairs. Of all the genes identified, only 67% of them have a known function. It should be noted that the size of the *P. entomophila* genome is several times smaller compared to the genes of other bacteria of the *Pseudomonas* group. However, the smaller size of the *P. entomophila* genome is not the result of evolutionary reduction (Vodovar et. al. 2005; Vodovar et. al. 2006). Genome analysis using BLAST helped to identify the core of the genome that makes up 1002 genes. Analysis of the *P. entomophila* genome also confirms the close genetic relationship to *P. putida*. 70.2% of the genes of the *P. entomophila* strain have their orthologs in the *P. putida* genome. Of all the genes building the *P. entomophila* genome, only 50 genes are found in other bacteria from the *Pseudomonas* group, but not in *P. putida*. 34 genes present in the *P. putida* strain, build the genome of other bacteria from the

Pseudomonas group, but do not occur in *P. entomophila*. The *P. entomophila* genome has been remodeled to a much smaller extent by genetic mobile elements and bacteriophage insertions in relation to other bacteria from the *Pseudomonas* group, and above all *Pseudomonas putida* (Vodovar et. al. 2005; Vodovar et. al. 2006). *P. entomophila* genome contains six putatively active transposases and is devoid of type II introns, which is one of the main differences between the genomes of both strains (Dieppois et. al. 2014; Sarris and Scoulica 2011).

3. Virulence factors of *Pseudomonas entomophila*

The *Pseudomonas entomophila* bacteria has a number of virulence factors encoded by its genome. One of the main elements which allow to effectively fight the host are proteases. *P. entomophila* strain encodes three serine proteases (pseen3027, pseen3028, pseen4433) and one alkaline protease (pseen1550), that is not encoded by the *P. putida* genome (Liehl et. al. 2006). The alkaline protease is an alkaline metalloproteinase– AprA homologue which main function is to protect the bacteria against immune response of the host. The AprA protein is present in high amounts in the bacterial supernatant of *P. entomophila*, which confirms its important function in the pathogenic mechanisms of action on the insect's organism (Dieppois et. al. 2014). Additionally, the genome sequence of *P. entomophila* contains genes for four catalases, two superoxide dismutases, three hydroperoxide reductases and eleven S-glutathione transferases (Dieppois et. al. 2014). The *P. entomophila* is capable of producing TccC– insecticidal toxin complex protein, which is characteristic only for entomopathogenic bacteria. Its genome encodes proteins more distantly related to TccC and TcdB, that the function in virulence mechanism has not yet been tested. The *P. entomophila* genome encodes a number of virulent factors responsible for binding to the surface of host cells that affect the adhesion of bacteria and colonization of the insect organism. The main compounds responsible for adhesion are genes encoding the filamentous haemagglutinin, a surface adhesion protein and the amyloid curli fiber. The bacterial genome of *P. entomophila* contains encoding genes for type I secretion systems (T1SS) responsible for delivering proteins directly to the host cells. There is a single locus of the conserved core of the type VI of secretion system gene. In addition, there are genes encoding VgrG and Hcp proteins in the genome that are T6SS homologs. The *P. entomophila* strain does not contain type III secretion system, which are present in pathogenic bacteria. This fact suggests an important role of type IV secretion system in the mechanism of host pathogen interactions (Dieppois et. al. 2014; Sarris and Scoulica E. 2011; Zozaya-Hinchliffe et. al. 2010). Three orders of insects: Diptera, Lepidoptera and Coleoptera are known for being susceptible to *P. entomophila* infections. There are reports of the ability of these bacteria to infect *Dictyostelium discoideum* and *Caenorhabditis elegans*. The effect of *P. entomophila* strain infection depends on the route of infection, as well as the amount of bacteria that infect the host organism. Infections of *D. melanogaster* larvae by pricking and introduction of bacterial paste into the inner cavity of the body, kill the host within 24 hours. Infecting the fruit fly by natural infection - orally, affects the slower development of infection, and the lethal effect varies depending on the dose of the pathogen. Naturally infected *D. melanogaster* by the addition to food bacterial suspension of OD600 = 50– 100 leads to colonization of the host within 2-3 days (Dieppois et. al. 2014). Insect infection with a lower dose of bacteria - OD600 = 5– 25, causes a lethal effect after 4 days. Infection with *P. entomophila* with a concentration of less than OD600=1 does not have a lethal effect on *D. melanogaster* (Buchon et. al. 2009; Vallet-Gely et.al. 2010) The virulence of *P. entomophila* depends on the ability of the intestinal epithelium to defend the host organism, as well as on the production and distribution of virulence factors that disrupt the organism homeostasis (Dieppois et. al. 2014).

4. Secondary Metabolites produced by *Pseudomonas entomophila*

The genome of *Pseudomonas entomophila* encodes five main groups of genes which products are secondary metabolites. The first group encodes the non-ribosomal peptide and is responsible for the production of hydrogen cyanide. the remaining four clusters code for the non-ribosomal peptides that are responsible for the synthesis of the components building lipopeptides and a polyketide (Dieppois et. al. 2014). The ability to produce hydrogen cyanide– HCN by *P.*

entomophila bacteria, allows it to be included in the group of cyanogenic bacteria. Level of HCN production depend on oxygen availability and in this case does not significantly affect the virulence level of the strain. Among all groups of NRPS gene clusters in *P. entomophila*, one of them can have a significant impact on bacterial virulence. The cluster consists of genes pseen0131, pseen0132, pseen0133 (Vodovar et. al. 2005; Vodovar et. al. 2006). The production of secondary metabolites does not significantly affect the ability to kill insects, however, it may be important to infect organisms belonging to other groups. The *P. entomophila* genome encodes chitinases, lipases, proteases and uncharacterized hydrolases. These enzymes possess hydrolytic activity and can degrade polymers present in the environment as well as the insect body. In the nucleotide sequence of *P. entomophila*, genes encoding compounds with bioremedial properties, numerous transporters and regulatory elements allowing for adaptation to various environmental conditions are also recorded. The ability to synthesis a number of secondary metabolites, as well as many genes encoding virulence factors, allow *P. entomophila* to colonize a range of ecological niches - soil, rhizosphere and water systems (Vodovar et. al. 2006; Shahbaz-Mohammadi and Omidinia, 2011). However, this bacterium is not a plant pathogen (there are no genes encoding enzymes digesting plants components). It has been shown that *P. entomophila* bacteria participate in the promotion of plant growth, counteracting the development of fungal pathogens (Chattopadhyay et. al. 2004; Vodovar et. al. 2006). The ability to grow and develop in many different environment as well as the virulence properties of *P. entomophila* are regulated by GacS/ GacA two-component system. (Vodovar et. al., 2006). It's main elements are the serine kinase and response regulator. This system fulfills an important role in adapting to changing environmental conditions as well as activating virulence factors of Gram-negative bacteria (Heeb and Haas 2001).

5. The impact of *Pseudomonas entomophila* infection on selected elements of innate immunity of *Drosophila melanogaster*

The immune system of insects consists only of innate immunity mechanisms. This includes humoral and cellular responses. Studies on the effect of *Drosophila melanogaster* infection by *Pseudomonas entomophila* showed that the pathogen activates a number of elements of the host's immune system. Among the elements of humoral response of *D. melanogaster*, immune peptides have to be mentioned. Drosomicin, Diptericin and Attacin are produced by intestinal epithelial cells in response to infection with Gram-negative bacteria. The synthesis of these peptides begins after identification of diaminopimelic acid (DAP)-type peptidoglycan characteristic for Gram-negative bacteria. DAP is the activator of the Imd signaling pathway responsible for the regulation of the expression of antibacterial peptides. The infection with *P. entomophila* stimulates the synthesis of immune peptides associated with the digestive system *D. melanogaster*. It has been proven that activating the Imd pathway and increasing the synthesis of immune peptides against infection, increases the chance of overcoming the infection (Kuraishi et. al. 2011; Vodovar et. al. 2005). In an infected insect, increased synthesis of other components of the humoral immune response occurs. As a result of infection with *P. entomophila*, increased synthesis of lysozyme occurs. Lysozyme is synthesized de novo in a fat body and is a germicidal agent with a lytic effect. Although, a greater stimulus for the synthesis of lysozyme is Gram-positive bacterial infection. In the case of *P. entomophila* infections, this phenomenon is also presented. Due to infection, a dramatic increase in synthesis of lysozyme is observed. there is also a dramatic increase in this component of the humoral response of the insect. Another important element of the immune system of insects, whose activity is changing is the phenol oxidase system. As a result of infection with *P. entomophila*, there is a diagnosis of lipopolysaccharide located on the surface of Gram-negative bacteria. The phenol oxidase system in insects is involved in the healing process and melanization of the insect's epidermis (Vodovar et. al. 2006).

6. Effect of *Pseudomonas entomophila* infection on *Drosophila mellangaster* physiology

So far, the interaction of *Pseudomonas entomophila* with insect *Drosophila melanogaster* is described. The main organ of the host that was first damaged as a result of infection is the gut (Amcheslavsky, 2009). Fruit fly infection is usually caused by eating food contaminated with bacteria

- usually fruit. It has been reported that under laboratory conditions *D. melanogaster* is easier to infect with a suspension of bacteria in a solution of sucrose. Fly after infection with poisoned food with *P. entomophila* stops eating other food (Dieppois et. al. 2014). It is not known whether this phenomenon is directly caused by bacteria and whether it is the result of damage to the digestive system by entomopathogen (Vallet-Gely et. al. 2008; Dieppois et. al. 2014). Bacterial cells that enter the intestine can still divide and move colonizing subsequent sections of the digestive system. Examination of the mechanism of interaction between *P. entomophila* and *D. melanogaster* allowed to follow the next stages of morphological changes caused by the pathogen in the body of the insect. The infection of *P. entomophila* causes the morphological changes of cells that build the intestinal gut of *D. melanogaster*. The microvilli of intestinal epithelial cells are deformed. In later stages, the intestinal epithelial cells are disrupted. About 24 hours after the infection with bacteria, no changes in the construction of protective barriers (peritrophic matrix) are observed. This proves that the main element involved in the fight against the pathogen is the gut. In the first day after infection, the bacteria do not appear in hemocel *D. melanogaster* (Vallet-Gely et. al. 2008). Infection to the intestinal epithelium leads to an oxidative burst that limits the growth of bacteria in the gut. The ability of *P. entomophila* to synthesize proteins responsible for resistance to oxidative stress, allows the bacteria to survive the hostile conditions in the host organism (Dieppois et. al. 2014). In the digestive tract of insects, the pH is acidic and its values are in the range of pH=2-3. A number of antibacterial substances, for example lysozyme, are produced in the digestive system. A large tolerance for external conditions allows survival of *P. entomophila*, even at acidic pH and in the presence of lysozyme. In the insect gut, as a result of infection, the reactive oxygen species are produced by the NADPH Duox. *P. entomophila* bacteria are resistant to reactive oxygen species, which increases resistance to the first line of defense (Ha EM et. al. 2005; Mulet et. al. 2012).

7. Summary

The *Pseudomonas entomophila* bacteria stand out against other strains classified in the *Pseudomonas* order as well as other entomopathogenic strains. The study of genome sequencing significantly increased the state of knowledge about this bacteria and provided valuable information about the mechanism of its action. These bacteria are deprived of a type III secretion system, highly pathogenic to insects and non-pathogenic to plants. Lack of ability to infect plants gives the possibility of recognizing this strain of bacteria as a potential biopesticide. However, this conclusion should be supported by other studies on the ability to infect other insects. The influence of the bacterial strain on the bee organism should also be examined, due to the usefulness of these insects to humans and their use in agriculture. Another important aspect of *P. entomophila* research is further analysis of its virulence factors and studies concerning the effect of individual virulence factors on different host organisms (Vodovar et. al. 2005; Vodovar et al. 2006; Dieppois et. al. 2014).

8. Bibliography

- Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. et. al. (2009) Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 9;4(1): 49-61.
- Buchon N, Broderick NA, Poidevin M (2009) *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell & Host Microbe*, 5(2): 200-211.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2004) Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 33–54.
- Dieppois G, Opota O, Lalucat J, et al. (2014) *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. *Springer*: 25-34.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity *Science*, 310: 847-850.
- Heeb S, Haas D (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.*, 14(12): 1351-63.

- Kamala-Kannan S, Lee KJ, Park SM, et al. (2010) Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol.* 50(2): 200-205.
- Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, et al. (2011) Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(38): 15966-71.
- Liehl P, Blight M, Vodovar N, et al. (2006) Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model. *PLoS PATHOGEN*
- Mulet M, Gomila M, Lemaitre B, et al., (2012) Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 35(3): 145-9.
- Sarris P, Scoulica E, (2011) *Pseudomonas entomophila* & *Pseudomonas mendocina*: Potential models for studying the bacterial Type VI Secretion System. *Infection, Genetics and Evolution* 11(6): 1352-1360.
- Shahbaz-Mohammadi H, Omidinia E (2011) Screening and characterization of proline dehydrogenase flavoenzyme producing *Pseudomonas entomophila*. *Iran J Microbiol.* 3(4): 201-9.
- Shanbhag S, Tripathi S (2009) Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* mid gut. *J Exp Biol.* 212(Pt 11): 1731-44.
- Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L, et al (2010) Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Appl Environ Microbiol.* 76(3): 910-921.
- Vallet-Gely I, Opota O, Boniface A, et al. (2010) A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol.* 12(11): 1666-79.
- Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S. et al. (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotechnol.* 24(6): 673-9.
- Vodovar N, Vinals M, Liehl P, et al. (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(32): 11414-11419.
- Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, et al., (2010) Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 48(5): 1812-9.

28. Entomopathogenic properties of fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

Michał Sułek, Jakub Kordaczuk, Patrycja Kaczmarek

Maria Curie-Skłodowska University, Department of Immunobiology, Lublin, Poland

Scientific supervisor: dr hab. Iwona Wojda, prof. UMCS

Jakub Kordaczuk: jakub.kordaczuk@o2.pl

Keywords: insect, immunity, biopesticides, insecticides

Abstract

Insects are the most common group of pests. They cause a significant loss in gathered yields and contribute to contamination of the environment. Chemical pesticides, which are the most popular group of insecticides, not only are lethal to specific pests, but also to nontarget organisms. To protect the environment and limit the contamination caused by chemicals, scientists have been developing new insecticides based on biological factors. Among these factors are entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Both fungal species are highly pathogenic to specific insects, yet they are safe for humans. In addition, they contribute to the reduction of chemicals present in the environment. What is more, biopesticides based on entomopathogenic fungi are highly effective against pests and have a low production cost in comparison to traditional chemical pesticides. Thanks to molecular biology, scientists can reach a better understanding of the mechanisms of fungal activity against insects. This allows to develop new, more specialized, and more effective fungal bioinsecticides, which is crucial for a rational pest management program.

1. Introduction

Pesticides are chemical substances that have been used for the control of insect pests for many decades. Unfortunately, these chemicals cause downside effects. They poison nontarget organisms and contribute to groundwater contamination. These unwanted characteristic of chemical pesticides have forced scientists to develop alternative, bio-friendly insecticides. Among biological control agents, plant protection with entomopathogenic fungi has a key role in practical pest management program. The factors that make fungi a great potential source of biocontrol agents are: their high reproductive abilities, short generation time, target-specific activity and capabilities to survive a longer time in an environment, which is crucial when the host is absent. The use of entomopathogenic fungi has a broad range of advantages in comparison to conventional chemical pesticides. These include high efficiency, reduction of chemicals in the environment, low cost of production and primarily safety for human and other nontarget organisms, which share a common niche with insect pests. Fungal bioinsecticides, unlike bacteria and viruses, do not need to be ingested by insects in order to infect them. Entomopathogenic fungi invade their hosts directly through their cuticle, which make them easier to apply than other biocontrol agents. What is more, almost all insect species are susceptible to fungal infection. Currently there are approximately 750 species of fungi that cause infection in insects. Fungi produce spores that infect their host by germinating on the surface of cuticle and then overgrowing the insects' body. Death occurs between 4 and 10 days, depending on the number of infecting spores and fungi species. After death of the host, the fungus produces thousands of new spores on the dead body, which disperse and infect new insects. In this paper we want to discuss the properties of two popular entomopathogenic fungi: *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* (robertsii)(Gul 2014).

2. General characteristics of *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae*

Beauveria bassiana is a worldwide soil fungus responsible for white mustardine disease. Originally the fungus was known as *Tritirachium shiotae*. It was renamed after the Italian scientist Agostino Bassi, who implicated this fungus as the agent of white mustardine disease in silkworms.

Beauveria species, including *Beauveria bassiana*, are easy to differentiate from other fungi thanks to their morphological properties. *B. bassiana* is a filamentous fungus that produces colourless aerial conidia from conidiogenous cells. First, conidia are produced on the top of conidiophore. Next, conidium grows laterally in the middle of the first neck of conidiophore and then is pushed upwards by sympodial growth, which results in a fully grown and unique type of fungi conidia. *B. bassiana* colonies grow slow. They tend to have woolly structure, with colours varying from white to yellow or even pink. Their hyphae are colourless and smooth, usually about 2 µm wide. Conidiogenous cells consist of a globose base, globose conidia and denticulate rachis (Omkar 2016; Saranraj and Arul 2017). The genus *Metharizium* consist of 9 *Metharizium* species widely spread across the World. Currently, only three of the characterized species are of importance to economics and science: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium album*, and *Metarhizium flavoviride* (Sandhu 2000). The *M. anisopliae* species, which has the highest entomopathogenic potential is responsible for „green muscardine” disease. Fungus is characterized by branching conidiophores and rounded to conical conidiogenous cells, which are part of dense hymenium. Conidia are round or ovoid, forming chains which aggregate into tubular, bright green to yellow columns (Sandhu 2000; Jackson and Jaronski 2009). Both entomopathogenic species: *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* can infect a broad spectrum of insect hosts.

3. Mode of host infection by *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae*

The process of infection starts with adhesion of conidia or blastospores to the cuticle of a vulnerable host. Cuticle of insects is a heterogenous structure which can change depending on the insects's developmental stage. The outer layer of cuticle is called epicuticle. Below epicuticle, the next layer – procuticle - is divided into exo-, meso-, and endo-cuticular layer. The last layer of cuticle – epidermidis - surrounds and protects the internal structures of insects' body. Attachment of the spores is a passive process catalysed by water and air transmission. *Beauveria bassiana* produces three types of spores: aerial, submerged conidia and blastospores, all of them are infective. It has been found that spores of *B. bassiana* are surrounded by a layer compound of interwoven fascicles of hydrophobic rodlets. This unique layer is characteristic for dried spores, since it has not been detected on the vegetative cells. The process of adhesion of dry spores to an insects' cuticle is caused by non-specific hydrophobic forces caused by the hydrophobic rodlets. In *B. bassiana*, two hydrophobins have been found: *Hyd1* and *Hyd2*. These molecules are responsible for rodlet layer assembly, which is crucial for adhesion to host cuticle and virulence of fungi (Zhang et al. 2007). In *M. anisopliae* two genes have been characterized as responsible for expression of adhesion proteins: *Mad1* and *Mad2*. It has been found that the loss of the *Mad1* protein resulted in difficulties in adhesion to host cuticle, germination, blastospore synthesis and virulence of fungi. Further analysis of adhesion proteins suggested that the *Mad2* protein is responsible for target-specific adhesion and the loss of this molecule resulted in decreased adhesion. Unlike the loss of *Mad1* did not affect fungal differentiation and virulence (Chengshu and Leger 2007). Once entomopathogenic fungi attach to the insects' cuticle via specialized hydrophobins and adhesins, the germination and growth begins. The further growth of fungi depends on nutrients, oxygen, hydrogen, suitable pH and temperature. Hydrocarbons present on insect cuticle such as aliphatic and methyl-branched alkanes have been described as perfect nutrients for *B. bassiana*. Once the fungi are attached, the process of penetration of host cuticle is started.

4. Penetration of host cuticle by *B. bassiana* and *M. anisopliae*

As mentioned before, fungi infect insects directly by penetration of the cuticle. The penetration process starts when the germ tube or appressorium is formed. Appressorium is a specialized structure which assists the fungi in breaching the cuticle and helps reaching the hemocel. Formation of appressorium is dependent on the host surface tomography and involves intracellular messenger molecules like Ca^{2+} and cyclic AMP. Entomopathogenic fungi penetrate the cuticle and reach the hemocel of the host to obtain nutrients crucial to further growth and reproduction. „Entry” requires mechanical pressure and enzymatic degradation. It has been shown that proteins are a major

component of insect cuticle. *B. bassiana* and *M. anisopliae* produce a variety of enzymes including proteases, lipases and chitinases, capable of degrading cuticle. The most abundant group of cuticle-degrading enzymes found in *B. bassiana* and *M. anisopliae* are proteases such as trypsin, chymotrypsin, esterase, collagenase, and chymoelastase. What is more, endoproteases and aminopeptidase are also involved in formation of appressorium (Pedrini et al. 2013; Sanchez-Perez et al. 2014). In *M. anisopliae* species, scientists have found genes encoding the protein kinases, which are involved in penetration processes. For example, *MaHog1* gene (a member of the Hog1/Sty1/p38 MAP-kinase **gene** family), which encodes for *Hog1* kinase that regulates the penetration and *Chi2* gene, which encodes for an endochitinase which regulates the penetration of the host cuticle and reduces the time to kill the host. Further analysis showed that also a membrane proteins, the tetraspanins, regulate the turgor pressure of appressorium and the expression of protein and chitin degrading enzymes. Tetraspanins also regulate the expression of *ApsA* (anucleate primary sterigmata) and kinesin. These molecules contribute to sensing the environment of the host and start the germination of the fungi using nutrients found on the hosts cuticle (Aw and Hue 2017). As mentioned before, cuticle is a complex structure, which may differ during the life cycle of an insect and is a compound of several various layers. To overcome this protection, fungi enzymes need to work synergistically to fully penetrate the host cuticle. For example, in lipid degradation by *B. bassiana* performed by eight cytochrome P450 enzymes, four catalases, three lipases/esterases, a long-chain alcohol, aldehyde dehydrogenases and putative hydrocarbon carrier protein (Pedrini et al. 2013). In addition, environmental factors such as temperature, sunlight and humidity influence the whole process of infection, from the adhesion to the host to germination and penetration of the cuticle. Both *B. bassiana* and *M. anisopliae* can infect a broad range of different insect species spread across the world, thus presented infection factors vary between local species in presented entomopathogenic fungi. After a successful penetration, the fungi are spread inside the hemocel forming yeast-like structures called blastospores. In order to get maximum nutritions they reach the insect's respiratory system. Host's death results from mechanical damage of tissue, lack of nutrients in the body and primarily synthesis of fungal toxins (Sinha et al. 2011).

5. Fungal toxins

Entomopathogenic fungi produce various toxins, which have a different effect on insect's tissues. *Beauveria bassiana* produces many insect toxins such as: beauvericin, beauverolides, bassianolide, and isarolides. Analysys of insects infected with *Metharizium anisopliae* have showed presence of cytochalasins and destruxins (DTXs). DTXs are cyclic peptides that posses ester linkages and consist of five aminoacids and D- α hydroxyl acid. They are produced relatively late in the insects' body, usually after the mycelium is grown. Destruxins are capable of modulating the host cellular immune system, which involves prevention of phagocytosis and nodule formation. What is more, DTXs cause immune depressant activity in insects and can modulate insect signalling pathway by activating calcium dependent channels in the insects' muscle. Currently, over 28 different destruxins have been found, most of them are synthetized in *M. anisopliae* species (Samuels et al. 1988; Vey et al. 2001). The main role of destruxins is to simplify the establishment of fungi germination in the insect hemocel (Samuels et al. 1988). Beauvercin has been isolated from *B. bassiana* and various *Fusarium* strains. Structure of the toxin could be described as a cyclic lactone trimer of amide of N-methyl l-phenylalanine and d- α -hydroxyisovaleric acid. Beauvercin structure allows the molecule to react with divalent cations and form complexes, thus it can be described as an ionophore. Beauvericin is highly cytotoxic to mosquito larvae, blowflies, and Colorado potato beetle, which make it a good insecticide. Bassianolide is another toxin isolated from *B. bassiana* strains. Structurally, bassianolide is a cyclic polymer of d- α -hydroxyisovaleryl L-N-methylleucinol. It functions as an ionophore, similar to beauvericin and is highly entomopathogenous on *Bombyx mori* larvae and pupae. Injection of bassianolide in water solution caused infection symptoms at a dose of 2 μ g/larvae and was lethal at a dose of >5 μ g/larvae (Sinha et al. 2011).

6. Production and application of pesticides based on *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae*

High virulence of *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae*, as well as their ability for mass production at low costs make them the most popular entomopathogenic fungi used in production of insecticides. Various *B. bassiana* and *M. anisopliae*-based products have been developed and spread across the globe for use against a broad spectrum of pests of fields, forest or greenhouse. Currently, extensive research is being conducted to improve the methods of fungal mass production and to better understand the mechanisms as well as virulence factors of entomopathogenic fungi. The most common method of production of the fungus is the use of artificial media. For fungal colonization, what perfectly works is placing the dishes that contain culture grown on agar media in fields or forests. However, most of mass production methods involve the use of vegetables as the medium. Grains such as rice, wheat, barley and millet have been successfully used in various fungal cultures. A millet-based growth medium has been reported to be one of the most successful. It provides all the crucial nutrients for the fungi and support its growth in the niche in absence of host insects. In a general scheme of this type of medium, millet grains are placed in a polyvinyl container, which is soaked in water that contains citric acid. Then, the medium is boiled at 90°C for 1 h and autoclaved at 121 °C for 30 min. After that, the bag is incubated at 25°C for a period of 3 weeks, then the culture is dried. The whole process results in granule production with the concentration of 1.1×10^8 *B. bassiana* conidia per gram of grain (Gouli 2008). Another method of large-scale production of conidia is conducted with the use of a fermenter. Fungi are placed on shallow plates in the fermenter on an average depth of 1 cm. After several days the conidia are produced. The next medium worth mentioning is a solid substrate that is attractive to the target insects and can be used as a bait. Insects during feeding stage are often a good target for the bait. However, some of insect species demonstrated the ability to avoid these traps by sensing the presence of the entomopathogenic fungi. Good example are termites, which are highly susceptible to infection by *B. bassiana* and *M. anisopliae*. They are able to avoid fungal infection by sealing off the contaminated tunnel to prevent it from infecting them and others in the „pack”. However, cellulose bait coated with *M. anisopliae* overcome the repellence of the insects (Staples and Milner 2009). Another approach worth mentioning is a production of mycelium in a submerged culture. After the fungi are grown, the culture is filtered and thin mats approximately 3–6 mm thick are made and treated with a sugar solution (10% maltose or sucrose) as desiccation protectant. The mat is dried at 20–25°C and divided into small, approximately 2mm particles. These particles are introduced into the field, greenhouse or even house area and after exposition to moisture, commence production of conidia. The production of new conidia is constantly running for the next several days, thereby providing fresh inocula for a considerable amount of time. The formulation of insecticides based on fungi encounters issues related to e.g a half-life of the conidia. Unlike chemical insecticides, the use of organic solvents in production is not possible, because they cause death of living organisms in biopesticides. Currently, most commercial preparations are in the form of oils or wettable powders. Wettable powders, the most popular form of fungal insecticides, contain: 0–80% technical powder, 15–45% filler, 1–10% dispersant, and 3–5% surfactant. After mixing with water that can be applied to the foliage as a standard spray. What is more, powder can also be applied directly into the soil. Powder contains a number of additives to protect the fungi from UV light, promote germination of fungal spores or enhance the ability of spores to stick on the plants (Kim et al. 2010). Second most popular carrier for fungal spores are oils. Variety of oils is added to improve the validity of fungal-based preparations and their efficiency in dry climates. What is more, oils increase survival and viability of conidia, stimulate germination, help spores adhere on the plants and assist in penetration of insect cuticle by disrupting the waxy layer. The most popular oil carriers used in these products are mineral and paraffin oil (Moore et al. 1995). Vegetable oils such as corn and cotton seed oil have also been suggested as effective carriers. Viability of conidia in corn oil was higher than 98% for 9 months of storage at 25 °C, but drastically fell to 23% at 21 months of storage (Moore et al. 1995; Kim et al. 2011). Effectiveness of fungi as pesticides not only depends on fungal type but also on method of application. We can distinguish four main methods of fungal applications: tipping the plant or roots, spraying the foliage, treating the soil and

using vectors. A list of commercially available *B. bassiana* and *M. anisopliae* products, as well as target pests, crops and formulation is presented below in Table 1

Tab. 1. Formulations of *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* pesticides (Sinha et al. 2011).

Fungi	Target Pest	Crop	Product and company	Formulation
<i>Beauveria bassiana</i>	Sucking insects	Cotton, glasshouse crops	Naturalis™, Tray Bioscience, USA	Liquid formulation
<i>Beauveria bassiana</i>	Coffee berry borer	Coffee	Conidia, AgroEvo, Germany, Columbia	Suspendible granules
<i>Beauveria bassiana</i>	Whiteflies/Aphids/Thrips	Field crops	Mycontrol-WP/Mycotech Corp, USA	Wettable powder
<i>Beauveria bassiana</i>	Corn borer	Maize	Ostrinil/Natural plant protection/France	Microgranules of mycelium
<i>Metharizium anisopliae</i>	Termites	Houses	Bio-path™/EcoScience/USA	Conidia on a mycelium placed in trap/chamber
<i>Metharizium anisopliae</i>	Black vine weevil	Glasshouse ornamental crops, nursery stock houses	Biologie Bio 1020/Bayer AG, Germany	Granules of mycelium
<i>Metharizium anisopliae</i>	Locusts, Grasshoppers	Pasture/turf	Biogreen/Biocare Technology Pvt. Ltd./Australia	Conidia produced on grains

7. Conclusion

The use of fungal insecticides in biocontrol of insects is key in practical pest management program. They allow for a better environment protection and biodiversity in comparison to chemical substances. However, the use of *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* and other entomopathogenic fungi cause some concern among scientists. Fungal products require 2–3 weeks to kill the insects, the inoculum has a short expiration date and application of preparations often needs to coincide with high relative humidity. Also, it has been reported that some of saprophytic fungi may contribute to contamination of environment with mycotoxins. However, advantages of using fungal-based pesticides highly exceed the disadvantages. Today, thanks to modern techniques used in molecular biology, scientists can overcome most difficulties related with the fungi. There is also a need for further understanding of the mechanisms of entomopathogenic fungi in order to develop new, more specialized and more effective fungal bioinsecticides.

8. Bibliography

- Aw KMS, Hue SM (2017) Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *Journal of fungi* 3(2): 30.
- Chengshu W, St. Leger RJ (2007) The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808–816.
- Gouli V, et al. (2008) Effect of the entomopathogenic fungi on mortality and injury level of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 4 (2): 37–47.
- Gul HT, Saeed S, Khan FZA (2014) Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. *Applied Sciences and Business Economics* (1): 10–18.
- Jackson MA, Jaronski ST (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological research* 113(8): 842–850.

- Kim J., Je YH, Choi JY (2010) Complementary effect of phloxine B on the insecticidal efficacy of *Isaria fumosorosea* SFP-198 wettable powder against green house white fly, *Trialeurodes vaporariorum* West. *Pest Management Science* 66:1337–1343.
- Kim JS et al. (2011) Persistence of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) SFP-198 conidia in corn oil based suspension. *Mycopathologia* 171: 67–75.
- Moore O, et al. (1995) Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* 5: 193–199
- Omkar BK (2016) Chapter 2 - Biocontrol of Insect Pests. *Ecofriendly Pest Management for Food Security*: 25-61.
- Pedrini N et. al (2013) Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology* 4: 24.
- Samuels RI, Reynolds SE, Charnley AK (1988) Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 10 (2): 403–412.
- Sanchez-Perez LC et. al (2014) Enzymes and entomopathogenic fungi: advances and insights. *Advances in Enzyme Research* 2: 65–76.
- Sandhu SS, Rajak RC, Hasiya SK (2000) Potential of entomopathogens for the biological management of medi-cally important pest: progress and prospect. *Glimpses in Plant Sciences*: 110–117.
- Saranraj P, Arul J (2017) AGROBENEFICIAL ENTOMOPATHOGENIC FUNGI – *Beauveria bassiana*: A REVIEW. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*. (2): 1051-1087.
- Sinha KK, Choudhary AK, Kumari P (2016) Entomopathogenic Fungi. *Ecofriendly Pest Management for Food Security*: 475–505.
- Staples TA, Milner RJ (2000) A laboratory evaluation of the repellency of *Metharizium anisopliae* conidia to *Coptotermes lacteus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 36: 1–16.
- Vey A, Hougland R, Butt TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agent. In: Butt, T.M. (Ed.), *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB-International: 311–345.
- Zhang, SZ et. al (2011) Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopatho-genic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* (80): 811–826.

29. Biofilm bakteryjny wielogatunkowy – metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część III – przegląd metod mikroskopowych

Multispecies bacterial biofilm – research and visualization methods on abiotic surfaces. Part III – microscopy assays

Zuzanna Sycz ⁽¹⁾, Monika Sępek ⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

⁽²⁾ Klinika Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
Opiekun naukowy: dr hab. Dorota Wojnicz

Zuzanna Sycz: sycz.zuzanna@gmail.com

Słowa kluczowe: biofilm mieszany, adhezja, egzopolisacharyd, analiza ilościowa i jakościowa biofilmu

Streszczenie

Biofilm bakteryjny stanowią przylegające do powierzchni stałych zorganizowane struktury, utworzone przez komórki jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów. Badania biofilmów mogą być prowadzone m. in. metodami mikroskopowymi, dotyczą wówczas ich cech fenotypowych, składu gatunkowego, etapów powstawania i mechanizmów funkcjonowania, sposobów komunikacji między bakteriami (*quorum sensing*) oraz interakcji międzygatunkowych (synergizm, antagonizm). Oprócz tradycyjnej mikroskopii optycznej, do metod mikroskopowych stosowanych w badaniach biofilmów należą m.in.: skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mikroskopia sił atomowych (AFM), mikroskopia konfokalna w połączeniu z hybrydyzacją fluorescencyjną *in situ* (FISH) oraz peptydowymi kwasami nukleinowymi (PNA), konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM), mikroskopia ze skanującą sondą (SPM), skaningowa transmisyjna mikroskopia promieniowania X (STXM) oraz konfokalna mikroskopia ramanowska (CRM).

1. Wstęp

Niniejsza praca stanowi kontynuację tematyki podjętej w pierwszej i drugiej części monografii (Biofilm bakteryjny wielogatunkowy – metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część I – przegląd metod barwiących i metabolicznych. Część II – przegląd metod genetycznych i fizycznych). Złożoność biofilmów utrudnia ich wyczerpującą analizę z wykorzystaniem jedynie metod barwiących i metabolicznych, dlatego wymaga połączenia różnych technik eksperymentalnych, do których należą metody genetyczne, fizyczne i mikroskopowe. Za pomocą nowoczesnych metod mikroskopowych można przeprowadzić m.in. analizę trójwymiarowej struktury biofilmu, w której można zaobserwować przestrzenne zróżnicowanie umiejscowienia w niej bakterii, wzajemnych relacji ilościowych oraz przestrzennych interakcji pomiędzy drobnoustrojami. W przedstawionej poniżej charakterystyce tych metod podkreślono zarówno ich zalety jak i ograniczenia.

2. Opis zagadnienia

Tradycyjna mikroskopia optyczna (światlna) jest podstawową techniką wystarczającą do wizualnej identyfikacji tworzenia biofilmu, niezawodną do wykrywania biofilmów bakteryjnych jako ognisk infekcji (przedstawia wartość diagnostyczną i prognostyczną) oraz do ilościowej oceny biomasy biofilmu. Stwierdzono, że absorpcja światła przez biofilmy koreluje z masą komórek bakteryjnych tworzących biofilm oraz z całkowitą masą biofilmu. Zauważono istnienie liniowej relacji między intensywnością piksela w obrazach biofilmu na płaszczyźnie wyznaczonej osiami x i y, a odpowiednią liczbą komórek (oś z), co umożliwia obliczenie grubości biofilmu. Dzięki

stosunkowo małemu powiększeniu, mikroskopia świetlna umożliwia obrazowanie większych części próbki w porównaniu z mikroskopią elektronową. Z tych powodów badania przy użyciu mikroskopii świetlnej i transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) lub skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) zapewniają lepszą korelację uzyskanych wyników.

Zalety metody: przygotowanie próbki jest łatwe, preparaty barwione są metodą Grama, Browna i Brenna oraz hematoksyliną i eozyną (H&E); jest to metoda praktyczna i tania. Ograniczenia metody: nie jest osiągnięty poziom powiększenia i rozdzielczości konieczny do określenia międzykomórkowych i komórkowych relacji; po osiągnięciu maksymalnej wykrywalnej intensywności nasycenia pikseli niemożliwe jest dostrzeżenie dalszych różnic w grubości; niemożliwe jest zróżnicowanie morfotypowe poszczególnych gatunków bakterii (de Carvalho i in. 2007, Davis i in. 2008, Hochstim i in. 2010, Hong i in. 2014, Oates i in. 2014, Richardson i in. 2009, Toth i in. 2011, Winther i in. 2009).

Wobec niedoskonałości podstawowych technik mikroskopowych, w celu identyfikacji i topograficznej wizualizacji bakterii w wielogatunkowym biofilmie, konieczne jest zastosowanie zaawansowanych technik mikroskopowych, do których należą m.in.: skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mikroskopia sił atomowych (AFM), mikroskopia konfokalna w połączeniu z hybrydyzacją fluorescencyjną *in situ* (FISH) oraz peptydowymi kwasami nukleinowymi (PNA), konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM), mikroskopia ze skanującą sondą (SPM), skaningowa transmisyjna mikroskopia promieniowania X (STXM) oraz konfokalna mikroskopia ramanowska (CRM).

3. Przegląd literatury

3.1 CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa to metoda wykorzystująca mikroskop optyczny wyposażony w wiązkę laserową. Jest obecnie najbardziej wszechstronną techniką mikroskopową do wizualizacji struktury przestrzennej biofilmu i metodą z wyboru do kwantyfikacji biofilmu. Umożliwia wizualizację całego biofilmu komórkowego, tj. materiału macierzy zewnątrzkomórkowej oraz uwodnionych żywych komórek w trzech wymiarach. Możliwe jest skanowanie grubej próbki biologicznej, poprzez przetwarzanie obrazu linia po linii, w osiach x, y i z. Większość barwników fluorescencyjnych stosowanych w badaniach biofilmu wybarwia składniki komórkowe, a nie składniki macierzy, dlatego zobrazowanie macierzy zewnątrzkomórkowej jest trudniejsze, a EPS (egzopolisacharyd) jest nazywany „ciemną materią biofilmu”. Jednoczesne zastosowanie kilku sond fluorescencyjnych umożliwia równoczesne obrazowanie poszczególnych składników biofilmu. Sondy najczęściej używane do oznaczania komórek drobnoustrojów w biofilmie to SYTO-9 i SYBR-Green. Jest również stosowany zestaw dwóch barwników: SYTO-9 oraz jodek propidyny (PI), obydwa reagują z kwasami nukleinowymi, lecz różnią się zdolnością do przenikania przez nieuszkodzone błony bakteryjne. SYTO-9 o małej masie cząsteczkowej przenika do wnętrza komórek przez spójne błony cytoplazmatyczne (komórki żywe) i zabarwia je na zielono. PI o dużej masie cząsteczkowej przenika tylko do komórek z uszkodzeniami w błonach (komórki martwe) i zabarwia je na czerwono. Zastosowanie tych barwników umożliwia zatem zróżnicowanie populacji bakterii obecnych w biofilmie na komórki żywe i martwe pod względem różnic w ciągłości błon cytoplazmatycznych. Fluorescencja z oświetlonego punktu jest zbierana w obiektywie, a następnie transformowana przez fotodiodę na sygnał elektryczny przetwarzany przez komputer. Informacje ze wszystkich pikseli są składane, dając obraz 3D o wysokim kontraście i rozdzielczości. Można połączyć tą metodę z konfokalną mikroskopią ramanowską (CRM), co umożliwia określenie rozkładu przestrzennego biomasy i wody, a także składu gatunkowego biofilmu.

Zalety metody: umożliwia jednoczesną ocenę struktury przestrzennej biofilmu bakteryjnego i identyfikację gatunku bakterii, jest szczególnie przydatna do badania grubych, wielowarstwowych próbek, np. EPS biofilmu bakteryjnego; pozwala na obrazowanie procesów rozwojowych biofilmu w czasie; w kontekście wielogatunkowych biofilmów pozwala na analizę konkurencji międzygatunkowej; umożliwia ocenę wpływu środków przeciwdrobnoustrojowych na żywotność komórek. Ograniczenia metody: zakłócenia lokalnych właściwości fizykochemicznych biofilmu po

reakcji z sondami fluorescencyjnymi; auto-fluorescencja próbki ukrywająca sygnał z badanej komórki, metoda pozwala tylko na badanie półilościowe, ponieważ można stosować jednocześnie tylko kilka barwników i pokazać tylko kilka elementów w tym samym obrazie (Azeredo i in. 2017, Franklin i in. 2015, Guilbaud i in. 2015, Neu i in. 2014, Pan i in. 2016, Pantanella i in. 2013, Raszka i in. 2009).

3.2 CRM (Confocal Raman Microscopy)

Spektroskopia Ramana (mapowanie ramanowskie) opiera się na wzorach rozproszenia światła wykrytych po napromieniowaniu próbki światłem monochromatycznym. Wiązka promieniowania elektromagnetycznego o znanej długości fali uderza w analizowaną próbkę. Mierzy się rozproszenie promieniowania i przesunięcie w energii. Spektroskopia Ramana została wykorzystana do zdefiniowania chemii materiałów matrycowych w biofilmach. Częstotliwość rozproszenia światła w biofilmie różni się od częstości jego rozproszenia przez poszczególne substraty, co może być wykorzystane do badania składu chemicznego biofilmu. Spektroskopia ramanowska wzajemnie uzupełnia się ze spektroskopią w podczerwieni (IR), ale widmo ramanowskie jest łatwiejsze w interpretacji. Konfokalna mikroskopia ramanowska pozwala na uzyskanie informacji na temat chemicznych „odcisków palców” różnych biofilmów. CRM najczęściej występuje w połączeniu z CSLM i służy do określenia przestrzennej dystrybucji biomasy i wody oraz składu chemicznego żywego biofilmu. Rozproszenie Ramana jest raczej słabym efektem, może on jednak być znacznie wzmocniony. Powierzchniowo wzmocniony efekt Ramana – SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) umożliwia wzmocnienie efektywnego ramanowskiego przekroju cząstecznego (*Raman cross-section*) cząsteczek zaadsorbowanych na powierzchni metalu (tzw. adsorbatu) o kilka rzędów wielkości w stosunku do efektywnego ramanowskiego przekroju czynnego cząsteczek nie zaadsorbowanych. Ta metoda umożliwia zatem bezpośrednie dotarcie do nieosiągalnych do tej pory próbek, takich jak wnętrza komórki bakteryjnej oraz jej poszczególne kompartmenty. Służy do badania komunikacji międzykomórkowej (*quorum sensing*) w oparciu o wydzielane cząsteczki jako sygnały.

Ograniczenia metody: mały efektywny ramanowski przekrój czynny obniżający poziom sygnału, co uniemożliwia użycie CRM w badaniach na poziomie pojedynczej molekuly; możliwość termicznej degradacji próbki; pojawienie się silnego tła fluorescencyjnego pochodzącego od zanieczyszczeń biologicznych; skomplikowana konfiguracja warunków eksperymentu w celu uzyskania sygnałów wysokiej jakości; trudno zbadać głębsze warstwy grubych biofilmów (Bodelón i in. 2016, Pantanella i in. 2013, Raszka i in. 2009, Schlucker 2014).

3.3 SEM (Scanning Electron Microscopy)

Skaningowa mikroskopia elektronowa wykorzystuje wiązkę elektronów, tj. promieniowanie o krótkiej długości fali i o wysokiej energii, dzięki czemu ma wysoką rozdzielczość i powiększenie rzędu nanometrów. Dostarcza informacji o strukturze przestrzennej biofilmu i wykrywa obecność EPS. Jest szeroko stosowana do wizualizacji powierzchni mikrokolonii, jak również dojrzałego biofilmu. Uwidacznia strukturę powierzchni próbki, chociaż nie posiada rozdzielczości pionowej. Umożliwia wizualną analizę powstawania jak i redukcji biofilmu. Może być używana w połączeniu ze skoncentrowaną wiązką jonową (FIB), co umożliwia zbadanie wnętrza biofilmów przez usunięcie odsłoniętych warstw powierzchniowych i/lub przekrojowe cięcia. Metoda ta umożliwia identyfikację trójwymiarowej struktury biofilmu bakteryjnego bez możliwości uwidocznienia pojedynczych komórek bakteryjnych. W celu uwidocznienia komórek bakteryjnych można dodatkowo oceniać wycinki w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM). Niestety ani SEM ani TEM nie identyfikują gatunków bakterii tworzących biofilm. Jest to niezwykle przydatne narzędzie dla analizy porównawczej w badaniach biofilmu przy ocenie działania antybakteryjnego związku czy leczenia.

Zalety metody: wyższa rozdzielczość wizualizacji (od 50 do 100 nm) i głębia ostrości w porównaniu z innymi technikami obrazowania; pomiar i kwantyfikacja danych w 3D; szeroki zakres powiększeń do analizy próbki biofilmu (20 do 30 000 razy). Ograniczenia metody: żmudne i czasochłonne przygotowanie próbek (konieczne jest ich utrwalanie, odwodnienie i powlekanie materiałem przewodzącym, który może zniszczyć strukturę próbek lub powodować artefakty), aby były odpowiednie do operacji próżniowych.

Suszenie punktowe jest najczęściej stosowaną metodą suszenia biofilmów w przypadku SEM, chociaż doprowadza to do znacznej utraty EPS. W związku z tym, że obrazowanie SEM wymaga wysokiej próżni, próbki muszą być solidnie odgazowane. Ograniczenia SEM w tym zakresie zaowocowały powstaniem alternatywnych metod w badaniach biofilmu, takich jak *cryo*-SEM i *environmental*-SEM (ESEM). Metoda *cryo*-SEM pozwala na zachowanie biofilmu w zamrożonym stanie uwodnionym oraz na zamrażanie-pękanie, gdzie zamrożona próbka biologiczna jest fizycznie rozbijana, aby odsłonić szczegóły strukturalne płaszczyzny pęknięcia odsłaniając wewnętrzną strukturę biofilmu. Metoda ESEM, w przeciwieństwie do *cryo*-SEM, zachowuje integralność biofilmu w stanie naturalnym poprzez gwałtowne zamrażanie próbki (i zachowanie jej wrażliwych struktur komórkowych), umożliwia obrazowanie w środowisku gazowym uwodnionych i nieprzewodzących biofilmów bakteryjnych, na które nie mają wpływu artefakty i odwodnienie (Azeredo i in. 2017, Bleck i in. 2010, Franklin i in. 2015, Garcez i in. 2013, Hannig i in. 2010, Karcz i in. 2012, Pan i in. 2016, Pantanella i in. 2013, Raszka i in. 2009, Timp i in. 2008, Wilson i in. 2017).

3.4 STXM (Scanning Transmission X-ray Microscopy)

W skaningowej transmisyjnej mikroskopii promieniowania X próbka jest oświetlana mono- lub polichromatyczną wiązką promieniowania X. Jest to metoda szeroko stosowana do badania składu komórek bakteryjnych i biofilmów o nominalnej rozdzielczości 25 nm. Metoda synergistyczna z innymi metodami rentgenowskimi, np. fluorescencją rentgenowską. Zalety metody: próbki nie wymagają szczególnego przygotowania, promieniowanie X nie uszkadza próbek w przeciwieństwie do promieniowania elektromagnetycznego (EM). Ograniczenia metody: złożone i kosztowne oprzyrządowanie (Srivastava i Bhargava 2016, Wilson i in. 2017).

3.5 SPM (Scanning Probe Microscopy)

Zasada działania mikroskopii ze skanującą sondą polega na skanowaniu pola widzenia mikroskopu liniami, każda linia jest następnie mierzona punkt po punkcie, a obraz tworzony jest na podstawie tych pojedynczych punktów pomiarowych. Wybór punktu pomiarowego następuje poprzez poruszanie nad próbką sondy, zasadniczy pomiar określonej właściwości badanej próbki jest dokonywany za pomocą tej samej sondy. Skanowanie z reguły realizowane jest za pomocą skanerów skonstruowanych w taki sposób, że próbka może poruszać się względem głowicy mikroskopu z sondą w trzech wymiarach. Poruszanie poziome zapewnia wybór kolejnych linii obrazu (współrzędna y) oraz skanowanie linii (kolejne punkty – współrzędna x). Skaner pionowy – z reguły o większej rozdzielczości – zapewnia uzyskiwanie zmiany pionowego położenia sondy względem próbki (współrzędna z). Jedną z odmian tej metody jest mikroskopia sił atomowych, opisana poniżej. Istnieje również technika będąca połączeniem SPM ze spektroskopią ramanowską, tzw. *Tipenhanced Raman Spectroscopy* (TERS). Ograniczenie metody: może być analizowana tylko powierzchnia biofilmu i warstwy jej najbliższe, nie nadaje się do badania dojrzałych biofilmów o grubości kilkudziesięciu mikronów (Raszka i in. 2009, Srivastava i Bhargava 2016, Wilson i in. 2017).

3.6 AFM (Atomic Force Microscopy)

Mikroskopia sił atomowych umożliwia uzyskanie obrazu powierzchni ze zdolnością rozdzielczą rzędu wymiarów pojedynczego atomu, dzięki wykorzystaniu sił oddziaływań międzyatomowych na zasadzie przemieszczania ostrza nad lub pod powierzchnią próbki. Sonda wywiera ultra-niskie obciążenia na powierzchni próbki, umożliwiając w ten sposób ilościowy pomiar i mapowanie elastyczności biofilmu oraz odłączanie bakterii od podłoża. Technika ta umożliwia obrazowanie próbek biologicznych w skali od nanometra do mikrometra. Metoda ta jest używana do wizualizacji powierzchni pojedynczych komórek bakterii i biofilmu, a także do monitorowania (również w czasie rzeczywistym) procesów związanych z życiem bakterii, takich jak rozmnażanie i produkcja EPS (jego ilość i grubość). Dzięki AFM stało się możliwe obrazowanie i badanie właściwości żywych komórek w ich naturalnym ciekłym środowisku, co jest utrudnione w przypadku szeroko dotychczas stosowanej mikroskopii elektronowej SEM i pochodnych metod. AFM jest również narzędziem do ilościowego określania siły adhezji między żywymi komórkami, komórką i powierzchnią, a nawet pojedynczymi cząsteczkami. Obrazowanie suchych biofilmów rosnących w wilgotnym powietrzu (warunki nienasycone) jest bezproblemowe pod względem oderwania

komórek i powoduje niewielkie zmiany w morfologii lub siłach przyczepności w porównaniu z wilgotnymi biofilmami.

Zalety metody: obserwacja w warunkach otoczenia *in situ*; minimalizacja procedur obróbki wstępnej i występowania artefaktów nawet na powierzchniach płynnych; taka sama rozdzielczość wzdłuż i poprzecznie do powierzchni; dostarczenie trójwymiarowych obrazów topografii powierzchni; ilościowa ocena interakcji biofilmu z powierzchnią i spójności biofilmu wraz z jakościowym obrazowaniem EPS. Ograniczenia metody: niemożność uzyskania dużego obszaru skanowania próbki i zobrazowania ścian bocznych komórek bakteryjnych; wrażliwość na warunki otoczenia (zwłaszcza wilgoć), artefakty i degradację obrazu; uszkodzenie struktury biofilmów przez obrazowanie powierzchni (zwłaszcza w środowisku płynnym); potrzeba unieruchomienia komórek podczas obrazowania (Alhede i in. 2012, Baro i in. 2012, Beaussart i in. 2014, Franklin i in. 2015, Lim i in. 2011, Lower i in. 2011, Pan i in. 2016, Pantanella i in. 2013, Potthoff i in. 2015, Raszka i in. 2009).

3.7 Mikroskopia konfokalna z wykorzystaniem techniki FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) oraz PNA (*Peptide Nucleic Acid*)

Hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* to technika służąca do wykrywania w materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą sond oligonukleotydowych DNA (mających długość zazwyczaj 15-25 nukleotydów), znakowanych na końcu 5' barwnikami fluorescencyjnymi (np. DAPI, rodamina, fluoresceina, kumaryna). Sondy mogą być również specjalnie zaprojektowane do wiązania rRNA w żywych komórkach bakteryjnych. W celu zapewnienia kontrolowanej hybrydyzacji sondy do sekwencji docelowej, badane komórki zostają utrwalone i permeabilizowane. Intensywność sygnału fluorescencyjnego jest skorelowana z zawartością komórkowego RNA oraz etapem wzrostu danego mikroorganizmu, dzięki czemu możliwa jest ocena poziomu metabolizmu komórkowego, wynikającego z liczby aktywnych rybosomów w komórce.

Oligonukleotydowe sondy znakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi hybrydują specyficznie z wybranymi fragmentami rRNA drobnoustrojów. Gdy badany gen ulega ekspresji, wówczas uzyskuje się fluorescencyjny sygnał – GFP (*Green Fluorescent Protein*). Do badania biofilmów wielogatunkowych używa się sond PNA (*Peptide Nucleic Acid Probes*), które są syntetycznymi analogami DNA. Wiążą się one z wybranymi sekwencjami RNA/DNA z wyższym powinowactwem, ponieważ ich przypadkowy ładunek elektryczny jest obojętny. W PNA-FISH (*Peptide Nucleic Acid Probes FISH*) wykorzystuje się fluorescencyjnie znakowane sondy PNA, które różnią się pod względem chemicznym od sond wykorzystywanych w standardowej metodzie FISH, CARD-FISH, DOPE-FISH. Sondy PNA to cząsteczki kwasu peptydonukleinowego, które naśladują cząsteczkę DNA, jedyna różnica polega na zastąpieniu ujemnie naładowanego szkieletu fosforanowo-cukrowego obojętnym elektrycznie fragmentem poliamidowym lub peptydowym. Niestety, sekwencje powszechnie używanych sond oligonukleotydowych nie mogą być prosto przeniesione na sekwencje sond PNA; ponadto wymaga się, aby były one krótsze (14-15 nukleotydów). Powyższe czynniki oraz koszt tej metody znacząco ograniczają jej wykorzystanie (Brzeszcz i in. 2013, Raszka i in. 2009, Wilson i in. 2017).

4. Podsumowanie

W niniejszej pracy przeglądowej przedstawiono i krótko scharakteryzowano metody mikroskopowe, służące do badania i wizualizacji biofilmów bakteryjnych oraz umożliwiających bezpośrednią kwantyfikację. Za pomocą każdej z technik mikroskopowych można uzyskać informacje dotyczące różnych aspektów złożonej struktury biofilmu. Zaleca się zatem podejście łączące różne metody, aby uzyskać bardziej realistyczne wyniki. Zastosowanie najbardziej zaawansowanych metod: CLSM, SEM i AFM na dużą skalę jest ograniczone przez wysokie koszty oraz pracochłonny charakter analizy. Nadal istnieje wyzwanie w badaniu abiotycznych i biotycznych interakcji powierzchniowych biofilmów, co wiąże się z opracowaniem nowych metod. Do tej pory nie został w zadowalający sposób rozwiązany problem fizycznej izolacji pojedynczych komórek i składników macierzy biofilmu. Rozwój technologii obrazowania jest ukierunkowany na metody mikroskopowe, które dają rozdzielczość rzędu dziesiątek nanometrów, poniżej granicy dyfrakcji

światła: mikroskopia super-rozdzielcza, taka jak fotoaktywowana mikroskopia lokalizacyjna - PLAM (*Photoactivated Localization Microscopy*), mikroskopia lokalizacji fotoaktywacji fluorescencyjnej - FPLAM (*Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*) i stochastyczna optyczna mikroskopia rekonstrukcyjna - STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) (Azeredo i in. 2017, Franklin i in. 2015, Wilson i in. 2017, Zhang i in. 2012).

5. Literatura

- Alhede M, Qvortrup K, Liebrechts R et al. (2012) Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65: 335–42.
- Azeredo J, Azevedo N, Briandet R et al. (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*, 43, 3: 313–51.
- Baro A, Reifemberger R (2012) Atomic force microscopy in liquid: biological applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Sullan R et al. (2014). Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nat Protoc*, 9: 1049–55.
- Bleck C, Merz A, Gutierrez M et al. (2010) Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Microsc*, 237: 23–38.
- Bodelón G, Montes-García V, López-Puente V et al. (2016) Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nature Materials*, 15: 1203–11.
- Brzeszcz J, Kapusta P, Turkiewicz A (2013) Zastosowanie metod molekularnych w badaniach bioremediacji substancji ropopochodnych. *Nafta-gaz*, 11: 829–42.
- de Carvalho C, da Fonseca M (2007) Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *BioTechniques*, 42: 616–20.
- Davis S, Ricotti C, Cazzaniga A et al. (2008) Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*, 16:23–9.
- Franklin B, Chang C, Akiyama T et al. (2015) New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol Spectr* 2015 Aug 3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0016-2014.
- Garcez A, Nunez S, Azambuja N et al. (2013) Effects of photodynamic therapy on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg*, 31: 519–25.
- Guilbaud M, Piveteau P, Desvaux M et al. (2015) Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Appl Environ Microbiol*, 81: 1813–19.
- Hannig C, Follo M, Hellwig E et al. (2010) Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J Med Microbiol*, 59: 1–7.
- Hochstim CJ, Choi JY, Lowe D, et al. (2010). Biofilm detection with hematoxylin–eosin staining. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 453–6.
- Hong S, Dhong H, Chung S et al. (2014) Hematoxylin and eosin staining for detecting biofilms: practical and cost-effective methods for predicting worse outcomes after endoscopic sinus surgery. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 7: 193–7.
- Karcz J, Bernas T, Nowak A i in. (2012) Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy. *Scanning*, 34: 26–36.
- Lim J, Cui Y, Oh Y et al. (2011) Studying the effect of alginate overproduction on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by atomic force microscopy. *J Nanosci Nanotechnol*, 11: 5676–81.
- Lower SK (2011) Atomic force microscopy to study intermolecular forces and bonds associated with bacteria. *Advances in experimental medicine and biology*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science+Business Media.
- Neu T, Lawrence J (2014) Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. *Methods Mol Biol*, 1147: 43–64.

- Oates A, Bowling F, Boulton A et al. (2014) The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *J Diabetes Res*, 153586. doi: 10.1155/2014/153586.
- Pan M, Zhu L, Chen L (2016) Detection Techniques for Extracellular Polymeric Substances in Biofilms: A Review. *BioResources*, 11, 3: 8092–115.
- Pantarella F, Valenti P, Natalizi T et al. (2013) Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*, 25: 31–42.
- Potthoff E, Ossola D, Zambelli T et al. (2015) Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy. *Nanoscale*, 7: 4070–9.
- Raszka A, Ziemińska A, Wiechetek A (2009) Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne. Środowisko*, 106, 2: 101–14.
- Richardson N, Mordan N, Figueiredo J et al. (2009) Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *Int Endod J*, 42: 908–21.
- Schlucker S (2014) Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. *Angewandte Chemie. International Edition*, 53: 4756–95.
- Srivastava S, Bhargava A (2016) Biofilms and human health. *Biotechnol Lett*, 38: 1–22.
- Timp W, Matsudaira P (2008) Electron microscopy of hydrated samples. *Meth Cell Biol*, 89: 391–407.
- Toth L, Csomor P, Sziklai I et al. (2011) Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin–eosin and gram staining. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 268: 1455–62.
- Wilson C, Lukowicz R, Merchant S (2017) Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews: J Eng Technol*, 6, 4: 1–25.
- Winther B, Gross B, Hendley J et al. (2009) Location of bacterial biofilm in the mucus overlying the adenoid by light microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 135: 1239–45.
- Zhang M, Liu W, Nie X (2012) Molecular Analysis of Bacterial Communities in Biofilms of a Drinking Water Clearwell. *Microbes Environ*, 27, 4: 443–8.

30. Bakteryjne modułowe syntazy poliketydowe

Bacterial modular polyketide synthases

Zuzanna Sycz ⁽¹⁾, Monika Sępek ⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

⁽²⁾ Klinika Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
Opiekun naukowy: dr hab. Dorota Wojnicz

Zuzanna Sycz: sycz.zuzanna@gmail.com

Słowa kluczowe: poliketydy, modułowe/modularne syntazy poliketydowe, biologia syntetyczna, biosynteza kombinatoryczna, metabolity wtórne promieniowców

Streszczenie

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania naturalnymi źródłami pochodzenia substancji leczniczych: roślinami i mikroorganizmami. Wobec stale rosnącego zapotrzebowania na nowe i skuteczne leki przeciwbakteryjne, prowadzone są badania zmierzające w kierunku ulepszania antybiotyków obecnie stosowanych, poprzez modyfikację ich struktur chemicznych oraz poszukiwanie w naturze nowych związków o odmiennym mechanizmie działania. Ponad 50% dotychczas poznanych antybiotyków to związki poliketydowe, produkowane jako metabolity wtórne przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Poliketydy powstają w wyniku cyklicznie powtarzających się reakcji kondensacji i redukcji, katalizowanych przez duże, wieloenzymatyczne kompleksy – syntazy poliketydowe. Poznawanie syntaz poliketydowych oraz ich produktów ukazuje różnorodność metabolitów wtórnych mikroorganizmów, dostarcza nowych substancji leczniczych i wzbogaca zasób narzędzi umożliwiających tworzenie związków o zaplanowanej strukturze metodami biosyntezy kombinatorycznej. Osiągnięcia w tym zakresie spowodowały nagły wzrost zainteresowania nieodkrytymi dotychczas genami syntaz poliketydowych, które mogłyby zwiększyć zasób fragmentów przydatnych do konstrukcji sztucznych układów syntetyzujących zaprojektowane związki chemiczne. Zmieniając sekwencję DNA genów kodujących syntazy poliketydowe, można wytworzyć poliketydy o przewidywanej strukturze, co umożliwia opracowanie nowych leków. Takie interwencje są ważną częścią powstającej dziedziny – biologii syntetycznej.

1. Wstęp

Poliketydy są to organiczne związki chemiczne, których szkielet węglowy jest polimerem reszt acylowych krótkich kwasów karboksylowych. Wielkość cząsteczki poliketydu jest zróżnicowana, najmniejszym przedstawicielem tej grupy związków jest kwas 6-metylosalicylowy (152 Da), największym - cykliczny polieter maitotoksyny (3422 Da). Poliketydy występują powszechnie w przyrodzie jako produkty metabolizmu wtórnego bakterii, grzybów oraz roślin. Większość związków poliketydowych, które znalazły zastosowanie praktyczne, produkowanych jest przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*, należące do rzędu promieniowców (*Actinomycetales*). Są to tlenowe, Gram-dodatnie bakterie glebowe, zdolne do wytwarzania ogromnej liczby zróżnicowanych metabolitów wtórnych (zwłaszcza poliketydów) i enzymów (syntaz poliketydowych).

Do grupy związków poliketydowych lub ich pochodnych o znaczeniu leczniczym, należą przede wszystkim antybiotyki (erytromycyna, tetracykliny, makrolidy, polieny, ryfampicyna, mupirocyna, tylozyna, oleandomycyna, linkomycyna), a także związki przeciwpasożytnicze (milbemocyna, awermektyny, iwermekтины), przeciwgrzybicze (nystatyna, natamycyna, amfoterycyna B), przeciwnowotworowe (doksorubicyna, daunorubicyna, daunomycyna, geldanamycyna, mitramycyna, mekabcyny, epotilony A i B, disorazol C), immunosupresyjne (takrolimus, rapamycyna), antycholesterolowe (lowastatyna), chemoprewencyjne (resweratrol),

kokcydiostatyczne (monenzyna), a także naturalne regulatory wzrostu i różnicowania komórki, herbicydy i insektycydy (Bayly et al. 2017, Ray et al. 2016, Risdian et al. 2019, Staunton et al. 2001).

2. Opis zagadnienia

Związki poliketydowe powstają w wyniku cyklicznie powtarzających się reakcji kondensacji i redukcji reszt krótkich kwasów karboksylowych, katalizowanych przez duże, wieloenzymatyczne kompleksy – syntazy poliketydowe (PKS, polyketide synthase). Enzymy te kontrolują dobór substratów (jednostek wydłużających), stopień i stereospecyficzność redukcji w każdym cyklu biosyntezy oraz sposób cyklizacji wydłużanego łańcucha. Syntazom poliketydowym towarzyszą enzymy modyfikujące, przeprowadzające dalsze przemiany szkieletu poliketydowego (m.in.: glikozylację, hydroksylację, metylację), co również zwiększa różnorodność powstających produktów.

Biosynteza poliketydów przebiega w sposób analogiczny do biosyntezy kwasów tłuszczowych. Obejmuje ona szereg reakcji kondensacji dekarboksylacyjnej Claisena, podczas których do wydłużanego łańcucha poliketydowego dobudowywane są jednostki dwuwęglowe pochodzące z acetylo-koenzymu A, tj. acetyloestry (acetylowy, propionylowy, malonylowy, metylomalonylowy). Produkty kondensacji uzyskują zróżnicowanie strukturalne w wyniku przejścia przez cały lub częściowy cykl redukcyjny, który obejmuje reakcje ketoredukcji, dehydratacji i redukcji enoilu. W każdym cyklu biosyntezy, po przyłączeniu kolejnej jednostki wydłużającej, grupa β -ketonowa powstającego łańcucha węglowego może ulec redukcji do grupy hydroksylowej, wiązania podwójnego lub pojedynczego. Produkty pośrednie pozostają kowalencyjnie związane z białkami przeprowadzającymi ich obróbkę enzymatyczną. Dzięki powyższemu mechanizmowi, istnieje możliwość tworzenia nieograniczonej liczby poliketydów o różnorodnych strukturach chemicznych (Bayly et al. 2017, Risdian et al. 2019, Staunton et al. 2001).

Syntazy poliketydowe klasyfikowane są do trzech odrębnych grup:

PKS typu I – modułowe (modular) syntazy poliketydowe, obejmują syntazy poliketydów niearomatycznych (m. in. makrolidów, politerów, polienów). Stanowią kompleks (układ) kilku wieloenzymatycznych białek o dużej masie cząsteczkowej: od 130 kDa (syntaza kwasu orselinowego) do 1070 kDa (syntaza rapamycyny). Każde z tych białek posiada liczne domeny enzymatyczne, zgrupowane w tzw. moduły, z których każdy używany jest do przeprowadzenia tylko jednego cyklu wydłużania łańcucha poliketydowego, czyli katalizuje jeden cykl kondensacji i redukcji. Do najlepiej zbadanych PKS I należy syntaza prekursora (aglikonu) erytromycyny A – 6-deokserytronolidu B (DEBS) pochodząca z *Saccharopolyspora erythraea*. Również pierwszym odkrytym klastrem genowym był klasterek odpowiedzialny za biosyntezę erytromycyny. Składa się z on 3 genów (ok. 30 kbp w całkowitej wielkości), które kodują białka enzymatyczne: DEBS1, DEBS2 i DEBS3 i 19 genów niekodujących PKS. PKS typu I służą najczęściej jako modele do projektowania metabolitów na poziomie DNA. Znane są również iteracyjne syntazy typu I.

PKS typu II – iteracyjne (iterative) syntazy poliketydowe, obejmują syntazy wielopierścieniowych poliketydów aromatycznych (np. aktynorodiny, tetracenomycyny). Zbudowane są z kilku zasocjowanych, lecz odrębnych enzymów, wielokrotnie aktywnych w trakcie syntezy jednej cząsteczki i wykorzystywanych wielokrotnie do przeprowadzenia wszystkich wymaganych cykli biosyntezy. Znane są również nieiteracyjne syntazy typu II.

PKS typu III – iteracyjne, obejmują syntazy poliketydowe, które w odróżnieniu od PKS I i II nie posiadają białka przenoszącego reszty acylowe, lecz działają bezpośrednio na substraty połączone z koenzymem A. Typ ten reprezentują przede wszystkim roślinne syntazy chalkonowe (Bayly et al. 2017, Cane et al. 2010, Ray et al. 2016, Risdian et al. 2019).

3. Przegląd literatury

3.1 Biosynteza modułowych syntaz poliketydowych typu I

PKS I to olbrzymie enzymy katalityczne, zawierają wiele miejsc aktywnych na pojedynczym polipeptydzie. W biosyntezie erytromycyny, makrocykl poliketydowy jest wytwarzany przez trzy enzymy: DEBS1, DEBS2 i DEBS3, które działają jako kompleks o masie cząsteczkowej 2 MDa.

Każde białko zawiera wiele domen, z których każda posiada aktywność katalityczną w celu rozszerzenia i zmiany struktury poliketydu, gdy ten przechodzi wzdłuż białka. Domeny są pogrupowane w regiony funkcjonalne, tj. moduły rozszerzeń. Jeden moduł to grupa domen enzymatycznych potrzebnych do przeprowadzenia jednego, pełnego cyklu kondensacji i redukcji reszty acylowej włączanej do poliketydu. Każdy moduł określa strukturę chemiczną dodawaną do rosnącego poliketidu na każdym etapie biosyntezy. Liczba modułów danej PKS I odpowiada liczbie cykli kondensacji i redukcji przez nią przeprowadzanych, a zatem warunkuje długość łańcucha węglowego produktu. W skład jednego białka wchodzi zazwyczaj 2–3 moduły, jednak może być ich więcej (np. w syntazie awermektyny–4, a w jednym z białek syntazy rapamycyny–6). Pierwsze trójwymiarowe struktury syntazy poliketydowej w różnych stanach funkcjonalnych uzyskano za pomocą kriomikroskopii elektronowej (Cane et al. 2010, Smith et al. 2015, Staunton et al. 2001, Weissman et al. 2005).

Na N-końcu białka zawierającego pierwszy moduł, zlokalizowane są domeny konieczne do wydłużania łańcucha poliketydowego, są to: syntaza 3-oksoacylowa (syntaza 3-oksoacyl:ACP), nazywana syntazą β -ketoacylową lub ketosyntazą (**KS**), transferaza acetylo-CoA/malonylo-CoA:ACP nazywana acylotransferazą (**AT**) oraz białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe, zwany acylowym białkiem nośnikowym (**ACP**). Domeny AT i ACP, wprowadzające starterową resztę acylową do kondensacji z resztami wydłużającymi, nazywane są domeną ładującą (**LD**, *loading domain*). Na początku każdego cyklu wydłużany łańcuch jest połączony wiązaniem tioestrowym z cysteiną w miejscu aktywnym KS, a jednostka wydłużająca z fosfopantoteinowym ramieniem ACP. Rodzaj reszty acylowej (jednostki wydłużającej) włączanej w danym cyklu (a co za tym idzie obecność bocznych grup metylowych, etylowych i innych w odpowiednim miejscu łańcucha) zależy od specyficzności domeny AT. Specyficzność substratu dla AT jest różna pomiędzy poszczególnymi szlakami poliketydowymi, a zatem AT przyczyniają się do różnorodności strukturalnej w grupie poliketydów. Te cechy sprawiają, że AT są jednym z najbardziej obiecujących narzędzi do manipulowania syntezą poliketydów. Np. w syntazie DEBS, moduł ładujący składający się z AT, wybiera propionian z propionilo-CoA i przenosi grupę propionylową do ACP. Propionyl jest następnie przenoszony do domeny ketosyntazy (KS). Następnie łańcuch poliketydowy wydłuża się przez kondensację z metylomalonianem (pochodzącym z metylomalonylo-CoA), załadowanym wstępnie w domenie ACP modułu rozszerzającego. Następnie domena KS przeprowadza reakcję kondensacji dekarboksylacyjnej. Produkt tej reakcji pozostaje związany z ACP i w zależności od budowy danego modułu syntazy ulega redukcji lub też, zachowując niezredukowaną grupę β -ketonową, zostaje przeniesiony na miejsce aktywne domeny KS kolejnego modułu i wchodzi do kolejnego cyklu biosyntezy (Bayly et al. 2017, Cane et al. 2010, Musiol-Kroll et al. 2018, Ray et al. 2016, Staunton et al. 2001, Weissman et al. 2005).

Oprócz odpowiedzialnych za kondensację domen podstawowych (KS, AT, ACP), w zależności od stopnia redukcji reszty acylowej w danym cyklu, moduł może zawierać do 3 domen modyfikujących (redukcyjnych): ketoreduktazę (**KR**), dehydratazę (**DH**) i reduktazę enoilową, zwaną enoiloreduktazą (**ER**). Częsteczką syntetyzowaną przez moduł zawierający jedynie domeny KS, AT i ACP, posiada grupę ketonową. Przykładem takiego układu jest moduł 3 syntazy DEBS, który pozostawia grupę ketonową przy C9 powstającego poliketidu. Jeżeli moduł zawiera domenę KR, to grupa ketonowa zostaje zredukowana do grupy hydroksylowej (-OH). Tak działają moduły 1, 2, 5, 6 syntazy DEBS wprowadzające grupy hydroksylowe odpowiednio w pozycjach 13, 11, 5 i 3 łańcucha poliketydowego, przy czym grupa -OH przy C13 jest zaangażowana w tworzenie wiązania laktonowego. Obecność domen KR i DH prowadzi do utworzenia wiązania podwójnego między atomami węgla (np. zmodyfikowany moduł 4 syntazy DEBS). Jeżeli moduł zawiera domeny KR, DH i ER, łańcuch węglowy w odpowiedniej pozycji jest całkowicie zredukowany (np. moduł 4 syntazy DEBS). Domeny ER mogą odpowiednio zmniejszyć każdą grupę karbonylową. Ponieważ PKS erytromycyny ma jeden 1 moduł ładujący i 6 modułów rozszerzających, produktem jest łańcuch heptaketydowy. Na C-końcu ostatniego modułu syntazy występuje zazwyczaj domena tiosteerazowa (**TE**), odpowiedzialna za hydrolizę wiązania łańcucha poliketydu z syntazą i uwolnienie poliketidu z enzymu, a także (w przypadku antybiotyków makrolidowych) za laktonizację produktu. Etap uwalniania produktu może nastąpić przez atak egzogenne nukleofilu powodującego hydrolizę lub

transestryfikację albo poprzez wewnątrzcząsteczkowy O-, N- lub C-nukleofil, powodujący makrolaktonizację, makrolaktamizację lub kondensację Claisena (Bayly et al. 2017, Horsman et al. 2016, Ray et al. 2016, Staunton et al. 2001, Weissman et al. 2005).

3.2 Modyfikacje postpoliketydowe

Nowo powstały łańcuch poliketydowy najczęściej nie jest ostatecznym produktem i podlega modyfikacjom (m. in. cyklizacji, aromatyzacji, glikozylacji, hydroksylacji, metylacji, utlenieniu), co również zwiększa różnorodność związków poliketydowych. Enzymy bezpośrednio uczestniczące w modyfikacjach (post-PKS) to hydroksylazy, glikozylotransferazy, O-metylotransferazy i ketoreduktazy. Geny kodujące enzymy modyfikacji postpoliketydowych znajdują się w obrębie zespołu genów syntazy. Zmiany strukturalne, które wprowadzają enzymy post-PKS, są niezbędne dla aktywności biologicznej.

Cząsteczki cukrów przyłączone do szkieletu poliketydowego warunkują lub wzmacniają aktywność biologiczną wielu związków. Enzymy syntetyzujące pochodne cukrowe przyłączane do poliketydu również pośrednio uczestniczą w modyfikacjach post - poliketydowych. Geny tych enzymów są zlokalizowane razem z pozostałymi genami kodującymi enzymy modyfikujące. Pochodne cukrowe włączane do poliketydów zwykle pochodzą od TDP-glukozy. W wielu systemach syntezy obecna jest TDP-glukozo-4,6-dehydrataza, przekształcająca TDP-glukozę w TDP-4-keto-6-deoksylglukozę (Pawlik i Kotowska 2005, Staunton et al. 2001).

3.3 Modyfikacje genetyczne syntaz poliketydowych typu I

Budowa związków poliketydowych zależy od ułożenia genów i domen enzymatycznych w syntazie, co daje możliwość zaprogramowania struktury nowego związku. Znaczna homologia sekwencji genów pozwala na przewidywanie funkcji nowo poznanych syntaz i łączenie fragmentów genów różnych syntaz. Możliwe jest stosowanie w manipulacjach genetycznych genów lub ich fragmentów, które tylko na podstawie sekwencji sklasyfikowane zostały jako geny kodujące syntazy poliketydowe. Poniżej opisane zostaną 4 rodzaje modyfikacji genetycznych PKS I.

Modyfikacje syntaz istniejących

Modyfikacje te polegają na ukierunkowanej mutagenizie, tj. wprowadzeniu mutacji punktowych do genów kodujących pojedyncze domeny redukcyjne. Takie modyfikacje prowadzą do zmian w uzyskiwanym produkcie, np. otrzymywany jest krótszy łańcuch poliketydowy lub zmienia się stopień redukcji wybranych atomów węgla. Np. mutanty zawierające nieaktywną domenę redukcyjną DEBS wytwarzają niezredukowane pochodne erytromycyny i tak: po unieczynnieniu domeny enoiloreduktazowej (ER) modułu 4 syntazy DEBS powstaje anhydro-erytromycyna, natomiast po unieczynnieniu domeny ketoreduktazowej (KR) modułu 5 DEBS powstaje 5-oksy-erytromycyna.

Modyfikacje w obrębie istniejącej syntazy polegają również na klonowaniu pojedynczych genów kodujących wybrane moduły (tj. „skręcaniu” naturalnego zespołu genów), następnie różnemu łączeniu ich ze sobą (także z przemieszczeniem fragmentu jednego z genów) i ostatecznie ekspresji nowego, hybrydowego białka, a właściwie zmodyfikowanego kompleksu białek, które wykazują odmienną kinetykę enzymatyczną i wytwarzają nowe związki poliketydowe.

Dzięki występowaniu stosunkowo długich regionów okalających domeny redukcyjne, jest możliwa również wymiana tych domen w obrębie genów syntaz. Regiony te mają znaczenie jako obszary wyznaczające zakres wymienianego DNA i oddzielające miejsca o określonej aktywności katalitycznej. Zaobserwowano, że mutacje unieczynniające domeny KS modułów od N-końca białka DEBS1, nie wykazują wpływu na funkcję modułów położonych bliżej C-końca. Kolejnym sposobem ingerencji w strukturę poliketydu jest wprowadzanie zmodyfikowanych prekursorów z ominięciem wcześniejszych etapów biosyntezy (Cane et al. 2010, Pawlik i Kotowska 2005, Staunton et al. 2001, Sun et al. 2015, Weissman et al. 2005, Zheng et al. 2015).

Tworzenie syntaz hybrydowych

Modyfikacje te polegają na tworzeniu nowych, hybrydowych syntaz poliketydowych, składających się z fragmentów syntaz już istniejących. W biosyntezie kombinatorycznej tworzy się

kilka niezależnych wersji genów kodujących poszczególne białka syntazy. Następnie poddaje się ekspresji różne kombinacje przygotowanych wcześniej genów mozaikowych. W efekcie uzyskuje się bibliotekę kombinatoryczną nowych związków poliketydowych. Przykładem jest mozaika genów utworzona poprzez sklonowanie składającego się z dwóch domen (AT i ACP) modułu starterowego syntazy awermektyny, w miejscu odpowiedniego fragmentu syntazy DEBS pozbawionej własnego startera. Powstały w ten sposób zespół enzymatyczny jest zdolny do wykorzystywania szerszego niż DEBS zakresu alternatywnych cząsteczek starterowych, ponieważ syntaza awermektyny może włączać ponad 40 alternatywnych substratów (kwasów karboksylowych o rozgałęzionym łańcuchu węglowym). Po wymianie domen AT dwóch pierwszych modułów syntazy DEBS, warunkujących włączanie propionianu, na domeny AT pochodzące z innych syntaz i włączające octan, powstały 3 typy rekombinantów, nie zawierające grupy metylowej w odpowiedniej pozycji pierścienia makrolidowego i wytwarzające nowe pochodne erytromycyny.

Modułowa natura PKS I zapewnia możliwość zastąpienia nie tylko pojedynczych domen, a nawet całych modułów w celu wytworzenia zmienionego PKS, który wprowadzi różne jednostki poliketydowe lub zmieni stereochemię lub funkcjonalność makrocyklu. W rezultacie kombinacji domeny acylotransferazowej z modułu 2 syntazy rapamycyny (rapAT2), fragmentu bezpośrednio łączącego domeny AT i ACP (AT/ACP), układu domen DH/KR z modułu 4 (rapDH/KR4) i układu domen modyfikujących DH/ER/KR z modułu 1 z poszczególnymi domenami acylotransferazy oraz ketoreduktazy w modułach 2, 5 i 6 syntazy DEBS, uzyskano 33 różne pochodne 6-deokserytronolidu B. Innym przykładem jest domena ładowania (AT-ACP) DEBS1, która została zastąpiona przez moduł ładujący z PKS awermektyny. Ten alternatywny moduł ładujący akceptuje szerszy zakres jednostek wyjściowych, takich jak izobutyrylan i 2-metylomaślan, oprócz jednostek octanu i propionylu akceptowanych przez moduł ładujący DEBS1. W kolejnym przykładzie moduł 2 z klastra genu PKS rapamycyny wprowadzono do *eryAI* (genu kodującego DEBS1). Powstała nie naturalna syntaza wytworzyła kilka nowych związków, w tym poliketidy z większym makrolaktonem, pochodzącym od oktaketydu. Powyższe doświadczenia wykazały ogromny potencjał funkcjonalny syntazy DEBS, zdolnej do „obróbki” alternatywnych substratów i wytwarzania tym samym wielu antybiotyków poliketydowych (Bayly et al. 2017, Cane et al. 2010, Klaus et al. 2018, Pawlik i Kotowska 2005, Staunton et al. 2001, Sun et al. 2015, Weissman et al. 2005, Zheng et al. 2015).

Modyfikacje reakcji postpoliketydowych

Rozszerzeniem możliwości tworzenia nowych związków poliketydowych jest modyfikacja ich syntezy na etapie reakcji postpoliketydowych. Najczęściej modyfikuje się reakcje O-metylacji grup hydroksylowych lub przyłączanie reszt cukrowych poprzez wprowadzenie do danego szczepu bakterii genu *des* warunkującego syntezę reszty cukrowej (D – dezozaminy). Specyficzna delecja pojedynczego genu post-PKS w genie monenzyny, prowadzi do akumulacji trienu, którego struktura różni się wyraźnie od końcowego produktu monenzyny A (Pawlik i Kotowska 2005).

Strategie poszukiwania nowych genów syntaz poliketydowych

Modyfikacje te polegają na całkowicie sztucznym syntetyzowaniu sekwencji DNA kodującej nowe zespoły genów syntaz poliketydowych. Sekwencje takie są projektowane na bazie znajomości cech warunkujących powstawanie oczekiwanego związku chemicznego. Badania nad uzyskaniem w sposób naturalny poliketydów o nienaturalnej strukturze dotyczą przede wszystkim syntazy DEBS z *Saccharopolyspora erythraea*, pierwszego dobrze poznanego zespołu genów i białek PKS I. Sekwencjonowanie genomów bakteryjnych dostarcza informacji o nowych genach syntaz poliketydowych, których produkty pozostają nieznanne. Analogicznie, poznanie sekwencji nukleotydowej zespołów genów syntaz oleandomycyny, tylozyny, awermektyny, takrolimusa i rapamycyny, pozwoliło na zastosowanie tych genów w konstrukcji nowych syntaz hybrydowych. Praktykowane jest także tworzenie tzw. biblioteki metagenomowej, zawierającej eDNA (*environmental* DNA) izolowane bezpośrednio z próbek środowiskowych (gleby, wody, osadów dennych etc.) i poszukiwanie w niej genów nowych syntaz poliketydowych mikroorganizmów trudnych do hodowli.

Istnieje kilka możliwych podejść do poszukiwania nowych związków poliketydowych o działaniu leczniczym. Pierwsze z nich, to projektowanie inhibitorów konkretnych enzymów lub receptorów bakteryjnych. Drugie, to wysokowydajne badania przesiewowe, czyli testowanie pod względem aktywności biologicznej bibliotek związków (np. produktów biosyntezy kombinatorycznej, ekstraktów z hodowli mikroorganizmów), identyfikacja klonów z biblioteki DNA zawierających sekwencję genów biosyntezy poliketydów lub testowanie zaprojektowanych związków o zdefiniowanej strukturze. Trzeci kierunek to poszukiwanie nowych zespołów genów biosyntezy związków poliketydowych aktywnych biologicznie (Cane et al. 2010, Pawlik i Kotowska 2005, Ray et al. 2016, Staunton et al. 2001, Weissman et al. 2005).

W poszukiwaniu genów syntaz poliketydowych pierwszy etap stanowi skonstruowanie tzw. biblioteki genomowego DNA badanego mikroorganizmu w wektorach kosmidowych lub typu BAC (*bacterial artificial chromosome* – sztuczny chromosom bakteryjny), które umożliwiają klonowanie fragmentów DNA do 300 kpz. Liczba klonów w bibliotece powinna reprezentować cały genom. Drugim etapem jest identyfikacja klonów zawierających interesujące geny biosyntezy metabolitów wtórnych i subklonowanie krótszych fragmentów (ok. 1 kpz) nadających się do sekwencjonowania, najczęściej przy użyciu amplifikacji DNA (reakcja PCR) lub hybrydyzacji DNA (metoda Southern Blot), które pozwalają na wykrycie obecności poszukiwanych genów niezależnie od tego czy w danych warunkach ulegają one ekspresji. Geny biosyntezy metabolitów wtórnych występują jako zespoły (zgrupowania) obejmujące 20-200 kpz, zlokalizowane na tym samym obszarze chromosomu, a także na dużych, liniowych plazmidach, często spotykanych u promieniowców. Dzięki temu wystarczy identyfikacja jednego genu, a analiza sąsiadujących z nim odcinków DNA pozwala znaleźć pozostałe geny. Dostęp do dużej liczby sekwencji zwiększa skuteczność strategii poszukiwania nowych genów biosyntezy antybiotyków takich jak „odwrotna genetyka” (*reverse genetics*) czy „skanowanie” genomu, ze względu na możliwość lepszego zaprojektowania starterów do reakcji PCR i sond do hybrydyzacji. Aktualnie prowadzone badania zmierzają w kierunku projektowania nowych syntaz na poziomie sekwencji DNA, czyli przeprowadzenia *in vitro* syntezy fragmentów DNA kodujących poszczególne podjednostki projektowanej syntazy (Bayly et al. 2017, Cane et al. 2010, Pawlik i Kotowska 2005, Staunton et al. 2001, Sun et al. 2015, Weissman et al. 2005, Zheng et al. 2015).

4. Podsumowanie

Istnieje bogaty potencjał biosyntetyczny bakterii z rodzaju *Streptomyces* oraz innych promieniowców, wytwarzających wiele cennych syntaz i związków poliketydowych, które wciąż „czekają na odkrycie”. Poznanie sekwencji genomów tych mikroorganizmów nie tylko dostarcza informacji na temat nowych genów biosyntezy metabolitów wtórnych, ale także daje wgląd w mechanizmy regulacji metabolizmu, pozwala modyfikować już istniejące szczepy i konstruować nowe szczepy zdolne do wydajnej ekspresji zespołów genów pochodzących z innych organizmów.

Poza dostarczaniem nowych metabolitów: potencjalnych leków lub substratów do modyfikacji chemicznych, geny kodujące syntazy poliketydowe są wykorzystywane do tworzenia nowych związków o zaplanowanych strukturach metodami biosyntezy kombinatorycznej. Rozwój metod biologii molekularnej pozwala na kontrolowane modyfikacje syntaz poliketydowych i wprowadzanie zamierzonych zmian do struktury produktu. Przez sukcesywną inaktywację lub dodawanie poszczególnych domen, wymianę na domeny o innej specyficzności, łączenie domen i całych modułów pochodzących z różnych syntaz czy wreszcie dobór różnych enzymów modyfikujących, tworzone są tzw. biblioteki kombinatoryczne związków nie występujących w naturze, które są następnie testowane pod względem aktywności biologicznej (Klaus et al. 2018, Sun et al. 2015, Weissman et al. 2005).

5. Literatura

Bayly CL, Yadav VG (2017) Towards Precision Engineering of Canonical Polyketide Synthase Domains: Recent Advances and Future Prospects. *Molecules*, 22: 235; doi:10.3390/molecules22020235

- Cane DE (2010) Programming of Erythromycin Biosynthesis by a Modular Polyketide Synthase. *J Biol Chem*, 285(36): 27517–23
- Horsman ME, Hari TP, Boddy CN (2016) Polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase thioesterase selectivity: logic gate or a victim of fate? *Nat Prod Rep*, 33: 183–202
- Klaus M, Grininger M (2018) Engineering strategies for rational polyketide synthase design. *Nat Prod Rep*, 35: 1070–81
- Kotowska M (2005) Zastosowanie metod biologii molekularnej do poszukiwania genów biosyntezy antybiotyków poliketydowych i peptydowych produkowanych przez promieniowce. *Postępy Biochem*, 51 (3): 345–52
- Musiol-Kroll EM, Wohlleben W (2018) Acyltransferases as Tools for Polyketide Synthase Engineering. *Antibiotics*, 7, 62; doi:10.3390/antibiotics7030062
- Pawlik K, Kotowska M (2005) Od sekwencji DNA do antybiotyku. *Biotechnologia*, 70: 57–74
- Ray L, Moore BS (2016) Recent advances in the biosynthesis of unusual polyketide synthase substrates. *Nat Prod Rep*, 33(2): 150–61
- Risdian C, Mozef T, Wink J (2019) Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 7(5). pii: E124. doi: 10.3390/microorganisms7050124
- Smith JL, Skiniotis G, Sherman DH (2015) Architecture of the polyketide synthase module: surprises from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 31: 9–19
- Staunton J, Weissman KJ (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, 4: 380–416
- Sun H, Liu Z, Zhao H, Ang EL (2015) Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des Devel Ther*, 9: 823–33
- Weissman KJ, Leadlay PF (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol*, 3: 925–36
- Zheng K, Xie C, Hong R (2015) Bioinspired iterative synthesis of polyketides. *Front. Chem*, 3: 32. doi: 10.3389/fchem.2015.00032

31. Rola limfocytów $T\gamma\delta$ w alergiach skórnych i pokarmowych

The role of $T\gamma\delta$ cells in skin and food allergies

Oskar Wiśniewski

Katedra Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Wiesław Kozak

Wiśniewski Oskar: owisniew@doktorant.umk.pl

Słowa kluczowe: cytokiny, zapalenie, niekonwencjonalne limfocyty, błona śluzowa, MHC

Keywords: cytokines, inflammation, unconventional lymphocytes, mucosa, MHC

Streszczenie

Limfocyty $T\gamma\delta$ są określane mianem „niekonwencjonalnych”. Większość limfocytów T to komórki $T\alpha\beta$, u których receptor TCR składa się z dwóch łańcuchów glikoproteinowych: alfa oraz beta. Komórki $T\gamma\delta$ posiadają w swej strukturze TCR, który składa się z łańcucha gamma oraz łańcucha delta. U zdrowego człowieka stanowią one niewielki procent wszystkich komórek T, ich liczebność rośnie natomiast w przypadku różnorodnych infekcji. Wyróżniają się na tle innych populacji komórek T; w większości nie posiadają one na swojej powierzchni cząsteczek CD4 oraz CD8. Ponadto prezentują one potencjał cytotoksyczny, jak również immunomodulacyjny. Obecnie uważa się, że komórki te są ogniwem pośrednim, łączącym cechy przynależne odporności wrodzonej oraz odporności nabytej. Antygeny aktywujące komórki $T\gamma\delta$ są w dużej mierze nieznane, jednakże wydaje się, że ich aktywacja zachodzi w sposób niezależny od głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC). Ponadto uważa się, że limfocyty te odgrywają znaczącą rolę w rozpoznawaniu antygenów lipidowych. W ostatnich latach notuje się zwiększone zainteresowanie limfocytami $T\gamma\delta$ w kontekście ich udziału w procesach nowotworzenia, alergiach, a także ich potencjalnej roli w immunoterapii. Niniejszy artykuł przeglądowy ukazuje rolę tych komórek w alergiach pokarmowych oraz skórnych, prezentując najnowsze doniesienia dotyczące udziału limfocytów $T\gamma\delta$ w indukcji i rozwoju reakcji alergicznych.

Summary

$T\gamma\delta$ lymphocytes are referred to as "unconventional" lymphocytes. Most T cells are $T\alpha\beta$ cells in which TCR receptor consists of two glycoprotein chains: alpha and beta. $T\gamma\delta$ cells have TCR in their structure, which consists of the gamma chain and the delta chain. In a healthy person, they constitute a small percentage of all T cells. They differ from other T cell populations; in most cases they do not have CD4 and CD8 molecules on their surface. In addition, they present cytotoxic as well as immunomodulatory potential. It is now believed that these cells are an intermediate link connecting traits of innate immunity and acquired immunity. Antigens activating $T\gamma\delta$ cells are unknown, however, it appears that it occurs in a manner independent of the major histocompatibility complex (MHC). In addition, these lymphocytes are thought to play a significant role in the recognition of lipid antigens. In recent years, there has been increased interest in $T\gamma\delta$ lymphocytes in the context of their participation in carcinogenesis, allergies, and potential role in immunotherapy. This review article shows the role of these cells in allergies, presenting the latest reports on the participation of $T\gamma\delta$ lymphocytes in the induction and development of allergic reactions.

1. Ogólna charakterystyka limfocytów $T\gamma\delta$

Niekonwencjonalne limfocyty $T\gamma\delta$ to relatywnie słabo poznana grupa komórek T. Zostały one odkryte w 1985 roku i od tego czasu stanowią obiekt niesłabnącego zainteresowania ze strony naukowców. Charakteryzują się one obecnością receptora $TCR\gamma\delta$, oraz (zazwyczaj) brakiem ekspresji cząsteczek CD4 i CD8 na powierzchni. W obrębie limfocytów $T\gamma\delta$ wyróżnia się dwie

główne populacje komórek, różniące się segmentem V łańcucha δ - V δ 1 oraz V δ 2. Komórki V δ 1, stanowiące około 10% wszystkich komórek T $\gamma\delta$, występują głównie w grasicy oraz w GALT. W tych ostatnich stanowią one pierwszą linię tzw. nadzoru immunologicznego (ang. *immunosurveillance*), wiążąc głównie ligandy związane ze stresem komórkowym (MICA, MICB) (Born i in. 2013). Populacja komórek V δ 2, przeważająca w krwi obwodowej, stanowi zaś ok. 50-95% wszystkich limfocytów T $\gamma\delta$. Do ligandów rozpoznawanych przez tę populację należą głównie niebiałkowe fosfoantygeny, takie jak np. produkty przejściowe powstające w procesie biosyntezy izoprenoidów (Constant i in. 1994). Zarówno komórki V δ 1, jak i V δ 2, wiążą antygen oraz ulegają aktywacji na drodze niezależnej od cząsteczek MHC. Komórki subpopulacji V γ 9V δ 2, stanowiącej u człowieka większość limfocytów V δ 2 w krwioobiegu, są zdolne do pośredniej aktywacji limfocytów T CD4+ oraz CD8+, mogą również pełnić rolę komórek prezentujących antygen względem limfocytów CD8+. W tym ostatnim przypadku procesowanie antygeny do formy ulegającej zaprezentowaniu trwa znacznie dłużej, niż ma to miejsce w monocytach oraz makrofagach. Aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ produkują szereg cytokin, z których najistotniejsze wydają się być TNF- α oraz IL-17 (Lawand i in. 2017).

Obie opisywane populacje wykazują potencjał cytotoksyczny. W pierwszej fazie indukowany jest on ekspresją receptorów powierzchniowych, w późniejszych fazach jest natomiast regulowany poprzez rozpuszczalne mediatory, takie jak perforyny i granzymy. Do tej pory zidentyfikowano kilka mechanizmów cytotoksyczności limfocytów T $\gamma\delta$: (a) poprzez bezpośrednie działanie granulizyny, uszkadzającej błony komórkowe i doprowadzającej w konsekwencji do komórkowego szoku osmotycznego, (b) poprzez ekspresję ligandów, takich jak np. CD95L, które wiążą się z receptorami śmierci (ang. *death receptors*) na powierzchni komórek docelowych, (c) na drodze zależnej od przeciwciał, związanej z ekspresją CD16 (Lawand i in. 2017).

Warto nadmienić, iż limfocyty T $\gamma\delta$ u zdrowego człowieka stanowią zaledwie ok. 1-5% wszystkich komórek T, natomiast w czasie infekcji udział ten może zwiększyć się do nawet do kilkudziesięciu procent. Podejrzewa się w związku z tym, że komórki te mogą pełnić ważną rolę w tworzeniu tzw. pierwszej linii obrony immunologicznej.

2. Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w alergiach skórnych

Spoczynkowe limfocyty T $\gamma\delta$ znajdujące się w naskórku, z powodu swojego podobieństwa morfologicznego do komórek dendrytycznych, nazywane są dendrytycznymi epidermalnymi limfocytami T (ang. *dendritic epidermal T cells*, DETC). Termin ten zarezerwowany jest wyłącznie dla limfocytów mysich, których receptory złożone są z łańcuchów V γ 3/V δ 1. Podejrzewa się, że funkcjonalnym odpowiednikiem tych komórek u człowieka są limfocyty T V γ 9/V δ 2 (Moser i Eberl 2007). Aktywacja DETC zachodzi pod wpływem bliżej nieokreślonych czynników stresowych, uszkodzenia tkanki, a także na skutek lokalnej infekcji keratynocytów (np. przez cytomegalowirus), prowadzącej do zwiększonej ekspresji IL-7 przez te komórki. Warto jednak zaznaczyć, że do aktywacji tych komórek są niezbędne dodatkowe sygnały o charakterze kostymulatorowym (MacLeod i Havran 2011). Obejmują one interakcję pomiędzy pleksyną B obecną na keratynocytach, a cząsteczką CD100 limfocytów oraz ligację receptora coxsackie-adenowirusowego (CAR) z białkiem JAML. W aktywowanych DETC następuje przebudowa cytoszkieletu powodująca zmianę ich kształtu oraz produkcja czynników wzrostu, takich jak IGF-1 czy KGF. Dochodzi również do sekrecji chemokin (CCL3, CCL4, CCL5, XCL1) oraz cytokin, głównie IL-2, IL-3, IL-17, GM-CSF, IFN- γ oraz TNF- α . Wykazano, że DETC oddziałują na proces rekrutacji limfocytów o różnym fenotypie: Th1, Th2 oraz Th17 (Fay i in. 2016).

W celu poznania mechanizmów alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (ang. *atopic contact dermatitis*, ACD) wykorzystuje się myszy z rozwiniętą reakcją nadwrażliwości kontaktowej (CHS). Badania wykazały kluczową rolę IL-17 (produkowanej m.in. przez limfocyty T $\gamma\delta$) w rozwoju CHS. Wykorzystując 2,4-dinitrofluorobenzen jako alergen wykazano, że po podaniu tego związku następuje gwałtowny wzrost liczebności limfocytów T $\gamma\delta$ produkujących IL-17 (Nielsen i in. 2014). Ponadto zaobserwowano, że zmiany skórne ucha, powstałe w wyniku traktowania alergenem, były zredukowane o około połowę u myszy *wild type* względem mutantów IL-17 $-/-$. W tym samym badaniu wykazano również decydujący wpływ IL-1 β na produkcję IL-17 przez limfocyty T $\gamma\delta$

(Nielsen i in. 2014). Nielsen i wsp. opisali również rolę receptora NKG2D w aktywacji mysich DETC. Receptor ten związany jest z komórkami NK (*natural killer*), ponadto jednak zaobserwowano jego ekspresję na powierzchni DETC oraz ludzkich limfocytów CLA+. Odkryto, że indukowane stresem ligandy dla tego receptora są produkowane w dużej ilości przez keratynocyty podczas ekspozycji na alergen w warunkach *in vitro*. Blokowanie receptora przeciwciałami anti-NKG2D prowadziło do częściowego zahamowania aktywacji DETC (Nielsen i in. 2015). Jiang i wsp., również na modelu mysim, określili rolę limfocytów rezydujących w skórze właściwej. Odkryli, że, w przeciwieństwie do DETC, komórki te nie są jednorodne pod względem budowy receptora komórek T. Podobnie do limfocytów epidermalnych, komórki T rezydujące w skórze właściwej są zdolne do produkcji IL-17 i za pośrednictwem tej cytokiny promują infiltrację neutrofilów do miejsca kontaktu z alergenem (Jiang i in. 2017).

Jako że odpowiedź limfocytów $\gamma\delta$ może być modulowana poprzez ligandy receptorów z rodziny TLR – TLR1/2/6, TLR3, TLR6 (modulacja w sposób bezpośredni, w połączeniu z receptorem TCR) oraz TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 (modulacja za pośrednictwem aktywowanych ligandami komórek dendrytycznych) (Wesch i in. 2011), warto przytoczyć badania nad rolą tych receptorów w alergiach na metale ciężkie. Badania Schmidt i wsp. wykazały, że jony Ni^{2+} wywołują gwałtowną odpowiedź zapalną poprzez bezpośrednią aktywację ludzkiego TLR4 (Schmidt i in. 2010). Odkryto również, że jony te są zdolne do aktywacji inflamasonu NLRP3, co prowadzi do sekrecji IL-1 β przez komórki prezentujące antygen (Li i Zhong 2014). Udowodniono, że taka aktywacja w przypadku neutrofili rezydujących w płucach prowadzi do zwiększonej produkcji IL-17A przez limfocyty T V γ 6V δ 1 (Hassane i in. 2017). Doświadczenia przeprowadzone na myszach wykazały, że zwierzęta z mutacją typu *knock-out* w genie kodującym TLR3 cechowały się łżejszymi objawami CHS po traktowaniu 2,4,6-trinitrofluorobenzenem, niż myszy *wild type*. Odwrotna sytuacja wystąpiła w przypadku zwierząt wykazujących nadekspresję tego genu – objawy były silniejsze w porównaniu do grupy kontrolnej (Yasuike i in. 2017).

Niewiele jest, niestety, badań przeprowadzanych wśród ludzi. Dla porządku warto jedynie wspomnieć o pracy Dyring-Andersen i wsp., którzy przebadali niewielką grupę (n=14) osób cierpiących na alergię na nikiel. Analiza próbek skóry i krwi obwodowej wykazała permanentnie podniesiony poziom komórek $\gamma\delta$ we krwi alergików, wzrostu tego nie zanotowano jednak w próbkach skóry (Dyring-Andersen i in. 2013).

3. Rola limfocytów $\gamma\delta$ w alergiach pokarmowych

Śródnabłonkowe limfocyty $\gamma\delta$ (ang. *intraepithelial lymphocytes*, IEL) stanowią ok. 50% wszystkich limfocytów w jelicie cienkim. W przeciwieństwie do limfocytów związanych z warstwą skóry, IEL $\gamma\delta$ są zdolne do migracji poprzez nabłonek jelita oraz błazkę właściwą, na drodze zależnej od okludyny. Główną funkcją IEL $\gamma\delta$ jest utrzymywanie homeostazy tkanki nabłonkowej. Aktywowane komórki wytwarzają czynnik wzrostu keratynocytów (KGF-1), który indukuje proliferację komórek nabłonkowych, a także programy naprawcze tkanki. Jak wszystkie rodzaje komórek $\gamma\delta$, również IEL podlegają regulacji za pośrednictwem cytokin (Ishikawa i in. 2007). Na szczególną uwagę zasługuje tu białko TL1A (*TNF-like protein 1A*); przypuszcza się, że cytokina ta pełni kluczową rolę w regulacji procesu wnikania IEL do tkanki nabłonkowej. Limfocyty $\gamma\delta$ znajdujące się w jelicie są ponadto źródłem IL-10 oraz TGF- β – dwóch mediatorów, mających duże znaczenie w rozwoju alergii pokarmowych (Ishikawa i in. 2007).

Podobnie, jak w przypadku badań nad rolą limfocytów $\gamma\delta$ w reakcjach na alergen kontaktowy, prace opisujące rolę IEL $\gamma\delta$ oparte są w dużej mierze o modele mysie. Związane jest to m.in. z tym, że u myszy IEL $\gamma\delta$ stanowią przeważającą większość wszystkich IEL. Bol-Schoenmakers i wsp. przeprowadzili badanie, w czasie którego u gryzoni wywoływana była alergia na orzeszki ziemne (podawano ekstrakt z orzeszków skoniugowany z toksyną cholery). Zaindukowanie alergii prowadziło do zmniejszenia procentowego udziału limfocytów $\gamma\delta$ w tkankach jelita oraz w kępkach Peyera, przy jednoczesnym zwiększeniu liczebności tych komórek w węzłach chłonnych krezkowych. Oba te zjawiska występowały w 1-2 dniu od indukcji alergii, natomiast w dniu 7 obserwowano powrót do wartości wyjściowych (Bol-Schoenmakers i in. 2011). W badaniu tym blokowano również *in vivo* receptory TCR $\gamma\delta$ – skutkowało to wzmoczoną odpowiedzią alergiczną,

cechującą się zwiększoną sekrecją przeciwciał klasy IgE oraz cytokin charakterystycznych dla fenotypu Th2 w splenocytach. Wyniki uzyskane w toku tego doświadczenia są zgodne ze wcześniejszymi doniesieniami, mówiącymi o roli tych komórek w indukcji tolerancji pokarmowej względem owalbuminy (Bol-Schoenmakers i in. 2011). Podobne doświadczenie przeprowadzili Cardoso i wsp., wykazując, że podanie ekstraktu z orzeszków ziemnych uprzednio uwarżliwionym myszom skutkowało uszkodzeniem tkanki jelita oraz redukcją liczebności komórek T $\gamma\delta$ w tym organie. Dowiedziono również, że u myszy pozbawionych komórek tucznych zablokowanie receptora TCR $\gamma\delta$, a następnie transfer limfocytów T $\gamma\delta$, prowadziło do zmniejszenia reakcji alergicznej (Cardoso i in. 2008). Mengel i wsp. wykazali, że podanie myszom przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko TCR $\gamma\delta$ prowadziło do zablokowania indukcji tolerancji pokarmowej na owalbuminę (Mengel i in. 1995).

Na koniec warto przytoczyć badanie poświęcone wpływowi polifenoli pochodzących z niedojrzałych jabłek na populację komórek T $\gamma\delta$. Skondensowane taniny, występujące w dużym stężeniu w niedojrzałych owocach, wykazują działanie antyoksydacyjne oraz zapobiegają uwalnianiu histaminy z komórek układu odpornościowego. Akiyama i wsp. badali korelację pomiędzy podaniem ekstraktu, a liczebnością komórek T $\gamma\delta$ na modelu mysim. Wykazano, że podanie skondensowanych tanin prowadzi do inhibicji rozwoju nadwrażliwości pokarmowej, zarówno u myszy dzikich, jak i u zwierząt szczepu B10A, charakteryzującego się niezwykle podatnością na sensytyzację. Inhibicja ta była związana ze zwiększeniem udziału limfocytów T $\gamma\delta$ w obrębie komórek IEL (Akiyama i in. 2005).

4. Podsumowanie

Ograniczona liczba prac poświęconych relacji pomiędzy limfocytami T $\gamma\delta$, a różnego rodzaju alergiami może wynikać z dualistycznej natury tych komórek. Mogą funkcjonować one zarówno jako elementy przeciwdziałające alergiom, jak również promujące je. Taka sama sytuacja występuje w przypadku badań nad zastosowaniem tych komórek w immunoterapii nowotworów. Droga działania wydaje się być zależna od wzajemnych proporcji mediatorów układu odpornościowego produkowanych przez te komórki. Istnieje wiele dowodów na to, że limfocyty T $\gamma\delta$ biorą istotny udział w indukcji i rozwoju alergii. Badania prowadzone na modelach ludzkich i mysich sugerują, że mogą one regulować reakcje alergiczne poprzez rozmaite mechanizmy, jednakże wiele aspektów szczegółowych roli limfocytów T $\gamma\delta$ w alergii pozostaje nie w pełni wyjaśnionych - na przykład dokładny wpływ różnych podzbiorów limfocytów T $\gamma\delta$ na stan zapalny związany z alergią lub różnice pomiędzy limfocytami T $\gamma\delta$ obecnymi we krwi obwodowej, a tymi, które związane są z błoną śluzową. Nie jest również wiadome jak wiek i płeć wpływają na populację, liczebność oraz funkcję limfocytów T $\gamma\delta$

w chorobach alergicznych oraz do jakiego stopnia specyficzne mechanizmy regulacyjne komórek T $\gamma\delta$ przyczyniają się do rozwoju alergii. Stosunkowo niewiele badań poświęcono roli limfocytów T $\gamma\delta$ w alergiach kontaktowych i pokarmowych. Istnieje jednak szereg prac traktujących o roli tych komórek w alergiach wziewnych i astmie. Nie do końca zrozumiałe są przyczyny takiej dysproporcji. Faktem jest jednak to, że w przypadku relacji pomiędzy limfocytami T $\gamma\delta$, a wszystkimi rodzajami alergii, jest jeszcze wiele do odkrycia. Niezbędne jest wyjaśnienie dokładnych mechanizmów, poprzez które omawiane komórki przyczyniają się do rozwoju lub zatrzymania reakcji alergicznych, a także wyjaśnienie źródeł, otrzymywanych niekiedy, przeciwstawnych wyników. Kluczowe jest również badanie tych komórek nie jako całości, a jako konkretnych populacji oraz subpopulacji, różniących się przecież właściwościami. Interesujące badania poświęcone są potencjalnemu zastosowaniu tych komórek w immunoterapii (głównie nowotworów). Wydaje się, że w przypadku alergii takie zastosowanie również może mieć miejsce. Bez wątpienia wskazane jest przeprowadzenie badań populacyjnych, w celu globalnego ustalenia udziału komórek T $\gamma\delta$ w ludzkim fenotypie immunologicznym.

5. Literatura

Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, et al. (2005) Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS letters* 579(20): 4485-4491.

- Bol-Schoenmakers M, Marcondes Rezende M, Bleumink R, et al. (2011) Regulation by intestinal $\gamma\delta$ T cells during establishment of food allergic sensitization in mice. *Allergy* 66(3): 331-340.
- Born W, Aydintung K, O'Brien R (2013) Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens. *Cellular & molecular immunology* 10(1): 13.
- Cardoso CR, Teixeira G, Provinciatto PR, et al. (2008) Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* 38: 338-49.
- Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al. (1994) Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264(5156): 267-70.
- Dyring-Andersen B, Skov L, Løvendorf MB, et al. (2013) CD4+ T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis* 68(6): 339-347.
- Fay NS, Larson, EC, Jameson JM (2016) Chronic inflammation and $\gamma\delta$ T cells. *Frontiers in immunology* 7: 210.
- Hassane M, Demon D, Soulard D, et al. (2017) Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates the $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal immunology* 10(4): 1056.
- Ishikawa H, Naito T, Iwanaga T, et al. (2007) Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunological Reviews* 215(1): 154-165.
- Jiang X, Park CO, Sweeney JG, et al. (2017) Dermal $\gamma\delta$ T cells do not freely re-circulate out of skin and produce IL-17 to promote neutrophil infiltration during primary contact hypersensitivity. *PloS one* 12(1): e0169397.
- Lawand M, Déchanet-Merville J, Dieu-Nosjean MC (2017) Key features of gamma-delta T-cell subsets in human diseases and their immunotherapeutic implications. *Frontiers in immunology* 8: 761.
- Li X, Zhong F (2014) Nickel Induces Interleukin-1 β Secretion via the NLRP3-ASC-Caspase-1 Pathway. *Inflammation* 37(2): 457-466.
- MacLeod AS, Havran WL (2011) Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(14): 2399-2408.
- Mengel J, Cardillo F, Aroeira LS, et al. (1995) Anti- $\gamma\delta$ T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunology letters* 48(2): 97-102.
- Moser B, Eberl M (2007) $\gamma\delta$ T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 215: 89-102.
- Nielsen MM, Dyring-Andersen B, Schmidt JD, et al. (2015) NKG2D-dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* 135(5): 1311-1319.
- Nielsen MM, Lovato P, MacLeod AS, et al. (2014) IL-1 β -Dependent Activation of Dendritic Epidermal T Cells in Contact Hypersensitivity. *The Journal of Immunology* 1301689.
- Schmidt M, Raghavan B, Müller V, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature immunology* 11(9): 814.
- Wesch D, Peters C, Oberg HH, et al. (2011) Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cellular and molecular life sciences* 68(14): 2357-2370.
- Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, et al. (2017) The role of toll-like receptor 3 in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Journal of dermatological science* 88(2): 184-191.

32. Biogeography of scorpions with special consideration for species of medical importance in Europe and in the Middle East

Oskar Wiśniewski

Katedra Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Wiesław Kozak

Wiśniewski Oskar: owisniew@doktorant.umk.pl

Key words: scorpionism, sting, epidemiology, zoogeography

Summary

The aim of this article is to present and underline the importance of biogeographical studies of scorpions for public health and healthcare system in general. These animals are responsible for 1,2 millions of sting incidences annually, many of them result in severe sequelae, some of them are lethal. Understanding of the relation between scorpions and environment, both natural and anthropogenic is crucial to provide an effective epidemiological surveillance and therefore to improve the quality of treatment for patients.

1. Introduction

Scorpions (Scorpiones) is an order within the arachnids family (Arachnida). To date, over 1,500 species of these animals have been described. The exact number of them is constantly fluctuating due to the unclear taxonomy; a general trend of elevating subspecies to the rank of the species is observed. It is estimated that about 2 billion people in the world are potentially exposed to a scorpion sting (Chippaux and Goyffon 2008). About 30 species are considered potentially dangerous for humans, however, it should be remembered that the type and severity of symptoms after stinging by this animal is an individual issue, depending on age, health, medical history, allergies, etc. (Chippaux and Goyffon 2008). The group of increased risk includes children, elder and immunocompromised people. It is important to remember that scorpion venom is not homogeneous, it consists of a number of substances, mainly of a proteinic nature. Sensitization to one of the components of venom can cause a very strong reaction of the organism, so-called anaphylactic shock, which can even lead to death. Unfortunately, the implementation of allergy tests poses many difficulties - it is required to obtain a certain amount of antigen (in this case: particular venom fractions), which is a very expensive and technically complicated process. Venom of most species is neurotoxic; one species - *Hemiscorpius lepturus* - possesses cytotoxic venom. Symptoms of its action are necrotic wounds, local tissue necrosis and general inflammation. There is a widespread misconception that scorpions can only be found in the tropics. However, these animals can be found in many different climatic zones, very often near human dwellings. In many countries symptomatic treatment is the only way to treat scorpion stings.

Understanding processes affecting the distribution of scorpions is crucial to develop programs considering prevention and treatment of the effects of scorpion sting (scorpionism). The aim of the work is to present the biogeography of scorpions as a key factor determining the epidemiology of scorpionism on the example of Europe and the Middle East. Epidemiological monitoring of scorpion stings in this area is necessary to reduce possible damage resulting from bites, both economic (shortening the time of inability to work, particularly important in rural areas) and social (exposure to frequent stings and following health problems reflect in mental condition). The improvement of sanitary and housing conditions, combined with the systematic increase in the quality of medical care, may result in a reduction in both mortality and morbidity rates in the case of scorpionism.

2. Historical sources regarding scorpion biogeography

Historia Animalium (History of Animals) by Aristotle is believed to be the first biogeographical work devoted to scorpions (and other animals) (Fet et al. 2009). This work, written around 343 BC, contains detailed anatomical and morphological descriptions of over half a thousand animals. The great Swiss naturalist Luis Agassiz paid tribute to this book writing: *since the time of Aristotle, the systematics of zoology has not made any progress for the next two thousand years, until Linnaeus introduced new features and characteristics of individual taxonomic rankings*. Take a look at the first description about the biogeography of this group of arachnids. In book VIII, part 29, the Stagirite writes: *locality is an important element in regard to the bite of an animal. Thus, in Pharos and other places, the bite of the scorpion is not dangerous; elsewhere – in Caria, for instances – where scorpions are venomous as well as plentiful and of large size, the sting is fatal to man or beast...* Caria is a historical land located by the Aegean Sea in the southwestern part of Asia Minor, covering approximately the area of today's Turkish province of Muğla. In some of the translations of Aristotle's work, Caria is replaced by Scythia, which is a large area of Eurasia, ranging from Ukraine to Central Asia. In both of them there are a number of species (mainly belonging to *Mesobuthus* genus) with relatively strong venom that are considered potentially dangerous to human health and life. Pharos is much more intriguing. It is known that the author could not have meant the Mediterranean island located at the entrance to the port of Alexandria (Egypt), because in this area the occurrence of many dangerous species is noted. In addition, the island of Pharos became famous thanks to the lighthouse only a few decades after *Historia Animalium* had been written, so there is no reason for Aristotle to put a description of this place in his work. However, there is another island that has historically had the same name. It is Hvar located off the coast of Dalmatia (Croatia). The most common species in this area are small, hardly venomous *Euscorpius*. Aristotle probably wrote about this genus when he mentioned that the sting of scorpions from Pharos "is not dangerous" (Fet et al. 2009).

Another remarkable observation regarding the zoogeography of scorpions comes from Pliny the Elder. In *Historia Naturalis* (Natural History), he writes, after Aristotle, that near a mountain in Caria the scorpions are dangerous only to the locals, while they do not attack the travelers. The author supposes that the explanation of this fact is related to the lifestyle of scorpions. Usually, scorpions do not intentionally interact with people. In order to find these arachnids, for example to conduct some scientific research, it is not uncommon to spend long days searching through burrows or spaces under stones. On the other hand, scorpions are sometimes found in human dwellings; some species are even considered to be synanthropic. It happens due to the presence of a large amount of readily available food places like that. From a purely statistical point of view, the victims of scorpion sting will be local residents, not newcomers spending a short time in a given place.

It is worth to pay attention to one more antique description devoted to scorpions. Its author is Roman Claudius Aelianus Praenestinus called Aelian. This writer, who was a protégé of Emperor Septimius Severus, lists eleven types of scorpions in one of his works. Some of them correspond to the actual characteristics of different species occurring in the Middle East, while others seem to be a creation of the imagination of the author (for example, flying scorpions). It is not known whether Aelian was a direct witness of the attack of the imperial army on Hatra (currently archaeological site of Mabad al-Hadar in Iraq), but he mentions the use of scorpions as a weapon. During the siege of Hatra (198-199), city defenders threw "scorpion bombs" outside the city walls to sow panic among Roman soldiers (Mayor 2008).

3. Contemporary data on global biogeography of scorpions

The scorpions are extremely cosmopolitan; representatives of the order live on all continents except Antarctica. An excellent example illustrating the unusual ecological plasticity of scorpions is the European distribution of the genus *Mesobuthus*. There are reports on the occurrence of one of the species, *M. eupeus*, in the area of the Russian Orenburg region (near the border between Europe and Asia, coordinates: 51°13' N 57°75' E). The postulated factor limiting the occurrence of *M. eupeus* in this area is the presence (or absence) of a particular type of soil (Gromov 2001). *Mesobuthus eupeus*

also occurs in Afghanistan, Armenia, Azerbaijan, China, Georgia, Iraq, Iran, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Montenegro, Pakistan, Syria, Tajikistan, Turkey, Turkmenistan and Uzbekistan (Fet 2010). Relative to this species, *M. gibbosus*, was listed in Albania, Bulgaria, Montenegro, Macedonia and Greece (Fet 2010). Undoubtedly, it proves the extraordinary adaptability of these animals. The broad distribution of scorpions across the globe prompted researchers to analyze their spread and try to find some rules of this phenomenon. The very first works, published at the turn of the 20th century, answered the question about the unusual distribution of certain species rather superficially. The inability to formulate an internally coherent concept concerning this issue was caused by several factors: lack of full knowledge about scorpion phylogeny, ignorance or failure in considering Wegener's theory of continental drift as well as cyclic climate changes (especially concerning tropical climates) and lack of knowledge of the scorpions' life strategy. One of the earliest zoogeographic works considering the influence of continental drift on the global distribution of scorpions is a report by B. H. Lamoral from 1980. He drew several conclusions, such as that all presently occurring scorpions (sometimes referred to as Neoscorpionina) originate from pulmonates that emerged during the existence of Pangaea II, and the ancestors of today's Buthidae family (protobuthids) were the dominant group of animals by all the time of existence of this supercontinent. According to this author, today's diversity within this family is the result of vicariance (a speciation under the influence of the formation of natural geographical barriers), occurring during the breakup of Pangaea to Laurasia and Gondwana (Lamoral 1980). He also points to the possibility of active migration of scorpions from Laurasia to the northern part of Gondwana during this long-term process. However, later studies on modern genera proved their low mobility (Lourenço 2014).

An interesting concept was put forward by Lourenço. He is interested in the spatio-temporal classification proposed by Udvardy, who distinguished three levels of biogeographic analyzes: the phylogenetic scale (describing global changes limited only by the period of existence of an organism), the millennial scale (describing changes in the Pleistocene and later times) and the secular scale (describing the last several thousand years). He uses these scales in order to explain contemporary empirical observations, such as the polymorphism of South American scorpions of the genus *Tityus* or the disjunctive distribution of scorpions of the Iuridae family, occurring both in the neotropical region and in the Middle East (Lourenço 2014). However, it should be noted that these studies do not consider the molecular phylogeny of scorpions.

4. Biogeography of European scorpions and their medical importance

There are two genera of scorpions in Europe, whose sting is considered potentially dangerous to human health - *Mesobuthus* (two species, including one endemic in Cyprus) and *Buthus* (six species) (Fet 2010). The most common representative of the genus *Mesobuthus* is *M. gibbosus*, while the most abundant representative of the genus *Buthus* is *B. occitanus*. The geographical range of the first mentioned species is described above, while *B. occitanus* is found in the southern part of France, Spain and Portugal (Fet 2010). The biogeography of *M. gibbosus*, both historical and dynamic, is quite well known. It is recognized that the current range of this species is the result of many episodes, the most influential of which was the Messinian Salinity Crisis. At that time, approximately 5.96 million years ago, due to the desiccation of the Mediterranean basin, the islands of this basin were connected with the continent for a period of about 100,000 years. In the light of recent research, this event is recognized as a crucial for *M. gibbosus* arrival to the Balkan Peninsula from Central Asia (Wisniewski and Olech 2015). The exact size of the population living in this region is not known, however, according to observational data, these scorpions are found much less frequently than *Euscorpis* spp. *M. gibbosus* prefers dry habitats far away from human settlements, while representatives of the genus *Euscorpis* are synanthropic species. However, it occurs in areas frequented by tourists, eg in the proximity of the Skadar Lake National Park (Montenegro) (Wiśniewski, Olech 2015). In the scientific literature several cases of human stings by *M. gibbosus* have been reported; all reports come from Montenegro (Pajovic et al. 2014). Clinical symptoms in patients ranged from local pain, usually lasting a few days, to serious systemic disorders, with consequences visible even many months after the sting. In 80% of cases, the place of the sting were the lower limbs. Large-scale (598 cases) statistical study on the characteristics of *M. eupeus* stings in

the area of Şanlıurfa (Turkey) showed the highest number of such events in the summer months (in the order: June, July and August) (Ozkan and Kat 2005). There are no studies confirming the same dependence among the *Mesobuthus* occurring in the Balkans, but it is worth noticing that these months are a period of increased travel to various regions of the Balkan Peninsula, which may have a significant impact on tourists' safety. Species of the genus *Euscorpius* are much more widespread - they occur in the Iberian Peninsula, France, Germany, Italy, Switzerland, the Balkan Peninsula, Romania, Ukraine and Russia (Fet 2010). There are anecdotal reports on the existence of a Czech population of *Euscorpius* sp. in the past, but no scorpions have been found in this country for a long time. The existence of a large (about 10,000 individuals) stable population of *E. flavicaudis* in the docks in Sherness (England, Kent county) (Benton 1992) can be considered as an interesting fact. The beginning of the population dates back to the times of King George IV (1820-1830), when ships from Italy, supplying various types of building materials, came to this port. A number of individuals have probably been dragged along with the load. The first (confirmed) report on the occurrence of *E. flavicaudis* in this place is the description of the specimen deposited at the British Museum of Natural History, dated 1870 (Benton 1992).

5. Biogeography of the Middle East scorpions and their medical importance

The Middle East, comparing to Europe, is the habitat of incomparably more species of scorpions. A number of scorpions with very strong venom occur there, such as *Androctonus crassicauda* and *Leiurus quinquestriatus*. Due to the greater presence of these arachnids, research on them in the Middle East is much more advanced than in Europe.

In Turkey, the previously mentioned *A. crassicauda* and *M. eupeus* are considered the most dangerous species. Interestingly, despite the fact that *A. crassicauda* is considered a much more venomous, there is no statistically significant difference between the effects of the venom of both species. The annual incidence is 36 cases per 100,000 thousand inhabitants, and mortality 0.01 per 100,000 residents (Ozkan et al. 2008). In the southern part of Turkey, the incidence rate is slightly higher than in the whole country - it reaches 40 cases per 100,000 residents (Ozkan and Kat 2005; Ozkan et al. 2006). However, there were no deaths directly related to the effects of the sting. However, it was observed that women are more likely to be victims of scorpions than men, and 75% of cases were people over the age of 15.

The research conducted in Israel determined the scale of scorpionism to approximately 200 cases per year, with only 15-20% of patients requiring hospitalization (Bentur et al. 2003). Soldiers of the Israeli armed forces have a much more frequent contact with scorpions - for 100,000 soldiers about 1,400 events a year (Haviv et al. 1997). This professional group seems to be the most exposed to contact with the discussed group of arachnids. Operating in difficult conditions, often deserts, with the simultaneous pressure of time, is the cause of much greater exposure of soldiers to the stings. After the first war in the Persian Gulf an increase in the number of scorpions was observed in Iraq and Kuwait. Abandoned trenches and military equipment became the perfect hideout for arachnids. Frequent contact between soldiers and scorpions resulted in the establishment of many legends, such as the suicide committed allegedly by the scorpion, when it is surrounded by flames. In fact, the characteristic attitude approached at a high temperature, i.e. placing the venom barn near the abdomen (it looks as if the scorpion stings itself), results from biophysical processes occurring in the arthropod's body - rapid dehydration of the whole organism makes the observer think that he is actually dealing with a scorpion committing suicide (Legros et al. 1998). In order to achieve this effect, it was sometimes practiced catching scorpions and setting fire around them (own data, unpublished).

In Saudi Arabia, *L. quinquestriatus*, *A. crassicauda* and *Parabuthus liosoma* are responsible for the majority of stings. Geographical variation in the occurrence of the phenomenon is noticeable: in the Riyadh and Eastern provinces, less than 10 cases of sting were recorded per 100,000 inhabitants, while in the provinces of Medina and Al-Baha this ratio is 370 and 480 cases respectively per 100,000 residents (Al-Sadoon and Jarrar 2003). Older papers describe the mortality rate associated with a scorpion sting at 4.8% in the province of Medina (El-Amin et al. 1994), as time passed, however, a significant drop in the number of fatalities was observed, probably due to the improved conditions of

hospitalization of patients (Al-Sadoon and Jarrar 2003). A particularly high incidence rate is recorded in the rural areas of Saudi Arabia - it often reaches the value of more than 1000 cases per 100,000 thousand inhabitants (Mahaba 1997). Epidemiological research conducted among American soldiers stationed in this country during the operation Desert Shield (1990-1991) made it possible to estimate the incidence rate for approximately 2,400 cases of scorpionism per 100,000 soldiers (Groshong 1993).

Data from Iran allows the observation of interesting facts about scorpions. The sting reports from 2001-2009 estimate the frequency of scorpionism for over 42,500 cases per year, with a mortality rate of 19.5 cases per year. About 80% of all recorded events took place in the Khuzestan province. In the years 2001-2006 a decreasing trend of the frequency of stings by scorpions was observed (Dehghani and Fathi 2012).

6. Conclusions

The above-mentioned examples clearly indicate a significant geographical differentiation in the scale of the discussed problem. The reason is that in the Middle East occur many more species of medical importance than in Europe. In addition, the factors limiting the distribution of European species of scorpions with strong venom are temperature, humidity and soil type. Both representatives of the genus *Buthus* and *Mesobuthus* prefer hot and dry habitats. It is natural, therefore, that they are not widespread throughout Europe. Residents of rural areas located in the desert regions of the Middle East are much more likely to be exposed to the scorpions. It is worth noting that despite the ubiquity of these animals, the mortality rate among patients remains at a very low level. In cases requiring hospitalization, a wide and easy access to necessary treatment exists in European countries, however, it should be noted that medical personnel in the Middle East countries (eg in Iran) have extensive experience in the treatment of scorpion stings.

Despite the relatively small number of fatal cases, the problem should not be neglected. Research in this field, both epidemiological meta-analyses and case reports, lead to a better understanding of the essence of the problem, and also enable faster and more effective treatments for patients.

7. Literature

- Al-Sadoon MK, Jarrar BM (2003) Epidemiological study of scorpion stings in Saudi Arabia between 1993 and 1997. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 9(1): 54-64.
- Benton TG (1992) The ecology of the scorpion *Euscorpis flavicaudis* in England. *Journal of Zoology* 226(3): 351-368.
- Bentur Y, Taitelman U, Aloufy A (2003) Evaluation of scorpion stings: the poison center perspective. *Veterinary and Human Toxicology* 45(2): 108-11.
- Chippaux J-P, Goyffon M (2008) Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* 107(2): 71-79.
- Colombo M (2006) New data on distribution and ecology of seven species of *Euscorpis* Thorell, 1876 (Scorpiones: Euscorpiidae). *Euscorpis* 36: 1-40.
- Dehghani R, Fathi B (2012) Scorpion sting in Iran: a review. *Toxicon* 60(5): 919-933.
- Dutto M, Dutto L, Scaglione N, et al. (2010) *Euscorpis* (Scorpiones, Euscorpiidae): three cases of stings in northwestern Italy. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16(4): 659-663.
- Fet V (2010) Scorpions of Europe. *Acta Zoologica Bulgarica* 62(1): 271-276.
- Fet V, El-Hennawy H, Braunwalder ME, et al. (2009) The first observation on scorpion biogeography by Aristotle. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa* 44: 147-150.
- Gromov AV (2001) The northern boundary of scorpions in Central Asia [in:] V Fet, PA Selden (ed.), *Scorpions 2001*. In *Memoriam Gary A. Polis*, British Arachnological Society, Burnham Beeches: 401-406.

- Groshong TD (1993) Scorpion envenomation in eastern Saudi Arabia. *Annals of Emergency Medicine* 22(9): 1431-1437.
- Haviv J, Huerta M, Shpilberg O, et al. (1997) Poisonous animal bites in the Israel Defense Forces. *Public Health Reviews* 26(3): 237-245.
- Lamoral BH (1980) A reappraisal of suprageneric classification of recent scorpions and of their zoogeography. 8. Internationaler Arachnologen-Kongress, Vienna: 439-444.
- Legros C, Martin-Eauclaire MF, Cattaert D (1998) The myth of scorpion suicide: are scorpions insensitive to their own venom? *Journal of Experimental Biology* 201(18): 2625-2636.
- Lourenço WR (2014) Biogeography of Southeast Asia (and Wallacea) scorpions, a review [in:] D Telnov (ed.), *Biodiversity, Biogeography and Nature Conservation in Wallacea and New Guinea*, volume II, Entomological Society of Latvia, Riga: 27-46.
- Mahaba HMA (1997) Scorpion sting syndrome: epidemiology, clinical presentation and management of 2240 cases. *Eastern Mediterranean Health Journal* 3(1): 82-89.
- Mayor A (2008) *Greek fire, poison arrows, and scorpion bombs: biological & chemical warfare in the ancient world*, Penguin, London.
- Ozkan O, Kat I (2005) *Mesobuthus eupeus* scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 11(4): 479-491.
- Ozkan O, Adiguzel S, Yakistiran S, et al. (2006) *Androctonus crassicauda* (Olivier 1807) scorpionism in the Sanliurfa Provinces of Turkey. *Head and Neck* 6:2.
- Ozkan O, Uzun R, Adiguzel S, et al. (2008) Evaluation of scorpion sting incidence in Turkey. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 14(1): 128-140.
- Pajovic B, Radojevic N, Radosavljevic M (2014) Chronic *Mesobuthus gibbosus* scorpionism related to the sting in vein. *European review for medical and pharmacological sciences* 18(9): 1419-1421.
- Wiśniewski O, Olech B (2015) A new locality of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) from Montenegro (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius* 205: 1-5.