

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Przegląd badań

Część I



www.mlodzi naukowcy.com

Poznań 2024

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

mgr inż. Karol Kłosiński

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-67991-13-1)

ISBN (wydanie online 978-83-67991-18-6)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-67991-19-3)

Data wydania: maj 2024

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. Diety roślinne u psów i kotów	7
<i>Alicja Wardak</i>	
2. Pogląd wybranych ras psów owczarskich w Polsce w latach 2012-2022	16
<i>Alicja Wardak</i>	
3. Trening klikerowy kury	25
<i>Barbara Rytel</i>	
4. Struktura pogłowia psów rasy retriever w Polsce w latach 2017-2022	30
<i>Barbara Rytel</i>	
5. Alergenność substancji aktywnych zawartych w jajach ptasich	39
<i>Paulina Wac, Nikola Pietruszka, Patrycja Jóźwiak, Dawid Ziobro, Savelli Ishchenko, Justyna Batkowska, Kamil Drabik</i>	
6. Etologiczna i fizjologiczna odpowiedź organizmu na zaburzenia dobrostanu drobiu	46
<i>Wojciech Madzula, Kacper Janus, Natalia Wolska, Anastasiya Ramankevich, Kamil Drabik, Justyna Batkowska</i>	
7. Skorupa jaja i jej rola w procesie rozwoju zarodka	52
<i>Szymon Grzejszczak, Sofii Danko, Marta Mickiewicz, Rafał Banaszkiewicz, Karolina Wengerska, Justyna Batkowska</i>	
8. Analiza zmienności opadów na wybranych zlewniach w ostatnim trzydziestoleciu	58
<i>Patrycja Stanowska</i>	
9. Znaczenie modyfikacji strukturalnych ibuprofenu w postaci ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny w kontekście zwiększonej przenikalności przez skórę	68
<i>Karolina Biłska</i>	
10. Post-translational modifications of the PARP1 protein in enzyme activation and function	79
<i>Kończ Kinga, Gronkowska Karolina, Robaszkiewicz Agnieszka</i>	
11. Post-translational protein modifications under cellular stress: Implications for DNA repair	86
<i>Kończ Kinga, Gronkowska Karolina, Robaszkiewicz Agnieszka</i>	
12. Przegląd czynników wpływających na właściwości membrany opartej na poli(fluorku winylidenu) (PVDF)	92
<i>Surma Olga, Molenda Marcin</i>	
13. The potential of waste biomass: Brewery Spent Grain as a substrate in microbiological cultures for enzymes production	99
<i>Aleksandra Zyskowska, Halina Maniak</i>	
14. Evaluation of the feasibility of using untreated and acid-pretreated brewery spent grain for <i>Cerrena unicolor</i> cultivation	105
<i>Aleksandra Zyskowska, Julia Karalus, Halina Maniak</i>	

Przedmowa

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

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, 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. Diety roślinne u psów i kotów

Plant-based diets for dogs and cats

Alicja Wardak

Uniwersytet w Siedlcach, Wydział Nauk Rolniczych, Instytut Zootechniki i Rybactwa, Studenckie Koło Naukowe Sympatyków Zwierząt

Opiekun naukowy: dr inż. Agata Danielewicz

Alicja Wardak: aw85720@stud.uws.edu.pl

Słowa kluczowe: semiwegetarianizm, tauryna, arginina, kwas arachidonowy, kardiomiopatia rozstrzeniowa

Streszczenie

Temat różnorodności modeli żywieniowych w odniesieniu do człowieka wydaje się dobrze znany. Wśród diet stosowanych przez ludzi można wyróżnić wiele ich rodzajów, jak np. dieta śródziemnomorska, dieta ketogeniczna, carnivora i różne kombinacje diet bezmięsnych lub ograniczających mięso. W żywieniu zwierząt można również wyróżnić różne style karmienia, jak np. dieta monoproteinowa, dieta BARF, domowa czy hipoalergiczna. Jednakże coraz częściej wprowadza się zwierzętom domowym żywienie ograniczające mięso i produkty odzwierzęce, co obrazują przeprowadzane badania (Dodd et al. 2022).

Niniejsza praca przeglądowa stanowi rozważania nad dietami bazującymi na roślinach w żywieniu psów i kotów. Zaprezentowano filogenetyczne uwarunkowania tychże zwierząt do diety, ich procesy fizjologiczne istotne z punktu widzenia tematu oraz możliwe następstwa stosowania długotrwale tego typu diet. Wyróżniono również schorzenia, w których stosowanie diet roślinnych jest absolutnie zakazane oraz takie, w których mogą one przyczynić się do poprawy stanu zdrowia zwierzęcia.

1. Wstęp

Wśród diet bezmięsnych, a więc takich, które wykluczają mięso, wyróżnić można wiele odmiennych od siebie sposobów odżywiania. Niektóre z nich są bardzo rygorystyczne. Przykładem jest dieta wegańska, całkowicie wykluczająca zarówno mięso, jak i produkty pochodzenia zwierzęcego. Podobna jest dieta witariańska, która również wyklucza mięso i dozwolone jest w niej spożywanie tylko owoców i warzyw w stanie surowym, a więc bez jakiegokolwiek obróbki termicznej. Z kolei w diecie wegetariańskiej podstawą żywienia również są rośliny, ale stosunek do spożywania tkanek zwierzęcych może być odmienny w zależności od danego wariantu wegetarianizmu. Wśród nich wyróżnić można m.in.: laktoowoowegetarianizm, wykluczający mięso, a dopuszczający jaja, mleko oraz ich przetwory; semiwegetarianizm, pozwalający na spożywanie mięsa wszystkich gatunków zwierząt poza ssakami; czy np. pescowegetarianizm, bazujący na produktach roślinnych oraz mięsie ryb. Są to jedynie niektóre z odmian diet bazujących na roślinach. W rzeczywistości można wymienić jeszcze więcej ich rodzajów, jednakże niniejsza praca kładzie nacisk na stosowanie takiego modelu żywieniowego wśród psów i kotów, toteż zostaną przywołane diety prawdopodobne do stosowania u zwierząt.

Wśród ludzi wyróżnić można wiele powodów stosowania diet roślinnych, a są to m.in.: walory prozdrowotne takiego sposobu odżywiania, dbałość o ekologię, powody moralne i religijne, sprzeciw przeciwko masowej hodowli zwierząt czy oddziaływania kulturowe (Cader i Lesiów 2021). W ostatnich latach naukowcy zaczęli zgłębiać temat przyczyn karmienia zwierząt takich jak pies i kot dietami roślinnymi. Dużą rolę przypisuje się światopoglądowi i stylowi żywienia właściciela na skład diety jego zwierzęcia. W badaniu (Dodd et al. 2022) wykazano, że zwierzęta na dietach roślinnych lub wegetariańskich należą głównie do wegan (taką deklarację złożyło 27% spośród badanych wegan) oraz w mniejszym stopniu do wegetarian (1 osoba spośród badanych wegetarian). To psy częściej były na takiej diecie niż koty. Z kolei wśród osób spożywających i mięso, i rośliny (wszystkożernych) oraz na diecie pescowegetariańskiej nie odnotowano przypadków karmienia psów i kotów dietami

bezmięsnymi. Należy zaznaczyć, że zdecydowana większość badanych osób (wegan, wegetarian, psecowegetarian i osób wszytkożernych) przyznała, że karmi swoje zwierzęta dietą bazowaną na mięsie i zgłaszała wątpliwości co do roślinnych diet dla psów i kotów. Ogólny odsetek psów żywnionych dietą roślinną wynosił 1,6%, zaś u kotów: 0,7%.

2. Filogenetyczne uwarunkowania diety psa i kota.

Zarówno pies domowy (*Canis lupus familiaris*), jak i kot domowy (*Felis catus*) są zwierzętami należącymi do grupy drapieżników mięsożernych (*Carnivora*). Jednakże sposób ich odżywiania nieco się od siebie różni. Różnice w odżywianiu psów i kotów można wytłumaczyć odwołując się do przynależności ekologicznej tychże gatunków. W nadrodzinie psowatych (*Canoidea*) wyróżnia się kilka rodzin, spośród których część jest wszytkożerna (szopowate, niedźwiedziowate), jedna rodzina (pandowate) - wyłącznie roślinożerna oraz część jest wszytkożerna, np. rodzina psowatych (*Canidae*), do której należy pies. Psa domowego określa się mianem zwierzęcia "względnie mięsożernego". Przemawiają za tym argumenty odnoszące się do strategii żywieniowych przodków tego gatunku - uważa się, że już dawne psowate żywiły się głównie mięsem zwierzęcym, jednak gdy z różnych powodów niemożliwe było spożycie tego typu posiłku, zwierzęta te potrafiły przystosować się do sytuacji i uzupełniać swoją dietę w pokarmy roślinne. Również wartym wspomnienia jest fakt, że zwierzęta te po upolowaniu zwierzyny (która najczęściej była roślinożercą), najpierw spożywały ich jelita, a więc te narządy, w których przebywał jeszcze pokarm roślinny (Kurosad i Kungi 2013). Kolejnym argumentem przemawiającym za "względną mięsożernością" psów, a więc spożywaniem przez nie również produktów roślinnych, jest fakt obecności genu AMY2B wśród psów. Jest to gen enzymu amylazy trzustkowej, który odgrywa ważną rolę w procesie trawienia węglowodanów. Stwierdza się, że przyczyniła się do tego wspólna koewolucja psa i człowieka, przez którą psy przystosowały się do diety wsokoskrobiowej (Freedman et al. 2014).

Z kolei w nadrodzinie kotowatych (*Feloidea*) wszystkie rodziny są mięsożerne (w tym rodzina kotowatych - *Felidae*). Kot jest określany jako "bezwzględny mięsożerca". Ich proces udomowienia przebiegał inaczej niż u psów. Nie znaleziono w ich organizmach ani kodzie genetycznym takich mechanizmów, które pozwalałyby im na spożywanie większej ilości pokarmu roślinnego. Co więcej - w ich anatomii i fizjologii istnieje wiele przeciwwskazań do tego typu diety, co zostanie zaprezentowane w dalszej części niniejszej pracy. Na podstawowe różnice w żywieniu psów i kotów miały wpływ różne procesy ewolucyjne i adaptacyjne. Dziś możemy określić następujące wnioski: kot jako bezwzględny mięsożerca powinien jeść posiłki białkowo-tłuszczowe, które są małe objętościowo, ale spożywane często. Natomiast pies - względny mięsożerca - powinien mieć dietę opartą na węglowodanach, białkach i tłuszczach, duże objętościowo posiłki spożywane rzadziej niż kot (Kurosad i Kungi 2013).

3. Anatomiczne i fizjologiczne przystosowania do diety

3.1 Pies

O przystosowaniu psa do określonego typu diety świadczy już jego uzębienie. Pies posiada w łukach dolnym i górnym łącznie 42 zęby, z czego kły i siekacze (16 sztuk) służą głównie do pobierania i obrabiania mięsa, zaś zęby przedtrzonowe i trzonowe (26 sztuk) są używane do rozdrabniania i rozcierania pokarmu roślinnego (Jank 2013). Pies odbiera 5 smaków: gorzki, słodki, kwaśny słony i umami - smak mięsny. Ten ostatni aktywowany jest prawdopodobnie obecny w pożywieniu glutaminian. Najbardziej atrakcyjnymi smakami dla psa jest słony oraz słodki, dlatego niektóre pokarmy roślinne mogą się cechować wysoką smakowitością dla psa, jak np. gotowana marchew, batat czy miąższ jabłka. Z kolei smak gorzki często jest źle tolerowany przez psy, co może szybko decydować o awersji do tego typu pokarmów. Stąd niektóre warzywa, takie jak np. brukselka, rukola, jarmuż i niektóre zioła). Warto nadmienić, że smak jest drugorzędnym kryterium czy dany pokarm zostanie pobrany przez psa, czy nie. Najważniejszą rolę odgrywa w tym przypadku narząd węchu, który jest niezwykle dobrze rozwinięty u tych zwierząt. Ślina wydzielana jest u psa przez cztery pary gruczołów ślinowych. Jej funkcją jest ułatwienie odbierania smaków, namoczenie

pokarmu i przystosowanie go do lepszego przyswojenia w dalszych odcinkach układu pokarmowego. Trawienie niektórych pokarmów rozpoczyna się już w jamie ustnej. Jednakże zarówno psy jak i koty nie posiadają w swojej ślinie enzymu α -amylazy ślinowej, która w dużym stopniu jest odpowiedzialna za trawienie węglowodanów, w związku z tym proces ich trawienia i przyswajania rozpoczyna się w dalszych odcinkach układu pokarmowego.

Na całej długości przełyku psa występują gruczoły śluzowe przełykowe, których wydzieliny wspomagają transport pokarmu do żołądka. Szybkość perystaltyki przełyku wspomaga budowa tego narządu z mięśni poprzecznie prążkowanych i gładkich (Krysiak i Świeżyński 2012). Zawartość posiłku wpływa na pracę żołądka: na skład soku żołądkowego, pracę obecnych tam enzymów, jego pH oraz czasu przebywania tam treści pokarmowej. W żołądku następuje wstępna hydroliza białek. Włókno rozpuszczalne (np.: inulina, laktuloza, np. w większości roślin strączkowych) pozytywnie wpływa na szybkość opróżniania żołądka, w przeciwieństwie do włókna nierozpuszczalnego (celuloza, pektyny, ligniny - np częściowo: pulpa buraczana). Jednakże nie należy bagatelizować roli włókna nierozpuszczalnego w diecie. Wspiera ono poczucie sytości w diecie oraz wspiera pracę całego przewodu pokarmowego (Chandler 2016). W związku z faktem nierozpuszczalności części węglowodanów w diecie, pokarm zwierzęcy jest często lepiej trawiony i przyswajany przez organizmy psów i kotów (Jank 2013).

Jelito cienkie psa jest dłuższe w porównaniu do tego narządu u kota, a biorąc pod uwagę, że to właśnie tu zachodzi większość procesów związanych z trawieniem pokarmów roślinnych, może to stanowić przystosowanie do diet wegetariańskich. W jelicie cienkim zachodzi fermentacja (trawienie chemiczne) składników pokarmowych oraz trawienie mechaniczne, polegające na perystaltycznych ruchach jelita. Po strawieniu następuje ich wchłonięcie do różnych układów organizmu - krwionośnego i limfatycznego. To m.in. kosmki jelitowe jelita cienkiego odpowiadają za transport tychże produktów fermentacji. Stwierdza się, że psy karmione dietą o podstawie roślinnej mają dłuższe kosmki jelitowe od tych karmionych dietą mięsną (*ibidem*). W jelicie cienkim następuje kontynuacja trawienia białek (rozpoczęło się to hydrolizą białek do polipeptydów w żołądku) przy pomocy enzymów trzustkowych i tych ze ścian jelita (głównie endopeptydazy). Większość węglowodanów trawionych jest w jelicie cienkim. Dzieje się to głównie za pomocą enzymów trzustkowych (w tym wspomniany wcześniej enzym AMY2B ułatwiający trawienie m.in. skrobi). Zauważono, że w przypadku dużej ilości produktów skrobiowych w diecie, amylaza trzustkowa zwiększa swoje działanie, przeciwdziałając możliwym negatywnym skutkom spożywania zbyt dużej ilości tego składnika. Stanowi to kolejne z przystosowań psów do spożywania produktów roślinnych. Należy tutaj zwrócić uwagę na fakt, że u szczeniąt i młodych psów ze względu na wciąż rozwijający się organizm, aktywność tejże amylazy trzustkowej jest ograniczona, dlatego mogą one gorzej tolerować diety roślinne niż psy dorosłe. Ilość węglowodanów rozpuszczalnych należy również kontrolować ze względu na to, że ich obecność może pogarszać strawność białek. Z kolei zbyt duża zawartość włókna pokarmowego (nierozpuszczalne) może mieć negatywny wpływ na wchłanianie wody z jelita cienkiego i prowadzić do biegunki osmotycznej, ale w przeciwieństwie do włókna rozpuszczalnego - nie powoduje ono pogorszenia strawności białek. Psy stale karmione pokarmem o zbyt dużej zawartości węglowodanów wytwarzają większą ilość gazów, częściej defekują, mają czasem ograniczone możliwości przyswajania witamin (ze względu na częste niedobory tłuszczu, w których mogłyby się rozpuszczać witaminy A, D, E i K). Może to prowadzić do niedoborów i pogorszeniu się stanu zdrowia zwierzęcia (Kurosad i Kungi 2013).

W jelicie grubym zachodzi głównie trawienie bakteryjne zachodzące przy udziale mikroflory tego narządu. Procesowi temu ulegają niestrawione wcześniej składniki pokarmowe. Stwierdza się, że trawienie w jelicie grubym psów przebiega nieco skuteczniej niż u kotów. Jest to kolejny czynnik, który potwierdza ogólnie lepszą strawność składników pokarmowych (zwłaszcza - roślinnych) niż u kotów, co czyni psy bardziej przystosowanymi do diet z dużą zawartością roślin. Włókno pokarmowe (włókno nierozpuszczalne - to, które nie ulega fermentacji w jelicie cienkim) jest tu częściowo poprzez trawienie bakteryjnej w jelicie grubym. Włókno to ma pozytywny wpływ na mikrobiom jelita grubego oraz poprawia jakość kału, dlatego nie należy go wykluczać w diecie.

3.2 Kot

Kot posiada w swojej jamie ustnej znacznie mniej zębów przedtrzonowych i trzonowych niż pies, a co z tym idzie - mniejszą możliwość mechanicznego rozdrobnienia pokarmu roślinnego. Stanowi to potwierdzenie jego bezwzględnej mięsożerności. Dodatkowo kot ma język o szorstkiej, haczykowatej budowie, która również jest przystosowaniem do diety opartej na mięsie. Uznaje się, że dawnym przodkom kota taka budowa języka pomagała rozdrobnić ciało mniejszych ofiar, bo na takie właśnie polował. Stąd też wynika fakt, że koty powinny jeść małe porcje, ale wiele razy w ciągu dnia. Kot, w przeciwieństwie do psa, nie odbiera smaku słodkiego. Jest to związane mutacją w genie *Tas1r2*. Taką samą mutację zauważono również u dzikich kotowatych, które z natury są mięsożerne i nie wykazują zainteresowania w dużym stopniu roślinami. Przyczyną może być właśnie brak odczuwania słodkiego smaku, co sprawia, że niektóre rośliny są dla niech nieatrakcyjne pod względem smaku (Li Xia et al. 2005). Najbardziej atrakcyjny dla kota jest smak kwaśny. Smak gorzki - którego unikają psy - jest dla kota stosunkowo smakowity, a smak słony - zupełnie neutralny. Koty posiadają pięć par gruczołów ślinowych. Podobnie jak u psów, u kotów również nie występuje w ślinie enzym α -amylazy ślinowej, toteż trawienie węglowodanów rozpoczyna się w dalszej części układu pokarmowego.

U kotów stwierdza się wolniejszą perystaltykę przełyku. I mimo występowania gruczołów przełykowych podobnie jak u psów, to budowa tego narządu u kotów nie sprzyja tak szybkiemu przekazywaniu pokarmu do żołądka (Jank 2013). W żołądku, na skutek współdziałania enzymów, soku żołądkowego itd. zachodzi wstępna hydroliza białek. Proces transportu pokarmu z żołądka wspierają również ruchy perystaltyczne żołądka. Na szybkość opróżniania żołądka kota mają wpływ podobne czynniki jak u psa. Dodatkowo co do zasady karma sucha u kota przebywa dłużej w żołądku niż karma mokra. Pokarm trafiający do jelita cienkiego jest wstępnie nawilżony, przemieszany i rozdrobniony.

Długość jelita cienkiego w porównaniu do wielkości zwierzęcia jest dłuższa u psów niż u kotów, toteż tamte posiadają większą powierzchnię trawienia i stosunkowo lepszą strawnością różnych pokarmów. Z racji, że proces trawienia węglowodanów ma miejsce głównie w jelicie cieniłym, stwierdza się, że psy są lepiej przystosowane do diety roślinnej. Co nie zmienia faktu, że trawienie pokarmów przez koty również jest skuteczne (Jank i Wilczak 2013). Enzymy obecne w jelicie cieniłym rozpoczynają proces fermentacji. Tutaj następuje znacząca różnica między psami a kotami. Koty nie posiadają mechanizmu przystosowawczego do rosnącej ilości skrobi w diecie, w odróżnieniu od psów. Zwiększona ilość tego surowca nie powoduje zwiększenia działania enzymu amylazy trzustkowej. Taki stan może prowadzić do zaburzeń funkcjonowania układu pokarmowego oraz

- w konsekwencji - np. biegunki. Obróbka termiczna zwiększa stopień strawności zarówno skrobi jak i innych składników pokarmowych. Należy jednak zwracać uwagę na czas takiego przygotowywania pokarmów. Zbyt długa obróbka termiczna może wywołać efekt odwrotny od zamierzonego i drastycznie zmniejszyć strawność np. białka. Podobnie jak u psów, występowanie w diecie kota dużej zawartości włókna surowego może niekorzystnie wpływać na strawność innych składników pokarmowych, np. białek i obniżać ich biodostępność. Również może prowadzić do niedoborów pokarmowych, częstszej defekacji czy utraty wagi.

Porównując zachodzące procesy metaboliczne u psa i kota, widać znaczące różnice między nimi. Pierwszą podstawową różnicą, mającą odzwierciedlenie w diecie jest fakt, że koty nie mają zdolności do pokrywania swojego zapotrzebowania na taurynę endogennie, w związku powyższym wymagane jest dostarczanie tego aminokwasu w diecie. Koty nie posiadają enzymu aldolazy treoninowej, w związku z powyższym przemiana treoniny zachodzi w odmienny sposób niż u psów. W organizmie kota brakuje również dioksygenazy, co uniemożliwia im przemianę beta-karotenów w retinolową formę witaminy A, co również należy uwzględnić w diecie. Również utrudnione jest wchłanianie witamin z grupy B i D. Kolejną różnicą jest cały proces glukoneogenezy. U psów proces ten zachodzi podobnie u człowieka - stężenie glukozy we krwi wzrasta po zjedzeniu porcji. U kotów natomiast proces ten zachodzi bez ustanku. Dodatkowo enzym glukokinazy wątrobowej działa zdecydowanie słabiej u kotów niż u psów. Enzym ten związany jest z możliwością wykorzystania glukozy w organizmie i jest to kolejny czynnik, który wymusza na kotach spożywanie małych

posiłków, ale wiele razy w ciągu dnia, by zachować homeostazę glukozowo-insulinową (Kurosad 2013). Również wraz z wiekiem obniża się aktywność enzymu laktazy, co powoduje nietolerancję laktozy u dorosłych kotów. Wyklucza to mleko i jego przetwory z diety.

4. Zapotrzebowanie na składniki pokarmowe w kontekście diet bezmięśnych

4.1 Białko i aminokwasy

W literaturze nieraz można spotkać się z określonymi ilościami zapotrzebowania na białko. Warto jednak zaznaczyć, że ważna jest nie sama ilość przyjmowanego białka, ale bardziej jego profil aminokwasowy. Podawane wartości białka są zazwyczaj niejako uproszczonym narzędziem, pomagającym w bilansowaniu diet (Kurosad i Kungi 2013). Produkty pochodzenia zwierzęcego są bardziej bogate w białko niż produkty roślinne. Wynika to z wartości biologicznej białka, czyli stopnia pokrycia zapotrzebowania na poszczególne aminokwasów, ze szczególnym uwzględnieniem aminokwasów ograniczających (lizyna, tryptofan, metionina). Białka pochodzenia zwierzęcego mają z reguły wyższą wartość biologiczną niż białka roślinne. Stąd białka zwierzęce nazywane są pełnowartościowymi, a roślinne - niepełnowartościowymi. Wzorcem największej wartości biologicznej białka dla psów i kotów jest białko jaja kurzego. Wyjątkiem od reguły pełnowartościowości białek zwierzęcych jest żelatyna - nie pokrywa ona w całości zapotrzebowania na tryptofan (*ibidem*). Czysto teoretycznie, znając dokładne profile aminokwasowe różnych białek roślinnych, utworzenie z nich pełnowartościowej diety zdaje się możliwe. Wtedy wymaga to jednak fachowej wiedzy i odpowiedniego nakładu pracy ze strony osoby wprowadzającej taką dietę swojemu zwierzęciu. Jedną z popularniejszych metod konstruowania roślinnych dawek pokarmowych dla psów jest łączenie kilku roślinnych źródeł białka. Za przykład często podaje się łączenie np. soi i kukurydzy, które ze względu na swoje różne zawartości aminokwasów, mogą lepiej pokryć zapotrzebowanie białkowe niż zastosowanie np. samej soi. Jest to też często wykorzystywane w gotowych karmach wegetariańskich do kupienia (Jank i Wilczak 2013). Biorąc pod uwagę powyższe, monoproteinowy styl żywienia, zakładający podawanie białka jedynie z jednego źródła, jest niezalecany w dietach bezmięśnych dla zwierząt. Termin "wartości biologicznej białka" jest naturalnie powiązany ze strawnością pokarmu. Sama zawartość aminokwasowa danego białka nie stanowi o jego realnej wartościowości. Należy znać jeszcze strawność danego surowca, by ocenić jego biodostępność (czyli ile % z niego zwierzę jest w stanie przyswoić w organizmie poprzez np. wchłanianie w trawieniu), a ile zostanie niestrawione i w efekcie - wydalone. Dodatkowo strawność konkretnych substancji może być zmienna osobniczo i zależna np. od stanu zdrowia zwierzęcia, przebytych przez niego chorób itd. Tak dokładnie wyliczenia dla każdego osobnika nie zawsze jest niemożliwe, dlatego przyjmuje się, że to wyższej jakości surowce występujące w karmie są najlepiej strawne, a te gorszej jakości - mniej strawne (Jank 2013). Wprowadzanie u zwierząt diet bezmięśnych lub z jego ograniczoną zawartością (jak np. pollo-, semi-, pesco-, insektowegetariańska) powinno odbywać się z pełną świadomością procesów zachodzących w organizmach zwierzęcych, ryzyka niedoborów. Należy tu również zwrócić uwagę na ilość pobieranego pokarmu, ponieważ produkty roślinne mogą mieć mniejszą smakowitość dla psów i kotów i w związku z tym zwierzęta te mogą nie pobierać pokarmu w całości, co nawet przy dobrze zbilansowanej diecie będzie prowadziło do niedoborów oraz do wolniejszego tempa wzrostu u młodych zwierząt (Kurosad i Kungi 2013). Szczególnie ważne jest dostarczanie aminokwasów egzogennych, które są dostarczane do organizmów kota i psa w diecie, w przeciwieństwie do aminokwasów endogennych, które są wytwarzane samoistnie przez te zwierzęta. (*ibidem*).

Tauryna

Szczególnie ważne w diecie kota jest pokrycie bezwzględного zapotrzebowania na taurynę, która jest aminokwasem egzogennym u tych zwierząt. Psy takiego zapotrzebowania nie mają i aminokwas ten wytwarzany jest wewnątrz jego organizmu. Tauryna ma istotną rolę w organizmie kota w kontekście procesów trawiennych - łączy się z kwasami żółciowymi w wątrobie, powodując powstawanie ich soli, co jest ważne w kontekście trawienia tłuszczów. Jest to jedyny aminokwas spełniający tę funkcję u kota. U psa proces ten wspierany jest również przez glicynę (*ibidem*). Tauryna wzmacnia też funkcjonowanie serca, siatkówki oka i wspiera kotkę w okresie rozrodu i wpływa na

zdrowie jej młodych. Ma ważną rolę w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u młodych zwierząt. W późniejszych stadiach życia jest również niezbędna do prawidłowego przekazywania impulsów nerwowych (*ibidem*). Największa zawartość tauryny obecna jest w mięsie ptaków, ryb czy małych gryzoni, nieco mniejsze ilości zauważalne są u dużych ssaków. W produktach roślinnych stosunkowo duże stężenie tauryny odnotowano w algach. Poza nimi w roślinach jest bardzo niskie stężenie tego aminokwasu, co jest dużą przeszkodą dla stosowania diet roślinnych u kotów. Niedobory tauryny u kotów mogą prowadzić do kardiomiopatii rozstrzeniowej (DCM) oraz centralnego zwyrodnienia siatkówki (FCRD). U psów rzadziej spotyka się skutki niedoborów tauryny. Są w stanie syntezować ten aminokwas wewnętrznie przy udziale swoich prekursorów - metioniny i cysteiny. Wtedy jest to zazwyczaj kardiomiopatia rozstrzeniowa, warunkowana dodatkowo predyspozycjami genetycznymi danych ras do tej choroby oraz z innymi czynnikami zewnętrznymi (*ibidem*).

Metionina i cysteina

Kolejnym niezwykle istotnym aminokwasem egzogennym jest metionina (prekursor tauryny). Jej niedobór w psiej diecie może prowadzić do kardiomiopatii rozstrzeniowej (DCM). Metionina jest również aminokwasem ograniczającym zarówno u psów, jak i u kotów. Metionina i cysteina wpływają na jakość skóry i okrywy włosowej. Dodatkowo u kotów oba te aminokwasy mają znaczenie przy produkcji felininy. W wielu produktach pochodzenia roślinnego (np. soja, zboża) metionina występuje w bardzo małej ilości. Zdecydowanie więcej jest jej w białkach pochodzenia zwierzęcego. Metionina i cysteina oddziałują na zapotrzebowanie w taurynę (*ibidem*).

Arginina

Jej niedobór u psów w okresie wzrostu może prowadzić do zmętnienia soczewki oka. Zarówno u psa, jak i u kota mogą one prowadzić do hiperamonemii, w wyniku której może nastąpić wzmożone ślinienie, wymioty, skurcze i porażenia, a w ekstremalnych przypadkach - nawet śmierć. Szczególnie wrażliwe na niedobory argininy są koty. Szkodliwe skutki niedoboru tego aminokwasu mogą być widoczne już w kilka godzin po spożyciu posiłku bez argininy. Postępują szybko i są niezwykle niebezpieczne. Właściwy poziom argininy u kotów jest ważny, ponieważ bez argininy koty nie są w stanie syntezować ornityny - aminokwasu istotnego w cyklu mocznikowym. (*ibidem*).

Lizyna

Lizyna jest aminokwasem ograniczającym u psów. W kontekście diet wegetariańskich oraz niskobiałkowych suszonych dostarczanie jej z pożywienia jest bardzo ograniczone ze względu na specyfikę przygotowywania takich karm. Podczas suszenia i ogrzewania np. ziaren zbóż występuje reakcja, która całkowicie uniemożliwia lub zmniejsza możliwość wykorzystania lizyny w organizmie. Dlatego w takich przypadkach zaleca się dodatkowe uzupełnianie lizyny (*ibidem*).

Tryptofan

Tryptofan jest istotnym aminokwasem mającym wpływ na prawidłowe funkcjonowanie neuroprzekazników (*ibidem*). Wpływa on pozytywnie na procesy poznawcze i zachowania behawioralne. U psów zwiększa się jego ilość, by wspomóc terapię behawioralną w zaburzeniach powiązanych z neurologią, w wyniku których pies wykazuje nadmierną agresję. Dodatkowo często zaleca się stosowanie diet z wyższą zawartością tryptofanu, gdy pies boryka się z problemem fobii dźwiękowych (Levine 2016). Ważna jest zależność tryptofanu i niacyny. U psów występuje mechanizm, który minimalizuje ryzyko niedoboru tego aminokwasu poprzez syntezowanie go z witaminy B3. Koty niestety nie posiadają takiej zdolności, w związku z powyższym w ich diecie należy kontrolować i tryptofan, i niacynę (Kurosad, Kungi 2013).

Fenylalanina i tyrozyna

Fenylalanina i tyrozyna jest istotna głównie dla psów i kotów o czarnym kolorze włosów. Mają one większe zapotrzebowanie na te aminokwasy niż zwierzęta tych samych gatunków, ale o innych umaszczeniach. Niedobory tych aminokwasów mogą powodować tzw. zespół czerwonego włosów oraz neuropatie czuciowe (*ibidem*).

4.2 Tłuszcze

Tłuszcze stanowią główne źródło energii w diecie psów i kotów. Dodatkowo zwiększają smakowitość pobieranych pokarmów. W kontekście diet roślinnych szczególnie ważne są kwasy linolowy (LA) i arachidonowy (AA). To wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Poza tym, że są one źródłem, energii, to również mają wpływ na prawidłowe syntezowanie różnych związków w organizmie, są składnikami błon komórkowych (arachidonowy) oraz - co najważniejsze - warunkują prawidłowe funkcjonowanie skóry. Jest to ważne nie tyle ze względów estetycznych, a bardziej na funkcjonowanie całego organizmu. Skóra jest największym narządem ciała, którego funkcją jest m.in. ochrona reszty organizmu przed szkodliwymi drobnoustrojami. Zaburzenie jej funkcjonowania w wyniku nieodpowiedniej ilości kwasów tłuszczowych powoduje zwiększenie wrażliwości na alergeny w wyniku zmniejszenia ogólnej odporności skóry (*ibidem*). Źródłami kwasu linolowego są głównie oleje roślinne. Pies ma w swoich organizmie mechanizm pozwalający dobrze syntezować kwas arachidonowy z kwasu linolowego, czego niestety brakuje u kotów. W związku z powyższym kwas arachidonowy określa się jako warunkowo egzogeny oraz określane jest na niego bezwzględne zapotrzebowanie. Należy więc dostarczać go zawsze z dietą. A z kolei źródłem kwasu arachidonowego w największym stopniu jest mięso. (*ibidem*)

4.3 Żelazo

Głównym źródłem żelaza z pożywienia (tzw. żelazo w postaci nieorganicznej, niehemowej) są produkty mięsne, mączki mięsne i kostne, ale także produkty węglowodanowe, jak np. ziarna zbóż. Częstym komponentem bezmięsnych diet dla psów jest soja. Uważa się, że może mieć ona negatywne działanie na absorpcję żelaza z organizmu. Niedobór żelaza u zwierząt, podobnie jak u ludzi, prowadzi do niedokrwistości. Jej objawami są często: osłabienie organizmu, apatia, biegunki itd. Żelazo w organizmie zwierząt obecne jest również w formie ferrytyny i hemosyderyny, toteż u psów żywionych dietą wegetariańską zaleca się badanie ich stężeń w organizmie (*ibidem*).

4.4 Witaminy

Witamina A

Witamina A jest rozpuszczalna w tłuszczach. Jej najbogatszym źródłem są tkanki roślinne, jednak można ją również dostarczać z roślin. Występują wtedy w formie roślinnych β -karotenów. Aby móc wykorzystać ich właściwości, należy syntezować ten β -karoten w aktywną formę witaminy A - retinol. Wśród psów istnieje taki organizm, jednakże nie posiadają go koty. Mogą one jedynie wchłaniać β -karoten w jelitach, co nie jest równie jego syntezy w aktywną formę witaminy A. Skutki niedoboru witaminy A w organizmie zwierząt mogą powodować różnorakie problemy z narządem wzroku, oddychaniem czy procesami rozrodczymi (Kurosad i Kungi 2013; Jank i Wilczak 2013).

Niacyna (witamina B3)

Psy posiadają mechanizm syntezowania niacyny z tryptofanu, co pomaga łagodzić objawy niedoboru tej witaminy, jednakże nie pokryją dziennego zapotrzebowania na ten składnik. Natomiast koty nie posiadają takiego mechanizmu, dlatego w przypadku kotów określa się wymagane zapotrzebowanie na witaminę B3 (witamina PP), dostarczane w diecie. W skrajnych przypadkach niedobór tejże witaminy może prowadzić nawet do śmierci. Bardziej powszechne objawy to np.: zapalenia skóry, biegunki, spadek apetytu, pelagra, problemy z układem nerwowym i rdzeniem kręgowym i inne. Źródłami niacyny są produkty pochodzenia zwierzęcego, ryby oraz produkty roślinne takie jak np. drożdże, zboża czy rośliny strączkowe. Jednakże biodostępność niacyny w produktach roślinnych jest stosunkowo niska. Więc z racji, że koty muszą otrzymywać niacynę z pożywienia (ponieważ nie są w stanie syntezować jej z tryptofanu jak psy), niewskazane jest karmienie kotów dietą roślinną. Jednakże należy zaznaczyć, że niedobór witaminy B3 nie należy do często występujących (Kurosad, i Kungi 2013).

Kwas foliowy (witamina B9)

Kwas foliowy wspiera proces rozwoju i rozmnażania komórek w organizmie zwierząt. Bierze udział w syntezie różnych substancji. Ma znaczenie przy wspieraniu działania neuroprzekaźników. Jest obecny przy wchłanianiu żelaza. Jego głównym źródłem są tkanki zwierzęce

(np. wątroba), ale może być dostarczany także z niektórymi warzywami. Obróbka termiczna może obniżyć jego biodostępność, dlatego należy zwracać na to uwagę przy sporządzaniu receptur dawek pokarmowych. Witamina B9 musi być codziennie dostarczana w diecie, gdyż nie jest magazynowany w organizmie psów i kotów. Niedobory kwasu foliowego mogą prowadzić do niedokrwistości, zaburzeń apetytu, ogólne osłabienie odporności organizmu (*ibidem*).

Kobalamina (witamina B12)

Kobalamina jest istotna dla procesów metabolicznych w organizmie. Bierze udział w syntezie metioniny. Dodatkowo jest ściśle powiązana z kwasem foliowym (witamina B9). Niedobór kobalaminy również może powodować m.in. niedokrwistość megaloblastyczną. Jednakże niedobór witaminy B12 jest rzadko spotykany. Narażone są na niego głównie zwierzęta na dietach bezmięsnych, ponieważ pokarmy roślinne są ubogie w kobalaminę (*ibidem*).

5. Możliwe następstwa diet bezmięsnych

Źle zbilansowana dieta roślinna prowadzi do wielu problemów zdrowotnych. Najczęstszym wyzwaniem takich diet jest zbilansowanie wartości wielu wyżej wymienionych substancji w organizmie kota. Jak nadmieniono wyżej, jego organizm zawiera o wiele mniej mechanizmów fizjologicznych, pozwalających pokryć zapotrzebowanie na wszystkie wymagane składniki pokarmowe. U kota dieta roślinna jest niebezpieczna i niezalecana. Może prowadzić m.in. do: zaburzeń rozrodu, obniżenia odporności, nadmiernego złuszczenia skóry, centralnego zwyrodnienia siatkówki, hiperamonemii, zaćmy, kardiomiopatii rozstrzeniowej (wtórna kardiomiopatia żywieniowa), a w wyniku następstw tych chorób - do śmierci. (Kurosad i Kungi 2013; Sapieryński 2013).

U psów istnieje więcej możliwości wprowadzenia diet z większą ilością roślin, a mniejszą ilością mięsa. Jednak nieprawidłowe skomponowanie dawki żywieniowej tego typu również obarczone jest ryzykiem problemów zdrowotnych. Są to m.in. zaburzenia rozrodu, pogorszenie jakości skóry i włosa, choroby skóry, wspomniana wcześniej, zmętnienie soczewki oka, hiperamonemia oraz kardiomiopatia. DCM nie jest to częstym zjawiskiem u psów. A przynajmniej nie z powodu czynnika żywieniowego. Najczęściej do tego schorzenia przyczyniają się głównie czynniki genetyczne, chociaż dieta również ma w tym przypadku znaczenie (Kurosad i Kungi 2013; Kurosad 2013; Jank i Wilczak 2013).

6. Diety roślinne lub o wysokiej zawartości węglowodanów w leczeniu niektórych schorzeń

W niektórych przypadkach chorobowych, po konsultacji z lekarzem weterynarii, wprowadzenie diety roślinnej może mieć pozytywne efekty zdrowotne. Do takich schorzeń u psów należą: kamice dróg moczowych, choroby wątroby (krążenie wrotno-oboczne, encefalopatia wątrobową), alergie pokarmowe, niektóre enteropatie (Kurosad i Kungi 2013; Jank i Wilczak 2013). W określonych przypadkach zaburzeń behawioralnych stosowanie diety o niskiej zawartości białka oraz wysokiej zawartości węglowodanów może przynieść pozytywne skutki obok terapii behawioralnej. Przykładem są niektóre rodzaje fobii dźwiękowych u psów (Levine 2016),

Z kolei u kotów niezalecane jest wprowadzanie diety w całości roślinnej. Jedynie można wskazać schorzenia, gdzie korzystne może być zwiększenie ilości przyjmowanych pokarmów roślinnych. A są to m.in.: cukrzyca, choroby jelita grubego, hiperlipidemia czy koty po kastracji, otyłe lub z nadwagą w celu zwiększenia poczucia sytości. W wymienionych przypadkach udział włókna powinien maksymalnie wynosić ok 15%, jednakże każdy przypadek powinien być osobno rozpatrzony przez lekarza weterynarii (Kurosad 2013).

7. Podsumowanie i wnioski

Przystosowania do diety psów i kotów bardzo różnią się między sobą. Pies ma zdecydowanie mechanizmów adaptacyjnych do diety z dużą ilością roślin i pod pewnymi względami jest możliwe wprowadzenie u niego diety wegetariańskiej, np w odmianie semiwegetarianizmu oraz stosując

różnego rodzaju dodatki żywieniowe, w tym suplementy. Natomiast stosowanie tego typu modelu żywienia u kotów jest niemożliwe. Niekonwencjonalne diety powinny być wprowadzone za zgodą lekarza weterynarii i pod jego kontrolą. Należy zbilansować wiele wymienionych w tej pracy składników pokarmowych i innych elementów zdrowej diety. W celu kontrolowania stanu zdrowia warto regularnie badać swoje zwierzę pod kątem m.in. poziomu żelaza, ferrytyny, hemosyderyny, witaminy A, tauryny, kwasy arachidonowego i sodu (Kurosad i Kungi 2013; Kurosad 2013; Jank i Wilczak 2013).

8. Literatura

- Burger IH (1994) Energy needs of companion animals: Matching food intakes to requirements throughout the life cycle. *The Journal of Nutrition*; Volume 124, Supplement 12: 2584S-2593S. [za:] Ceregerzyn M., Lechowski R., Barszczewska B. (red.) (2013). Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław
- Burger IH, Barnett KC (1982) The taurine requirement of the adult cat. *Small Animals Practice*, 23: 533-537 [za:] Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) (2013). Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław
- Cader P, Lesiów T (2021) Weganizm i wegetarianizm jako diety we współczesnym społeczeństwie konsumpcyjnym. *Nauki Inżynierskie i Technologie, Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu*, nr 37: 9-33 DOI:10.15611/nit.2021.37.01
- Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) (2013). Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław
- Chandler M (2016) Importance of fibre in diet. *Veterinary Times*, 46(35), 10-12. [za:] <https://karolinaholda.com/wloknopokarmowe-w-diecie-psa/#rozpuszczalne>
- Dodd SAS, Cave NJ, Adolphe JL, Shoveller AK, Verbrugghe A (2022) Plant-based (vegan) diets for pets: A survey of pet owner attitudes and feeding practices. *PLOS ONE* 17(5): e0268982
- Freedman AH, Gronau I, Schweizer RM et al. (2014) Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLOS Genetics* 10(8): e1004631. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004631>
- Guidi D (2021) Żywnienie i dietetyka psów i kotów. Przewodnik dla lekarza weterynarii. Edra Urban & Partners, Wrocław
- Jank M (2013) Podstawy fizjologii żywienia [w:] Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław: 7-36
- Jank M, Wilczak J (2013) Metody karmienia psów i kotów [w:] Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław: 269-292
- Krysiak K, Świeżyński K (2012) Anatomia zwierząt. Narządy wewnętrzne i układ krążenia. Tom 2. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Kurosad A (2013) Żywnienie kotów [w:] Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław: 241-268
- Kurosad A, Kungi K (2013) Składniki pokarmowe [w:] Ceregerzyn M, Lechowski R, Barszczewska B (red.) Podstawy żywienia psów i kotów. Podręcznik dla lekarzy i studentów weterynarii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław: 37-158
- Levine ED (2016) Fobie dźwiękowe [za:] Horwitz DF, Mills DS (red.) Medycyna behawioralna psów i kotów. Wydawnictwo Galaktyka. Łódź: 171-180
- Li Xia, Li Weihua, Wang H et al. (2005) Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar. *PLoS Genet* 1(1):e3. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010003>
- Sapierzynski R, (2013) Kardiomiopatie pierwotne u psów i kotów. *Życie Weterynaryjne* 88(12): 1023-1028

2. Pogłowie wybranych ras psów owczarskich w Polsce w latach 2012-2022

The population of selected breeds of herding dogs in 2012-2023

Alicja Wardak

Uniwersytet w Siedlcach, Wydział Nauk Rolniczych, Instytut Zootechniki i Rybactwa, Studenckie Koło Naukowe Sympatyków Zwierząt

Opiekun naukowy: dr Agata Danielewicz

Alicja Wardak: aw85720@stud.uws.edu.pl

Słowa kluczowe: Polski Owczarek Podhalański, Border Collie, Polski Owczarek Nizinny, Owczarek Belgijski – Malinois

Streszczenie

Najbardziej popularnym podziałem ras psów ze względu na ich filogenetykę oraz użyteczność jest ten zaproponowany przez Międzynarodową Federację Kynologiczną FCI (*Fédération Cynologique Internationale*). Wyróżnia ona 10 grup ras psów.

W skład I Grupy FCI, nazwanej: *“Owczarki i inne psy pasterskie, z wyłączeniem szwajcarskich psów do bydła”*, wchodzi ponad 50 różnych ras psów (dokładnie jest ich 55). Grupę I można podzielić na dwie sekcje. Pierwsza z nich to owczarki. I to właśnie psy z tej sekcji będą przedmiotem niniejszej pracy. Drugą sekcję stanowią *“Psy pasterskie, z wyłączeniem szwajcarskich psów do bydła”*.

W naszym kraju największą organizacją należącą do FCI jest Związek Kynologiczny w Polsce (ZKwP). Ma on ogromną rolę w popularyzowaniu wzorów rasowych określonych przez FCI (o czym świadczy chociażby przetłumaczenie tych wymogów na język polski czy organizowanie wystaw psów rasowych zgodnie z w/w wzorcami). ZKwP prowadzi również statystyki, które pozwalają określić liczebność poszczególnych ras psów w Polsce.

Niniejsza praca ma na celu analizę pogłowia wybranych ras psów pasterskich w Polsce w minionych latach oraz ukazanie różnych głosów w dyskusji na temat hodowli tych zwierząt.

1. Wstęp

Grupa 1 FCI, tj. *“Owczarki i inne psy pasterskie, z wyłączeniem szwajcarskich psów do bydła”*, jest niezwykle zróżnicowanym zbiorem ras psów pasterskich. Można tu znaleźć psy zarówno o stosunkowo niskiej wysokości w kłębie (jak np. u rasy Welsh Corgi Cardigan - ok. 30 cm), jak i o większych rozmiarach (np. Polski Owczarek Podhalański - ok. 65 cm). Są owczarki o długiej, gęstej i lśniącej okrywie włosowej (jak np. Owczarek szkocki długowłosy), jak również takie o krótkiej sierści (np. jak np. u Owczarka Belgijskiego - Malinois), czy nawet o szorstkiej sierści, zwijającej się w sznury (np. Owczarek Węgierski Puli).

Tak ogromne zróżnicowanie wśród ras tej grupy wynika z różnych rodzajów użyteczności psa pasterskiego. Można wyróżnić dwa główne rodzaje pierwotnej użyteczności owczarków: 1) obronna - stróża stada, jak np. Polski Owczarek Podhalański; 2) zaganiająca - pilnowanie, by zwierzęta nie oddalały się z pastwiska, jak np. Polski Owczarek Nizinny (Monkiewicz i Wajdzik 2003). Obecnie psy pasterskie są niemal wszechstronnie użytkowane. Wiele z nich już we wzorcu rasowym ma uszczegółowioną charakterystykę użytkowania, jak np. Wilczak Czechosłowacki, gdzie określono go jako psa służbowego, czy Owczarek Sztetlandzki, kwalifikowany jako pies zarówno pasterski, jak i do towarzysstwa.

2. Materiał i metody

Celem pracy było określenie zmian w populacjach zarówno poszczególnych ras psów owczarskich (Polski Owczarek Podhalański, Border Collie, Polski Owczarek Nizinny oraz Owczarek Belgijski - Malinois), jak i w ogólnej populacji psów pasterskich (grupa 1 FCI). Porównano różnice w ogólnej liczebności osobników w danej grupie (bądź rasie) oraz strukturę pogłowia (ilość samców

i samic), jak i liczbę nowonarodzonych szczeniąt na przestrzeni 11 lat. Metodą zastosowaną w badaniu była analiza porównawcza danych zgromadzonych przez Związek Kynologiczny w Polsce, ujętych w sprawozdaniach hodowlanych za lata 2012-2022. Przeprowadzoną analizę obrazują sporządzone na potrzeby niniejszej pracy wykresy oraz tabele.

3. Wyniki

Według statystyk prowadzonych przez Związek Kynologiczny w Polsce, liczebność Grupy 1 w FCI wynosiła w Polsce w 2018 roku 13 010 osobników, w 2019 r. - 13 794 osobników, w 2020 r. - 14 740 osobników, w 2021 r. - 17 156 osobników, a w 2022 r. - 18 310 osobników (Tab.1). Na drodze analizy ustalono, że liczebność populacji owczarków w Polsce w ciągu ostatnich lat zwiększa się. Jednakże w porównaniu do osobników wszystkich innych grup FCI, udział procentowy Grupy 1 w ogólnej liczebności wszystkich zarejestrowanych rasowych psów w Polsce pozostaje niemal na równym poziomie, wynoszącym ok. 17-18% (Tab.1).

Tab. 1. Liczebność i stosunek procentowy psów ras Grupy 1 FCI w stosunku do do reszty grup FCI oraz całości populacji psów rasowych zarejestrowanych w ZKwP w latach 2018-2022.

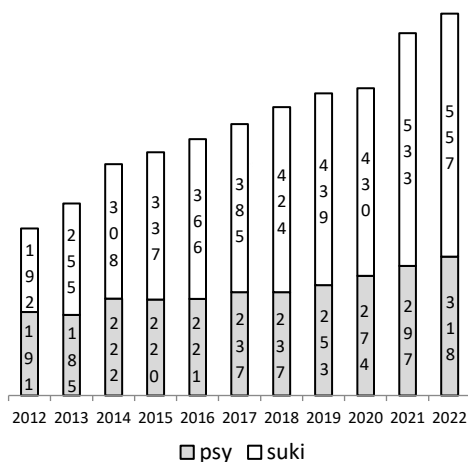
Rok	Osobniki ogółem, w tym:	
	Grupa I FCI	Reszta Grup FCI
2018	75 556	
	13 010	13 010
	17,20%	82,20%
2019	76 373	
	13 794	62 579
	18,10%	81,90%
2020	83 043	
	14740	68303
	17,70%	82,30%
2021	95 776	
	17156	78620
	17,90%	82,10%
2022	102 683	
	18310	84373
	17,80%	82,20%

Polski Owczarek Podhalański (wzorzec FCI nr 252) jest psem dużych rozmiarów. Jego użytecznością jest bycie psem pasterzem-stróżem stada. Jest “wizytówką” polskich gór.

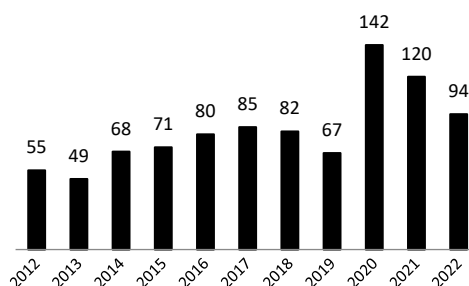
Na Rys.1-3 przedstawiono liczebności osobników tej rasy na przestrzeni minionej dekady. Na wykresie (Rys.1) zobrazowano zmianę w proporcjach ilości samców do samic wraz z upływem czasu: w 2012 roku odnotowano niemal tyle samo osobników męskich i żeńskich, a w 2022 roku zaobserwowano zdecydowaną przewagę ilości suk. Na kolejnym wykresie (Rys.2) porównano liczbę miotów tej rasy. Zauważono tendencję wzrostową w ilości miotów, jednak w 2019 roku odnotowano obniżenie tej liczby, a w roku następnym (2020 r.) następuje nagłe zwiększenie liczby miotów. Dane te są zgodne z następnym wykresem (Rys.3) obrazującym liczbę zarejestrowanych szczeniąt z podziałem na płeć noworodków. Zaobserwowano początkowy wzrost liczebności szczeniąt od 2012 do 2018 roku, następnie regres w latach 2018 i 2019, po czym gwałtowny wzrost tejże liczebności.

Ostatecznie w roku 2022 zaobserwowano niemal dwukrotne zwiększenie liczby szczeniąt w porównaniu do roku 2012.

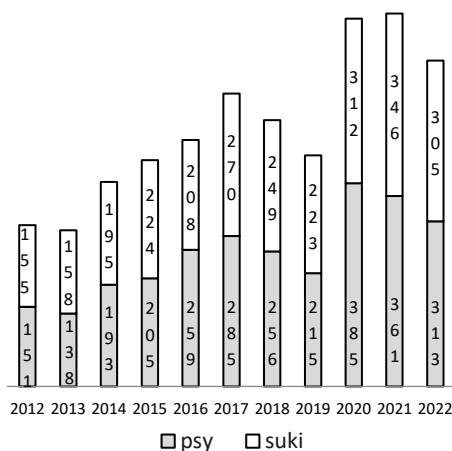
Border Collie (wzorzec FCI nr 297) jest bardzo popularnym psem pasterskim. Jego pierwotną użytkowością jest zaganianie owiec. Rasa ta wyróżnia się wysoką inteligencją użytkową (Coren 1997). Border Collie jest popularnym psem na wielu zawodach sportowych, jak np. zaganianie zwierząt na czas czy agility. Coren opisuje też specyficzny sposób zaganiania stada owiec przez tę rasę, porównując ten cykl łowiecki do polowania watahy wilków. Twierdzi on, że jeden owczarek Border Collie jest w stanie samodzielnie wypełnić rolę kilku psów pasterskich jednocześnie, powtarzając charakterystyczną sekwencję łowiecką (*ibidem*).



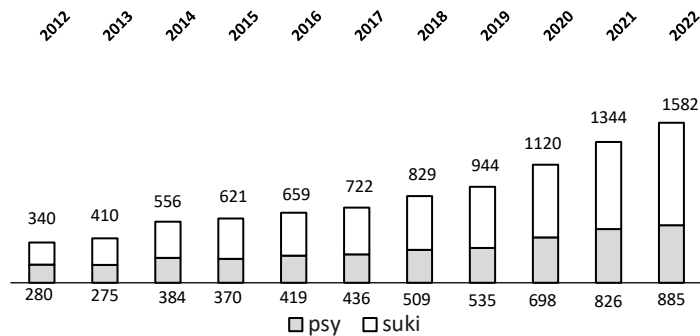
Rys.1. Rozkład płciowy w populacji rasy Polski Owczarek Podhalański w latach 2012-2022.



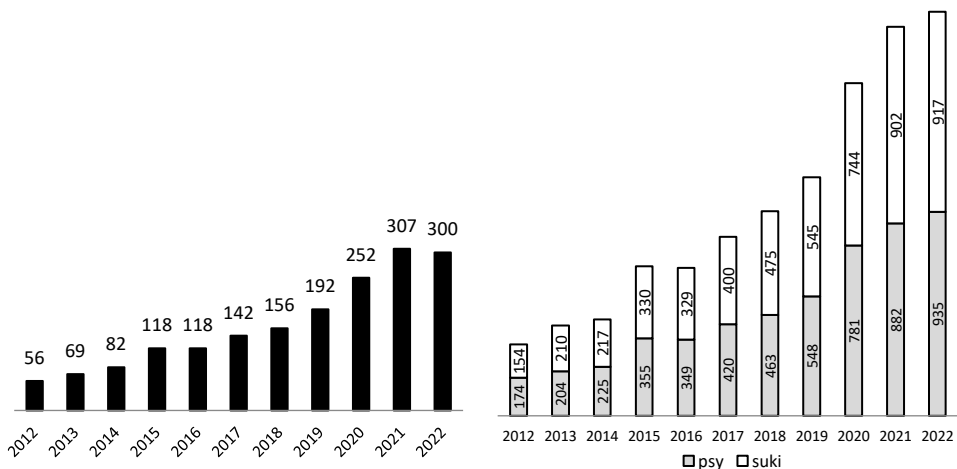
Rys.2. Ilość miotów rasy Polski Owczarek Podhalański w latach 2012-2022.



Rys.3. Rozkład płciowy urodzonych szczeniąt rasy Polski Owczarek Podhalański w latach 2012-2022.



Rys.4. Rozkład płciowy w populacji rasy Border Collie w latach 2012-2022.



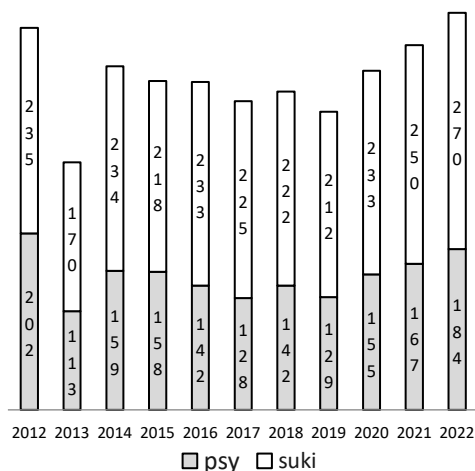
Rys.5. Ilość miotów rasy Border Collie w latach 2012-2022.

Rys.6. Rozkład płciowy urodzonych szczeniąt rasy Border Collie w latach 2012-2022.

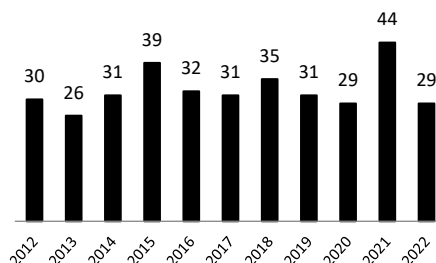
Na przestrzeni lat 2012 - 2022 odnotowano stopniowy i konsekwentny wzrost liczebności osobników rasy Border Collie w Polsce (Rys.4-6). Podczas gdy ogólna liczba osobników tej rasy wzrosła niemal czterokrotnie w latach 2012-2022, tak liczby miotów i szczeniąt wzrosły ponad pięciokrotnie (Rys.5-6). W efekcie w 2012 roku zarejestrowanych było w sumie 620 osobników (280 psów i 340 samic), a 11 lat później odnotowano aż 2467 osobników (w tym 885 samców i 1582 samic). Na wykresie (Rys.6) zobrazowano rozkład płciowy szczeniąt urodzonych w danych latach. W porównaniu z podobnym rozkładem osobników dorosłych (Rys.4), proporcje między psami a sukami w pokoleniu szczeniąt są bardziej równomierne.

Polski Owczarek Nizinny (wzorzec FCI nr 251) użytkowo zakwalifikowany jest zarówno jako pies pasterski, jak i stróżujący. Rasa ta osiąga średnią wysokość w kłębie (ok. 42 cm), a jej gęsta i zmierzwiona okrywa włosowa nadaje charakterystycznego wyglądu. Dziś psy tej rasy spełniają również funkcję psów do towarzystwa.

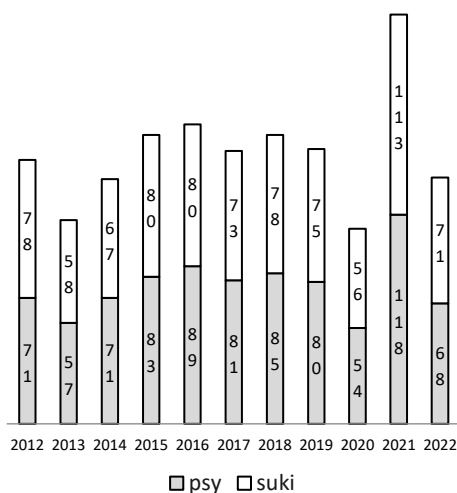
Na wykresach obrazujących strukturę pogłowia Polskiego Owczarka Nizinnego (Rys.7-9) odnotowano względnie stałą liczebność tejże rasy. Ukazano również wyrównane proporcje między osobnikami męskimi i żeńskimi (Rys.7). Na wykresie obrazującym ilość miotów w danych latach (Rys.8) również pokazano względnie stałą wartość. Wyjątkiem jest rok w 2021, w którym to liczba miotów osiąga wyraźnie wyższy wynik niż w pozostałych latach (liczba miotów w 2021 roku - 44). Jest to w spójności z liczbą urodzonych szczeniąt (Rys.9) w tym roku. Urodziło się najwięcej osobników w przedziale lat 2012-2022. Było ich dokładnie 231 szczeniąt z czego 118 to psy, a 113 – suki. Na wykresie tym zobrazowano również wyrównaną strukturę populacji szczeniąt rasy pod względem ilości samców do samic.



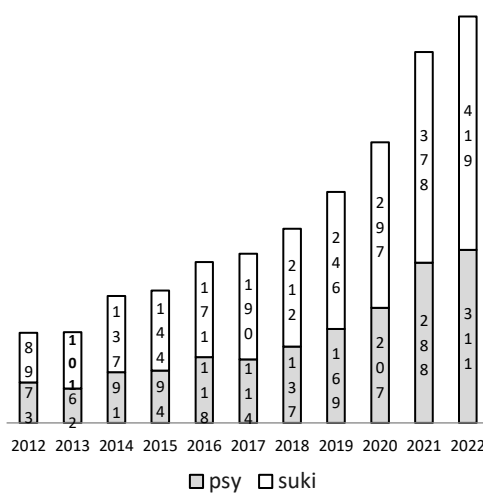
Rys.7. Rozkład płciowy w populacji rasy Polski Owczarek Nizinny w latach 2012-2022.



Rys.8. Ilość miotów rasy Polski Owczarek Nizinny w latach 2012-2022.



Rys.9. Rozkład płciowy urodzonych szczeniąt rasy Polski Owczarek Nizinny w latach 2012-2022.



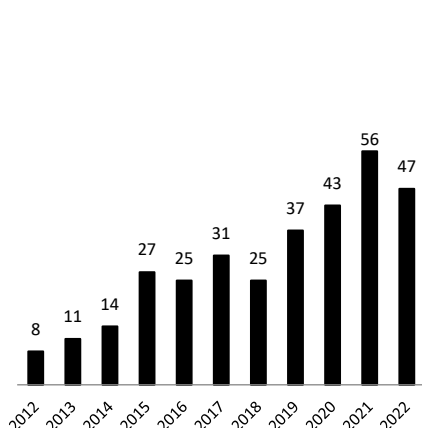
Rys.10. Rozkład płciowy w populacji rasy Owczarek Belgijski – Malinois w latach 2012-2022.

Owczarek Belgijski - Malinois (wzorzec FCI nr 15) jest rasą początkowo wykorzystywaną jako pasterska, jednakże teraz uznawany jest za psa o wszechstronnej użyteczności - jako obrońca, stróż, pies policyjny (tropiciel) a nawet pies rodzinny. W związku z niezwykle ciekawą i skomplikowaną historią tej rasy, wyróżnia się jej kilka odmian: Malinois, Groenendael, Laekenois, Tervueren. Na potrzeby tejże pracy do analizy został wybrany Owczarek Belgijski - Malinois.

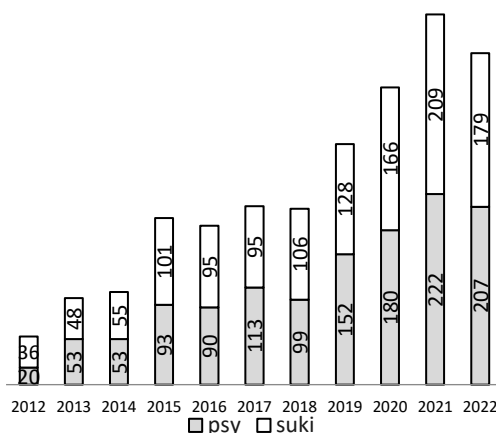
Sylwetka tego psa powinna mieć harmonijną budowę i zamykać się w obrębie kwadratu. Wysokość w kłębie powinna osiągać ok. 60 cm. Ta odmiana rasy charakteryzuje się krótką sierścią.

W analizie pogłowia tejże rasy (Rys.10-12) wykazano tendencję wzrostową w liczebności populacji. Jednakże to, co wyróżnia wykres liczebności Owczarka Belgijskiego na przestrzeni lat 2012-2022 (Rys.10) od wykresów psów innych ras (Rys.1; Rys.4), to relatywnie wyrównana struktura

pogłowia pod względem liczebności psów do suk. Podczas analizy liczby miotów (Rys.11) również zauważono ogólną tendencję wzrostową. Podobnie jak u Polskiego Owczarka Nizinnego, w roku 2021 odnotowano definitywnie większą ilość miotów niż innych latach. Odnotowano wówczas aż 56 miotów. Na wykresie ukazującym liczbę urodzonych szczeniąt na przestrzeni lat (Rys.12) również zobrazowano największą osiągniętą wartość w roku 2021 - wtedy urodziło się aż 431 szczeniąt, z czego 222 to psy, a 209 to suki.



Rys.11. Ilość miotów rasy Owczarek Belgijski - Malinois w latach 2012-2022.

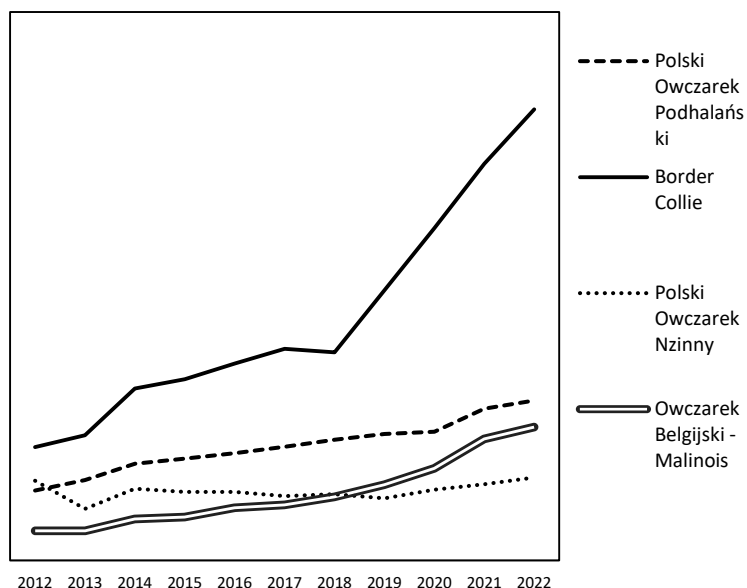


Rys.12. Rozkład płciowy urodzonych szczeniąt rasy Owczarek Belgijski - Malinois w latach 2012-2022.

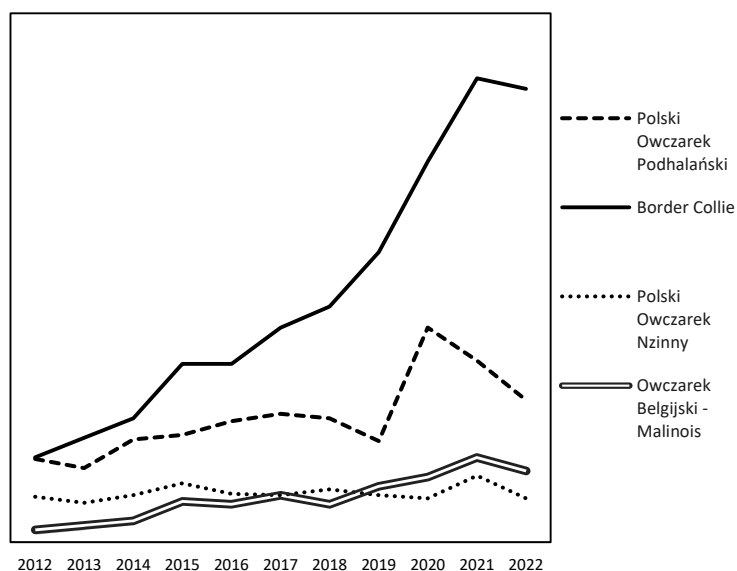
4. Dyskusja

W celu porównania liczebności wyżej opisanych ras i struktury ich pogłowia, przygotowano ogólne zestawienie analizowanych danych. Obliczono, że liczebność osobników poszczególnych rasach wzrastała kolejno: Polski Owczarek Podhalański - ponad dwukrotnie ($\approx 2,28$), Border Collie - prawie czterokrotnie ($\approx 3,98$), Polski Owczarek Nizinny - tutaj liczebność osobników w rasie była niemal jednakowa w ciągu tych 10 lat (2012 r. - 437 osobników; 2022 r. - 454 osobników), Owczarek Belgijski - Malinois – wzrost czterokrotny ($\approx 4,51$). Powyższe obliczenia oraz liczebność osobników w poszczególnych rasach zobrazowano na wykresie (Rys.13). Wykazano, że ogólne populacje w analizowanych rasach cechuje tendencja wzrostowa. Największy wzrost w liczebności osobników w latach 2012-2022 odnotowano w rasie Border Collie. Od roku 2018 liczebność rasy gwałtownie wzrasta (średnio o ok. 300-400 osobników na rok). Średni roczny przyrost osobników rasy Border Collie jest niemal równy całości populacji rasy Polski Owczarek Nizinny w 2022 roku (454 osobniki). Zauważono również wzrost liczebności rasy Polski Owczarek Podhalański w latach 2019-2020, a w dwóch kolejnych latach (2020-2022) - nieznaczny spadek. Odnotowano także wzrost liczebności w rasie Owczarek Belgijski-Malinois. Jego ogólny przyrost na przestrzeni tych 11 lat był stosunkowo największy. Jednakże krzywa wzrostu liczebności tej rasy nie jest tak zróżnicowana, jak w przypadku owczarka Border Collie, gdzie już początkowa ilość osobników (w 2012 roku) była o wiele większa. Na Rys.14 umieszczono porównanie liczby miotów u poszczególnych ras psów. Co ciekawe, można zauważyć podobną liczbę miotów w 2012 roku w rasie Polski Owczarek Podhalański i Border Collie, jednakże w ciągu tych 11 lat już bardzo mocno zróżnicowała się liczba miotów w tych samych rasach. W rasie Border Collie odnotowano w 2022 roku aż 300 miotów (co nie jest najwyższym wynikiem w liczbie miotów tej rasy - osiągnięto go w 2021 roku, gdy zarejestrowano 307 miotów), podczas gdy u Polskiego Owczarka Podhalańskiego odnotowano w 2022 roku 94 mioty (najwyższy wynik w 2020 roku - 142 mioty). Zgodnie z uprzednimi danymi, odnotowano również stosunkowo duży wzrost liczebności miotów w rasie Owczarek Belgijski - Malinois. Natomiast w rasie Polski Owczarek Nizinny w 2022 roku, stanowiącym ostatni rok niniejszej analizy, zanotowano 29 mioty, co stanowi niższą wartość niż liczba miotów w pierwszym roku badania. Jest to jedyny taki przypadek

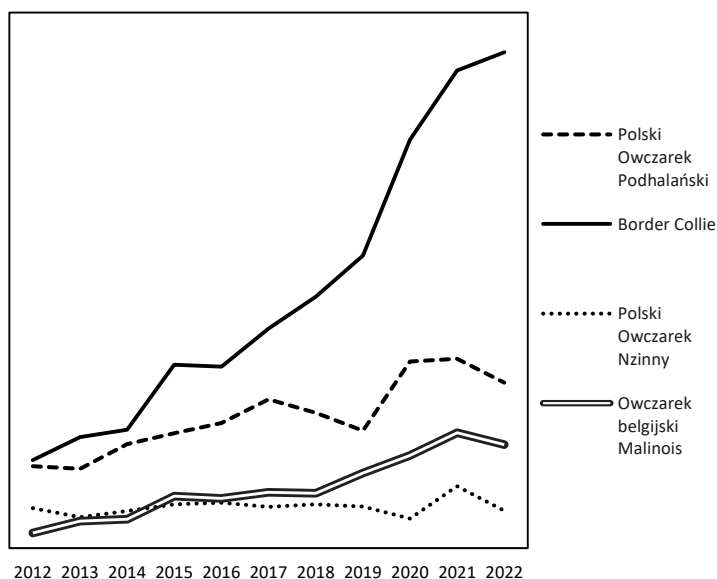
w porównywanych rasach. Należy nadmienić, że nie oznacza to tendencji spadkowej w liczbie miotów tej rasy. Jak wykazano na wykresie (Rys.14) jest to raczej wyrównana wartość przez ostatnie 11 lat. Następne zestawienie (Rys.15) obrazuje ilość urodzonych szceniąt danej rasy w latach 2012-2022. Dane w niej przedstawione są spójne z poprzednimi wykresami. Potwierdzono następujące tezy: stabilności w liczebności rasy Polski Owczarek Nizinny, ponadprzeciętny przyrost osobników rasy Border Collie, umiarkowany wzrost liczebności szceniąt rasy Owczarek Belgijski-Malinois oraz stopniowo wzrastającą liczbę szceniąt rasy Polski Owczarek Podhalański z zastrzeżeniem, że w latach 2018-2019 odnotowano spadek liczny urodzonych szceniąt.



Rys.13. Łączne zestawienie liczebności ras Polski Owczarek Podhalański, Border Collie, Polski Owczarek Nizinny oraz Owczarek Belgijski – Malinois w Polsce w latach 2012-2022.



Rys.14. Łączne zestawienie ilości miotów w rasach: Polski Owczarek Podhalański, Border Collie, Polski Owczarek Nizinny oraz Owczarek Belgijski – Malinois w Polsce w latach 2012-2022.



Rys.15. Łączne zestawienie liczby szceniąt urodzonych w rasach: Polski Owczarek Podhalański, Border Collie, Polski Owczarek Nizinny oraz Owczarek Belgijski – Malinois w Polsce w latach 2012-2022.

5. Wnioski

Szczegółowa analiza danych zebranych w sprawozdaniach hodowlanych Związku Kynologicznego w Polsce wykazała duże zróżnicowanie struktury pogłowia poszczególnych ras psów pasterskich. W ciągu minionych 11 lat odnotowano ogólny przyrost osobników należących do Grupy I FCI. Jednakże nieustannie stanowią one około 18% ogólnej liczby wszystkich psów FCI w Polsce. W 2022 roku Grupa I FCI w Polsce stanowiła niemal największą spośród wszystkich grup FCI (było ich 18 310 osobników). Przewyższała ją liczebnością jedynie Grupa IX -"Psy ozdobne i do towarzystwa" (wówczas 20 205 osobników).

Wykazano znaczne różnice w wielkości przyrostu poszczególnych ras psów. Wśród porównywanych w niniejszej pracy ras psów największy wzrost liczebności zarówno osobników męskich, żeńskich (ogółem), liczby miotów i liczby urodzonych i zarejestrowanych szceniąt odnotowano w rasie Border Collie. Z kolei najbardziej jednorodny przyrost wykazano w rasie Polski Owczarek Nizinny.

Na zróżnicowanie w strukturach pogłowia poszczególnych ras Grupy I FCI może mieć wpływ fakt, że psy owczarskie nie są już użytkowane tylko jako psy pasterskie zaganiające. Użytkuje się je także w wielu innych kierunkach, jako np. psy sportowe (Border Collie w agility czy Sheepdog Trials), psy służbowe (Owczarek Belgijski- Malinois w K9, ale także i GPR; Owczarek Niemiecki jako przykład innej rasy psa służbowego), psy stróżujące (Owczarek Niemiecki krótko- i długowłose – kolejne z zastosowań teje rasy) czy po prostu psy do towarzystwa (jak np. Welsh Corgi Cardigan czy Welsh Corgi Pembroke).

6. Literatura

- Coren S (1997) Inteligencja psów, tłum. Gasparska G, Wydawnictwo Książka i Wiedza, Warszawa.
 Monkiewicz J, Wajdzik J (2003) Kynologia. Wiedza o psie. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław.
 Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2012.
 Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2013.

Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2014.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2015.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2016.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2017.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2018.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2019.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2020.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2021.
Związek Kynologiczny w Polsce. Sprawozdanie hodowlane za rok 2022.
Związek Kynologiczny w Polsce. Wzorzec rasowy FCI nr 15 (Owczarek Belgijski - Malinois).
Związek Kynologiczny w Polsce. Wzorzec rasowy FCI nr 251 (Polski Owczarek Nizinny).
Związek Kynologiczny w Polsce. Wzorzec rasowy FCI nr 252 (Polski Owczarek Podhalański).
Związek Kynologiczny w Polsce. Wzorzec rasowy FCI nr 297 (Border Collie).
<https://www.zkwp.pl/index.php>

3. Trening klikerowy kury

Clicker training of hens

Barbara Rytel

Uniwersytet w Siedlcach, Wydział Nauk Rolniczych, Studenckie Koło Naukowe Sympatyków Zwierząt

Opiekun naukowy: dr inż. Agata Danielewicz

Barbara Rytel: br83640@stud.uws.edu.pl

Słowa kluczowe: szkolenie, drób, pozytywne wzmocnienie

Streszczenie

Coraz większa liczba właścicieli zwierząt interesuje się treningiem swoich podopiecznych. Istnieją różne metody treningowe ale za najbardziej efektywną uważane jest pozytywne wzmocnienie. Do tego rodzaju treningu zalicza się trening klikerowy. Dzięki temu rodzajowi treningu można osiągnąć wiele pozytywnych efektów, np. wzmocnienie więzi opiekun-zwierzę, łagodzenie stresu zwierzęcia oraz wzmocnienie układu neurologicznego zwierzęcia. Aby trening klikerowy był efektywny, podczas każdego kliknięcia musi pojawić się nagroda, najlepiej w postaci jedzenia.

Trening klikerowy kury został przeprowadzony, aby ocenić szybkość nauki komendy przez kury w dwóch grupach wiekowych. Po przeanalizowaniu wyników można stwierdzić, że starsze kury uczą się znacznie szybciej, niż młodsze. Natomiast w grupie młodszych kur zaobserwowano mniejszą motywację pokarmową. Porównując wyniki badań własnych z innymi autorami prowadzącymi analizę sposobu i czasu nauki jałówek stwierdzono, że kury potrzebują większej ilości powtórzeń, aby nauczyć się nowej komendy. Zestawiając trening kur z treningiem makaków królewskich, wykazano, że kury popełniają znacznie mniej błędów niż małpy.

1. Wstęp

W 2020 r. organizacja WHO stwierdziło, iż choroba wirusowa wywołana przez SARS-CoV-2 stwarza międzynarodowe zagrożenie zdrowia publicznego. Z tego powodu choroba ta osiągnęła status pandemii. Aby ograniczyć rozprzestrzenianie się wirusa wzmocniono środki dystansowania społecznego (Dhama K. I in., 2020). Skutkiem tych działań było zwiększenie liczby godzin spędzanych w domach (2). Podczas badań prowadzonych w 2020r. wykazano, że miesiące kwiecień oraz maj były okresem z najwyższym wskaźnikiem adopcji psów oraz kotów. Do badania wykorzystano Google Trend, czyli ogólnodostępne źródło informacji, z którego można pozyskiwać dane, które umożliwiają analizy zachowań społeczeństwa z zakresu poszukiwania informacji w internecie (Cervellin G. I in., 2017; Carneiro H. 2009; Mavragani A. 2018). Adopcja w tym terminie niosła ze sobą ryzyko nabycia przez pupila lęku separacyjnego. Właściele przez większość dnia przebywali ze swoimi podopiecznymi w jednym miejscu, przez co zwierzęta podążały za człowiekiem oraz otrzymywały od niego uwagę. Takie zachowania prowadzić mogą do powstania lęku separacyjnego u podopiecznego (Flannigan G., 2001). Aby tego uniknąć właściele zwierząt zainteresowali się tematem treningu zwierząt towarzyszących.

Trening psa opiera się na warunkowaniu instrumentalnym, który jest świadomości istnienia powiązania pomiędzy świadomym czynem, a jego skutkami. Charakter konsekwencji wpływa na kolejne wystąpienia (Schroll S., 2019). Wyróżnia się cztery możliwe konsekwencje w treningu opartym na warunkowaniu instrumentalnym (Ziv G., 2017.). Da się wyróżnić wzmocnienia oraz kary- każde z nich dzieli się na pozytywne oraz negatywne. Pozytywne wzmocnienie polega na prezentacji pożądanego bodźca zwierzęciu w postaci nagrody za dobre zachowanie. Negatywne wzmocnienie polega na usunięciu nieprzyjemnego dla zwierzęcia bodźca z jego otoczenia- dzięki temu zmniejsza się presję wywieraną na trenowanym. Pozytywna kara polega na podawaniu zwierzęciu bodźca nieprzyjemnego dla niego jako konsekwencja jego czynów. Kara negatywna polega na zabieraniu zwierzęciu przyjemnego bodźca z jego otoczenia (Schroll S., 2019). Wykazano,

iz metodą szkoleniową, która wykazuje największą skuteczność jest metoda pozytywnego wzmocnienia (Ziv G., 2017).

Pozytywne szkolenie zwierząt wpływa korzystnie na funkcjonowanie człowieka oraz pupila. Wspólne spędzanie czasu na ćwiczeniach wpływa pozytywnie na poprawę oraz zacieśnienie relacji pomiędzy właścicielem, a jego podopiecznym. Motywowanie zwierzęcia do pracy, myślenia jest również wykorzystywane w leczeniu zaburzeń behawioralnych zwierząt domowych (Willson E.K., 2017). Ponadto wzmocnienie pozytywne wpływa korzystnie na układ neurologiczny oraz złagodzenie odczuwania stresu. Ćwiczenia oparte na nagrodzie skutkują liczniejszymi oraz bardziej efektywnymi połączeniami między neuronami w mózgu (Overhaul K.L., 2011). Wiele zwierząt schroniskowych mają problem z wysokim poziomem stresu. Szkolenie z wykorzystaniem wzmocnień pozytywnych pomaga im zredukować ilość kortyzolu we krwi, dzięki interakcjom z ludźmi oraz zwiększeniu poczucia sprawczości (Kogan L., 2017).

Trening klikerowy opiera się na pozytywnym wzmocnieniu, dzięki czemu jest on przyjazny dla dobrostanu zwierzęcia (Cimarelli G., 2020). Proces szkolenia za pomocą treningu przebiega zawsze w ten sam sposób. Zwierzę wykonuje pożądaną zachowanie, trenujący używa klikera wydając z urządzenia tylko jeden sygnał, a następnie pojawia się nagroda. Nagroda po dźwięku klikera powinna pojawiać się za każdym razem, ponieważ rzadsze wzmacnianie wywołuje frustrację u zwierzęcia. Aby uzyskać najszybsze efekty w początkowych fazach treningu zaleca się wzmacnianie żywnością (Fukuzawa M., 2013).

Trening klikerowy kury został przeprowadzony, aby ocenić szybkość nauki komendy przez kury w dwóch grupach wiekowych. Dodatkowo przeanalizowano podobieństwa i różnice pomiędzy efektami szkolenia innych gatunków zwierząt klikerem.

2. Materiał i metody

Badanie zostało przeprowadzone w 2022 roku. W doświadczeniu wzięło udział 8 sztuk kur rasy zielononóżka kuropatwiana. Kurczęta podzielono na dwie grupy ze względu na wiek: 4 sztuki dwutygodniowych kurcząt oraz 4 sztuki czteromiesięcznych kur.

Każda sesja treningowa trwała około 5 minut oraz odbywała się w pomieszczeniu ograniczającym wpływ bodźców ze środowiska zewnętrznego.

Zadaniem zwierzęcia było wykonanie obrotu wokół własnej osi przez jego lewe ramię. Do treningu wykorzystano kliker, który służył do naprowadzania zwierząt na obrany cel badania. Żaden z badanych osobników nie miał wcześniejszego kontaktu z tą metodą szkoleniową. Na początku należało wypracować pozytywne skojarzenie z dźwiękiem klikera. Po każdym markerze dźwiękowym następowało wzmocnienie pozytywne w postaci larwy mącznika młynarka. Larwy pochodziły ze sprawdzonej hodowli owadów karmowych „Hodowla owadów karmowych Imperator”.

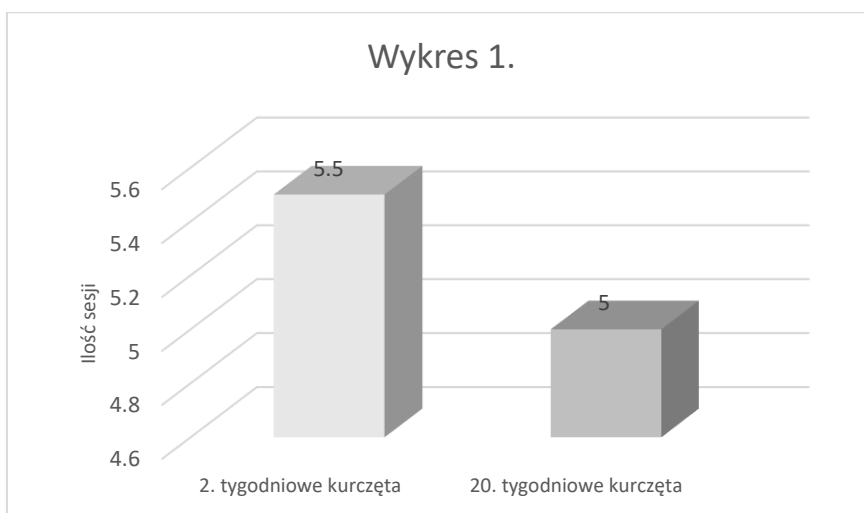
Podczas badania mierzono czas oraz liczbę pozytywnych reakcji kury na trening klikerowy. Uzyskane wyniki porównano pomiędzy grupami oraz przedstawiono w postaci wykresów.

3. Wyniki

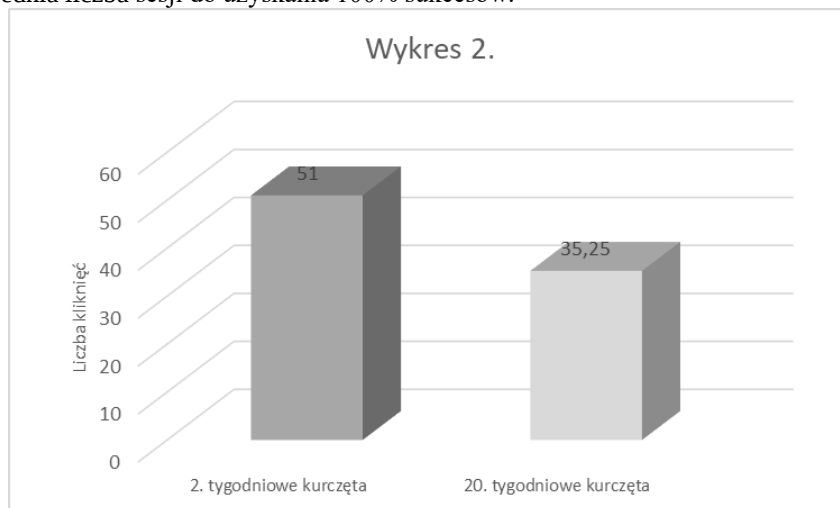
Po przeanalizowaniu Rys.1 można stwierdzić, że 20. tygodniowym kurczętom potrzeba mniej sesji treningowych do wyuczenia nowej komendy. 2. tygodniowym kurczętom zajmuje to średnio 5,5 sesji, za to 20. tygodniowym kurczętom 5 sesji.

Po przeanalizowaniu Rys. 2 można wywnioskować, że 2. Tygodniowe kurczęta potrzebują znacznie większej ilości kliknięć w treningu, aby nauczyć się nowej komendy, niż 20. Tygodniowe kurczęta. Starsze kury potrzebują średnio 35,25 kliknięć, za to młodsze kury potrzebują średnio 51 kliknięć.

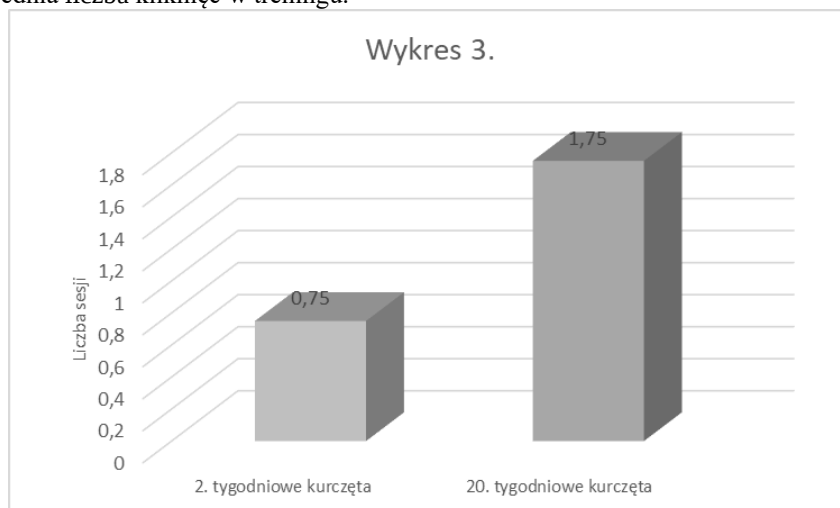
Po przeanalizowaniu Rys. 3 można stwierdzić, że młodsze kurczęta podczas treningu mają mniejszą ilość sesji bez kliknięć, niż starsze kurczęta. 20. Tygodniowe kurczęta podczas treningu mają średnio 1,75 sesji bez kliknięcia, za to 2. Tygodniowe kurczęta mają średnio 0,75 sesji bez kliknięcia.



Rys. 1. Średnia liczba sesji do uzyskania 100% sukcesów.



Rys. 2. Średnia liczba kliknięć w treningu.



Rys. 3. Średnia liczba sesji, podczas których nie wykonano żadnego kliknięcia.

4. Wnioski

Starsze, 20. tygodniowe kury uczą się znacznie szybciej niż 2. tygodniowe kurczęta. Jest to przeciwny wniosek do badania nad szybkością nauki psów. Podczas badania sprawdzano, czy rodzaj żywienia wpływa na szybkość uczenia się. Badanie rozróżniono na wiek. We wnioskach wykazano, że młodsze osobniki uczyły się szybciej, niż starsze, bez względu na rodzaj przyjmowanego żywienia (Milgram N.W., 2002).

W badaniu, które można porównać z przeprowadzonym szkoleniem klikerowym kur jest trening jałówek. Do owego badania wykorzystano młode osobniki krowy rasy holsztyńsko-fryzyjska. Trenowano je za pomocą klikera, aby akceptowały zabiegi weterynaryjne, dzięki czemu będą one mniej stresujące dla osobnika. Podczas treningu krów wykonano średnio 85 kliknięć przy średnio 4,6 sesjach. Porównując obydwa gatunki da się zauważyć, iż krowy potrzebowały więcej kliknięć w treningu niż kury. Zestawiając średnie liczby sesji treningowych krowy potrzebowały ich mniej, niż kury, 5,25, aby opanować nową komendę bądź zachowanie (Lomb J., 2021).

Podczas treningu makaków królewskich średnio 20% treningu są błędami (Tulip J., 2017). Kury podczas treningu klikerowego popełniają statystycznie mniej błędów, niż makaki, ponieważ ich średnia błędów w zestawieniu z treningiem wynosi 2,89%.

Pozytywne szkolenie niesie ze sobą wiele pozytywnych skutków. Ułatwia ono nawiązanie oraz zacieśnianie relacji właściciel-pupil. Jeden z elementów szkolenia pozytywnego- kliker- sprawia, że wspólny trening staje się bardziej efektywny oraz szybszy, dzięki łatwym do odczytania sygnałom. Tą metodę można stosować również w przypadku zwierząt gospodarskich oraz dzikich. Z wniosków można wydedukować, że trening klikerowy jest metodą, która w prosty sposób pozwala nam na nawiązanie więzi z wieloma gatunkami zwierząt.

5. Literatura

- Carneiro H., Mylonakis E., 2009, „Google Trends: A Web-Based Tool for Real-Time Surveillance of Disease Outbreaks”, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 10, 15, Pages 1557–1564
- Cervellin G., Comelli I., Lippi G., 2017, „Is Google Trends a reliable tool for digital epidemiology? Insights from different clinical settings”, *Journal of Epidemiology and Global Health* Volume 7, Issue 3, , Pages 185-189
- Cimarelli G., Schoesswender J., Vitiello R., Hubert L., Virányi Z., 2020, „Partial rewarding during clicker training does not improve naïve dogs’ learning speed and induces a pessimistic-like affective state.”, *Animal Cognition*. 24(1):107-119
- Dhama K., Patel S., Sharun K. i in., 2020, „SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus”, *Travel Medicine and Infectious Disease*, Volume 37,
- Flannigan G., Dodman N., 2001, „Risk factors and behaviors associated with separation anxiety in dogs”, *J Am Vet Med Assoc*, 15;219(4):460-6.
- Fukuzawa M., Hayashi N., 2013., „Research Comparison of 3 different reinforcements of learning in dogs (*Canis familiaris*).”, *Journal of Veterinary Behavior*. Volume 8, Issue 4, Pages 221-224.
- Hong Kong Census and Statistics Department. Unemployment and Underemployment Statistics for February to April (2020)
- Kogan L., Kolus C., Schoenfeld-Tacher R., 2017, „Assessment of Clicker Training for Shelter Cats.”, *Animals*, 7(10), 73.
- Lomb J., Mauger A., von Keyserlingk M.A.G., Weary D.M., 2021, „Effects of positive reinforcement training for heifers on responses to a subcutaneous injection.”, *Journal of Dairy Science*. 104(5):6146-6158
- Mavragani A., Ochoa G., Tsarakakis K., 2018, „Assessing the Methods, Tools, and Statistical Approaches in Google Trends Research: Systematic Review”, *J Med Internet Res.*, Vol 20, No 11
- Milgram N.W., Muggenburg H.E., Holowachuk B., Murphey D., Estrada H., Ikeda-Douglas J., Zicker S.C., Cotman C.W., 2002, „Landmark discrimination learning in the dog: Effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy.”, *Neurosci Biobehav Rev*. 26(6):679-95.

- Overhaul K.L., 2011, Topics in Companion Animal Medicine 26(1), 2-9
- Schroll S., Dehasse J., 2019, „Zaburzenia zachowania psów”
- Tulip J., Zimmermann J.B., Farningham D., Jackson A., 2017, „An automated system for positive reinforcement training of group-housed macaque monkeys at breeding and research facilities”, Journal of Neuroscience Methods. 285:6-18
- Willson E.K., Stratton R.B., Bolwell C.F., Stafford K.J., 2017, „Comparison of positive reinforcement training in cats: A pilot study.”, Journal of Veterinary Behavior. Volume:21. Pages 64-70.
- Ziv G., 2017, „The effects of using aversive training methods in dogs.”, Journal of Veterinary Behavior, Volume 19. Pages 50-60.

4. Struktura pogłowia psów rasy retriever w Polsce w latach 2017-2022

The structure of the retriever dog population in Poland in 2017-2022

Barbara Rytel

Uniwersytet w Siedlcach, Wydział Nauk Rolniczych, Studenckie Koło Naukowe Sympatyków Zwierząt

Opiekun naukowy: dr inż. Agata Danielewicz

Barbara Rytel: br83640@stud.uws.edu.pl

Słowa kluczowe: Golden Retriever, Labrador Retriever, Flat Coated Retriever, populacja

Streszczenie

Grupa psów retrievery obejmuje 6 ras. Należą one do 8. grupy FCI. W Polsce w 2022 roku zarejestrowano łącznie 5070 dorosłych osobników tej grupy. Rasa Golden retriever zyskuje na popularności wśród Polaków. Pierwotnym zadaniem rasy był aport z wody, natomiast obecnie najczęściej jest domowym pupilem. Celem pracy było przeanalizowanie liczebności rasy Golden retriever w latach 2017-2022 oraz określenie stopnia popularności w Polsce. Dane zebrano na podstawie statystyk prowadzonych przez Związek Kynologiczny w Polsce.

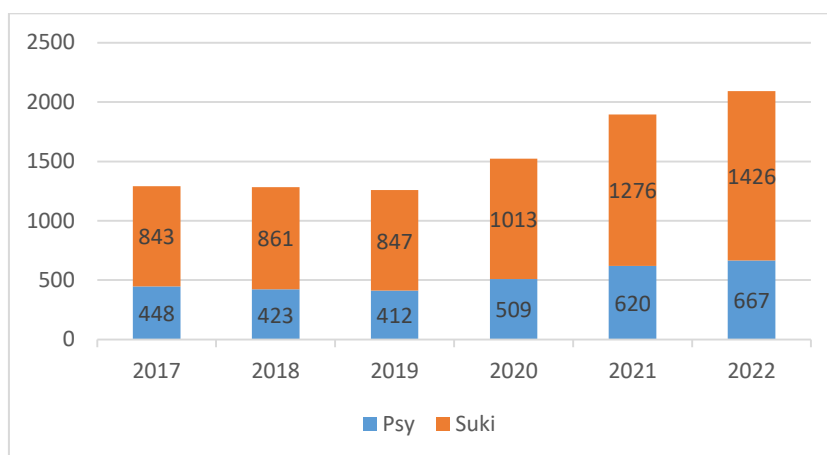
Z roku 2017 na rok 2018 odnotowano wzrost rejestrowanych suk wyłącznie w rasie Golden Retriever w porównaniu do innych ras. Kolejne lata to szybki wzrost rejestrowanych zwierząt w grupie retrieverów (od 100 do nawet 200 osobników). Analiza danych za rok 2021 i 2022 wykazała spadek liczebności psów rasy Labrador Retriever, natomiast rasa Golden Retriever zwiększyła swoją liczebność o 150 osobników wśród suk oraz o 57 wśród psów. Przeprowadzona analiza zebranego materiału wykazała znaczny wzrost (o ponad 160%) zainteresowania psami z grupy retrieverów.

1. Wstęp

Grupa psów retriever obejmuje 6 ras: Chesapeake Bay Retriever, Curly Coated Retriever, Flat Coated Retriever, Golden Retriever, Labrador Retriever oraz Nova Scotia Duck Tolling Retriever. Wszystkie powyższe rasy należą do 8 grupy FCI, tj. aportery, płochacze i psy dowodne. Grupa ta dzieli się na trzy sekcje: Retrievery, płochacze oraz psy dowodne. W Polsce w 2022 roku zarejestrowano łącznie 5070 dorosłych osobników tej grupy. Na potrzeby badania wytypowano trzy rasy: Flat Coated Retriever, Golden Retriever oraz Labrador Retriever. Wybrano je poprzez analizę liczebności ras retriever w Polsce w latach 2017-2022, udostępnionej przez Związek Kynologiczny w Polsce. Wytypowane rasy wykazały się największą liczebnością w danej grupie w badanych latach.

Rasą, która zdobywa popularność wśród społeczeństwa jest Flat Coated Retriever. Rasa pochodzi z Wielkiej Brytanii. W FCI klasyfikuje się w 8. grupie - aportery, płochacze i psy dowodne, w sekcji 1. - aportery. Rasa ta została przypisana do 8. grupy FCI dzięki swojemu naturalnemu instynktowi łowieckiemu. Flat Coated Retrievery uznawane są za psy przyjazne oraz łagodne. Ich eksterier wpływa pozytywnie na poczucie pewności siebie osobników. Psy osiągają wysokość w kłębie od 59cm do 61,5cm, za to suki od 56,5cm do 59cm. Waga osobników oscyluje pomiędzy 27kg, a 36kg u samców, natomiast u samic pomiędzy 25kg, a 32kg. Pomimo wysokiej masy ciała, rasa jest zbudowana proporcjonalnie. Głowa jest długa i dobrze rzeźbiona. Szczęki są także długie i mocne, dzięki którym możliwe jest przenoszenie odstrzelonej dżicyzny podczas polowania. Oczy średniej wielkości, koloru ciemnobrązowego lub orzechowego. Niepożądane są okrągłe, wylupiaście oczy. Uszy powinny przylegać do czaszki. Głowa jest dobrze osadzona na szyi. Szyja osadzona jest pomiędzy łopatkami oraz przechodzi łagodnie w linię grzbietu. Umożliwia to łatwą pracę oraz poruszanie się. Tułów charakteryzuje się szeroką oraz głęboką klatką piersiową oraz krótkimi i płaskimi łędźwiami. Zakończony jest ogonem, który jest prosty oraz noszony na równi z linią grzbietu, nigdy powyżej tej linii. Obydwie linie kończyn są mocno zbudowane, posiadające silne, okrągłe palce oraz mocne i grube poduszki. Budowa ciała psa umożliwia mu swobodny, płynny ruch,

podczas którego przednie i tylne kończyny poruszają się równolegle do osi ciała. Całe ciało pokryte jest gęstym, ale delikatnym włosiem. Umaszczenie występujące w tej rasie to: czarny oraz wątrobiany.



Rys. 1 Rozkład płciowy w populacji rasy Flat Coated Retriever w latach 2017-2022.

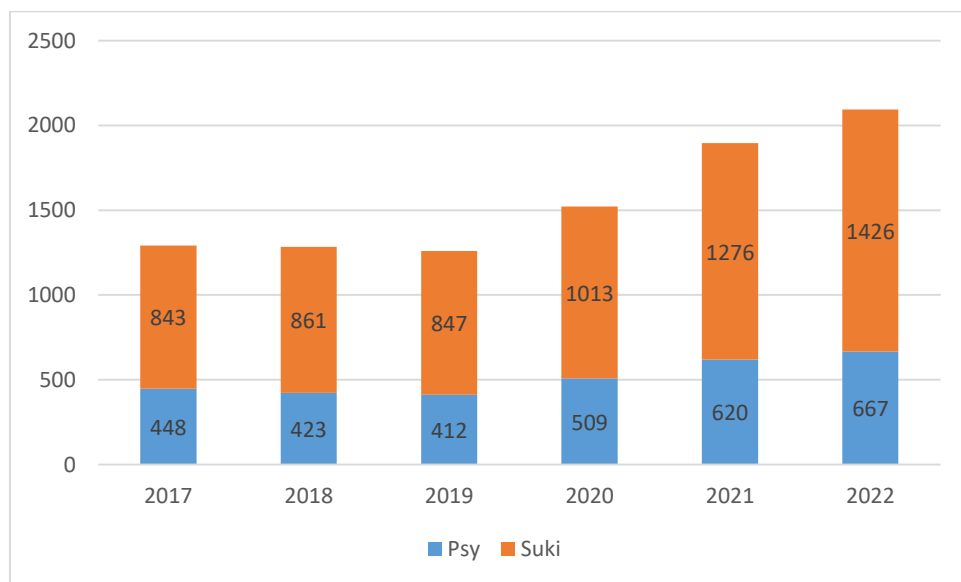
W latach 2017-2022 widać wzrost zainteresowania rasą Flat Coated Retriever (Rys.1). Można zaobserwować wzrost liczebności rejestrowanych sук o ponad 38%, natomiast liczba rejestrowanych psów wzrosła o około 31%. Łączny wzrost zarejestrowanych psów i sук wynosił ok. 35%. W 2017r. procentową ilością rasy Flat Coated Retriever w zestawieniu z całą grupą Retriever wyniosła około 7%. Dla porównania, w roku 2022 Flat Coated Retrievery stanowiły niecałe 7%-6,9%- grupy Retriever.

Najpopularniejszą rasą z wytypowanych w latach 2017- 2022r. jest Labrador Retriever. Rasa ta również wywodzi się z Wielkiej Brytanii. Jest zaklasyfikowana do 8. grupy FCI oraz 1. sekcji. Swoją popularność zawdzięcza swojemu temperamentowi. Labrador Retrievery z natury są łagodne oraz oddane właścicielowi. Rasa jest skłonna do zabawy oraz nie posiada żadnych oznak agresji, bądź lęklivosti (Pegram C. i in. 2021). Dzięki tak wielu pozytywnym cechom owa rasa ma predyspozycje do wielu form pracy z człowiekiem: pies przewodnik- umożliwia wysokość psa w kłębie, która musi wynosić średnio 60cm; pies pomagający osobom poruszającym się na wózkach inwalidzkich- pies pomaga właścicielowi w życiu codziennym poprzez wiele aspektów, np. obsługa drzwi, ciągnięcie wózka, bądź przenoszenie wybranych przedmiotów w pysku; dogoterapia (Kuźniewicz J. 2010). Labrador Retrievery należą do psów większych. Psy osiągają 56-57cm w kłębie, za to suki 54-56cm. Budowa psa jest proporcjonalna. Głowa jest obszerna, lecz bez wydatnych policzków. Kufa oraz nozdrza są dobrze rozwinięte ze średniej długości, mocnymi zębami. Oczy Labrador Retrievery są średniej wielkości o dwóch dopuszczalnych kolorach: brązowym bądź orzechowym. Uszy osadzone są z tyłu głowy oraz lekko przylegają do czaszki. Głowa osadzona jest na gładkiej oraz silnej szyi. Szyja osadzona pomiędzy dobrze ustawionymi łopatkami. Łopatki przechodzą płynnie w grzbiet, który ma szerokie, krótkie łędźwie. Klatka piersiowa jest szeroka oraz głęboka. grzbiet przechodzi w ogon, który jest gruby u nasady oraz zwęża się ku końcowi. Ogon nie może zawijać się nad grzbietem. Kończyny tej rasy są mocnego kośćca. Palce są zwarte oraz dobrze wysklepione, a poduszki dobrze rozwinięte. Tak zbudowana sylwetka pozwala na swobodny ruch, podczas którego kończyny poruszają się równolegle do osi ciała. Każdy osobnik pokryty jest krótką, gęstą okrywą włosową. Posiadają również podszerstek, który chroni psa przed wpływem czynników atmosferycznych. Umaszczenia, które są zgodne ze wzorcem to: czarny, żółty, wątrobiany. Dopuszczalna jest mała, biała plama na przedpiersiu psa.

W badanych latach zaobserwowano wzrost rejestrowanych psów oraz sук rasy Landrador Retriever (Rys.2). Liczba ta, w porównaniu roku 2017 do roku 2022, zwiększyła się o 13% wśród psów oraz o tyle samo, t.j. 13% wśród sук. Łącząc obie płcie zaobserwowano wzrost liczby rejestrowanych osobników również o 13%. W 2017 roku Labrador Retrievery stanowiły ponad 57%

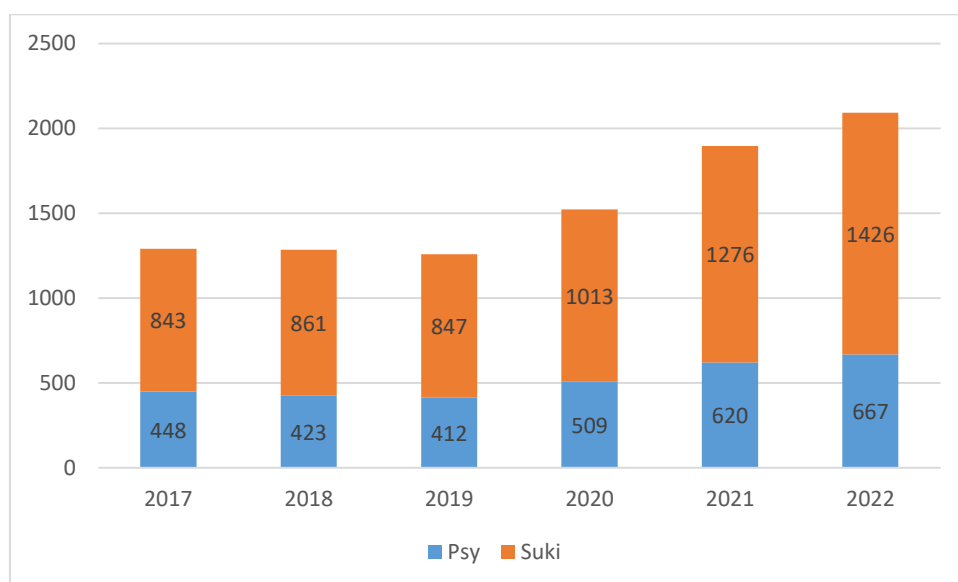
grupy Retriever. W 2022 roku natomiast ich liczebność w stosunku do tej grupy stanowiła niższy procent, około 48%.

Ostatnią wybraną do badania rasą jest Golden Retriever. Rasa to również wywodzi się z Wielkiej Brytanii. Należy do 8. grupy FCI- aportery, płochacze i psy dowodne oraz sekcji 1. – aportery. Rasa została stworzona do aportu z wody. Da się zauważyć rosnący trend posiadania psów tej rasy. Jednym z czynników wpływających na to jest temperament Golden Retrieverów. Rasa została wyprowadzona na łagodną, potulną oraz inteligentną. Dodatkowo jest pewna siebie oraz posiada naturalną zdolność do pracy. Jest rasą najczęściej wybieraną do pracy w dogoterapii (Kuźniewicz J. 2010). Dodatkowo Golden Retrievery sprawdzają się w pracy jako przewodnicy osób z niepełnosprawnościami, w pracy w policji, jako psy detekcyjne, bądź jako psy w straży pożarnej lub pogotowiu górskim, gdzie pomagają w przeszukiwaniu gruzowisk oraz miejsca, na którym pojawiła się lawina śnieżna (Kania-Gierdziewicz J., Gierdziewicz M., Kalinowska B. 2014). Dzięki tym cechom, coraz częściej można spotkać je w roli domowego pupila (Wagner H. 2013). Wygląd ogólny tych psów jest harmonijny, lecz zwarty i mocny. Głowa jest szeroka, z szeroką oraz głęboką kufą. Oczy są koloru ciemnobrązowego, a uszy średniej wielkości, osadzone na wysokości poziomu oczu. Głowa jest dobrze osadzona na muskularnej szyi. Szyja płynnie przechodzi w grzbiet, który jest prosty. Łędźwie są umięśnione oraz krótkie. Klatka piersiowa jest głęboka. Z linii grzbietu da się wyodrębnić ogon, który jest noszony na równi z jego linią. Sięga on stawu skokowego i nie może zawiązać się na końcu. Wszystkie kończyny są umięśnione oraz z mocnym kośćcem. Każda kończyna zakończona okrągłą łapą o kocim kształcie. Pomimo zwartej, mocnej budowie ciała, Golden Retrievery poruszają się energicznie oraz swobodnie. Psy nie poruszają się „hackney’em”. Całe ciało pokryte jest gładkimi lub falistymi włosami. Posiada także wodoodporny podszerstek. Dopuszczalne umaszczenia: dowolny odcień złotego lub kremowego. Dopuszczalne jest małe, białe znaczenie na przedpiersiu.



Rys. 2 Rozkład płciowy w populacji rasy Labrador Retriever w latach 2017-2022.

W badanych latach, w rasie Golden Retriever można zaobserwować znaczny wzrost zarejestrowanych sук, natomiast wzrost psów jest zbliżony do wcześniej omawianych ras (Rys.1; Rys.2; Rys.3). Liczba sук w badanych latach zwiększyła się o 69%, natomiast psów o 48%. Przez 5 lat badań wykazano, że wzrost sук oraz psów liczony łącznie, wyniósł 62%. Procentowy udział rasy Golden Retriever w grupie Retriever w roku 2017 wyniósł 31%. Natomiast w roku 2022 procentowa ilość Golden Retrieverów podwyższyła się i wyniosła 38%.



Rys. 3 Rozkład płciowy w populacji rasy Labrador Retriever w latach 2017-2022.

2. Materiał i metody

Analizę danych przeprowadzono na podstawie wyników udostępnionych przez Związek Kynologiczny w Polsce. Strukturę pogłowia przeanalizowano na przestrzeni ostatnich 5 lat (2017–2022). Porównywano trzy grupy psów: zarejestrowane suki, zarejestrowane psy oraz szczenięta. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresach.

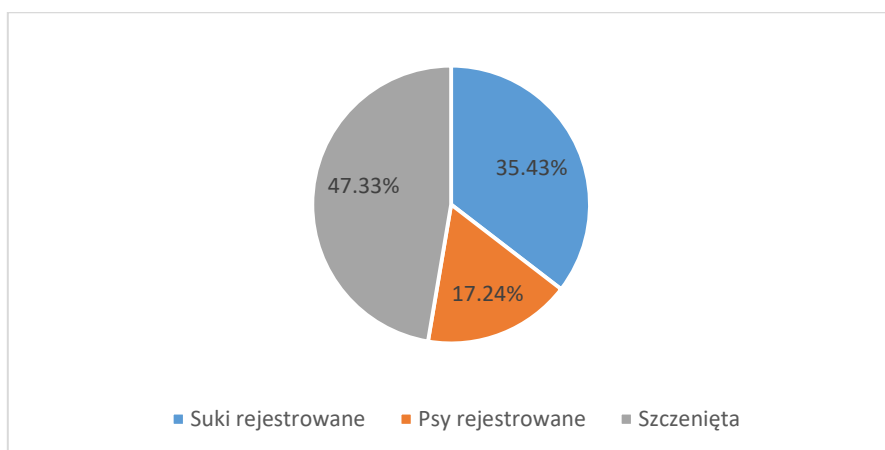
Głównym celem pracy było zbadanie trendów popularności rasy Golden Retriever w Polsce w latach 2017-2022r. Rasy Flat Coated Retriever oraz Labrador Retriever służą porównaniu w zestawieniu, aby móc dogłębniej przeprowadzić analizę.

3. Wyniki

W latach 2017-2018 (Tab. 1; Tab. 2) można było zaobserwować wzrost rejestracji osobników tylko jednej rasy, którą była Golden Retriever. Ilość zarejestrowanych suk wzrosła o 18 sztuk. Dodatkowo liczba szczeniąt wzrosła o 64 osobniki. Zestawiając trend suk innych badanych ras Flat Coated Retrievery zmniejszyły liczebność zarejestrowanych suk o około 1,75%, natomiast liczba rejestrowanych suk rasy Labrador Retriever zmalała o około 2%. Pomimo największego spadku procentowego liczby zarejestrowanych suk, Labrador Retrievery były najliczniejszą grupą spośród badanych.

Tab. 1 Struktura populacji retriever w 2017 roku.

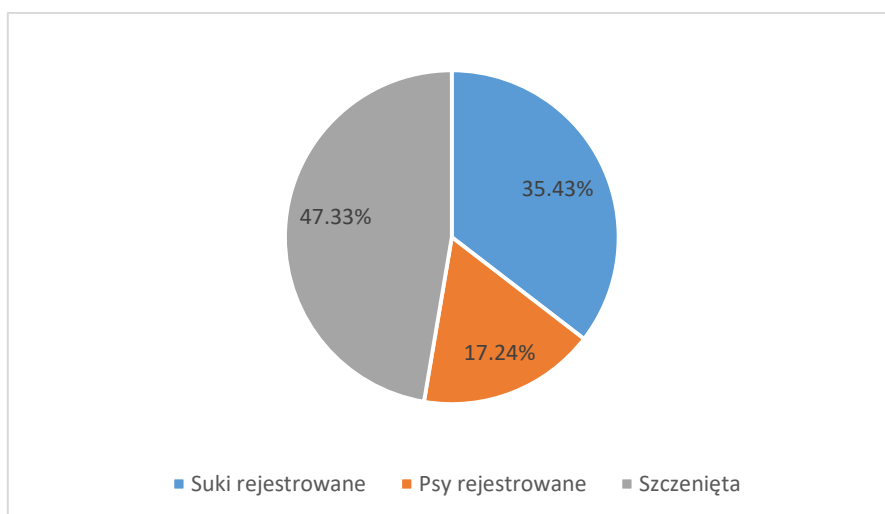
	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	172	1591	843
Psy rejestrowane	113	767	448
Szczenięta	149	1554	757



Rys. 4 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2017 roku.

Tab. 2 Struktura populacji retriever w 2018 roku.

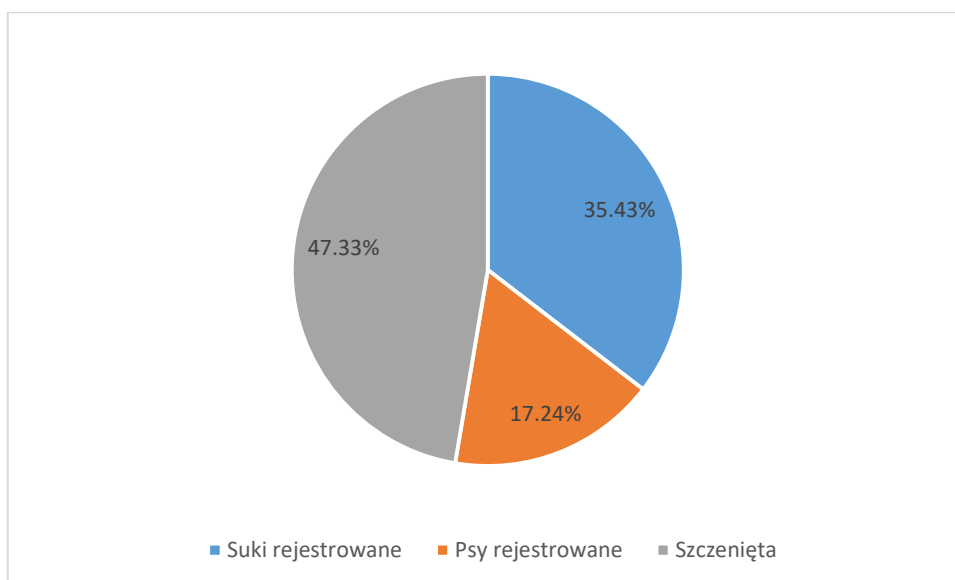
	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	169	1558	861
Psy rejestrowane	113	762	423
Szczenięta	139	2333	821



Rys. 5 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2018 roku.

Tab. 3 Struktura populacji retriever w 2019 roku.

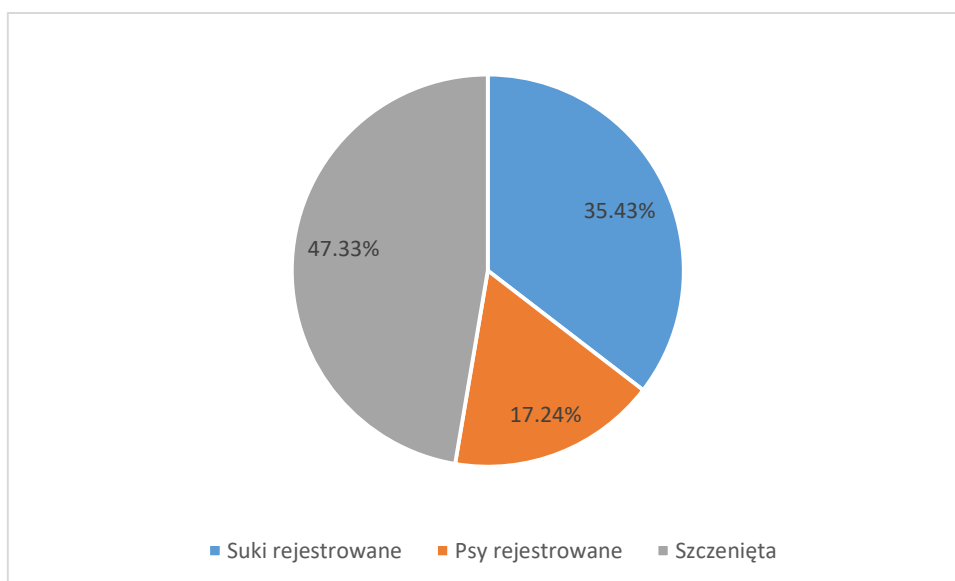
	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	187	1473	847
Psy rejestrowane	113	703	412
Szczenięta	203	2268	1393



Rys. 6 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2019 roku.

Tab. 4 Struktura populacji retriever w 2020 roku.

	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	200	1632	1013
Psy rejestrowane	119	754	509
Szczenięta	262	2609	1757



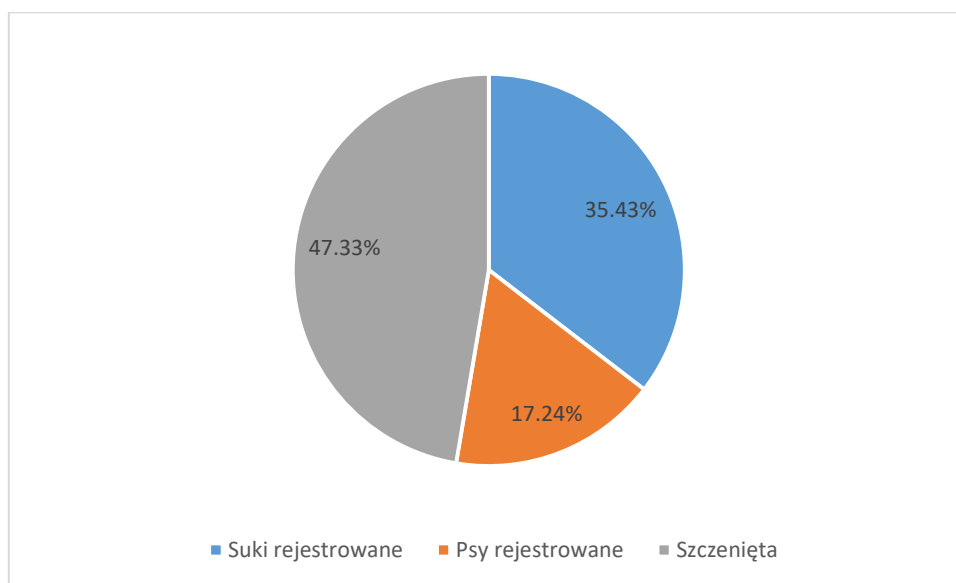
Rys. 7 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2020 roku.

W latach 2019-2020 (Tab. 3; Tab. 4) odnotowano wzrost liczby rejestrowanych osobników w każdej z badanych ras oraz w każdej z badanych grup. Wśród szczeniąt największy wzrost

odnotowano w rasie Labrador Retriever, tj. o 341 osobniki. W roku 2018 rasa Golden Retriever osiągnęła największy wzrost zarejestrowanych suk oraz psów, tj. 166 sztuki zarejestrowanych suk o 7 osobników więcej w zestawieniu z Labrador Retrieverami, natomiast liczba zarejestrowanych psów wzrosła o 97 osobników, czyli o 93 osobniki więcej w zestawieniu z Flat Coated Retrieverami.

Tab. 5 Struktura populacji retriever w 2021 roku.

	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	231	1814	1276
Psy rejestrowane	144	873	620
Szczenięta	202	2838	2378

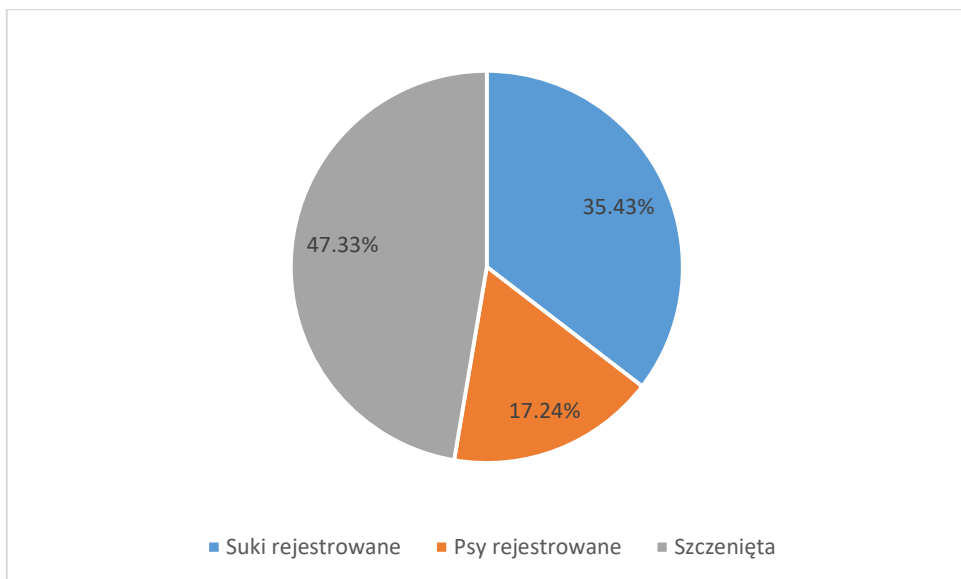


Rys. 8 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2021 roku.

Tab. 6 Struktura populacji retriever w 2022 roku.

	Flat Coated Retriever	Labrador Retriever	Golden Retriever
Suki rejestrowane	238	1798	1426
Psy rejestrowane	149	869	667
Szczenięta	222	2262	2141

W latach 2021-2022 (Tab. 5; Tab.6) odnotowano wzrost rasy Golden Retriever oraz Flat Coated Retriever we wszystkich badanych grupach. Płcią, która zwiększyła swoją liczbę o największą liczbę osobników były suki. W rasie Flat Coated Retriever wzrosła o 7 osobników, a w rasie Golden Retriever wzrosła o 150 osobników. W przeciwieństwie do owych ras, w rasie Labrador Retriever ilość suk zmalała o 16 sztuk.



Rys. 9 Procentowe zróżnicowanie płci pogłowia retriever w 2021 roku.

4. Dyskusja i wnioski

Analiza powyższych wykresów pozwoliła wysunąć wnioski na temat trendów wśród wybranych ras grupy retrieverów. W początkowych dwóch badanych latach odnotowano wzrost zarejestrowanych suk wyłącznie w rasie Golden Retriever. Kolejne badane lata wykazały wzrost rejestrowanych zwierząt w analizowanej grupie (od 100 do 200) osobników. W dwóch ostatnich badanych latach odnotowano jednak spadek liczebności psów rasy Labrador Retriever o 16 osobników wśród rejestrowanych suk oraz o 4 osobniki wśród rejestrowanych psów. W przeciwieństwie do tej rasy, liczebność Golden Retrieverów zwiększyła się o 150 osobników wśród rejestrowanych suk oraz o 57 wśród rejestrowanych psów. Dzięki analizie wykazano znaczny wzrost zainteresowania psami z grupy Retriever, który wynosił ponad 160%.

Rasy grupy Retriever niewątpliwie stają się coraz bardziej popularne. Zawdzięczają to w głównej mierze charakterom, które badane rasy mają spokojne, zrównoważone oraz przyjaźielskie. Warto obserwować przyszłoroczne trendy popularności tej grupy, ponieważ jest to coraz prężniej rozwijająca się grupa ras psów myśliwskich.

5. Literatura

- Kania-Gierdziewicz J, Gierdziewicz M, Kalinowska B (2014) Analiza spokrewnienia i inbrodu golden i labrador retrieverów z krakowskiego Oddziału Związku Kynologicznego w Polsce. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, t. 10, nr 1, 9-19.
- Kuźniewicz J (2010) Psy ratujące ludziom życie. Cz. 1. Psy dogoterapeuci i ostrzegające przed występowaniem chorób. *Przegląd Hodowlany* 7, 29-31.
- Kuźniewicz J (2010) Psy ratujące ludziom życie. Cz. 2. Psy ratownicze i wspomagające osoby niepełnosprawne.”, *Przegląd Hodowlany* 8, 31-33.
- Pegram C, Woolley C, Brodbelt DC, Church D, O’Neil D (2021) Disorder predispositions and protections of Labrador Retrievers in the UK. *Sci Rep.* 2021; 11: 13988.
- Sprawozdanie hodowlane za rok 2017, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2017.pdf
- Sprawozdanie hodowlane za rok 2018, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2018.pdf
- Sprawozdanie hodowlane za rok 2019, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2019.pdf

Sprawozdanie hodowlane za rok 2020, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2020.pdf
Sprawozdanie hodowlane za rok 2021, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2021.pdf
Sprawozdanie hodowlane za rok 2022, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/sprawozdania/spr_hod_2022.pdf
Systematyka ras FCI z uwzględnieniem polskiego nazewnictwa ras, ZKWP,
https://www.zkwp.pl/regulaminy/Systematyka_Ras.pdf
Wagner H (2013) Golden retriever. Wychowanie i zdrowie.
Wzorzec FCI nr 111 /28.10.2009, ZKWP, <https://www.zkwp.pl/wzorce/111.pdf>
Wzorzec FCI nr 121/28.10.2009, ZKWP, <https://www.zkwp.pl/wzorce/121.pdf>
Wzorzec FCI nr 122 /12.01.2011, ZKWP, <https://www.zkwp.pl/wzorce/122.pdf>

5. Alergenność substancji aktywnych zawartych w jajach ptasich

Allergenicity of active substances contained in bird's eggs

Paulina Wac⁽¹⁾, Nikola Pietruszka⁽¹⁾, Patrycja Jóźwiak⁽¹⁾, Dawid Ziobro⁽¹⁾, Savelli Ishchenko⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾, Kamil Drabik⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab. Justyna Batkowska, dr inż. Kamil Drabik

Paulina Wac: paulinamwac@gmail.com

Słowa kluczowe: odpowiedź immunologiczna, molekuły alergenowe, syndrom ptak-jajo, alternatywy jaj kurzych

Streszczenie

Jaja kurze, ze względu na bogatą zawartość składników odżywczych, stanowią jeden z podstawowych elementów diety większości ludzi na świecie. Są też jednym z najczęściej wprowadzanym do diety małych dzieci pokarmem odzwierzęcym zaraz po mleku krowim. Mogą być też dobrym źródłem białek, fosfolipidów, karotenoidów oraz wielu substancji biologicznie czynnych wpływających pozytywnie na procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie ludzkim. Niemniej jednak w jajach oprócz wielu substancji prozdrowotnych znajdziemy również te niekorzystne dla ludzi. Do takich substancji należą alergeny wywołujące reakcje uczuleniowe. Alergie to nadmierna odpowiedź układu odpornościowego na dany czynnik, który w określonej dawce może wywoływać patologiczną reakcję organizmu. Te czynniki to właśnie alergeny, które w drodze łączenia się ze specyficznymi przeciwciałami prowadzą do zaistnienia reakcji alergicznej. Jaja kurze należą do jednych z najczęściej wywołujących alergię produktów odzwierzęcych. Zarówno w białku jak i żółtku jaja kurzego znaleźć można wiele alergenów takich jak m.in. owomukoid, owotransferyna, lizozym, α -liwetyna czy apowitelina.

Celem pracy jest przybliżenie molekuł alergennych jaja kurzego wraz z omówieniem syndromu ptak-jajo.

1. Wstęp

Jaja kurze są źródłem wysokiej jakości białka i ważnych witamin. Ich skład powoduje, że są one często niezastąpione pod względem funkcjonalnym, takim jak pienienie czy emulgowanie (Fu i in. 2010). Mimo to, są również jedną z najczęstszych przyczyn występowania alergii pokarmowych. Niepożądane reakcje powoduje najczęściej białko jaja kurzego, chociaż żółtko również zawiera substancje alergizujące (Urisu i in. 2015). Wraz ze wzrostem spożycia jaj pojawiają się problemy żywieniowe i zdrowotne, co sugeruje pilną potrzebę znalezienia rozwiązania tego problemu (Huang i in. 2021).

2. Czym są alergie i alergeny

Alergie pojawiają się, gdy układ odpornościowy organizmu nadmiernie reaguje na obce substancje (alergeny), które dla większości ludzi są zazwyczaj nieszkodliwe. Należą do nich m.in. pyłki roślinne lub produkty żywnościowe. Reakcje alergiczne najczęściej występują na skórze oraz w drogach oddechowych i na błonach śluzowych, ich objawy zwykle pojawiają się natychmiast po kontakcie z alergenem jednak mogą także wystąpić po upływie kilku godzin lub dni i w większości są łagodne, ale mogą też być uciążliwe i mieć znaczny wpływ na codzienne życie (Sicherer i Sampson 2010).

Alergię na jaja można zdefiniować jako niepożądaną reakcję o charakterze immunologicznym, wywołaną przez proteiny jaja kurzego. Białko jaja zawiera ponad 20 różnych protein i glikoprotein. Owomucoid, owalbuminę, owotransferyna i lizozym zostały zidentyfikowane

jako główne alergeny jaja kurzego. Uważa się, że α -liwetyna jest głównym alergenem żółtka jaja odpowiedzialnym za tzw. zespół ptak-jajo (Urisu i in. 2015). Alergie na jaja i mleko są najczęstszymi alergiami pokarmowymi wieku niemowlęcego, częstość ich występowania szacuje się od 1,6% dla dzieci w wieku 2-2,5 roku (Eggesbø i in. 1999) do 2,4% natomiast częstość występowania alergii u dorosłych została oszacowana na 0,1% (Osterballe i in. 2005).

Alergia na jaja występuje najczęściej w okresie niemowlęcym, zwykle po pierwszym spożyciu. Reakcje kliniczne obejmują pokrzywkę i/lub obrzęk naczynioruchowy u 80-90% (w ciągu kilku minut) oraz objawy żołądkowo-jelitowe u 10-44% (w ciągu 2 godzin). Większość reakcji ma charakter łagodny, z pokrzywką jedynie na twarzy. Cięższe reakcje z istotnymi objawami ze strony układu oddechowego występują rzadziej (Boyano Martinez i in. 2001). Objawy takie jak chrypka lub zmiana wysokości głosu, kaszel, świst lub świszczący oddech, wskazują na cięższą reakcję. Sporadycznie u małych dzieci pojawia się bledność i zwiotczenie. Kontakt ze skórą najprawdopodobniej wywołuje miejscowe reakcje skórne. Spożycie surowego lub niedogotowanego jaja może wywołać cięższe reakcje kliniczne niż jajo dobrze ugotowane (Eigenmann 2000). Obecność wyprysku jest istotnym czynnikiem ryzyka alergii na jaja. Pacjenci z łagodną alergią na jaja często będą w stanie tolerować produkty jajeczne po intensywnym podgrzaniu. Badanie pacjentów z alergią na jaja w wieku od 0,5 do 25 lat wykazało, że 70% z nich było w stanie tolerować dobrze ugotowane jajo (Clark i in. 2010). Ustąpienie alergii na jaja następuje etapami, zaczynając od tolerancji na jaja poddane długiej obróbce termicznej (np. ciasto), następnie lekko ugotowane jajko (np. jajecznicę), a na koniec surowe jajo. Dlatego dzieci, które tolerują gotowane jaja, mogą nadal reagować na surowe lub niedogotowane ich odpowiedniki. Z reguły reakcje stają się z czasem słabsze, a często mniej dotkliwe (Eigenmann 2000). Alergia na jaja u dorosłych może być ciężka i długotrwała. Zazwyczaj jest spowodowana uporczywą reakcją uczuleniową na jaja w dzieciństwie.

3. Alergeny białka jaja kurzego

Owomukoid, owoalbumina i owotransferyna to glikoproteiny wchodzące w skład białka jaja kurzego. Wraz z lizozymem należą do 4 najbardziej alergennych substancji zawartych w białku jaja (Chang in. 2018). Owomukoid stanowi 11% białek jaja kurzego i jest uważany za dominujący alergen w jaju. Składa się z 186 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 28 kDa przy czym jest odpowiedzialny za większość alergii spowodowanych spożyciem białka (Kovacs-Nolan i in. 2000). Dzięki swojej budowie jest odporny na działania proteinaz, kwasów, temperatury czy innych pospolitych metod usuwania alergenów z pożywienia (Muake i in. 2021). Alergenność owomukoidu spada po potraktowaniu wysoką temperaturą, jednak w przypadku niewystarczającego czasu lub zbyt niskiej temperatury podczas obróbki, alergenność może nawet wzrosnąć na skutek tworzenia nowych substancji immunogennych w reakcji Maillarda (seria wielu jednoczesnych reakcji chemicznych cukrów prostych z aminokwasami) pomiędzy owomukoidem a glukozą, doprowadzając w ten sposób do zmodyfikowania zawartych w owomukoidzie aminokwasów (Chang i in. 2018). U ludzi uczulonych na białko jaja kurzego, odporność może różnić się w zależności od stężenia specyficznych dla owomukoidu przeciwciał IgE. Ponadto ludzie posiadający większe stężenie tych przeciwciał we krwi wykazują większą reakcję w przypadku ogólnej alergii na białko jaja kurzego (Ma i in. 2020).

Owotransferyna to glikoproteina o wadze 76 kD i posiadająca 686 aminokwasów. Glikoproteina ta stanowi około 12% białka jaja kurzego. Wraz z owomukoidem, owotransferyna jest dominującym alergenem wykrywanym w surowicach pacjentów z wstrząsem anafilaktycznym. Owotransferyna ze względu na swoje właściwości wiązania metali, a w szczególności jonów żelaza, może występować w dwóch formach: formie apo (bez żelaza) oraz formie holo (w kompleksie z żelazem). Stwierdzono także, iż obciążenie żelazem zmniejsza alergenność tego białka (Ma i in. 2020).

Owoalbumina jest glikoproteina, która stanowi około 54% białka jaja kurzego. Tak wysokie jej stężenie w białku sprawia, iż mimo że wykazuje mniejsze właściwości alergenowe od owomukoidu, czy owotransferyny ma duży wpływ na alergenność jaja kurzego. Owoalbumina posiada także właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Liu i in. 2018). Poza tym, nie tylko samo białko wykazuje właściwości antymikrobiologiczne. Udowodniono, że po proteolitycznym rozkładzie, można z niej uzyskać również przeciwdrobnoustrojowe peptydy. Owoalbumina posiada też zdolności pienne, co

żelujące oraz emulgujące, dzięki czemu znalazła ona zastosowanie w przemyśle spożywczym, ale także w nanotechnologii, a właściwie w jej nowej gałęzi, czyli nano-immunoterapii, która skupia się na dostarczaniu antygenów, cytokin, kwasów nukleinowych oraz małych cząsteczek bezpośrednio do danej tkanki lub komórki indukując w ten sposób reakcje systemu immunologicznego. Owoalbumina stanowi w tej metodzie modelowy antygen dla astmy, chorób immunologicznych oraz nowotworów (Pang i in. 2021).

Lizozym składa się z jednolitego łańcucha polipeptydowego o długości 129 aminokwasów, usieciowanego w 4 różnych miejscach mostkami disiarczkowymi, które mogą przyczyniać się do jego alergenicności (Liburdi i in. 2014). Lizozymy to klasa enzymów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które występują powszechnie w całym królestwie zwierząt jako naturalne środki bakteriobójcze (Silvetti i in. 2017). U zwierząt wyróżnia się trzy główne typy lizozymu: lizozym typu kurzego, który określany jest jako typ C. Jest on wytwarzany przez większość kręgowców oraz jest w głównej mierze wykorzystywany do badań nad tym enzymem. Kolejnymi typami są: typ gęsi, który jest określany jako typ G oraz typ I, który jest obecny u bezkręgowców (Callewaert i Michiels 2010). Ze względu na swoje właściwości bakteriobójcze lizozym jest stosowany jako środek służący do konserwacji mięsa drobiowego i produktów z niego wytwarzanych. Jaja kurze zawierają ok. 3,5% lizozymu w suchej masie, dlatego wykorzystuje się je na skalę przemysłową jako źródło tego enzymu (Cegielska-Radziejewska i in. 2008).

4. Alergeny żółtka jaja kurzego

Białko jaja kurzego wykazuje znacznie silniejsze i częstsze działanie alergizujące niż żółtko, jednak i w tym przypadku można znaleźć szereg swoistych molekuł alergennych. Głównymi alergenami występującymi w żółtku jaja kurzego są alfa-liwetyna (Gal d 5) oraz YGP42 (Gal d 6) (De Silva i in. 2016).

Gal d 5, czyli albumina surowicy, składa się z 589 reszt aminokwasowych. Jest ona niestabilnym białkiem hydrofilowym o masie 70 kDa, rozpuszczalnym w wodzie. Alfa-liwetyna jest alergenem reagującym krzyżowo (Jiang i in. 2022) i może powodować objawy alergiczne ze strony układu oddechowego czy pokarmowego (Huang i in. 2021).

Gal d 6 jest białkiem żółtkowym pochodzącym z C-końca prekursora VTG-1, który jest rozszczepiany poprzez aktywność enzymatyczną, celem utworzenia dojrzałego białka. Alergen ten jest odporny na ciepło, ale może być trawiony przez pepsynę (Amo i in. 2010). Jest glikoproteiną żółtka YGP42 o masie cząsteczkowej 42 kDa (Mann i Mann 2008) oraz wykazuje stabilizację termiczną i redukcijną (Huang i in. 2021). De Silva i in. (2016) przeprowadzili badania, w których przebadano surowiec krwi 25 pacjentów, którzy wykazywali nadwrażliwość na białko jaj kurzych. Stwierdzono, że wszyscy pacjenci są również uczuleni na przynajmniej 2 białka żółtkowe i wykazywali po nich reakcje alergiczne. Z badań wynikało, że 16% badanych zareagowało na Gal d 5, natomiast 24% pacjentów zareagowało na Gal d 6. Postawiono hipotezę, że YGP42 jest pomniejszym alergenem związanym z nadwrażliwością na żółtko jaj kurzych, jednak według badań De Silva i in. (2016) jest on bardziej alergenny i może wpływać na większą ilość pacjentów, niż twierdzono na początku.

5. Reaktywność krzyżowa alergenów jaj

Zjawisko reaktywności krzyżowej (alergii krzyżowej) polega na aktywacji naturalnej adaptacyjnej reakcji układu odpornościowego na konkretny antygen, przez inny antygen, o podobnej do niego budowie. Immunoglobuliny E (IgE) są w większości odpowiedzialne za alergię krzyżową. Ich funkcją jest wiązanie specyficznych antygenów, ale potrafią wykazywać one znaczącą elastyczność w ich wiązaniu, atakując antygeny, które nie są dla nich specyficzne, ale wykazują do takowych podobieństwo. Powoduje to wystąpienie objawów alergii bez wcześniejszego kontaktu z alergenem krzyżowym, gdyż przeciwciała wywołujące reakcję alergiczną zostały już wcześniej wytworzone przez kontakt z alergenem pierwotnym, z którym nowe antygeny krzyżowe są mylone (Piwowarek i in. 2015). System ten ma pozytywne, jak i negatywne efekty. Potrafi on stanowić przewagę w obronie przed infekcją, pomagając organizmowi łatwiej i szybciej rozpoznawać

zagrożenie, ale może także prowadzić do zaburzeń alergicznych w tym właśnie alergii krzyżowej czy występowania chorób autoimmunologicznych (Bonds i in. 2008).

Reaktywność krzyżowa jest częstym zjawiskiem pomiędzy białkami występującymi w jajach różnych ptaków, zjawisko to zachodzi między białkami jaj takich gatunków jak indyk, kaczka, gęś, kura i mewa. Reakcja ta może również występować między białkami pochodzącymi z różnych części ptasiego jajka danego gatunku. Proteiny z białka kurzego jaja mogą wywoływać alergiczną reakcję krzyżową immunoglobulin E nastawionych na wykrywanie protein z żółtek kurzych jaj. Zjawisko alergii krzyżowej zachodzi także między białkami jaja kurzego, a tymi występującym w mięsie kurzym i surowicy krwi kury (Langeland i in. 1983).

Częstą formą zjawiska reaktywności krzyżowej jest „bird-egg syndrome” (spolszczona nazwa „zespół ptak-jajo”). Opiera się on na podobieństwie między białkami pochodzącymi z różnych tkanek lub organów ptasich. Jest to zespół polegający na występowaniu objawów klinicznych alergii układu oddechowego na ptasie antygeny z piór oraz wywołanej przez nie objawów alergii układu pokarmowego na podobne antygeny z mięsa lub/i żółtka czy białka jaja. (Hemmer i in. 2016). Pomimo faktu, że alergia na mięso jest stosunkowo rzadkim schorzeniem (rzadszym niż uczulenie na jajka) regularnie zdarzają się przypadki zespołu ptak-jajo charakteryzujące się uczuleniem na pierze i mięso ptaków, przy czym nie występuje negatywna reakcja na jaja tych ptaków. Zespół ten występuje nie tylko w alergiach na pierze pochodzące od drobiu, ale także może być obecny w przypadku alergii na pierze pochodzące od ptaków nietradycyjnie hodowlanych takich jak orzeł czy sowa (Ferreira i in. 2004).

Albumina kurzej surowicy (CSA - chicken serum albumin) - Gal d 5, czyli alfa-liwetyna jest uważana za główny alergen stojący za zespołem ptak-jajo. Jest ona tylko częściowo termostabilnym alergenem. Po odpowiednim jej podgrzaniu (co najmniej 90°C przez 30 min.) reaktywność jaką wywołuje u immunoglobuliny E spada o 88%, co może odpowiadać za fakt, że niektóre osoby przebadane pod kątem zespołu ptak-jajo wykazywały reakcje alergiczne na surowe jaja, ale nie na te podawane obróbcie termicznej. Albumina surowicy występuje we wszystkich tkankach ptasich odpowiedzialnych za występowanie syndromu ptak-jajo. Dodatkowo znaleziono albuminę nie tylko w tkankach ptasich, ale i w powietrzu w miejscach, gdzie ptaki przebywają (Quirce i in. 2001).

Szepfalusi i in. (1994) wykazali, że większość pacjentów cierpiących na zespół ptak-jajo to dorosłe kobiety. Analiza wieku badanej grupy wskazała, że średnia wieku pacjentów wynosiła 46 lat (zakres to od 16 do 71 lat). Różni się to od tendencji wykazywanej przez klasyczną alergię na jajka, na którą cierpią głównie dzieci bez predyspozycji płciowej.

6. Alternatywy

Badania prowadzone przez Gubała i in. (2021) potwierdzone próbą pokarmową wskazują, że w populacji Europejskiej aż 0,2% ludzi cierpi na nadwrażliwość wywołaną przez białka jaj kurzych. Jest to druga najczęściej występująca alergia po alergii na białka mleka krowiego. Uczulenia pokarmowe mogą wiązać się z różnymi zagrożeniami dla życia i zdrowia to, oraz częstość występowania uczuleń pokazuje potrzebę znalezienia rozwiązań alternatywnych dla jaj kurzych.

Badania Moghtaderi i in. (2020) przeprowadzone pod kątem reakcji alergicznych na jaja innych gatunków drobiu u dzieci wykazujących nadwrażliwość na białka jaja kurzego Wykazały że 96,1% procent dzieci nietolerujących białek jaj kurzych ma problemy z jajami innych ptaków. Najczęstszą reakcją alergiczną wywoływały białka jaj przepiórczych (69,2% badanych), następnie białka jaj kaczek (65,5%), indyczek (63,5%), żółtka jaj gęsi (46%), natomiast najmniejszy procent reaktywności wykazywały żółtka jajka gołębi (44%). Ukazuje to możliwość stosowania jaj innych gatunków drobiu jako alternatyw dla kurzych oraz możliwość kontynuowania badań w celu rozpoczęcia prac nad tworzeniem doustnej immunoterapii żółtkami jaj gęsi i gołębi (Moghtaderi i in. 2020). Pomimo mniejszej alergenności od jaj kurzych, jaja innych gatunków drobiu, takich jak przepiórcze (Caro Contreras i in. 2008), kacze czy gęsie istnieją bardzo rzadkie przypadki wywoływania przez nie reakcji alergicznej u osób nie wykazujących takiej reakcji na jaja kurze (Añibarro i in. 2000). Należy uwzględnić tę możliwość przy rozważaniu różnych form terapii.

Obecnie nie ma potwierdzonej metody całkowitego wyeliminowania uczulenia na białka jaj kurzych. Zapobieganie reakcji alergicznej polega na unikaniu ich spożywania, bądź w ciężkich

przypadkach, stosowaniu epineferyny, podawanej w formie zastrzyków dożylnych. Specyficzna doustna indukcja tolerancyjna (ang. Specific oral tolerance induction - SOTI) jest eksperymentalną formą terapii, mającą na celu leczenie lub łagodzenie przypadków nadwrażliwości na jaja kurze przez budowanie odporności. Iacono i in. (2012) próbowali zminimalizować nadwrażliwość u dzieci z bardzo ciężko alergią na jaja kurze, przy użyciu surowej emulsji z jaj kurzych, podawanej regularnie przez 6 miesięcy. Wybrano surowe jaja ze względu na fakt, że niepoprawnie ugotowane jajo może wywołać reakcje alergiczne tak samo jak to surowe. Uzyskanie tolerancji na surowe jaja kurze daje możliwość zmniejszenia restrykcyjności diety. Po zakończeniu okresu terapii i ponownym teście reakcji alergicznej, okazało się, że 90% pacjentów osiągnęło częściową tolerancję, jednak żadna z badanych osób nie osiągnęła jej w pełnym zakresie. Wzrost progu tolerancji na substancje uczulające nie był związany z wiekiem pacjentów, ich historią ani stężeniem IgE w surowicy, co świadczy o skuteczności terapii SOTI i daje perspektywę na rozwój tego typu terapii (Iacono i in. 2012). Nie ma produktów jajecznych niezawierających substancji alergennych, istnieją jednak prace prowadzące w tym kierunku. Park i in. (2017) testowali możliwość zmniejszenia alergenicności owalbuminy (OVA- głównego alergenu jaj kurzych) po deglikozylacji za pomocą N-acetyloglukozaminidazy (N-OVA). Stwierdzili, że stopień alergenicności i antygenowości tego białka zmniejsza się po przeprowadzeniu wymienionego procesu. Wynik ten sugeruje potrzebę dalszych badań w celu produkcji niealergiczych produktów jajecznych, mogących stanowić alternatywę dla uczulających jaj kurzych.

7. Podsumowanie

Alergia na jaja nie jest determinowana tylko i jedynie przez całe jajo, a składają się na to poszczególne alergeny w nim zawarte. Umożliwia to wybór selektywnego rodzaju diety pozbawionego poszczególnych substancji. Przykładowo mając alergię jedynie na alergeny białka jaja nie trzeba eliminować z diety żółtek. Alergie na jaja nie trzeba mieć od wczesnego dzieciństwa a można ją nabyć w wyniku częstego wystawiania organizmu na działanie substancji drażniących. Pozwala to na wyjaśnienie występowania specyficznych reakcji organizmu ludzkiego.

8. Bibliografia

- Amo A, Rodriguez-Perez R, Blanco J i in. (2010) Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(12): 7453-7457.
- Añíbarro B, Seoane FJ, Vila C i in. (2000) Allergy to eggs from duck and goose without sensitization to hen egg proteins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105(4): 834–836.
- Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R (2008) A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 8(1): 82–86.
- Boyano MT, Garcia AC, Diaz PJM i in. (2001) Validity of specific IgE antibodies in children with egg allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 31(9): 1464-1469.
- Callewaert L, Michiels CW (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Bioscience* 35(1): 127-160.
- Caro Contreras FJ, Giner Muñoz MT, Martín Mateos MA i in. (2008) Allergy to quail's egg without allergy to chicken's egg. Case report. *Allergologia et immunopathologia* 36(4): 234–237.
- Cegielska-Radziejewska R, Leśniewski G, Kijowski J (2008) Properties and application of egg albumen lysozyme and its modified preparations– a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 58(1): 5-10.
- Chang LT, Tanaka T, Nickerson MT (2018) „Egg proteins: fractionation, bioactive peptides and allergenicity”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(15): 5547-5558.
- Clark AT, Skypala I, Leech SC i in. (2010) British Society for Allergy and Clinical Immunology guidelines for the management of egg allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 40(8): 1116-1129.
- De Silva C, Dhanapala P, Doran T i in. (2016). Molecular and immunological analysis of hen's egg yolk allergens with a focus on YGP42 (Gal d 6). *Molecular immunology* 71: 152-160.

- Eggesbø M, Halvorsen R, Tambs K i in. (1999) Prevalence of parentally perceived adverse reactions to food in young children. *Pediatric Allergy and Immunology* 10(2): 122-132.
- Eigenmann PA (2000) Anaphylactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *Journal of allergy and clinical immunology* 105(3): 587-588.
- Ferreira F, Hawranek T, Gruber P i in. (2004) Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 59(3): 243-267.
- Fu TJ, Maks N, Banaszewski K (2010) Effect of heat treatment on the quantitative detection of egg protein residues by commercial enzyme-linked immunosorbent assay test kits. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(8): 4831-4838.
- Gugała A, Kurowski M, Kowalski ML (2021) Alergia na pokarmy w Polsce na tle innych krajów Europy– wyniki projektu EuroPrevall Alergia Astma Immunologia 26(1): 18-26.
- Hemmer W, Klug C, Swoboda I (2016) Update on the bird-egg syndrome and genuine poultry meat allergy. *Allergo journal international* 25: 68-75 .
- Huang L, Shao Y, Li X i in. (2021) Designing multi-epitope diagnosis of Gal d 5 and Gal d 6 based on Immunoinformatics approaches against egg yolk allergy. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 27: 1577-1588.
- Iacono ID, Tripodi S, Calvani M i in. (2012) Specific oral tolerance induction with raw hen's egg in children with very severe egg allergy: A randomized controlled trial. *Pediatric Allergy and Immunology* 24(1): 66-74.
- Jiang X, Mu H, Hsieh YHP i in. (2022) Isolation and Characterization of Chicken Serum Albumin (Hen Egg Alpha-Livetin, Gal d 5). *Foods* 11(11): 1637.
- Kovacs-Nolan J, Wei Zhang J, Hayakawa S i in. (2000) Immunochemical and Structural Analysis of Pepsin-Digested Egg White Ovomucoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 6261-6266.
- Langeland T (1983) A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. VI. Occurrence of proteins cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in hen egg yolk, and hen and chicken sera and flesh. *Allergy* 38(6): 399-412.
- Liburdi K, Benucci I, Esti M (2014) Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5): 1062-1073.
- Liu K, Chen S, Chen H i in. (2018) Cross-linked ovalbumin catalyzed by polyphenoloxidase: Preparation structure and potential allergenicity. *International Journal of Biological Macromolecule* 107: 2057-2064.
- Ma X, Liang R, Xing Q i in. (2020) Can food processing produce hypoallergenic egg? *Journal of Food Science* 85(9): 2635-2644.
- Mann K, Mann M (2008) The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* 8(1): 178-191.
- Moghtaderi M, Nabavizadeh SH, Teshnizi SH (2020) The frequency of cross-reactivity with various avian eggs among children with hen's egg allergy using skin prick test results: fewer sensitizations with pigeon and goose egg. *Allergologia Et Immunopathologia* 48(3): 265-269.
- Muake T, Yoshii K, Watanabe T i in. (2021) Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation. *Poultry Science* 100(2): 452-460.
- Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG i in. (2005) The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatric Allergy and Immunology* 16(7): 567-573.
- Pang G, Liu Y, Wang Y i in. (2021) Endotoxin contamination in ovalbumin as viewed from a nano-immunotherapy perspective. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 14(1): 1-7.
- Park H, Yoon T, Kim HH i in. (2017) Changes in the antigenicity and allergenicity of ovalbumin in chicken egg white by N-acetylglucosaminidase. *Food Chemistry* 217: 342-345.
- PiwoWAREK KŁ, Mincer-Chojnacka I, Zdanowski R i in. (2015) Alergiczna reaktywność krzyżowa– czy nowe wyzwanie dla alergologów? *Pediatrica Medycyny Rodzinnej* 11 (4): 382-390
- Quirce S, Marañón F, Umpiérrez A i in. (2001) Chicken serum albumin (Gal d 5*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy* 56(8): 754-762.

- Sicherer SH, Sampson HA (2010) Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology* 125(2): 116-125.
- Silvetti T, Morandi S, Hintersteiner M I in. (2017) Use of hen egg white lysozyme in the food industry. In *Egg innovations and strategies for improvements*: 233-242.
- Szepfalusi Z, Ebner C, Pandjaitan R i in. (1994) Egg yolk α -livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93(5): 932–942.
- Urisu A, Kondo Y, Tsuge I (2015) Hen's egg allergy. *Food Allergy: Molecular Basis and Clinical Practice* 101: 124-130.

6. Etologiczna i fizjologiczna odpowiedź organizmu na zaburzenia dobrostanu drobiu

Ethological and physiological response of the organism to poultry welfare disorders

Wojciech Madzula⁽¹⁾, Kacper Janus⁽¹⁾, Natalia Wolska⁽¹⁾, Anastasiya Ramankevich⁽²⁾, Kamil Drabik⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: prof. dr hab. Justyna Batkowska, dr inż. Kamil Drabik

Słowa kluczowe: kanibalizm; kortyzol; pterofagia

Streszczenie

Celem pracy było przeanalizowanie najczęściej spotykanych fizjologicznych i behawioralnych objawów zaburzenia dobrostanu u drobiu. Opisano najważniejsze zmiany fizjologiczne i behawioralne zachodzące w odpowiedzi na zaburzenie dobrostanu drobiu, które mogą być wykorzystane jako wskaźnik oceny poziomu dobrostanu. Monitorowanie poziomu dobrostanu drobiu i zapewnienie odpowiednich warunków hodowlanych są kluczowe dla przemysłu drobiarskiego, ponieważ dobrostan zwierząt jest istotny nie tylko dla samych zwierząt, ale także dla zapewnienia wysokiej jakości pozyskiwanych od nich produktów spożywczych.

1. Wstęp

Dobrostan to stan, który charakteryzuje się utrzymaniem homeostazy organizmu, uwzględniając dobre samopoczucie oraz prawidłowe funkcjonowanie zwierzęcia. Zaburzenia tego stanu manifestują się poprzez zachowania zwierzęcia, które są odpowiedzią na zmiany fizjologiczne towarzyszące zaburzeniom, przede wszystkim na wydzielanie hormonów odpowiedzialnych za stres. Dobrostan drobiu jest kluczowym zagadnieniem w chowie i hodowli, wpływającym na zdrowie i jakość życia zwierząt. Fizjologicznie zaburzenia dobrostanu mogą być związane z chorobami, niedoborami pokarmowymi, problemami z układem oddechowym czy dyskomfortem wynikającym z nieprawidłowych warunków środowiskowych. Jednakże, zaburzenia dobrostanu drobiu mogą objawiać się również poprzez zmianę zachowania. Behawioralne objawy to m.in.. zaburzona aktywność, agresja między osobnikami, pterofagia, kanibalizm, picie wody w nadmiarze lub zbyt małe jej spożycie, stereotypowe ruchy czy apatia. Ocena dobrostanu obejmuje zdrowie ogólne, odpowiednią dietę i warunki środowiskowe oraz kontrolę chorób.

2. Przegląd literatury

2.1 Fizjologiczna odpowiedź na zaburzenie homeostazy

Zaburzenia dobrostanu mogą rzutować niemal na wszystkie aspekty życia zwierząt. U podstaw znajdują się parametry fizjologiczne bezpośrednio związane z zaburzeniami homeostazy. Wymienić wśród nich należy przede wszystkim zwiększone poziomy tak zwanych hormonów stresu (kortyzol, kortykosteron), ale również zaburzenia proporcji elementów morfotycznych krwi, jak zmiana stosunku heterofili do limfocytów czy zmiany poziomu aktywności niektórych enzymów wątrobowych lub odpowiedzialnych za status oksydacyjny organizmu.

Mówiąc o dobrostanie w chowie i hodowli drobiu istotnymi elementami wydaje się przede wszystkim zapewnienie ptakom odpowiednich warunków środowiska, a także żywienia zaspokajającego potrzeby fizjologiczne i produkcyjne ptaków. Jeśli nawet jeden z tych szeroko pojętych aspektów ulegnie zachwianiu bardzo często dochodzi do zaburzenia homeostazy. Przez homeostazę rozumie się utrzymanie równowagi szerokiego spektrum wskaźników biochemicznych

niezbędnych do poprawnego funkcjonowania danego organizmu. Istotne jest to, iż każdy organizm jest inny, czy to ze względu na genotyp czy też osobnicze przystosowanie, a więc wartości te nigdy nie są identyczne, ale w pewnym przedziale dany wskaźnik nigdy nie powinien przekraczać określonych norm (pH, temperatura, dostępność substratów, ciśnienie osmotyczne powodujące przepływ przez błony biologiczne).

Zaburzenie homeostazy może wynikać m.in. ze stresu, ma on objawy zarówno fizjologiczne, jak i behawioralne, aczkolwiek często trudno to określić u zwierząt. By upewnić się, stres wystąpił możliwe jest zbadanie poziomu hormonów takich jak kortykosteron i aldosteron czy kortyzol. Ich podwyższony poziom wskazuje na stres, ale należy pamiętać, że pewne stężenia tych hormonów są fizjologiczne (Marć-Pieńkowska i in. 2014), np. koncentracja kortykosteronu w organizmach ptaków jest 100-krotnie większa niż stężenie kortyzolu (Palme i in. 1999, Puvadolpirod i Thaxton 2000, De Jong i in. 2001), co należy brać pod uwagę podczas dokonywania oceny stresu.

Produkcja znacznych ilości glikokortykoidów dość szybko doprowadza do deficytu cholesterolu w nadnerczach (Marć-Pieńkowska i in. 2014). Ponieważ jest on niezwykle ważnym substratem niezbędnym do produkcji witaminy D i kwasów żółciowych długotrwały lub intensywny stres może mieć negatywny wpływ na trawienie tłuszczu. Ponieważ tłuszcze są związkami wysokoenergetycznymi, ich brak w diecie może doprowadzić do rozpoczęcia katabolizmu białek i postania stresu indukowanego brakiem substancji odżywczych (Hatch 2012). Puvadolpirod i Thaxton (2000) wykazali, że znaczny wzrost adrenokortykotropiny spowodował zróżnicowanie w masie tych kurcząt broilerów. Masa ciała, śledziony i grasicy malała, natomiast masa wątroby rosła wykazując w szczytowym momencie dwukrotność masy wątroby ptaków z grupy kontrolnej, która nie była poddana działaniu adrenokortykotropiny. Wraz z czasem jaki upłynął od aplikacji adrenokortykotropiny masa narządów zmniejszała się wracając do normy. Wzrost masy wątroby łączy się przede wszystkim z działaniem kortykosteronu, który bezpośrednio wpływa na jej wzrost a także zwiększa stężenie glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych, trójglicerydów i lipoprotein VLDL (bardzo niskiej gęstości) we krwi.

Spadek masy ciała to też odpowiedź na zbyt długie wystawianie organizmu na działanie kortykosteronu. Jego wpływ na metabolizm białkowy doprowadza do wzrostu proteolizy białek mięśni, a na skutek przyspieszenia deaminacji zmniejsza się stężenie aminokwasów we krwi. Efektem takiego działania jest zwiększone wydalanie azotu w moczu i stopniowa degradacja masy mięśniowej.

W dzisiejszych czasach powodami stresu mogą być zmiany w stadach, zmiany żywieniowe i przede wszystkim transport, który łączy zmienną temperaturę z ściśnięciem i powoduje możliwe obrażenia mechaniczne. Równie ważnym czynnikiem wywołującym stres jest zbyt duża obsada ptaków, co może przyczyniać się do nadmiernego wydziobywania piór (Frieske i Mroczowski, 2014) i/lub kanibalizmu. Zauważono, że czynniki powodujące ból w trakcie uszkodzeń mechanicznych i chemicznych, inicjują przyspieszenie akcji serca, zmniejszenie pobrania paszy, a wyrwanie piór zmniejsza ruchliwość kur i stanowi próbę tłumienia bólu, są to efekty nie korzystne i wysoce stresogenne.

Z tych powodów niezwykle istotnym jest zachowanie możliwie najniższego poziomu stresu podczas chowu i hodowli drobiu, gdyż jest to nie tylko kosztowne, ale także ma to niekorzystny wpływ na zdrowie ptaków, a także jakość pozyskiwanych surowców.

2.2 Regulacja hormonalna

Jak wspomniano wcześniej, bardzo ważnym wskaźnikiem fizjologicznym, który ulega zmianie przy zaburzeniu poziomu dobrostanu, jest poziom hormonów we krwi. Przede wszystkim są to tzw. hormony stresu tj. kortyzol, kortyzon i kortykosteron (De Jong i in. 2001). Jako, że są to glikokortykosteroidy, są one produkowane w warstwie pasmowatej kory nadnerczy. Ich prekursorem są estry cholesterolu, których spadek odnotowano u brojlerów po leczeniu hormonem adrenokortykotropowym (Siegel i in. 1960).

Hormony stresu odpowiadają między innymi za takie reakcje organizmu jak zwiększanie poziomu glukozy we krwi, co jest wskazane w gwałtownej reakcji na stres. W czasie przemian glukozy uwalniana jest energia z rozerwaniem wiązania pirofosforanowego wysokoenergetycznego związku, adenozyntrifosforanu (ATP), która pozwala zwierzęciu na atak lub ucieczkę, a także jest

ona istotna w takich sytuacjach jak poród czy kopulacja (White i Porterfield, 2012). Zwiększony poziom glikokortykosteroidów pobudza również wydzielanie erytropoetyny, której głównym zadaniem jest produkcja czerwonych krwinek, mających na celu odpowiednie dotlenienie tkanek w sytuacjach stresowych. Warto jednak zaznaczyć, że w przypadku długotrwałego stresu stężenie kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu utrzymuje się na znacząco niższym poziomie, co skutkuje działaniem prozapalnym oraz immunosupresyjnym. Wówczas ptaki, w szczególności te hodowlane, stają się bardziej podatne na zakażenia, obserwowane są problemy z wynikami reprodukcyjnymi a także choroby autoimmunologiczne (Möstl i Palme, 2002).

Jedną z najlepszych nieinwazyjnych metod oceny poziomu kortyzolu jest badanie metabolitów w kale. Pozwala to na dokładną analizę stężeń tego hormonu. Natomiast metodą nieefektywną jest ocena poziomu kortyzolu z pobranej krwi, ponieważ ukłucie igłą powoduje natychmiastową reakcję ptaka na stres, co skutkuje szybkim wyrzutem kortyzolu i jego pochodnych, czyli kortykosteronu tuż po schwytaniu (Schwabl i in. 1991).

Regulacja hormonalna ma również wpływ na zmiany w proporcjach składników krwi, przede wszystkim zależność między liczebnością heterofili a limfocytów (Dufva i in. 1996). Ich pomiar również jest wiarygodnym wskaźnikiem poziomu stresu u zwierzęcia (Driver, 1981). Działanie kortykosteronu chwilę po reakcji stresowej ptaka powoduje wzrost ilości heterofili przy spadku ilości limfocytów (Müller i in. 2011).

2.3 Behawioralne zaburzenia drobiu wynikające z niewłaściwego środowiska bytowania

Oprócz biochemicznych skutków zaburzenia homeostazy ptaki często wykazują objawy w postaci zaburzeń behawioralnych. Wśród najczęściej spotykanych, wynikających z czynników środowiskowych, zaburzeń możemy wyróżnić: agresję, stereotypie, polegające np. na nadmiernym dziobaniu bez pobierania paszy, wzmożonej wokalizacji i ruchliwości, pterofagii (wydziobywanie piór) oraz kanibalizmie.

Jedną z najłatwiejszych do zauważenia stereotypii jest pterofagia ponieważ drób zaczyna tracić pióra na skutek dziobania. Jeśli stres jest stale na wysokim poziomie pterofagia przekształca się w kanibalizm i ptaki zaczynają wydziobywanie odkrytych (nieopierzonych) części ciała, przede wszystkim okolic steku, grzebieni, koralu i indyków. Stanowi to nagły problem, gdyż na skutek uszkodzeń zwiększa się pobór paszy, która zostanie wykorzystana przede wszystkim by wyleczyć powstałe rany i zwalczyć ryzyko infekcji. Zużyta dodatkowa pasza generuje dodatkowe koszty często stanowiąc często 10 a czasem 40% kosztów ogólnych (Urban-Chmiel, 2014. Jones i in. (2004) wykazali, że ptaki z linii wykazującej niski (LFP), a nie wysoki poziom wydziobywania piór (HFP) wykazywały większą towarzyskość (motywowacę do przebywania w pobliżu innych osobników) i pasywny styl "radzenia sobie". Wysoka towarzyskość i bierność były również negatywnie związane z FP (feather pecking – wydziobywanie piór) u dorosłych osobników. Natomiast przycinanie piór kurom w celu naśladowania wyników FP wywoływało dziobanie i kanibalizm, nawet u ptaków, które wcześniej nie wykazywały FP. Społeczna transmisja łagodnego FP miała miejsce, gdy ptaki LFP i HFP były trzymane razem. Delikatne dziobanie może prowadzić do jego ciężkiej postaci.

Kanibalizm jest powszechnym problemem produkcji drobiarskiej, może wystąpić w każdym systemie utrzymania ptaków, a czynnikami mu sprzyjającymi mogą być uwarunkowania genetyczne lub środowiskowe, związane z utrzymaniem drobiu (Urban-Chmiel, 2014). Często pojawia się w stadach utrzymywanych w chowie klatkowym. Utrzymywanie drobiu w tym systemie może powodować niemożność zaspokojenia wielu potrzeb behawioralnych, takich jak dziobanie, grzebanie w ziemi lub ściółce, poszukiwanie pokarmu czy ruch. Ptaki nie mając możliwości w sposób naturalny zaspokoić potrzeby dziobania zaczynają kierować go na inne osobniki, powodując okaleczenia. Brak wystarczającej przestrzeni i duże zagęszczenie wywołuje stres, który dodatkowo napędza zachowania agresywne. Problem ten nie dotyczy jedynie systemów klatkowych, ale także ściółkowych wskazując na jego bardzo zróżnicowaną etiologię (Bombik i in. 2013). W stadach kur niosek zaobserwowano, że po śmierci jednego z osobników na skutek kanibalizmu pojawia się tendencja do częstszych tego typu zachowań patologicznych w obrębie tej samej i sąsiadujących klatek. Kanibalizm może być więc wynikiem uczenia się ptaków od innych osobników stada, dlatego wskazane jest szybkie reagowanie na pojawienie się tego zjawiska w stadzie (Cloutier i in. 2001). Problem kanibalizmu może też mieć

podłoże w nieprawidłowym żywieniu zwierząt. Prowadzić do występowania tego typu skłonności może dieta uboga w białko pochodzenia zwierzęcego (Van Krimpen i in. 2005).

Kanibalizm, będący skutkiem zaburzonego dobrostanu, wywołuje nie tylko straty ekonomiczne ze względu na podwyższoną śmiertelność, ale jednocześnie obniża poziom dobrostanu (Lambton i in. 2015). Zachowania kanibalistyczne powodują ból, przez co łamią trzecią zasadę pięciu wolności, od bólu, ran i chorób (Meseret, 2016). Skutkują również wywoływaniem stresu i dyskomfortu, zarówno psychicznego, jak i fizycznego wśród stada. Wiele czynników powodujących kanibalizm jest jednocześnie jego skutkami (Meseret, 2016).

Profilaktyka skłonności kanibalistycznych obejmuje przede wszystkim zapewnienie urozmaicenia środowiska i warunków bytowania zwierząt. Czynnikiem obniżającym patologiczne zachowania jest dobranie odpowiedniej ściółki, dzięki której ptaki są w stanie zaspokajać swoje naturalne potrzeby (grzebanie, szukanie pożywienia) i wykazują mniejsze zainteresowanie innymi osobnikami (Nicol i in. 1999). Przeprowadzono badania, które wykazały, że mniejsza liczba ptaków w stadzie powoduje rzadsze występowanie zachowań agresywnych (Sosnowka-Czajka i Skomorucha, 2020).

Jednym z przykładów naturalnych zachowań drobiu są zachowania agresywne, w tym agresja terytorialna, samce konkurują ze sobą o dominację i dostęp do zasobów. Ważne jest, żeby kontrolować zachowania agresywne w stadach użytkowych i monitorować ilość czasu, jaką ptaki poświęcają na ten typ zachowań. Zwiększona agresja u ptaków jest częstym skutkiem zaburzonego dobrostanu zwierząt. Relacje agonistyczne pojawiają się w pierwszych tygodniach życia podczas walki o zasoby, osobniki żyjące w grupach uczą się ich i je zapamiętują, a wykorzystują, gdy osiągają dorosłość (Queiroz i Cromberg, 2006). Osobnikizymane po wykluciu w izolacji wykazują zachowania agresywne wcześniej i w większym stopniu niż osobniki dorastające w grupach (Raihan i in. 2017). Na występowanie zachowań agresywnych ma duży wpływ stres środowiskowy, który powodowany jest niewłaściwymi warunkami w czasie chowu i hodowli. Nieprawidłowości powoduje również utrzymywanie zwierząt w ciemności lub poddawanie ich nadmiernej ekspozycji na sztuczne światło. Czynniki napędzającymi agresję są: ograniczona, niewystarczająca ilość paszy (złamanie wolności od głodu i pragnienia), nagradzanie osobników wykazujących agresję, zbyt mała przestrzeń osobista (Queiroz i Cromberg, 2006).

Ponadto ptaki spędzają różną ilość czasu dziobiąc bez jedzenia, co określa się jako stereotypowe zachowanie dziobania. Są one znacznie częściej odnotowywane w klatkach bateryjnych niż w wolierze (Tanaka i Hurnik, 1992). Informacje dotyczące występowania stereotypii i czasu poświęconego na te zachowania mogą być przydatne do zrozumienia, jak lepiej zaprojektować miejsce utrzymania, aby zaspokoić naturalne potrzeby ptaków w zakresie pobierania pożywienia i przejawiania zachowań z tym związanych. Zachowanie poszczególnych ptaków przy karmidło, jeśli zostanie określone ilościowo, może stanowić podstawę porównawczą do oceny alternatywnych strategii zarządzania i utrzymywania (Gates i Xin, 2008).

3. Podsumowanie

Zaburzenia dobrostanu u ptaków mogą mieć poważne konsekwencje dla ich zdrowia i produktywności. Te problemy mogą mieć fizjologiczne, jak i behawioralne odzwierciedlenie. Objawy zaburzeń dobrostanu ptaków są różnorodne, obejmując zmiany w zachowaniach, wyglądzie fizycznym oraz funkcjach życiowych.

Wpływają one na wydajność produkcji, jakość mięsa lub jaj oraz ogólną kondycję populacji ptaków. Dlatego ważne jest monitorowanie ich dobrostanu poprzez zapewnienie odpowiednich warunków hodowlanych, właściwego żywienia, profilaktyki zdrowotnej i opieki weterynaryjnej.

4. Literatura

- Bombik T, Bombik E, Biesiada-Drzyzga B (2013). Dobrostan zwierząt w aspekcie kryteriów i metod oceny. *Przegląd Hodowlany*, 81(6): 25-27
- Cloutier S, Newberry RC, Honda K. i in. (2002). Cannibalistic behaviour spread by social learning. *Animal Behaviour*, 63(6): 1153-1162.

- de Jong IC, van Voorst AS, Erkens JH i in. (2001). Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broiler breeders using intravenous cannulation. *Physiology & behavior*, 74(3): 299-304.
- Driver EA (1981). Hematological and blood chemical values of mallard, *Anas p. platyrhynchos*, drakes before, during and after remige moult. *Journal of Wildlife Diseases*, 17(3): 413-421.
- Dufva R, Allander K (1996). Variable effects of the Hen Flea *Ceratophyllus gallinae* on the breeding success of the Great Tit *Parus major* in relation to weather conditions. *Ibis*, 138(4): 772-777.
- Frieske A, Mroczkowski S (2014). Ból w chowie drobiu. *Medycyna Weterynaryjna*, 70(06): 342-347.
- Gates RS, Xin H (2008). Extracting poultry behaviour from time-series weigh scale records. *Computers and electronics in agriculture*, 62(1): 8-14.
- Hatch KA (2012). The Use and Application of Stable Isotope Analysis to the Study of Starvation, Fasting, and Nutritional Stress in Animals: 337-364. W: McCue, M. (eds) *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jones RB, Blokhuis HJ, De Jong IC i in. (2004). Feather pecking in poultry: the application of science in a search for practical solutions. *Animal Welfare*, 13(S1): 215-219.
- Lambton SL, Knowles TG, Yorke C I in. (2015). The risk factors affecting the development of vent pecking and cannibalism in free-range and organic laying hens. *Animal Welfare*, 24(1): 101-111.
- Marć-Pieńkowska J, Topolińska P, Mitura K (2014). Poziom stresu wskaźnikiem dobrostanu zwierząt. *Wiadomości Zootechniczne*, 2: 36-42.
- Meseret S (2016). A review of poultry welfare in conventional production system. *Livestock Research for Rural Development*, 28(2): 234-245.
- Möstl E, Palme R (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2): 67-74.
- Müller C, Jenni-Eiermann S, Jenni L (2011). Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Functional Ecology*, 25(3): 566-576.
- Nicol CJ, Gregory NG, Knowles TG i in.. (1999). Differential effects of increased stocking density, mediated by increased flock size, on feather pecking and aggression in laying hens. *Applied Animal Behaviour Science*, 65(2): 137-152.
- Palme R, Robia CH, Messmann S, i in. (1999). Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 86(7): 237-241.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP (2000). Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poultry Science*, 79(3): 363-369.
- Queiroz SA, Cromberg VU (2006). Aggressive behavior in the genus *Gallus* sp. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 8: 1-14.
- Raihan SM, Tsudzuki M, Kawakami SI (2017). Screening of the behavioral tests for monitoring agonistic behavior of layer chicks. *The Journal of Poultry Science*, 54(4): 296-302.
- Schwabl H, Bairlein F, Gwinner E (1991). Basal and stress-induced corticosterone levels of garden warblers, *Sylvia borin*, during migration. *Journal of Comparative Physiology B*, 161: 576-580.
- Siegel HS (1960). Effect of population density on the pituitary-adrenal cortical axis of cockerels. *Poultry Science*, 39(2): 500-510.
- Sosnowska-Czajka E, Skomorucha I (2020) 3. Systemy utrzymania a produktywność i dobrostan drobiu: 38-58. W: *Chów i hodowla zwierząt gospodarskich na przestrzeni 70 lat – problemy i wyzwania*, Kraków.
- Tanaka T, Hurnik JF (1992). Comparison of behavior and performance of laying hens housed in battery cages and an aviary. *Poultry Science*, 71(2): 235-243.
- Urban-Chmiel R (2014). Pterofagia oraz kanibalizm jako następstwa obniżonego poziomu dobrostanu u drobiu. *Życie Weterynaryjne*, 89(09): 756-759.

- Van Krimpen MM, Kwakkel RP, Reuvekamp BFJ i in. (2005) Impact of feeding management on feather pecking in laying hens. *World's Poultry Science Journal* 61(4): 663-686
- White B, Porterfield S (2012). Endocrine and reproductive physiology. W: *Mosby physiology monograph series* (with student consult online access): 27-43. Elsevier Health Sciences.

7. Skorupa jaja i jej rola w procesie rozwoju zarodka

The eggshell and its role in the embryo development process

Szymon Grzejszczak⁽¹⁾, Sofiia Danko⁽¹⁾, Marta Mickiewicz⁽¹⁾, Rafał Banaszkiewicz⁽¹⁾, Karolina Wengerska⁽²⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Justyna Batkowska, dr inż. Kamil Drabik

Sofiia Danko: sofia.danko@gmail.com

Słowa kluczowe: kutykula, warstwa palisadowa, warstwa brodawkowa, błony podskorupowe, formowanie skorupy

Streszczenie

Skorupa jaja jest jego jedyną częścią nieorganiczną. Charakteryzuje się ona skomplikowaną, doskonale zorganizowaną, wielowarstwową strukturą, której każda część pełni specyficzne funkcje. Najbardziej zewnętrzną częścią skorupy jest kutykula, która zapobiega przedostawaniu się drobnoustrojów do wnętrza jaja. Warstwa palisadowa oraz warstwa brodawkowa odpowiadają za wytrzymałość, natomiast błony podskorupowe za utrzymanie stabilności skorupy oraz zabezpieczanie treści jaja przed wnikaniem potencjalnie patogennych mikroorganizmów do wnętrza jaja. Występujące w całej skorupie pory odpowiadają za wymianę gazową pomiędzy wnętrzem jaja a środowiskiem zewnętrznym. W związku z tym można stwierdzić, że główną funkcją skorupy jaja jest ochrona rozwijającego zarodka przed czynnikami środowiskowymi. Ze względu na skład chemiczny, w którym największy udział ma węglan wapnia (ok. 94%), skorupa jaja stanowi doskonale źródło pierwiastków budulcowych dla rozwijającego się embrionu ptasiego. Celem pracy było przybliżenie budowy, składu chemicznego, procesu formowania się i funkcji poszczególnych części skorupy jaj ptasich, a także omówienie procesu przyswajania substancji budulcowych ze skorupy jaja podczas rozwoju embrionalnego.

1. Wstęp

Skorupa jaja ptaków ma bardzo złożoną strukturę, która spełnia szereg funkcji fizjologicznych. Jej pierwotną funkcją jest ochrona rozwijającego się zarodka przed czynnikami środowiskowymi, uszkodzeniami fizycznymi i mikroorganizmami (Kopacz i Drazbo 2018). Ochrona ta jest możliwa dzięki wielowarstwowej budowie. Skorupa jaja zbudowana jest z kutykuli, będącej jej najbardziej zewnętrzną warstwą, warstwy palisadowej, warstwy brodawkowej oraz dwóch błon pergaminowych (zewnętrznej i wewnętrznej). Skorupa jaja składa się głównie z związków nieorganicznych, w szczególności z węglanu wapnia (95%), oraz w śladowych ilościach związków organicznych 5% (Szeleszczuk 2013). Tak duża zawartość wapnia w składzie chemicznym skorupy jest niezbędna, gdyż około 80% wapnia w układzie kostnym pisklęcia będzie pochodziło z skorupy (Coleman i Terepka 1972; Hincke i in. 2008). Kolejną niezwykle istotną funkcją skorupy jest zapewnienie wymiany gazowej pomiędzy wnętrzem jaja a środowiskiem poprzez znajdujące się w niej liczne pory.

2. Budowa i funkcje skorupy

Kutykula jest cienką, najbardziej zewnętrzną warstwą skorupy, składającą się w 90% z białek i w 10% z węglowodanów takich jak galaktoza, fruktoza i mannoza. Kutykula odpowiada za zakończenie formowania skorupy jaja, a jej obecność na powierzchni skorupy zapewnia rozwijającemu się zarodkowi ochronę przed szkodliwymi mikroorganizmami mogącymi dostać się do wnętrza jaja poprzez pory (Bain i in. 2013, Wilson i in. 2017). Co ciekawe, nie wszystkie ptaki

wykształcają kutykulę na powierzchni swoich jaj, do tych wyjątków należą papużki faliste i pingwiny (Vieco-Galvez i in. 2021).

Obecne w skorupie jaja kurzego pory stanowią jedyną drogę wymiany gazowej pomiędzy rozwijającym się zarodkiem a środowiskiem zewnętrznym. Liczba porów, ich średnica i układ były przedmiotem wielu badań. Zimmermann i in. (2007) zasugerowali, że liczba i kształt porów są związane z okresem inkubacji, a także warunkami środowiskowymi, w których żyją ptaki, przy czym u ptaków, u których okres inkubacji jest dłuższy, liczba porów jest mniejsza. Na ogół w skorupie jaja kurzego znajduje się 7000-17000 porów o średnicy 6-26 mikronów, w związku z tym przyjmuje się, że na cm² skorupy może przypadać od 70 do 200 porów. Ich największe zagęszczenie znajduje się w tępych końcach jaja, natomiast ich najmniejsza liczba obserwowana jest w końcu ostrym. Należy jednak pamiętać, że liczba porów w skorupie jaja jest zmienna i dodatnio skorelowana z masą jaja (Tullett i in. 1977). W jajach większość ptaków obserwuje się pory o budowie lejkowatej, w przypadku jaj pingwinów oraz ptaków blaszkodziobych przyjmują one rozgałęziony w jednej płaszczyźnie kształt, natomiast u strusi i emu są one rozgałęzione we wszystkich płaszczyznach (Vieco-Galvez i in. 2021).

Warstwa palisadowa, zwana również warstwą gąbczastą, stanowi swego rodzaju rusztowanie skorupy, decydujące o jej cechach wytrzymałościowych. Składa się ona z kolumn kryształów kalcytu, które są prostopadłe do powierzchni skorupy jaja (Świątkiewicz i Koreleski 2003). Dzięki swojej budowie warstwa palisadowa jest najgrubszą częścią skorupy (Coulibaly i in. 2023). Badając związek tej warstwy z cechami wytrzymałościowymi skorupy Simons (1971) zaobserwował zależność pomiędzy szerokością kolumn kalcytu a zdolnością skorupy do odkształceń. Stwierdził, że jaja z szerokimi kolumnami krystalicznymi miały wysokie wartości deformacji, natomiast wąskie kolumny tworzyły mocniejsze skorupy jaj. Tezę tę potwierdził Schmidt (1968), który zauważył podobną analogię w przypadku jaj perliczych. Podstawę do tworzenia się warstwy palisadowej stanowi warstwa brodawkowa, która składa się z półkolistych skupisk węglanu wapnia (brodawek) osadzonych na zewnętrznej błonie podskorupowej.

W jajach kurzych występują dwie, przylegające do siebie błony podskorupowe – zewnętrzna i wewnętrzna. Składają się one z sieci włókien zbudowanych z wielu rodzajów białek. Błony te są ze sobą połączone i przylegają ściśle do skorupy niemal na całej jej powierzchni. Jedynym wyjątkiem jest tępy koniec jaja, gdzie błony podskorupowe rozdzielają się tworząc komorę powietrzną, z której rozwijający się zarodek bierze swój pierwszy oddech. Na początku inkubacji błony podskorupowe ściśle przylegają do warstwy brodawkowatej skorupy, jednak wraz z czasem połączenie to słabnie. Oprócz pełnienia funkcji w procesie mineralizacji skorupy błony podskorupowe mają za zadanie utrzymanie stabilności skorupy oraz zabezpieczanie treści jaja przed drobnoustrojami.

3. Proces formowania

Proces formowania skorupy rozpoczyna się w końcowych częściach jajowodu a dokładniej w przesmyku białym (Hincke i in. 2012). Proces ten jest jednym z najwcześniej poznanych przez ludzkość procesów mineralizacji. Odbyna się on praktycznie codziennie w zależności od dostępu światła. Formowanie skorupy wymaga od kury bardzo dużych zapasów węglanu wapnia, gdyż dziennie na wytworzenie skorupy wykorzystuje ona około 2 g tego pierwiastka (Nys i Le Roy 2018).

U kur selekcionowanych na wysoką nieśność przy zapewnieniu odpowiednich warunków środowiskowych proces uwapniania się skorupy można podzielić na 3 etapy, a łączny czas tworzenia się skorupy wynosi około 17 godzin (Nys i in. 2004). W pierwszym etapie formowania skorupy rozpoczyna się proces mineralizacji kryształów kalcytu na błonie zewnętrznej (trwa ok. 5 godzin). Rozmieszczenie miejsc krystalizacji uwarunkowane jest genetycznie i może ono wpływać na wytrzymałość skorupy. W późniejszych etapach miejsca mineralizacji przekształcają się w miejsca wzrostu warstwy brodawkowatej, a następnie poprzez ich wzrost powstaje warstwa palisadowa (Nys i in. 2004). Drugi etap formowania skorupy stanowi jeszcze szybszy wzrost warstwy palisadowej. Podczas gdy prostopadłe do tworzącej się skorupy jaja tworzą się kryształy kalcytu, to zaraz po nich w pozycji liniowej osadza się węglan wapnia, proces ten postępuje w ciągu 10 godzin (Hincke i in. 2012). Ostatni najkrótszy etap kończy proces zwapnienia (ok. 1,5 godziny). Zatrzymanie

mineralizacji następuje poprzez zetknięcie się z płynem macicznym, który w swoim składzie jest wysycony jonami wapnia (Gautron i in. 1997). Oprócz jonów wapnia w procesie formowania skorupy obserwuje się podwyższone stężenie fosforu, który wykrywalny jest na powierzchni skorupy. Dzieje się tak, gdyż aniony fosforowe, a także białkowe związki fosforanowe mogą stanowić inhibitory wytrącania się węglanu wapnia, co pociąga za sobą wzrost kryształów (Gautron, i in. 2001).

W końcowym etapie formowania skorupy zyskuje ona swój kolor. Barwniki odpowiedzialne za kolor podlegają syntezie w gruczole skorupowym jajowodu (Wang i in. 2007). Barwa skorupy jest cechą charakterystyczną dla poszczególnych ras. Wyróżnia się trzy podstawowe barwniki: biliwerdynę, jej chelat z cynkiem oraz protoporfirynę (Kennedy i in. 1976). W przypadku jaj o niebieskiej lub zielonej skorupie w większych przeważają biliwerdyna i jej chelaty z cynkiem, natomiast w jajach o brązowej skorupie większy udział stanowi protoporfiryna (Zhao i in. 2006). Barwa skorupy ma duży wpływ na przyszłą wartość wytworzonego jaja. Jaja o ciemnym zabarwieniu skorupy cechują się zazwyczaj jej większą grubością, co prawdopodobnie spowodowane jest zależnością między procesem wapnienia skorupy, a odkładaniem się w niej barwników (Ingram i in. 2008). U przepiórek japońskich, u których barwa skorupy jest niezwykle zróżnicowana, jaja mogą mieć barwę niebieską, czarną, białą, brązową oraz nakrapianie, co jednak nie wpływa znacząco na ich jakość konsumpcyjną. Niemniej jednak, niektórzy autorzy zauważyli różnice w parametrach wylęgowości jaj przepiórczych o różnym kolorze skorup (Drabik i in. 2020).

4. Skład chemiczny skorup jaj

Skorupa jaja kurzego składa się w 94% z węglanu wapnia, 4% substancji organicznych, 1% fosforanu wapnia oraz 1% węglanu magnezu (Murakami i in. 2007). Finalny udział składników mineralnych w skorupie jaja kurzego wynosi ok. 6 g (Nys i in. 2004). Skład chemiczny skorupy przekłada się na jej procentowy udział w składzie jaja i, w zależności jej od wielkości, wynosi około 10 - 13% (Hanusová i in. 2015). Choć z punktu widzenia konsumenta skorupa i błony podskorupowe wydają się być tylko produktami ubocznymi, to stanowią one źródło związków biologicznie czynnych dla rozwijającego się zarodka (Nakano i in. 2003).

Według Nakano i in. (2003) w jajach kur rasy White Leghorn, zawartość popiołu wynosiła 16,07% dla odwapnionej skorupy, 0,31% dla błony zewnętrznej, natomiast w błonie wewnętrznej zawartość popiołu była niewykrywalna. Co więcej w skorupie jaja i błonach podskorupowych oznaczył on niewielką ilość kwasu uronowego (zaliczany do tzw. kwasów cukrowych powstających z aldoz, pełnią ważne funkcje biologiczne jak detoksykacja czy biotransformacja ksenobiotyków czy hormonów steroidowych), który może przyczyniać się do utrzymania odpowiedniej twardości skorupy, a także, dzięki swoim właściwościom antybakteryjnym, ochrony jaja przed drobnoustrojami. Badania wykazały, że w skorupie znajdowała się pięciokrotnie większa zawartość kwasu uronowego niż w błonach skorupy (Nakano i in. 2001). Zawartość alaniny i glicyny w przypadku skorupy jest wyższa w porównaniu do błon podskorupowych, natomiast w przypadku proliny i hydroksyproliny sytuacja jest odwrotna, to w błonach podskorupowych zawartość tych aminokwasów jest zdecydowanie większa. W przypadku leucyny minimalnie większą jej zawartość zaobserwowano w odwapnionej skorupie jaj, natomiast zawartość ta była niemal identyczna między błonami podskorupowymi (Nakano i in. 2003).

Błony skorupy zawierają 69,2% białka, 2,7% tłuszczu, 1,5% wody i 27,2% popiołu. Choć kolagen stanowi zaledwie około 10% białka, z którego składają się błony podskorupowe, to jest on podstawowym elementem zapewniającym ich kształt. Zawartość kolagenu pomiędzy wewnętrzną a zewnętrzną błoną podskorupową może się różnić. Należy zauważyć, że w przyrodzie funkcjonuje wiele typów kolagenów, których rola jest ściśle związana z budową. Do najważniejszych należą te budujące włókna fibrylarne (typ I, II, III, V) oraz budujące struktury usieciowane (typ IV, VII, X) (Bortstein i Sage, 1980). Jak podaje Shi i in. (2021) wewnętrzna błona podskorupowa zawiera zarówno kolagen typu I, jak V, w przeciwieństwie do zewnętrznej błony podskorupowej zawierającej jedynie kolagen typu I.

5. Przyswajalność substancji budulcowych

Zarodek kurzy od początku inkubacji pobiera ogromną ilość jonów wapnia, niezbędnych do prawidłowego rozwoju narządów. Skorupa jaja dostarcza ponad 80% tego kluczowego elementu budulcowego, przy czym jego największe ilości zużywane są podczas wytwarzania szkieletu, mięśni i układu nerwowego (Chien i in. 2009). Niedobór minerałów w skorupie jaja może prowadzić do zaburzeń metabolicznych, a tym samym może mieć negatywny wpływ na układ kostny, ale także odpornościowy i sercowo-naczyniowy. Co więcej, zmiany w składzie chemicznym skorupy mogą pogorszyć wyniki lęgu.

Podczas rozwoju embrionalnego szkielet wykazuje największe zapotrzebowanie właśnie na wapń. Tempo wzrostu może odgrywać fundamentalną rolę dla wzorca rozwoju szkieletu u ptaków, im szybszy wzrost, tym mniej skostniały szkielet w momencie wyklucia (Blom i Lilja 2004). Podczas rozwoju embrionalnego, do 11 doby inkubacji, wapń jest sukcesywnie mobilizowany najpierw z żółtka (które zawiera około 30 mg tego pierwiastka), a następnie ze skorupy jaja. Między 12. a 16. dobą inkubacji obserwuje się spadek masy skorupy jaja o około 300 mg, co stanowi około 120 mg wapnia i innych składników budulcowych. Proces ten ma na celu wzmocnienie szkieletu zarodka, tak by był on w stanie utrzymać wzrost masy ciała. Podczas inkubacji ze skorupy uwalnia się również 2,75 mg fosforu, 57,2 µg żelaza oraz 0,68 µg manganu, natomiast zawartość tych pierwiastków w skorupie jest bardzo niska w porównaniu do ich zawartości w żółtku (Yair i Uni 2011; Halgrain i in. 2022).

Wapń jest przekazywany ze skorupy do zarodka za pośrednictwem błony kosmówkowo-omoczniowej. Nabłonek kosmówkowy wyściela błony skorupowe i bierze udział zarówno w rozpuszczaniu wapnia z wewnętrznej części skorupy jaja, jak i w przenoszeniu rozpuszczonych jonów do zarodka przy pomocy sieci naczyń włosowatych. Mobilizacja wapnia ze skorupy odbywa się wyłącznie za pośrednictwem kosmków kosmówki. Ilość mobilizowanego wapnia jest zależna od zarówno stopnia rozbudowania kosmków, jak i od ich liczby (Karlsson i Lilja 2008). Utrata składników mineralnych ze skorupy jaja podczas resorpcji minerałów również osłabia skorupę na potrzeby procesu wyklucia, umożliwiającego pisklęciu wydostanie się ze skorupy (Chien i in. 2009).

6. Podsumowanie

Przedstawiony powyżej przegląd piśmiennictwa pokazuje, jak skomplikowaną i niezwykle istotną dla prawidłowego rozwoju zarodka jest skorupa jaja. Oprócz zapewnienia ochrony i wymiany gazowej pomiędzy środowiskiem a wnętrzem jaja, skorupa dostarcza pierwiastków mineralnych niezbędnych głównie dla prawidłowego formowania układu kostnego pisklęcia. Nie ulega zatem wątpliwości, że prawidłowa budowa skorupy oraz jej skład chemiczny mają niezwykle istotny wpływ na sukces wylęgu oraz zdrowie i jakość pozyskanych piskląt.

7. Literatura

- Blom J, Lilja C (2004) A comparative study of growth, skeletal development and eggshell composition in some species of birds. *Journal of Zoology* 262(4): 361-369.
- Chien YC, Hincke MT, McKee MD (2009) Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization. *Journal of Structural Biology* 168(3): 527-538.
- Coleman JR., Terepka AR. (1972) Fine structural changes associated with the onset of calcium, sodium and water transport by the chick chorioallantoic membrane. *The Journal of Membrane Biology* 7(1): 111-127.
- Coulibaly F, Onbaşlar EE, Bakır B i in. (2023) The effects of using UV light instead of formaldehyde in disinfection of hatching eggs on shell microbial load, embryo development, hatchability, and chick characteristics. *International Journal of Environmental Health Research* 1-11, <https://doi.org/10.1080/09603123.2023.227636>.
- Drabik K, Batkowska J, Vasiukov K i in. (2020) The impact of eggshell colour on the quality of table and hatching eggs derived from Japanese Quail. *Animals* 10(2): 264.

- Gautron J, Hincke MT, Mann K i in. (2001) Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein: isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization. *Journal of Biological Chemistry* 276(42): 39243-39252.
- Gautron J, Hincke MT, Nys Y (1997) Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connective Tissue Research* 36(3): 195-210.
- Halgrain M, Bernardet N, Crepeau M i in. (2022) Eggshell decalcification and skeletal mineralization during chicken embryonic development: defining candidate genes in the chorioallantoic membrane. *Poultry Science* 101(2): 101622.
- Hanusova E, Hrnčár C, Hanus A, Oravcová M (2015) Effect of breed on some parameters of egg quality in laying hens. *Acta Fytotechnica et Zootechnica* 18(1): 20-24.
- Hincke MT, Nys Y, Gautron J i in. (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 17(4): 1266-1280.
- Hincke MT, Wellman-Labadie O, McKee MD i in. (2008) Biosynthesis and structural assembly of eggshell component: 97-128. W. *Egg Bioscience and Biotechnology* (Mine Y). Wiley-Interscience a John Wiley & Sons, INC, Publications.
- Ingram DR, Hatten LF, Homan KD (2008) A study on the relationship between eggshell color and eggshell quality in commercial broiler breeders. *International Journal of Poultry Science* 7(7): 700-703.
- Karlsson O, Lilja C (2008) Eggshell structure, mode of development and growth rate in birds. *Zoology* 111(6): 494-502.
- Kennedy GY, Vevers HG (1976) A survey of avian eggshell pigments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 55(1): 117-123.
- Kopacz M., Drazbo A. (2018). Zmiany jakości jaj konsumpcyjnych w zależności od sposobu i czasu przechowywania. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 14(3):37-45.
- Murakami FS, Rodrigues PO, Campos CMTD i in. (2007) Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells. *Food Science and Technology* 27: 658-662.
- Nakano T, Ikawa N, Ozimek L (2001) Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. *Poultry science* 80(5): 681-684.
- Nakano T, Ikawa NI, Ozimek L (2003) Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science* 82(3): 510-514.
- Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM i in. (2004) Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol* 3(6-7):549-562.
- Nys Y, Le Roy N (2018) Calcium homeostasis and eggshell biomineralization in female chicken: 361-382. W. *Vitamin D* (Hewison M, Bouillon R, Giovannucci E I in.). Academic Press Inc
- Schmidt WJ 1968 Zur Eischalenstruktur beim Perlhuhn (*Numida meleagris*). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 86:444-452.
- Shi Y, Zhou K, Li i in. (2021) Avian eggshell membrane as a novel biomaterial: a review. *Foods* 10(9): 2178.
- Simons PCM (1971) Structure of eggshell and membranes [W:] Simons PCM *Ultrastructure of the hen eggshell and its physiological interpretation*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, the Netherlands.
- Świątkiewicz S, Koreleski J (2003) Wpływ czynników żywieniowych na jakość skorupy jaja. *Postępy Nauk Rolniczych* 50: 177-189.
- Szeleńczuk Ł. (2013). Skorupa jaja kurzego – niedoceniane źródło wapnia. *Lek w Polsce* 23(9): 64-71.
- Tullett SG., Board RG (1977) Determinants of avian eggshell porosity. *Journal of Zoology* 183: 203-211.
- Vieco-Galvez D, Castro I, Morel PC I in. (2021) The eggshell structure in apteryx; form, function, and adaptation. *Ecology and Evolution* 11(7): 3184-3202.
- Wang XT, Deng XM, Zhao CJ i in. (2007) Study of the deposition process of eggshell pigments using an improved dissolution method. *Poultry Science* 86(10): 2236-2238.
- Wilson PW, Suther CS, Bain M i in. (2017) Understanding avian egg cuticle formation in the oviduct: a study of its origin and deposition. *Biology of Reproduction* 97(1): 39-49.

- Yair R, Uni Z (2011) Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poultry Science* 90(7): 1523-1531.
- Zhao R, Xu GY, Liu ZZ i in. (2006) A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poultry Science*, 85(3), 546-549.
- Zimmermann K, Hipfner JM (2007) Egg size, eggshell porosity, and incubation period in the marine bird family Alcidae. *The Auk* 124(1): 307-315.

8. Analiza zmienności opadów na wybranych zlewniach w ostatnim trzydziestoleciu

Analysis of precipitation variability in selected catchments over the last three decades

Patrycja Stanowska

Szkoła Doktorska Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza

Opiekun naukowy: prof. dr hab. inż. Józef Dziopak, Promotor pomocniczy: dr inż. Mariusz Starzec
Stanowska Patrycja: pat.stanowska@gmail.com

Słowa kluczowe: zmienność i wysokość, opad roczny, opad atmosferyczny

Streszczenie

Opad jako zjawisko trudne do przewidzenia, generuje inżynierom wiele problemów podczas projektowania systemów odwodnieniowych i obiektów z nimi współdziałających. Wybór wysokości opadu rocznego wpływa na wartość natężenia przepływu miarodajnego do ustalania geometrii kanałów i kubatury obiektów retencyjnych. Błędne przyjęcie tego parametru powoduje przyjęcie kanałów

o niewystarczających gabarytach, co w konsekwencji prowadzi do częstszych podtopień, albo generuje niepotrzebnie większe koszty inwestycyjne. Zatem kluczowym aspektem jest właściwy wybór opadu, który zapewni prawidłowe zaprojektowanie systemów kanalizacyjnych. Celem badań była analiza kształtowania się wysokości opadów atmosferycznych na przestrzeni lat 1991 – 2022. W artykule uwzględniono opady z północno-zachodniej, centralnej i południowo-wschodniej Polski. Dane o opadach pochodzą z Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej. Wybrano celowo różne odległe rozmieszczenie stacji pomiarowych, aby porównać otrzymane wyniki badań i nadać im znaczenie aplikacyjne. W artykule omówiono kształtowanie się opadu rocznego i miesięcznego dla wybranych lat. Rozważaniu poddano w jakim miesiącu najczęściej odnotowano opad maksymalny w skali roku. Analizie poddano także jak często na przestrzeni lat pojawił się dany opad maksymalny roczny. Pozwala to w wyborze odpowiedniej częstotliwości pojawienia się deszczu krytycznego ustalanego podczas projektowania systemów kanalizacji deszczowej. Na podstawie wyników można stwierdzić, że najniższe opady występują w centralnej Polsce, średnio 500 mm, nieco wyższe wartości są dla regionu północno-zachodniego około 800 mm i najwyższe dla południowo-wschodniej Polski, bo około 950 mm. Rozbieżność wyników potwierdza, że uwarunkowania lokalne mają istotny wpływ na wysokość opadów. Dlatego tak ważnym elementem procesu projektowego jest prawidłowe ustalenie wysokości opadu ze względu na region planowanej inwestycji.

1. Wstęp

Wody opadowe na terenach naturalnych, nieprzekształconych przez człowieka w większości infiltrują do gruntu, a określona ich ilość odpływa do cieków. W przypadku wystąpienia opadu na terenach zurbanizowanych, gdzie powierzchnia jest utwardzona dochodzi do zaburzenia naturalnej równowagi pomiędzy zjawiskami opadu, a procesami spływu, infiltracji i parowania (Słyś 2013). W konsekwencji prowadzi to niekiedy do ustalania nadmiernych dopływów wód opadowych do projektowanej sieci kanalizacyjnych i urządzeń. W innej sytuacji niedoszacowanie powoduje częstsze podtopienia i wylanie na powierzchnię wód opadowych, a także znaczne straty gospodarcze. Inżynierowie, w celu uniknięcia błędów projektowych przyjmują odpowiednie założenia dotyczące stopnia utwardzenia powierzchni spływu, wysokości opadu i częstotliwości jego pojawienia się (Myhre i in. 2019; Nachshon i in. 2016). Niestety, błędne ustalenia skutkują złym doborem wymiarów przewodów i obiektów retencyjnych. Drugim niekorzystnym zjawiskiem utrudniającym dobranie odpowiednich wartości wysokości opadów są coraz częściej obserwowane zmiany (cykle) klimatyczne, w tym susze i deszcze nawalne, które również zaburzą proces równowagi obiegu wody w przyrodzie. Według prognoz coraz częściej będą występować znaczne różnice dotyczące

wysokości opadu pomiędzy okresami deszczowymi a suchymi (Fischer i Knutti 2016; Szyga-Pluta 2018; Tomczyk i Szyga-Pluta 2018). Dwoma podstawowymi przyczynami zmian w bilansie dopływu wód opadowych do sieci kanalizacyjnej są więc postępująca urbanizacja i zmieniające się na niekorzyść ekstremalne zjawiska pogodowe (Humbal i in. 2023; Nowakowska i Kotowski 2017; Starzec i in. 2020).

Woda znajduje się w ciągłym obiegu hydrologicznym, na który składa się szereg zjawisk, takich jak: parowanie wód oceanów, mórz, jezior, rzek, transpiracja, parowanie z gleby, sublimacja, infiltracja do gruntu, spływ powierzchniowy, intercepcja itd. Opad jest zjawiskiem trudnym do scharakteryzowania, bowiem jest uwarunkowany dużą zmiennością, zarówno czasową jak i przestrzenną (Szyga-Pluta 2018). Od wielu lat prowadzone są badania dotyczące opadów atmosferycznych. Pomimo wielu prac zajmujących się tym problemem, większość potwierdza dużą zmienność opadu, trudną do opisanego jednoznacznie (Czarnecka i Nidzgorska-Lencewicz 2012; Tomczyk i Szyga-Pluta 2018; Woś 2010; Żmudzka 2009). Dotychczas najbardziej znane modele opadowe stosowane do wymiarowania kanalizacji w Polsce to model opadowy Błaszczyka, Bogdanowicz i Stachy, Chomicza, Lombarda (Kotowski i in. 2010). Modele te nie zawsze mogą być użyte w każdym przypadku, a mogą być nawet uznawane za przestarzałe, przez co należy uważnie rozważyć wybór modelu opadowego (Kotowski i in. 2009; Węglarczyk 2013). Sytuacja ta zmusza projektantów do udoskonalenia metod projektowych i zasad wymiarowania systemów deszczowych, a także ostrożnego doboru parametrów wejściowych dla zlewni objętych opracowaniem projektowym (Kordana – Obuch i Starzec 2020; Starzec i in. 2014). W Polsce obserwowane są znaczne różnice w wysokości opadu rocznego ze względu na lokalizację systemu odwodnieniowego (Licznar i in. 2020). Dodatkowo, widoczne są różnice w wysokościach opadów miesięcznych. W artykule dokonano analizy zmienności opadów na przestrzeni ostatniego trzydziestolecia (1991-2022) na obszarze trzech różnych lokalizacji zlewni na obszarze Polski. Ma to na celu wykazanie odmiennych charakterystyk zmienności czasowej, jak i przestrzennej opadów w Polsce.

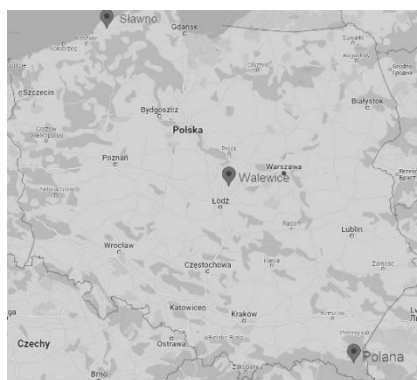
2. Materiał i Metody

Celem badań była analiza ilościowa kształtowania się wysokości opadów atmosferycznych na przestrzeni lat 1991 – 2022 na terenie trzech różnych lokalizacji w Polsce. Dane o opadach pochodzą ze strony internetowej Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej. Są to meteorologiczne dane bazujące na pomiarach wysokości opadu na wybranych stacjach meteorologicznych. Analizie poddano charakterystyki opadów pojawiających się w różnych lokalizacjach, które na potrzeby artykułu oznaczono kolejno: *I*, *II* i *III*.

Rozważono następujące stacje meteorologiczne: Sławno, Walewice i Polana (Tab.1). Wybrano różne odległe rozmieszczenie stacji pomiarowych w celu porównania otrzymanych wyników pod względem umiejscowienia ich na mapie Polski (Rys.1). Lokalizacja *I* znajduje się w północno-zachodniej części Polski, w mieście Sławno i jest położona na Równinie Słupskiej w województwie zachodnio -pomorskim. Druga analizowana lokalizacja *II* posiada stację meteorologiczną w centralnej części Polski w Walewicach, w województwie łódzkim. Natomiast trzecia, poddana analizie lokalizacja *III* znajduje się w południowo-wschodniej Polsce we wsi Polana, w województwie podkarpackim.

Tab.1. Analizowane stacje meteorologiczne, z których pochodzą dane opadowe.

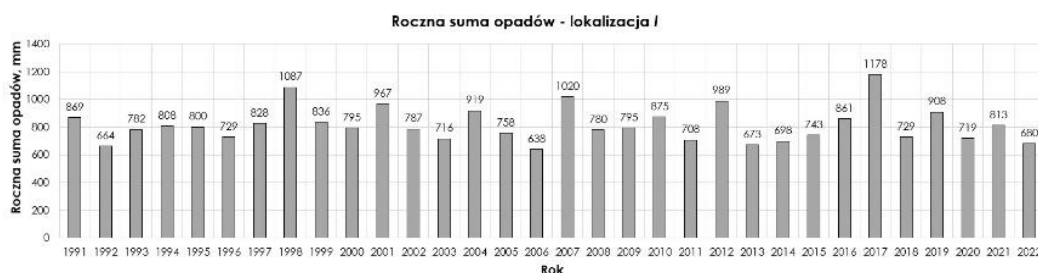
Oznaczenie	Kod stacji	Nazwa stacji	Lokalizacja
<i>I</i>	254160030	Sławno	Województwo zachodnio-pomorskie
<i>II</i>	252190160	Walewice	Województwo łódzkie
<i>III</i>	249220220	Polana	Województwo podkarpackie



Rys. 1. Lokalizacja zlewni poddanych analizie.

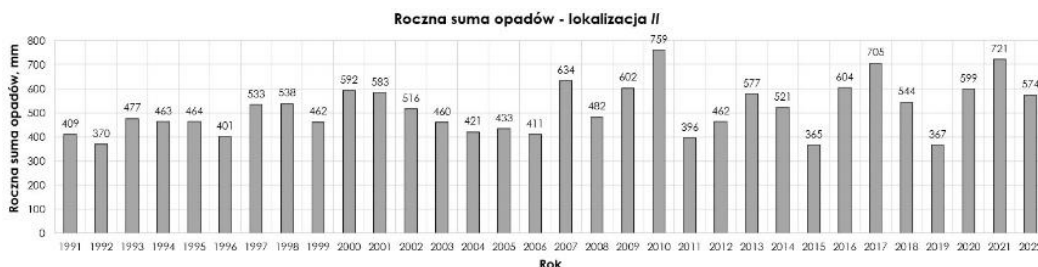
3. Wyniki i dyskusja

W pierwszej kolejności analizie poddano kształtowanie się opadu rocznego w zależności od lokalizacji na mapie Polski i danego roku. W przypadku lokalizacji I (Rys.2), tj. północno-zachodniej Polski, maksymalna wysokość opadu rocznego na przestrzeni lat 1991 - 2022 wyniosła 1178 mm i była ona odnotowana w roku 2017. Drugi największy opad roczny wystąpił w roku 1998 i wyniósł on 1087 mm, natomiast trzeci największy opad miał miejsce w 2007 roku i był równy 1020 mm. Wyniki te wskazują, że opad maksymalny występuje dla lokalizacji I, średnio co 10 lat. Średnia wartość opadu na podstawie danych z lat, wynosi 817 mm, co stanowi 31% mniej niż najwyższa zanotowana wartość wysokości opadu dla tej lokalizacji.



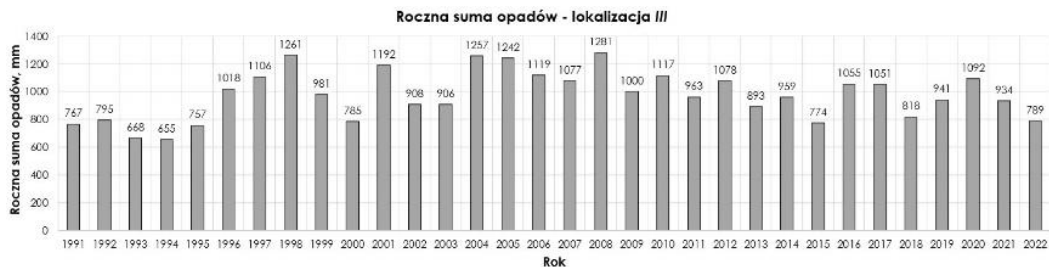
Rys. 2. Roczna suma opadów w analizowanych latach w lokalizacji I (północno-zachodnia Polska).

Maksymalne opady roczne dla lokalizacji II (Rys.3) są znacznie mniejsze w porównaniu do lokalizacji I, bo aż o około 40%. Najwyższy opad roczny dla lokalizacji II w latach 1991 – 2022 odnotowano w 2010 roku i wyniósł on 759 mm. Z kolei drugi największy opad wystąpił w roku 2021 o wartości 721 mm, a trzeci w kolejności największy opad miał miejsce 2017 roku i był równy 705 mm. Analizując średnią wartość opadu rocznego z trzydziestu lat dla terenów centralnej Polski, wynosi ona około 514 mm. Wyznaczona wartość średnia jest o około 32% mniejsza od maksymalnej zanotowanej wartości opadu z analizowanych lat dla lokalizacji II.



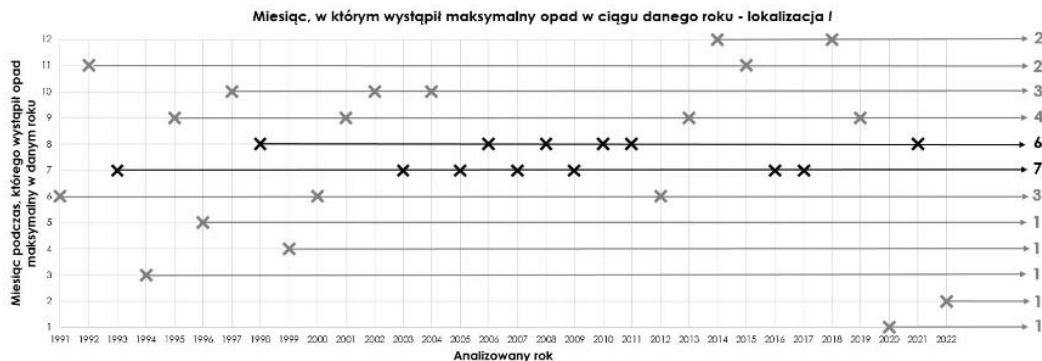
Rys. 3. Roczna suma opadów w analizowanych latach w lokalizacji II (centralna Polska).

Dla lokalizacji *III* (Rys.4), tj. południowo-wschodniej części Polski, maksymalny opad roczny w latach 1991 - 2022, wyniósł 1281 mm i był on zanotowany w 2008 roku. Drugi największy opad roczny wystąpił w 1998 r. i wyniósł 1261 mm, natomiast trzeci największy opad miał miejsce 2004 roku i był równy 1257 mm. Średnia wartość opadu rocznego z trzydziestu lat dla południowo - wschodniej części Polski, wyniosła około 976 mm i jest ona około 24% mniejsza od maksymalnej zanotowanej wysokości opadu. Wartość średnia z analizowanego trzydziestolecia opadu rocznego jest najmniej oddalona od maksymalnego opadu w porównaniu do lokalizacji *I* i *II*. Dodatkowo w tym przypadku, zanotowano także najwyższe opady roczne w odniesieniu do pozostałych analizowanych regionów.

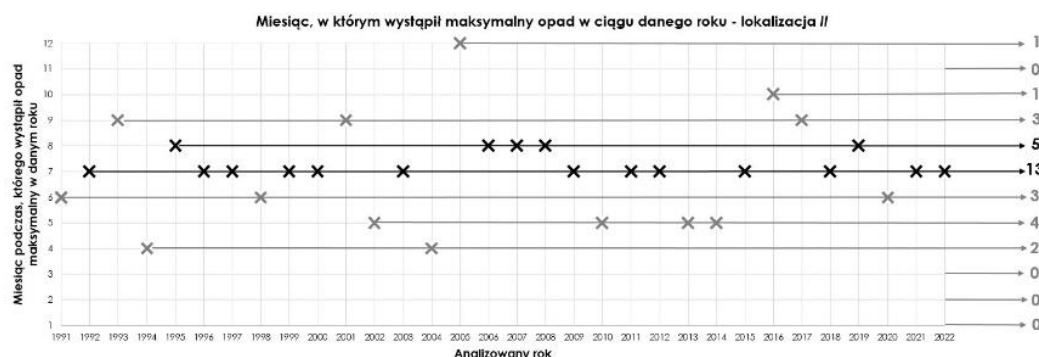


Rys. 4. Roczna suma opadów w analizowanych latach w lokalizacji *III* (południowo – wschodnia Polska).

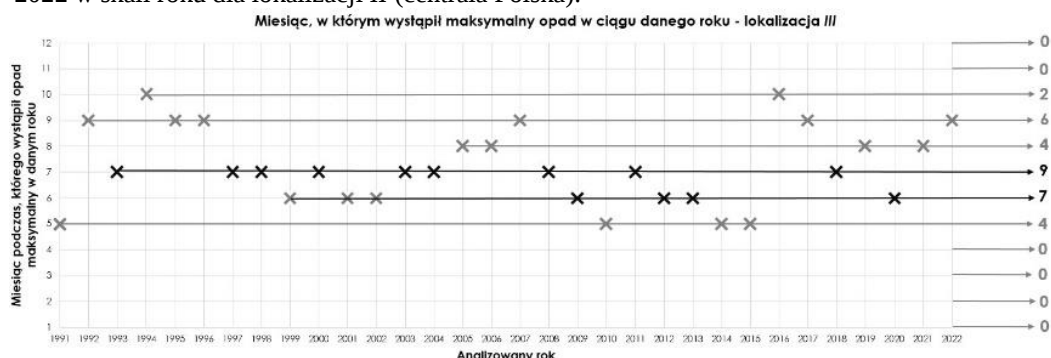
W dalszym etapie rozważaniom poddano miesięczne opady, w których wystąpił opad maksymalny w danym roku na przestrzeni analizowanego zakresu lat. Dla lokalizacji *I* (tj. północno - zachodnia Polska) miesięczne opady maksymalne najczęściej występowały w lipcu (Rys.5). W analizowanym trzydziestoleciu sytuacja taka miała miejsce 7 razy i stanowi to 22% udziału we wszystkich wynikach. Drugim miesiącem z opadami maksymalnymi był sierpień, bowiem w przeciągu 30 lat opad maksymalny wystąpił 6 razy w sierpniu (19% udział). Dla lokalizacji *II*, czyli centralnej Polski (Rys.6), maksymalny opad miesięczny w analizowanym trzydziestoleciu najczęściej występował w lipcu. W tym przypadku sytuacja ta miała miejsce 13 razy i jest to około 41% spośród wszystkich analizowanych wyników. Na drugim miejscu jest miesiąc sierpień, w którym opad maksymalny pojawił się 5 razy w przeciągu 30 lat i stanowi to około 16% spośród analizowanych wyników. W południowo – wschodniej Polsce, tj. lokalizacji *III* (Rys.7), maksymalny opad miesięczny pojawił się 9 razy w lipcu (28%) i 7 razy (2%) w czerwcu dla analizowanego trzydziestolecia. Wyniki te wykazują tę samą zależność dla wszystkich trzech lokalizacji i potwierdzają, że maksymalne opady miesięczne najczęściej obserwowane są w miesiącach letnich, w tym szczególnie w lipcu.



Rys. 5. Krotność występowania maksymalnych opadów w przedziale miesiąca na przestrzeni lat 1992 - 2022 w skali roku dla lokalizacji *I* (północno – zachodnia Polska).



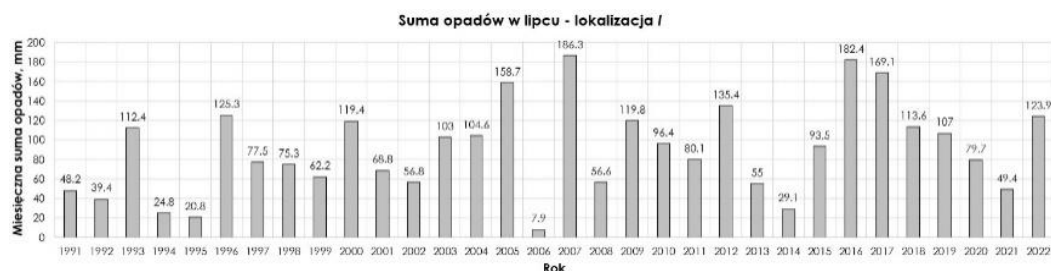
Rys. 6. Krotność występowania maksymalnych opadów w przedziale miesiąca na przestrzeni lat 1992 - 2022 w skali roku dla lokalizacji II (centrala Polska).



Rys. 7. Krotność występowania maksymalnych opadów w przedziale miesiąca na przestrzeni lat 1992 - 2022 w skali roku dla lokalizacji III (południowo – wschodnia Polska).

W kolejnym etapie analizie poddano zmienność wysokości opadów w lipcu dla wszystkich trzech regionów w okresie rozważanego trzydziestolecia (1991-2022). Rozważano opady dla tego miesiąca, ponieważ jak to wykazano wcześniej, w lipcu najczęściej występują opady maksymalne w skali roku, niezależnie od położenia zlewni.

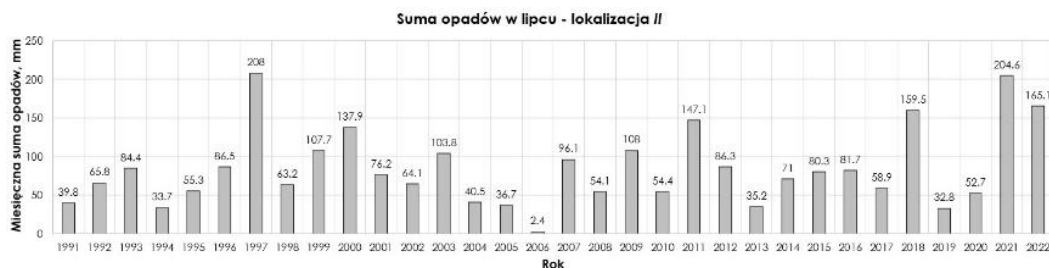
Dla lokalizacji I (północno-zachodnia Polska) najwyższa wysokość opadów w lipcu wystąpiła w roku 2007 o wartości 186,3 mm, natomiast najmniej wyniosła 7,9 mm w roku 2006 (Rys.8). Na podstawie danych ustalono średni opad w lipcu dla analizowanego trzydziestolecia równy 90,1 mm. W tym przypadku opad o największej wartości jest ponad dwukrotnie większy od średniej z lat i prawie 24-krotnie większy od najmniejszej zanotowanej wartości.



Rys. 8. Wysokość opadów w lipcu w północno-zachodniej Polsce w latach 1991 – 2022.

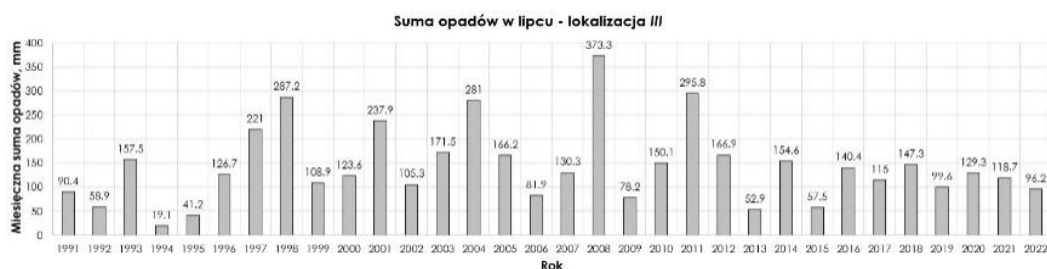
Najwyższą miesięczną sumę opadów o wartości 208 mm dla lokalizacji II (Rys.9) zanotowano w lipcu 1997 roku, natomiast najmniejsza wyniosła 2,4 mm w 2006 roku. Średni lipcowy opad dla lokalizacji II w analizowanym trzydziestoleciu wyniósł 84 mm, wartość ta jest 2,5-krotnie

mniejsza od najwyższej. Z kolei najwyższy zanotowany opad jest prawie 87-krotnie większy od najmniejszej wartości z lipca.



Rys. 9. Wysokość opadów w lipcu w centralnej Polsce w latach 1991 – 2022.

Maksymalna miesięczna suma opadów w lipcu dla południowo-wschodniej Polski (Rys.10) wyniosła 373,3 mm w 2008 r., natomiast najmniejsza wysokość opadu w lipcu była równa 19 mm i miała miejsce w 1994 r. Obliczono, że średnia wartość opadu miesięcznego w lipcu dla lokalizacji *III* wynosi 143 mm. W tym przypadku opad o najwyższej wartości jest 2,6 razy większy od średniej z lat i prawie 20-krotnie większy od najmniejszej zanotowanej wartości.



Rys. 10. Wysokość opadów w lipcu w południowo-wschodniej Polsce w latach 1991 – 2022.

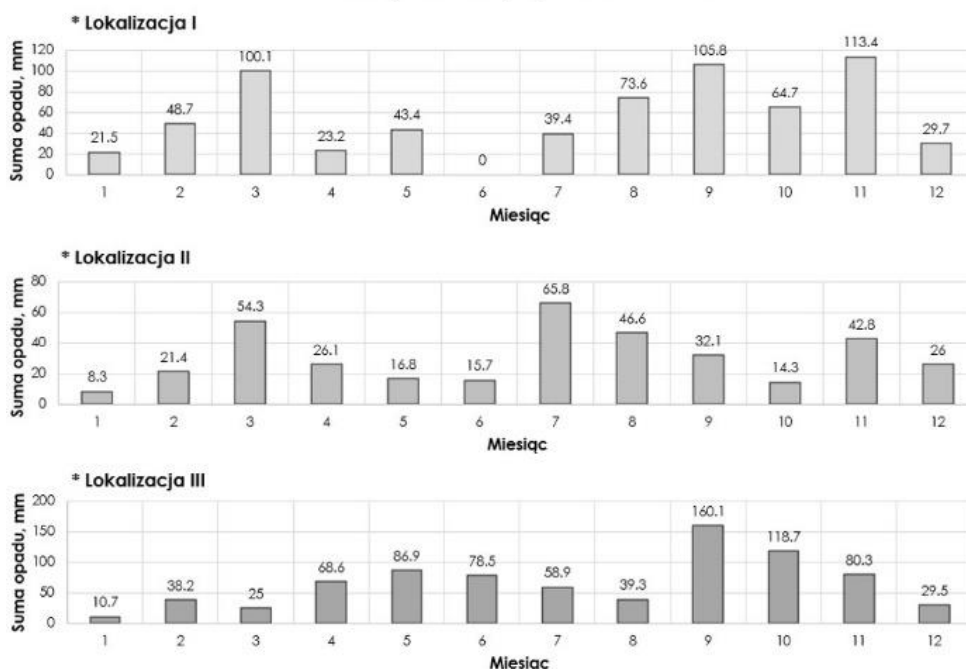
W dalszej części artykułu rozważaniu poddano miesięczne sumy opadów dla każdej z trzech lokalizacji w odstępie czasowym co 10 lat, wzięto pod uwagę opady w 1992 r. (Rys.11), 2002 r. (Rys.12), 2012 r. (Rys.13) i 2022 r. (Rys.14). Na podstawie poniższych wykresów można zauważyć charakterystyczne punkty maksimum i minimum, które występują pomiędzy znacznym wzrostem a spadkiem opadu i na odwrót pomiędzy spadkiem a wzrostem wysokości opadu.

W 1992 roku opady od stycznia do marca charakteryzują się wzrostem dla lokalizacji *I* i *II*. Natomiast dla lokalizacji *III*, od marca do maja wysokość opadów powoli wzrasta, a następnie spada, aż do sierpnia. Dla lokalizacji *I* maksymalny opad pojawił się w listopadzie, dla lokalizacji *II* w lipcu, natomiast dla lokalizacji *III* we wrześniu. Charakterystyczne punkty maksimum dla lokalizacji *I* i *II* pojawiają się w marcu i listopadzie, a punkty minimum w czerwcu i październiku. Z kolei dla lokalizacji *I* i *III* punkty maksimum pokrywają się we wrześniu. Natomiast dla wszystkich trzech lokalizacji punkty minimum występują w okresie zimowym dla stycznia i grudnia. Na podstawie wyników, można stwierdzić, że maksymalne opady miesięczne nie występują w tych samych miesiącach dla analizowanych trzech zlewni (Rys.11).

W 2002 r., podobnie jak w 1992 r., miesiące z maksymalną sumą opadów nie pokrywają się dla analizowanych zlewni. Dla lokalizacji *I* maksymalny opad pojawił się w październiku, dla lokalizacji *II* w maju, natomiast dla lokalizacji *III* w czerwcu. Miesiące te nie są takie same jak 10 lat wcześniej. W przypadku lokalizacji *I* i *II* wykresy charakteryzują się podobną zależnością od stycznia do maja, a dla lokalizacji *I* i *III* od kwietnia do grudnia. Dodatkowo w 2002 roku obserwowany jest wzrost sumarycznych opadów rocznych w odniesieniu do 1992 r., dla lokalizacji *I* jest to wzrost o 19%, dla lokalizacji *II* o 39% i dla lokalizacji *III* o 14%. Wyniki przeprowadzonych

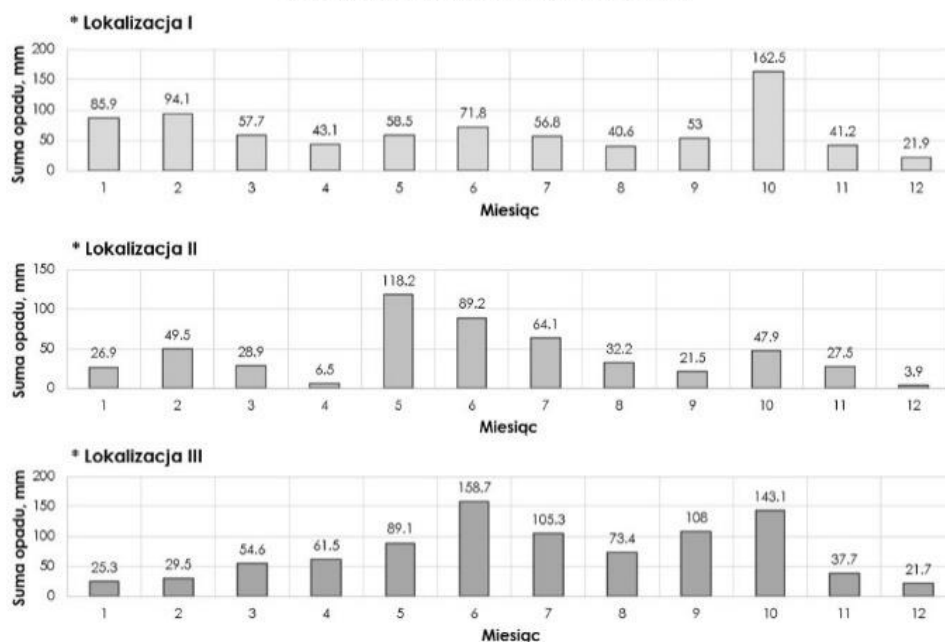
badań potwierdziły zasadniczy wpływ wybranej lokalizacji zlewni na rozkład opadów, które charakteryzują się wyjątkowo dużą zmiennością.

Miesięczne sumy opadów w roku 1992



Rys. 11. Porównanie opadów miesięcznych dla wszystkich trzech lokalizacji w 1992 roku.

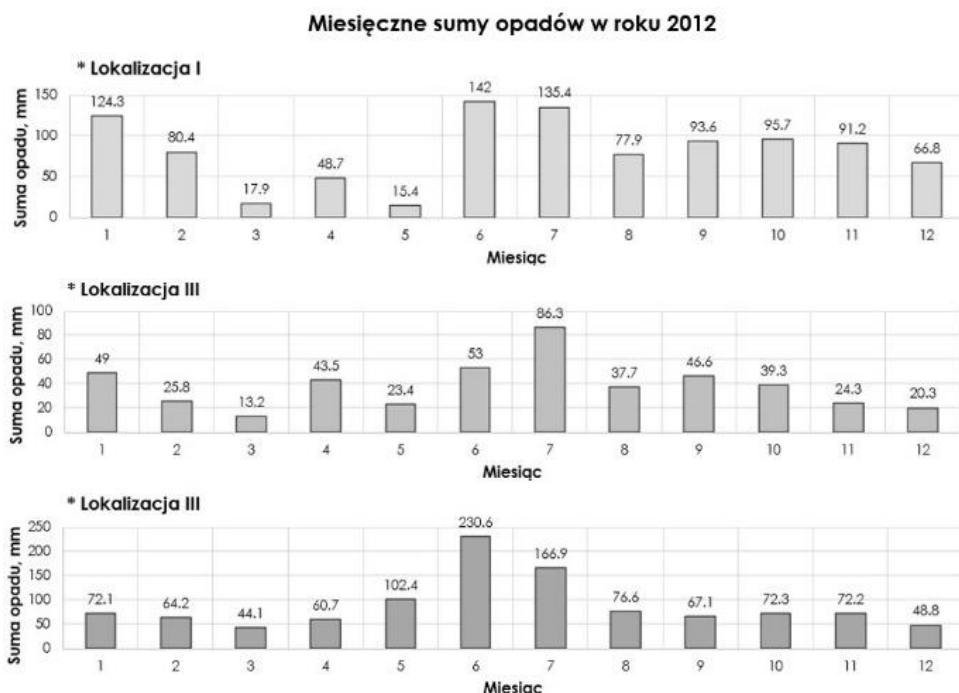
Miesięczne sumy opadów w roku 2002



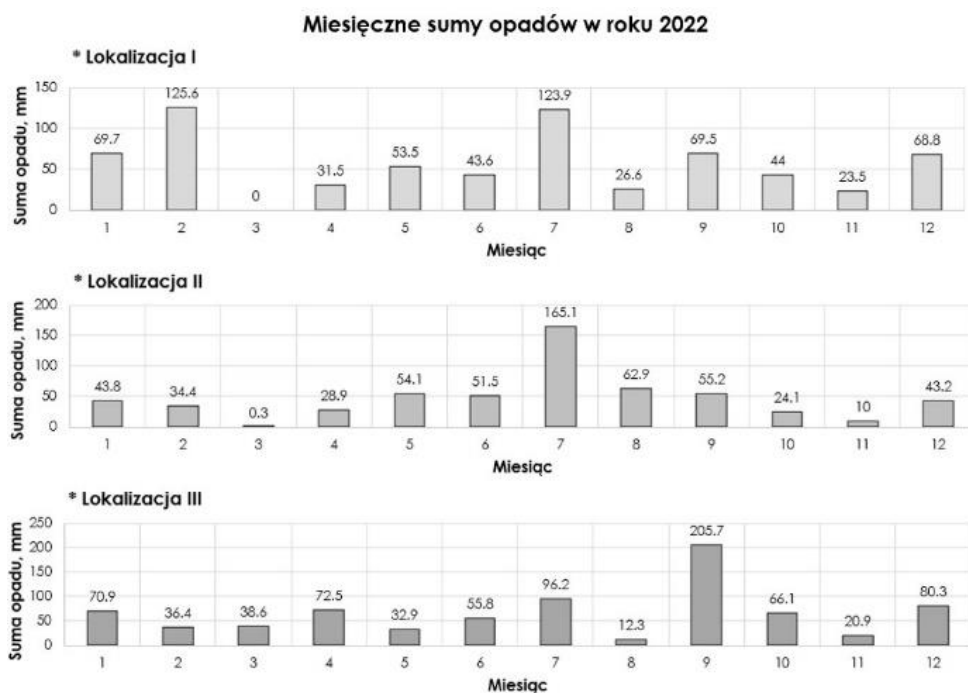
Rys. 12. Porównanie opadów miesięcznych dla wszystkich trzech lokalizacji w 2002 roku.

W roku 2012 opad maksymalny w skali roku wystąpił w czerwcu dla lokalizacji I i III oraz w lipcu dla lokalizacji II. Wszystkie trzy lokalizacje wyróżniają się podobną zależnością wzrostu

wysokości opadu od stycznia do czerwca, a następnie zależnością spadkową od października do grudnia. W porównaniu do poprzednich analizowanych wykresów w 2012 r. zostaje utrzymana bardzo podobna zależność wzrostowo-spadkowa dla wszystkich trzech analizowanych lokalizacji.



Rys. 13. Porównanie opadów miesięcznych dla wszystkich trzech lokalizacji w 2022 roku.



Rys. 14. Porównanie opadów miesięcznych dla wszystkich trzech lokalizacji w 2012 roku.

Wyniki pokazują, że sumaryczne opady roczne w 2012 r. w porównaniu do 1992 r. rosły. Dla lokalizacji *I* jest to wzrost o 49%, dla lokalizacji *II* o 25% i o 36% dla lokalizacji *III*. Natomiast w porównaniu do 2002 r., dla lokalizacji *I* jest to wzrost o 26%, dla lokalizacji *II* spadek o 10% i dla lokalizacji *III* wzrost o 19%.

W roku 2022 opad maksymalny w skali roku wystąpił w lipcu dla lokalizacji *I* i *II* i w wrześniu dla lokalizacji *III*. Lokalizacja *I* i *II* posiada najwięcej punktów wspólnych o wartościach maksymalnych w maju, lipcu, wrześniu i grudniu, natomiast wspólne punkty minimalne wystąpiły w marcu, czerwcu, sierpniu i listopadzie (Rys. 13). Wyniki z 2022 r. pokazują największe podobieństwo do wykresów z 1992 r. W odniesieniu do sumarycznych opadów rocznych z 2012 r., opady w 2022 r. dla lokalizacji *I* maleją o 31 %, dla lokalizacji *II* rosły o 24% i dla lokalizacji *III* maleją o 27%. W porównaniu do 2002 r., dla lokalizacji *I* opady maleją o 24%, dla lokalizacji *II* rosły o 11% i dla lokalizacji *III* maleją o 87%. Natomiast w porównaniu do 1992 r., opady rosły o 3% dla lokalizacji *I* i o 55% dla lokalizacji *II*, a maleją zaledwie o 1% dla lokalizacji *III*.

4. Wnioski

Maksymalny opad roczny dla trzech analizowanych zlewni jaki wystąpił w ostatnim trzydziestoleciu odnotowano w południowo – wschodniej Polsce (lokalizacja *III*). Wysokość opadu dla tej zlewni wyniosła 1281 mm (2008 r.). Na drugim miejscu znalazła się północno-zachodnia Polska (lokalizacja *I*), dla której maksymalny opad roczny wyniósł 1178 mm (2017 r.). Natomiast najwyższy opad roczny w centralnej Polsce (lokalizacja *II*) wyniósł zaledwie 759 mm (2010 r.).

Najwyższa średnia wysokość opadu rocznego występuje dla regionu południo-wschodniego i wynosi ona 976 mm. Drugie miejsce dla średniej wysokości opadu rocznego odnosi się do terenów północno-zachodniej Polski, dla których średni opad roczny wyniósł 817 mm. Natomiast najmniejsze średnie opady roczne zanotowano w centralnej Polsce i wyznaczona ich wartość wynosi około 514 mm.

Maksymalne opady roczne z danych lokalizacji dla analizowanego zakresu lat nie występują w tym samym czasie. Świadczy to o wpływie lokalizacji zlewni na ustalone wyniki i ich wartości. Maksymalny opad roczny dla lokalizacji *III* był o 69% większy od lokalizacji *II* i o 9% od lokalizacji *I*. Z kolei średnia wartość opadu rocznego dla lokalizacji *III* jest większa nawet o 90% od średniej wartości dla lokalizacji *II* i o 19% większa w porównaniu do lokalizacji *I*.

Na podstawie analizowanych danych można stwierdzić, że południowo-wschodnia Polska charakteryzuje się największymi sumami opadów rocznych. Natomiast w centralnej Polsce występują najmniejsze wysokości opadów rocznych. Najwyższe opady miesięczne spośród analizowanych trzech zlewni przypadają na miesiąc lipiec. W latach 1991- 2022, maksymalny opad miesięczny w lipcu wystąpił 13 razy dla lokalizacji *II*, 9 razy dla lokalizacji *III* i 7 razy dla lokalizacji *I*.

Na przestrzeni analizowanych lat 1991 – 2022 biorąc pod uwagę lokalizację *I* miesięczna suma opadów w lipcu miała największą wartość w 2007 r. i wyniosła ona 186 mm, natomiast najmniejsza 8 mm w 2006 r. Wyznaczono także średni opad miesięczny w lipcu z analizowanych lat i wynosił on 90 mm. Dla centralnej Polski, najwyższa suma opadów w lipcu wyniosła 208 mm w 1997 r., zaś najmniejsza wyniosła około 2 mm w 2006 r. Średnia wysokość opadów w lipcu z trzydziestolecia dla lokalizacji *II* była równa 84 mm. Z kolei dla południowo-wschodniej Polski, najwyższa suma opadów w lipcu wynosiła 373 mm w 2008 r., a najniższa 19 mm w 1994 r. Średni opad miesięczny w lipcu był równy 143 mm. Dla analizowanych zlewni średnia wartość sumy opadu z lipca jest około 2 – 2,5 krotnie mniejsza od maksymalnych wartości opadów odnotowanych w lipcu dla rozważanego trzydziestolecia. Wyniki te dodatkowo wskazują na znaczne rozbieżności pomiędzy wartościami opadów miesięcznych jako maksymalnymi, minimalnymi i średnimi.

Na podstawie przeprowadzonej analizy nie można jednoznacznie określić trendu wzrostowego ani spadkowego dla sumy opadów rocznych analizowanych zlewni. Opady regularnie ulegają wzrostowi i spadkowi na przestrzeni lat, jednak co około 10 lat można zauważyć opady maksymalne, które znacznie odbiegają od wartości średnich. Wyniki badań potwierdzają losowość zjawiska atmosferycznego jakim są opady deszczu. A ich zmienność w czasie i przestrzeni powinna być uwzględniana przy ustalaniu bilansu ilościowego wód deszczowych, a także w przypadku

aktualizacji metod stosowanych do wyznaczania miarodajnych przepływów w różnych systemach odwodnieniowych.

5. Literatura

- Czarnecka M, Nidzgorska-Lencewicz J (2012) Wieloletnia zmienność sezonowych opadów w Polsce. *Woda – Środowisko – Obszary Wiejskie* 12 (2): 45–60.
- Fischer E, Knutti R (2016) Observed heavy precipitation increase confirms theory and early models. *Nature Climate Change* 6: 986-991.
- https://danepubliczne.imgw.pl/data/dane_pomiarowo_obserwacyjne/dane_meteorologiczne/miesieczne/opad/
- Humbal A, Chaudhary N, Pathak B (2023) Urbanization Trends, Climate Change, and Environmental Sustainability. In book: *Climate Change and Urban Environment Sustainability* 9: 151-166.
- Kordana – Obuch S, Starzec M (2020) Statistical Approach to the Problem of Selecting the Most Appropriate Model for Managing Stormwater in Newly Designed Multi-Family Housing Estates. *Resources* 9(9):110.
- Kotowski A, Danciewicz A, Kaźmierczak B (2010) Modelowanie opadów do wymiarowania kanałów. *Polska Akademia Nauk. Komitet Inżynierii Lądowej i Wodnej. Instytut Podstawowych Problemów Techniki. Studia z zakresu inżynierii* nr 68, Warszawa.
- Kotowski A, Kaźmierczak B, Danciewicz A (2009) Analiza maksymalnych wysokości opadów we Wrocławiu-Strachowicach w latach 1960-2009. Modelowanie opadów miarodajnych do wymiarowania kanalizacji. *Raporty Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, SPR* nr 26/2009.
- Licznar P, Siekanowicz-Grochowina K, Oktawiec M i in. (2020) Maksymalne wysokości i natężenia opadów i ich modele. *Metodyka opracowania Polskiego Atlasu Natężenia Deszczów (PANDA). Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej – Państwowy Instytut Badawczy* 4: 55-75.
- Myhre G, Alterskjær K, Stjern CW et al. (2019) Frequency of extreme precipitation increases extensively with event rareness under global warming. *Scientific Reports* 9(1):16063.
- Nachshon U, Netzer L, Livshitz Y (2016) Land cover properties and rain water harvesting in urban environments. *Sustainable Cities and Society* 27: 398-406.
- Nowakowska M, Kotowski A (2017) *Metodyka i zasady modelowania odwodnień terenów zurbanizowanych. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.*
- Słyś D (2013) *Zrównoważone systemy odwodnienia miast. Dolnośląskie Wydawnictwo Edukacyjne.*
- Starzec M, Dziopak J, Aleksejev M (2014) Wpływ wybranych metod na kształtowanie się hydrogramów przepływu ścieków deszczowych. *IV Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Techniczna. INFRAEKO 2014. Nowoczesne Miasta. Infrastruktura i Środowisko. Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów.*
- Starzec M, Dziopak J, Słyś D (2020) An Analysis of Stormwater Management Variants in Urban Catchments. *Resources* 9 (2): 19.
- Szyga-Pluta K (2018) Zmienność czasowa i przestrzenna opadów atmosferycznych w Wielkopolsce w latach 1981–2014. *Przegląd Geograficzny* 90 (3): 495–516.
- Tomczyk AM, Szyga-Pluta K (2018) Variability of thermal and precipitation conditions in the growing season in Poland in the years 1966–2015, *Theoretical and Applied Climatology* 135(2): 1517-1530.
- Węglarczyk S (2013) O poprawności wzorów Błaszczyka na obliczanie opadów miarodajnych. *Infrastruktura i ekologia terenów wiejskich* 3/IV: 63–76.
- Woś A (2010) *Klimat Polski w drugiej połowie XX wieku. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.*
- Żmudzka E (2009) Współczesne zmiany klimatu Polski. *Acta Agrophysica* 13 (2): 555–568.

9. Znaczenie modyfikacji strukturalnych ibuprofenu w postaci ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny w kontekście zwiększonej przenikalności przez skórę

Significance of structural modifications of ibuprofen in the form of ibuprofenate alkyl esters of L-lysine in the view of increased skin permeability

Karolina Bilska

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Paula Ossowicz-Rupniewska

Ossowicz-Rupniewska Paula: paula.ossowicz@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: substancje aktywne, niesteroidowe leki przeciwzapalne, penetracja skóry

Streszczenie

W wyniku trzyetapowej syntezy uzyskano modyfikacje strukturalne ibuprofenu w postaci organicznych soli, tj. ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny o zróżnicowanym rozgałęzieniu i długości łańcucha alkilowego w kationie, oznaczonych jako [LysOiPr][IBU], [LysOPr][IBU], [LysOPr][IBU]₂ oraz [LysOBu][IBU], z wysokimi wydajnościami. Tożsamość wszystkich związków potwierdzono za pomocą technik spektroskopowych (NMR, FT-IR), a także określono ich właściwości fizykochemiczne. Badania obejmowały analizę stabilności termicznej, temperatur przemian fazowych, rozpuszczalność w wodzie i roztworze PBS. Strukturę krystaliczną zbadano za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej. Ponadto wyznaczono ich lipofilowość metodą „shake-flask” oraz przeprowadzono badania ich przenikalności przez skórę i akumulacji w skórze.

1. Wstęp

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) stanowią powszechnie używane środki do leczenia schorzeń związanych z układem mięśniowo-szkieletowym, takich jak choroba zwyrodnieniowa stawów i reumatoidalne zapalenie stawów oraz do łagodzenia objawów urazów. Ich popularność wynika głównie z roli, jaką pełnią prostaglandyny jako mediatorzy stanów zapalnych, bólu i gorączki. Niemniej jednak, długotrwałe stosowanie NLPZ ogólnoustrojowo często napotyka na ograniczenia z powodu różnorodnych działań niepożądanych, takich jak komplikacje żołądkowo-jelitowe, problemy z funkcjonowaniem nerek oraz potencjalne interakcje lekowe. Najczęstszym oraz najbardziej poważnym czynnikiem ograniczającym jest uszkodzenie błony śluzowej żołądka (Komatsu i Sakurada 2012). Ponadto, pojawiły się raporty sugerujące, że niektóre tradycyjne NLPZ, takie jak diklofenak i ibuprofen, mogą zwiększać ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych (Fosbøl i in. 2010).

W celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia skutków ubocznych związanych z doustnym stosowaniem NLPZ, coraz częściej wykorzystuje transdermalną podaż leków, co stanowi bezpieczniejszą alternatywę. Metoda ta posiada szereg zalet, m.in. zabezpiecza związki czynne przed enzymami żołądkowymi, omija metabolizm w wątrobie oraz zmniejsza ryzyko działań niepożądanych na poziomie całego organizmu (Murthy 2012). W przypadku przezskórnego stosowania NLPZ, istotne jest uwzględnienie takich czynników jak lipofilowość leku, jego rozpuszczalność w wodzie oraz szybkość wchłaniania substancji czynnych.

Około 40% składników aktywnych farmaceutycznie jest praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie. Ponadto, ich ograniczona skuteczność i niska biodostępność, prowadzące do słabej penetracji przez skórę, skłania do poszukiwania bardziej efektywnych rozwiązań, takich jak modyfikacje strukturalne cząsteczek substancji leczniczych (Pedro i in. 2020). Aminokwasowe ciecze jonowe doskonale wpisują się w ten trend, ponieważ poprawiają znacząco właściwości związku aktywnego, a jednocześnie są bezpieczniejsze w stosowaniu (Tao i in. 2005).

2. Materiał i Metody

Wszystkie użyte substancje chemiczne były produktami handlowymi i nie przeszły dodatkowego procesu oczyszczania. L-lizyna (98%) została zakupiona od firmy Chemat (Konin, Polska). Alkohol etylowy (99,5%), izopropylowy (>99,9%), propylowy (99%) i butylowy (98%), a także roztwór amoniaku (25%) zostały nabyte od firmy StanLab (Lublin, Polska). Chlorek tionylu (99,5%) pochodził od firmy Acros Organics (Geel, Belgia). Dimetylosulfotlenek (>99,9%), chlorek sodu (>99,9%) oraz chlorek metylenu (>99,9%) zostały zakupione od firmy Chempur (Gliwice, Polska). Ibuprofen (kwas (R,S)-2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowy) (+98%) został dostarczony przez firmę Am-Beed (Arlington Heights, IL, USA). Deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO-d₆, >99,9%) pochodził z firmy Chempur (Gliwice, Polska).

2.1 Synteza ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny

Synteza ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny przebiegała w trzech etapach. W pierwszym etapie, w wyniku reakcji estryfikacji L-lizyny alkoholem w obecności czynnika chlorującego (SOCl₂) otrzymano chlorowodorki estrów alkilowych L-lizyny. Następnie przeprowadzono reakcję zobojętniania otrzymanych chlorowodorków 25% roztworem amoniaku. Ostatnim etapem było protonowanie estrów ibuprofenem w środowisku chlorku metylenu.

Czystość i tożsamość uzyskanych związków potwierdzono za pomocą metod spektroskopowych i wyznaczono ich właściwości fizykochemiczne.

2.2 Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)

Widma ¹H NMR (400 MHz) i ¹³C NMR (100 MHz) zarejestrowano przy użyciu spektrometru Bruker DPX-400. Jako rozpuszczalnik zastosowano DMSO-d₆.

2.3 Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Widma FT-IR wykonano techniką ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance*) przy użyciu spektrofotometru Nicolet 380 FT-IR firmy Thermo Electron Corporation. Widma zarejestrowano w zakresie liczb falowych 4000 – 400 cm⁻¹ przy pomocy programu komputerowego Omnic w wersji 7.3 zintegrowanego ze spektrometrem.

2.4 Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Analizę proszkowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego wykonano za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego AERIS Xrays ON firmy Malvern Panalytical Ltd w zakresie 7 - 90° 2θ przy użyciu promieniowania CuKα (λ = 1,54056 Å).

2.5 Stabilność termiczna

Stabilność termiczną otrzymanych związków zbadano przy pomocy termograwimetru Proteus Thermal Analysis TG 209 F1 Libra firmy NETZSCH. Badania prowadzone były w atmosferze utleniającej (przepływ azotu: 10 ml min⁻¹, przepływ powietrza: 25 ml min⁻¹), w zakresie temperatur 298,15-1273,15 K. Analizie poddawano próbki o masie około 5 – 10 mg. Analizy prowadzono przy użyciu tygli korundowych (Al₂O₃). Rejestrowany był ubytek masy badanej próbki wraz ze wzrostem temperatury.

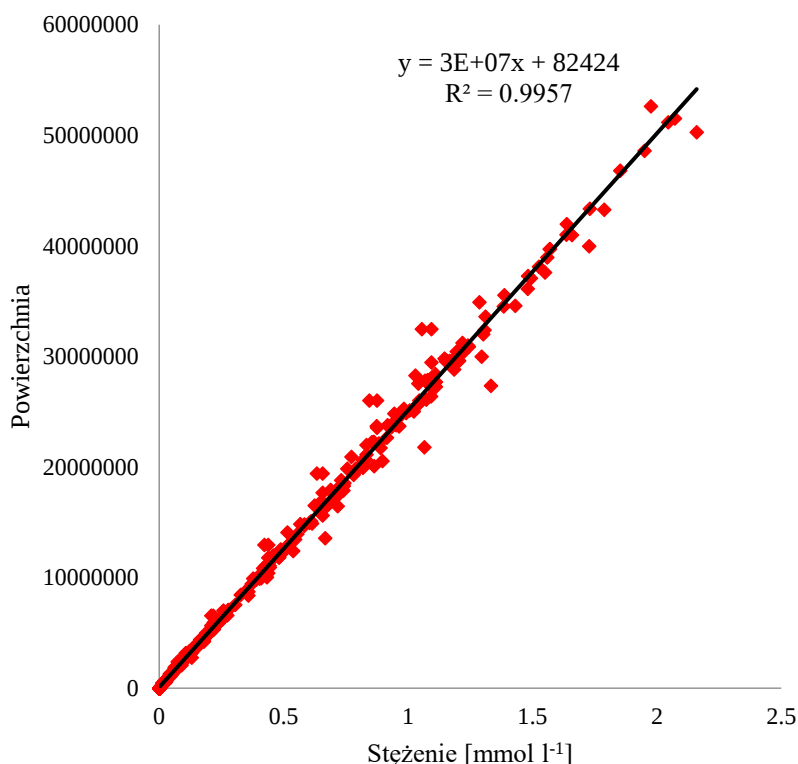
2.6 Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Temperatury przemian fazowych wyznaczono przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego TA Instruments Q-100 (New Castle, DE, USA). Badanie prowadzono w zakresie temperatur od 183,15 K do temperatury o około 293,15 K niższej niż temperatura początku rozkładu związku (wyznaczonej przy użyciu TG, jako T_{onset}). Pomiary przeprowadzane były w atmosferze azotu w zamkniętych tyglach aluminiowych. Analizie poddawano próbki o masie około 10 mg.

2.7 Rozpuszczalność w wodzie i PBS

Rozpuszczalność otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny wyznaczono dla nasyconych roztworów wodnych i roztworów w PBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna, pH = 7,4). Do fiolek (pojemność 4 ml) odważono 15 – 20 mg badanej substancji, następnie dodano 2 ml wody lub roztworu PBS. Następnie fiołki umieszczono w termostатовanej do 298,15 K łaźni

i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez dobę. Po 24 godzinach roztwory zostały przesączone przy użyciu niesterylne go filtra strzykawkowego (wykonanego z mieszanych estrów celulozy o średnicy porów 0,45 µm, rozmiar: 25 mm). Stężenie badanych roztworów wyznaczono przy pomocy chromatografu HPLC Nexera-i LC-2040C 3D High Plus Liquid Chromatograph firmy SHIMADZU. Chromatograf wyposażony był w detektor DAD/FLD i kolumnę Kinetex F5 o porowatości 2,6 µm 100A, o wymiarach 150 × 46 mm firmy Phenomenex. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina wody i acetonitrylu w stosunku 50:50 (V/V), o przepływie – 1 ml min⁻¹. Próbkę ustawione były w termostatowanym do temperatury 308,15 K autosamplerze. Nastrzyki powtórzono co najmniej 3 razy dla każdej próbki i wyniki uśredniono. Do analizy wykorzystane zostały chromatogramy rejestrowane przy długości fali 210 nm. Stężenie ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny wyliczone zostały na podstawie pomiarów powierzchni pików, stosując metodę krzywej kalibracyjnej (Rys.1).



Rys. 2. Wykres krzywej kalibracyjnej dla ibuprofenianów estrów alkilowych L-aminokwasów.

2.8 Lipofilowość

Lipofilowość wyznaczono metodą *shake-flask*. Do 10 mg badanej substancji wprowadzono 5 ml wody nasyconej n-oktanołem i 5 ml n-oktanolu nasyconego wodą. Otrzymany roztwór mieszano przez 3 godziny w temperaturze 298,15 K, następnie warstwy rozdzielono. Stężenie ibuprofenianów w fazie wodnej określono metodą HPLC. Stężenie związku w warstwie organicznej, obliczono na podstawie różnicy stężeń, zgodnie ze wzorem:

$$c_o = c_0 - c_w \left[\frac{mg}{dm^3} \right]$$

gdzie:

c_0 – całkowite stężenie [kg/m³] – obliczone na podstawie masy związku użytego w badaniu,
 c_o – stężenie substancji w warstwie niepolarniej (organicznej),

c_w – stężenie substancji w warstwie polarnej (wodnej) – obliczone na podstawie wyników HPLC.

Lipofilowość ($\log P$) – logarytm dziesiętny współczynnika podziału związku między fazy organiczną i wodną przy określonym pH, w którym wszystkie cząsteczki związku występują w postaci niejonizowanej, obliczono według poniższego wzoru:

$$\log P = \log c_o - \log c_w$$

2.9 Przenikalność substancji aktywnej przez skórę

Badania przenikalności przez skórę przeprowadzono przy użyciu komór dyfuzyjnych Franza firmy Teledyne Hanson Research (model Phoenix DB-6). Płyn akceptorowy stanowił roztwór PBS ($\text{pH} = 7,4$). Powierzchnia dyfuzji wynosiła 1 cm^2 . Komora akceptorowa (10 ml) była utrzymywana w stałej temperaturze $310,15 \pm 273,35 \text{ K}$ za pomocą termostatu. Zawartość komory akceptorowej mieszano mieszadłem magnetycznym z jednakową prędkością dla wszystkich komór (400 obrotów na minutę). W każdej komorze donorowej umieszczono po 1 ml 1% roztworu w 70% etanolu (w przeliczeniu na zawartość substancji aktywnej). W badaniach użyto 70% (v/v) etanol ze względu na to, że takie stężenie etanolu jest optymalnym do transdermalnej aplikacji leku (Zhang i in. 2017). Doświadczenie prowadzono przez 24 godziny. Aby zapobiec parowaniu roztworu, komorę donorową przykrywano korkiem. Próbkę pobierano odpowiednio po 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h i 24 h mieszania. W każdym punkcie czasowym pobrano 0,5 ml próbki płynu akceptorowego i ponownie napełniano świeżym buforem o tym samym pH. Stężenie ibuprofenianów w płynie akceptorowym mierzono metodą HPLC.

2.10 Kumulacja substancji aktywnej w skórze

Po zakończeniu badania przenikania, skórę usunięto z komory Franza, następnie przemyto 0,5% roztworem dodecylsulfanu(VI) sodu i osuszono. Następnie skórę pocięto na małe kawałki i ekstrahowano 2 ml metanolu przez 24 godziny w temperaturze $277,15 \text{ K}$. Następnie próbki homogenizowano przez 3 minuty za pomocą homogenizatora (IKA®T18 digital ULTRA TURRAX, Staufen, Niemcy) i odwirowywano przy 3500 obr/min przez 5 minut. Po odwirowaniu roztwór analizowano metodą HPLC. Kumulację IBU i jego soli w skórze ludzkiej obliczano dzieląc ilość oznaczonego związku w próbce po wyekstrahowaniu ze skóry, przez masę skóry ($\mu\text{g g}^{-1}$).

3. Wyniki i dyskusja

3.1 Synteza ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny

W wyniku reakcji L-lizyny z wybranymi alkoholami (etanol, izopropanol, propanol i butanol) w obecności chlorku tionylu (czynnik chlorujący) otrzymano cztery chlorowodorki estrów alkilowych L-lizyny – $[\text{LysOEt}][\text{HCl}]_2$, $[\text{LysOiPr}][\text{HCl}]_2$, $[\text{LysOPr}][\text{HCl}]_2$ oraz $[\text{LysOBu}][\text{HCl}]_2$ w postaci ciał stałych (o różnym zabarwieniu) z wydajnościami w granicach 86-96%. W wyniku reakcji neutralizacji uzyskanych w I etapie chlorowodorków estrów alkilowych L-lizyny czynnikiem zobojętniającym (25% roztworem amoniaku) zsyntezowano cztery estry alkilowe L-lizyny o wydajnościach w zakresie 43-99%. Wszystkie z nich były cieczami o żółtym zabarwieniu. W wyniku reakcji protonowania otrzymanych estrów alkilowych L-lizyny ibuprofenem (kwasem (RS)-2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowym) uzyskano cztery pochodne ibuprofenu – ibuprofenian estru izopropylowego oraz butylowego L-lizyny, a także monoibuprofenian oraz bis(ibuprofenian) estru propylowego L-lizyny z wydajnościami od 60 do 80%. Poza ibuprofenianem estru butylowego L-lizyny, który okazał się być pastą w odcieniu brązowym, reszta ibuprofenianów była bardzo lepкими cieczami o żółtym zabarwieniu. W przypadku reakcji estru etylowego L-lizyny z ibuprofenem nie udało się otrzymać soli o pożądanym stosunku molowym części estrowej do części ibuprofenianowej.

W Tab.1 przedstawiono zestawienie wydajności oraz postaci wszystkich związków otrzymanych podczas 3-etapowej syntezy.

Tab. 1. Zestawienie syntez chlorowodorków, estrów oraz ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny.

Związek	Postać	Wydajność [%]
[LysOEt][HCl] ₂	Białe ciało stałe (proszek)	93
[LysOiPr][HCl] ₂	Żółte ciało stałe (płatki)	86
[LysOPr][HCl] ₂	Żółte ciało stałe (proszek)	96
[LysOBu][HCl] ₂	Brunatne ciało stałe (proszek)	92
[LysOEt]	Jasnożółta ciecz	43
[LysOiPr]	Żółta ciecz	99
[LysOPr]	Pomarańczowa ciecz	72
[LysOBu]	Brunatna ciecz	99
[LysOiPr][IBU]	Żółta lepka ciecz	60
[LysOPr][IBU]	Żółta lepka ciecz	74
[LysOPr][IBU] ₂	Żółta lepka ciecz	68
[LysOBu][IBU]	Brunatna pasta	80

3.1. Magnetyczny rezonans jądrowy

Identyfikacja wszystkich otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny została przeprowadzona poprzez analizę spektrów magnetycznego rezonansu jądrowego, protonowych oraz węglowych. Analizując widma ¹H oraz ¹³C NMR wszystkich uzyskanych produktów, potwierdzono zgodność ich struktur z oczekiwanymi związkami. Poniżej zamieszczono opisy tych widm.

[LysOiPr][IBU] – ibuprofenian estru izopropylowego L-lizyny

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 7,17 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,01 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 4,90 (p, J = 6,2 Hz, 1H), 3,37 (q, J = 7,1 Hz, 1H), 3,21 (dd, J = 7,5, 5,4 Hz, 1H), 2,61 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,38 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 1,79 (dt, J = 13,5, 6,8 Hz, 1H), 1,57 – 1,36 (m, 4H), 1,35 – 1,27 (m, 2H), 1,26 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,19 (dd, J = 6,3, 5,1 Hz, 6H), 0,85 (d, J = 6,6 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 177,68; 175,64; 141,98; 138,69; 128,85; 127,58; 67,68; 54,27; 47,61; 44,78; 40,35; 39,17; 34,53; 30,16; 28,23; 22,74; 22,67; 22,04; 22,03; 20,11.

[LysOPr][IBU] – ibuprofenian estru propylowego L-lizyny

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 7,17 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 7,03 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 4,01 – 3,98 (m, 2H), 3,45 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 3,30 (dd, 1H), 2,68 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 2,39 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 1,79 (dp, J = 13,5, 7,0 Hz, 1H), 1,63 – 1,53 (m, 4H), 1,49 – 1,38 (m, 3H), 1,28 (d, J = 7,1 Hz, 6H), 0,86 (d, J = 4,6 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 177,33; 175,98; 141,10; 139,06; 129,01; 127,57; 65,95; 54,14; 46,81; 44,74; 39,00; 34,31; 30,13; 27,54; 22,65; 22,02; 19,78; 10,74.

[LysOPr][IBU]₂ – bis(ibuprofenian) estru propylowego L-lizyny

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 7,17 (dd, 4H), 7,02 (dd, 4H), 4,04 – 3,95 (m, 2H), 3,40 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,27 (dd, J = 7,5, 5,4 Hz, 1H), 2,61 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 2,39 (d, J = 7,1 Hz, 4H), 1,96 – 1,62 (m, 6H), 1,65 – 1,49 (m, 6H), 1,27 (d, J = 7,1 Hz, 6H), 0,89 – 0,84 (m, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ in ppm: 177,53; 176,18; 141,79; 138,76; 128,88; 127,58; 65,87; 54,26; 52,94; 47,39; 44,78; 39,16; 34,56; 33,07; 30,15; 29,41; 28,23; 22,77; 22,67; 22,03; 20,04; 10,74.

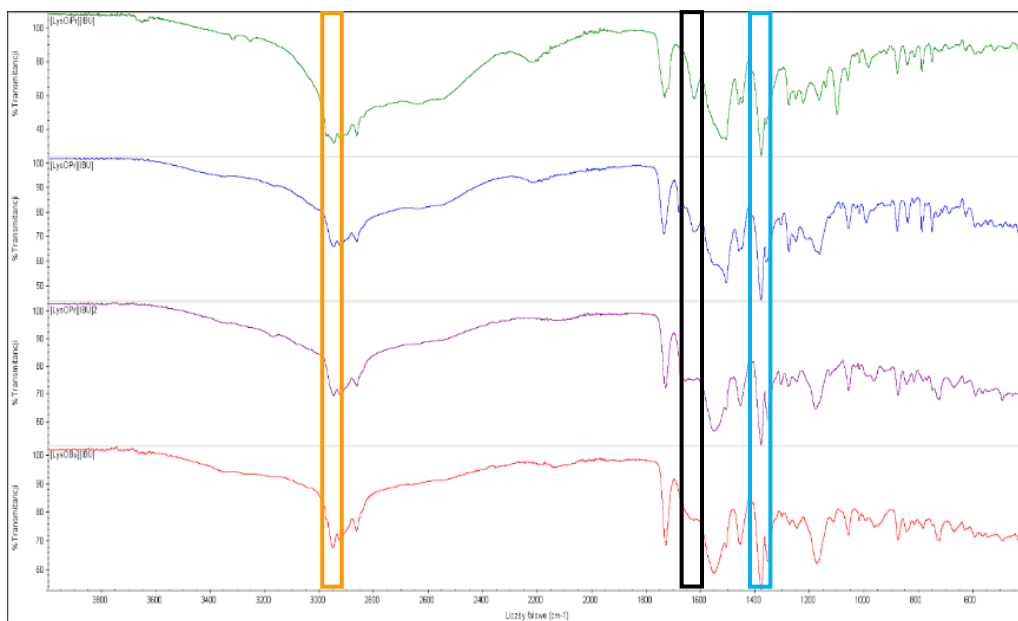
[LysOBu][IBU] – ibuprofenian estru butylowego L-lizyny

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ in ppm: 7,17 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,01 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 4,89 (s, 2H), 4,04 (q, $J = 6,3$ Hz, 1H), 3,26 (dd, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 1H), 2,60 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,38 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,79 (dt, $J = 13,5, 6,7$ Hz, 1H), 1,70 – 1,52 (m, 3H), 1,50 – 1,36 (m, 4H), 1,35 – 1,25 (m, 6H), 1,24 – 1,08 (m, 2H), 0,85 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ in ppm: 177,62; 176,24; 142,13; 138,62; 128,82; 127,58; 64,06; 54,30; 47,71; 44,78; 40,94; 34,65; 30,69; 30,16; 28,85; 22,80; 22,67; 20,16; 19,08; 14,02.

3.2 Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Kolejnym potwierdzeniem tożsamości otrzymanych związków była analiza widm FTIR. Na Rys.2 zaobserwowano wyraźne pasma absorpcyjne, które odpowiadały drganiom asymetrycznym $\nu(\text{COO})_{\text{as}}$ w okolicach 1630 cm^{-1} (oznaczone czarnymi kwadratami) oraz drganiom symetrycznym $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$ w zakresie 1400 cm^{-1} (oznaczone niebieskimi kwadratami). Różnica przekraczająca 200 cm^{-1} pomiędzy wartościami liczb falowych dla tych pasm jednoznacznie wskazała na obecność anionu karboksylanowego COO^- , co potwierdziło jonową naturę tych związków (Variam i in. 2010). Dodatkowo, zaobserwowano pasma absorpcyjne odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań C-H w okolicach 2950 cm^{-1} (oznaczone pomarańczowymi kwadratami).

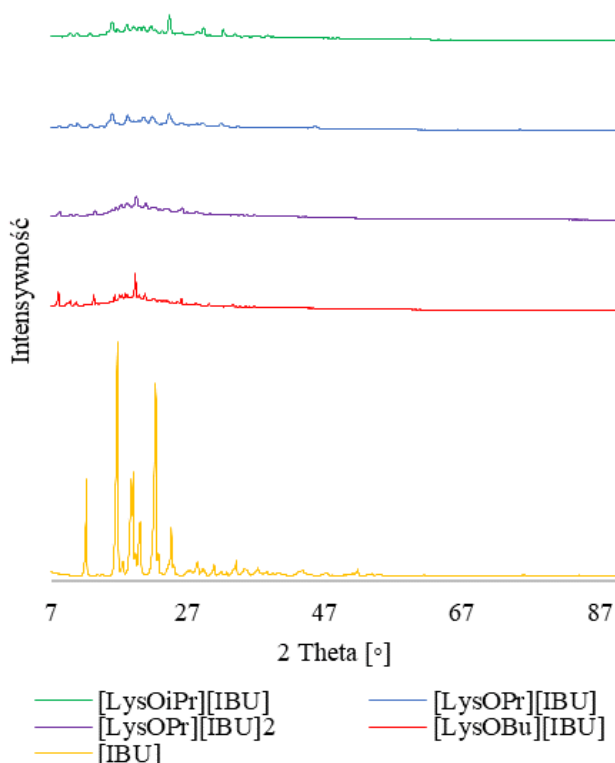


Rys.3. Zestawienie widm FT-IR otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny.

3.3 XRD

Aby potwierdzić, czy syntetyzowane ibuprofeniany są krystaliczne, wykonano analizę proszkowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Poniżej (Rys.3) zestawiono dyfraktogramy ibuprofenu oraz otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny.

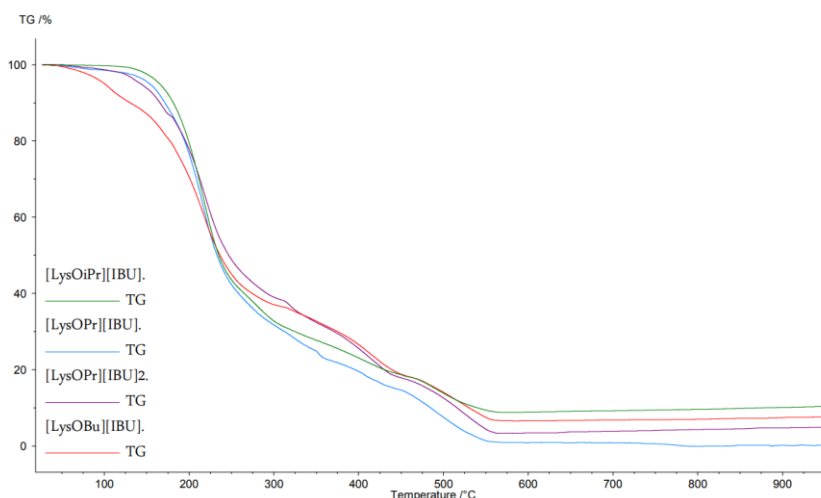
Dyfraktogramy uzyskanych pochodnych wykazywały odmienne wzorce dyfrakcyjne w porównaniu z wyjściowym ibuprofenem, co potwierdziło różnice w strukturach krystalicznych otrzymanych substancji. Intensywność refleksów pochodnych ibuprofenu była mniejsza niż w przypadku niemodyfikowanego ibuprofenu, co sugerowało obniżoną ilość fazy krystalicznej w tych pochodnych.



Rys.4. Zestawienie dyfraktogramów dla [LysOiPr][IBU] (zielony), [LysOPr][IBU] (niebieski), [LysOPr][IBU]₂ (fioletowy), [LysOBu][IBU] (czerwony) i [IBU] (pomarańczowy).

3.4 Stabilność termiczna

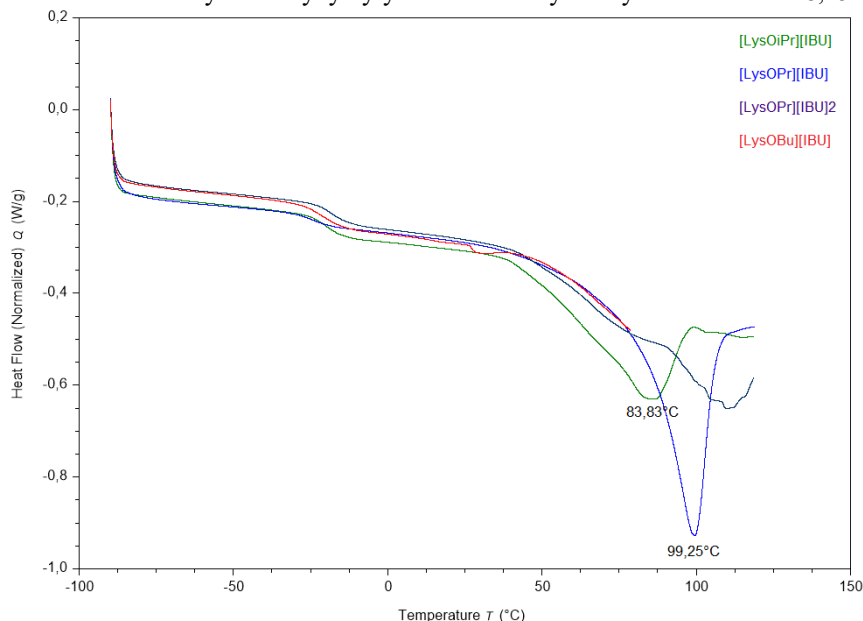
Z analizy termogravimetrycznej (Rys.4) wynikało, że im dłuższy łańcuch alkilowy w cząsteczce, tym jej stabilność termiczna malała. To prowadziło do rozkładu związku w niższych temperaturach. Spośród uzyskanych związków ibuprofenianu estru butylowego L-lizyny (oznaczony kolorem czerwonym) wykazywał najniższą stabilność termiczną.



Rys.5. Zestawienie krzywych TG otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny.

3.5 Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Na podstawie analizy DSC (Rys.5) wyznaczono temperatury topnienia i zeszklenia badanych związków. Ustalono wartości temperatury topnienia dla ibuprofenu estru izopropylowego L-lizyny – 356,98 K oraz dla ibuprofenu estru propylowego L-lizyny – 372,4 K. W obu przypadkach wartości te były poniżej 373,15 K. To oraz ich struktura jonowa wskazywały na ich przynależność do grupy cieczy jonowych. Pozostałe związki wykazywały niestabilność w tym zakresie temperatur, najprawdopodobniej topiąc się z rozkładem. Temperatury zeszklenia ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny były zbliżone i oscylowały w okolicach 248,15 K.



Rys.6. Zestawienie krzywych DSC otrzymanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny.

3.6 Rozpuszczalność w wodzie i PBS

Wyniki rozpuszczalności substancji aktywnej w wodzie i roztworze soli fizjologicznej (PBS) dla wszystkich uzyskanych pochodnych, jak i dla niemodyfikowanego ibuprofenu przedstawiono w Tab. 2.

Tab.2. Rozpuszczalność ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny w wodzie i PBS.

Związek	Rozpuszczalność w wodzie		Rozpuszczalność w PBS	
	[g dm ⁻³]	[g IBU dm ⁻³]	[g dm ⁻³]	[g IBU dm ⁻³]
IBU	0,076 ± 0,001		0,432 ± 0,001	
[LysOiPr][IBU]	9,271 ± 0,115	4,847 ± 0,049	9,204 ± 0,107	4,812 ± 0,046
[LysOPr][IBU]	6,502 ± 0,023	3,399 ± 0,001	6,944 ± 0,026	3,630 ± 0,011
[LysOPr][IBU] ₂	12,044 ± 0,183	4,142 ± 0,051	> 69,05	> 23,75
[LysOBu][IBU]	11,389 ± 0,217	5,750 ± 0,090	> 69,45	> 35,06

Zauważono wyraźnie wyższą rozpuszczalność ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny (zarówno w wodzie jak i PBS) w porównaniu do niemodyfikowanego ibuprofenu.

3.7 Lipofilowość

Wszystkie uzyskane ibuprofeniany estrów alkilowych L-lizyny wykazywały niższe wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda niż niemodyfikowany ibuprofen (Tab.3). Ze względu na wartości log P niższe niż 1 dla wszystkich tych pochodnych, można było sklasyfikować je jako substancje charakteryzujące się wysoką hydrofilowością. Nie zaobserwowano żadnej wyraźnej zależności między wartościami log P a długością łańcucha alkilowego.

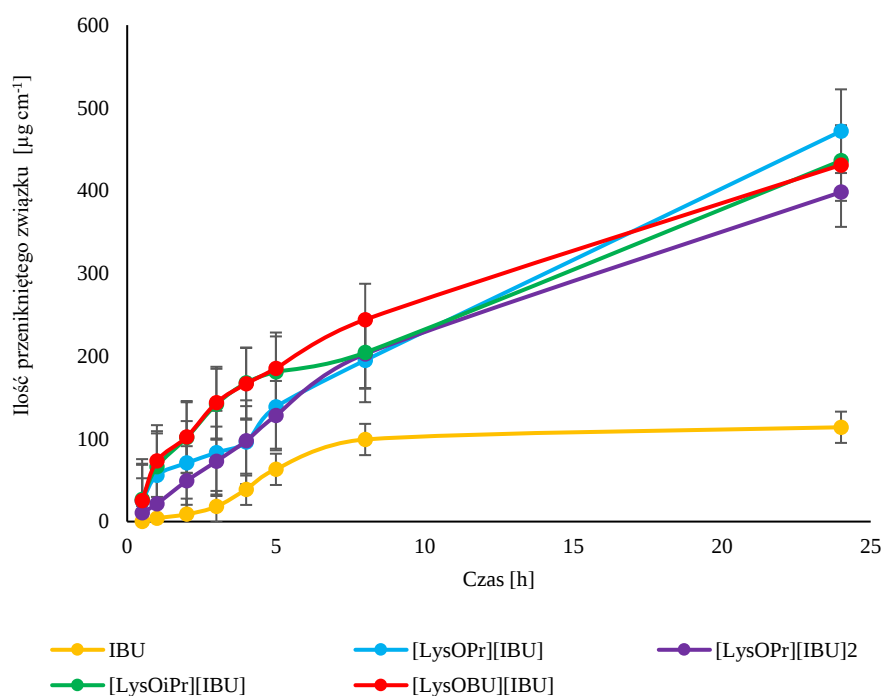
Tab.3. Wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda dla uzyskanych pochodnych ibuprofenu.

Związek	log P
IBU	3,208
[LysOiPr][IBU]	0,371
[LysOPr][IBU]	0,520
[LysOPr][IBU] ₂	0,190
[LysOBu][IBU]	0,408

3.8 Przenikalność substancji aktywnej przez skórę

W celu zbadania potencjalnego zastosowania pochodnych ibuprofenu w miejscowym i transdermalnym dostarczaniu leków, przeprowadzono testy penetracji skóry *in vitro* z wykorzystaniem skóry świnińskiej, bowiem skóra świnińska jest powszechnie używana do wstępnej oceny przenikania leków przez skórę. Liczne analizy histopatologiczne potwierdziły, że jej cechy są zbliżone do ludzkiej skóry (Khiao i in. 2019).

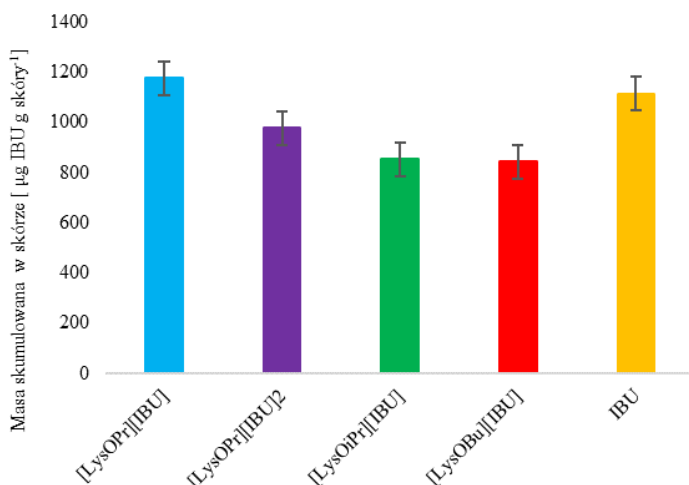
Na Rys. 6 przedstawiono profile przenikania otrzymanych związków.

**Rys.7.** Profile przenikania ibuprofenu i ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny wraz z wartościami odchylenia standardowego.

Po 24 godzinach przenikania, skumulowana masa ibuprofenu w fazie akceptorowej była wyższa po aplikacji etanolowych roztworów [LysOiPr][IBU], [LysOPr][IBU], [LysOBu][IBU] oraz [LysOPr][IBU]₂ w porównaniu z niemodyfikowanym ibuprofenem. Ibuprofenian estru propylowego L-lizyny przenikał w najwyższym stopniu, osiągając około 246 µg IBU (w odniesieniu do stężenia substancji czynnej). Względem przenikalności niemodyfikowanego ibuprofenu, uzyskana wartość była około 1,5-krotnie wyższa.

3.9 Kumulacja substancji aktywnej w skórze

Na Rys. 7 zaprezentowano wyniki kumulacji ibuprofenu w skórze. Wszystkie badane sole wykazały zdolność do kumulacji w skórze. Najniższa wartość kumulacji zaobserwowana była dla [LysOBu][IBU], podczas gdy [LysOPr][IBU] okazał się związkiem, który najefektywniej akumulował się w skórze. Sam ibuprofen również wykazywał wysoką zdolność do kumulacji.



Rys.8. Kumulacja w skórze ibuprofenu oraz ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny po 24 godzinach przenikania.

4. Wnioski

W wyniku trzyetapowej reakcji obejmującej jednoczesną estryfikację i chlorowodorowanie, zobojętnianie i protonowanie otrzymano cztery pochodne ibuprofenu – monoibuprofenian estru izopropylowego L-lizyny – [LysOiPr][IBU], monoibuprofenian estru propylowego L-lizyny – [LysOPr][IBU], bis(ibuprofenian) estru propylowego L-lizyny – [LysOPr][IBU]₂ oraz monoibuprofenian estru butylowego L-lizyny – [LysOBu][IBU]. Tożsamość wszystkich otrzymanych związków potwierdzono przy użyciu widm protonowych i węglowych NMR oraz FT-IR. Badanie XRD potwierdziło zawartość formy krystalicznej we wszystkich otrzymanych ibuprofenianach estrów alkilowych L-lizyny. W wyniku analizy termogravimetrycznej stwierdzono, że najmniej stabilnym związkiem okazał się być [LysOBu][IBU], a najbardziej stabilnym [LysOiPr][IBU]. Stwierdzono również zależność stabilności termicznej od długości łańcucha alkilowego estru, im dłuższy łańcuch tym mniejszą stabilność wykazywały związki. Dwie sole – [LysOiPr][IBU] oraz [LysOPr][IBU] charakteryzowały się temperaturami topnienia poniżej 373,15 K, co wraz z ich budową jonową oraz obecnością aminokwasu pozwoliło zaklasyfikować je do grupy aminokwasowych cieczy jonowych. Rozpuszczalność ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny (zarówno w wodzie jak i PBS) była znacząco wyższa niż niemodyfikowanego ibuprofenu. Dla wszystkich badanych pochodnych ibuprofenu uzyskano niższe wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda niż dla niemodyfikowanego ibuprofenu. We wszystkich przypadkach wartości log P były mniejsze niż 1, dlatego można było zakwalifikować je do związków hydrofilowych. Wszystkie z badanych ibuprofenianów estrów alkilowych L-lizyny przenikały w dużo lepszym stopniu przez skórę niż niemodyfikowany ibuprofen. Wykazano zależność skumulowanej masy po 24 godzinach badania przenikalności przez skórę: [LysOPr][IBU] > [LysOiPr][IBU] > [LysOBu][IBU] > [LysOPr][IBU]₂ > IBU. Wszystkie badane sole akumulowały się w skórze. [LysOPr][IBU] wykazywała najwyższą wartość kumulacji w skórze.

5. Literatura

- Fosbøl EL, Køber L, Torp-Pedersen C i in. (2010) Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs among healthy individuals. *Expert Opinion on Drug Safety* 9(6): 893-903.
- Khiao In M, Richardson KC, Loewa A (2019) Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia Histologia Embryologia* 48(3): 207-217.

- Komatsu T, Sakurada T (2012) Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47(5): 890-895.
- Murthy N (2012) *Transdermal drug delivery: approaches and significance*. Dove Press 1.
- Pedro SN, R. Freire CS, Silvestre AJD i in. (2020) The Role of Ionic Liquids in the Pharmaceutical Field: An Overview of Relevant Applications. *IJMS* 21(21): 8298.
- Tao G Hong, He L, Sun N I in. (2004) New generation ionic liquids: cations derived from amino acids. *Chemical Communications* (28): 3562.
- Vairam S, Premkumar T, Govindarajan S (2010) Trimellitate complexes of divalent transition metals with hydrazinium cation: Thermal and spectroscopic studies. *J Therm Anal Calorim.* 100(3): 955-960.
- Zhang A, Jung EC, Zhu H i in. (2017) Vehicle effects on human stratum corneum absorption and skin penetration. *Toxicology and Industrial Health* 33(5): 416-425.

10. Post-translational modifications of the PARP1 protein in enzyme activation and function

Kołaczk Kinga ^(1,2), Gronkowska Karolina ^(1,2), Robaszkiewicz Agnieszka ⁽¹⁾

⁽¹⁾ University of Lodz, Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

⁽²⁾ Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12 /16, 90-237 Lodz, Poland

Supervisor: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz Prof. UŁ.

Kołaczk Kinga: kinga.kolacz@edu.uni.lodz.pl

Key words: cellular processes, DNA damage repair, enzymatic activity,

Abstract

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) plays a key role in many cellular processes, including DNA damage response and maintenance of genome integrity. This monograph focuses on the relationship between post-translational modifications (PTMs) that regulate PARP1 activation and function. Through an overview of research findings and reviews, we elucidate the dynamic interaction of phosphorylation, acetylation, ubiquitination and other PTMs that precisely tune PARP1 enzymatic activity. We discuss the interplay of PTMs and their effects on PARP1 activation and the processes it mediates, including DNA repair, transcriptional regulation and cell fate determination. In addition, we highlight emerging therapeutic opportunities targeting specific PTMs to modulate PARP1 function, with implications for the treatment of cancer and other diseases.

1. Introduction

Many different processes occur simultaneously in the cells of all organisms, and many proteins with specialized functions are involved in these processes. Proteins have diverse roles, including transport, regulatory, signaling, catalytic and structural functions, and can be activated or deactivated by a variety of post-translational modifications (PTMs). These modifications can alter the properties of a protein by addition of functional groups to side chains of amino acid residues after protein biosynthesis is complete (Conibear 2020). Examples of post-translational modifications include phosphorylation, acetylation, glycosylation, methylation, sumoylation, ubiquitination and ADP-ribosylation (Conibear 2020). PTMs enable the control of many important biological processes in cells, such as gene expression, DNA repair and cell cycle control (Conibear 2020) and serve as fundamental mechanism for defining function of proteins under specific conditions. In addition, abnormalities associated with PTMs have been linked to numerous human diseases and developmental disorders, thereby indicating their critical role in the function and maintenance of cellular and organismal health (Wang et al. 2014).

Post-translational modifications include the aforementioned ADP-ribosylation, which regulates many processes including DNA repair, transcription, chromatin structure and cell signalling (Poltronieri et al. 2021). This type of PTM occurs when a polymer of ADP-ribose is attached to the amino acid chain of a target protein, but mono-ADP-ribosylation (MARylation) was also documented as functional modification (Poltronieri et al. 2021). The enzymes that transfer the ADP-ribose units are grouped into the family of poly-ADP-ribose polymerases (PARPs), which comprises 17 members, but PARP1 and PARP2 are the most important in repair of DNA damage (Hoch and Polo 2020). In addition PARP1 and PARP2 are responsible for the highest extent of protein PARylation in human cells - 85-90% and 10-15%, respectively (Hoch and Polo 2020). Therefore, in the present review, we focus mainly on the PARP1 with predominant activity in human cells, particularly in response to DNA lesions, but we also pay attention to the importance of post-translational modifications that modulate the activity of this enzyme.

2. Structure and function of the PARP1 protein in the cell

PARP1 consists of 1014 amino acids and has a molecular weight of approximately 113 kDa (Kamaletdinova et al. 2019). It comprises 3 major domains: a DNA-binding domain (N-terminal) containing three zinc fingers (ZnI, ZnII, ZnIII), a central self-modification domain containing the BRCT motif (BRCA1 - C-terminal domain), and a catalytic domain (C-terminal) localized in the proximity of the WGR motif, which spans conserved tryptophan, glycine and arginine residues (Ray Chaudhuri and Nussenzweig 2017). The schematic structure of PARP1 is shown in Fig. 1. The ZnI and ZnII zinc fingers are required for recognition and binding to DNA damage sites. A nuclear localisation sequence (NLS) between the second and third zinc fingers (Kamaletdinova et al. 2019) makes nucleus a primary, intracellular placement.

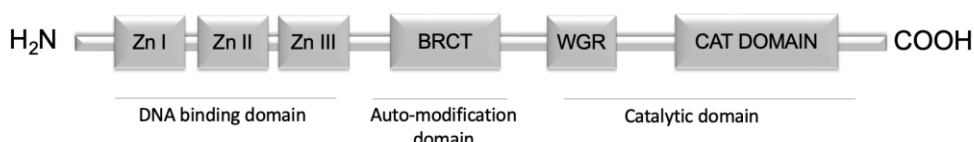


Fig. 1. Schematic representation of the domain structure of human PARP1.

The primary function of PARP1 is to synthesize an ADP-ribose (pADPr) polymer using NAD⁺ as a substrate. The synthesized polymer can range in length from 2 to more than 200 ADPr units and can be linear or branched, (every 20 to 50 ADPr units) (Ray Chaudhuri and Nussenzweig 2017). Poly(ADP-ribosylation) is a transient modification involving the attachment of mono- or pADPr to acceptor proteins or to its own protein chain at the carboxyl group site of glutamate, aspartate or lysine. Recently, some other acceptor sites for ADP-ribose molecule were identified such as serine and arginine residues (Liu et al. 2017).

2.1 Mechanisms of PARP1 activation

PARP1 and poly(ADP-ribosylation) regulate enzymatic activity of various proteins as well as dynamics of their association and dissociation from chromatin depending on the intracellular cascades activated in a particular compartment and time in cell. Under physiological conditions, a significant fraction of PARP1, approximately 40-50%, is localized in the nucleolus, where it is involved in processes related to ribosome biogenesis and maintenance of nucleolar structure (Boamah et al. 2012). The best-known mechanisms of PARP1 activation are the single-stranded (SSB) and double-stranded (DSB) DNA breaks. Upon DNA damage PARP1 translocates from the nucleolus to the nucleoplasm where recognizes DNA lesions, binds them and recruits other proteins involved in DNA repair (Liu et al. 2017). After recognition of SSBs or DSBs, PARP1 undergo activation by auto-modification and ADP-ribosylates other acceptor proteins, usually contributing in DNA repair (Ray Chaudhuri and Nussenzweig 2017). Genotoxic stress-induced activation of PARP1 also alters the affinity of PARP1 for DNA and affects PARP1-dependent chromatin compaction at the PARP1 enrichment sites (Ray Chaudhuri and Nussenzweig 2017).

Besides DNA damage-dependent mechanism, PARP1 activation also occurs through post-translational modifications, including acetylation, phosphorylation and methylation (Hamamoto 2018; Hassa et al. 2005; Kauppinen et al. 2006; Messner et al. 2009). Numerous studies suggest that post-translational modifications regulate PARP1 activity and that disruption of these PARP1 modifications is associated with human cancers (Hamamoto 2018). In this article, we describe the effects of post-translational modifications on PARP1 protein activity and function.

3. Post-translational modifications that affect PARP1 activity

The cellular processes such as DNA damage repair, regulation of transcription or cellular metabolism, require the activation of various signalling pathways and dynamic changes in protein function through their post-translational modifications. In addition to self-modification by ADP-

ribosylation, PARP1 undergoes a number of other PTMs, which are shown in the diagram below and described further in this chapter.

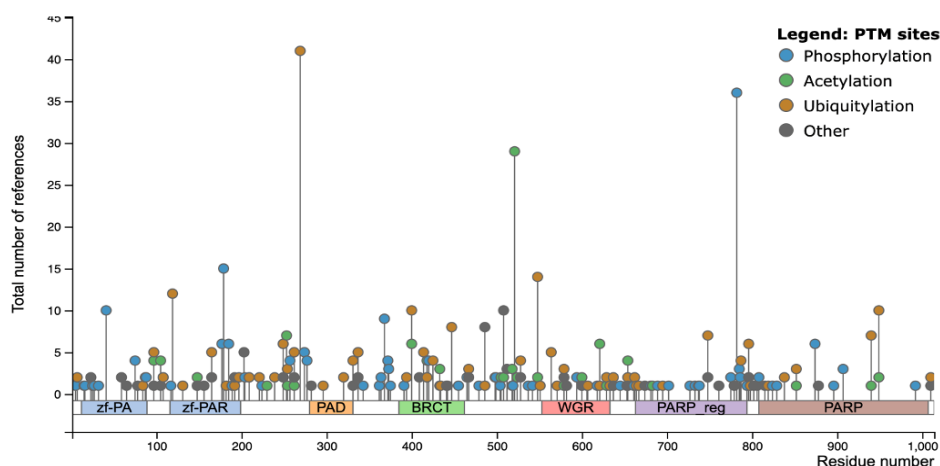


Fig. 2. PARP1 post-translational modification sites according to Source: PhosphoSite Plus Database; <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=9166&showAllSites=true>

3.1 Phosphorylation

Phosphorylation was one of the earliest identified modifications of PARP1 and initially this modification was linked to negative regulation of PARP1 activity. Phosphorylation by protein kinase C (PKC) reduced PARP1 enzymatic activity and ability to bind DNA. Similarly, AMP-activated protein kinase AMPK is also a PARP1 phosphorylating enzyme on Ser177, leading to inhibition of PARP1 activity (Hamamoto 2018). However, numerous subsequent studies demonstrated a role of phosphorylation in PARP1 activation. For example, ERK kinase 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activates PARP1 through direct phosphorylation of serine 372 and threonine 373. Similarly, CDK2 complexed to cyclin E and to progesterone receptor (PR), phosphorylates serines 785 and 786, hence phenocopying the effect of ERK1/2 (Hamamoto 2018). In addition, the receptor tyrosine kinase c-Met phosphorylates PARP1 at Tyr907, leading to increased PARP1 enzymatic activity and decreased PARP1 binding to inhibitors. Other enzymes that modify PARP1 activity via phosphorylation include c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), calmodulin kinase (CaMK), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (Hamamoto 2018).

A more recent study has demonstrated a role of the tyrosine kinase c-Abl in PARP1 phosphorylation. After exposure to LPS or TNF- α , the non-receptor c-Abl kinase underwent nuclear translocation and phosphorylated PARP1 at site Y829. Phosphorylation of PARP1 at this residue is required for RelA/p65 protein poly(ADP-ribosylation) and NF- κ B-dependent expression of pro-inflammatory genes in mouse RAW 264.7 macrophages and human monocytic THP1 cells (Bohio et al. 2019). This study identified a novel signalling pathway that is activated in response to immune stimuli, which links phosphorylation-dependent activation of PARP1 and its function in gene expression. Binding of c-Abl to PARP1 and tyrosine phosphorylation on PARP1 are important in the PARP1-NF- κ B signalling pathway mediating the regulation of pro-inflammatory genes, suggesting that blocking the interaction of c-Abl kinase with PARP1 may improve the outcome of inflammatory diseases mediated by PARP1 activation. (Bohio et al. 2019) Another study demonstrated that CHK2 stimulate PARP1 activity through phosphorylation (Hsu et al. 2019). Mechanistically, phosphorylation of PARP1 by CHK2 regulates its cellular localization and promotes its catalytic activity and interaction with other repair proteins (XRCC1).

Based on the above examples, PARP1 phosphorylation occurs on multiple amino acid residues and plays an important role in the function of PAR synthesizing enzyme. This suggests that disruption of this process or mutations in the phosphorylation sites may lead to changes in PARP1

activity and thus reduced or abolished DNA damage repair, and consequently cancer development or progression.

3.2 Acetylation and deacetylation of PARP1

PARP1 has numerous acetylation acceptor residues such as lysines: 498, 505, 508, 521 and 524 and these amino acids are modified by p300/CBP (Hassa et al. 2005). Acetylated PARP1 promotes inflammation by regulating NF- κ B-dependent gene transcription since it co-activates NF- κ B (Hassa et al. 2005). These findings suggest that acetylation of PARP1 is important for its role in regulation of gene transcription. Furthermore, PCAF acetylates PARP1 thereby enhancing enzyme auto-poly(ADP-ribosyl)ation as well as the ADP-ribosylation of other targets (Hamamoto 2018). PARP1 deacetylation is mediated by the following histone deacetylases: HDAC1, HDAC2 or HDAC3. These enzymes directly interact with PARP1, and their activity may partially suppress PARP1-dependent transcriptional activation of NF- κ B (Hassa et al. 2005). Another eraser of PARP1 acetylation is SIRT1 deacetylase, which inhibits PARP1 enzymatic activity and induces the declines in mRNA level of PARP1. Moreover, cellular level of NAD, a substrate of both enzymes, is important in the interactions between PARP1 and SIRT1.

A recent study reported the interplay between different post-translational modifications of PARP1 in oxidative stress-induced vascular damage. Lysine 249 on PARP1 is acetylated by CBP and deacetylated by SIRT2. Deacetylation of K249 by SIRT2 promotes ubiquitination of this lysine residue by mobilizing the E3 ubiquitin ligase containing WW domain of protein 2. This leads to proteasomal degradation of PARP1 (Zhang et al. 2021). This study revealed a previously unrecognized mechanistic link between SIRT2, PARP1 and WWP2 in the regulation of oxidative stress-induced vascular injury. Furthermore, 15 potential lysine residues were identified as possible sites of interaction between acetylation, SUMOylation and ubiquitination. Genomic analysis of *PARP1* mutation identified lysines K148, K249, K528, K637, K700 and K796 as likely hotspots playing an important role in the interplay between these three covalent modifications of PARP1 (Gupta and Kumar 2021). Another study showed that in breast cancer cells, NAT10 mediates the acetylation of PARP1 at Lys949, leading to its auto-modification and stability, thereby increasing the cells ability to repair DSBs (Wang and Zhao 2022). The data suggest that acetylation of different PARP1 lysine sites may confer opposing functions of this protein in DSB repair. Therefore, the intentional regulation of PARP1 acetylation may be considered as a novel therapeutic approach. Another study provides information on the inhibition of PARP1 activity by SIRT3 overexpression in cardiac hypertrophy, confirming a role of deacetylation in declining activity of PARP1. The study revealed the possibility that PARP1 interacts with SIRT3 and that PARP1 acetylation and activity are reduced by SIRT3 overexpression (Feng et al. 2020). The accumulated experimental evidence links PARP1 acetylation with increased PARP1 activity and enhanced co-activatory role in gene transcription.

3.3 Methylation

Methylation is the most poorly described post-translational modification of PARP1. Single literature reports on this type of PTM suggest the increased activity methylated PARP1. Protein methyltransferase SMYD2 modifies lysine 528 of PARP1 (Piao et al. 2014), and methylated enzyme reveals significantly higher enzymatic activity than unmethylated PARP1. Moreover, cells lacking SMYD2 showed a significant reduction in PAR levels under genotoxic stress, whereas SMYD2 overexpression led to significantly higher PARP1 activity. An additional modification that stimulates PARP1 activity is the methylation of PARP1 at Lys508 by SET7/9 (Hamamoto 2018). that catalyses lysine monomethylation of histones, but also methylates many non-histone target proteins such as p53 or DNMT1. PARP1 methylation by SET7/9 enhances PAR synthesis in response to oxidative stress *in vivo* and PARP1 recruitment to sites of DNA damage. Interestingly, PARP1 methylation does not interfere with its auto-modification, but auto-PARylation inhibits SET7/9-dependent PARP1 methylation thereby suggesting that such a molecular mechanism may prevent PARP1 overactivation upon genotoxic stress.

3.4 SUMOylation and Ubiquitination

PARP1 was shown to undergo SUMOylation and ubiquitination. For example, SUMO E3 ligase, an inhibitor of STAT4-activated protein (PIAS4), interacts with PARP1 and mediates heat shock-induced PARP1 polySUMOylation at lysines 486 and 203 (Hamamoto 2018). In contrast, SUMO1/sentrin-specific peptidases 1 and 3 (SEN1 and SEN3) (Messner et al. 2009) are responsible for PARP1 desumoylation. SUMOylation of lysine 486 does not affect the enzymatic activity of PARP1, but abolished the p300-dependent acetylation of PARP1, thereby providing the mechanistical and functional link between SUMOylation and acetylation on PARP1. Moreover, SUMOylation of PARP1 at lysine 486 reduce its a transcriptional coactivator activity. SUMOylation-deficient PARP1 mutant shows improved transcriptional coactivator function compared to wild-type PARP1 (Messner et al. 2009). SUMOylation-mediated labelling of PARP1 protein by SUMO2 leads to recognition of PARP1 by SUMO-targeting Ring Finger Protein ubiquitin ligase 4 (RNF4), thereby leading to ubiquitination and degradation of this protein. This suggests another link between SUMOylation and ubiquitination of PARP1. Other PARP1 ubiquitinating proteins include the Ub E3 ligase RNF198 (Kashima et al. 2012), which recognizes specifically modified PARP1 molecules and ubiquitinates them at residues K68 and K63. The above-mentioned required modification – ubiquitination is inserted by the PAR ring finger 146-dependent E3 ligase (RNF146 or Iduna) (Hamamoto 2018). This enzyme modifies proteins that are PARsylated or bind PAR. The described molecular circuit links Iduna's PAR-dependent ubiquitination of PARP1 with it targeting for proteasomal degradation.

SUMOylation and ubiquitination may play an important role in the release of PARP1 trapped on chromatin after cell treatment with PARP1 inhibitors. Analyses by Krastev et al. revealed an interaction between chromatin-bound PARP1 and the ubiquitin-regulated ATPase p97. They found that PARP1 trapped on the chromatin undergoes SUMOylation by PIAS4 and subsequent ubiquitylation by the E3 ubiquitin ligase RNF4. These modifications promote the recruitment of p97 and the release of PARP1 trapped on the chromatin (Krastev et al. 2022). This suggests a possible mechanism for PARP1 release from DNA after its trapping with PARP1 inhibitors and pave the way for new therapeutic approach, particularly in tumors that gained resistance to PARP traps. The above examples indicate that SUMOylation alone does not affect PARP1 protein activity, but it may indirectly modulate PARP1 via the interplay between SUMOylation, acetylation, and ubiquitination, which results in PARP1 degradation.

3.5 ADP-ribosylation

PARP1 automodification occurs in the form of a single ADP-ribose unit, short as well as long ADP-ribose chains of 2-200 units in length. It is inserted primarily at aspartate and glutamate residues in the 'automodification region', which consists of the BRCT fold (Rouleau-Turcotte and Pascal 2023). Three lysine residues, Lys498, Lys521 and Lys524 in the automodification loop (aa 466-525) and additional residues in the first 214 amino acids of PARP1 (Hamamoto 2018) have been identified as target sites for PARP1 auto-ADP ribosylation. As previously described, DNA damage switches the ADP-ribosylation sites to serine due. To PARP1 interaction with HPF1, and the enzyme is automodified at three serine residues: S499, S507 and S519 (Rouleau-Turcotte and Pascal 2023).

Differences in the interaction of PARP1 with chromatin depend on the extent of its ADP-ribosylation - extensive ADP-ribosylation contributes to PARP1 release from chromatin and inhibits its binding to DNA, whereas moderate and weak ADP-ribosylation allows *de novo* PARP1 interaction with chromatin (Hamamoto 2018) or maintains pre-existed PARP1 interaction with DNA. Some reports indicate that PARP1 auto-modification reduces the ability of this protein to bind to intact chromatin, but not to nucleosomes and free ends of DNA (Hamamoto 2018). ADP-ribosylation of PARP1 may facilitate its release from DNA due to the high negative charge of ADP-ribose, which leads to repulsion from also negatively charged DNA (Laspata et al. 2023), but other mechanisms causing PARP1 release from chromatin are also possible.

PARP1 automodification is required to repair DNA damage. The sirtuin 6 (SIRT6)-dependent mono-ADP-ribosylation of PARP1 at lysine 521 stimulates PARP1 activity and facilitates DNA damage repair (Mao et al. 2011). In addition to auto-modification, other PARP family proteins

can ADP-ribosylate PARP1. PARP2 form heterodimers with PARP1 and these two enzymes modify each other. Literature data suggest that PARP3 can also bind to PARP1 and lead to its activation (Hamamoto 2018).

4. Summary

PARP1 plays an important role in the regulation of many intracellular processes. Post-translational modifications of this protein, such as phosphorylation, acetylation or ADP-ribosylation, play an important role in PARP1 activation, interaction with DNA, chromatin, and with other proteins as well as determines protein stability and abundance. Therefore, post-translational modifications of PARP1 modulate processes in which PARP1 is involved. These include, but is not limited to, DNA repair, regulation of gene transcription or regulation of cell death. Knowing and understanding the functions and interplay between these modifications is crucial to understand the mechanisms that control and modulate PARP1 activity and function. Comprehensive knowledge of these mutual interconnections may be useful to revise the scheme of anti-cancer therapies based on PARP1 inhibitors and possibly repurposing of these compounds in other, PARP1-mediated diseases or conditions.

5. Literature

- Boamah EK, Kotova E, Garabedia M, et al. (2012) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Regulates Ribosomal Biogenesis in *Drosophila* Nucleoli. *PLoS Genet* 8: e1002442. doi.org/10.1371/journal.pgen.1002442
- Bohio AA, Sattout A, Wang R, et al. (2019) c-Abl-Mediated Tyrosine Phosphorylation of PARP1 Is Crucial for Expression of Proinflammatory Genes. *The Journal of Immunology* 203: 1521–1531. doi.org/10.4049/jimmunol.1801616
- Conibear AC (2020) Deciphering protein post-translational modifications using chemical biology tools. *Nat Rev Chem* 4, 674–695. doi.org/10.1038/s41570-020-00223-8
- Feng X, Wang Y, Chen W, et al. (2020) SIRT3 inhibits cardiac hypertrophy by regulating PARP-1 activity. *Aging* 12, 4178–4192. doi.org/10.18632/aging.102862
- Gupta R, Kumar P (2021) Computational Analysis Indicates That PARP1 Acts as a Histone Deacetylases Interactor Sharing Common Lysine Residues for Acetylation, Ubiquitination, and SUMOylation in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *ACS Omega* 6, 5739–5753. doi.org/10.1021/acsomega.0c06168
- Hamamoto R (2018) Regulation of poly ADP-Ribose polymerase 1 functions by post-translational modifications. *Frontiers in Bioscience* 23, 4578. doi.org/10.2741/4578
- Hassa PO, Haenni SS, Buerki C, et al. (2005) Acetylation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by p300/CREB-binding Protein Regulates Coactivation of NF- κ B-dependent Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 280, 40450–40464. doi.org/10.1074/jbc.M507553200
- Hoch NC, Polo LM (2020) ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease. *Genet Mol Biol* 43. doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0075
- Hsu PC, Gopinath RK, Hsueh YA, et al. (2019) CHK2-mediated regulation of PARP1 in oxidative DNA damage response. *Oncogene* 38, 1166–1182. doi.org/10.1038/s41388-018-0506-7
- Kamaletdinova T, Fanaei-Kahrani Z, Wang ZQ (2019) The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. *Cells* 8, 1625. doi.org/10.3390/cells8121625
- Kashima L, Idogawa M, Mita H, et al. (2012) CHFR Protein Regulates Mitotic Checkpoint by Targeting PARP-1 Protein for Ubiquitination and Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12975–12984. doi.org/10.1074/jbc.M111.321828
- Kauppinen TM, Chan WY, Suh SW, et al. (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 7136–7141. doi.org/10.1073/pnas.0508606103
- Krastev DB, Li S, Sun Y, et al. (2022) The ubiquitin-dependent ATPase p97 removes cytotoxic trapped PARP1 from chromatin. *Nat Cell Biol* 24, 62–73. doi.org/10.1038/s41556-021-00807-6

- Laspatha N, Muoio D, Fouquerel E (2023) Multifaceted Role of PARP1 in Maintaining Genome Stability Through Its Binding to Alternative DNA Structures. *J Mol Biol* 168207. doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168207
- Liu C, Vyas A, Kassab MA, et al. (2017) The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 45, 8129–8141. doi.org/10.1093/nar/gkx565
- Mao Z, Hine C, Tian X, et al. (2011) SIRT6 Promotes DNA Repair Under Stress by Activating PARP1. *Science* (1979) 332, 1443–1446. doi.org/10.1126/science.1202723
- Messner S, Schuermann D, Altmeyer M, et al. (2009) Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *The FASEB Journal* 23, 3978–3989. doi.org/10.1096/fj.09-137695
- Piao L, Kang D, Suzuki T, et al. (2014) The Histone Methyltransferase SMYD2 Methylates PARP1 and Promotes Poly(ADP-ribosyl)ation Activity in Cancer Cells. *Neoplasia* 16, 257-264.e2. doi.org/10.1016/j.neo.2014.03.002
- Poltronieri P, Miwa M, Masutani M (2021) ADP-Ribosylation as Post-Translational Modification of Proteins: Use of Inhibitors in Cancer Control. *Int J Mol Sci* 22, 10829. doi.org/10.3390/ijms221910829
- Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 610–621. doi.org/10.1038/nrm.2017.53
- Rouleau-Turcotte É, Pascal JM (2023) ADP-ribose contributions to genome stability and PARP enzyme trapping on sites of DNA damage; paradigm shifts for a coming-of-age modification. *Journal of Biological Chemistry* 299, 105397. doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105397
- Wang X, Zhao J (2022) Targeted Cancer Therapy Based on Acetylation and Deacetylation of Key Proteins Involved in Double-Strand Break Repair. *Cancer Manag Res Volume* 14, 259–271. doi.org/10.2147/CMAR.S346052
- Wang YC, Peterson SE, Loring JF (2014) Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* 24, 143–160. doi.org/10.1038/cr.2013.151
- Zhang N, Zhang Y, Wu B, et al. (2021) Deacetylation-dependent regulation of PARP1 by SIRT2 dictates ubiquitination of PARP1 in oxidative stress-induced vascular injury. *Redox Biol* 47, 102141. doi.org/10.1016/j.redox.2021.102141

11. Post-translational protein modifications under cellular stress: Implications for DNA repair

Kołaczk Kinga ^(1,2), Gronkowska Karolina ^(1,2), Robaszkiewicz Agnieszka ⁽¹⁾

⁽¹⁾ University of Lodz, Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

⁽²⁾ Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12 /16, 90-237 Lodz, Poland

Supervisor: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz Prof. UŁ.

Kołaczk Kinga: kinga.kolacz@edu.uni.lodz.pl

Key words: cellular processes, DNA damage repair, enzymatic activity, DNA damage response

Abstract

Cellular responses to stress involve complex signaling pathways, including those that orchestrate DNA damage repair. This manuscript reviews the dynamic post-translational modification (PTM) network of proteins, with a particular focus on their role in DNA repair processes under cellular stress. It includes key PTMs such as phosphorylation, methylation and acetylation and highlights their regulatory impact on proteins involved in DNA damage response pathways. It will focus also on the interplay between PTMs and the activation or inhibition of critical DNA repair factors. Insights into the intricate molecular mechanisms governing PTMs in the context of cellular stress will contribute to a deeper understanding of the cellular response to DNA damage.

1. Introduction

An organism's cells are constantly exposed to different types of stress. (e.g. oxidative stress, hypoxic stress and genotoxic stress) caused by a number of internal and external factors (Abramowicz et al. 2019). Cells have evolved a number of complex mechanisms that enable them to respond to stress conditions, from the activation of molecular pathways that promote survival to the induction of apoptosis - programmed cell death - when repair processes fail (Fulda et al. 2010). One of the key aspects of the cellular stress response is the post-translational modification (PTM) of proteins.

PTMs can alter the biological functions of cells by, among other, altering the activity and stability of proteins and their interaction with DNA, RNA and other proteins. Because of the many functional changes in proteins that occur as a result of their modification, PTMs are involved in the regulation of many cellular processes and pathways, such as the cell cycle, cell differentiation, transcriptional regulation, DNA damage response, cell metabolism and signal transduction. For example, phosphorylation is involved in cell signalling and the cell cycle; acetylation and methylation are associated with transcriptional regulation and cell metabolism and ubiquitination regulates protein degradation and localisation (Zhong et al. 2023).

The use of PTMs in the stress response has the obvious advantage of rapidly changing the mode of action of already synthesised proteins, with a huge number of possible combinations of PTMs on different amino acids, allowing dynamic changes in protein function. In addition, PTMs are reversible in a short time, which is another important feature of the stress response, especially when stress exposure is short (Rein 2020). Thus, post-translational modifications may play an important role in regulating the cellular response to stress by influencing cell fate decisions. In the later sections of this monograph, we will discuss selected post-translational modifications involved in the signalling pathways that determine the cellular response to stress and DNA damage.

2. The role of post-translational modifications in protein function

Protein PTMs changes the protein conformation, localization, activity, stability, charges, and interactions with other biomolecules, altering the phenotypes and biological response of cells (Zhong et al. 2023).

Protein phosphorylation is one of the most abundant PTMs in humans. Phosphorylation is formed by adding a phosphate group from ATP mainly to serine, threonine and tyrosine residues on the side chains of amino acids. This reaction is catalyzed by kinases and the reverse process dephosphorylation is catalyzed by phosphatases (Ramazi and Zahiri 2021; Zhong et al. 2023). By affecting protein activity, stability, localization, conformation and protein-protein interaction (PPI), this PTM is involved in the regulation of many physiological processes, including cellular stress response and DNA repair (Ramazi and Zahiri 2021; Zhong et al. 2023). Histone phosphorylation confers a negative charge to the histone, resulting in a more open chromatin conformation, associated with gene expression and DNA damage repair (Singh et al. 2020).

Acetylation is process dynamically regulated by the action of acetyltransferases and deacetylases. Acetyltransferases use acetyl CoA as a cofactor for adding an acetyl group to the ϵ -amino group of amino acids (mostly lysine) side chains, whereas deacetylases remove an acetyl group (Ramazi and Zahiri 2021; Zhong et al. 2023). Acetylation serves as a regulatory switch for protein conformation and activity changes. By changing the PPI, localization, stability, and activity of metabolic enzymes, acetylation is extensively involved in metabolism regulation. Moreover, acetylation is involved in DNA damage repair, signal transduction, stress response and autophagy (Zhong et al. 2023). In histone proteins lysine acetylation was shown to reduce positive charge of histone proteins, relaxing DNA-histone contacts and facilitating gene transcription (Xia et al. 2020).

Protein methylation, formed by transferring a methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) to a specific methyl acceptor, usually occurs at the side chains of lysine and arginine. Methylation is involved in the regulation of protein stability and activity, PPIs, nuclear-cytoplasmic shuttling and DNA damage repair (Zhong et al. 2023). Methylation of histone proteins is not sufficient to alter their charge, and therefore, likely acts to recruit other effector proteins to specific chromatin sites. H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 H3K36me2, and H3K36me3 modifications are associated with transcriptional activation, whereas H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 are considered repressive marks (Bure et al. 2022; Fallah et al. 2021)

Ubiquitination is the covalent attachment of ubiquitin (Ub) monomers (monoubiquitination) or Ub chains (polyubiquitination) mostly to lysine residues of proteins. Ubiquitination is regulated by three enzymes: Ub-activating enzyme (E1), Ub-conjugating enzyme (E2), and Ub-ligase enzyme (E3). The removal of ubiquitination is mainly carried out by deubiquitinases (DUBs) (Lee et al., 2023). A variety of Ub combinations are involved in different physiological functions. K48-, K11- or K29-linked ubiquitination and multiple monoubiquitination are signals for proteasomal degradation. However, K27- and K63-linked ubiquitination regulates proteasome-independent processes such as DNA repair and autophagy. SUMOylation is similar to the Ub modification process, requiring SUMO-activation enzyme (E1), SUMO-conjugating enzyme (E2), and SUMO-ligating enzyme (E3). SUMOylation is a PTM that covalently attaches small Ub-like modifiers (SUMOs) to specific lysine residues in proteins. SUMOylated proteins are often more stable and less susceptible to degradation (Zhong et al., 2023). Although, some ubiquitin ligases, termed SUMO-targeted ubiquitin ligases (Uls), recognize sumoylated proteins and links SUMO modification to the ubiquitin/proteasome system (Sriramachandran and Dohmen, 2014). In addition, SUMOylation is associated with the regulation of protein localization and activity and is involved in various cellular processes, such as DNA repair, apoptosis, cell cycle, and gene transcription (Zhong et al. 2023).

ADP-ribosylation is a process in which ADP-ribosyl transferases transfer ADP-ribosyl to the target protein's using NAD⁺ as the substrate. This modification, which occurs as mono- or poly-ADP-ribosylation, is reversible due to the action of different ADP-ribosylhydrolases (Lüscher et al. 2022). The structure and function of many proteins are regulated by ADP-ribosylation. ADP-ribosylation is involved in numerous physiological and pathological processes, such as signal transduction, protein transport, transcription, DNA damage repair, cell cycle regulation, viral infections, apoptosis, and necrosis (Lüscher et al. 2022; Zhong et al. 2023)

Different PTMs do not only function by themselves but can coordinately determine the activity and function of proteins. PTM cross-talk refers to the interaction of PTM sites between the same protein or different proteins, which affects the biological functions. These interactions can be positive, e.g., ubiquitination that is dependent on proximal phosphorylation, sumoylation, or ADP-

ribosylation or negative, as when histone H3R2 dimethylation prevents H3K4 trimethylation. Another type of PTM crosstalk is direct competition, a form of negative crosstalk where two different modifications such as phosphorylation and O-GlcNAcylation can occur on the same residue, and each modification inhibits the addition of the other (Leutert et al. 2021). Additionally, PTMs can activate or deactivate other regulators thereby changing the PTM status of downstream proteins. For example, acetylation has been shown to reduce the kinase activity of CDK9 (Beltrao et al. 2013). This indicates that PTMs tend to act in a coordinated manner.

3. Factors that lead to cellular stress

Among the main triggers of cellular stress, we can include: DNA-damaging agents (e.g., ionizing radiation and chemotherapeutic agents), which cause DNA damages and activate repair pathways specific for different types of DNA lesion; heat shock or chemical toxins that cause protein denaturation, which activate the unfolded protein response (UPR) in the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria; hypoxia and respiratory poisons that cause mitochondrial stress; nutrient deprivation, which activates autophagy enabling cells to catabolize their own components for survival and infectious agents, which can induce a variety of stress responses by activating pattern recognition receptors (Galluzzi et al. 2018). There are many different triggers of cellular stress, and the cell's response to these conditions depends on the nature and level of the threat. The adaptive capacity of the cell ultimately determines its fate (Fulda et al. 2010). The occurrence of stressful conditions can activate damage repair mechanisms if the stress-induced changes are temporary. However, it can also lead to senescence or cell death when restoration to normal conditions is impossible. Many of factors causing cellular stress lead to the occurrence of DNA damage and the subsequent activation of repair pathways that enable cells to respond to adverse conditions. (Fulda et al. 2010).

4. PTM's role in DNA damage response

Following DNA damage, various DNA repair mechanisms are activated, e.g. NER (nucleotide excision repair) and BER (base excision repair) for single-stranded DNA damage (SSB) or HR (homologous recombination) and NHEJ (non-homologous end joining) for double-stranded DNA damage (DSB). Post-translational modifications are involved in the response to both SSBs and DSBs.

4.1 Phosphorylation

When a single- or double-strand break occurs, phosphorylation of the serine residues of thousands of H2AX molecules is observed, resulting in the formation of phosphorylated H2AX or γ -H2AX (Bai et al. 2020). In the case of SSBs, phosphorylation of the protein XRCC1 - a key factor in SSB repair via the BER pathway - has been shown to facilitate the BER cutting step by promoting its dissociation from the DNA and the recruitment of downstream BER proteins to the initial damage step. The occurrence of DSB is also associated with increased phosphorylation of many factors, including H2AX, ATM, ATR, Chk1, Chk2, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and Ku70/Ku80 heterodimers. Many DDR and repair components are directly or indirectly recruited to γ -H2AX foci, including BRCA1, Rad50, Rad51, 53BP1. The ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways are key regulators of cell cycle arrest following DNA damage. Phosphorylation of Chk1/Chk2 proteins by ATM/ATR kinases leads to phosphorylation of the p53 protein, which acts directly on chromatin to increase transcription of p21 and certain DNA repair-related genes. p21 is responsible for inhibiting cell proliferation and suppressing genes whose transcriptional activity is determined by the rate of mitotic divisions. High levels of p21 subsequently lead to the formation of the RB-E2F1 complex and reduced expression of cell cycle genes (Engeland 2022). In addition to regulating transcription, E2F1 was shown to regulate DNA repair directly. E2F1 localizes to sites of DNA damage dependent on its phosphorylation at serine 31 by the ATM or ATR kinases. The topoisomerase II binding protein (TopBP1), which has multiple functions during the DNA damage response, specifically binds this phosphorylated form of E2F1 resulting in recruitment of E2F1 to sites of DNA damage. RB associates with E2F1 at DSBs and helps to stabilize the interaction between

phosphorylated E2F1 and TopBP1. A knock-in mutation that prevents E2F1 phosphorylation and recruitment of E2F1 and RB to sites of DNA breaks also impairs DNA repair and renders mice hypersensitive to ionizing radiation (IR) (Manickavaniyaham et al. 2019).

4.2 Poly-ADP ribosylation

PTM that is of great importance in the recognition of DNA damage and the initiation of repair is poly-ADP-ribosylation. Upon binding to DNA damage, the catalytic activity of PARP1 is immediately triggered and the enzyme catalyzes the addition of poly-ADP-ribose chains to its amino acid chain (self-modification) and to other substrates. XRCC1 (SSB repair protein) was found to interact with PARP-1-bound poly(ADP-ribose) through a PAR-binding motif. XRCC1 is then phosphorylated by ATM-Chk2, allowing the recruitment of many downstream proteins involved in BER to the initial sites of damage. The PAR binding motif is also found in xeroderma pigmentosum complement group protein A (XPA), the primary protein involved in the initial phase of NER. XPA has been shown to bind PARP-1 and PAR and is recruited to UV-induced DNA damage. Thus, poly(ADP-ribosyl)ation plays an important role in the initiation of DNA repair and provides the basis for the recruitment of BER/NER-related proteins. PARP-1 also detects double-strand breaks and provides a scaffold for chromatin remodelers (Bai et al. 2020). Poly(ADP-ribosyl)ation in DNA DSB repair focuses on the recruitment of a number of proteins involved in DNA repair to damaged sites through various PAR-binding motifs, and also contributes to the initiation of downstream events at different stages (Bai et al. 2020). PARP1 also directs the transcription of some DNA repair genes in breast cancer cells by the ADP-ribosylation of EP300, thereby causing its activation and marking nucleosomes for displacement by BRG1 (Sobczak et al. 2019).

4.3 Ubiquitination

Ubiquitination plays a key role in the DNA repair process by adding the protein ubiquitin to its substrate. For example, histone ubiquitination is an important step in DNA damage response, following DSBs in DNA, H2A on K13 and K15 can be ubiquitinated by RNF168 and RNF8, leading to the recruitment of other DNA repair proteins such as BRCA1 and 53BP1 and increasing the DNA damage response. The ubiquitination signal is recognised by 53BP1, which inhibits the HR process and promotes NHEJ. 53BP1 recognises both H4K20me2 and H2A K15ub at DNA damage sites, whereas BRCA1 recruitment depends on RAP80 via its ubiquitin-binding modules (UIMs), which bind K63 ubiquitin chains on chromatin. RNF169 is also recruited to DSBs, competes with RNF168, removes 53BP1 and RAP80 ubiquitin-binding sites on histone surfaces and promotes HR. RAD51 ubiquitination impairs RAD51-BRCA2 interaction, whereas RAD51 deubiquitination mediated by UCHL3 enhances RAD51-BRCA2 binding and facilitates RAD51 recruitment to DSBs. Ubiquitination of histone H2B (K120) in response to DNA damage via the RNF20-RNF40 complex leads to chromatin relaxation, increasing the availability of DNA repair factors (Yu et al. 2020).

4.4 Sumoylation

Following DNA damage, many DNA repair factors undergo sumoylation. SUMO1-3 accumulates at DSBs in human cells, and the SUMO ligases PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT protein 1) and PIAS4 (protein inhibitor of activated STAT protein 4) are essential for this accumulation, which is important for subsequent ubiquitination catalysed by RNF8 and RNF168. PIAS protein deficiency affects the ability to efficiently recruit 53BP1 and BRCA1 to DNA break sites; this significantly impairs ubiquitination of histone H2A and accumulation of K63-linked ubiquitin conjugates at DSB sites, what suggest an important role for SUMO E3 ligases in DNA repair (Bai et al. 2020). In addition, RAP80 binding to SUMO at DNA damage sites via the SUMO interacting motif (SIM) is also important for its recruitment to DSB sites. SUMO-bound RAP80 recognises SUMO-ubiquitin hybrid chains synthesised by RNF4 and promotes BRCA1 recruitment. BRCA1 is also sumoylated by the PIAS ligase SUMO E3 in response to DSBs, increasing the ubiquitin ligase activity of the BRCA1/BARD1 complex and promoting HR. Sumoylation also plays a key role in shutting down the DNA damage response after repair. MDC1 is sumoylated at sites of damage, leading to recognition by the SUMO (SIM) interaction motifs of RNF4, followed by its ubiquitination, degradation and removal from the DSB, as is the 53BP1 protein. RNF4 also interacts

with other sumoylated proteins through its SIM motifs and ubiquitinates polysumoylated proteins to facilitate their degradation (Yu et al. 2020).

4.5 Acetylation

The MRN complex (Mre11-Rad50-Nbs1) acts as a sensor of DSBs, detecting them and transmitting damage signals by phosphorylating proteins involved in cell cycle checkpoints and DNA repair. Tip60 forms a complex with MRN that is essential for its binding to DNA damage sites. As Tip60 is an acetyltransferase, it has been reported that ATM activation is dependent on lysine 3016 acetylation mediated by Tip60 in response to DNA DSBs. The acetylation of H2AX (K5) observed in the early stages of DDR is also catalysed by Tip60. There are reports that H2AX is constitutively acetylated at lysine 36 (H2AX K36Ac) by CBP/p300 acetyltransferases independently of H2AX phosphorylation. In addition, Tip60-dependent acetylation of H4 promotes HR-mediated DNA repair by reducing the presence of 53BP1 on chromatin. In turn acetylation of H3 and H4 by CBP/p300 facilitates NHEJ and chromatin relaxation by recruiting Ku70 and Ku80; BRG1, the catalytic subunit of the SWI/SNF chromatin remodelling complex, facilitates DSB repair by interacting with acetylated H3 through its bromodomain, suggesting an important role for acetylation in facilitating DNA DSB repair and recruitment of DSB-related proteins (Bai et al., 2020). In addition to phosphorylation, E2F1 is also acetylated in response to DNA damage by PCAF, CBP/p300 and Tip60. E2F1 acetylation can occur in the absence of E2F1 phosphorylation and independently promotes E2F1 stabilization in response to DNA damage and may also target E2F1 to specific pro-apoptotic genes, such as p7316 (Manickavinayam et al. 2019).

4.6 Methylation

Literature reports indicate that the Pol- β lyase domain, which plays a key role in BER, binds to PRMT6 and PRMT1, which play important roles in regulating Pol- β function. PRMT6 methylates R83 and R152 of Pol- β , increasing polymerase activity, while PRMT1 methylates R137, blocking Pol- β -PCNA interaction. FEN1, a Rad2 nuclease important for DNA replication and repair, undergoes methylation, enhancing FEN1 interaction with PCNA and promoting NER. RUVBL1, a cofactor of the TIP60 complex, requires methylation by PRMT5 during DSB repair, which activates TIP60 α , allowing acetylation of histone H4K16 and displacement of 53BP1 from DSBs. A component of the key MRN complex for HR, Mre11, is methylated by PRMT1, which is important for its function. Global inhibition of the methyltransferase disrupts the recruitment of Mre11 and 53BP1 to DSBs. At sites of DNA damage, multiple HMTs and HDTs modify chromatin and regulate the DDR. The demethylase KDM5B is responsible for demethylating H3K4me3, which is required for the accumulation of the repair proteins Ku70 and BRCA1 at DSBs. The interaction of H3K9me3 with Tip60 enhances the HAT activity of TIP60, which promotes HR repair through ATM and H4 acetylation. H3K6 methylation improves the association of DNA repair components (NBS1, Ku70) with DSBs, thereby affecting the efficiency of DSB repair (Bai et al. 2020).

5. Conclusions

Understanding the complex interplay between cellular stress and post-translational modifications is crucial to unravelling the molecular mechanisms underlying the stress response. Post-translational modifications (PTMs) play a critical role in the repair of DNA damage, thereby contributing to the maintenance of genomic integrity. DNA damage can be caused by a variety of factors, including exposure to ionizing radiation, chemical agents and endogenous cellular processes. To counteract these threats, cells have evolved complex DNA repair mechanisms in which PTMs play an important role. The dynamic interplay of phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, acetylation and methylation fine-tune the cellular response to maintain genomic stability and prevent the accumulation of mutations that could lead to disease, including cancer. Elucidation of these processes will not only improve our understanding of cellular physiology, but also holds the promise of developing targeted therapeutic interventions to mitigate the effects of stress-related disorders associated with impaired DNA repair.

6. References

- Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M (2019) Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review. *Proteomes* 7, 23. doi.org/10.3390/proteomes7020023
- Bai M, Ti D, Mei Q, et al. (2020) The Role of Posttranslational Modifications in DNA Repair. *Biomed Res Int* 2020, 1–13. doi.org/10.1155/2020/7493902
- Beltrao P, Bork P, Krogan NJ, et al. (2013) Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Syst Biol* 9, 714. doi.org/https://doi.org/10.1002/msb.201304521
- Bure IV, Nemtsova MV, Kuznetsova EB (2022) Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. doi.org/10.3390/ijms23105801
- Engeland K (2022) Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29, 946–960. doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z
- Fallah MS, Szarics D, Robson CM, et al. (2021) Impaired Regulation of Histone Methylation and Acetylation Underlies Specific Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Genetics*.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, et al. (2010) Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int J Cell Biol* 2010, 1–23. doi.org/10.1155/2010/214074
- Galluzzi L, Yamazaki T, Kroemer G (2018) Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 731–745. doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0
- Leutert M, Entwisle SW, Villén J (2021) Decoding Post-Translational Modification Crosstalk With Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 20, 100129. doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100129
- Lüscher B, Ahel I, Altmeyer M, et al. (2022) ADP-ribosyltransferases, an update on function and nomenclature. *FEBS J* 289, 7399–7410. doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.16142
- Manickavinayaham S, Vélez-Cruz R, Biswas AK, et al. (2019) E2F1 acetylation directs p300/CBP-mediated histone acetylation at DNA double-strand breaks to facilitate repair. *Nat Commun* 10, 4951. doi.org/10.1038/s41467-019-12861-8
- Ramazi S, Zahiri J (2021) Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)* 2021. doi.org/10.1093/database/baab012
- Rein T (2020) Post-translational modifications and stress adaptation: the paradigm of FKBP51. *Biochem Soc Trans* 48, 441–449. doi.org/10.1042/BST20190332
- Singh D, Nishi K, Khambata K, et al. (2020) Introduction to epigenetics: basic concepts and advancements in the field, in: Tollefsbol, T.B.T.-E. and R.H. (Ed.), *Translational Epigenetics*. Academic Press, pp. xxv–xliv. doi.org/10.1016/B978-0-12-819753-0.02001-8
- Sobczak M, Pitt AR, Spickett CM, et al., (2019) PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers (Basel)* 11, 1539. doi.org/10.3390/cancers11101539
- Sriramachandran AM, Dohmen RJ (2014) SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 75–85. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.022
- Xia C, Tao Y, Li M, et al. (2020) Protein acetylation and deacetylation: An important regulatory modification in gene transcription (Review). *Exp Ther Med* 20, 2923–2940. doi.org/10.3892/etm.2020.9073
- Yu J, Qin B, Lou Z (2020) Ubiquitin and ubiquitin-like molecules in DNA double strand break repair. *Cell Biosci* 10, 13. doi.org/10.1186/s13578-020-0380-1
- Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, et al. (2023) Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm (Beijing)* 4. doi.org/10.1002/mco2.261

12. Przegląd czynników wpływających na właściwości membrany opartej na poli(fluorku winylidenu) (PVDF)

A review of factors influencing the properties of a polyvinylidene fluoride (PVDF) based membrane

Surma Olga⁽¹⁾, Molenda Marcin⁽²⁾

⁽¹⁾ Wydział Chemii, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i przyrodniczych, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁽²⁾ Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Opiekun naukowy: dr hab. Marcin Molenda, prof. UJ

Surma Olga: olga.surma@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: magazynowanie energii, Li-ion, ogniwa litowe, elektrolit stały

Streszczenie

W technologii magazynowania energii potrzebne są bezpieczne i wydajne systemy. Elektrolity ciekłe używane w ogniwach litowo-jonowych mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia. Z rozszczelnionego ogniwa może wyciec elektrolit, który jest łatwopalny, a w kontakcie ze skórą żrący. Alternatywą dla tego rozwiązania powoli stają się elektrolity stałe, mające jednocześnie funkcje elektrolitu i separatora oddzielającego elektrody. Dzięki temu ogniwo z elektrolitem stałym ma szansę być cieńsze, bardziej sprężyste i mogące gromadzić więcej energii na jednostkę masy (IDTechEx 2021). Z tego powodu elektrolity stałe mają szansę zyskać na popularności w najbliższym czasie i uzupełnić niszowe zapotrzebowania.

W niniejszym przeglądzie zostaną przedstawione czynniki, które mają i mogą mieć wpływ na morfologię oraz późniejsze właściwości wytworzonych membran.

1. Wstęp

Ogniwo litowo-jonowe jest elektrycznym magazynem energii. Składa się z anody, katody, elektrolitu oraz separatora.

Katoda jest głównym źródłem jonów litu w ogniwie. Jest to folia aluminiowa pokryta materiałem o strukturze spinelu, oliwinu albo materiałem warstwowym, który w strukturze krystalicznej zawiera w sobie tlen, lit i inne metale. Gdy jony litu opuszczają materiał struktura krystaliczna zostaje zachowana. Dzieje się tak podczas ładowania ogniwa. Zatem, gdy ogniwo pracuje, jest rozładowywane, jony litu mogą z powrotem wbudować się w strukturę materiału katodowego. Dzięki tej właściwości praca ogniwa litowo-jonowego jest odwracalna (Górecki 2015).

Anodą może być folia z metalicznego litu, ale najczęściej jest to folia miedziana pokryta grafitem. Na anodzie podczas ładowania ogniwa następuje interkalacja jonów litu. Oznacza to, że w przestrzeń międzywarstwową grafitu umiejscawiają się jony litu tworząc strukturę Li_xC_6 , przy czym w maksymalnym stopniu naładowania $x = 1$. Separator ma nie dopuszczać aby nastąpiło zwarcie w ogniwie pomiędzy elektrodami, ale jednocześnie ma umożliwiać swobodny przepływ jonów Li^+ między nimi. Elektrolit jest medium transportowym, a w jego skład wchodzi sole litu (Górecki 2015).

Ze względu na łatwopalność oraz toksyczność wyżej wymienionych związków zaczęto szukać innych rozwiązań. W ten sposób zaczęły powstawać elektrolity stałe: elektrolity polimerowe, ceramiczne oraz ich hybrydy. Elektrolity polimerowe są elastyczne, plastyczne oraz mają lepszą przyczepność do powierzchni elektrody litowej. Natomiast z powodu niskiej wytrzymałości mechanicznej, są wrażliwe na perforacje przez dendryty litowe.

Z kolei elektrolity ceramiczne pomimo odporności na przebijanie są kruche, wymagają wysokotemperaturowej obróbki termicznej oraz posiadają wyższy opór przepływu ładunków między fazami elektrolitu i elektrody. Elektrolity ceramiczno-polimerowe posiadają cechy każdej z tych grup. Mają lepsze właściwości mechaniczne, dobre przewodnictwo i mniejszy opór międzyfazowy, co zachęca do dalszego rozwijania tej technologii. Elementem podnoszącym przewodnictwo jonowe

mogą być wypełniacze nieorganiczne, które dzielą się na wypełniacze przewodzące (LLTO) (Zhao et al. 2022) jak i nieprzewodzące (np. SiO₂) (Kim et al. 2001).

2. Opis zagadnienia

Poniższa praca skupiać się będzie na wyszukaniu czynników oraz wskazaniu warunków, które mogą mieć wpływ na strukturę i właściwości wytwarzanej membrany polimerowej do zastosowania w ogniwach litowo-jonowych.

3. Przegląd literatury

3.1 Właściwości poli(fluorku winylidenu) (PVDF)

Poli(fluorek winylidenu) (PVDF) należy do klasy fluoropolimerów. Są to materiały o doskonałych właściwościach mechanicznych, obojętności chemicznej i dobrej odporności termicznej. Składają się one z powtarzających się jednostek zbudowanych z węgla, wodoru i fluoru. W tabeli 1 zestawiono wybrane właściwości fizyczne dla polimeru PVDF, homologu PTFE oraz porównano je z polietylenem.

Tab.1. Porównanie właściwości fluoropolimerów z polietylenem o dużej gęstości (Marshall et al. 2021).

Polimer	Gęstość [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Temperatura topnienia [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatura zeszklenia [$^{\circ}\text{C}$]
PTFE	2,06-2,20	317-345	-
PVDF	1,76-1,83	158-200	-29 do -57
PE-HD	0,94-0,965	125-135	-118 do -133

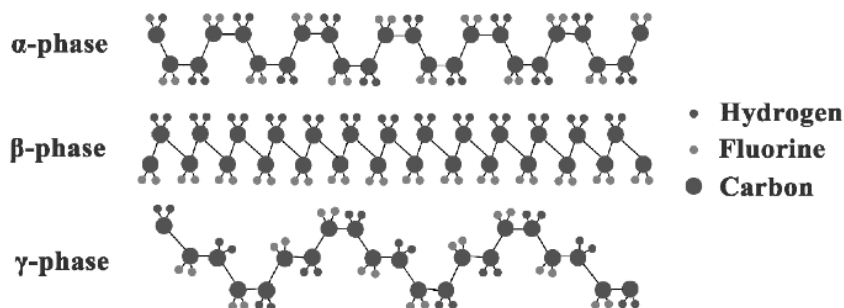
Oddziaływanie C-F jest najsilniejszym możliwym wiązaniem pojedynczym z węglem. Skutkuje to powstaniem szeregu oddziaływań kulombowskich, które są w stanie ustabilizować konformacje łańcuchów polimeru, zwiększając odporność na rotację wiązań (Marshall et al. 2021).

PVDF, dzięki częściowemu fluorowaniu może krystalizować w szereg polimorfów. Stopień krystaliczności poli(fluorku winylidenu) jest zwykle na poziomie 50-60%, a właściwości takie, jak gęstość zależą od jego składu fazowego. Ten polimer ma ich co najmniej cztery: α , β , γ , i δ . Faza α jest najbardziej stabilną termodynamicznie fazą krystaliczną PVDF i nie ulega wpływom pola elektrycznego. Forma δ występuje, gdy materiał zostanie poddany impulsom elektrycznym w podwyższonych temperaturach, jest ona dość rzadko spotykana. Natomiast w fazie β i γ możliwe jest zorientowane dipoli w taki sposób, aby utworzyć ogólnie trwałe dipole. Proces wyrównywania dipoli (*ang. poling*) polega na przyłożeniu pola elektrycznego do materiału utrzymywanego powyżej temperatury Curie w taki sposób, że łańcuchy orientują się zgodnie z kierunkiem pola elektrycznego. Materiał następnie jest specjalnie schładzany, aby kierunek dipoli został zachowany. Kiedy do takiego materiału zostanie przyłożone pole elektryczne, to w zależności od kierunku przyłożonego pola, może się ono kurczyć lub rozszerzać. W ten sposób fazy krystaliczne PVDF mogą wykazywać zarówno właściwości piezoelektryczne, jak i ferroelektryczne. Strukturę krystaliczną można kontrolować na przykład za pomocą temperatury, stosowanych rozpuszczalników, czy rozciągania (Nishiyama et al. 2016; Vasic et al. 2021; Chan et al. 2023).

PVDF i jego kopolimery są zatem interesującymi kandydatami do zastosowań w czujnikach. Ponadto PVDF zachowuje się jak materiał termoplastyczny i po podgrzaniu może być też przetwarzany przy użyciu dobrze ugruntowanych technik przemysłowych, takich jak formowanie wtryskowe i wytłaczanie (Marshall et al. 2021).

Istnieją jednak warunki niekorzystne dla PVDF, w których ulega on częściowemu rozkładowi. Materiał poddany takim warunkom wydziela fluorowodor, jednocześnie tworząc wiązania podwójne. Następuje również zmiana barwy roztworu na żółty lub brązowy. Dzieje się to w warunkach alkalicznych (Marshall et al. 2021). Wystarczy już 10% dodatek NiCO₃ (pH 8-9), żeby w ciągu 90 min polimer uległ żelowaniu. Może mieć to wpływ na przemysł akumulatorowy, gdzie stosuje się alkaliczne materiały takie jak NMC811. Długoterminowe oddziaływanie PVDF

z materiałami alkalicznymi w ogniwie nadal nie jest dokładnie zbadane. Jednak w całym okresie eksploatacji mechanizmy degradacji i uszkodzenia ogniwa mogą zostać przyspieszone na skutek kontaktu z alkalicznymi materiałami.

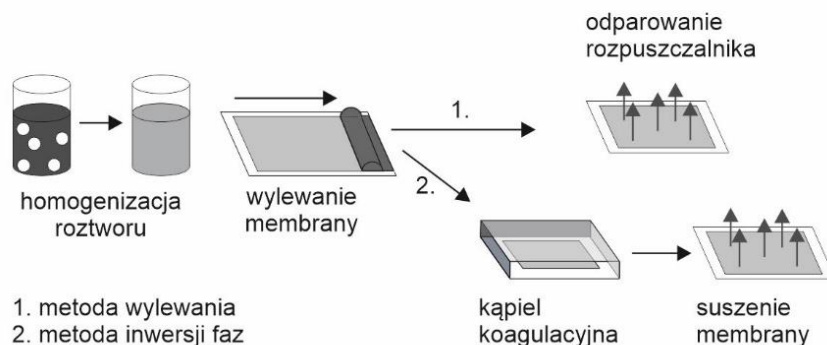


Rys.1. Struktury faz α , β i γ poli(fluorku winylidenu) (Wu et al. 2020).

PVDF w podwyższonych temperaturach reaguje również z nonocząstkami tlenku miedzi i tlenku glinu. Dodatek krzemionki i zeolitów zmniejsza stabilność termiczną materiału (Marshall et al. 2021). Istnieją również dodatki, które mogą podnieść stabilność chemiczną polimeru nie wchodząc z nim w reakcje. Np. grafen domieszkowany borem i magnetyt (Marshall et al. 2021). Zatem PVDF nie powinien być traktowany jako materiał całkowicie obojętny, a jego stabilność jest ważnym przedmiotem badań.

3.2 Przygotowanie membran

Najczęstszymi metodami preparatyki membran są metody (Rys.2): odlewania (*casting method*), która może być również termicznie indukowana (TIPS - *thermally induced phase separation*) oraz metoda inwersji faz (*phase inversion method*) nazywana inaczej metodą separacji faz indukowaną czynnikiem strącającym (NIPS – *nonsolvent induced phase separation*) (Thi et al. 2021). Metoda odlewania wykorzystuje układ dwuskładnikowy: polimer i rozpuszczalnik polimeru, a metoda inwersji faz układ trójskładnikowy, gdzie dodatkowym elementem jest substancja mieszająca się z rozpuszczalnikiem, a nie mieszająca lub częściowo mieszająca się z polimerem. Proces zaczyna się od zmieszania polimeru i rozpuszczalnika, doprowadzając do jednorodnego roztworu. Roztwór jest odlewany w postaci cienkiej folii lub wytłaczany przez matrycę w celu wytworzenia kształtów membran, takich jak płaskie arkusze lub puste w środku włókna. Następnie w metodzie inwersji faz materiał umieszczany jest w kąpeli koagulacyjnej, zawierającej substancję (dalej zwaną środkiem strącającym) nie mieszającą się z polimerem. W polimerze rozpoczyna się wtedy proces wymiany rozpuszczalnika na środek, częściowo lub niemieszający się z polimerem i następuje wytrącenie polimeru w roztworze. Po czym membranę się suszy (Tan and Rodrigue 2019).



Rys.2. Najczęstsze metody przygotowywania membran polimerowych.

Pierwszą zauważalną różnicą we właściwościach membrany otrzymanej tymi metodami, jest różnica porowatości. Membrany wytworzone metodą inwersji faz mają regularnie rozłożone pory, podczas gdy membrany uzyskane metodą wylewania mają zwartą strukturę z nieregularnie rozłożonymi porami, które często jeszcze są różnej wielkości. Na porowatość membrany mają również wpływ inne czynniki, jak na przykład dodatek wypełniacza, które opisane zostaną w dalszej części niniejszej pracy.

Kolejnym etapem jest dobranie odpowiednich proporcji pomiędzy polimerem, rozpuszczalnikiem i ewentualnie wypełniaczem. Nadmiar dodawanego rozpuszczalnika względem polimeru zależy od tego, która metoda syntezy zostanie wybrana, jakie rozpuszczalniki, polimery będą używane oraz to, czy mieszanina zawierać będzie dodatek wypełniacza (Capiglia et al. 1999; Duarte et al. 2020). Zatem do każdego układu indywidualnie należy dobrać odpowiedni stosunek, bo może się on wahać od 3-krotnego do ponad 16-krotnego nadmiaru, jak w przypadku pracy z PVDF (Kim et al. 2006; Haponska et al. 2017; Fluker et al. 2023).

Homogenizację mieszaniny powinno przeprowadzać się w warunkach, zapewniających całkowite spęcnienie polimeru oraz równomiernie wymieszanie jej składników. Jednocześnie należy pamiętać, że używane związki mogą być bardzo lotne lub rozkładać się w warunkach powietrza. Mając to na uwadze, tworzenie niektórych mieszanin można przeprowadzać w atmosferze gazu obojętnego, czy w szczelnie zamkniętym pojemniku szklanym (Kim et al. 2001), np. podczas pracy z N-Metylopirolidonem (NMP) (Wieczorek et al. 1995; Fluker et al. 2023). Aby przyspieszyć proces homogenizacji można podnieść temperaturę całego układu. W tabeli 2 przedstawiono, w oparciu o dane literaturowe, przykładowe programy homogenizacji mieszanin polimer - rozpuszczalnik. Zależą one od wielu czynników, między innymi od warunków panujących w laboratorium, co oznacza, że do każdego układu zawsze należy indywidualnie dostosować warunki suszenia.

Tab.2. Przykładowe warunki homogenizacji mieszaniny polimeru PVDF z wybranymi rozpuszczalnikami.

Polimer	Rozpuszczalnik	Temperatura mieszania [°C]	Czas mieszania [h]	Źródło
PVDF	NMP	pokojowa	1	(Fluker et al. 2023)
PVDF	NMP	80	48	(Haponska et al. 2017)
PVDF-HFP	aceton	50	3	(Kim et al. 2001)
		pokojowa	24	

Po schłodzeniu do temperatury pokojowej mieszaninę rozprowadza się przy pomocy noża odlewniczego ze szczeliną, aby otrzymać membranę o stałej grubości na całej powierzchni. Materiałem nośnym, na który wylewa się zawiesinę może być szkło, polimer, metal lub włóknina (Hołda and Vankelecom 2015). Stosowane grubości wylewanej mieszaniny mieszczą się w zakresie od 100 do 350 μm (Kim et al. 2001, 2006; Hołda and Vankelecom 2015). Nie ma pewności, jak grubość wylewanej warstwy wpływa na morfologię membrany. Przy metodzie odwrotnej inwersji faz zdecydowanie większy wpływ na morfologię membrany ma używany czynnik strącający oraz metoda suszenia. Podejrzewa się, że przy wylewaniu grubszych warstw powstaje więcej makroporów (Hołda and Vankelecom 2015).

W metodzie odwróconej inwersji faz, w celu przyspieszenia strącania membrany, stosuje się tak zwane kąpiele koagulacyjne. Mają one wiele parametrów możliwych do kontrolowania i bardzo duży wpływ na strukturę końcowej membrany. Rozpuszczalnik, używany w kąpieli koagulacyjnej ma za zadanie wymyć z membrany substancję, która odpowiadała za rozpuszczenie polimeru, tym samym powodując jego strącenie. Wielkość porów i całkowita porowatość membrany zależą głównie od szybkości dyfuzji rozpuszczalnika z odlewanej folii i dyfuzji drugiego rozpuszczalnika z kąpieli koagulacyjnej do folii. Szybkości dyfuzji można kontrolować temperaturą, poprzez manipulację składem roztworu odlewniczego (dodając np. sól, w celu obniżenia aktywności drugiego

rozpuszczalnika), warunkami odlewania (prędkość odlewania, temperatura odlewania, kontrolowany przepływ powietrza, wilgotność względna podczas odlewania) i warunkami wytrącania (przykładowo zmieniając czynnik strącający na taki, który ma mniejszą zdolność mieszania się z rozpuszczalnikiem). Gdy chce się otrzymać membranę o małych porach zalecana jest wolna wymiana substancji (Hołda and Vankelecom 2015). Kiedy substancja jest lotna wprowadza się czasem etap odparowania. Procedurę tą stosuje się, gdy w początkowym mieszaninie rozpuszczalnika z polimerem znajdują się lotne rozpuszczalniki lub współrozpuszczalniki, mając na celu uzyskanie mniej porowatych powierzchni membran. Etap odparowania powoduje selektywną utratę lotnego współrozpuszczalnika z wylewanej folii. W efekcie tworzy się tzw. „warstwa naskórkowa” o miejscowo zwiększonym stężeniu polimeru (Hołda and Vankelecom 2015).

Warunki suszenia to kolejny czynnik wpływający na późniejsze właściwości przewodnictwa jonowego. Wilgoć obecna w membranie będzie prowadziła do zwarcia (Fluker et al. 2023). Wilgotność powietrza również będzie wpływać na szybkość i skuteczność odparowywania substancji (Fluker et al. 2023). Celem jest doprowadzenie membrany do momentu otrzymania stałej masy. W tabeli 3 przedstawiono przykładowe warunki suszenia membrany.

Tab. 3. Przykładowe warunki suszenia membrany.

Temperatura suszenia [°C]	Czas suszenia [h]	Źródła
60	12	(Huang et al. 2016)
120	12	(Kim et al. 2006)
75	24	(Fluker et al. 2023)

Na zmniejszenie tworzenia się makroporów w membranie ma też wpływ dodatek tlenków metali. Nanocząstki TiO_2 zwiększają lepkość roztworu odlewniczego z powodu ich wysokiej powierzchni właściwej i wysokiej energii powierzchniowej. Dzięki temu tłumią powstawanie makroporów w strukturze, wpływając na poprawę wytrzymałości mechanicznej membran polimerowych (Hołda and Vankelecom 2015). Optymalizacja składu mieszaniny, zawartości procentowej wypełniacza jest niezbędna, aby nie doprowadzić do jego nadmiaru. Agregacja dodatków do membran może powodować pękanie ich powierzchni (Kim et al. 2006).

Dodatek wypełniaczy nieorganicznych może też mieć wpływ na zmianę stosunku fazy krystalicznej do fazy amorficznej. Dodatek krzemionki, czy tlenku glinu może zmniejszać stopień krystaliczności i jednocześnie temperaturę topnienia materiału (Kim et al. 2001). Wpływa to korzystnie na właściwości przewodnictwa jonowego w takich materiałach (Capiglia et al. 1999; Kim et al. 2001). Wypełniacze utrudniają ruch segmentów polimeru, ograniczając porządkowanie, co prowadzi do obniżenia stopnia krystalizacji (Li et al. 2004). Metodę, którą można by użyć do tego typu pomiarów jest skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) (Li et al. 2004).

Najprostszym sposobem zbadania morfologicznych właściwości membrany są badania pęcznienia i chłonności. Badania można przeprowadzić przy pomocy absorpcji substancji w próbce. Najczęstszym ze sposobów jest zanurzanie fragmentu membrany w roztworze soli litu przez określony czas i notowanie różnicy masy (Tab.4).

Tab.4. Przykładowe czasy i mieszaniny wykorzystywane do badania porowatości w membranie.

Sól	Stężenie roztworu soli [mol dm ⁻³]	Mieszanina	Skład mieszaniny	Wielkość fragmentu membrany	Źródło
LiClO_4	1	EC i DMC*	2:1	-	(Kim et al. 2001)
LiPF_6	1	EC i DMC	1:1	2x2 cm	(Kim et al. 2006)
-	-	n-butanol	-	-	(Huang et al. 2016)

*mieszanina węglanu etylenu (EC) i węglanu dimetylu (DMC)

4. Podsumowanie/ Podsumowanie i wnioski

W powyższym przeglądzie przedstawiono podstawowe właściwości i ryzyka związane z użytkowaniem w membranach z poli(fluorku winylidenu). Przedstawiono różnice między dwoma metodami otrzymywania membran polimerowych, to jest metodą wylewania i inwersji faz. Omówiono zasadę działania każdego z etapów przygotowania membrany i ich wpływ na morfologię otrzymanego wyrobu. Podsumowując, dobór metody oraz parametrów preparatyki jest specyficzny dla danego układu membrany i wymaga indywidualnej optymalizacji, w celu uzyskania oczekiwanych właściwości wytwarzanego materiału.

5. Literatura

- Capiglia C, Mustarelli P, Quartarone E, et al (1999) Effects of nanoscale SiO₂ on the thermal and transport properties of solvent-free, poly(ethylene oxide) (PEO)-based polymer electrolytes. *Solid State Ion* 118:73–79. [https://doi.org/10.1016/S0167-2738\(98\)00457-3](https://doi.org/10.1016/S0167-2738(98)00457-3)
- Chan K-Y, Li C-L, Wang D-M, et al (2023) Formation of Porous Structures and Crystalline Phases in Poly(vinylidene fluoride) Membranes Prepared with Nonsolvent-Induced Phase Separation—Roles of Solvent Polarity. *Polymers* 2023, Vol 15, Page 1314 15:1314. <https://doi.org/10.3390/POLYM15051314>
- Duarte P, Pereira S, Cunha I, et al (2020) Cellulose-Based Solid Electrolyte Membranes Through Microwave Assisted Regeneration and Application in Electrochromic Displays. *Front Mater* 7:507553. <https://doi.org/10.3389/FMATS.2020.00269/BIBTEX>
- Fluker EC, Pathreker S, Hosein ID (2023) Polyvinylidene Fluoride-Based Gel Polymer Electrolytes for Calcium Ion Conduction: A Study of the Influence of Salt Concentration and Drying Temperature on Coordination Environment and Ionic Conductivity. *Journal of Physical Chemistry C* 127:16579–16587. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.3C02342/ASSET/IMAGES/LARGE/JP3C02342_0006.JPEG
- Górecki P (2015) Akumulatory litowe. In: ELEKTRONIKA PRAKTYCZNA. <https://ep.com.pl/rynek/wybor-konstruktora/10299-akumulatory-litowe>. Accessed 14 Nov 2023
- Haponska M, Trojanowska A, Nogalska A, et al (2017) PVDF Membrane Morphology—Influence of Polymer Molecular Weight and Preparation Temperature. *Polymers* 2017, Vol 9, Page 718 9:718. <https://doi.org/10.3390/POLYM9120718>
- Hołda AK, Vankelecom IFJ (2015) Understanding and guiding the phase inversion process for synthesis of solvent resistant nanofiltration membranes. *J Appl Polym Sci* 132:42130. <https://doi.org/10.1002/APP.42130>
- Huang F, Liu W, Li P, et al (2016) Electrochemical Properties of LLTO/Fluoropolymer-Shell Cellulose-Core Fibrous Membrane for Separator of High Performance Lithium-Ion Battery. *Materials* 2016, Vol 9, Page 75 9:75. <https://doi.org/10.3390/MA9020075>
- IDTechEx (2021) Solid-State and Polymer Batteries Copyright , Use and Disclaimer
- Kim KM, Park NG, Ryu KS, Chang SH (2006) Characteristics of PVdF-HFP/TiO₂ composite membrane electrolytes prepared by phase inversion and conventional casting methods. *Electrochim Acta* 51:5636–5644. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2006.02.038>
- Kim KM, Ryu KS, Kang S-G, et al (2001) The Effect of Silica Addition on the Properties of Poly(vinylidene fluoride)-co-hexafluoropropylene)-Based Polymer Electrolytes. *Macromol Chem Phys* 202:866–872. <https://doi.org/10.1002/1521-3935>
- Li Z, Su G, Gao D, et al (2004) Effect of Al₂O₃ nanoparticles on the electrochemical characteristics of P(VDF-HFP)-based polymer electrolyte. *Electrochim Acta* 49:4633–4639. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2004.05.018>
- Marshall JE, Zhenova A, Roberts S, et al (2021) On the Solubility and Stability of Polyvinylidene Fluoride. *Polymers* 2021, Vol 13, Page 1354 13:1354. <https://doi.org/10.3390/POLYM13091354>

- Nishiyama T, Sumihara T, Sasaki Y, et al (2016) Crystalline structure control of poly(vinylidene fluoride) films with the antisolvent addition method. *Polymer Journal* 2016 48:10 48:1035–1038. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.62>
- Tan XM, Rodrigue D (2019) A Review on Porous Polymeric Membrane Preparation. Part I: Production Techniques with Polysulfone and Poly (Vinylidene Fluoride). *Polymers (Basel)* 11:. <https://doi.org/10.3390/POLYM11071160>
- Thi HYN, Nguyen BTĐ, Kim JF (2021) Sustainable fabrication of organic solvent nanofiltration membranes. *Membranes (Basel)* 11:1–21. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES11010019>
- Vasic N, Steinmetz J, Görke M, et al (2021) Phase Transitions of Polarised PVDF Films in a Standard Curing Process for Composites. *Polymers* 2021, Vol 13, Page 3900 13:3900. <https://doi.org/10.3390/POLYM13223900>
- Wieczorek W, Florjanczyk Z, Stevens JR (1995) COMPOSITE POLYETHER BASED SOLID ELECTROLYTES. *Electrochimica Acta* 40:2251–2258
- Wu T, Jin H, Dong S, et al (2020) A Flexible Film Bulk Acoustic Resonator Based on β -Phase Polyvinylidene Fluoride Polymer. *Sensors* 2020, Vol 20, Page 1346 20:1346. <https://doi.org/10.3390/S20051346>
- Zhao F, Liang J, Sun -Garnet Nb-Doped Li X, et al (2022) Review—Electrospun Inorganic Solid-State Electrolyte Fibers for Battery Applications. *J Electrochem Soc* 169:050527. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/AC6C1C>

13. The potential of waste biomass: Brewery Spent Grain as a substrate in microbiological cultures for enzymes production

Potencjał biomasy odpadowej: wysłodziny browarniane jako substrat w kulturach mikrobiologicznych do produkcji enzymów

Aleksandra Zyskowska, Halina Maniak

Department of Micro, Nano and Bioprocess Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

Supervisor: dr inż. Halina Maniak, halina.maniak@pwr.edu.pl

Aleksandra Zyskowska: 246230@student.pwr.edu.pl

Keywords: By-product, Solid-State Fermentation, Submerged Fermentation

Abstract

Breweries globally, engaged in large-scale beer production, consistently produce substantial quantities of post-production waste. Brewer's Spent Grain (BSG) represents a predominant by-product in brewing operations, presenting itself as a potentially valuable raw material with diverse avenues for utilization. Comprising cellulose, hemicellulose, lignin, and valuable nutritional compounds, BSG stands as a subject of interest in this review, specifically addressing its analysis and potential as a valuable substrate in microbiological cultivations.

1. Introduction

Brewers' spent grain (BSG) is the most abundant by-product in the beer-brewing process, representing approximately 85% of the total by-products obtained (Lynch et al. 2016). After the mashing process, the insoluble part of the barley grain, BSG, coexists with the soluble (liquid) wort. The wort, destined for fermentation into beer, is passed through BSG, which is a by-product requiring disposal. The average annual global production of BSG is around 39 million tons, with approximately 3.4 million tons produced in the European Union, including 2 million tons in Germany alone (Marcus and Fox 2021). Roughly 20 kg of wet BSG is generated per 100 liters of brewed beer (Lynch et al. 2016).

2. A literature review

2.1 Brewers' spent grain

Barley serves as the primary raw material for beer production, and its grain can be divided into three main parts: the embryo (germ), endosperm (aleurone and starchy endosperm), and grain coverings. These coverings further include (from inside to outside) the seed coat, pericarp layers, and husk (Fig.1.) (Lynch et al. 2016; Mussatto et al. 2006). During the brewing process, the starchy endosperm of malted barley undergoes enzymatic degradation, releasing fermentable (maltose and maltotriose) and non-fermentable (dextrins) carbohydrates, soluble proteins, polypeptides, and amino acids. The resulting medium, which will undergo beer fermentation by yeast, is known as wort. The insoluble grain components, mainly composed of grain coverings, constitute BSG (Tišma et al. 2018).

The chemical composition of BSG is characterized by its lignocellulosic nature, including fiber (hemicellulose and cellulose), protein, and lignin. Fiber accounts for approximately 50% of BSG on a dry weight basis, while protein content can reach up to 30%. Hemicellulose, primarily composed of arabinoxylan (AX), makes up a significant portion of BSG, reaching levels of up to 40% on a dry weight basis. AX is linked to cellulose fibrils through hydrogen bonding and consists of a xylose backbone with arabinose substitutions and esterified ferulic acid (Lynch et al. 2016). Predominant monosaccharides in BSG include xylose, glucose, and arabinose, with traces of rhamnose and galactose. Lignin constitutes about 10–28% of the total dry weight in BSG. Brewers' spent grain also contains proteins, primarily hordeins, glutelins, globulins, and albumins. Essential amino acids

account for about 30% of the total protein content, with lysine being the most abundant. Additionally, BSG contains various minerals, with silicon, phosphorus, calcium, and magnesium being the most prevalent (Jackowski et al. 2020; Mussatto et al. 2006). The amino acid and mineral content of BSG derived from 100% barley malt is summarized in Tab.1.

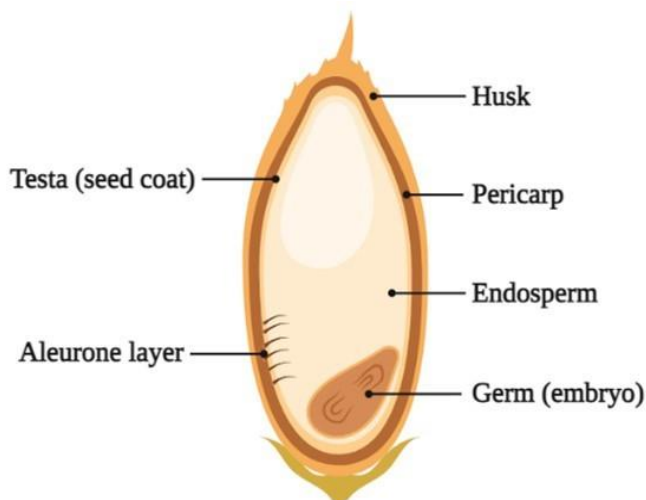


Fig.1. Composition of barley grain – own elaboration using BioRender.com.

Tab.1. Chemical composition of Brewer's Spent Grain (Jackowski et al. 2020).

Hemicellulose (arabinoxylan)	Cellulose	Protein	Lignin	Lipids	Ash	Phenolics
21.8	25.4	24	11.9	10.6	2.4	n.d.
n.d.	n.d.	31	16	3-6	4	1.7-2
29.6	21.9	24.6	21.7	n.d.	1.2	n.d.
41.9	25.3	n.d.	16.9		4.6	
28.4	16.8	15.2	27.8	n.d.	4.6	n.d.
22.5	0.3	26.7	n.d.	n.d.	3.3	n.d.
40	12	14.2	11.5	13	3.3	2
n.d.	31-33	15-17	20-22	6-8	n.d.	1-1.5
22-29	n.d.	20-24	13-17	n.d.	n.d.	0.7-0.9
22.2	26.0	22.1	n.d.		1.1	
19.2	21.7	24.7	19.4		4.2	
All values expressed in g per 100 g dry material (% w/w); n.d., not determined.						

2.2 Solid-State Fermentation

SSF is an advanced biotechnological process that leverages solid substrates, such as agro-industrial residues, for the efficient production of microbial metabolites. This eco-friendly and cost-effective method allows for the generation of diverse value-added compounds. The significance of SSF lies in its straightforward operational procedures, facile substrate accessibility, and the potential for upscale production of high-quality products. To further optimize this technology, enhancements in parameters like mass transfer, aeration, mixing, and maximal substrate conversion into products are imperative (Srivastava et al. 2019).

Llimós et al. initiated the experimental protocol with the comprehensive characterization of brewery spent grains (BSG), focusing on compositional analysis and the identification of cellulose, hemicellulose, and lignin. Subsequently, solid-state fermentation (SSF) trials were executed in triplicate, involving the addition of 100 g of the prepared substrate to 0.5-liter glass Erlenmeyer flasks. Three distinct fungal strains *Aspergillus niger*, *Thermoascus aurantiacus*, and *Trichoderma reesei* –

were deployed. The SSF regimen was conducted under tightly controlled temperature and airflow conditions, with the respirometric process meticulously monitored through the computation of the specific oxygen uptake rate (sOUR). Temperature settings for SSF were 37 °C for *A. niger* and *T. reesei*, and 45 °C for *T. aurantiacus*. The experimental timeline was extended to 216 hours. Sequentially, enzymatic extraction from the fermented BSG was performed at 24-hour intervals. Extracts served as catalysts for BSG hydrolysis, alongside a commercially available enzyme cocktail (Viscozyme L) and a control setup featuring citrate buffer. Hydrolytic processes were scrutinized for 48 hours *via* the quantification of reducing sugar content. The obtained enzymes were further employed in the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) through submerged fermentation. BSG hydrolysates, rich in sugars, constituted the substrate for fermentation, employing two bacterial strains – *Burkholderia cepacia* and *Cupriavidus necator*. The entire system underwent monitoring for 72 hours, with cell harvesting occurring at 48 hours for *C. necator* and 72 hours for *B. cepacia* for subsequent PHA analysis. Results from the experiment underscored that *A. niger* exhibited peak enzymatic activity within the SSF framework, yielding an enzymatic extract proficient in generating substantial fermentable sugar quantities. Although the efficiency of BSG hydrolysis with *A. niger* fell below that achieved with the commercial enzyme cocktail Viscozyme L, the BSG hydrolysates derived from the *A. niger* enzymatic extract effectively supported PHA production using *B. cepacia* and *C. necator*, yielding 9.0 ± 0.4 mg P3HB·g⁻¹ DM and 7.0 ± 0.6 mg P3HB·g⁻¹ DM, respectively (Llimós et al. 2020).

In another study, Outeiriño et al. utilized beer production waste to generate cellulolytic enzymes through the application of solid-state fermentation (SSF) followed by enzymatic hydrolysis. The brewery spent grain underwent a meticulous treatment using ionic liquid – N-methyl-N-butylmorpholinium glycinate at 90°C for 16 hours, resulting in a material with high carbohydrate content and low lignin content, referred to as carbohydrate-rich material (CRM). SSF was conducted using *Aspergillus brasiliensis* CECT 2700 and *Trichoderma reesei* CECT 2414 fungi. The obtained cultures underwent enzyme extraction, and the extracts were frozen for subsequent analysis. Subsequently, enzymatic hydrolysis of CRMs was performed using enzyme cocktails obtained from both fungi, predominantly comprising cellulolytic enzymes such as endo- β -1,4-glucanase (CMCase), β -glucosidase, and xylanase. This process took place in 100 mL Erlenmeyer flasks, maintaining a temperature of 50°C and a rotational speed of 150 rpm for 144 hours to ensure the complete progression of the hydrolysis reaction. Analysis of the chemical composition of BSG before and after ionic liquid treatment revealed significant changes. Ionic liquid treatment led to a drastic reduction in lignin content by 62.5%, rendering BSG more susceptible to enzymatic hydrolysis. Additionally, a notable increase in the carbohydrate fraction was observed, including 1.6-fold more glucan, 1.8-fold more xylan, and 1.1-fold more arabinose. In the analysis of the results of enzymatic hydrolysis of CRMs, it was observed that enzymes derived from *Aspergillus brasiliensis*, particularly encompassing endo- β -1,4-glucanase (CMCase), β -glucosidase, and xylanase, were significantly more efficient than those from *Trichoderma reesei*. Optimal hydrolysis conditions included a solid-to-liquid ratio of 1:60 (w/v) and the application of 40 mL of enzymatic extract from *A. brasiliensis*. Impressive hydrolysis efficiency was achieved, releasing a total of 63.2% of sugars from the substrate, mainly glucose. It is noteworthy that no cellobiose formation was observed, indicating complete glucan hydrolysis to glucose. Comparing these results with an experiment utilizing *T. reesei* enzymes, it is evident that enzymatic hydrolysis using *A. brasiliensis* yielded significantly superior outcomes. The obtained data suggest that enzymes from *A. brasiliensis*, especially CMCase, β -glucosidase, and xylanase, exhibit greater efficacy in substrate degradation, confirming their potential for application in the biorefinery industry (Outeiriño et al. 2022).

In the Tišma and co-workers experiment (Tišma et al. 2018) conducted with the utilization of brewers' spent grains and the white-rot fungus *Trametes versicolor*, the raw material consisted of BSG derived from a blend of barley (60%) and malt (40%). During mashing, a water-to-grain ratio of 2.8:1 was employed, along with the addition of an enzyme mixture comprising α -amylase, β -glucanase, cellulase, endopeptidase, and amyloglucosidase, following brewery procedures. The fungus *T. versicolor* TV-6 was cultivated on PDA (potato dextrose agar) medium for 7 days at a temperature of 27°C. The experimental process involved incubating BSG (50 g) with particle size 2–

3 mm with *T. versicolor* fungus for 14 days at 27°C. Following the completion of the process, samples were autoclaved, dried (45°C, 48 h), and milled to 1 mm diameter. Mass loss was monitored, revealing a 35% reduction in BSG mass after 14 days of fermentation. The results of laccase activity indicated that maximum activity, averaging 560 U/L, was achieved after seven days of fermentation. BSG proved to be a superior substrate for laccase production compared to using corn silage as a medium, where activities of 180 U/L or 260 U/L were recorded. Chemical analyses demonstrated that BSG contained 55.5% total organic carbon (TOC), along with other components calculated as % of dry mass (dm) such as lignin (8.53% dm), cellulose (16.1% dm), and hemicellulose (20% dm). After 14 days of fermentation with *T. versicolor*, a degradation of 10.5% TOC was observed. Regarding polyphenols, their concentration increased by 3.4 times after 14 days of fermentation, reaching a value of 8.7 mg/g dry mass. The maximum laccase activity reached 560 U/L after seven days, suggesting the potential use of BSG as a promising substrate for laccase and polyphenol production during fermentation with *T. versicolor* (Tišma et al. 2018).

2.3 Submerged Fermentation

In contrast to SSF, SmF (Submerged Fermentation) is a process that requires excess water. SmF is a simplistic process and provides better control (Shah et al. 2019).

In the experiment conducted by Łaba and co-workers (Łaba et al. 2017) using spent grain from a small brewery in Lower Silesia, Poland, the cultivation of two bacterial strains, *Bacillus cereus* PCM 2849 and *B. subtilis* PCM 2850, was investigated. The spent grain, a primary component of the substrate, was carefully dried, reaching a moisture content of 7.0%. The raw material was characterized by a crude protein content of 17.78% and fiber content of 11%. Additionally, the substrate variant included mineral salts such as MgSO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, and CaCl_2 , serving as additional sources of micro- and macroelements to support the growth and enzymatic activity of bacteria. The bacterial cultivation process lasted for 6 days under controlled conditions at a temperature of 28°C and 200 revolutions per minute. *Bacillus cereus* PCM 2849 exhibited higher growth dynamics and proteolytic activity, reaching maximum activity at 2.49 U on the 5th day. The crude protein content after the culture was 6.09%. On the other hand, *B. subtilis* PCM 2850 showed higher cell density after 6 days, amylolytic activity at 3.7 U, and a crude protein content of 7.23%. Enzymatic analyses included proteolytic, amylolytic, xylanolytic, and cellulolytic activities. Zymography revealed the dominance of high molecular weight proteases in the case of *B. cereus* PCM 2849, while *B. subtilis* PCM 2850 demonstrated a broader range of molecular weights for produced proteases. Microscopic analysis after 6 days of cultivation showed moderate degradation of the barley malt structure by both bacteria, with a higher degree of degradation observed in the case of *B. subtilis* PCM 2850. The conclusions from the experiment suggest the potential use of spent grain as a substrate for the production of proteolytic and polysaccharide-degrading enzymes by *Bacillus* sp. bacteria. *Bacillus cereus* PCM 2849 exhibited higher proteolytic activity, while *B. subtilis* PCM 2850 showed higher cell density and amylolytic activity. Microscopic observations confirmed the degradation of the spent grain structure by both bacteria, with a greater degree of degradation in the case of *B. subtilis* PCM 2850 (Łaba et al. 2017).

The aim of the study conducted by Hashemi and co-workers (Hashemi et al. 2011) was to optimize the production of α -amylase using *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation with brewer's spent grain as an economical substrate. *Bacillus* sp. KR-8104 was identified, and inoculum preparation involved transferring a fresh culture to an inoculum medium. The main production medium, consisting of dextrin, yeast extract, meat extract, KH_2PO_4 , and MgSO_4 , was supplemented with BSG. Fermentation in Erlenmeyer flasks at 5% BSG resulted in a 5.95-fold increase in α -amylase production compared to no BSG. The impact of water-soluble and -insoluble fractions of BSG on α -amylase production was investigated, revealing that whole BSG yielded the highest enzyme production. Experiments omitting specific medium components in the presence of 5% BSG showed that a dextrin-free medium was optimal, producing 25 255 U/L α -amylase, a 5.8-fold increase compared to the negative control. This study emphasizes the potential of BSG to enhance α -amylase production and its capability to replace or reduce costly medium components (Hashemi et al. 2011).

Yong Xing Tan and colleagues (Tan et al. 2020) explored the potential of utilizing brewers' spent grains as a substrate for submerged fermentation, with the goal of cultivating *Bacillus subtilis* WX-17 without the need for additional supplements. *B. subtilis*, renowned for its health benefits and enzymatic capabilities, was chosen for its potential to break down the protein and cellulose-rich composition of BSG. The experimental procedure involved culturing *B. subtilis* WX-17, previously isolated from natto, in conjunction with BSG sourced from Asia Pacific Breweries. The submerged fermentation process was conducted over a 72-hour period at 37 °C, with samples collected at 0 and 72 hours for subsequent in-depth analysis. Metabolomics analysis, employing gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS), provided insights into the metabolites present in the fermented liquid. Simultaneously, the study evaluated total phenolic content and antioxidant activity to quantify the nutritional components of the resulting beverage. The viability of *B. subtilis* WX-17 was systematically assessed by counting colonies forming units (CFU/mL) over a six-week period, maintained at 4 °C. Results from the study demonstrated the sustained viability of *B. subtilis* WX-17 over the entire six-week duration, potentially attributed to the formation of endospores by *Bacillus* species. The fermented BSG exhibited a remarkable increase in antioxidant activity, measuring 2.08 times higher than the unfermented counterpart, along with a significant rise in phenolic content. This observed enhancement in phenolic content resonates with previous findings that microbial fermentation serves as an effective method for extracting phenolic compounds (Tan et al. 2020).

3. Summary

This work focuses on BSG's application in solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) for enzyme production. In SSF, fungal strains like *Aspergillus niger* and *Trametes versicolor* are used to generate enzymes for hydrolyzing BSG, supporting the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) through submerged fermentation with bacterial strains. Additionally, BSG is employed in submerged fermentation processes with bacterial strains like *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, producing proteolytic and polysaccharide-degrading enzymes. One study optimizes α -amylase production using *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation with BSG, resulting in a significant increase in enzyme production. The fermentation of *Bacillus subtilis* WX-17 results in a significant increase in antioxidant activity and phenolic content in BSG. Overall, the article highlights BSG's potential as a sustainable and economically viable raw material in various microbiological applications, primarily for the production of industrially important enzymes for the degradation of biomass and the food industry.

4. References

- Hashemi M, Razavi S, Shojaosadati S et al. (2011) The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnology* 28(2): 165–172.
- Jackowski M, Niedźwiedzki Ł, Jagiełło K et al. (2020) Brewer's spent grains—valuable beer industry by-product. *Biomolecules* 10(12): 1–18.
- Łaba W, Piezga M, Kawa-Rygielska J (2017) Evaluation of brewer's spent grain as a substrate for production of hydrolytic enzymes by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 92(6): 1389–1396.
- Llimós J, Martínez-Avila O, Martí E, et al. (2020) Brewer's spent grain biotransformation to produce lignocellulolytic enzymes and polyhydroxyalkanoates in a two-stage valorization scheme. *Biomass Conversion and Biorefinery* 12: 3921–3932.
- Lynch KM, Steffen EJ, Arendt EK (2016) Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing* 122(4): 553–568.
- Marcus A, Fox G (2021) Fungal biovalorization of a brewing industry byproduct, brewer's spent grain: A review. *Foods* 10(9) 2159: 1–10.
- Mussatto S, Dragone G, Roberto IC (2006) Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* 43(1): 1–14.

Outeiriño D, Costa-Trigo I, Pinheiro de Souza Oliveira R, et al. (2022) Biorefinery of Brewery Spent Grain by Solid-State Fermentation and Ionic Liquids. *Foods* 11(22) 3711: 1–14.

Shah F, Ranawat B, Mishra S (2019) An approach toward cellulase production, bioconversion, and utilization. In *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts: Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization* 207–223.

Srivastava N, Srivastava M, Ramteke PW et al. (2019) Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* 345–354.

Tan YX, Mok WK, Chen WN (2020) Potential novel nutritional beverage using submerged fermentation with *Bacillus subtilis* WX-17 on brewers' spent grains. *Heliyon* 6(6) e04155

Tišma M, Jurić A, Bucić-Kojić A et al. (2018) Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing* 124(2): 182–186.

14. Evaluation of the feasibility of using untreated and acid-pretreated brewery spent grain for *Cerrena unicolor* cultivation

Ocena możliwości wykorzystania nieprzetworzonego i poddanego wstępnej obróbce kwasem młóta browarnianego w hodowli *Cerrena unicolor*

Aleksandra Zyskowska, Julia Karalus, Halina Maniak

Department of Micro, Nano and Bioprocess Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

Opiekun naukowy: dr inż. Halina Maniak: halina.maniak@pwr.edu.pl

Aleksandra Zyskowska: 246230@student.pwr.edu.pl

Julia Karalus: julia.karalus@gmail.com

Keywords: biomass management, solid-state fermentation, white-root fungus

Abstract

Brewery spent grains (BSG) are a waste product of beer production, but due to their high content of natural biopolymers and simple compounds, it is an interesting alternative to the typically used synthetic microbial substrates. Due to the nature of this lignocellulosic substrate – high content of sugars, lignin, macro- and microelements, and low solubility in water – we considered using this raw material in the solid-state fermentation process to study the ability to grow representative of fungi. Brewery spent grain was used directly as an untreated raw material in the microbiological process without additional supplementation and after enrichment with the lignin fraction as an effect of 6% (v/v) citric acid pretreatment. The two bioprocesses were compared in terms of protein production, phenolics and sugars released. The result indicated that the untreated BSG may be used as the solid substrate for *Cerrena unicolor* growth. Contrary, BSG as the product of acid pretreatment is not suitable for direct usage as a medium, however, a relatively high protein content was observed. For further pBSG application as a microbiological substrate, it needs to be supplemented with carbon and nitrogen sources.

1. Introduction

Industrial-scale beer production generates a large amount of post-production waste, which includes plant biomass, yeast slurry, and wastewater (Steinhoff-Wrześniewska et al. 2011). By implementing the principles of circular economy, such residues are no longer waste, but valuable raw material with various directions of use. Statistically, one hectolitre of fermentation wort yields about 20 kg of wet BSG. The literature reports that as many as 1.94 billion hectolitres of beer were produced in 2018, which amounts to as much as 38.8 million tonnes of brewery spent grains (BSG) produced worldwide in just one year (Chetrariu and Dabija 2020). For a long time, insufficient attention was paid to them because of the high sugar and water content in their composition. Fresh BSG may be as much as 80% moisture. Such conditions are unfortunately favorable to the growth of pathogenic microorganisms that cause the decomposition and molding of the BSG. For this reason, their storage time is limited to about 10 days (Chetrariu and Dabija 2020). Among the popular methods for increasing shelf life is drying. It has been found that reducing the moisture content to 10–20% of the product weight extends the storage time up to 6 months (Mussatto et al. 2006).

Due to its high content of polysaccharides and valuable nutrients, BSG has come to be regarded as a valuable raw material. It has been observed that enrichment of feeds with such an additive caused an increase in lactation in cows and had a positive effect on the number of chicks hatched, furthermore, attempts have been made to use them as a basis for the production of biogas or solid biofuels such as briquettes and pellets (Czekala and Pawlisiak 2017). There is also the possibility of utilizing BSG as an organic fertilizer or as a food ingredient rich in fiber. In addition, their promising potential is increasingly being exploited in modern biotechnological processes (Bachman

et al. 2022). Many scientific articles describe the use of small-volume (2.5–100 g) scale BSG as a valuable substrate for microorganisms (Chetrariu and Dabija 2020; Mussatto et al. 2006) a carrier for immobilization (Mussatto et al. 2006) as well as substrates for production of various metabolites of microbial origin (Bianco et al. 2020; Lock et al. 2023) such as organic acids, enzymes, prebiotics, pigments, bioethanol, and bioactive substances. Therefore, the development of methods for the management of BSG as a valuable source of energy and nutrients could dramatically reduce the costs of large-scale, biotechnological production.

The BSG is formed by the mashing process, whereby the starch in the biomass is converted to glucose under the influence of enzymes. BSG consists mainly of barley grain hulls and fragments of pericarp and endosperm (Musatto et al. 2006). The amount of biomass components is variable and depends on barley variety, harvest time, growing conditions, mashing process, and also on the ingredients added to the fermentation vat, e.g. maize grain, and wheat grain (Bonifacio-Lopez et al. 2020). BSG is composed of lignocellulose as the main component of the cell wall. Its structural elements are non-starch polysaccharides (i.e. cellulose, hemicellulose, pectin) and lignin, which are also biomass energy carriers. According to studies, cellulose accounts for 12–40% of BSG dry matter, hemicellulose 14–46% and lignin 8–22% (Wróbel 2019).

This article presents a comparison of the utilization efficiency of untreated and acid-pretreated BSG in a culture of *Cerrena unicolor*. This microorganism is a representative fungus that produces many enzymes that can degrade all wood components – cellulose, hemicellulose and lignin. Therefore, we used it in our preliminary studies to assess its ability to degrade natural, untreated and pre-treated BSG which is lignocellulosic biomass. This is important in the context of the future use of BSG as a medium for fungal culture and enzyme production using waste materials.

2. Materials and methods

2.1 Brewery spent grain

The BSG originated from the brewery of the Wrocław University of Technology. Five kg of pilsner malt, 2 kg of wheat malt, 1 kg of carawheat malt (dark wheat malt) and 2 kg of unmalted wheat were used to produce the beer. The raw materials were ground on a two-roller grinder and then mashed in 40 dm³ of water. The mashing regime was as follows: 45 °C (10 min), 63 °C (30 min) and 73 °C (20 min), at the end the temperature was raised to 78 °C and held for 10 min to inactivate the enzymes. The mash was then filtered and washed with 20 dm³ of 80 °C water. After filtration, 50–52 dm³ of wort was obtained with a sugar content of 9 Brix. Beer was then made from the wort and the mash was dried for 48 h at 50 °C on a convection drier. The dried BSG was stored at 15 °C in a lockable plastic container.

2.2 Chemicals and reagents

Citric acid monohydrate (Stanlab, Lublin, Poland, p.a.), D-(+)-glucose anhydrous (POCH, Gliwice, Poland, p.a.), Glucose reagent (BioMaxima, Lublin, Poland), 3,5-dinitrosalicylic reagent (DNS), gallic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, ≥98.0%), Folin i Ciocalteu reagent (POCH, Gliwice, Poland), anhydrous calcium carbonate (Chempur, Piekary Śląskie, Poland, p.a.), Lowry reagent (Supleco), syringaldazine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy, 98%), bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), methanol (Alchem, Toruń, Poland, p.a.), potato dextrose agar (PDA) (Merck, Warszawa, Poland).

2.3 Microorganism

The laccase-producing fungus *Cerrena unicolor* (Bull.ex.Fr.) Murr, no. 139 was from the culture collection of the Department of Biochemistry, University of Lublin (Poland). The culture was maintained on PDA at 4 °C and transferred every two weeks to a fresh medium.

2.4 BSG pretreatment

Acid pretreatment was conducted in an autoclave (Laboratory steam sterilizer, SMS). The mass of 175 g of dry BSG was weighed and transferred to a 5 dm³ tank containing 6% citric acid solution. The raw material swelled for 30 min at ambient temperature and was then heat treated for

60 min at 121 °C and 1.5 atm. After cooling down, the BSG was rinsed thoroughly with distilled water until a neutral pH, gravitationally filtered and allowed to dry at 40 °C for 24 h.

2.5 Culture conditions

The culture of *Cerrena unicolor* was conducted in two variants of the solid substrate: (1) with untreated BSG (uBSG) and (2) with citric acid pretreated BSG (pBSG). To investigate the ability of the fungus to grow and produce laccase in both variants two sets of 11 flasks (capacity 0.3 dm³, equipped with lignin plugs) were prepared, each containing 3.02±0.03 g of uBSG or pBSG moistened with 0.012 dm³ of distilled water. Such prepared sets were sterilized for 15 min (121 °C, 1.5 atm) and cooled down, then the untreated or pretreated BSG were inoculated with round fragments of *C. unicolor* mycelium cut out from the edges of growing on PDA colony. Cultures were monitored at one or two-day intervals.

2.6 Product separation

At the scheduled time, the contents of the flask were extracted using distilled water as the extractant. The separation of sugars, phenols and proteins was carried out on a rotary shaker at 180 rpm for 30 min. The extract was then separated from BSG and mycelial biomass by centrifugation (Universal 320R, Hettich) at 6000 rpm for 5 min. The supernatant was analyzed for sugars, phenols and proteins.

2.7 Determination of sugars, phenolics and proteins

For the calculation of reducing sugars, phenolics and protein content, we applied the spectrophotometric methods, using McIlvaine buffer pH 7 as a solvent. The amount of reducing sugars was determined using the methodology with DNS reagent according to Miller (Miller 1959). The standard curve was performed using glucose as a standard. Phenolics were determined using the Folin and Ciocalteu procedure using gallic acid as a standard (Folin and Ciocalteu 1927). Lowry method was applied to determine protein content using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al. 1951).

3. Results and discussion

To determine the transformed elements of BSG biomass in *Cerrena unicolor* cultures, standard curves were prepared for reducing sugars, phenols and proteins using standard solutions of glucose, bovine serum albumin and gallic acid, respectively, prepared in McIlvaine buffer pH 7. The points obtained in absorbance measurement at 550, 750 and 765 nm, for DNS, Lowry and phenolic procedures, respectively, were described by the equations of the curves of the linear relationship of $Abs = f(\text{Concentration}) [g/dm^3]$ with a goodness-to-fit factor $R^2 \geq 0.96$. The parameters of the curves and the range of their linearity are given in Tab.1.

Tab.1. Parameters for the linear equations of standard curves $Abs = a \cdot C + b$ used for calculations of components produced in *Cerrena unicolor* culture.

Determined biomass component	a	b	Concentration range, g dm ⁻³	R ²
Glucose (reducing sugar)	0.713	-0.027	0.08–2.00	0.999
Phenols	1.014	-0.053	0.10–0.70	0.983
Proteins	3.561	0	0.025–0.500	0.964

Using the standard curve we calculated initial values of containing 15% free simple sugars, 0.18% phenols and 2.3% proteins in the untreated BSG. The literature reports that the content of biopolymers included typically in brewery spent grain is estimated as 24.5% cellulose, 23.8% hemicellulose and 15.8% lignin (Klimek et al. 2017). Therefore, BSG may be a substrate for microorganisms that can produce enzymes that decompose lignin and polysaccharides to get simple sugars (carbon source).

As presented in Fig.1, the amount of simple sugar changed during the time of cultivation. In the first two days, a two-fold increase in reducing sugars was observed from 450 to 982 mg which was accompanied by an increase in protein content. This indicates the higher amount of sugars resulted from the activity of cellulases and hemicellulases. After the second day, an almost constant decrease in carbon substrates is evident, with a significant depletion of the amount to almost 15 % of the maximum value by the end of the culture. However, during the culture, a slight increase in reducing sugars was observed on day 10, again accompanied by an increase in protein, suggesting the production of enzymes to degrade the carbon source biopolymers. In the course of the change in the amount of protein for cultures on untreated BSG, two maxima are visible on the 2nd and 10th day. The literature reports that during microbial decomposition of plant biomass components, readily available polysaccharides – mainly cellulose, starch and pectin – are degraded first, followed by components with a lower nutritional value, such as hemicelluloses or those that block access to polysaccharides trapped in the cellular compartments – lignin and hemicelluloses (Andlar 2018). The results obtained in the paper (Zeko-Pivac et al. 2022) are similar to those presented in this article. The maximal production of lignin-degrading enzymes such as manganese peroxidase and laccase on brewery spent grains with white rot fungus *Trametes versicolor* was detected on the 9th and 12th day, respectively. The last component that was measured along the duration of the *C. unicolor* culture was polyphenols. The mass of these compounds varied between 4.1 and 8.1 mg on the 6th and 12th day, but in general, their content remained at a low rather insignificant level. Visual observation of uBSG colonization confirms that it is a good microbial medium for fungal growth. In the last days of culture, *C. unicolor* has significantly overgrown the surface of the brewery's spent grain, utilizing almost completely the nutrients contained in its structure.

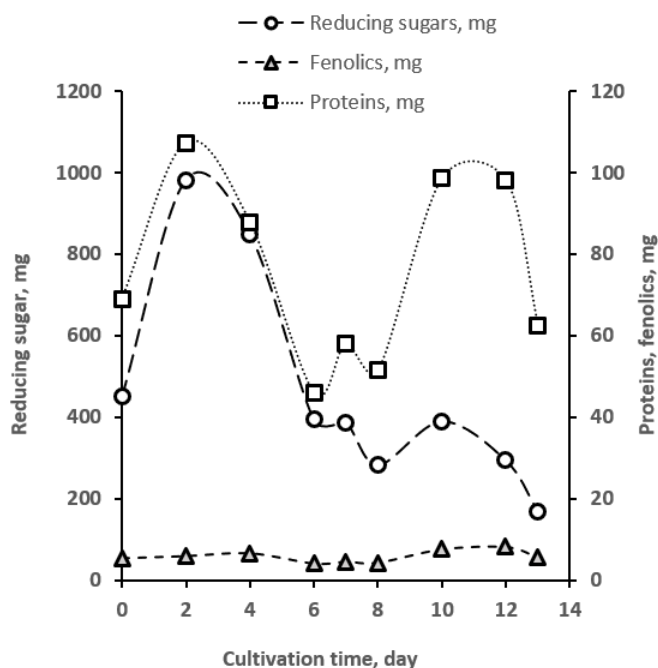


Fig.1. Mass (mg) of reducing sugars (circles), proteins (squares) and phenolics content (triangles) in the cultures of *Cerrena unicolor* in solid-state fermentation conducted on 3 g of untreated brewery spent grains (uBSG). Experimental points were combined for a better presentation of the results.

The results of *Cerrena unicolor* cultivation on acid-pretreated brewery spent grain are shown in Fig.2. The availability of free reducing sugars and proteins at the beginning of the microbiological process was marginal and did not provide any of the nutrients. As chemical pretreatment is one of the most effective methods to remove polysaccharides (Castilla-Archilla et al. 2023), we expected that

the amount of cellulose and hemicellulose would be residual and the main biopolymer that resulted from acid pretreatment is lignin. The course of sugars and phenolics released from pBSG was very low and maintained between 9–18 mg and 3.4–6.0 mg, respectively. On the other hand, the amount of protein increased until the 10th day to approximately 80 mg which very high value as the nutrients had been reduced drastically. Surprisingly, such protein content was not much different compared with the corresponding maximal mass of 107 mg produced by *C. unicolor* on untreated BSG. The decrease in the amount of protein in the culture is probably due to the fungus using it as the only source of carbon and nitrogen. The quality of the proteins produced would need to be checked in future studies. Despite the lack of nutrients and a primary carbon source, *C. unicolor* secreted a large amount of proteins in the presence of only lignin substance. This also gives direction for future research and the possibility of using polyphenols as a carbon source in microbial cultures. Visual observation of the growth of the fungus indicates that its growth was significantly reduced and even after 30 days the pBSG remained unchanged.

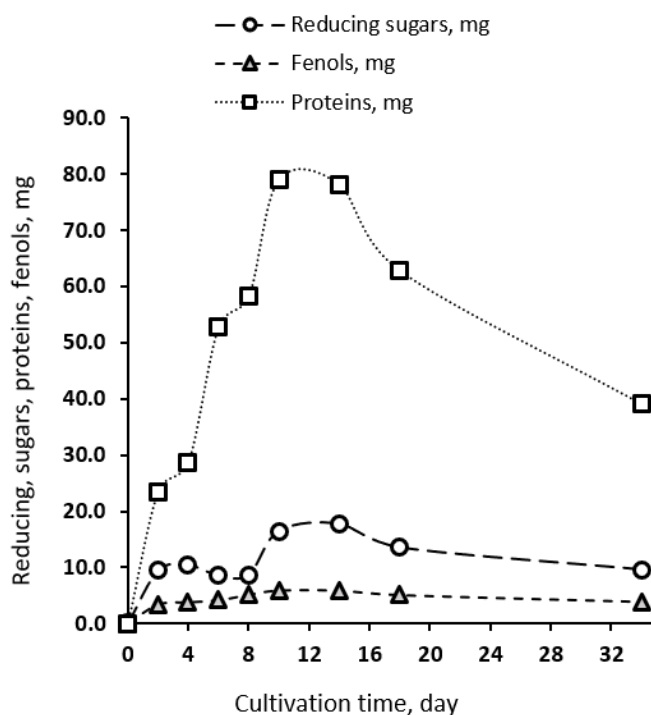


Fig.2. Mass (mg) of reducing sugars (circles), proteins (squares) and phenolics content (triangles) in the cultures of *Cerrena unicolor* in solid-state fermentation conducted on 3 g of citric acid pretreated brewery spent grains (pBSG). Experimental points were combined for a better presentation of the results.

4. Conclusions

The brewery spent grain (BSG) is a major by-product of the brewing industry. This raw material is mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. Until now, it has been used as an additive in animal feed. Due to their rich chemical composition, BSG can be used as a valuable substrate in microbial cultures for solid-state fermentation processes. Many microorganisms may use BSG as a source of carbon necessary for growth and for the production of valuable metabolites. In this study, we present two cultures of *Cerrena unicolor* on BSG in unaltered (uBSG) and organic acid pretreated (pBSG) forms. Reducing sugars, proteins and phenols were determined in the culture extracts, reflecting the extent to which the individual plant biomass components cellulose,

hemicellulose and lignin are broken down and proteins are produced by the white-rot fungus. The results show that uBSG is a good microbial natural substrate, as evidenced by the high values of released reducing sugars from cellulose and hemicellulose building blocks as well as significant amounts of proteins. In contrast, acid-pretreated BSG is an extremely nutrient-poor substrate, almost entirely composed of lignin substances. From the course of growing *C. unicolor* on this substrate, a significant increase in the amount of protein was observed but with no noticeable change in the amount of phenols and no change in the amount of reducing sugars. Such results gives direction to further studies to verify the type of proteins and the possibility of utilizing pBSG with additional supplementation of the carbon and nitrogen source for enzyme production. This will provide the opportunity to further manage waste biomass in the idea of a zero-waste economy.

5. References

- Andlar M, Rezic T, Mardetko N et al. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungal and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Science* 18:768–778.
- Bachmann SAL, Calvete T, F’eris LA (2022) Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10(1): 106951.
- Bonifácio-Lopes T, Teixeira JA, Pintado M (2020) Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer’s spent grain – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(16): 2730–2741.
- Bianco A, Budroni M, Zara S et al. (2020) The role of microorganisms on biotransformation of brewers’ spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:8661–8678.
- Castilla-Archilla J, Cermeño M, Tuohy MG (2023) Brewers’ spent grain pretreatment optimisation to enhance enzymatic hydrolysis of whole slurry and resuspended pellet. *Frontiers Chemical Engineering* 5: 1272988.
- Chettrariu A, Dabija A. (2020) Brewer’s spent grains: Possibilities of valorization, a review. *Applied science* 10 5619: 1–17.
- Czekała W, Pawlisiak A (2017) Produkcja i wykorzystanie wysłodzin browarnianych. *Technika ogrodnicza rolnicza leśna* 5: 23–25.
- Follin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* LXXIII 2:627–650.
- Klímek P, Wimmer R, Mishra PK et al. (2017) Utilizing brewer’s-spent-grain in wood-based particleboard manufacturing. *Journal of Clean Production* 141: 812–817.
- Lock TJ, Mah SH, Lai ZW (2023) Versatile Applications of Brewer’s Spent Grain: Solid-State Fermentation and Nutritional Added Value. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenolic reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-75.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426–428.
- Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC (2006) Brewers’ spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* 43: 1–14.
- Steinhoff-Wrześniowska A, Strzelczyk M, Czyżyk F (2011) Gospodarka materiałowo-odpadowa w przemyśle piwowarskim. *Nauka Przyroda Technologie* 5: 1–7.
- Wróbel M (2019) Zagęszczanie i kompaktowalność biomasy lignocelulozowej. *Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej. Seria: Monografie i Rozprawy*.
- Zeko-Pivac A, Bosnjakovic A, Planinić M et al. (2022) Improvement of the nutraceutical profile of brewer’s spent grain after treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganism* 10 2295: 1–16.