

Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 9

Kraków, marzec 2016

Od redakcji

DRODZY CZYTELNICY!

Witamy Was na łamach dziewiątego już numeru naszych Zeszytów Naukowych. Po raz kolejny wpłynęły do nas artykuły o bardzo szerokiej i ciekawej tematyce. Będziecie mogli się zapoznać z publikacjami, w których zawarte zostały najnowsze informacje z zakresu biologii molekularnej.

Życzymy miłej lektury!

ZESPÓŁ REDAKCYJNY

Zespół redakcyjny

Agnieszka Seretny
Irma Gryniuk
Jan Majta
Jakub Pagacz
Kinga Pajdzik
Róża Pietrzycka

Okładka

Jan Majta

Skład

Dobrochna Dolicka

Korekta

Zespół redakcyjny

Wydawca

KNSB Mygen

Nakład 650 szt.

Kontakt

aga.seretny@gmail.com

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez:



RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIwersytetu
JAGIELLOŃSKIEGO

Spis treści:

Chimery ssaków a możliwości ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem

Edwin Sieredziński 7

Wpływ immunosupresji na postęp chorób nowotworowych

Agnieszka Dąbrowska 12

Metody badania antygenów zgodności tkankowej

Izabela Górską, Agnieszka Bodzioch 17

Sekcja Badania Bezkręgowców Koła Naukowego Przyrodników - od palmiarni po Arktykę.

Alicja Laska, Sebastian Chmielewski 34

Metody identyfikacji kompleksów gatunków kryptycznych na przykładzie *Aceria tosichella* (wheat curl mite - WCM)

Alicja Laska, Krzysztof Ufir, Agnieszka Kiedrowicz 38

***Phaeodactylum tricornutum* jako organizm modelowy**

Wiktor Tokarek, Stanisław Listwan 44

Molekularna diagnostyka chorób wywołanych przez mikroorganizmy na przykładzie sepsy oraz zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*.

Krzysztof Ufir, Alicja Laska 55

Wykorzystanie nanocząstek w medycynie, kosmetologii i rolnictwie.

Natalia Lewandowska, Henryk Kozłowski 61

Chimery ssaków a możliwości ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem

Edwin Sieredziński
colonelwolf@gmail.com

Chimeryczne zarodki ssaków zrobiły wielką karierę w badaniach w zakresie embriologii eksperymentalnej - począwszy od 1961 roku, kiedy to zostały pierwszy raz uzyskane. Mogą one mieć jeszcze inne zastosowania niż tylko badanie mechanizmów rozwoju.

W ostatnich czasach nagłaśniany jest problem gatunków zagrożonych wyginięciem. Populacje tych gatunków się kurczą, w efekcie przy ograniczonej presji selekcyjnej wzrasta rola dryfu genetycznego - rozprzestrzeniają się geny obniżające przeżywalność osobników w niewielkiej już populacji. Chimery mogłyby stanowić tutaj swoiste żywe banki genów. Co więcej, we wczesnych fazach rozwoju nie ma problemu z łączeniem zarodków pochodzących z gatunków odległych od siebie taksonomicznie. Udało się uzyskać *geep* - chimerę owcy i kozy. Nie ma przeszkód w łączeniu komórek zarodków pochodzących od ssaków z różnych rzędów - prowadzono również eksperymenty na humanizowanych mysich chimerach. To podejście daje zatem znaczne możliwości. Można tutaj pozyskać próbki tkanek mogące służyć później do klonowania, jak również gamety danego gatunku rozwinięte w organizmie chimerycznym.

Wykorzystanie chimer może okazać się istotne w ochronie zasobów genetycznych gatunków zagrożonych wyginięciem.

Wstęp

W mitologii greckiej występowała istota będąca połączeniem organizmów kilku innych zwierząt zwana Chimerą. Rzeczywistość potrafi jednak dogonić fikcję, zatem pojawiają się one w przyrodzie, aczkolwiek nie mają aż tak spektakularnego wyglądu (wyjąwszy przypadki zaburzeń rozwojowych takich jak *foetus in foetu*, które mogły stanowić inspirację dla twórców mitów). Mogą występować one naturalnie - zdarzają się bowiem zespolenia zarodków lub wymiana komórek między nimi. Jako chimerę definiuje się każdy organizm, który nie posiada jed-

nolitego materiału genetycznego. Istnieje tutaj rozróżnienie między mozaiką - w jej przypadku wszystkie komórki mają wspólne pochodzenie, a różnią się na skutek mutacji, jaka zaszła w jednej z grup komórek w fazie rozwoju. W pewnym sensie wszyscy jesteśmy organizmami chimerycznymi lub mozaikowymi, ponieważ dochodzi do spontanicznych mutacji w komórkach linii somatycznej.

Chimery również można otrzymywać na użytek eksperymentów. Pierwszy raz dokonano tego w roku 1961, two-

rząc chimerę mysia [1]. Było to dzieło Andrzeja Tarkowskiego - uhonorowanego w roku 2002 nagrodą Kioto. Zrobiły one karierę w szeregu dziedzin biologii eksperymentalnej jak biologia rozwoju, embriologia, biologia komórki, neurobiologia. Możliwe jest wyznaczenie linii komórek oraz badanie jej w poszczególnych fazach rozwoju [3]. Idea uzyskania chimery zasadniczo sprowadza się do pobrania komórek z trofoblastu, węzła znajdującego się w blastocystyce. Ta linia komórek nazywana jest często komórkami ES (*embryo stem cells*) lub zarodkowymi komórkami macierzystymi. Następnie jest ona hodowana *in vitro* w układzie zapewniającym zachowanie ich właściwości, często razem z mysimi fibroblastami. Następnie komórki te przenoszone są do innej blastocysty i na tej podstawie rekonstruowany jest zarodek. Początkowo wykorzystywano chimery również do uzyskiwania transgenicznych zarodków ssaków, obecnie coraz częściej stosuje się techniki iniekcyjne. Otrzymywanie organizmu o pożądanym właściwościach wymaga bowiem tutaj aż dwóch pokoleń. Główną motywacją tego była duża łatwość transfekcji komórek w linii komórkowej *in vitro* w porównaniu z zarodkiem [3].

Otrzymywano różne chimery ssaków. Jednym z ciekawszych przykładów była *geet* - złożona z komórek owcy i kozy. Przykład ten pokazuje, że w tego typu eksperymentach można wykorzystywać komórki pochodzące z bardzo różnych zarodków organizmów odległych od siebie systematycznie. Akurat

w przypadku owcy i kozy nie jest to widoczne, są one przedstawicielami plemienia Caprini, w rodzinie pasterogich (Bovidae), nie mniej jednak uzyskiwano chimery ssaków i komórek przedstawicieli różnych rzędów. Przykładowo można wymienić tutaj humanizowane myszy. Powyższy przykład nakłania do refleksji nad możliwością wykorzystania chimery nie tylko w zakresie badań o biomedycznym charakterze.

Wiele spośród współczesnych 5500 gatunków ssaków zagrożonych jest wyginięciem. Mówi się również o spadku różnorodności biologicznej. Chimery mogą przysłużyć się ich ochronie - podobnie jak utrzymywanie przedstawicieli tych gatunków w warunkach naturalnych bądź w ogrodach zoologicznych. Szczególnie istotne znaczenie mogą mieć w utrzymaniu zasobów genetycznych danego gatunku. Problemem tym zajmiemy się poniżej.

Dryf genetyczny a różnorodność w obrębie gatunku

Wielkim problemem jest nie tyle utrzymanie odpowiedniej liczebności, ile ubożenie różnorodności, co jest związane z homogenizacją puli genetycznej bardzo nielicznego gatunku [4]. W izolowanych populacjach rolę odgrywa inne zjawisko, również przyczyniające się do zubożenia puli genetycznej populacji. Może być ono bardzo brzemienne w skutki. Wystarczy tylko inwazja patogenów albo nagła zmiana warunków środowiskowych, by całość

populacji groziło wyginięcie. Zjawiskiem tym jest dryf genetyczny (efekt Sewalla Wrighta) [2,5].

Termin ten po raz pierwszy został zaproponowany na początku lat trzydziestych. Teoria dryfu genetycznego została później rozwinięta przez japońskich genetyków ewolucyjnych – Motoo Kimurę i Tomoko Ohtę. Zjawisko to stało się również osią sporu w obrębie biologii ewolucyjnej – niektórzy badacze przypisywali mu znaczną rolę w procesach ewolucji, zwracając uwagę na niewidoczność dla doboru naturalnego wielu cech organizmu. W praktyce konserwatorskiej odwołać się należy do tez zaproponowanych przez Ohtę dotyczących zależności między siłą nacisku selekcyjnego oraz zachodzeniem dryfu genetycznego. W populacjach, w których jest ona silna rola dryfu genetycznego jest w zasadzie marginalna. Kiedy maleje siła nacisku selekcyjnego, efekt Sewalla Wrighta staje się coraz bardziej znaczącym czynnikiem kształtującym pulę genową populacji. Allele, które w normalnych warunkach obniżałyby żywotność, zaczynają rozprzestrzeniać się i po kilku pokoleniach występować mogą u praktycznie wszystkich osobników. Może być to spowodowane spadkiem liczebności osobników, czego konsekwencją jest ograniczony przepływ osobników między populacjami. Tworzą się zatem izolowane grupy. W takich populacjach zmniejsza się rola presji selekcyjnej, *ergo* rośnie znaczenie dryfu genetycznego [2]. Allele obniżające żywotność rozprzestrzeniają się bez większych

przeszkód. W efekcie tego wystarczy już niewielka zmiana warunków środowiska lub inwazja pasożytów jest wystarczająca do wyginięcia populacji. Będąc przesadnie optymistycznym, można by zakładać, iż niewielka populacja może rozszerzyć zasięg i na drodze spontanicznych mutacji oraz selekcji naturalnej zwiększyć swoją różnorodność genetyczną, zgodnie to jest zresztą z teorią koalescencji wykorzystywaną w rekonstruowaniu historii populacji. Wiadomo, że z niewielkiej populacji wyjściowej może rozwinąć cały zespół populacji wykazujący różne cechy morfologiczne, fizjologiczne i behawioralne. Proces ten jednak długotrwały (może zająć kilkaset do kilku tysięcy lat) i w doraźnych działaniach konserwatorskich nie można na niego liczyć [2]. Należałoby zatem skupić się na możliwościach ratowania puli genetycznej populacji zagrożonych gatunków ssaków, póki jest to możliwe. Użyteczne w tych działaniach mogą być chimery.

Chimery a ochrona gatunków ssaków

Wyżej omówiono skutki działania dryfu genetycznego na populacje. Oczywiście, można utrzymywać zwierzęta w niewoli – w ogrodach zoologicznych lub nawet w hodowlach prywatnych właścicieli po uprzednim udzieleniu koncesji lub licencji. Pytanie, czy takie rozwiązanie jest na stan obecny zadowalające i czy programy konserwatorskie zdołają w ten sposób zapobiec zubożeniu różnorodności genetycznej populacji naturalnych. Obecnie nie ma

problemów natury bioetycznej w związku z przetrzymywaniem zwierząt w ogrodach zoologicznych; Kłopot jest jednakże innej natury - czy obecnie stosowane techniki chowu są wystarczająco wydajne? W odpowiedzi na to pytanie przychodzą chimery - umożliwiają bowiem one uzyskiwanie zwierząt w większych ilościach. Co więcej, takie podejście pozwala otrzymać zarodki bądź linie komórek ES, jakie mogą być utrzymywane przez wiele lat dzięki technikom krioprezewacji znanymi od kilkudziesięciu lat. Nie ma tutaj potrzeby obchodzenia się z całym organizmem w postembrionalnych fazach rozwoju. Takie rozwiązanie może pozwolić utrzymywać zasoby genów danego gatunku [4].

Chimery umożliwiają stworzenie swobodnego żywego banku genów. Obecnie jest to możliwe, techniki tworzenia chimer są doskonale znane od kilkudziesięciu lat. Niektórzy sugerują stosowanie klonowania metodą transferu jądrowego w zachowywaniu gatunków ssaków bądź wręcz wskrzeszania wymarłych w niedawnym czasie. Takie postulaty wysuwano w przypadku wilka workowatego lub nawet mamuta. Z klonowaniem związanych jest wiele problemów dotyczących chociażby imprintingu oraz szeregu niuansów mających związek z wczesnym rozwojem zarodkowym. Wydawałoby się, że embriologia eksperymentalna ssaków stanowi obecnie bardziej dziedzinę stosowaną aniżeli akademicką naukę, jednakże jest szereg niewyjaśnionych zjawisk związanych z wczesnym rozwojem ssaków. Przykładowo, dlaczego

pancerniki zawsze rodzą bliźnięta? Również śmiertelność zarodków *in utero* stanowi rzadko zgłębiany problem badawczy [4], a istotny zwłaszcza w przypadku bydła domowego. Problemy mogą dotyczyć również torbaczy stanowiących odrębną i izolowaną linię w obrębie ssaków. Nie rozważano tutaj przykładu stekowców, które są jedynymi znanymi obecnie ssakami jajorodnymi. W obrębie rzędów Eutheria, tj. ssaków łożyskowych, nie powinno być problemów z tworzeniem chimer [4].

Chimery pozwalają łączyć ze sobą komórki ssaków pochodzących z różnych grup systematycznych. W przypadku ssaków kopytnych jako organizmy wykorzystywane do ich produkcji zastosować można by bydło domowe, Dla małych ssaków dobrym organizmem byłaby mysz. Organizmy do tworzenia żywych banków genów w postaci chimer już są. W zasadzie jedyne, co pozostaje to wdrożyć tę technikę. Pojawia się tutaj, rzecz jasna, szereg problemów technicznych związanych z indukcją superowulacji, a następnie umieszczeniem implantowanego zarodka [4]. Technika ta może wywoływać zastrzeżenia obrońców przyrody czy praw zwierząt ze względu na ingerencję w ustrój osobnika gatunku zagrożonego wyginięciem. Sprzeciw o charakterze bioetycznym będzie tym bardziej głośniejszy, że tego typu manipulacja eksperymentalna nie dotyczy organizmu uważanego za modelowy. Być może również tego typu podejście jest stosunkowo rzadko rozważane i nie wychodzi poza akademicką dysku-

sję. Wśród obrońców przyrody panuje często przekonanie, że w ogóle nie należy ingerować w żaden sposób w życie takiego organizmu. Możliwe, że dlatego o wiele chętniej rozważane jest wskrzeszanie wymarłych gatunków – jak wilków workowatych czy mamutów, aniżeli prace nad chimera-
mi zawierającymi materiał pochodzący z organizmów zagrożonych wyginięciem.

Podsumowanie

Kawecki w 1976 roku w swoim podręczniku akademickim pisał, iż chime-
ry mogą zmienić oblicze niektórych dziedzin zoologii [1]. Jak to często bywa w przypadku umysłów świątłych,

potrafią one wybiec daleko w przyszłość. Prawda jest bowiem taka, że chimery mogłyby być bardzo użytecznym narzędziem w ochronie gatunków zagrożonych wyginięciem. Pozwalałaby one minimalizować szkody w różnorodności genetycznej populacji związane z dryfem genetycznym oraz planować programy konserwatorskie w inny. Wielka szkoda, że obecnie o wiele chętniej rozważa się futury-
styczne – choć częściowo usprawiedliwione – wizje o wskrzeszaniu wymarłych gatunków [4]. Czy nie lepiej jest ratować istniejące bogactwa aniżeli upajać się wizją złotych jabłek Hesperyd w postaci mamutów czy wilków workowatych?

Bibliografia:

- [1] Kawecki Z. 1976. Zoologia stosowana. Wyd. PWN
- [2] Krzanowska H., Łomnicki A., Rafiński J., Szymura J. M. 2002. Zarys mechanizmów ewolucji. Wyd. PWN
- [3] Stokłosowa S. (red.) 2004. Hodowla komórek i tkanek. Wyd. PWN

- [4] Wilmut I., Campbell K., Tudge C. 2002. Ponowny akt stworzenia. Dolly i era panowania nad biologią. Wyd. Rebis.
- [5] Żuk B., Wierzbicki H., Zatoń-Dobrowolska M. 2011. Genetyka populacji i metody hodowlane. PWRiL.

Wpływ immunosupresji na postęp chorób nowotworowych

Agnieszka Dąbrowska
Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów FERMENT
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
agnieszkadabrowska1993@gmail.com
Praca napisania pod opieką dra Jakuba M. Milczarka

Immunosupresją nazywamy zjawisko, w którym zablokowany zostaje proces wytwarzania przeciwciał oraz komórek odpornościowych przez tzw. immunosupresory. Szybki rozwój medycyny transplantacyjnej, postęp w immunologii transplantacyjnej oraz wprowadzenie nowych leków immunosupresyjnych przyczyniły się do poprawy wyników wielu przeszczepów.

Roczne przeżycie przeszczepu wynosi około 95%, zaś odległe wyniki przeżycia pacjentów i samych przeszczepów nie są satysfakcjonujące. Odrzucenie przeszczepu jest głównym powodem śmierci pacjentów z pobranymi narządami. Obok powikłań sercowo-naczyniowych czy zakażeń, nowotwory stanowią narastającą przyczynę coraz wyższej śmiertelności w tej populacji chorych.

Postęp w transplantologii przyczynił się do wydłużenia czasu przeżycia chorych po przeszczepieniu narządów. Wdrożenie najnowszych metod immunosupresji (używanie leków immunosupresyjnych, np. cyklosporyny, rapamycyny) oraz zaawansowanych metod obrazowania i opieki nad chorymi znacząco zmniejszyły ryzyko odrzucenia przeszczepionego narządu. Okazuje się, iż przewlekłe stosowanie leków immunosupresyjnych w celu przeciwdziałania odrzuceniu narządu wiąże się ze zwiększonym ryzykiem infekcji, chorób sercowo-naczyniowych oraz częstszym występowaniem nowotworów [1].

Mimo obiecujących wyników immunoterapii guzów nowotworowych w mo-

delach zwierzęcych, podobnych osiągnięć nie obserwuje się u ludzi w badaniach klinicznych. Jedną z przyczyn tej rozbieżności mogą być upośledzenia układu odpornościowego towarzyszące zaawansowanej chorobie nowotworowej [2].

Postęp w dziedzinie immunologii pozwolił zrozumieć interakcję nowotwór-organizm i otworzył niezwykle możliwości dla rozwoju immunoterapii przeciwnowotworowej. Identyfikacja antygenów nowotworowych pozwoliła dostosować się do leczenia konkretnych celów molekularnych, mających ekspresję w komórkach nowotworowych. Ponadto postępy w biotechnologii pozwalają na zaprojektowanie i opracowanie bardziej skutecznych szczepionek przeciwrakowych akty-

wujących immunizację, jednak efektywna immunoterapia nie została jeszcze opracowana dla każdego rodzaju nowotworu [3].

Brak sukcesu obecnych strategii jest związany z "ucieczką" komórek nowotworowych od odpowiedzi immunologicznych [3,4]. Prawdopodobnie obecne metody leczenia nowotworów złośliwych oparte na wykorzystaniu systemu odpornościowego są po prostu nieskuteczne.

Układ immunologiczny jest ważny dla kontroli rozwoju nowotworowego. Jeśli odporność wrodzona lub adaptacyjna zostaje osłabiona lub stłumiona, może nastąpić rozwój nowotworu. W mysich modelach wykazano, że utrata czynności układu odpornościowego, zwłaszcza tych wpływających na produkcję interferonu- γ (IFN- γ), limfocytów T oraz naturalnych komórek cytotoksycznych i ich mechanizmów efektorowych, może wiązać się z zwiększoną zachorowalnością i częstością powstawania nowotworów [4]. Wytwarzanie, a także regulacja odpowiednich interakcji prozapalnych może w istocie kontrolować oraz promować zwalczanie pewnych rodzajów nowotworów.

Tolerancją immunologiczną nazywamy zjawisko, w którym układ odpornościowy nie wykazuje żadnej reakcji na antygen. Warto podkreślić, iż tolerancja ta odnosi się do jednego, konkretnego antygeny, nie zaś do braku reaktywności względem wszystkich możliwych antygenów. Istotnym mechanizmem indukcji tolerancji immu-

nologicznej jest nieodpowiednie przetwarzanie przeciwciał i wadliwa prezentacja antygenów unikalnych dla nowotworów TAA (Tumor Associated Antigens) przez komórki APC (Antigen Presenting Cell). APC, komórki dendrytyczne DC (Dendritic Cell), monocyty, makrofagi oraz zaktywowane limfocyty B odpowiadają za zwiększoną ekspresję głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC (Major Histocompatibility Complex) oraz kostymulację cząsteczek w warunkach zapalnych. Komórki te są zdolne do indukowania odpowiedzi immunologicznej przez prezentację antygeny za pomocą CD4+ lub CD8+. DC są odpowiedzialne za rozpoczęcie i nasilenie odpowiedzi immunologicznej [5]. W warunkach immunosupresyjnych komórki te nie są w stanie wywołać zjawiska zaprezentowania antygeny limfocytom T. Do aktywacji limfocytów T, komórki dendrytyczne muszą posiadać zdolność przedstawiania antygenów do CD4+ i CD8+ oraz jednocześnie dostarczyć odpowiednie sygnały do kostymulacji. Sygnały te wyrażają się poprzez ekspresję białka B7 na powierzchni komórek oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych. Nieefektywna aktywacja limfocytów T może pojawiać się z powodu występowania mikrośrodowiska immunosupresyjnego, braku mediatorów prozapalnych i indukowania immunosupresji przez nowotwory.

Złośliwe odmiany nowotworów wykorzystują mechanizmy, które omijają lub „zagłuszają” reakcje immunologiczne - wytwarzają one różne czynniki immu-

nologiczne TDFs (Tumour-Derived Factors), które angażują fibroblasty i makrofagi związane z nowotworem oraz inne populacje komórek związanych z hamowaniem dojrzewania komórek dendrytycznych oraz obniżeniem aktywności limfocytów T [6]. Spośród wielu TDF, które mogą promować guza poprzez tłumienie wrodzonej odporności i w wyniku tego ułatwienie progresji nowotworu wymienia się: czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), interleukiny-10 (IL-10), reaktywne formy tlenu (ROS), 2,3-dioksygenaza indolowa (IDO), prostaglandyny (np. PGE2) i transformujący czynnik wzrostu (TGF- β). Wiele populacji komórek szpikowych lub limfatycznych jest również zaangażowanych i wykorzystywanych w tworzeniu immunosupresji lub sieci indukowania tolerancji immunologicznej, skutkując naruszeniem skuteczności odporności wrodzonej i adaptacyjnej. Należą do nich makrofagi związane z nowotworem (TAM), komórki T-regulatorowe (Treg), naturalny zabójca komórek T (NKTs), niedojrzałe komórki dendrytyczne (IDC) i komórki supresorowe pochodzące ze szpiku (MDSCs).

Kluczowym zjawiskiem dla powstawania TDF jest konstytutywna aktywacja białka STAT3. W mikrośrodowisku nowotworowym STAT3 kontroluje produkcję cytokin (IL-10, VEGF) i hamuje reakcję prozapalną wobec guza. Wynikiem tego jest utrudnienie dojrzewania i aktywacji komórek dendrytycznych, co dalej skutkuje zahamowaniem odpowiedzi immunologicznej [7].

W literaturze opisano również podobne sposoby hamowania aktywności niektórych elementów odpowiedzi odpornościowej przez komórki nowotworowe:

- rekrutację komórek MDSC wydzielających czynniki immunosupresyjne: NOS2 i arginazę;
- rekrutację przez komórki nowotworowe, przy pomocy cytokiny CCL22, regulatorowych limfocytów Treg hamujących dojrzewanie komórek dendrytycznych;
- zahamowanie ekspresji niektórych białek wchodzących w skład receptorów TCR;
- wydzielanie przez komórki nowotworowe ligandów FasL i TRAIL indukujących w komórkach T śmierć apoptotyczną;
- wytwarzanie przez komórki nowotworowe ligandów indukujących śmierć apoptotyczną limfocytów T (tzw. negatywna kostymulacja) [8].

Innym sposobem rozwoju nowotworu w zjawisku immunosupresji jest mechanizm oparty na wadliwym kontakcie międzykomórkowym. Nowotwór wpływa na rozwój immunosupresji poprzez zdolność zmniejszenia ekspresji receptorów śmierci na powierzchni komórki nowotworowej. Receptory te są niezbędne do oddziaływania pomiędzy komórkami a limfocytami T i niszczenia komórek guza. W tym przypadku „ucieczka” nowotworu przed mechanizmami immunologicznymi może mieć wpływ na procesy proapoptotyczne – zmniejszona ekspresja receptorów śmierci warunkuje brak oddziaływań z ligandami (np. PD-

L1, B7-H1, B7-H7, FasL) wysyłanych przez limfocyty T i co za tym idzie - śmierć komórki [3].

Przedstawiony powyżej sposób unikania odpowiedzi odpornościowej przez nowotwór nie jest jedyny. Komórki nowotworowe unikają nadzoru immunologicznego również poprzez:

- zahamowaną ekspresję cząsteczek MHC klasy I - komórki bez MHC I nie są zdolne do prezentowania antygenów limfocytom T i nie mogą być zniszczone przez komórki Tc;
- mutacje w białkach TAP1 biorących udział w transporcie produktów enzymatycznej „obróbki” antygenów (mianowicie zmniejszenie ekspresji antygenów na powierzchni komórek nowotworowych) - TAP1 są to peptydowe transportery, przenoszące peptydy (pocięte białka) do siateczki śródplazmatycznej w celu prezentacji ich przez cząsteczki klasy I MHC;
- mutacje w białkach LMP2 i LMP7 immunoproteasomów biorących udział w „obróbce” antygenów (niższa ekspresja antygenów na powierzchni komórek nowotworowych) - białka te tworzą podjednostki kompleksu białek cytoplazmatycznych nazywanych proteasomami;
- „złuszczenie” z powierzchni komórek nowotworowych antygenów;
- zmniejszoną ekspresję cząsteczek kostymulujących należących do rodziny B7, mających wpływ na odpowiedź limfocytów T - następuje brak zjawiska potęgowania i aktywacji limfocytów T [8].

Stosunkowo niedawno opisano rów-

nież relację między zjawiskiem immunosupresji a wydzielanymi przez komórki nowotworowe tzw. egzosomami (pęcherzyki powstające na drodze endocytozy wielkości 40-150 nm, mogące przenosić miRNA, mRNA, mtDNA, DNA). Obecnie pęcherzyki te, pochodzące ze zdrowych komórek, są badane w celu wykorzystania ich jako nośników leków. Egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe powodują taką modyfikację mikrośrodowiska, która sprzyja rozwojowi nowotworu. Pęcherzyki te odpowiedzialne są za zablokowanie prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne, a co za tym idzie - zahamowanie aktywacji limfocytów Tc i Th. Na swojej powierzchni posiadają one cytokiny immunosupresyjne (np. TGFB, IL-10) oraz cząsteczki FasL [9]. Regulacja odpowiedzi immunologicznej może być sterowana przez miRNA zawarte w egzosomach. Wówczas mechanizm rozwoju nowotworu zależeć będzie od rodzaju przeniesionego przez egzosomy miRNA, który degraduje RNA syntezujące białko biorące udział w procesie powstawania odpowiedzi odpornościowej.

Podsumowując, immunosupresja jest zjawiskiem potęgującym rozwój guza. Leki immunosupresyjne należą do istotnych czynników ryzyka rozwoju nowotworów zarówno w pośrednim mechanizmie hamowania odpowiedzi immunologicznej, jak i w bezpośrednich i nie do końca poznanych działaniach na nowotworzenie. Część pacjentów z przebytą chorobą nowotworową przed transplantacją jak i

de novo po przeszczepieniu otrzymuje podstawowy lek immunosupresyjny rapamycynę. Według doniesień zastosowanie nowych leków immunosupresyjnych o swoistym działaniu przeciwnowotworowym może zmniejszyć ryzyko wystąpienia nowotworów do kilku procent.

Wiele badań wskazuje również, iż nowotwory same w sobie biorą ważny

udział w obniżeniu odporności organizmu. Według takiego rozumowania stosowanie leków immunosupresyjnych może tylko dodatkowo wzmacniać rozwój nowotworu. Rozwiązanie tego problemu wymaga jeszcze odpowiedzi na wiele innych pytań i badań nad tym zjawiskiem.

Bibliografia:

- [1] A. Plużański, P. Badurak, M. Krzakowski, Nowotwory po przeszczepieniu narządów, *Onkologia w Praktyce Klinicznej* (2010), 6(2): 53-61
- [2] D.W. Kowalczyk, E. Kwiatkowska, A. Mackiewicz, Immunosupresja towarzysząca chorobie nowotworowej. Kliniczne implikacje obserwacji modeli doświadczalnych, *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* (2003), 8(2): S294
- [3] H. T. Khong and N. P. Restifo, Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes, *Nat Immunol.*, (2002), 3(11): 999-1005.
- [4] T. J. Stewart, S. I. Abrams (2008) How tumours escape mass destruction, *Oncogene*, 27: 5894-5903, doi:10.1038/onc.2008.268
- [5] A. Cuenca, F. Cheng, H. Wang, J. Brayer, L. Horna, L. Gui wsp., Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens, *Cancer Research* (2003),63: 9007-9015
- [6] Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S i wsp., Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells, *Nat Med* (2004),10: 48-54
- [7] S. Szala, Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów?, *Postepy Hig. Med. Dośw.* (online) (2009), 63: 598-612
- [8] Aneta Wójtowicz, Monika Baj-Krzyworzeka, Jarosław Baran, Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropęcherzyków błonowych, *Postepy Hig. Med. Dośw.* (online) (2014), 68: 1421-1432

Metody badania antygenów zgodności tkankowej

Izabela Górską, Agnieszka Bodzioch

Studenckie Koło Naukowe Immunologii Zakażeń Wirusowych przy Zakładzie Immunologii Klinicznej, Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum w Krakowie

AgnieszkaBodzioch@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr n. med. Marzena Lenart

Wstęp

Transplantologia jest tą dziedziną medycyny, której dynamiczny postęp w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat pozwolił wyleczyć wiele osób, niemających niegdyś szans na przeżycie. Pierwsze wzmianki o przeszczepianiu narządów pochodzą jednak już z czasów starożytnych. O tego typu praktykach wspominają liczne źródła, na przykład traktat Shushruta Samhuta, opisujący opracowaną w Indiach chirurgiczną technikę odtwarzania obciętych nosów, czy opis zamiany serc dwóch żołnierzy znieczulonych dużą ilością wina dokonanej przez chirurga Tsin Yue-Jena w starożytnych Chinach. Prekursorami medycyny transplantacyjnej w Europie byli z kolei święci bliźniacy Kosma i Damian, którzy dokonali przeszczepu nogi pobożnemu kościelnemu w Rzymie w IV wieku n.e. Przenosząc się jednak w naszych rozważaniach do czasów współczesnych: rok 1954 przyniósł ze sobą pierwszą udaną transplantację wykonaną w Bostonie. Joseph Murray, późniejszy laureat Nagrody Nobla, wraz z zespołem chirurgów dokonał syngenicznego przeszczepienia nerki pomiędzy bliźniakami monozygotycznymi, z których jeden cierpiał na schyłkową niewydolność nerek. Terapia ta okazała się

skuteczna i bezpieczna, czego dowodem było przeżycie biorcy 9, a dawcy ponad 50 lat. Kolejne lata przyniosły niesłychany rozwój technik chirurgicznych, opieki pooperacyjnej, wprowadzono skuteczny lek immunosupresyjny - azatioprynę, za odkrycie którego w 1988 roku George Hitchings i Gertruda Ellion otrzymali Nagrodę Nobla, poznano również układ zgodności tkankowej człowieka. Dzięki temu udało się znacząco przedłużyć czas przeżycia przeszczepionego narządu w organizmie biorcy [17]. Sam termin „transplantacja”, wywodzący się z języka łacińskiego (od czasownika *transplantare*: szczepić, przesadzać), oznacza przeszczepianie tkanek lub narządów w obrębie jednego organizmu, albo z jednego organizmu do drugiego. Procedura przeszczepiania narządu wymaga zgodności dawcy i biorcy nie tylko pod względem grup krwi w układzie ABO, ale również w kontekście różnic genetycznych, głównie w zakresie cząsteczek układu zgodności tkankowej. Mogą one być powodem uruchomienia procesów immunologicznych skutkujących odrzuceniem przeszczepu [8,21]. Biorąc pod uwagę różnice genetyczne pomiędzy dawcą i biorcą można wy-

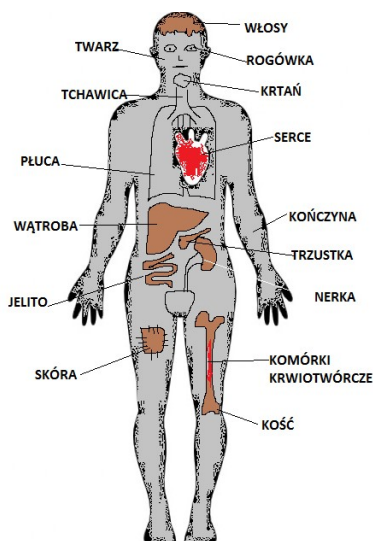
różnić następujące rodzaje przeszczepów:

-autologiczny (autogeniczny): biorca i dawca to ten sam osobnik,

-syngeniczny (izogeniczny): między identycznymi osobnikami tego samego gatunku (szczepy wsobne u zwierząt oraz bliźnięta monozygotyczne),

-allogeniczny: między różnymi genetycznie osobnikami tego samego gatunku,

-ksenogeniczny: między osobnikami odmiennych gatunków [17].



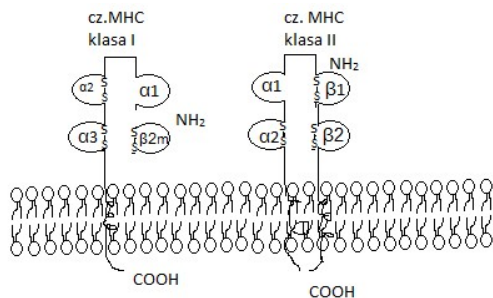
Rys. 1 Narządy i tkanki człowieka przeszczepiane w klinice [17]

Główny układ zgodności tkankowej

Główny układ zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) został odkryty przy okazji badań dotyczących poszukiwania genetycznego tła odrzucania przeszczepów skóry u myszy. Bódcem do zapoczątkowania tych badań było odkrycie przez Karla Landsteinerja grup krwi systemu ABO oraz odkrycie i wyjaśnienie zjawiska aglutynacji krwinek czerwonych biorcy pod wpły-

wem surowicy krwi dawcy [31]. Często poszukiwać innych antygenów grupowych krwi, które byłyby odpowiedzialne za przyjęcie lub odrzucenie przeszczepu [17]. W ten sposób odkryto grupy antygenów oznaczanych jako I, II i III. W celu lepszego poznania i wyjaśnienia roli tych antygenów przeprowadzono badanie polegające na przeszczepieniach skóry pomiędzy liniami kongenicznych myszy różniących się tylko i wyłącznie danym *locus* zgodności tkankowej. Badanie wykonano dla kilkunastu pokoleń myszy. Wyniki wykazały, iż reakcja na ten zabieg zależy przede wszystkim od *locus* MHC, a tylko w niewielkim stopniu od innych *loci*, nazwanych słabymi antygenami zgodności tkankowej. Owe słabe antygeny różnią się od MHC zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym. Tworzą one heterogenną grupę peptydów określanych jako antygeny zgodności tkankowej niekodowane przez MHC. Najczęściej są one rozpoznawane analogicznie do antygenów wirusowych, czyli rozpoznawane przez limfocyty T w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I i klasy II [19]. Z uwagi na to, iż stanowią one istotną barierę podczas transplantacji tkanek, zwłaszcza transplantacji szpiku kostnego, może zdarzyć się sytuacja, w której pomimo zgodności biorcy i dawcy pod względem haplotypów MHC, słabe antygeny mogą być przyczyną odrzucenia przeszczepu. Cząsteczki MHC są natomiast glikoproteinami obejmującymi wiele genów o największym polimorfizmie z dotychczas poznanych. Biorą one udział zarówno w inicjacji, jak i w fazie

efektorowej odpowiedzi immunologicznej. Częsteczki MHC, ze względu na różnice zarówno pod względem budowy (Rys.2), jak i funkcji, dzieli się na klasę I, II i III [16].



Rys.2 Schemat cząsteczek zgodności tkankowej [16]

MHC klasy I

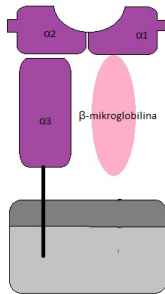
Cząsteczki MHC klasy I występują na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych (z wyjątkiem ośrodkowego układu nerwowego, rogówki i trofoblastu łożyska), a także sporadycznie na powierzchni erytrocytów. Warunkują one zachowanie się cytotoksycznych limfocytów T, biorąc tym samym udział w reakcji przeciwko infekcji wirusowej, a także w odrzucaniu przeszczepu. Zbudowane są z dwóch łańcuchów polipeptydowych: ciężkiego - kodowanego przez geny MHC, i lekkiego, β_2 -mikroglobuliny, kodowanego przez gen znajdujący się poza kompleksem genów MHC. Łańcuch ciężki (α) składa się z: N-końcowego fragmentu zewnątrzkomórkowego stanowiącego ok. 80% długości łańcucha, krótkiego transbłonowego fragmentu hydrofobowego (ok. 20 aa) oraz krótkiego fragmentu hydrofilowego położonego wewnątrz cząsteczki (ok. 20-40 aa).

Fragment zewnątrzkomórkowy jest utworzony przez trzy domeny (α_1 , α_2 , α_3) tworzące pętle. Dwie z nich, domena α_1 i α_2 , zawierają łańcuchy cukrowe i odznaczają się polimorfizmem, co stanowi podstawę różnic między cząsteczkami MHC kl. I, pochodzących od różnych osobników i kodowanych przez różne allele. Miejscem przyłączenia się antygenów prezentowanych limfocytom T jest rowek utworzony przez domeny α_1 i α_2 , osadzony na β_2 -mikroglobulinie i domenie α_3 , które znajdują się pomiędzy nim a błoną komórkową (Rys.3). W owym rowku znajduje się sześć zagłębień (od A do F) zwanych kieszonkami, które stanowią miejsca zakotwiczenia się łańcuchów bocznych aminokwasów prezentowanych antygenów. Aby cząsteczka MHC kl. I mogła w sposób efektywny prezentować antygeny limfocytom T, potrzebuje związać co najmniej 2-3 aminokwasy kotwiczące. Antygeny prezentowane przez te cząsteczki składają się najczęściej z 8-10 aminokwasów i obydwoma końcami tkwią w rowku utworzonym przez cząsteczkę MHC [20].

MHC klasy II

Cząsteczki MHC klasy II występują tylko na powierzchni wyspecjalizowanych komórek układu odpornościowego, takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B. Mogą jednak pojawiać się na wielu innych komórkach, jak np. pobudzone limfocyty T czy komórki śródbłonna, w wyniku aktywacji lub działania cytokin, np. interferonu γ (INF- γ). Konstytutywne występowanie cząsteczek MHC klasy

II u człowieka zaobserwowano na komórkach śródbłonna naczyń w sercu i nerkach. Regulują one immunologiczne rozpoznanie przez limfocyty B i T. Częsteczki te są zbudowane z dwóch niekowalencyjnie połączonych łańcuchów o podobnej budowie, α i β , które są kodowane przez geny zlokalizowane w obrębie MHC.



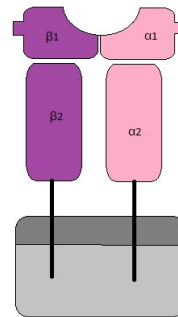
Rys.3 Schemat rowka MHC kl. I [16]

Podobnie jak łańcuch ciężki cząsteczki klasy I, składają się z one z trzech części: zewnątrzkomórkowej N-końcowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Domeny zewnętrzne $\alpha 1$ i $\beta 1$ obu łańcuchów tworzą rowek, w którym, podobnie jak to miało miejsce w cząsteczkach MHC kl. I, występuje sześć kieszonek. Jednak polimorfizm tych cząsteczek dotyczy głównie domen $\alpha 1$ i $\beta 1$ (Rys.4). Prezentowane przez nie antygeny obejmują od kilkunastu do ponad dwudziestu aminokwasów i mogą występować po obu stronach rowka. Ponadto mają one zdolność do łączenia się w pary i tworzenia „superdimerów” [20].

MHC klasy III

Cząsteczki MHC klasy III wchodzi w skład układu dopełniacza. Zadaniem tego układu jest uzupełnianie (dopeł-

nianie) roli przeciwciał w zakresie unieszkodliwiania antygeny. Stanowi on zbiór białek surowicy i płynów tkankowych, których jest łącznie z czynnikami regulującymi około 30. Białka te są oznaczane literą C (ang. *complement*) i liczbą. Białka C2, C4 i czynnik B (BF) u ludzi są kontrolowane przez *loci* MHC klasy III [16].



Rys.4 Schemat rowka MHC kl. II [16]

Główny układ zgodności tkankowej człowieka

Główny układ zgodności tkankowej człowieka - układ HLA (ang. *human leukocyte antigens*) swą nazwę zawdzięcza odkryciu jego antygenów na krwinkach białych człowieka. Kompleks genów układu HLA znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 6 i zajmuje łącznie około 4 mpz DNA (4 miliony par zasad), czyli ponad 0,1% całego genomu [6]. Wyróżniamy trzy klasy genów, których produkty to glikoproteiny o budowie domenowej klasyfikowane jako antygeny:

- Klasy I: geny klasyczne: HLA-A, HLA-B, HLA-C oraz nieklasyczne: HLA-E, HLA-F, HLA-G oraz MICA i MICB;
- Klasy II: geny klasyczne: HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP;
- Klasy III: wiele różnych białek, między innymi: składniki dopełniacza C2

i C4, czynnik B, produkt protoonkogene-
nu Notch 4, jądrowa kinaza seryno-
wo/treoninowa RPI (Rys.5).

Do ich roli należy udział w odpowiedzi
immunologicznej poprzez prezentację
antygenów limfocytom, rozpoznawanie
własnych tkanek i prezentacja skład-
ników obcych. Układ HLA jest ukła-
dem diploidalnym, co oznacza,
że każdy człowiek posiada dwa komplety
HLA klasy I i II (dwa haplotypy),
jeden pochodzący od matki, a drugi od
ojca. Każdy gen może występować
w postaci dwóch różnych alleli - mamy
wtedy do czynienia z heterozygotą, lub
w postaci dwóch identycznych alleli -
homozygotą. Jest on dziedziczony
zgodnie z prawami Mendla, niezależ-
nie od płci (Rys.6) [16].

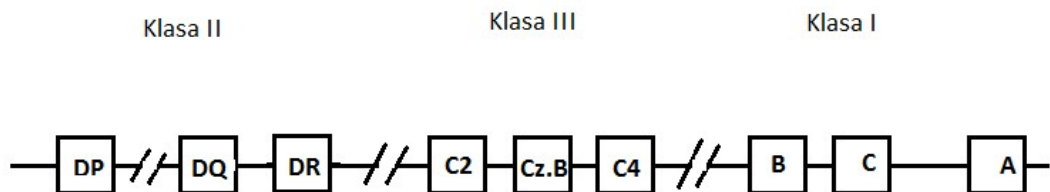
Klasyczny schemat dziedziczenia HL
(99% przypadków) [15]

- 25% - szansa na pełną zgodność
między dwojgiem rodzeństwa,
- Szansa na pełną zgodność z bratem/
siostrą rośnie wraz ze wzrostem liczby
rodzeństwa:
 - *44% szans - dwójka rodzeństwa
 - *58% szans - trójka rodzeństwa
 - *94% szans - dziesięcioro rodzeństwa
- W Polsce - ok. 30 % szans na pełną
zgodność między rodzeństwem.

Nieklasyczny schemat dziedziczenia
[16]:

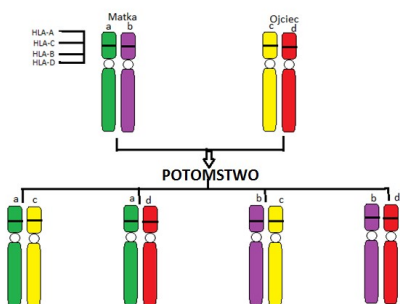
- Inwersja
- Delecja
- Mutacje punktowe
- „Crossing over” - daje możliwość
wystąpienia pięciu możliwych haploty-
pów. Jego wystąpienie u pacjenta po-
woduje brak możliwości znalezienia
zgodnego dawcy rodzinnego. Należy
jednak podkreślić, że jest to bardzo
rzadkie zjawisko.

Z układem zgodności tkankowej zwią-
zane jest również nie do końca pozna-
ne i wyjątkowe zjawisko
niezrównoważenia sprzężeń (ang. *lin-
kage disequilibrium*). Polega ono
na częstszym występowaniu alleli róż-
nych *loci* w postaci wspólnego haplo-
typu, niż wynikałoby z przypadkowego
i niezależnego ich dziedziczenia,
np.: A1, B8 i DR3 u przedstawicieli ra-
sy kaukaskiej. Przeciwnym zjawiskiem
jest „ujemna nierównowaga sprzężeń”,
polegająca na rzadszym występowaniu
alleli różnych *loci* w postaci wspólnego
haplotypu, niż wynikałoby z przypad-
kowego i niezależnego dziedziczenia,
np.: A2 i Cw7 w populacji europejskiej.
Następstwem korzyści, jakie wynikają
ze wspólnego występowania alleli na-



Rys.5 Schemat mapy genetycznej układu HLA, czyli głównego układu zgodności
tkankowej człowieka.

leżących do różnych *loci*, jest faworyzacja układów najskuteczniejszych w walce z lokalnie występującymi drobnoustrojami. Haplotypem najczęściej występującym w populacji polskiej jest haplotyp: HLA-A*01, -B*08, -DRB1*03, typowy dla rasy kaukaskiej [38].



Rys. 6 Klasyczny schemat dziedziczenia [16]

Typowanie tkankowe

Przeszczepienie narządu to przede wszystkim zabieg ratujący życie. W niektórych przypadkach, takich jak schyłkowa niewydolność wątroby, płuc czy serca, transplantacja jest jedyną metodą terapii. U osób cierpiących na niewydolność nerek czy cukrzycę, pozwala na polepszenie jakości życia, a także zwiększa szanse przeżycia. Pacjenci z nowotworami układu krwiotwórczego, a także z niektórymi chorobami wrodzonymi, mają szansę na przeżycie dzięki przeszczepieniu szpiku kostnego. Obecnie, oprócz nerek, serca, wątroby, płuca i trzustki, przeszczepia się również izolowane wyspy trzustkowe, fragmenty jelit, tchawicę i krtań [1-7,37].

W celu prawidłowego dobrania dawcy

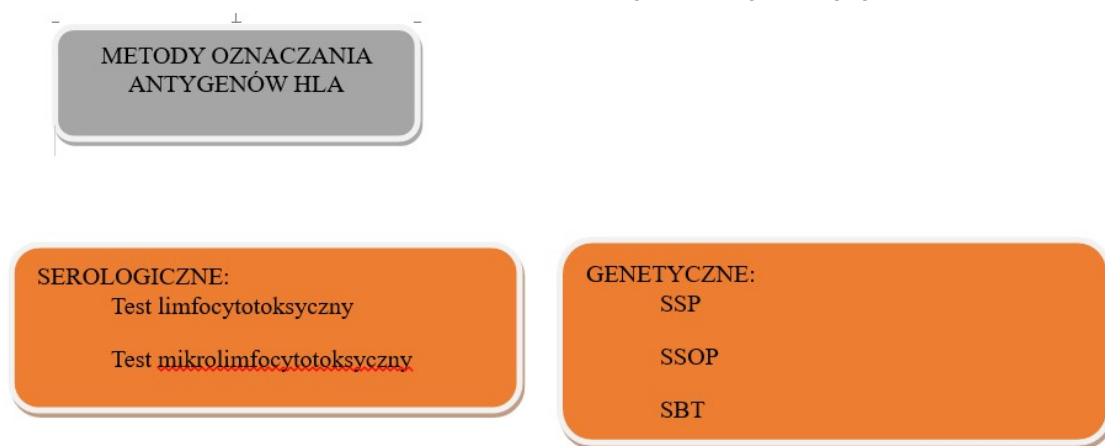
i biorcy przeszczepu potrzebny jest szereg badań. Podstawę stanowi potwierdzenie wzajemnej zgodności genetycznej dawcy i biorcy. W tym celu służy oznaczenie właśnie antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II. Wszelkiego rodzaju niewydolności narządowe stanowią podstawowe wskazania do przeszczepu narządów. Przykładowo wskazaniami do przeszczepienia wątroby są zakażenia WZW typu B i C, poalkoholowa marskość wątroby, nowotwór, cholestazy, ciężkie zatrucia, choroby metaboliczne (hemochromatoza, choroba Wilsona), torbielowatość wątroby, czy obszerne urazy. W przypadku przeszczepienia serca kwalifikują się tu pacjenci z kardiomiopatią, zwykle rostrzeniową, chorobą niedokrwienną serca, wadami wrodzonymi oraz z zaawansowanymi wadami zastawkowymi z wykluczeniem tych, które można leczyć kardiologicznie [7]. W przypadku przeszczepienia płuc za wskazania uznaje się: przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POCHP), samoistne włóknienie płuc (SWP), mukowiscydozę, niedobór alfa-1 antytrypsyny, pierwotne tętnicze nadciśnienie płucne [4]. Przeszczepienie nerki, jako najskuteczniejsza metoda leczenia nerko-zastępczego, brana jest pod uwagę u każdego chorego z przewlekłą niewydolnością nerek [3]. Częstym narządem przeszczepianym w Polsce jest także rogówka, w tym przypadku wskazaniem do przeszczepu są wszystkiego rodzaju dystrofie, zmętnienia istoty właściwej, blizny pooparzeniowe, aktywne owrzodzenia infekcyjne, czy uszkodzenia śródbłon-

ka [23]. W przypadku narządów, odwrotnie niż w przypadku szpiku kostnego, do dobrania dawcy i biorcy nie jest potrzebna pełna zgodność pod względem antygenów HLA, ale akceptuje się najmniejszą niezgodność w układzie HLA klasy I i II. Aby określić zgodność między dawcą i biorcą należy wykonać oznaczenie antygenów HLA, a główne metody oznaczania dzielimy na serologiczne i genetyczne (Rys.7) [37].

Większą zdolnością dyskryminacji charakteryzują się metody oparte na mieszanej hodowli limfocytów (ang. *mixed lymphocyte culture*, MLC) zwane typowaniem komórkowym. Obecnie jest ona rzadko stosowana ze względu na dużą pracochłonność.

Test mikrolimfocytotoksyczny

Stosowany jest w transplantologii i transfuzjologii do określania antygenów zgodności tkankowej klasy I u dawcy i biorcy, przy przetaczaniu masy leukocytarnej, jak również w ba-



Rys. 7 Podział metod oznaczania antygenów HLA.

TESTY SEROLOGICZNE

Najstarszymi, ale wciąż stosowanymi, metodami badań antygenów HLA są testy serologiczne. Wykorzystują one reakcje wiązania swoistych przeciwciał z antygenami na powierzchni komórek, najczęściej limfocytów. Jak każda metoda badawcza, posiada ona zarówno zalety jak i wady. Jest to test szybki i tani, jednak posiadający słabą zdolność dyskryminacji, czyli brak możliwości różnicowania dużej części znanych wariantów allelicznych HLA. Wymaga on również wykorzystywania żywych komórek w celu przeprowadzenia badania [34].

daniach ustalających korelację pomiędzy określonymi antygenami układu zgodności tkankowej a jednostkami chorobowymi. Stosowany był również do typowania HLA kl. I oraz II na izolowanych limfocytach B, ale z powodu niskiej rozdzielczości i pracochłonności zastąpiono go badaniami genetycznymi [33].

Podstawa: reakcja antygen-przeciwciała

Założenia: metoda oparta jest na zjawisku niszczenia limfocytów, czyli komórek docelowych, przez swoiste przeciwciała skierowane przeciwko antygenom występującym na po-

wierzchni tych komórek, przy udziale dopełniacza. Pozwala wykryć zarówno antygeny powierzchniowe komórek, jak i obecne w płynach ustrojowych przeciwciała skierowanych przeciwko tym antygenom.

Przebieg reakcji: dwuetapowy

1. Utworzenie kompleksu w wyniku wiązania swoistych przeciwciał z powierzchniowymi determinantami antygenowymi.

2. Przyłączenie się dopełniacza do tak utworzonego kompleksu antygen-przeciwciała, uszkodzenie błony komórkowej komórki docelowej, zaburzenie równowagi osmotycznej jej wnętrza i w konsekwencji śmierć komórki.

Materiał: zawiesina limfocytów pacjenta izolowanych z krwi obwodowej (w przypadku konieczności określenia antygenów zgodności tkankowej klasy II do badań należy uzyskać zawiesinę limfocytów B), swoiste surowice odpornościowe skierowane przeciwko antygenom HLA (gotowe surowice anty-HLA), dopełniacz króliczy.

Płytki Terasaki, barwnik (eozyna), formalina, mikroskop odwrócony [33].

Etapy:

1. Izolacja limfocytów,
2. Wypełnienie wszystkich dołków na płytkach Terasaki'ego olejem parafinowym,
3. Dodanie do każdego zagłębienia pod parafinę surowicy anty-HLA o znanej swoistości oraz zawiesinę badanych limfocytów,
4. Inkubacja płytek,
5. Dodanie dopełniacza,
6. Inkubacja,
7. Dodanie barwnika - eozyny,

8. Reakcja cytotoksyczna - zatrzymanie przez dodanie formaliny,

9. Pozostawienie płytki w temperaturze pokojowej na około jedną godzinę,

10. Odczytanie wyniku w mikroskopie odwróconym.

Ocena wyniku: ocenia się w mikroskopie świetlnym wygląd komórek, obliczając odsetek komórek martwych (wybarwionych) [32].

Stopień nasilenia reakcji podaje się wg umownej skali:

- Do 10 % komórek martwych - wynik ujemny
- Do 20 % komórek martwych - 2
- 20-50% komórek martwych - 4
- 50-75 % komórek martwych - 6
- 75-100 % komórek martwych - 8

Metoda ta jednak ma już charakter historyczny, ze względu na powstanie nowych, dużo dokładniejszych możliwości typowania.

METODY GENETYCZNE

Przedstawione wcześniej metody serologiczne są obarczone dużym błędem sięgającym nawet 20%. Najwięcej trudności pojawia się przy typowaniu serologicznym antygenów z grupy DRw52, szczególnie DRB1*13 [37]. Ponadto badania serologiczne nie zawsze sprawdzają się w przypadku aktywacji limfocytów wykazujących wzmożoną ekspresję antygenów HLA na swej powierzchni oraz w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. Dlatego też badania serologiczne obecnie są zastępowane technikami biologii molekularnej. Typowanie genetyczne staje się najbardziej powszechnym sposobem typowania HLA. Wykorzystuje ono analizę polimorfi-

zmu genetycznego na poziomie DNA. Analiza taka jest o wiele prostsza i dokładniejsza od analizy na poziomie białka. Podstawą interpretacji jest zależność pomiędzy sekwencją nukleotydową DNA, a sekwencją aminokwasową kodowanego białka. Dużą zaletą metod genetycznego typowania jest możliwość rozróżnienia wszystkich alleli, znikomy odsetek błędów, łatwość standaryzacji, a także możliwość badania martwych komórek. Wadą natomiast są duże koszty oraz wydłużony czas badania.

Techniki oparte na analizie fragmentów DNA o polimorficznej sekwencji wykorzystują [6]:

1. Specyficzne sekwencje inicjujące łańcuchową reakcję polimerazy (ang. polymerase chain reaction) - PCR (np. PCR-SSP- PCR, nested- PCR, ARMS),
2. Enzymy restrykcyjne (PCR- RFLP),
3. Zestawu specyficznych sond oligonukleotydowych (PCR-SSO),
4. Analizę konformacyjnej (PCR-SSCP - PCR, analiza heteroduplesów PCR, DSCA).
5. Sekwencjonowanie (SBT).

Typowanie alleli genów MHC przeprowadza się:

- a) MHC kl I: A, B, C: 2 i 3 egzon kodujący łańcuch α ,
- b) MHC kl II DR: 2 egzon kodujący łańcuch β : geny DR 1,3, 4, 5, DQ i DP: 2 egzon kodujący łańcuch α oraz β .

Przed przystąpieniem do wykonania typowania HLA metodami genetycznymi należy wyizolować DNA i określić czystość DNA mierząc absorbancję przy długości fali 260 i 290 nm. Stosunek absorbancji 260/290 powinien mieścić się w przedziale 1,6-1,9 [36].

Dzięki genotypowaniu antygenów HLA możemy uzyskać wynik o niskiej, pośredniej, bądź wysokiej rozdzielczości, w związku z rodzajem/czułością użytej metody (Rys.8). Jako wynik niskiej rozdzielczości uznaje się przykładowo: A*03, B*08. DR*11, gdzie litera oznacza *locus*, gwiazdka jest symbolem oznaczającym, że typowanie odbyło się metodą genetyczną, zaś dwie liczby za nią określają numer rodziny alleli.

przypadku wyniku o wysokiej rozdzielczości, przykładowo: A*03:01:02, dochodzą dwie dodatkowe liczby po dwukropku - pierwsza oznacza kolejny numer sekwencji egzonowej, następna zaś mówi o polimorfizmie nukleotydów w intronach. Natomiast wynik pośredni równoważny jest z niejednoznacznym wynikiem genotypowania, przykładowo: B*08:03/05/08, co oznacza, że możliwa jest obecność jednego z podanych alleli antygeny HLA B.

PCR SSP

Metoda SSP (ang. *Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction*) polega na przeprowadzeniu szeregu reakcji PCR z użyciem różnych par starterów dobranych tak, aby reakcja była możliwa tylko i wyłącznie w obecności określonego allelu lub grup alleli. Swoista amplifikacja DNA jest możliwa dzięki zastosowaniu wielu par starterów obejmujących tylko polimorficzne miejsca egzonu kodujące dany antygen HLA. Jest to najszybsza metoda typowania genetycznego, w której wynik uzyskujemy bezpośrednio po reakcji PCR.

Etapy:

- Przygotowanie mieszaniny reakcyj-

nej PCR: DNA, Taq polimeraza, dNTP, Mg²⁺, bufor odpowiedni dla polimerazy,

- Przeniesienie mieszaniny do wielu probówek reakcyjnych o różnej swoistości (swoiste startery),
- Reakcja PCR - wiele swoistych amplifikacji,
- Przeniesienie na żel agarozowy,
- Elektroforeza,
- Analiza komputerowa kombinacji dodatnich i ujemnych wyników reakcji PCR [34].

SSOP

Kolejną z metod genetycznych, dzięki której uzyskujemy wyniki o niskiej rozdzielczości określających najczęściej jeden *locus* jest metoda SSOP (ang. *Sequence-Specific Oligonucleotide Probe*) w Polsce najczęściej stosowana do genotypowania HLA klasy II: DR i DQ [9,10]. Podobnie jak w metodzie SSP, jej wykonanie wymaga wstępnej izolacji DNA, natomiast sama metoda składa się z 4 etapów:

1. Amplifikacja wyizolowanego DNA z użyciem pojedynczej pary starterów amplifikującej cały egzon z użyciem PCR.
2. Hybrydyzacja wielu swoistych sond umieszczonych na pasku nitrocelulozowym z odpowiednimi allelami kodującymi dane antygeny HLA.
3. Uwidocznienie produktów hybrydyzacji.

Istnieje kilka możliwości uwidocznienia pozytywnej reakcji:

- dzięki stosowaniu biotynylowanych starterów po etapie amplifikacji uzyskamy produkt połączony z biotyną, dzięki czemu w celu uwidocznienia

wystarczy inkubacja produktu reakcji zstreptawidyną połączoną z enzymem poprzez dodanie substratu dla tegoż enzymu [24];

- używanie mikrokulek opłaszczonych fluorochromem - każda mikrokulka jest swoista dla danego antygeny HLA i ma swoją niepowtarzalną fluorescencję, którą oceniamy za pomocą cystometrii przepływowej;

- SSOP Luminex - w tej metodzie także stosuje się polistyrenowe kolorowe mikrokulki sprzężone ze specyficznymi sekwencjami oligonukleotydowymi, które zawierają regulowany stosunek np. 2 fluorochromów, tworząc kombinację 100 niepowtarzanych mikrokulek, co pozwala na ocenę do 100 różnych parametrów jednocześnie np. 100 różnych alleli HLA. Metoda ta jest równoznaczna z metodą cystometrii przepływowej, jednak do oceny fluorescencji stosuje się wyspecjalizowany aparat Luminex służący *stricte* do analiz z zastosowaniem wspomnianych mikrokulek. [11]

- sondy związane z płytką ELISA - metoda ta łączy reakcje PCR z wizualizacją produktu przy użyciu sond oligonukleotydowych specyficznych dla sekwencji (SSOP) w teście immunoenzymatycznym postaci enzymu (ELISA); mówimy wtedy o metodzie SSOP-ELISA [10].

4. Etap ostatni, niezależnie od metody uwidoczniania produktu, polega na analizie komputerowej otrzymanego wyniku [1].

SSCP

Analizę konformacji cząsteczek DNA w drodze różnych technik elektrofore-

tycznych: analiza konformacji pojedynczych nici (ang. *single-stand conformation polymorphism*, SSCP). Techniki te pozwalają na wykrycie polimorfizmu i zmian punktowych. Po izolacji DNA amplifikujemy egzon interesującego nas genu za pomocą techniki PCR, następnie, produkt tej reakcji denaturujemy termicznie w buforze obciążającym z dodatkiem formamidu będącego czynnikiem denaturującym. Następnie przeprowadza się elektroforezę w niedenaturującym środowisku, co pozwala na uzyskanie różnego skręcania nici DNA i uzyskania odmiennych wzorów prążkowych ze względu na różną szybkość migracji różnych konformacji. Tak np. analizuje się allele genu DRB1, gdzie dwa pasma odpowiadają homozygotie, zaś cztery heterozygotie danego genu [5]. Metoda opisana tutaj może być nieco skomplikowana do zastosowania w rutynowym typowaniu alleli HLA, jednakże, jest przydatna w poszukiwaniu "nowych" alleli [14].

Dodatkową, unowocześnioną odmianą technik analizy konformacji DNA, jest tzw. badanie RSCA (ang. *reference stand conformational analysis*), polegające na analizie różnic w ruchliwości fragmentów DNA w elektroforezie kapilarnej na żelu poliakrylamidowym [26]. RSCA jest obecnie rzadziej stosowaną metodą, co spowodowane może być tym, iż szybkość migracji elektroforetycznej dwóch różniących alleli może być zbliżona. [16]

SBT

Kolejną metodą genetyczną badania

antygenów zgodności tkankowej jest sekwencjonowanie DNA (ang. *sequence-based typing*, SBT). W metodzie tej uzyskuje się sekwencję nukleotydów, którą porównujemy z sekwencjami dostępnymi w bazie danych. Metoda ta pozwala na wykrycie nowych, indywidualnych alleli antygenów HLA i uzyskanie wyników o wysokiej rozdzielczości, pożądanych w transplantologii zwłaszcza szpiku kostnego [18]. Przykładowo badanie to można przeprowadzić metodą Sangera, gdzie po izolacji DNA amplifikuje się, w celu identyfikacji HLA klasy I, egzon 2 i 3 chromosomu 6, klasy II egzon 2. Następnie, po oczyszczeniu produktów amplifikacji przeprowadzana jest reakcja PCR, w której używa się znakowanych dideoksynukleotydów, dzięki czemu po elektroforezie kapilarnej i detekcji laserowej poszczególnych dideoksynukleotydów terminujących nici DNA o różnej długości, można określić badaną sekwencję i porównać ją z sekwencją alleli HLA z dostępnymi w bibliotece sekwencji [35].

Zmniejszenie ryzyka odrzucania przeszczepu między dawcą i biorcą zgodnym pod względem HLA sprawia, że ich typowanie jest niezwykle ważne w transplantologii. Typowanie HLA jest również wykorzystywane w diagnostyce chorób powiązanych z HLA. Przykładem może być antygen HLA-B27, którego obecność pomaga w diagnostyce zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa [19].

Zasady doboru dawców do przeszczepu nerek i innych narządów.

Dobór dawcy i biorcy w przypadku przeszczepu narządu powinien w głównej mierze zapobiec odrzuceniu przeszczepionego narządu. Dawcą przeszczepu allogenicznego może być dawca niespokrewniony bądź członek rodziny chorego. Najlepiej, gdy jest on genetycznie zgodny (identyczny) pod względem antygenów HLA, na przykład brat lub siostra (dawca klasyczny), posiadający te same haplotypy (geny) odziedziczone od ojca i matki. Idealną sytuacją jest przeszczepienie od dawcy rodzinnego, w którym dawca i biorca są parą bliźniąt jednojajowych. Dawcą może być również jedno z rodziców lub rodzeństwa chorego, w polowie zgodne genetycznie. W przypadku przeszczepów narządów oczekuje się jak największej zgodności dawcy i biorcy w antygenach HLA klasy I *loci* A, B, i klasy II *loci* DR [2].

Czas przeżycia narządu jest uzależniony od wielu czynników, między innymi od różnic antygenowych między dawcą i biorcą. Z biegiem czasu po przeszczepieniu narząd ulega stopniowemu, przewlekłemu uszkodzeniu. W sytuacji przeszczepu narządu unaczynionego dochodzi do rozpoznania obcych (niezgodnych) antygenów na powierzchni tkanek dawcy. Dochodzi wówczas do reakcji immunologicznej, która może przebiegać jako:

- a) Odrzucanie narządu przeszczepionego przez biorcę,
- b) Odrzucanie narządu przeszczepionego w wyniku obecności w surowicy biorcy preformowanych przeciwciał przeciwko swoistym antygenom obecnych na powierzchni tkanek dawcy

(PRA) [30].

Przeżycie przeszczepu w wypadku transplantacji nerek uzyskanych od żywych spokrewnionych dawców jest najdłuższe, gdy dawca i biorca nie różnią się antygenami HLA. Istnieją jednak sytuacje, w których badanie zgodności HLA nie jest wykonywane, na przykład przy przeszczepianiu niektórych narządów unaczynionych, jak serce czy wątroba. Jest to związane z niską dostępnością dawców, a także z ograniczonym czasem na wykonanie przeszczepu. Niemniej jednak badania wykazują, iż dłuższe przeżycie przeszczepu jest charakterystyczne dla tych przypadków, w których występuje najmniej niezgodności w obrębie alleli HLA. W większości obecnie wykonywanych transplantacji narządów, wykorzystuje się narządy pobrane od osób zmarłych. Sprawia to, że szansa na dobranie biorcy o identycznych allelach HLA co dawca jest znikoma. Do zwiększenia prawdopodobieństwa, iż przypadkowo dobrana para dawca-biorca będą identyczni pod względem HLA, przyczynia się nierównowaga sprzężeń oraz częstsze występowanie niektórych antygenów HLA w danej populacji. Ze względu na ciągle wzrastającą liczbę osób oczekujących na przeszczep, przewyższającą liczbę potencjalnych dawców, stosuje się strategię doboru najbardziej zgodnego biorcy do dawcy. Najbardziej pożądaną sytuacją jest dobór pary o jak najmniejszej liczbie niezgodnych antygenów, a zgodność w zakresie HLA-DR i HLA-B zapewnia najlepsze wyniki transplantacji. Zdarzają się jednak przypadki, w których mimo idealnej

zgodności badanych antygenów HLA dochodzi do odrzucania przeszczepu. W takiej sytuacji pierwszym krokiem jest wykluczenie możliwego błędu typowania. Okazuje się, że kilkanaście procent HLA-identycznych nerek zostaje odrzuconych ze względu na różnice w antygenach HLA, które nie są badane standardowo, np. HLA-DQ, HLA-DP oraz w wyniku niezgodności w obrębie słabych antygenów zgodności tkankowej czy układach antygenów komórek śródbłonka i monocytów [2].

Warunki konieczne do przeszczepienia nerki:

- Zgodność grupowa krwi
- Próba krzyżowa ujemna
- Wybór optymalnego biorcy

W przypadku przeszczepu obligatoryjnego nerki:

- Brak dostępu do dializ
- PRA < 80%
- Biorca > 60 r.ż o ile dawca > 65 r.ż.
- Dawca < 16 r.ż dla biorców z listy

pediatrycznej

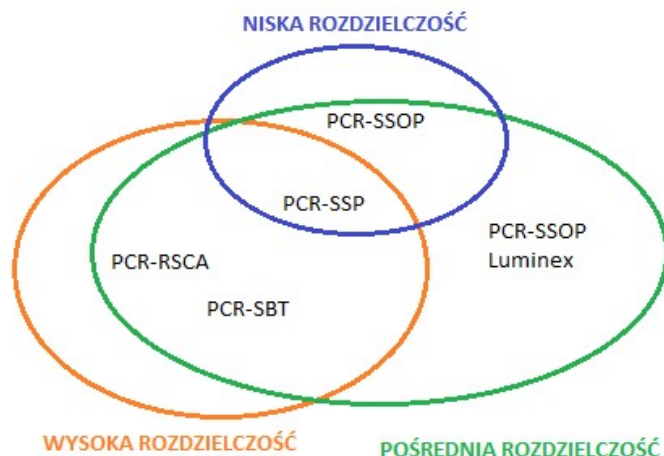
- Biorca przeszczepu wielonarządowego [3]

Warunki konieczne do przeszczepu innych narządów:

- Trzustka: zgodność ABO, ujemna próba krzyżowa, zgodność HLA (A, B, DR)
- Płuca: zgodność ABO, (ujemna próba krzyżowa), zgodność HLA (A, B, DR)
- Serce: zgodność ABO, (ujemna próba krzyżowa)
- Wątroba: zgodność ABO [2].

Próba krzyżowa (ang. cross-match)

Jest to badanie, polegające na przeprowadzeniu reakcji surowic wyselekcjonowanych pacjentów z limfocytami dawcy z wykorzystaniem techniki CDC (cytotoksyczność zależna od dopełniacza). Celem jest sprawdzenie, czy w organizmie potencjalnego biorcy narządu nie krążą preformowane przeciwciała anti-HLA dawcy, które w wyniku związania dopełniacza niosą



Rys.8 Porównanie rozdzielczości niektórych metod.

duże ryzyko ostrego procesu odrzucania. Aby przeprowadzić próbę krzyżową, należy wyizolować limfocyty z materiału tkankowego dawcy, a następnie podzielić je na subpopulacje limfocytów T i B. Obecnie najczęściej do tego celu wykorzystuje się zestaw gotowych przeciwciał monoklonalnych oraz kolumny ze złożem paramagnetycznym. Osoby, u których wykryto dodatnią reakcję cytotoksyczną (C-M dodatni, próba krzyżowa dodatnia) są wykluczane z ostatecznego zestawienia potencjalnych biorców. W metodzie tej, limfocyty dawcy wyizolowane z węzła chłonnego inkubuje się z surowicą potencjalnego biorcy. Wskazówką diagnostyczną, która określa prawdopodobieństwo wystąpienia dodatniej reakcji w teście CDC, jest wartość PRA (ang. *Panel reactive antibodies*). Reakcja limfocytotoksyczna zależna od dopełniacza posiada jednak ograniczoną czułość i subiektywność oceny nasilenia reakcji a także niesie wątpliwości, co do znaczenia klinicznego przeciwciał pozbawionych właściwości cytotoksycznych. Przyczyniło się to do rozwoju innych technik pozbawionych wad testów limfocytotoksycznych, które umożliwiają ocenę immunizacji biorcy przeszczepu. Jedną z nich jest technika FCXM (ang. *Flow cytometric crossmatch*). Jest to próba krzyżowa wykorzystująca cytometrię przepływową do pomiaru nasilenia reakcji pomiędzy antygenami dawcy a przeciwciałami biorcy. W wyniku zajścia reakcji obserwuje się świecenie komórek wiążących znakowane fluorochromem przeciwciała, skierowane przeciwko przeciwciału pochodzącemu

z surowicy pacjenta,. Nasilenie świecenia jest proporcjonalne do ilości związanych danych przeciwciał znakowanych fluorochromem. Technika ta umożliwia nie tylko odróżnianie komórek docelowych, ale również określenie klasy immunoglobulin wykrytych przeciwciał [30].

PRA

Jak wspomniano wyżej, aby doszło do przeszczepu narządu niezbędną jest zgodność w głównych grupach krwi (ABO), jak najmniejsza niezgodność w układzie HLA oraz ujemny wynik próby krzyżowej. Dodatkowo, bardzo ważnym elementem jest też brak u biorcy przeciwciał limfocytotoksycznych PRA, których obecność w zależności od ich miana odpowiednio wydłuża okres oczekiwania na przeszczep, a także zmniejsza jego powodzenie [27]. Przeciwciała te powstają w wyniku ekspozycji potencjalnego biorcy na obce antygeny HLA np. podczas ciąży (gdzie odsetek uczulonych wieloródek wynosi 40%), wcześniejszego przeszczepienia narządów, po transfuzjach krwi (jedna transfuzja jest przyczyną immunizacji 10% chorych, a odsetek ten wzrasta do 50-70% wraz z ilością transfuzji, dlatego też stosuje się preparaty krwi pozbawione masy leukocytarnej) [27]. Do powstawania tych przeciwciał przyczyniać się mogą też uogólnione infekcje bakteryjne czy wirusowe oraz szczepienia ochronne, mogące nasilać wytwarzanie alloprzeciwciał [22]. U części chorych, wraz z upływem czasu, reaktywność przeciwciał zmniejsza się lub nawet zanika, jednak u części z nich, mimo braku

ekspozycji na czynniki immunizujące, synteza przeciwciał utrzymuje się na stałym poziomie [14]. W związku z wysokim ryzykiem odrzucenia przeszczepionego narządu u takich chorych, ważne jest wykrywanie takich osób, co powoduje z jednej strony wydłużenia czasu czekania przez nich na transplantację, ale z drugiej daje im możliwość odczulania i tym samym zmniejszenia ryzyka odrzucenia przeszczepu np. poprzez stosowanie immunoglobuliny ludzkiej (IgG), Rituximabu (przeciwciał anty-CD 20) niszczącego limfocyty B odpowiedzialne z produkcje alloprzeciwciał, czy plazmaferezy [12].

Stopień uczulenia/immunizacji można oceniać *in vitro* w teście mikrocytotoksycznym w panelu zawierającym wyizolowane limfocyty od około 30-50 dawców krwi tak dobranych, by reprezentowali większość antygenów HLA

Bibliografia:

- [1] Alifrangis M., Enosse S., Pearce, R., Drakeley, C., Roper, C., Khalil, I. F. Bygbjerg IC. A simple, high-throughput method to detect Plasmodium falciparum single nucleotide polymorphisms in the dihydrofolate reductase, dihydropteroate synthase, and P. falciparum chloroquine resistance transporter genes using polymerase chain reaction-and enzym. Am J Trop Med Hyg. 2005:155-162.
- [2] Biuletyn informacyjny, Poltransplant 2010; 1.
- [3] Durlik M. Klinger M. Chory dializowany jako biorca przeszczepu. In: Forum Nefrologiczne. Via Medica Medical Publishers, 2010. p. 201-211.
- [4] Remiszewski P. et al. Kwalifikacja chorych do przeszczepu płuc. Polish Pneumology and

w populacji. Obecnie PRA ocenia się przy użyciu cystometrii przepływowej, mówimy wtedy o FlowPRA [13]. W tym celu stosuje się kuleczki opłaszczane antygenami HLA, które są inkubowane z surowicą pacjenta w temperaturze pokojowej. Następnie dodaje się ludzkie immunoglobuliny anty-IgG sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym i ponownie inkubuje, a potem ocenia się w cytometrze przepływowym stopień świecenia, proporcjonalny do miana przeciwciał anty-HLA [22]. Pacjenci, których PRA jest wyższe niż 80%, czyli ich surowica reaguje z ponad 80% wyizolowanych leukocytów dawców, uważa się za wysoko zimmunizowanych, co znacznie wydłuża ich czas oczekiwania na przeszczepienie średnio do 5, a nawet do 18 lat (dane z 2007 roku z Centrum Organizacyjno-Koordinacyjnego ds. Transplantacji Poltransplant z Gozdowskiej).

- Allergology, 2004, 72:9-10: 333-340.
- [5] Bannai M., Tokunaga K., Lin L., Kuwata S., Mazda T., Amaki I., Juji T. Discrimination of human HLA-DRb1 alleles by PCR-SSCP (single-standard conformation polymorphism) method. Int J Immunogenet. 1994:1-9.
- [6] Bogunia-Kubik K (red.): Badania immunogenetyczne w transplantologii i diagnostyce. Wydawnictwo I-BIS S.C., Wrocław 2012: 9-13.
- [7] Colvin-Adams M. et al. Lung and heart allocation in the United States. Am J Transplantation. 2012:3213-3234.
- [8] Dorota Smolarek , Anna Krop-Wątołek , Kazimiera Waśniowska, Marcin Czerwiński . Molecular background of the ABO blood group system.
- [9] Ishida H., Tanabe K., Furusawa M., Ishizuka

- T., Hayashi T., Tokumoto T., Miyamoto N., Shirakawa H., Shimmura H., Shimizu T. TH, Al KLA et, et al. *Immunologia. Tissue Antigens*. 2009;69-72(2):192-198.
- [10] Enevold A., Vestergaard L. S., Lusingu J., Drakeley C. J., Lemnge M. M., Theander T. G. AM. Rapid screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haemoglobin polymorphisms in Africa by a simple high-throughput SSOP-ELISA method. *Malar J*. 2005.
- [11] Heinemann F. M. HLA genotyping and antibody characterization using the LuminexTM multiplex technology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2009, 36(4), 273-278.
- [12] Durlik M. Management of highly sensitized patients — deceased donor. *Ann. Transplant*. 2006; 2: 32-34.
- [13] Ishida H., Tanabe K., Furusawa M., Ishizuka T., Hayashi T., Tokumoto T., Miyamoto N., Shirakawa H., Shimmura H., Shimizu T. TH. Evaluation of flow cytometric panel reactive antibody in renal transplant recipients - examination of 238 cases of renal transplantation. *Transpl Int*. 2005:163-168.
- [14] Gozdowska J. „Przygotowanie i przeszczepienie nerki u pacjenta wysoko immunizowanego”, *Forum nefrologiczne*, 2008, 1(3), 147-148].
- [15] Nowak J., Fabijańska-Mitek J., *Podstawy immunogenetyki transplantacyjnej*, 2012
- [16] Jakub Gołąb, Marek Jakubisiak, Witold Lasek TS. Receptory limfocytów T wiążące antygen i główny układ zgodności tkankowej. In: *Immunologia*. 6th ed. Warszawa: PWN; 2014:47-62.
- [17] Jakub Gołąb, Marek Jakubisiak, Witold Lasek TS. *Immunologia transplantacyjna*. In: *Immunologia*. 6th ed. Warszawa: PWN; 2014:425-450.
- [18] Rozemuller E.H., Tilanus M.G.J.: *Hum. Immunol*. 1996, 46:27-34.
- [19] Wiland P et al. Can we diagnose ankylosing spondylitis earlier?. *Postępy Nauk Medycznych*, 2012.
- [20] Urtnowski P, et al. Historia, funkcje i struktura głównego układu zgodności tkankowej. *Medycyna Weterynaryjna*, 2013, 69.10.
- [21] PI T. Humoral theory of transplantation. *Am J Transpl*. 2003:665-673.
- [22] Shoenfeld Y. MM. Autoimmunologiczny (autozapalny) zespół indukowany przez adiuwanty-ASIA. *Reumatologia*. 2013:101-107.
- [23] Szaflik J. IJ. Przeszczepy rogówki. *Przew Lek*. 2003;69-72.
- [24] Trachtenberg E. A., Keyeux G., Bernal J., Noble J. A. EHA. Results of Expedicion Humana: II. Analysis of HLA class II alleles in three African American populations from Colombia using the PCR/SSOP: identification of a novel DQB1* 02 (* 0203) allele. *Tissue Antigens*. 1996:192-198.
- [25] Trachtenberg E. A., Keyeux G., Bernal J., Noble J. A. EHA. Results of Expedicion Humana: II. Analysis of HLA class II alleles in three African American populations from Colombia using the PCR/SSOP: identification of a novel DQB1* 02 (* 0203) allele. *Tissue Antigens*. 1996:192-198.
- [26] Turner D. M., et al. HLA-A typing by reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) using a capillary-based semi-automated genetic analyser. *Tissue Antigens*, 1999, 54.4: 400-404.
- [27] Vaughan RW. HLA Typing by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. In *MHC Protocols*. Humana Press. 2003:45-59.
- [28] W. KJS. Leczenie nerkozastępcze w nefropatii cukrzycowej. *Diabetol Klin*. 2003:21-26.
- [29] Wyderka M., Gągałka A. SE. Przeszczep wątroby u dziecka. *Pielęgniarstwo Pol*. 2009:286-294.
- [30] Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G.,

- Debska-Slizień A., Jankowska M.M., Rutkowski B. TP. Diagnostic Value of Specific Anty-HLA Alloantibodies before and after Renal Transplantation. Programs for Highly Sensitized Recipients.; 2009.
- [31] Simpson, E. Function of the MHC. Immunology 1988, 64, 1: 27.
- [32] Amos D, Bashir H, Boyle W, et al. A simple microcytotoxicity test. Transplantation 1969; 7: 220-223
- [33] Teraski PI., Gierston DW. Proposed HLA matching scheme for improved cadaveric kidney allocation. Transplant Proc 1995; 27: 61-63
- [34] Takayuki S. et al. Increased frequency of HLA-DR4 allele in women with unexplained recurrent spontaneous abortions, detected by the method of PCR-SSP, Journal of Reproductive Immunology, 1997, 32, 3, 273
- [35] Santamaria P. et al. HLA class I sequence-based typing. Human immunology, 1993, 37.1: 39-50.
- [36] Khosravinia H., Narasimha Murthy H., Thertha Parasad D., Pirany N., 2007. Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. Afr. J. Biotech. 6, 481-486.
- [37] Bogunia-Kubik K., Lange A. Typowanie antygenów zgodności tkankowej u potencjalnych dawców i biorców przeszczepów komórek hematopoetycznych, Acta Haematologica Polonica, 2000, 31, Nr 2.
- [38] Wawrzynowicz-Syczewska, M. Immunogenetics of liver disease. Postępy Nauk Medycznych. 2000.

Sekcja Badania Bezkręgowców Koła Naukowego Przyrodników - od palmiarni po Arktykę.

Alicja Laska, Sebastian Chmielewski

Sekcja Badania Bezkręgowców Koła Naukowego Przyrodników

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

alicja.m.laska@gmail.com

Praca napisana pod opieką dra hab. Pawła Szymkowiaka

Sekcja Badania Bezkręgowców należy do Koła Naukowego Przyrodników Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Aktywność naukowo-badawcza Sekcji skupia się wokół badań nad taksonomią, ekologią oraz zoogeografią bezkręgowców z wykorzystaniem technik molekularnych. Od 2012 roku jednym z wiodących działań Sekcji jest realizacja projektu badawczego „Palmiarnie w Polsce i Europie jako gorące plamy bioróżnorodności (hot-spots) i ich rola w introdukcji gatunków obcych”. Celem podjętych zadań jest zbadanie różnorodności gatunkowej bezkręgowców zasiedlających wybrane palmiarnie i cieplarnie. Do tej pory zebrano materiał z ośrodków palmiarnianych w Berlinie, Pradze, Poznaniu, Łodzi i Krakowie. Dotychczasowe analizy pozwoliły zaobserwować duże bogactwo gatunkowe fauny bezkręgowcej badanych obiektów, w tym odkrycie taksonów nowych dla nauki oraz gatunków tropikalnych nieznanymi dla danego regionu geograficznego, o czym członkowie Sekcji donoszą w publikowanych na bieżąco artykułach naukowych [Koliccka 2014, 2016; Koliccka i in., 2013, 2015, 2016; Zawierucha i in., 2013]. Pod koniec 2015 roku Sekcja przystąpiła do realizacji projektu dotyczącego zmian sukcesyjnych zachodzących w rewitalizowanym miejskim Rezerwacie Przyrody Żurawiniec w Poznaniu. Celem tego przedsięwzięcia jest odbudowa pierwotnych warunków wodnych oraz przywrócenie charakterystycznego dla rezerwatu zespołu roślinności typowej dla torfowisk przejściowych. Niedawno Sekcja zakończyła projekt badawczy: „Mejofauna zbiorników słodkowodnych fiordu Hornsund (Spitsbergen, Arktyka)”. Badania miały na celu poznanie różnorodności gatunkowej mejofauny siedlisk słodkowodnych fiordu Hornsund, rozmieszczenia gatunków, współwystępowania grup i potencjalnych dróg ich migracji oraz przetestowanie hipotezy zakładającej, że bioróżnorodność i liczebność organizmów wzrasta wraz z odległością od lodowca.

Wstęp

Sekcja Badania Bezkręgowców jest jedną z najstarszych i najprężniej działających grup należących do Koła

Naukowego Przyrodników Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Obecnie liczy ona 20 członków

i sympatyków. Od czasu powstania w 1967 roku jej profil naukowy skupia się wokół taksonomii, ekologii oraz zoogeografii bezkręgowców. Oprócz ścisłej współpracy z Zakładem Taksonomii i Ekologii Zwierząt Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Sekcja współpracuje z innymi krajowymi i zagranicznymi jednostkami naukowymi, np. Instytutem Oceanologii Polskiej Akademii Nauk.

Aktualne projekty badawcze

Jednym z wiodących projektów Sekcji jest badanie bioróżnorodności, ekologii oraz dróg rozprzestrzeniania się wybranych grup bezkręgowców zasiedlających palmiarnie. Te stosunkowo słabo zbadane miejsca są także rozpatrywane pod względem potencjalnej aklimatyzacji gatunków obcego pochodzenia. Obiecujące wyniki badań przeprowadzone w Palmiarni Poznańskiej były impulsem do powstania projektu „Palmiarnie w Polsce i Europie jako gorące plamy bioróżnorodności (hot-spots) i ich rola w introdukcji gatunków obcych”. Projekt dofinansowany był przez m. in. Dziekana Wydziału Biologii UAM oraz ze środków Koła Naukowego Przyrodników UAM. W jego ramach przeprowadzono dotychczas badania w palmiarni w Poznaniu oraz w palmiarniach w Kopenhadze, Pradze, Berlinie, Łodzi i Krakowie. W przyszłości planowana jest inwentaryzacja kolejnych obiektów znajdujących się w Mińsku, Brześciu oraz Gliwicach. Dotychczasowe badania były publikowane w zagranicznych czasopismach naukowych. Dzięki

przeprowadzonej w 2012 roku inwentaryzacji Palmiarni Poznańskiej stwierdzono zaskakująco wysokie zróżnicowanie taksonów fauny bezkręgowcej, w tym: wrotków, płazińców, skąposzczetów, brzuchorzęsek oraz mniej licznych w gatunki widłonogów, roztoczy, wieloszczetów i owadów [Koliczka i in., 2015]. Zwieńczeniem badań w Poznaniu było pierwsze stwierdzenie występowania rozłupnogłowców (*Schizomida*) w Polsce [Zawierucha i in., 2013], a także odkrycie nowego podrodzaju i 12 nowych dla wiedzy gatunków brzuchorzęsków. W Palmiarni Poznańskiej dokonano również pierwszego w Europie Środkowej stwierdzenia chrząszcza z rodzaju *Pycnomerus*. W roku 2013 badania kontynuowano w palmiarni w Kopenhadze, w której stwierdzono m. in. 5 gatunków brzuchorzęsków, w tym jednego nowego dla duńskiej fauny [Koliczka i in., 2013, Koliczka, 2014]. Wyniki uzyskane na podstawie materiału pobranego w palmiarni w Łodzi umożliwiły opisanie brzuchorzęsków zasiedlających bromelie [Koliczka, 2016]. Materiał pobrany w palmiarniach w Pradze oraz Berlinie jest obecnie opracowywany ze szczególnym uwzględnieniem roztoczy, niesporczaków, wijów, owadów, pajaków oraz brzuchorzęsków.

Pod koniec 2015 roku Sekcja Badania Bezkręgowców przystąpiła również do projektu mającego na celu zbadanie zmian zachodzących w rewitalizowanym miejskim Rezerwacie Przyrody Żurawiniec. Rezerwat został utworzony w 1959 roku ze względu na znajdu-

jące się na jego obszarze torfowiska przejściowe o cennych walorach naukowych i dydaktycznych. Powstanie w bezpośredniej okolicy osiedli mieszkalnych przyczyniło się do zmiany stosunków wodnych doprowadzając do zniszczenia jego naturalnego charakteru. W latach 2012-2014 w rezerwacie prowadzono badania geologiczne, których wyniki pozwalają prześledzić oraz odtworzyć przebieg zmian środowiska przyrodniczego w przeszłych epokach. Projekt Rewitalizacji Rezerwatu Przyrody Żurawiniec prowadzony jest we współpracy z licznymi podmiotami, m. in. pracownikami naukowymi Wydziałów Biologii i Geografii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, przedstawicielami władz miasta, dyrekcją Zakładu Lasów Poznańskich oraz Regionalnym Konserwatorem Przyrody w Poznaniu. Zadaniem Sekcji jest śledzenie procesów sukcesji wtórnej fauny bezkręgowej rezerwatu. W tym celu, co 3 miesiące, od listopada 2015 roku, pobierane są próby ściółkowe oraz wodne. Ściółka jest pobierana ramką o objętości 25 cm x 25 cm x 10 cm w 30 wyznaczonych miejscach, a następnie umieszczana w aparacie Tullgrena w celu wypłoszenia fauny. Próby wodne będą pobierane czerpakiem po nawodnieniu, obecnie wyschniętych, zbiorników. Materiał będzie pozyskiwany z dna zbiornika i roślin wodnych. Po czerpakowaniu na miejscu, zostanie on wyłożony na folię i posegregowany w celu znalezienia organizmów wodnych i przeniesienia ich do płynu konserwującego. Zebrane próby będą analizowane pod kątem występowania

takich grup bezkręgowców jak: pająki, owady, ślimaki, roztocze. W dalszym etapie zebrane okazy będą identyfikowane do gatunku. Przewiduje się zmianę poziomu bioróżnorodności na terenie rezerwatu oraz składu obecnej fauny w kierunku obecności taksonów charakterystycznych dla torfowisk przejściowych. Ponadto badania mogą być źródłem informacji o przebiegu zmian zoocenotycznych jakie dokonują się na terenie zurbanizowanym.

Zakończone projekty badawcze

Sekcja zakończyła projekt badawczy: „Mejofauna zbiorników słodkowodnych fiordu Hornsund (Spitsbergen, Arktyka)”. Dotychczasowe badania udowodniły, że region ten, mimo surowego klimatu i krótkiego okresu wegetacyjnego, odznacza się dużą złożonością składu gatunkowego, jak i znacznym zróżnicowaniem rodzajów i wyższych jednostek taksonomicznych na tle pozostałych regionów arktycznych. Jest to młody i słabo przekształcony ekosystem, podatny na antropopresję i zmiany klimatu. Badania miały na celu poznanie różnorodności gatunkowej mejofauny siedlisk słodkowodnych fiordu Hornsund (brzuchorzęsków, niesporczaków, nicieni, wrotków, widłonogów, wioślarek, wieloszczetów, małżoraczków), rozmieszczenia gatunków, współwystępowania grup oraz potencjalnych dróg ich migracji, oraz przetestowanie hipotezy zakładającej, że różnorodność taksonów i liczebność organizmów wzrasta wraz z odległością od lodowca (<http://knp.home.amu.edu.pl/page.php?id=dzialalnosc&s=2>). Pobór materia-

łu został zakończony, obecnie trwa opracowywanie danych.

W 2015 roku członkowie Sekcji Badania Bezkęgowców zajmowali się badaniem mejofauny jezior Czarnogóry i Albanii. Półwysep Bałkański jest uważany za jedno z europejskich centrów endemizmu. Działania Sekcji miały na celu poszerzenie wiedzy o faunie jezior tego terenu oraz poszukiwanie korelacji czynników środowiskowych (zawartości węgla organicznego, twardości wody, stężenia tlenu i azotu, pH) z występowaniem poszczególnych taksonów bezkręgowców wodnych. Analiza mejofauny jezior badanego terenu pozwoliła na pierwsze stwierdzenie obecności zwierząt z grup: *Tardigrada*, *Rotifera*, *Rhabditophora*, *Collembola* i *Gastrotricha*. W próbach ponadto zidentyfikowano następujące taksony: *Polychaeta*, *Ostracoda*, *Acari*, *Copepoda*, *Cladocera*, *Nematoda*, *Gastropoda* i *Amphipoda*.

Bibliografia:

[1] Koliccka M., *Gastrotricha* Mečnikow, 1865 from Copenhagen Palm House - contribution to the knowledge of *Lepidodermella intermedia* Kåanneby, Todaro & Jondelius, 2012 (*Chaetonotida*, *Gastrotricha*); *Zoosystema*; 2014, 36(4), 713-722.

[2] Koliccka M., *Gastrotrichs* in bromeliads - newly recorded *Chaetonotus* (*Hystriochaetonotus*) *furcatus* Kisielewski, 1991 (*Chaetonotida*) from the Łódź Palm House, *Zoosystema*, 2016 (w druku).

[3] Koliccka M. i in., *Gastrotricha* from the Poznań Palm House—one new subgenus and three new species of freshwater *Chaetonotida* (*Gastrotricha*), *Zootaxa*, 2013, 3717(2), 231-

Upowszechnianie wyników

Wyniki prac Sekcji były przedstawione na wielu międzynarodowych i ogólnopolskich konferencjach, m. in. Polar Ecology Conference, II i III Konferencji Młodych Naukowców z okazji Światowego Dnia Wody (II and III Young Scientists Conference, World Water Day), V i VI Studenckiej Konferencji Biologii Ewolucyjnej. Przedstawiane referaty oraz postery cieszą się dużym zainteresowaniem oraz są szeroko dyskutowane.

Sekcja Badania Bezkęgowców angażuje się w popularyzację nauki przez organizowanie warsztatów i pokazów dla młodszych adeptów nauki. Jest to dobra okazja do zdobycia wiedzy z technik mikroskopowania, samodzielnego zbioru bezkręgowców i ich obserwacji. Dotychczasowe zajęcia odbywały się w ramach Nocy Biologów, Festiwalu Nauki i Sztuki oraz Nocy Naukowców.

279.

[4] Koliccka M. i in., Palm house - biodiversity hotspot or risk of invasion? Aquatic invertebrates: The special case of *Monogononta* (*Rotifera*) under greenhouse conditions, *Biologia*, 2015, 70(1), 94-103.

[5] Koliccka M. i in., Hidden invertebrate diversity - phytotelmata in Bromeliaceae from palm houses and florist wholesalers (Poland), *Biologia*, 2016 (w druku).

[6] Zawierucha K. i in., First record of the schizomid *Stenochrus portoricensis* (*Schizomida*: *Hubbardiidae*) in Poland, with DNA barcode data, *Turkish Journal Of Zoology*, 2013, 37, 357-361.

Metody identyfikacji kompleksów gatunków kryptycznych na przykładzie *Aceria tosichella* (wheat curl mite - WCM)

Alicja Laska¹, Krzysztof Ufir², Agnieszka Kiedrowicz¹

¹Zakład Taksonomii i Ekologii Zwierząt, Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

²Zakład Entomologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

alicja.m.laska@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr hab. Anny Skorackiej

Kompleksy gatunków kryptycznych obejmują gatunki nierozróżnialne na podstawie cech morfologicznych, które często są blisko spokrewnione ze sobą [Skoracka i in., 2015].

Szpeciele (*Eriophyoidea*) to roztocze (*Acari*) o ogromnym znaczeniu gospodarczym, ponieważ są obligatoryjnymi pasożytami roślin, także tych szczególnie istotnych dla człowieka (rośliny uprawne). Większość ze znanych gatunków szpecieli cechuje wąska specyficzność żywicielska (pasożytność na jednym gatunku rośliny), które zasiedlają żywicieli należących do różnych gatunków roślin. Przykładem gatunku szpecielea o szerokiej specyficzności żywicielskiej jest *Aceria tosichella*, powszechnie nazywany wheat curl mite (WCM). Szpeciel ten jest pasożytem traw (*Poaceae*) oraz amarylkowatych (*Amaryllidaceae*). Zasiedlanie roślin z dwóch rodzin skłoniło do postawienia hipotezy, że WCM jest kompleksem gatunków kryptycznych o zróżnicowanej specyficzności żywicielskiej [Miller i in., 2013]. Do potwierdzenia powyższej hipotezy użyto metod biologii molekularnej (odcinka mitochondrialnego DNA COI oraz fragmentu D2 28S rDNA), ekologicznych (eksperymentalne testowanie zakresu żywicieli) oraz analiz morfometrycznych w oparciu o cechy ilościowe (PCA i analiza dyskryminacyjna) [Skoracka i in., 2013, 2014].

Wyniki dotychczasowych badań pozwoliły na opisanie dziesięciu odrębnych genetycznie linii w obrębie kompleksu WCM. Istnieją jednak przesłanki, że zróżnicowanie w obrębie kompleksu WCM jest nadal niedokładnie oszacowane i konieczne są dalsze badania mające na celu identyfikację kolejnych linii genetycznych WCM [Skoracka i in., 2015].

Wstęp

Gatunki kryptyczne są to gatunki cech morfologicznych, będące zazwyczaj trudne do rozróżnienia na podstawie cech morfologicznych, będące zazwyczaj blisko ze sobą spokrewnione

[Bickford i in., 2007; Knowlton, 1993]. Identyfikacja gatunków kryptycznych jest szczególnie istotna w przypadku organizmów ważnych z punktu widzenia gospodarki, gdyż różne gatunki mogą wymagać innych strategii ochrony lub kontrolowania ich liczebności. Istnieje wiele przykładów gatunków kryptycznych, np. komary będące wektorami dla zarodźca malarycznego *Plasmodium sp.* [Perkins, 2000] lub pasożytnicze nitnikowce *Gordius sp.* [Hanelt i in., 2015]. Ponadto badania dotyczące zróżnicowania w obrębie gatunków umożliwiają dokładne oszacowanie różnorodności biologicznej na świecie. W niniejszej pracy chcielibyśmy opisać metody stosowane podczas identyfikacji gatunków kryptycznych na przykładzie *Aceria tosichella* (wheat curl mite, WCM). Szpeciele są to jedne z najmniejszych roztoczy, których wielkość wynosi średnio 200 µm [Keifer, 1975; Nalepa, 1887]. Ciało szpecielei ma robakowaty bądź wrzecionowaty kształt i jasną, najczęściej mlecznobiałą barwę. Posiadają dwie pary odnóży, co odróżnia je od innych roztoczy. Szpeciele są pasożytami roślin i całe ich życie związane jest z rośliną żywicielską. Obserwuje się wśród nich duże zróżnicowanie w specjalizacji żywicielskiej. Znane są gatunki, które pasożytują na jednym gatunku rośliny żywicielskiej (zdecydowana większość) oraz takie, które zasiedlają rośliny należące do różnych gatunków, rodzajów i rodzin. WCM jest wektorem groźnych wirusów roślinnych (WMSV, WmoV, TriMV, BrSMV) [Goetz i in., 1995; Hadi i in., 2011; Seifers i in., 1997, 2009;

Slykhuis, 1956] oraz przyczyną bezpośrednich uszkodzeń roślin, dlatego ważne jest dokładne poznanie biologii i strategii życiowej WCM.

Historia kompleksu WCM

Aceria tosichella (wheat curl mite, WCM) została po raz pierwszy znaleziona i opisana na terenie byłej Jugosławii w 1969 r., na liściach pszenicy (*Triticum aestivum L.*). Z powodu jego morfologicznego podobieństwa do pokrewnego gatunku *Aceria tulipae*, opisanego po raz pierwszy w 1938 roku przez Keifera, bywał błędnie oznaczany jako *A. tulipae*. Ostateczne rozróżnienie obu gatunków zostało zaproponowane przez zespół badaczy rosyjskich [Shevtchenko i in., 1970], którzy opisali różnice w biologii i morfologii obu gatunków. Rok przed publikacją Shevtchenko i in. [1970], Keifer opisał gatunek szpecielea występującego na pszenicy jako *A. tosichella* [1969]. Nazwa *A. tritici* nadana przez Shevtchenko uznana została za synonim nazwy gatunkowej *A. tosichella*. Do tej pory występowanie gatunku *Aceria tosichella* zostało potwierdzone na około 90 gatunkach traw [Carew i in., 2009; Connin, 1956, Harvey i in., 2001; Navia i in., 2013; Skoracka i in., 2012; Slykhuis, 1955; Somsen i in., 1970]. Dalsze badania wykazały jednak, że zróżnicowanie ekologiczne i genetyczne w obrębie tego gatunku jest wysokie, a poszczególne linie genetyczne różnią się znacznie specyficznością żywicielską oraz zakresem żywicieli [Carew i in., 2009; Miller i in., 2013; Navia i in., 2013; Schiffer

i in., 2009; Skoracka i in., 2012, 2013, 2014; Szydło i in., 2015].

Identyfikacja linii w obrębie kompleksów gatunków kryptycznych

Badania ekologiczne

Poszczególne linie genetyczne w obrębie kompleksów gatunków kryptycznych mogą znacznie się różnić pod względem biologii i ekologii, np. pod względem niszy ekologicznej lub rozmieszczenia geograficznego [Mayr, 1963]. W przypadku kompleksu WCM badania ekologiczne polegały na eksperymentalnym testowaniu zakresu żywicieli. W trakcie doświadczenia osobniki były przenoszone z żywicieli oryginalnych na nowych, a następnie porównywano poziom ich dostosowania na oryginalnym i nowym żywicielu [Skoracka i in., 2013, 2014]. Ponadto analizowano próby roślin zebranych w terenie. Osobniki WCM znalezione na poszczególnych roślinach żywicielskich były następnie testowane w laboratorium pod kątem zdolności do zasiedlania różnych gatunków roślin [Skoracka i in., 2012, 2013]. Różnice w zdolności do kolonizacji poszczególnych roślin żywicielskich mogą sugerować występowanie odrębnych gatunków w obrębie kompleksu [Skoracka i in., 2013]. W przypadku badań nad kompleksem WCM wykazano różnice w dostosowaniu poszczególnych linii genetycznych. Najszerzy zakres żywicieli wykazała linia MT-1, zasiedlając pszenicę, jęczmień, cebulę, czosnek, perz, rajgras wyniosły oraz stokłosę. Liniami o wąskiej specyficz-

ności żywicielskiej są m.in. MT-5 i MT-7, które osiągają niski fitness na roślinach żywicielskich innych niż oryginalne [Skoracka i in., 2013].

Badania molekularne

Spośród różnych metod badania przynależności taksonomicznej organizmów oraz obecności gatunków kryptycznych, najbardziej jednoznaczne wyniki dają badania z dziedziny biologii molekularnej [Hebert i in., 2003, Sonnenberg i in., 2007]. Analizy przeprowadza się porównując różne fragmenty DNA, tzw. specyficzne markery molekularne. Najistotniejszą ich cechą jest posiadanie odpowiedniej liczby występujących polimorfizmów, co pozwala na wykrycie różnic pomiędzy populacjami, liniami genetycznymi lub gatunkami [Magalhães i in., 2007]. Do badań nad WCM użyto fragmentów mitochondrialnego DNA (COI i 16S) oraz jądrowego DNA (region D2 28S rDNA, ITS1, ITS2, ANT) [Miller i in., 2013; Skoracka i in., 2013]. Uzyskane wyniki umożliwiły identyfikację odrębnych linii genetycznych w obrębie kompleksu WCM, a odległości genetyczne między niektórymi liniami odpowiadały odległościom międzygatunkowym [Skoracka i in., 2013].

Badania morfologiczne

Gatunki kryptyczne mogą różnić się nieznacznie pod względem morfologii. Subtelne różnice są bardzo trudne do wykrycia bez przeprowadzenia kom-

pleksowych analiz morfometrycznych. W wielu przypadkach dopiero duże serie pomiarów i ich weryfikacja statystyczna pozwalają je zauważyć.

Badania morfologiczne w obrębie kompleksu WCM polegały na pomiarach cech istotnych diagnostycznie u kilkudziesięciu osobników z poszczególnych populacji. Do porównywania morfologii użyto analizy składowych głównych (PCA) oraz analizy dyskryminacyjnej (LDA) w oparciu o cechy ilościowe. W pierwszej kolejności wykonano analizy PCA w celu sprawdzenia, czy pomiędzy populacjami zasiedlającymi różnych żywicieli istnieją nieciągłości. Następnie wyodrębnione linie genetyczne na podstawie mtDNA COI analizowano przy użyciu LDA. Analiza ta dowiodła, że *A. tulipae*, gatunek blisko spokrewniony z WCM (będący częścią kompleksu WCM) wykazuje znaczne różnice morfologiczne w obrębie badanych cech i został na ich podstawie jednoznacznie rozróżniony od reszty kompleksu WCM. Analizy PCA i LDA nie wykazały różnic pomiędzy populacjami zasiedlającymi pozostałych żywicieli oraz liniami genetycznymi kompleksu WCM [Skoracka i in., 2012].

Podsumowanie

Badania nad obecnością gatunków kryptycznych powinny być komplekso-

we i wieloetapowe. Zintegrowane metody z zakresu ekologii, biologii molekularnej oraz morfologii pozwalają jednoznacznie wykazać zróżnicowanie w obrębie danego kompleksu oraz wyodrębnić oddzielne linie genetyczne. Zastosowanie opisanych powyżej metod pozwoliło na wydzielenie dziesięciu linii genetycznych w obrębie WCM, które były nierozróżnialne na podstawie obserwacji morfologicznych prowadzonych przy użyciu mikroskopu stereoskopowego [Skoracka i in., 2012; Szydło i in., 2015]. Przeprowadzone badania dowodzą, że liczba kryptycznych linii w obrębie kompleksu może być niedoszacowana i jest ona ściśle skorelowana z podjętym wysiłkiem badawczym wyrażonym np. liczbą przebadanych prób [Skoracka i in., 2015]. Dalsze badania mogą umożliwić zidentyfikowanie większej liczby linii genetycznych wchodzących w skład kompleksu WCM. Badania nad zróżnicowaniem kompleksu WCM są bardzo ważne, gdyż poszczególne linie genetyczne mogą wymagać odmiennych strategii ochrony roślin. Obecnie badania te są priorytetowym celem badaczy zajmujących się kompleksem WCM.

Bibliografia:

- [1] Bickford D., i in., Cryptic species as a window on diversity and conservation, *Trends Ecol Evol*, 2007, 22, 148-155, doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
[2] Carew M. i in., Molecular markers

- indicate that the wheat curl mite *Aceria tosichella* Kiefer may complex in Australia, *Bull Entomol Res*, 2009, 5, 479-486.
[3] Connin R. V., The host range of the wheat curl mite, vector of wheat streak

- mosaic, *J. Econ Entomol*, 1956, 49, 1-4.
- [4] Goetz R., i in., The complete nucleotide-sequence and genomic organization of the mite-transmitted brome streak mosaic rymovirus in comparison with those of potyviruses, *J Gen Virol*, 1995, 76, 2035-2042.
- [5] Hadi B. i in., Wheat streak mosaic virus on wheat: biology and management, *J Integ Pest Manage*, 2011, 2, J1-J5.
- [6] Hanelt B. i in., Cryptic species of hairworm parasites revealed by molecular data and crowdsourcing of specimen collections, *Mol Phylogenet Evol*, 2015, doi: 10.1016/j.ympev.2014.09.010.
- [7] Harvey, T. L., i in., Host range differences between two strains of wheat curl mites (Acari: Eriophyidae), *J Agr Urban Entomol*, 2001, 18, 35-41.
- [8] Hebert P. D. i in., Biological identifications through DNA barcodes, *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512), 313-321.
- [9] Keifer H. H., Eriophyid studies I. *Bulletin of the Department of Agriculture State of California*, 1938, 27, 181-206.
- [10] Keifer H. H., Eriophyid Studies C-3, (Special publication) Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1969.
- [11] Keifer H. H., Eriophyoidea Nalepa, W. L. R. Jeppson, H. H. Keifer, E. W. Baker (red.), *Mites injurious to economic plants*, University of California Press, 1975, 327-396.
- [12] Knowlton N, Sibling species in the sea, *Annu Rev Ecol Evol Syst* , 1993, 24, 189-216, doi:10.1146/annurev.es.24.110193.001201.
- [13] Magalhães S. i in., Host race formation in the Acari, *Exp Appl Acarol*, 2007, 42(4), 225-38.
- [14] Miller A. D. i in., Phylogenetic analyses reveal extensive cryptic speciation and host specialization in an economically important mite taxon, *Mol Phylogenet Evol* , 2013, 66(3), 928-940.
- [15] Navia, D., i in., The wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops, *Exp Appl Acarol*, 2013, 59, 95-143, doi: 10.1007/s10493-012-9633-y.
- [16] Nalepa A., *Die Anatomie der Phytophen*, Sitz kais Akad Wiss, Math-natur Kl Wien, 1887, 96(4), 115-165.
- [17] Perkins S., Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* , 2000, 267(1459), 2345-2350, doi: 10.1098/rspb.2000.1290.
- [18] Populations, species, and evolution: an abridgment of *Animal species and evolution*, E. Mayr, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge&London, 1963, str. 21-37.
- [19] Schiffer M. i in., The distribution of wheat curl mite (*Aceria tosichella*) lineages in Australia and their potential to transmit wheat streak mosaic virus, *An Appl Biol*, 2009, 155, 371-379.
- [20] Seifers D.L. i in., Identification of the wheat curl mite as the vector of the high plains virus of corn and wheat, *Plant Dis*, 1997, 81, 1161-1166.
- [21] Seifers D. L. i in., Identification of the wheat curl mite as the vector of *Triticum mosaic virus*. *Plant Disease*, 2009, 93, 25-29.
- [22] Shevtchenko V. G. i in., Taxonomic separation of similar species of eriophyid mites, *Aceria tulipae* Keif. and *A. tritici* sp. n. (Acarina, Eriophyoidea)- vectors of the viruses of onions and wheat, *Zool Zhur*, 1970, 49, 224-235.
- [23] Skoracka A. i in., Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari, Eriophyoidea) revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data, *Invertebrate Systematics*, 2012, 26, 417-433.
- [24] Skoracka A. i in., The wheat curl mite *Aceria tosichella* (Acari: Eriophyoidea) is a complex of cryptic lineages with divergent host ranges: evidence from molecular and plant bioassay data, *Bot J Linn Soc* , 2013, 109, 165-180.
- [25] Skoracka A. i in., Global spread of wheat curl mite by its most polyphagous and pestiferous lineages, *An Appl Biol*, 2014, 165(2), 222-235.
- [26] Skoracka A. i in., Cryptic speciation in the Acari: a function of species lifestyles or our ability to separate species?, *Exp Appl Acarol*, 2015, 67(2), 165-182.
- [27] Slykhuis, J.T., *Aceria tulipae* Keifer (Acarina, eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic, *Phytopathology*, 1955, 45, 116-128.
- [28] Slykhuis, J.T., Wheat spot mosaic,

caused by a mite transmitted virus associated with wheat streak mosaic, *Phytopathology*, 1956, 46, 682-687.

[29] Somsen, H.W. i in., The wheat curl mite, *Aceria tulipae* Keifer, in relation to epidemiology and control of wheat streak mosaic, Research Publication 162. Agricultural Experiment Station, Kansas State University of Agriculture and Applied Science Manhattan, 1970, 1-24.

[30] Sonnenberg R. i in., An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification, *Front Zool*, 2007, doi:10.1186/1742-9994-4-6.

[31] Szydło W. i in., Exceptionally High Levels of Genetic Diversity in Wheat Curl Mite (*Acari: Eriophyidae*) Populations from Turkey, *J. Econ. Entomol*, 2015, 108(4), 2030-2039.

Phaeodactylum tricornutum jako organizm modelowy

Wiktor Tokarek, Stanisław Listwan

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

wiktor.tokarek@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dra hab. Dariusza Latowskiego

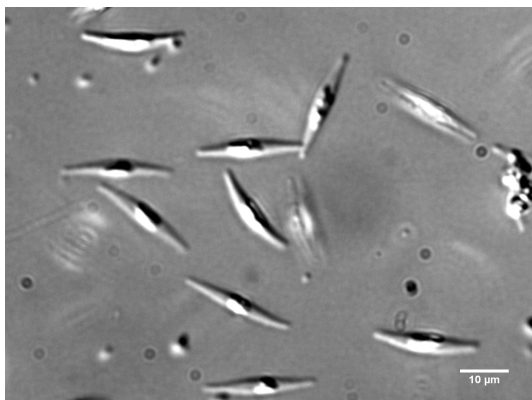
***Phaeodactylum tricornutum* jest gatunkiem morskiej okrzemki, występującym w wodach przybrzeżnych rozciągającym się od Niemiec w Europie po Nową Szkocję w Ameryce Północnej. Cechą charakterystyczną tego gatunku jest słabe wysycenie krzemionkowego pancerzyka, przez co okrzemki te mogą rosnąć przy niedoborach krzemu w środowisku. *P. tricornutum* może występować w trzech formach morfologicznych - wrzecionowatej, owalnej i trójramiennej, w zależności od warunków środowiskowych. Gatunek ten jest łatwy w hodowli w warunkach laboratoryjnych. Ponadto, jego genom został zsekwencjonowany. Wypracowano protokoły transformacji i wyciszania genów *P. tricornutum*. Wszystko to sprawiło, że gatunek ten znalazł zastosowanie jako organizm modelowy. Jest on szeroko wykorzystywany w badaniach biochemicznych, ekologicznych i genetycznych. Brak obligatoryjnego zapotrzebowania na krzem sprawia, że jest on obiecującym celem badań nanobiochemicznych, dążących do opisanego procesu tworzenia krzemionkowego pancerzyka. *P. tricornutum* zawiera w dużych ilościach barwnik - fukoksantynę, dla której udowodniono działanie przeciwnowotworowe. Ponadto gatunek ten akumuluje wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Z tych powodów jest on interesującym obiektem badań farmaceutycznych. Akumulacja tłuszczowców sprawia, że organizm ten może być wykorzystany do produkcji biopaliwa.**

Wstęp

Okrzemki są jednokomórkowymi organizmami eukariotycznymi zdolnymi do prowadzenia fotosyntezy. Powstały one na drodze wtórnej endosymbiozy pomiędzy fotosyntetycznym eukariontem (krasnorostem), a heterotroficznym eukariontem [1]. Obecnie ta grupa organizmów jest odpowiedzialna za około 40% pierwotnej produkcji morskiej biomasy i około 20% całkowitej pro-

dukcji pierwotnej [2,3]. Okrzemki stanowią też bardzo ważne ogniwo w globalnym obiegu krzemu [4]. Organizmy te są też źródłem biologicznie aktywnych substancji, takich jak karotenoidy czy wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT), wykazujących działanie prozdrowotne [5]. *Phaeodactylum tricornutum* jest przedstawicielem okrzemek z grupy wydłużonych (*Pen-*

natae), bardzo szeroko wykorzystywanym w różnych dziedzinach nauki, takich jak biochemia [6] czy biologia molekularna [7,8]. Organizm ten jest powszechnie uważany za gatunek modelowy [9]. Niniejsza praca przedstawia najważniejsze zagadnienia dotyczące biologii tego gatunku i prezentuje jego wybrane zastosowania.



Ryc. 1. Komórki *P. tricornutum* (forma wrzecionowata; fot. dr Weronika Krzeszowiec-Jeleń).

Formy morfologiczne *P. tricornutum*

Do chwili obecnej zaobserwowano i opisano cztery różne formy morfologiczne gatunku *P. tricornutum*: wrzecionowatą, owalną, trójramienną oraz, opisaną ostatnio, formę krzyżową [10,11]. Niektórzy autorzy wyróżniają również formę kulistą [10]. Różnorodność form morfologicznych okrzemki *P. tricornutum* wydaje się być spowodowana bardzo szczególną budową ściany komórkowej, której wysycenie krzemem jest bardzo niewielkie w porównaniu do innych okrzemek [10]. Wydaje się, że występowanie określonych morfotypów *P. tricornutum* jest

słabo związane z genomem [10].

Formie wrzecionowatej wraz z formą owalną poświęcano jak dotąd najwięcej uwagi w stosunku do pozostałych form morfologicznych [12]. Sugeruje się, że wynika to z łatwości utrzymania wymienionych form morfologicznych w hodowli [10]. Uważa się, że wykształcenie formy owalnej jest odpowiedzią na stres środowiskowy [13].

Forma trójramienna występuje stosunkowo rzadko, co jest prawdopodobną przyczyną, dla której temu morfotypowi poświęcono niewiele czasu w badaniach nad *P. tricornutum* [10,12]. Utrzymanie tego morfotypu w hodowli należy do zadań trudnych, a niektórzy badacze sugerują wręcz, że jest to forma nietypowa w cyklu życiowym *P. tricornutum* [14]. Pomimo trudności w utrzymaniu opisywanej formy morfologicznej w hodowli, jest ona często obserwowana w próbkach pobranych bezpośrednio z akwenów [10,12].

Forma krzyżowa została opisana dopiero w 2014 roku. Występowanie omawianej formy morfologicznej wydaje się być ściśle zależne od temperatury hodowli, a najwyższy odsetek formy krzyżowej uzyskuje się w przypadku hodowli w niskiej temperaturze. Autorzy odkrycia sugerują, że poza niezwykłym kształtem, morfotyp krzyżowy może charakteryzować się odmienną zawartością kwasów tłuszczowych. Poszerzenie wiedzy na ten temat może być kluczowe dla przyszłej produkcji biopaliw, w której można wykorzystać okrzemki *P. tricornutum*.

nutum [11].

Analiza i modyfikacje genomu *P. tricornutum*

Genom *P. tricornutum* został zsekwencjonowany w roku 2008. Składa się on z 27,4 milionów par zasad i zawiera 10402 przewidywanych genów, natomiast na jeden gen przypada średnio 0,79 intronu [15]. *P. tricornutum* dzieli 57% genów z *Thalassiosira pseudonana*, pierwszym organizmem z grupy okrzemek, którego genom został zsekwencjonowany [15,16]. Aż 784 przewidywanych genów *P. tricornutum*, co stanowi 7,5% genomu, jest pochodzenia bakteryjnego i znalazło się w genomie tej okrzemki na zasadzie horyzontalnego transferu genów. Geny te nie pochodzą z konkretnego źródła, lecz od wielu organizmów, wliczając w to przedstawicieli sinic, proteobakterii i archeonów [15]. Genom chloroplastów *P. tricornutum* nie zawiera tylu genów co genomy krasnorostów (z których to najprawdopodobniej się wywodzą [1]), co świadczy o transferze dużej liczby genów chloroplastowych do jądra gospodarza po zajściu wtórnej endosymbiozy [15]. Sekwencja genomowa jest dostępna na stronie <http://genome.jgipsf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>.

De Martino i wsp. zanalizowali różnice genetyczne pomiędzy różnymi szczepami *P. tricornutum* [10]. Ich analiza oparta o sekwencje ITS2 (ang. internal transcribed spacer 2) wykazała istnienie czterech genotypów *P. tricornutum*, oznaczonych jako A, B, C i D.

Sekwencje ITS2 cechowały się wysokim podobieństwem między wszystkimi analizowanymi szczepami. Wykazano istnienie polimorfizmów tylko w pięciu pozycjach nukleotydowych i na tej podstawie wydzielono cztery genotypy. Ponadto sekwencje ITS2 wszystkich szczepów *P. tricornutum* bardzo różniły się od tych sekwencji w innych gatunkach okrzemek. Pozwoliło to na wypracowanie testu wykrywającego obecność *P. tricornutum* w próbkach pobranych ze środowiska, opartego o specyficzne startery i reakcję PCR [10]. Wykorzystanie metody qRT-PCR do badania biologii *P. tricornutum*, wraz z opisem odpowiednich kontroli wewnętrznych (geny konstytutywnie ekspresjonowane, takie jak 18S rRNA czy histon H4) oraz wektorów zostało podsumowane przez Siaut i wsp. [17].

Możliwość przeprowadzenia transformacji i modyfikowania genomu tego modelowego organizmu od zawsze pasjonowała badaczy. Pierwszej stabilnej transformacji *P. tricornutum* dokonano w 1996 roku (czyli długo przed tym zanim genom został zsekwencjonowany), kiedy to Apt i wsp. wprowadzili do genomu tego organizmu gen *sh ble* kodujący białko zapewniające oporność stransformowanych okrzemek na antybiotyki zeocynę i fleomycynę [18]. W celu wprowadzenia genów do komórek wykorzystano metodę biolistyczną (z wykorzystaniem działa genowego). Na każde 108 komórek uzyskano 10-100 stransformowanych kolonii. Integracja genu *sh ble* była stabilna nawet po 50 podziałach ko-

mórkowych. Inna grupa badawcza wykazała, że optymalizacja wykorzystywanych kodonów odgrywa istotną rolę w wydajności ekspresji genów reporterowych w transformowanych komórkach *P. tricornutum* [19].

Najczęściej wykorzystywaną metodą transformacji komórek *P. tricornutum* jest metoda biolistyczna [17-23], a w ostatnich latach wypracowano metody transformacji tego gatunku oparte o metodę elektroporacji, uzyskując w ten sposób wydajność 1000 transformowanych kolonii na 108 komórek [24]. Zastosowanie metody pulsowej elektroporacji pozwoliło na podniesienie wydajności transformacji do 4500 na 108 komórek [25], jednak ta metoda wymaga zastosowania specjalistycznego sprzętu. Poprawa warunków transformacji przy zastosowaniu standardowego sprzętu pozwoliło na uzyskanie wydajności transformacji wynoszącej 2800 transformowanych kolonii na 108 komórek [26].

Rozwinięciu ulegają także metody wyciszenia genów *P. tricornutum*. Dotychczas udało się doprowadzić do wyciszenia genów białka reporterowego β -glukuronidazy [27], deepoksydazy wiolaksantyny [28] i pirofosforylasy UDP-glukozy [29].

Wykorzystanie *P. tricornutum* do produkcji monoklonalnych przeciwciał i antygenów

Postępy w badaniach molekularnych *P. tricornutum* doprowadziły do wyko-

rzystania tego organizmu jako systemu ekspresyjnego ludzkich białek. Hempel i wsp. wykorzystali *P. tricornutum* do ekspresji ludzkiego przeciwciała przeciwko białku powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B oraz odpowiedniego przeciwciała (HBsAg) [30]. Użyli oni indukowanego systemu opartego o promotor reduktazy azotanu(V). Do przeciwciał dołączono sygnał lokalizacji w retikulum endoplazmatycznym. Przeciwciała ulegające ekspresji w systemie okrzemkowym były w pełni funkcjonalne w testach *in vitro*, glikozylowane i po dwudniowej indukcji stanowiły ok. 9% całkowitej puli rozpuszczalnych białek [30]. HBsAg także wykazywał pełną funkcjonalność *in vitro* i akumulował się w komórkach *P. tricornutum* w ilości odpowiadającej 0,7% całkowitego rozpuszczalnego białka [30]. Ponadto, ludzkie przeciwciała produkowane w komórkach *P. tricornutum* mogą być wydzielane do medium hodowlanego i osiągnąć stężenie 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (przy braku sygnału lokalizacji do retikulum endoplazmatycznego) [31]. Ten sposób ekspresji może drastycznie obniżyć koszty oczyszczania produkowanych przeciwciał, jako że *P. tricornutum* nie wydziela innych białek [31]. Podkreśla to rolę tego gatunku jako obiecującego systemu ekspresji ludzkich białek [30]. Produkowane w ten sposób przeciwciała monoklonalne są homogeniczne pod względem części C-końcowej (nie dochodzi do proteolizy) i glikozylowane na N-końcu [32]. Jednakże optymalizacja produkcji przeciwciał w systemie okrzemkowym wymaga pełniejszego zrozumienia ścieżek gli-

kozytacji w komórkach tego gatunku okrzemek [32].

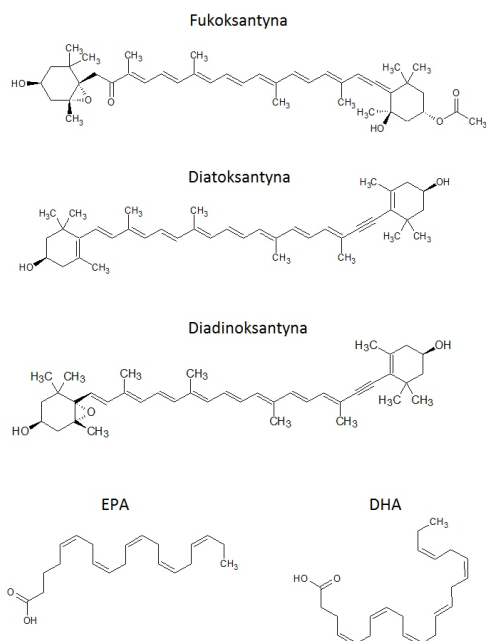
***P. tricornutum* a produkcja biopaliwa**

Glony, do których należą okrzemki, są cennym źródłem biopaliwa. Sugeruje się, że w przyszłości biopaliwo produkowane przez glony może zastąpić paliwa kopalne, jako że cechują się one największą produktywnością spośród organizmów wykorzystywanych do produkcji biopaliwa [33]. Okrzemki posiadają szereg cech czyniących z nich doskonałych producentów biopaliwa. Cechy te to zdolność do przystosowania się do różnych warunków środowiskowych, wysoka produktywność oraz akumulacja dużych ilości li-

pidów, co zostało niedawno podsumowane przez Hildebranda i wsp. [34].

P. tricornutum jest gatunkiem wykorzystywanym w badaniach przydatności okrzemek do produkcji biopaliw. Zawartość lipidów w komórkach tego gatunku sięga 20-30% [33], przy czym może być zwiększona poprzez modyfikacje warunków hodowlanych. Wykazano, że produkcja lipidów przez *P. tricornutum* wzrasta w warunkach niedoboru azotu (maksymalnie 2,4-krotnie) [35,36]. Takie warunki hodowlane powodują także spadek ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na korzyść nasyconych i jednonienasyconych [36]. Ponadto, niedobór krzemu także wpływa na skład kwasów tłuszczowych [37].

Innym sposobem podniesienia znaczenia *P. tricornutum* jako źródła biopaliwa są manipulacje genetyczne. Biopaliwo odznacza się lepszymi właściwościami, gdy jest złożone ze znaczącej ilości krótkich nasyconych kwasów tłuszczowych [38]. Natomiast *P. tricornutum* zawiera bardzo dużo wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [6]. Z tego powodu wypracowano metody genetycznych manipulacji, mających na celu podniesienie zawartości krótkich, nasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach tego gatunku. Transgeniczna ekspresja dwóch tioesteraz specyficznych względem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w komórkach *P. tricornutum* koreluje ze zwiększoną akumulacją kwasów laurynowego i mirystynowego [21]. Z kolei nadekspresja dehydrogenazy kwasu jabłkowego prowadzi do



Ryc. 2. Struktury chemiczne wybranych bioaktywnych związków występujących w *P. tricornutum* (wykonane w programie ChemSketch).

2,5-krotnego zwiększenia zawartości lipidów w komórkach *P. tricornutum* [39]. Inne podejście, polegające na edytowaniu genów odpowiedzialnych za biosyntezę lipidów przy użyciu meganukleaz i nukleaz TALEN spowodowało 45-krotne podniesienie stężenia triacylogliceroli w porównaniu z wyjściowym szczepem *P. tricornutum* [40].

Zastosowanie *P. tricornutum* do produkcji biopaliwa na dużą skalę wymaga znaczącej optymalizacji warunków hodowli. Ciekawym podejściem jest to wypracowane przez Zaslavskają i wsp [20]. Dzięki transformowaniu *P. tricornutum* dwoma genami kodującymi transportery glukozy (*glut1* i *hup1*) udało się uzyskać szczep zdolny do wzrostu heterotroficznego, odżywiającego się glukozą pod nieobecność światła. Pozwala to na wykorzystanie technik fermentacyjnych do kultury *P. tricornutum* na szeroką skalę [20].

Produkty metabolizmu *P. tricornutum* jako farmaceutyki

Już w 1992 roku zaobserwowano, że wodne ekstrakty *P. tricornutum* działają spowalniająco na ośrodkowy układ nerwowy [41]. Od tego czasu zidentyfikowano szereg związków występujących w tym organizmie o bioaktywnych właściwościach.

Fukoksantyna jest dominującym barwnikiem ksantofilowym u okrzemek z gatunku *P. tricornutum* [42]. Od czasu jej odkrycia fukoksantynie przypisuje się coraz więcej prozdrowotnych właściwości, których rozpiętość jest za-

skakująco duża. Najprawdopodobniej właśnie doniesienia o dobroczynnym wpływie fukoksantyny na organizm spowodowały, że została ona wprowadzona do obrotu handlowego jako suplement diety. Poniżej zostały przedstawione wybrane własności opisywanego barwnika.

Fukoksantyna wykazuje (przynajmniej na modelu zwierzęcym) działanie ograniczające przyrost masy białej tkanki tłuszczowej. Uważa się że dzieje się tak dzięki ekspresji białka UCP1 (ang. uncoupling protein-1) w adipocytach białej tkanki tłuszczowej [43]. Wykazano również, że fukoksantyna obniża poziom glukozy we krwi. Ponadto sugeruje się, że obniżenie poziomu glukozy może być skutkiem zmniejszenia ekspresji białka MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1), a zwiększenia ekspresji GLUT-4 (ang. glucose transporter type 4) oraz Adrb3 (ang. adrenoreceptor β 3) [44].

Opisywany barwnik ma również własności przeciwzapalne, co wykazano na modelu komórkowym, wykorzystując makrofagi stymulowane lipopolisacharydem (LPS). Hodowane komórki, którym podano fukoksantynę, wykazywały niższą nawet o 80% produkcję tlenku azotu (będącego mediatorem stanu zapalnego) niż komórki stymulowane, a nietraktowane fukoksantyną. Ponadto wykazano, że fukoksantyna dodana do medium hodowlanego znacząco obniżyła ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX) oraz indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) [45]. Z wykorzystaniem tych samych makrofagów (RAW 264.7) udowodniono,

że dodatek fukoksantyny do medium hodowlanego znacznie obniża ekspresję cytokin prozapalnych w komórkach [46].

Duże nadzieje budzą własności przeciwnowotworowe fukoksantyny, które wykazano na wielu liniach komórkowych. Dostyc długą listę linii komórkowych wraz z konkretnymi białkami, na które fukoksantyna oddziałuje, oraz listę nowotworów na których fukoksantynę testowano *in vivo* można znaleźć w pracy Koji Mikami i Masashi Hosokawa [47].

Diatoksantyna to inny ksantofil okrzemek. Powstaje on pod wpływem silnego światła, jako produkt deepoksydacji diadinoksantyny w jednym z cykli ksantofilowych zwanym cyklem diadinoksantynowym, występującym u okrzemek z gatunku *P. tricornutum* [48]. Wykorzystując model komórkowy (linia mysich makrofagów RAW264.7) wykazano, że diatoksantyna podana do pożywki hodowlanej komórek, zmniejszyła w sposób istotny ekspresję cytokin prozapalnych w komórkach, które były inkubowane z LPS [49]. Powyższe odkrycie otwiera drogę do prób zastosowania diatoksantyny jako leku przeciwzapalnego.

Innym ksantofilem występującym w *P. tricornutum*, oprócz dwóch wspomnianych, jest diadinoksantyna. Jest ona badana jako składnik kremów do opalania, z powodu jej zdolności do efektywnego filtrowania promieniowania UV [50].

Inną biologicznie aktywną grupą substancji występującą w *P. tricornutum* są wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT). Związki te są niezbędnymi składnikami diety i są ważne w procesach rozwojowych [51]. Komórki *P. tricornutum* akumulują zwłaszcza kwas eikozapentaenowy (EPA, 20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17, ω -3) w ilości osiągającej 27-40% masy wszystkich lipidów. Co więcej, zawartość tego kwasu może ulec zwiększeniu, w zależności od warunków hodowlanych [6,52]. Z tego powodu gatunek ten jest intensywnie badany jako komercyjne źródło EPA [52,53]. Dzięki optymalizacji procesu produkcji można osiągnąć produktywność wynoszącą 52 mg EPA na litr na dzień [53].

Innym WNKT o działaniu prozdrowotnym jest kwas dokozaheksaenowy (DHA, 22:6 Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19, ω -3). *P. tricornutum* produkuje DHA w śladowych ilościach, osiągających 0,7% lipidów [6]. Zawartość DHA może być znacznie podniesiona przez koekspresję Δ 5- i Δ 6-elongazy. Ponadto, wygenerowany w ten sposób DHA akumulował się pod postacią triacylogliceroli (zamiast galoktolipidów), co ułatwia jego dalszą ekstrakcję z komórek [22].

Zawartość WNKT w komórkach *P. tricornutum* może zostać podniesiona także przez nadekspresję acetylotransferazy diacyloglicerolu typu 2 [54].

Takie manipulacje genetyczne pozwalają na wykorzystanie *P. tricornutum* do produkcji biologicznie aktywnych

kwasów tłuszczowych, nawet takich, które normalnie nie akumulują się w tych komórkach.

***P. tricornutum* w badaniach biomineralizacji krzemu**

P. tricornutum nie wymaga obecności krzemu do wzrostu i funkcjonowania. Z tego powodu jest on idealnym obiektem do badania procesu tworzenia pancerzyka krzemionkowego, który u pozostałych okrzemek zbudowany jest m.in. z nieorganicznej krzemionki, ułożonej w skomplikowane struktury [55]. Łatwość manipulacji genetycznych *P. tricornutum* oraz szeroki zakres dostępnych narzędzi molekularnych pozwoli na badania, mające na celu zrozumienie tego skomplikowanego procesu zachodzącego w okrzemkach [56]. Przykładowo, analiza transkryptomu *P. tricornutum* wykazała, że ekspresja 223 genów te-

go gatunku jest regulowana dostępnością krzemu [57].

Podsumowanie

Phaeodactylum tricornutum jest niezwykłym gatunkiem morskiej okrzemki, odznaczającym się wieloma charakterystycznymi cechami, takimi jak wielość form morfologicznych, fakultatywny brak krzemionkowego pancerzyka, akumulacja dużej ilości lipidów (w tym WNKT) czy występowanie wielu innych bioaktywnych związków. Cechy te sprawiły, że organizm ten jest intensywnie badany i wypracowano bardzo wiele narzędzi służących analizie jego procesów metabolicznych, w tym metody modyfikacji genetycznej. Wszystko to przełożyło się na powszechne uznanie *P. tricornutum* za organizm modelowy o wielu potencjalnych zastosowaniach przemysłowych.

Bibliografia:

[1] Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJ. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*. 2004; 305(5682):354-60.
[2] Falkowski PG, Barber RT, Smetacek VV. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. 1998; 281(5374):200-7.
[3] Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 1998; 281(5374):237-40.
[4] Tréguer P, Nelson DM, Van Bennekom AJ, Demaster DJ, Leynaert A, Quéguiner B. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*. 1995; 268(5209):375-9.
[5] Borowitzka MA. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically

active compounds. *J Appl Phycol*. 1995; 1(7):3-15.
[6] Zhukova N, Aizdaischer NA. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*. 1995; 39(2):351-35.
[7] Bozarth A, Maier UG, Zauner S. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 82(2):195-201.
[8] Ulrike E, Alexandros B, Jürgen B, Claudia B, Gerhard S. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Phycol*. 2016; 1(28):123-129.
[9] Montsant A, Maheswari U, Bowler C, Lopez PJ. Diatomics: toward diatom functional genomics. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005; 5(1):5-14.
[10] De Martino A, Meichenin A, Shi J, Pan

- K, Bowler C. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornerum* (Bacillariophyceae) accessions. *J Phycol.* 2007; 43:992-1009.
- [11] He L, Han X, Yu Z. A rare *Phaeodactylum tricornerum* cruciform morphotype: culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics. *PLoS One.* 2014;9(4):e93922.
- [12] Tesson B, Gaillard C, Martin-Jézéquel V. Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornerum* Bohlin. *Botanica Marina.* 2009; 52:104-116.
- [13] De Martino A, Bartual A, Willis A, Meichenin A, Villazán B, Maheswari U, Bowler C. Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornerum*. *Protist.* 2011; 162(3):462-81.
- [14] Lewin JC, Lewin RA, Philpott DE. Observations on *Phaeodactylum tricornerum*. *J Gen Microbiol.* 1958; 18:418-426.
- [15] Bowler C i wsp. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature.* 2008; 456(7219):239-44.
- [16] Armbrust EV i wsp. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science.* 2004; 306(5693):79-86.
- [17] Siaut M i wsp. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornerum*. *Gene.* 2007; 406(1-2):23-35.
- [18] Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerum*. *Mol Gen Genet.* 1996; 252(5):572-9.
- [19] Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol.* 2000; 36:379-386.
- [20] Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, Ehrhardt D, Grossman AR, Apt KE. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science.* 2001; 292(5524):2073-5.
- [21] Radakovits R, Eduafo PM, Posewitz MC. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornerum*. *Metab Eng.* 2011; 13(1):89-95.
- [22] Hamilton ML, Haslam RP, Napier JA, Sayanova O. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornerum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab Eng.* 2014; 22:3-9.
- [23] Kira N, Ohinishi K, Miyagawa-Yamaguchi A, Kadono T, Adachi M. Nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerum* using PCR-amplified DNA fragments by microparticle bombardment. *Mar Genomics.* 2016; 25:49-56.
- [24] Niu YF i wsp. Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornerum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *BioTechniques Rapid Dispatches.* 2012; 52(6):1-3.
- [25] Miyahara M, Aoi M, Inoue-Kashino N, Kashino Y, Ifuku K. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerum* by multi-pulse electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013; 77(4):874-876.
- [26] Zhang C, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerum* by electroporation. *Mar Genomics.* 2014; 16:63-66.
- [27] De Riso V, Raniello R, maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerum*. *Nucleic Acid Res.* 2009; 37(14).
- [28] Lavaud J, Materna AC, Sturm S, Vuginec S, Kroth PG. Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornerum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. *PLoS One.* 2012; 7(5).
- [29] Zhu BH, Shi HP, Yang GP, Lv NN, Yang M, Pan KH. Silencing UDP-glucose pyrophosphorylase gene in *Phaeodactylum tricornerum* affects carbon allocation. *New Biotechnology.* 2016; 33(1):237-244.
- [30] Hempel F, Lau J, Klingl A, Maier UG. Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornerum*. *PLoS One.* 2011; 6(12).
- [31] Hempel F, Maier UG. An engineered

- diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb Cell Fact.* 2012; 11:126.
- [32] Vanier G, Hempel F, Chan P, Rodamer M, Vaudry D, Maier UG, Lerouge P, Bardor M. Biochemical Characterization of Human Anti-Hepatitis B Monoclonal Antibody Produced in the Microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One.* 2015; 10(10).
- [33] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 2007; 25:294-306.
- [34] Hildebrand M, Davis AK, Smith SR, Traller JC, Abbriano R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels.* 2012; 3(2):221-240.
- [35] Burrows EH i wsp. Dynamics of Lipid Biosynthesis and Redistribution in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Under Nitrate Deprivation. *Bioenerg Res.* 2012; 5:876-885.
- [36] Yang ZK i wsp. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnology for Biofuels.* 2013; 6:67.
- [37] Zhao PP i wsp. Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports.* 2014; 4:3958.
- [38] Stournas S, Lois E, Serdari A. Effects of fatty acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel fuel. *JAOCS.* 1995; 72:433-437.
- [39] Xue J, Niu YF, Huang T, Yang WD, Liu JS, Li HY. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metab Eng.* 2015; 27:1-9.
- [40] Daboussi F i wsp. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 2014; 5:3831.
- [41] Villar R, Laguna MR, Calleja JM, Cadavid I. Effects of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tetriolecta* extracts on the central nervous system. *Planta Med.* 1992; 58:405-409.
- [42] Kim SM, Jung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D, Pan CH. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 166(7):1843-55.
- [43] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332(2):392-7.
- [44] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol Med Rep.* 2009; 2(6):897-902.
- [45] Heo SJ i wsp. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(8-9):2045-51.
- [46] Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH, Jeon YJ. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2010; 649(1-3):369-75.
- [47] Mikami K, Hosokawa M. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(7):13763-81.
- [48] Olaizola M, La Roche J, Kolber Z, Falkowski PG. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res.* 1994; 41(2):357-70.
- [49] Konishi I, Hosokawa M, Sashima T, Maoka T, Miyashita K. Suppressive effects of alloxanthin and diatoxanthin from *Halocynthia roretzi* on LPS-induced expression of pro-inflammatory genes in RAW 264.7 cells. *J Oleo Sci.* 2008; 57(3):181-9.
- [50] Johnsen G, Lysaa PA, Aamodt K. Sunscreen compositions comprising carotenoids. Patent US 8834855 B2, 2014.
- [51] Voigt RG, Jensen CI, Fraley JK, Rozelle JC, Brown FR, Heird WC. Relationship between omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid status during early infancy and neurodevelopmental status at 1 year of age. *J. Hum. Nutr.Diet.* 2000; 15(2):111-120.

- [52] Mirón AS i wsp. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 16:287-297.
- [53] Meiser A, Schmid-Staiger U, Trösch. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *J Appl Phycol*. 2004; 16:215-225.
- [54] Niu YF iwsp. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs*. 2013; 11(11):4558-4569.
- [55] Lopez PJ, Desclés J, Allen AE, Bowler C. Prospects in diatom research. *Curr Opin Biotechnol*. 2005; 16(2):180-186.
- [56] Vartanian M, Desclés J, Quinet M, Douady S, Lopez PJ. Plasticity and robustness of pattern formation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol*. 2009; 182(2):429-42.
- [57] Sapriel G i wsp. Genome-wide transcriptome analyses of silicon metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* reveal the multilevel regulation of silicic acid transporters. *PLoS One*. 2009; 4(10):e7458.

Molekularna diagnostyka chorób wywołanych przez mikroorganizmy na przykładzie sepsy oraz zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*.

Krzysztof Ufir¹, Alicja Laska²

¹Zakład Entomologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński

²Zakład Taksonomii i Ekologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

^{1,2}Koło Naukowe Genetyki Uniwersytetu Jagiellońskiego

krzysztof.ufir@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. n. med. Tomasza Gosiewskiego, Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Według raportu Głównego Inspektora Sanitarnego w 2014 roku w Polsce odnotowano 944 przypadki zachorowań za sepsę i aż 13875 przypadków boreliozy. Obydwie te choroby charakteryzuje bakteriemia, czyli występowanie żywych patogenów bezpośrednio we krwi chorego. W obydwu przypadkach obserwuje się wzrost zachorowań na przestrzeni ostatnich lat. Sepsa, to ogólnoustrojowe zakażenie organizmu mikroorganizmami, wywołane przez bakterie (bakteriemia) lub grzyby (fungemia), wymagające hospitalizacji i często prowadzące do zgonu pacjenta. Borelioza z uwagi na niską wykrywalność może prowadzić do poważnych, nieodwracalnych zmian w układzie kostnowastkowym, naczyniowym jak i nerwowym. Do rutynowej diagnostyki takich zakażeń należą posiewy krwi (sepsa) oraz testy immunologiczne (borelioza). Coraz częściej jednak diagnostyka mikrobiologiczna sięga po narzędzia biologii molekularnej. Opracowuje się testy bazujące na amplifikacji DNA drobnoustrojów w oparciu o metodę PCR. Nie jest to jednak proste zadanie, gdyż wymaga uzyskania wysokiej jakości izolatów oraz pokonania szeregu trudności takich jak obecność inhibitorów czy mała ilość mikroorganizmów w próbce krwi. Metody te są ciągle rozwijane i standaryzowane, a ich rozwój daje nadzieję na szybką i skuteczną diagnostykę, a co za tym idzie terapię ww. chorób.

Wstęp

Borelioza

Czynnikiem etiologicznym boreliozy są krętki *Borrelia spp.* W czasie ich rozwoju, w zależności od etapu cyklu, mogą być pasożytami wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowymi. W związku

z tym wykazują szereg cech predysponujących je do zasiedlania organizmu żywiciela. Są to między innymi silnie skręcony kształt i zdolność do ruchu [Mączka, Tylewska-Wierzbanowska, 2011]. Badania molekularne pozwoliły

stwierdzić, że krętki posiadają jedynie szczątkowy własny metabolizm, co niemal całkowicie uzależnia je od gospodarza [Zajkowska, Pancewicz, 2007]. Cechuje je również niespotykany u innych bakterii polimorfizm antygenów [Witecka- Knysz i in., 2007]. Genom *B. burgdorferi* należy do jednego z najmniejszych wśród dotychczas poznanych. W jego skład wchodzi pojedynczy chromosom, 9 plazmidów liniowych i 12 plazmidów kolistych [Steere, 2001].

Borelioza należy do zoonoz, czyli chorób odzwierzęcych przenoszonych przez wektor. W zależności od miejsca występowania przenoszą ją różne gatunki kleszczy należące do rodzaju *Ixodes* [Liang i in., 2002]. Jej występowanie stwierdzono na całej półkuli północnej.

Jedynym objawem patognomicznym wczesnej fazy boreliozy jest rumień wędrujący. Występuje on u około 80% zakażonych [Steere, 2001] i jest zwiastunem fazy wczesnej miejscowej, w której stwierdza się objawy reumatologiczne, neurologiczne i kardiologiczne [Legatowicz- Koprowska, 2010]. Kolejny etap to faza późna występująca po kilku miesiącach. Może nie być poprzedzona żadnymi objawami [Legatowicz- Koprowska, 2010]. Cechuje się trwałym uszkodzeniem zajętych narządów [Szczeklik, 2010]. Zespół poboreliozowy, który może występować po skutecznym leczeniu charakteryzuje fibromialgia, przewlekłe zmęczenie i zaburzenia pamięci [Legatowicz- Koprowska, 2010].

Sepsa

Posocznica (sepsa) to zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, powstałej w wyniku zakażenia. Jej czynnikiem etiologicznym są bakterie i grzyby lub ich toksyczne metabolity wydzielane do krwi chorego (toksemia). Objawia się zespołem systemowej reakcji zapalnej SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) [Matot, Sprung, 2001] dającej szereg objawów klinicznych, do których należą:

- 1) temperatura ciała powyżej 38°C lub poniżej 36°C,
- 2) częstość akcji serca powyżej 90 uderzeń na min.,
- 3) częstość oddechów powyżej 20/min. lub ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej (pCO₂) poniżej 32mmHg,
- 4) leukocytoza powyżej 12 000/uł lub poniżej 4 000/uł lub obecność więcej niż 10% form niedojrzałych leukocytów. [Bone i in., 1992]

W przebiegu choroby zaobserwowano również nadmierną odpowiedź układu immunologicznego na czynniki wywołujące sepsę. Może ona prowadzić do atakowania przez układ odpornościowy tkanek własnych organizmu [Redl, Schlag, 1991].

W Polsce w latach 2003-2009 zanotowano 4999 przypadków ciężkiej sepsy. Największą śmiertelność na poziomie 56% odnotowano w 2004 roku. Sepsa była powodowana zakażeniami pozaszpitalnymi jak i szpitalnymi [Kubler i in., 2015].

Rutynowa diagnostyka zakażeń

„Złotym standardem” w diagnozowaniu sepsy są posiewy krwi pacjentów, u których stwierdzono SIRS. Ich zaletą jest relatywnie niski koszt oraz prostota wykonania badania z zastosowaniem systemów hodowli automatycznych takich jak na przykład BACTEC™ (BectonDickonson). Niestety czas oczekiwania na wynik wynoszący nawet powyżej 5 dni nie pozwala na odpowiednio wczesne wdrożenie wymaganego leczenia [Gosiewski i in. 2011, Jamal i in., 2005]. Ponadto, pomimo zaistnienia objawów tylko 50% testów metodą posiewu daje pozytywny wynik [Shafazand, Weinacker, 2002].

W przypadku boreliozy za postępowanie rutynowe przyjęto badania serologiczne polegające na wykonaniu testu ELISA (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Do weryfikacji jego dodatniego wyniku stosuje się test metodą Western Blot pozwalający na oznaczenie przeciwciał klas IgM i IgG dla antygenów *B. burgdorferi* [Miąsikiewicz i in., 2011]. Należy pamiętać o tym, iż nie są to metody pozbawione wad. Trudności diagnostyczne wynikają zarówno ze złożonego patomechanizmu tego schorzenia, wielu mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej, jak i zmienności morfologicznej oraz antygenowej krętka [Zajkowska, Pancewicz, 2007].

Diagnostyka molekularna

Tradycyjne, wymienione powyżej me-

tody diagnostyki są coraz częściej zastępowane metodami z dziedziny biologii molekularnej. Testy te wykazują większą czułość, pozwalają również na znaczne skrócenie procesu diagnostycznego, co bezpośrednio może się przełożyć na efektywność procesu leczenia chorego. Znajdują zastosowanie tam, gdzie hodowla drobnoustrojów jest trudna bądź niemożliwa [Budzyńska i in., 2008].

Zarówno DNA jak i RNA każdego organizmu zawierają unikalne dla niego sekwencje, stanowiące swoisty „odcisk palca”. Dzięki znajomości tych sekwencji możliwe jest zastosowanie metod takich jak łańcuchowa reakcja polimerazy (z ang. polymerase chain reaction, PCR) czy fluorescencyjna hybridyzacja *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH) do wykrycia obecności mikroorganizmów we krwi [Gosiewski i in., 2011].

Wykorzystanie krwi jako materiału do badań niesie za sobą pewne ograniczenia. Można wśród nich wymienić między innymi małą liczbę mikroorganizmów występujących w pojedynczej próbce krwi, czy obecność inhibitorów. Kluczowe jest również pozyskanie wysokiej jakości izolatów [Gosiewski i in., 2014, Schrader i in. 2012]. Powyższe trudności mogą być powodem niskiej dostępności testów komercyjnych wykrywających sepsę, takich jak np. SeptiFast (Roche) [Gosiewski in., 2014].

Już w 2004 roku Siondarski wraz ze współpracownikami porównywali sku-

teczność posiewów i metod molekularnych z wykorzystaniem metody PCR do wykrywania drobnoustrojów we krwi pacjentów. Wykorzystując amplifikację sekwencji DNA otrzymali 11,3% pozytywnych wyników, podczas gdy tradycyjne metody hodowlane potwierdziły obecność bakterii zaledwie u 3,8% [Siondarski i in., 2004].

Zhang i współpracownicy zajmowali się detekcją bakterii we krwi pacjentów z martwiczym zapaleniem trzustki. Ich wyniki potwierdziły obecność drobnoustrojów we krwi u 34,6% pacjentów, podczas gdy posiewy dały pozytywny rezultat zaledwie u 4,6 % [Zhang i in., 2011].

Alternatywą dla amplifikacji kwasów nukleinowych może być wykorzystanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Dotychczas była ona jednak wykonywana z zastosowaniem materiału pobranego z hodowli *in vitro*, gdyż wymagała wcześniejszego namnożenia mikroorganizmów [Calderaro i in., 2013].

Gosiewski i współpracownicy wykazali, że jest możliwe zastosowanie techniki FISH z wykorzystaniem próbki krwi pobranej bezpośrednio od pacjenta. Zespół przebadał 71 próbek krwi chorych z klinicznymi objawami sepsy. Stosując metodę FISH uzyskano 29,6 % wyników pozytywnych. Te same próbki przebadano stosując zagnieżdżony multipleksowy PCR (nested multiplex PCR) w czasie rzeczywistym. Umożliwiło to symultaniczną obserwację przyrostu amplifikowanego pro-

duktu w czasie przebiegu reakcji, dzięki zastosowaniu sond i barwników interkalujących z helisą DNA [Higuhi i in., 1993, Gosiewski i in., 2014]. W celu zwiększenia czułości reakcji zastosowano odmianę nested PCR polegającą na wykonaniu dwustopniowej amplifikacji. Podczas pierwszej z nich, przy zastosowaniu starterów zewnętrznych, powielono dłuższe odcinki DNA stanowiące matrycę w drugim etapie, gdzie zastosowano startery o wysokiej specyficzności (startery wewnętrzne). Otrzymano w ten sposób 71,8% wyników pozytywnych. W przypadku testu SeptiFast dodatni rezultat dało 25,3 % badanych próbek.

Próby diagnostyki w oparciu o metody biologii molekularnej prowadzono również w przypadku zakażenia krętkiem *B. burgdorferi*. Santino i współpracownicy stosowali łańcuchową reakcję polimerazy do przebadania 20 próbek surowicy pacjentów z klinicznymi objawami boreliozy. Wyniki PCR okazały się pozytywne w 100% przypadków. Porównano je również z badaniami serologicznymi, które wykazywały zakażenie krętkiem u wszystkich 20 badanych. [Santino i inn., 2008].

Badania nad molekularną diagnostyką boreliozy z wykorzystaniem nested PCR w czasie rzeczywistym u pacjentów zgłaszających wystąpienie rumienia wędrującego przeprowadzili Kondrusik i współpracownicy. Jako materiał do badań wykorzystali krew i mocz 86 pacjentów. Test przeprowadzono w dwóch etapach: przed i po

antybiotykoterapii. Po amplifikacji sekwencji DNA w pierwszym przypadku reakcja dała pozytywny efekt u 73,3% pacjentów. Po przeprowadzonym leczeniu taki efekt uzyskano u 52,3% badanych. W przypadku próbek DNA wyizolowanych z moczu nie stwierdzono wyników pozytywnych [Kondrusik i in., 2007].

Liveris i współpracownicy przeprowadzili PCR w wersji nested oraz pojedynczą amplifikację w czasie rzeczywistym na grupie 64 pacjentów z klinicznym podejrzeniem wystąpienia boreliozy. Zastosowanie obydwu rodzajów reakcji pozwoliło uzyskać pozytywny wynik w 45% prób. Z tej grupy metodą nested zdiagnozowano 65% przypadków, a metodą PCR w czasie rzeczywistym 24% [Liveris i in., 2007].

Bibliografia:

- [1] Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. et al., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992, 101: 1644–1655.
- [2] Budzyńska A., Kaczmarek A., Gospodarek E., Diagnostyka molekularna bakteryjnych zakażeń krwi. *Borgis - Postępy Nauk Medycznych* 2008, 12, 828-833.
- [3] Calderaro A., Martinelli M., Motta F., Larini S., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Chezzi C., De Conto F., Comparison of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assays with culture-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts from blood cultures and cerebrospina. *Clin Microbiol Infect* 2013, 20: O468–O475.
- [4] Gosiewski T., Flis A., Sroka A., Kędzierska A., Pietrzyk A., Kędzierska J.,

Podsumowanie

Jak wynika z przedstawionych badań metody mikrobiologii molekularnej stanowią istotny element w diagnostyce chorób takich jak sepsa czy borelioza. Cechują się one wysoką specyficznością i możliwością wykrycia drobnoustrojów na wczesnym etapie zakażenia, umożliwiając szybkie wdrożenie odpowiedniej terapii. Pomimo wysokich kosztów stanowią alternatywę dla tradycyjnych metod diagnostycznych. Dalsze badania nad standaryzacją testów molekularnych są konieczne, aby weszły one do powszechnego użycia w diagnostyce medycznej.

- Drwiła R., Bulanda M., Comparison of nested, multiplex, qPCR; FISH; SeptiFast and blood culture methods in detection and identification of bacteria and fungi in blood of patients with sepsis. *BMC Microbiol* 2014; 14: 2323.
- [5] Gosiewski T., Pietrzyk A., Brzywczy-Włoch M., Heczko Piotr B., Zastosowanie metod PCR i FISH w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi., *Ann. Acad. Med. Siles.* 2011. 65, 5-6, 14-22.
- [6] Gosiewski T., Szała L., Pietrzyk A., Brzywczy-Włoch M., Heczko P.B., Bulanda M., Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood. *Curr Microbiol* 2014, 68:149-155.
- [7] Jamal W., Tamaray G., Pazhoor A., Rotimi V.O., Comparative Evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC Systems for the Recovery of Pathogens Causing Bloodstream Infections. *Med Princ Pract.*, 2006, 15 ,3, 223-7.
- [8] Kondrusik M., Grygorczuk S., Skotarczak B., Wodecka B., Rymaszewska A., Pancewicz S., Zajkowska J.,

- Świerzbńska R., Hermanowska-Szapkowicz T., Molecular and serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection among patients with diagnosed erythema migrans, *Ann Agric Environ Med* 2007, 14, 209-213.
- [9] Kübler A., Adamik B., Durek G., Mayzner-Zawadzka E., Gaszyński W., Karpel E., Duszyńska W., Wyniki rejestru przypadków ciężkiej sepsy na oddziałach intensywnej terapii w Polsce w latach 2003–2009. *Anestezjologia Intensywna Terapie*, 2015, 47: 1, 8-14.
- [10] Legatowicz-Koprowska M., Walczak E., Borelioza- wciąż trudne wyzwanie, *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2011, tom 5, nr 4, 336-344.
- [11] Liang F., Nelson F., Fikrig E., Molecular Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the Murine Host, *J. exp. Med.* 196, 2002, 275- 280.
- [12] Liveris D., Schwartz I., McKenna D., Nowakowski J., Nadelman R. B., DeMarco J., Iyer R., Cox M.E., Holmgren D., Wormser G.P., Quantitation of cell-associated borrelial DNA in the blood of Lyme disease patients with erythema migrans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2011.
- [13] Mączka I., Tylewska- Wiezbanowska S., Cykl krążenia krętków *Borrelia burgdorferi* w środowisku, *Post mikrobiol.*, 2010, 49, 1, 25- 32.
- [14] Miąskiewicz K., Walczak E., Roguska K., Ząbek J., Fałszywie ujemne wyniki testów serologicznych w kierunku *Borrelia burgdorferi* jako efekt kompleksemii w przebiegu choroby z Lyme. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2011, 5,3, 201-209.
- [15] Raport Głównego Inspektora Sanitarnego- Stan Sanitarny Kraju w roku 2014., dostęp: <http://www.gis.gov.pl/>.
- [16] Redl H., Schlag G.; Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis* 1991. 164 (2): 383-388.
- [17] Santino I., Berlutti F., Pantanella F., Sessa R., del Piano M., Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis, *FEMS Microbiol Lett* 283, 2008, 30-35.
- [18] Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R., PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012, 113:1014-1026.
- [19] Shafazand S., Weinacker A.B., Improving Utilization and Yield Blood Cultures in the Critical Care. *Unit. Chest* 2002. 122: 1727 - 1736.
- [20] Siondalski P et al., Usefulness of the PCR technique for bacterial DNA detection in blood of the patients after "opened heart" operations. *Pol J Microbiol* 2004, 53: 145-9.
- [21] Steere, A.C., Lyme disease, *New England Journal of Medicine* vol. 345, Issue 2, 2001, 115-125.
- [22] Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szapkowicz T., Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? *Diagnosta Laboratotyjny*, 2007.
- [23] Zajkowska J.M., Pancewicz S.A., Wybrane aspekty patogenezy i diagnostyki neuroboreliozy, *Pol. Przy. Neurol.* 3, 2, 2007, 166- 122.
- [24] Zhang W.Z, Han T. Q., Tang Y. Q., Zhang S.D., Rapid detection of sepsis complicating acute necrotizing pancreatitis using polymerase chain reaction.. *World J Gastroenterol.* 2001, 7(2), 289-292.

Wykorzystanie nanocząstek w medycynie, kosmetologii i rolnictwie

Natalia Lewandowska, Henryk Kozłowski

Koło Naukowe Biotechnologii BioX

Katedra Genetyki, Fizjologii i Biotechnologii Roślin

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy w Bydgoszczy

Praca napisana pod opieką dr inż. Iwony Jędrzejczyk, dr inż. Alicji Tymoszuk

Nanotechnologia zajmuje się otrzymywaniem i wykorzystaniem materiałów, struktur, urządzeń oraz systemów składających się z atomów i molekuł w rozmiarze nano. Znajduje zastosowanie w medycynie, m.in. w wykrywaniu i leczeniu nowotworów, a także w stomatologii przy produkcji preparatów przeciwpróchnicznych. W kosmetologii nanometale stanowią dodatek do kremów pielęgnacyjnych, filtrów przeciwsłonecznych, szminek do ust, cieni do powiek, farb do włosów czy lakierów do paznokci. W rolnictwie ich obecność pozwala na bezpieczniejsze stosowanie środków ochrony roślin, natomiast ich właściwości antybakteryjne i antygrzybiczne znajdują zastosowanie m.in. w kulturach *in vitro*. Ograniczeniem w stosowaniu nanomateriałów jest, wciąż nie do końca poznane, ich ewentualne toksyczne działanie.

Wstęp

Nanotechnologia, stosunkowo nowy obszar nauki, definiowana jest jako wykorzystanie materii o wymiarach w skali 1-100 nanometrów. Z uwagi na unikatowe właściwości nanomateriałów, dyscyplina ta znajduje zastosowanie w wielu obszarach. Dostarcza materiały o nowych właściwościach w porównaniu do skali makro i ten fakt pozwala na prowadzenie badań, dążenie do poznania nowych perspektyw wykorzystania, tworzenie udoskonalonych lub zupełnie nowych urządzeń i systemów [1]. Obecnie, nanomateriały stosuje się już w medycynie, farmacji, kosmetologii, rolnictwie, ochronie roślin, a nawet w informatyce, mecha-

nice, energetyce czy inżynierii optycznej, przy czym nadal możliwości ich wykorzystania pozostają niewyczerpane [2].

Medycyna

Obecnie największym problemem w medycynie są, nieuleczalne jak dotąd, choroby nowotworowe. W Stanach Zjednoczonych częstość występowania raka i zgonów z nim związanych zmniejszyła się w ciągu ostatnich trzech lat dzięki wczesnemu wykrywaniu i leczeniu, jednak nowotwory są wciąż odpowiedzialne za jedną czwartą zgonów w tym kraju [3]. Tradycyjna

chemioterapia sprawdza się w kwestii samych zmian nowotworowych, jednakże mnogość skutków ubocznych skłania do poszukiwania nowych rozwiązań. Stosowane leki mają działanie toksyczne i osłabiają odporność pacjentów. Ze względu na swoje unikatowe właściwości fizyczne i biologiczne, chemioterapia oparta na nanotechnologii wydaje się być przyszłością w wykrywaniu i leczeniu nowotworów. Zdolność do swoistego docierania do ognisk (tkanek i komórek guza), zwiększona skuteczność i niska toksyczność w stosunku do niezmiennych nowotworowo komórek to pożądane właściwości metod terapeutycznych. Konstrukcja nanocząstek powinna być swoista dla choroby. Ze względu na to, że guzy różnią się od siebie, a guz pierwotny zazwyczaj różni się od jego przerzutów, ten sam no-

wotwór może ulegać zmianom z dnia na dzień, dlatego też, projektowanie nanocząstek powinno mieć charakter indywidualny dla każdego przypadku. Biorąc pod uwagę zmienne mikrośrodowisko guza i niekontrolowane zmiany proliferacyjne, pojawia się ogromna bariera przy wdrażaniu tej technologii [4]. Badania wskazują, że liderzy globalnego nanorynku zajmują się wdrażaniem nanotechnologii do leczenia konkretnych nowotworów, np. w Szwajcarii - raka prostaty, w Japonii - raka jelita grubego, w Chinach - raka jajnika, w Grecji - raka trzustki) [5]. Inne specjalizacje w poszczególnych krajach zostały uwzględnione w Tabeli 1. Ze względu na cenne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne, nanocząstki (a szczególnie nanosrebro) są szeroko wykorzystywane przy produkcji bandażu i opatrunków,

kraj	rak piersi	rak prostaty	rak płuc	rak jelita grubego	rak jajnika	rak trzustki	rak mózgu
Australia				✓*			
Kanada		✓			✓		
Chiny			✓	✓	✓✓	✓	
Francja	✓					✓	
Niemcy	✓	✓					✓
Grecja		✓✓				✓✓	
Indie			✓			✓	✓✓
Iran			✓	✓	✓	✓	
Izrael		✓	✓✓	✓✓			
Włochy	✓✓	✓				✓	✓
Japonia			✓	✓✓		✓✓	✓
Holandia	✓✓					✓	
Singapur	✓✓		✓	✓✓	✓	✓✓	✓✓
Korea Południowa	✓	✓✓	✓✓	✓	✓		✓
Hiszpania				✓		✓	✓
Szwecja		✓		✓	✓✓		
Szwajcaria		✓✓	✓	✓	✓✓		✓✓
Tajwan			✓✓	✓			
Wielka Brytania				✓			
Stany Zjednoczone		✓	✓		✓	✓	✓

*✓ mniejsza specjalizacja
 ✓✓ większa specjalizacja

Tabela 1. Specjalizacja krajów w wykorzystaniu leków przeciwnowotworowych bazujących na nanotechnologii w leczeniu określonych typów nowotworów (2000-2012) [5].

a także przeciwnie w stomatologii [6].

Kosmetologia

Największy udział nanotechnologii dotyczy poprawy dostarczania składników kosmetycznych do skóry. Dzięki nanosomom, czyli pęcherzykom w formie nano, będącymi wektorami substancji aktywnych, możliwa jest skuteczniejsza aplikacja kremów pielęgnacyjnych czy innych kosmetyków [7]. Nanomateriały mogą być również stosowane w celu nadania stabilności preparatom zawierającym składniki, które mogą się rozkładać na skutek m.in. utlenienia. Eliminując ryzyko powstawania reaktywnych form tlenu, a także pochłaniając szkodliwe dla skóry promieniowanie UV, nanocząstki doskonale sprawdzają się jako dodatek w produktach ochrony przeciwsłonecznej. Największe znaczenie mają tu nanocząstki ditlenku tytanu oraz tlenku cynku [8]. Z udziałem nanokolloidów, wytwarzane są również lipidowe nanocząstki, które ze względu na gęstą konsystencję, same w sobie mogą już stanowić preparat nawilżający i poprawiający elastyczność skóry. Właściwość ta cieszy się zainteresowaniem, zwłaszcza ze strony producentów kremów przeciwzmarszczkowych. Oprócz specyfików do pielęgnacji skóry, nanocząstki są również wykorzystywane w kosmetologii do nadawania barwy szminkom do ust, farbom do włosów czy cieniom do powiek. W produkcji lakierów natomiast polepszają ich trwałość [9]. Nanocząstki srebra oraz miedzi, ze

względu na swoje właściwości antybakteryjne, mogą być wykorzystywane jako środki konserwujące w kosmetykach, zastępujące specyfiki syntetyczne oraz przy produkcji mydeł [8, 9].

Rolnictwo i ochrona roślin

Jedną z głównych przyczyn strat w uprawach jest występowanie owadów i szkodników. Rolnicy radzą sobie z nimi, w mniejszym lub większym stopniu, stosując pestycydy pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego. Ponieważ naturalne środki ochrony roślin są bardziej pożądane ze względu na mniejszą toksyczność dla środowiska, a ich syntetyczne formy są skuteczniejsze, dąży się do połączenia tych cech. Nanotechnologia jest przydatnym narzędziem do tworzenia nowych preparatów o pożądanych właściwościach. Dobrze zaprojektowany system kontrolowanego uwalniania cząsteczek może poprawić docelową specyficzność, optymalizując działanie substancji czynnej, a tym samym zwiększając skuteczność stosowanego preparatu. Minimalizowane jest przy tym ryzyko toksycznego działania na organizmy inne niż docelowe oraz niepożądanego rozkładu przez drobnoustroje [10]. Oprócz ulepszania środków ochrony roślin, dzięki wykorzystaniu nanotechnologii, możliwe jest wykrywanie pozostałości pestycydów. Nanocząstki znajdują także zastosowanie jako czujniki do monitorowania stanu gleby [11].

Roślinne kultury *in vitro*

Wspomniane już właściwości antybakteryjne i antygrzybiczne nanocząstek, znajdują zastosowanie także w kulturach *in vitro*. Z uwagi na konieczność zachowania sterylności, antyseptyczne warunki podczas inicjacji kultur nie są wystarczające. Ważnym elementem jest dezynfekcja eksplantatów roślinnych, pochodzących z roślin *in vivo*. Nanocząstki są skutecznym środkiem do przeprowadzania tego procesu. Naukowcy wykonali szereg badań, skupiając się na reakcji poszczególnych szczepów drobnoustrojów na różne stężenia rozmaitych nanometali oraz skuteczności stosowania nanocząstek dla różnych gatunków roślin. Bezspornym dowodem potwierdzającym tezę odnoszącą się do wykorzystania nanokolloidów metali w procesie dezynfekcji jest duża liczba wyników dostępnych w literaturze. Jedno z badań dotyczyło dezynfekcji nasion rzepaku. Wykorzystanie nanosrebra w stężeniu 20 ppm w tym etapie okazało się najskuteczniejsze (100% sterylność) w porównaniu z innymi kombinacjami w doświadczeniu (Cu w stężeniu 20 ppm, Ag+Cu: 10 i 20 ppm) [12]. W innym eksperymencie likwidacja zakażeń mikrobiologicznych podczas mikrorozmnażania gerbery była oceniona w czterech różnych stężeniach nanosrebra (25, 50, 100 i 200 mg·dm⁻³). Eksplantaty były moczone przez 15, 30, 60 oraz 180 minut. Jako obiekty kontrolne posłużyły dwie kombinacje z powszechnie stosowanym do dezynfekcji podchlorynem sodu w połączeniu z chlorkiem rtęci (udział

ostatniego związku może mieć negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin). Najkorzystniejszym wariantem okazało się moczenie eksplantatów w nanokolloidzie srebra w stężeniu 25 mg·dm⁻³ przez 60 minut, ponieważ oprócz skutecznego działania przeciwdrobnoustrojowego, nie wywoływało ono niekorzystnego wpływu na regenerację mikrosadzonek [13]. Do tej pory inne wykorzystanie nanometali w kulturach *in vitro* nie zostało do końca poznane. Nowym przedmiotem badań staje się ocena wpływu nanocząstek na wzrost i regenerację eksplantatów roślinnych.

Ograniczenia w wykorzystaniu nanotechnologii

Pomimo, że nanomateriały są już powszechnie stosowane w wielu obszarach, okazuje się, że ich toksyczność nie została jeszcze całkowicie wykluczona. Badania dowiodły, że długoterminowa ekspozycja na nanocząstki nie jest do końca bezpieczna dla ludzi, zwierząt oraz roślin. W dwóch ostatnich grupach zaobserwowano pojawienie się stresu oksydacyjnego, który w następstwie mógł powodować uszkodzenie DNA oraz indukować proliferację. U ludzi natomiast zaobserwowano skutki uboczne, między innymi w postaci alergii skórnych. [14, 15, 16]. Jednakże wpływ nanomateriałów na środowisko zależy od kształtu i rozmiaru ich cząstek, dlatego w celu uzyskania wiarygodnych wyników należałoby przeanalizować temat bardziej szczegółowo [17].

Podsumowanie

Struktury pomniejszone do rozmiaru nano znajdują obecnie ogromne zastosowanie w wielu dziedzinach. Naukowcy poszukują nowych kierunków ich wykorzystania, ponieważ połączenie unikatowych właściwości oraz niewielkich rozmiarów stwarza niemalże nieograniczone pole działania. Ze względu na zdolność docierania do ognisk zmian rakowych, nanocząstki są nadzieją na wdrożenie skutecznych terapii nowotworowych. Idealnie sprawdzają się jako nośniki substancji aktywnych w kosmetykach. Dzięki nim możliwe jest kontrolowane doprowadzenie środków ochrony roślin do miejsc docelowych, bez negatywnego

wpływu na inne organizmy. Szeroko wykorzystywane są ich właściwości antymikrobiologiczne, nie tylko przy konserwacji produktów konsumpcyjnych, czy wytwarzaniu bandaży i opatrunków, ale również do dezynfekcji eksplantatów w kulturach *in vitro*. Jednakże, pomimo ogromnych korzyści płynących z zastosowania nanomateriałów w różnych dziedzinach, ich wpływ na środowisko nie został jeszcze w pełni poznany. Aby potencjał nanotechnologii został wykorzystany w zadowalającym stopniu, pożądane byłoby przeprowadzenie szeregu badań, wykluczających jej szkodliwy wpływ na środowisko i organizmy będące jego częścią.

Bibliografia:

- [1] Martel S., NanoRobotics Laboratory, Department of Computer and Software Engineering, and Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal (EPM), Montréal, QC, Canada, 1704, W: B. Bhushan (ed.), Encyclopedia of Nanotechnology, 2012
- [2] Novack B., Bucheli T.D., Occurrence, behaviour and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 2007, 150, 5-22
- [3] Hull L.C., Farrell D., Grodzinski P., Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research—View from NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 666-678
- [4] Gao Y., Xie J., Chen H., Gu S., Zhao R., Shao J., Jia L., 2014. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnology Advances* 32: 761-777.
- [5] Coccia M., Wang L., 2015. Path-breaking directions of nanotechnology-based chemotherapy and molecular cancer therapy. *Technological Forecasting & Social Change*, 2015, 94, 155-169
- [6] SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance, 2014, 7-10
- [7] Katz L.M., Dewan K., Bronaugh R.L., Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 85, 127-137
- [8] Ourique A.F., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Beck R.C.R., Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 352, 1-4
- [9] Szelecht A., Schroeder G., Zastosowanie nanotechnologii w kosmetologii. W: Schroeder G. (red.). *Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna*. Wydawnictwo Cursiva, 2010, 8
- [10] De Oliveira J.L., Campos E.V.R., Bakshi M., Abhilash P.C., Fraceto L.F., Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1550-1561
- [11] Khot L.R., Sankaran S., Maja J.M.,

- Ehsani R., Schuster E.W., Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection*, 2012, 35, 64-70
- [12] Bocian K., Zastosowanie roztworów nanometali do procesu sterylizacji nasion w kulturach in vitro. Praca magisterska. Biblioteka Katedry Fizjologii i Podstaw Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Technologiczno - Przyrodniczego w Bydgoszczy, 2014
- [13] Fakhrfeshani M., Bagheri A., Sharifi A., Disinfecting Effects of Nano Silver Fluids in *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) Capitulum Tissue Culture. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 2012, 6(17), 121-127
- [14] SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance, 2014, 7-10
- [15] Jiang H-S., Qiu X-N., Li G-B., Li W., Yin L-Y., Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(6), 1398-1405
- [16] Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N., Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment* 407, 2009, 5243-5246
- [17] Syu Y-Y., Hung J-H., Chen J-C., Chuang H-W., Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 83, 57-64