

WSZECHŚWIAT

PISMO PRZYRODNICZE

Tom 117 Nr 10–12

Październik–Listopad–Grudzień 2016



Danio pręgowany – organizm modelowy

*Przyżyciowe badania mikroskopowe
funkcji mózgu*

Okiem ryby – sieci neuronalne

Danio w badaniach nad nowotworami

Danio pręgowany – kampania edukacyjna

Nadciężki hel

Białka nieustrukturyzowane

Estrogeny a układ odpornościowy

ISSN 0043-9592



WSZECHŚWIAT

Z POLSKIMI PRZYRODNIKAMI OD 3 KWIETNIA 1882
Zalecany do bibliotek nauczycielskich i licealnych od r. 1947 (pismo Ministra Oświaty nr IV/Oc-2734/47)
Wszechświat jest pismem punktowanym w Index Copernicus International.

Treść zeszytu 10–12 (2634–2636)

ARTYKUŁY

Piotr Jan Korzeniowski, Małgorzata Wiweger, Mała rybka – wielkie wyzwania	255
Michał Bazała, Justyna Jędrzychowska, Jacek Kuźnicki, Przyżyciowe badania nad funkcjonowaniem mózgu przy użyciu mikroskopii SPIM	263
Magdalena Kędra, Jacek Jaworski, Justyna Zmorzyńska, Okiem ryby – nowe spojrzenie na rozwój sieci neuronalnych i choroby neurorozwojowe	270
Maciej Olszewski, Magdalena Prusko, Danio pręgowany jako organizm modelowy w badaniach nad nowotworami	278
Daria Goś, Kampania edukacyjna „Bądź zdrow jak ryba” jako przykład działań popularyzatorskich	284
Ziemowit M. Malecha, Nadciekły hel – substancja magiczna	291
Bartosz Różycki, Postęp w pomiarach białek nieustrukturyzowanych	295
Michał M. Skoczylas, Sara Trieu, Saskia Wiacek, Anna Walecka, Nowy codzienny uporczywy ból głowy – W 30. rocznicę pierwszego opisu choroby	305
Magdalena Maciuszek, Być kobietą, być kobietą – wpływ estrogenów na funkcjonowanie układu odpornościowego	308

DROBIAZGI

Spotkanie z przeziernikiem (Maria Olszowska)	315
Stwierdzenie martwicy wapiennej w gminie Stopnica (Woj. świętokrzyskie) (Maciej Bonk)	316

WSZECHŚWIAT SPRZED WIEKU

Artykuły z 1886 roku (Jerzy Vetulani, Maria Śmiałowska)	318
--	-----

KRONIKA

Jacek H. Graff, Jeden dzień Festiwalu Nauki w roku 2016 – refleksje i wnioski	328
--	-----

RECENZJE

Robert W. Henderson: Natural History of Neotropical Treeboas (genus <i>Corallus</i>). (Piotr Sura)	331
---	-----

Informujemy, że istnieje możliwość zakupienia bieżących i archiwalnych numerów *Wszechświata* bezpośrednio w Redakcji lub poprzez dokonanie wpłaty przelewem na nasze konto, z zaznaczeniem, jakich numerów dotyczyła wpłata.

Cena zeszytu z bieżącego roku oraz zeszytów z dwóch ubiegłych lat wynosi 12 zł. Ceny numerów archiwalnych z wcześniejszych lat od 1 zł do 5 zł.

Redakcja nie dysponuje zeszytem nr 7–9, tom 104, zawierającym płytke CD z głosami ptaków.

Proponujemy również dokonanie prenumeraty Pisma Przyrodniczego *Wszechświat*, poprzez wpłatę 48 zł rocznie. W sprawach prenumeraty i zakupu wybranych numerów prosimy o kontakt z P. Aleksandrem Koralem, e-mail: biuro@ptpk.org, tel. 661 482 408.

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
Redakcja Pisma Przyrodniczego *Wszechświat*
31-118 Kraków, ul. Podwale 1
Bank Zachodni WBK, XXII Oddział Kraków
nr konta 81 1500 1142 1220 6033 9745 0000

Ten numer *Wszechświata* powstał dzięki finansowej pomocy:

- Akademii Górniczo-Hutniczej
- Polskiej Akademii Umiejętności
- Urzędu Miasta Krakowa



Rada Redakcyjna

Przewodniczący: Irena Nalepa

Z-cy Przewodniczącej: Ryszard Tadeusiewicz, Jerzy Vetulani

Sekretarz Rady: Stanisław Knutelski

**Członkowie: Wincenty Kilarski, Michał Kozakiewicz, Elżbieta Pyza, Marek Sanak,
January Weiner, Bronisław W. Wołoszyn**

Komitety redakcyjne

Redaktor Naczelny: Maria Śmiałowska

Z-ca Redaktora Naczelnego: Barbara Płytycz

Sekretarz Redakcji: Alicja Firlejczyk

Członek Redakcji: Barbara Morawska-Nowak

Adres Redakcji

Redakcja Pisma Przyrodniczego *Wszechświat*

31-118 Kraków, ul. Podwale 1 m. 2, tel. 661 482 408

e-mail: wszechswiat.smialo@onet.pl,

www.wszechswiat.ptpk.org

Wydawca

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika, Kraków, ul. Podwale 1 m.2

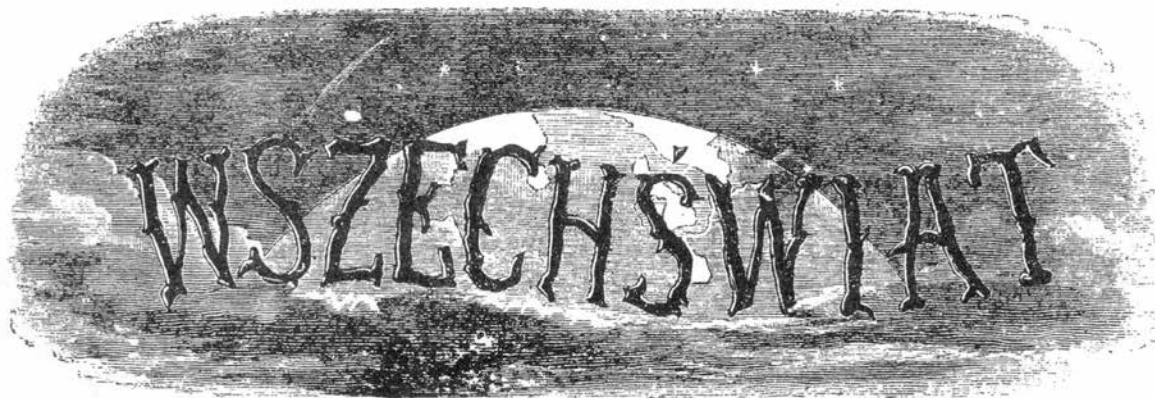
Projekt i skład

Artur Brożonowicz, frontart@frontart.eu

Druk

Drukarnia Printgraph, tel. 14 663 07 50, www.printgraph.pl

Nakład 700 egz.



PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW IM. KOPERNIKA

WYDAWANE PRZY WSPÓŁUDZIALE: AKADEMII GÓRNICZO-HUTNICZEJ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO I POLSKIEJ AKADEMII UMIEJĘTNOŚCI

TOM 117
ROK 134

PAŹDZIERNIK – LISTOPAD – GRUDZIEŃ 2016

ZESZYT 10–12
2634–2636

Cykl pięciu artykułów na temat wykorzystania *Danio* przegowanego jako organizmu modelowego w badaniach pracowników Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie realizujących w latach 2012–2016 projekt 7PR RegPot pt. „Fishing for Medicines and their targets using Zebrafish models of human diseases”.



MAŁA RYBKA – WIELKIE WYZWANIA

Piotr Jan Korzeniowski i Małgorzata Wiweger (Warszawa)

Streszczenie

Dynamiczny rozwój badań biomedycznych narzucił konieczność poszukiwania nowych modeli zwierzęcych, pozwalających na dokładniejsze poznanie złożonych procesów fizjologicznych i patologicznych. Jednym z takich modeli jest danio przegowane (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*). Ta niepozorna ryba wyznaczyła nowe trendy w badaniach z zakresu genetyki i rozwoju, farmakodynamiki, toksykologii, kontroli środowiska, behawioru itp., stwarzając szansę na znalezienie nowych dróg w leczeniu różnych chorób. Pomimo pozornej prostoty hodowli i przeprowadzenie badań z wykorzystaniem tego organizmu niesie za sobą szereg wyzwań, z którymi warto się zmierzyć.

Abstract

The dynamic development of biomedical research imposed the need for new animal models that would allow a more precise understanding of complex physiological and pathological processes. One such model is the zebrafish (*Danio rerio*). This modest fish set new trends in research: genetics and development, pharmacodynamics, toxicology, environmental control, behaviour, etc. creating an opportunity to find cure for various diseases. Despite the apparent simplicity, breeding and performing experiments on this organism carries a number of challenges which are worth addressed.

Gromada ryb (*Pisces*) stanowi najbardziej zróżnicowaną grupę współcześnie żyjących kręgowców. Skupia ponad 30 tysięcy gatunków, cechujących się

ogromną zmiennością budowy i fizjologii, podyktowaną dostosowaniem się do odmiennych warunków środowiskowych. Ryby zasiedlają wody słone, słodkie

oraz o charakterze mieszanym. Można je znaleźć od przybrzeżnych płycin po najgłębsze miejsca oceanów. Są również gatunki, które okresowo wychodzą na ląd, np. poskoczek mułowy (*Periophthalmus barbarus*). Wizerunki ryb można zobaczyć na najstarszych malowidłach i w manuskryptach stworzonych przez człowieka. Nic w tym dziwnego, ponieważ ryby, jako źródło wartościowego pokarmu i podstawa rozwoju wielu społeczności, zawsze były silnie związane z naszym gatunkiem. Oprócz dużego znaczenia gospodarczego ryby od wieluset lat były i są uznanymi „zwierzętami towarzyszącymi”. Już w starożytnych Chinach doceniano ich piękno i hodowano ozdobne odmiany karasia, tworząc wzorce poprawności kształtów i ubarwienia, kreując trendy, które przetrwały do dnia dzisiejszego. Dzięki dynamicznemu rozwojowi akwarystyki słodkowodnej (a także i morskiej) pięknie urządzone akwaria, z ciekawymi gatunkami eksponowanych w nich ryb, pozwalają nam utrzymać fragment przyrody we własnym domu i dają tak potrzebne wytchnienie od codziennych obowiązków. Gama zmienności anatomicznych i fizjologicznych oraz sposobów dostosowania się do różnych warunków środowiska jest także przedmiotem fascynacji i obiektem badań naukowych. Takie gatunki jak: gupik (*Poecilia reticulata*), mieczyk (*Xiphophorus helleri*), ryżanka japońska (*Oryzias latipes*; ang. medaka), ryby z rodzaju *Nothobranchius* (ang. killifish) czy też ryby łososiowate i jesiotrowate oraz wiele innych wniosły duży wkład w rozwój badań w różnych dziedzinach biologii, medycyny i toksykologii. Jednak to pewna mała, azjatycka ryba, hodowana od dziesięcioleci w akwariach domowych, zrobiła zawrotną karierę jako zwierzę laboratoryjne, użytkowane w setkach ośrodków naukowych na całym świecie. Jest nią danio pręgowany *Danio (Brachydanio) rerio* (ang. zebrafish), gatunek po raz pierwszy opisany w roku 1822 przez doktora Francis Buchanan-Hamiltona, szkockiego medyka i przyrodnika.

Danio pręgowany jest przedstawicielem rodziny karpowatych (*Cyprinidae*) – dalekim kuzynem karpia. W naturze zasiedla wody Indii, Pakistanu, Bangladeszu, Nepalu i Birmy. Bytuje w wodach o zróżnicowanym charakterze: od rzek, przez rozlewiska, do małych cieków wodnych i zbiorników zastoinowych. Preferuje zarośnięte płycizny, gdzie łatwo może zdobyć pożywienie (ryby danio są wszystkożerne) oraz skryć się przed drapieżcą. Ryby te są stosunkowo mało wymagające. Dobrze znoszą temperatury od 8°C do 32°C i przewodnictwo wody wahające się w granicach od 100 do 1400 μS (μS – jednostka układu SI dotycząca przewodności i admitancji elektrycznej). Dla porównania: woda destylowana ma ok 5 μS ,

a woda kranowa ma ok 500–800 μS . Danio cechuje się dość dużą płodnością i krótkim cyklem rozwojowym. Te naturalne cechy oraz niewielki rozmiar ciała (dorosłe osobniki osiągają 4–5 cm) sprzyjają utrzymywaniu ich w warunkach laboratoryjnych (Ryc. 1). Danio w formie dzikiej charakteryzuje się smukłym ciałem o typowym ubarwieniu, składającym się z pasów biegnących wzdłuż ciała. Jest jednak wiele odmian fenotypowych, w których pasiasty wzór nie jest zachowany: *leopard*, *albino*, *nacre*, *roy orbison*, *casper*, *crystal* [2].

Warto poświęcić trochę uwagi początkom badań z wykorzystaniem danio. Wprawdzie w czerwcu 1976 r. ryby danio zostały po raz pierwszy wysłane w kosmos na pokładzie radzieckiej stacji kosmicznej Salut 5 (Almaz 3), ale za prekursora badań z zastosowaniem tego modelu jest uważany prof. George Streisinger, urodzony w Budapeszcie w 1927 roku. Skomplikowana historia tego okresu spowodowała, że jego rodzina wyemigrowała do USA. Po przejściu kolejnych etapów edukacji prof. Streisinger swoją pracę związał z badaniami z zakresu biologii molekularnej wirusów. Do potwierdzenia uniwersalności swoich odkryć dotyczących struktury i kodu genetycznego faga T4 (bakteriofag składający się z kapsydu i dwuniciowego DNA, atakujący bakterie *E.coli*; jeden z najlepiej poznanych wirusów) wybrał rybę danio pręgową. Jego entuzjazm związany z wykorzystaniem ryb danio, jako modelu do studiowania genetyki i rozwoju kręgowców niższych, początkowo zetknął się z umiarkowanym przyjęciem. Na szczęście sceptycyzm osłabł, a linie danio uzyskane w laboratorium prof. Streisingera (Oregon University w Eugene) są do dzisiaj używane w badaniach na całym świecie. Kariera małej rybki uzyskała znaczne przyspieszenie w latach 80. i 90. ubiegłego wieku, kiedy w tzw.: „Tübingen screen” (kierowanym przez prof. Christiane Nüsslein-Volhard, laureatkę Nagrody Nobla za badania nad genetyką rozwojową muszki owocowej) oraz „Boston screen” utworzone zostały pierwsze kolekcje mutantów danio. Genetyka danio stała się interesującą dla szerszej grupy naukowców [5]. Rok 2001 to początek sekwencjonowania genomu danio pręgowanego w Instytucie Sangera (UK). W tym samym roku w Eugene (Oregon, USA) powstał „Zebrafish International Resource Center” (ZIRC) – bank genów danio, w którym przechowywane są tysiące linii dzikich, transgenicznych i z mutacjami. W Europie siostrzane centrum – „European Zebrafish Resource Center” (EZRC) otwarte zostało dopiero w 2012 r. w Karlsruhe w Niemczech. W tym samym roku został otwarty także chiński odpowiednik – China Zebrafish Resource Center (CZRC).

W Polsce badania z użyciem modelu danio prowadzone są w kilku ośrodkach, ale tylko nieliczne zwierzętarnie prowadzą licencjonowaną hodowlę, a tylko z takiej zwierzęta mogą być pozyskiwane z myślą o wykorzystaniu do celów naukowych bądź edukacyjnych.

odpornościowego oraz choroby infekcyjne (wirusowe i bakteryjne). Możliwość oceny zjawisk patologicznych, leżących u podłoża tych chorób na poziomie molekularnym i komórkowym, stwarza szanse na znalezienie nowych dróg w ich leczeniu. Oprócz tego prowadzone są badania z zakresu: genetyki



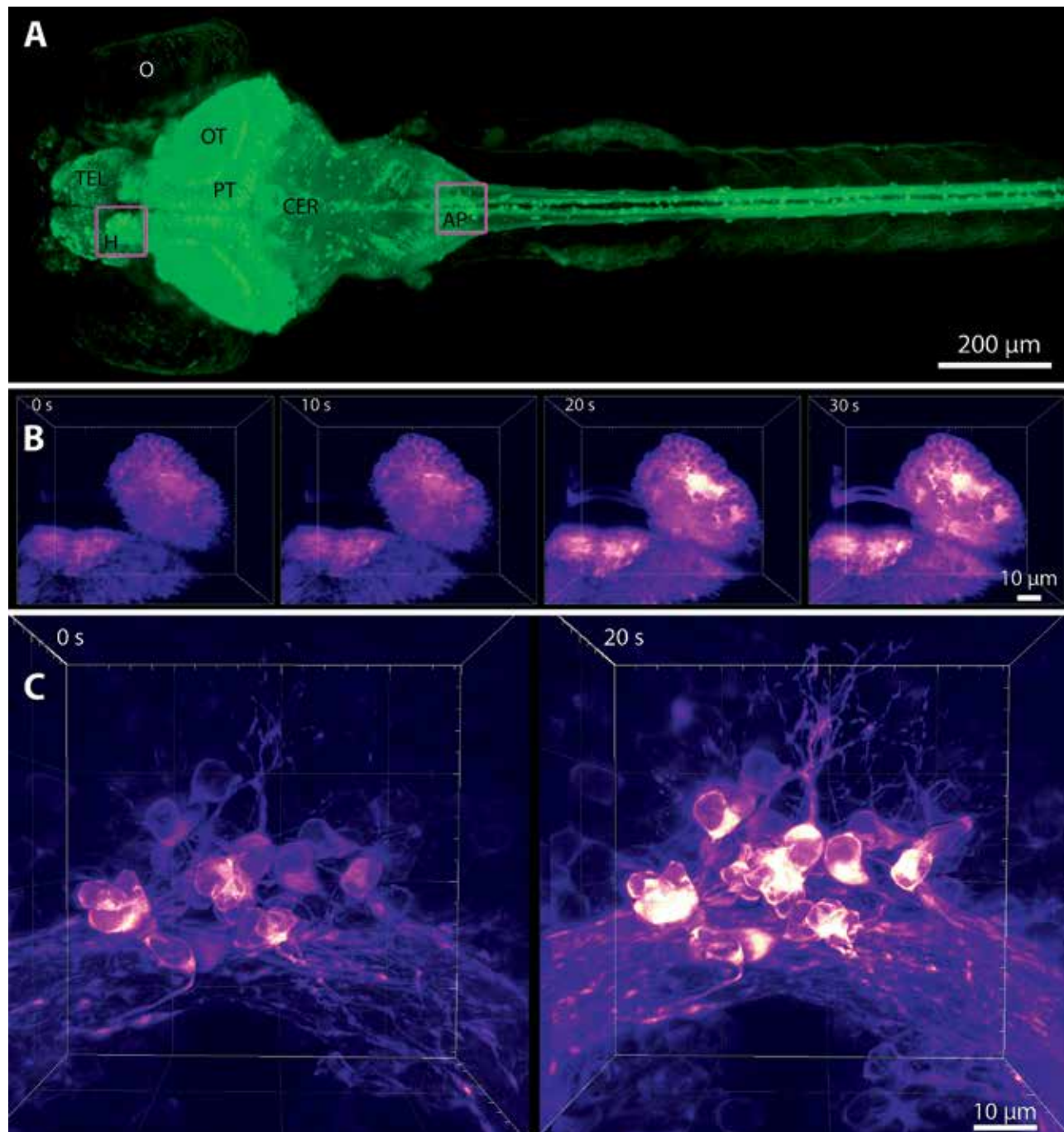
Ryc.1. Hodowla laboratoryjna danio pęgowanego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – przykładowe pojemniki hodowlane. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

Wiele czynników wpłynęło na to, że danio pęgowany jest popularnym modelem badawczym na całym świecie. Łatwość rozmnażania i krótki cykl rozwojowy (ok. 3 miesiące od jaja do osobnika dorosłego) oraz możliwość częstego pozyskiwania dużych ilości materiału badawczego są niewątpliwie jednym z najważniejszych aspektów. Niemniej ważny jest fakt, że stadia larwalne danio mają niewielki rozmiar (ok. 3 mm) oraz są przezroczyste, co pozwala na śledzenie *in vivo* zachodzących w organizmie procesów. Zsekwencjonowany genom (danio posiada 25 chromosomów) oraz obecność odpowiedników ok. 70% genów ludzkich decyduje o wyjątkowości tego zwierzęcia [3]. Do najważniejszych chorób, zaliczanych do zagrożeń cywilizacyjnych, nad którymi prowadzone są badania przy zastosowaniu modelu danio należą: choroby neurodegeneracyjne i psychiczne, choroby nowotworowe i serca, choroby układu mięśniowo-kostnego, różnego typu zaburzenia układu

i rozwoju, farmakodynamiki, toksykologii oraz kontroli środowiska. Poza zaawansowanymi badaniami na poziomie komórkowym i molekularnym, warte wymienienia są również badania behawioralne. Dzięki nowoczesnym urządzeniom stworzonym do precyzyjnej obserwacji zarówno form młodocianych, jak i ryb dorosłych, możliwa jest analiza pozwalająca na ocenę zmian w zachowaniu spowodowanych zmianami patologicznymi, działaniem leków czy innych różnorodnych czynników. Jako zwierzę modelowe danio poddawane było szeregu modyfikacjom. Mutageniza ENU (C₃H₇N₃O₂, związek chemiczny o silnie mutagennym charakterze) została użyta m. in. do stworzenia pierwszych kolekcji mutantów (wcześniej wspomniany „Tübingen screen”). Była także podstawą projektu „The Zebrafish Mutation Project (ZMP)” realizowanego w Instytucie Sangera (UK), którego celem było utworzenie knock-out’ów we wszystkich genach kodujących białka w genomie

danio pręgowanego. W metodzie tej samce danio poddawane są krótkiej kąpieli w roztworze mutagenu w celu wywołania zmian w DNA gamet. W założeniu, po tarle, każdy zarodek powinien odziedziczyć unikalny zestaw mutacji, z których część będzie utrwalona w następnych pokoleniach. Metoda ta jest wprawdzie przypadkowa i mało wydajna, jednak jest podstawą w „forward genetic screen”, w których kolekcję potencjalnych mutantów przeszukuje się pod kątem interesujących fenotypów. Dopiero te próbuje

się wiązać z zaistniałą mutacją. Takie działanie pozwala na odkrywanie nowych genów/mechanizmów regulacji. ENU działa na różne zwierzęta, ale ze względu na to, że przeprowadzenie „forward genetic screen” wymaga użycia dużej ilości osobników, aspekty etyczne i ekonomiczne sprawiają, że danio jest jednym z nielicznych kręgowców, u których tę metodę warto zastosować. Inaczej jest w przypadku metody CRISPr/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; CRISPR, CRI-



Ryc.2. Obrazowanie *in vivo* neuronów u transgenicznej, pięciodniowej larwy danio wyznakowanej sondą GCaMP5g [1] przy użyciu mikroskopu Light-sheet Z.1. (A) widok poglądowy: TEL-telencephalon, O-oculus, H-habenulla, OT-optic tectum, PT-pre tectum, CER-cerebellum, AP - area postrema; (B,C) seria zdjęć w kolejnych punktach czasowych, z rejonów zaznaczonych różową ramką, przedstawiających rosnące poziomy wapnia w cytoplazmie neuronów po indukcji środkiem powodującym rozprężanie błon mitochondrialnych (CCCP); (B) rejon nadwzgórza (zbliżenie na uzdeczkę-habenulla); (C) okolice pola dalszego (*area postrema*). Im jaśniejszy kolor, tym wyższy poziom wapnia. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

SPR-associated (*Cas*) genes), która od paru lat rewolucjonizuje świat nauki. Jest to sztandarowa technika, bazująca na naturalnych mechanizmach obrony występujących u bakterii. W aspekcie chorób rzadkich, zastosowanie tej metody z wykorzystaniem modelu danio ma szczególnie duży potencjał. Szybki rozwój rybiego zarodka oraz dostępność materiału umożliwia przyspieszanie i intensyfikację badań, dzięki czemu (technicznie i ekonomicznie) możliwe jest przetestowanie nawet kilkunastu genów/mutacji i ich funkcji w organizmie kręgowca. Przy produkcji linii transgenicznych najczęściej stosowane były dwie metody – TALEN (ang. *transcription activator-like effector* (TALE) *nucleases*) i system Tol2, także oparte na mechanizmach obronnych bakterii. Metody te pozwalały na inkorporację stosunkowo długich fragmentów obcego DNA, ale zarówno przygotowanie konstruktów, jak i wyprowadzenie transgenicznej linii były żmudne i mało wydajne. Od czasu zaadaptowania CRISPR/Cas9 także do produkcji linii reporterowych i knock-in'ów pozwalających na kontrolowane włączanie i wyłączanie genów, klasyczne procedury TALEN i Tol2 są zastępowane tą prostszą i znacznie efektywniejszą metodą [4]. Możliwość uzyskania świecących w różnych kolorach (mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna) organów, komórek, czy samych organeli umożliwia śledzenie złożonych procesów fizjologicznych i patologicznych na różnych poziomach (od organizmu do poziomu subkomórkowego, Ryc. 2). Przygotowując się do edytowania DNA u danio należy pamiętać o tym, że genom tej ryby charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem polimorfizmu. Dlatego warto poznać dokładną sekwencję rejonu, w którym chcemy wprowadzać zmiany, we wszystkich rybach, które będą użyte do pozyskania ikry. Tylko w ten sposób unikniemy niespodzianek związanych z obecnością polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP), który może spowodować, że sekwencja, która miała być homologiczna, akurat w jednej z ryb nie będzie miała wystarczającego podobieństwa lub spowoduje, że wprowadzone zmiany będą miały innych charakter.

Wiele czynników ma wpływ na efektywność i powtarzalność wyżej wymienionych metod. Ważne jest przygotowanie odpowiedniego materiału (projektowanie, synteza, zbiór komórek, roztwór/zawiesina robocza, przechowywanie), dostępność odpowiedniego sprzętu, manualne zdolności oraz doświadczenie operatora nastrzykującego zarodki, jakość ikry oraz stadium rozwoju zarodka, a także miejsce wklucia. Produkcja igieł jest sztuką, ale czas zainwestowany w zdobycie wprawy, zwróci się z pewnością. Dużo

czasu i cierpliwości wymaga także nauczanie się różnych technik nastrzykiwania czy transplantacji. Mając na uwadze to, że dobierając odpowiednie miejsce wklucia możemy spowodować: wyciszenie genu w całym zarodku lub powstanie organizmu mozaikowego (na przykład tylko część neuronów będzie wyznakowana), a także to, że materiał (np. bakteria czy komórka nowotworowa) będzie migrować lub zostanie w miejscu iniekcji, warto poznać zarówno teorię, jak i zdobyć praktyczne doświadczenie pod okiem doświadczonego praktyka.

Typowa szpilka krawiecka ma 35 mm długości i 0,6 mm grubości. Cieniutkie igły do akupunktury mają ok. 0,26 mm, jednak w porównaniu z głową 5-cio dniowego danio (1,2 mm średnicy), nawet tak drobne przedmioty są duże. Narzędzia używane do pracy z danio muszą być odpowiednio dopasowane (zarówno dla zarodków, jak i dla osobników dorosłych), aby umożliwić prawidłowe wykonanie zabiegu. W sprzedaży pojawia się coraz większa gama narzędzi, jednak potrzeba przygotowywania własnych przyrządów wydaje się być wpisana w rozwój nauki. Komplikacje niosą także analizy zarodków/larw. O ile obserwacje pojedynczych sztuk nie są kłopotliwe – można je wykonać pod standardowym mikroskopem i udokumentować zwykłą kamerą, o tyle prześledzenie zmian fenotypowych u większej grupy (zwykle 24–96 sztuk, a czasem 2 tysięcy) nie jest łatwe. Zarodki rozwijają się dynamicznie. Dlatego dane, aby były porównywalne, muszą być zbierane w tym samym czasie. Są wprawdzie systemy umożliwiające automatyczne obrazowanie komórek, ale ich zastosowanie dla zarodków jest bardzo ograniczone (zarodki są zbyt grube i ruchliwe, a w dodatku trzeba zanalizować dużą ich liczbę). Z tych powodów techniczne ograniczenia są chyba jednym z największych wyzwań, z jakimi muszą się mierzyć osoby pracujące z modelem danio pręgowany. Dlatego tak ważna jest współpraca biologów z inżynierami, informatykami i innymi osobami, którym nie obce są nowości techniczne. Przykładem takiej współpracy są urządzenia do EKG, roboty do sortowania ikry i nowoczesne systemy do prowadzenia hodowli laboratoryjnej danio pręgowanego.

Początkowo ryby utrzymywano w typowych akwariach z różnymi układami filtracji i napowietrzania. Standardy utrzymania hodowli danio w warunkach laboratoryjnych muszą być na wyższym poziomie, podobnie jak w przypadku innych zwierząt laboratoryjnych. Z tego powodu powstały systemy wodne dedykowane danio laboratoryjnemu. Obecnie istnieje kilka firm produkujących takie zestawy. Wspólnymi cechami tych urządzeń są: wydajna filtracja

mechaniczna, chemiczna i biologiczna, ciągła kontrola podstawowych parametrów wody (temperatury, pH, μS , natlenienia), możliwość automatycznej wymiany części wody (najczęściej stosowana objętość wymienianej dobowo wody to 10–15%, ale w sytuacjach, gdy w systemie przebywa więcej ryb, można ją zwiększyć), automatyczna produkcja wody hodowlanej na bazie wody RO (ang. *reverse osmosis*), czyli wody uzyskanej po zastosowaniu filtra odwróconej osmozy. Systemy takie są również wyposażone w silne lampy UV, zmniejszające ryzyko szerzenia się infekcji w obrębie akwakultury. Parametry wody są dodatkowo kontrolowane, nie automatycznie, ale manualnie, w akwariach, przy użyciu testów akwarystycznych. Przy tych kontrolach szczególną uwagę zwraca się na stężenie amoniaku i azotynów w wodzie, jako metabolitów wysoce toksycznych dla ryb. Jako integralna część systemu, bądź też jako urządzenia działające niezależnie, instalowane są systemy alarmowe powiadamiające o zagrożeniach takich jak: zmiany pH, przewodności, temperatury, brak zasilania czy zakłócenia cyklu świetlnego. Ryby utrzymywane w warunkach laboratoryjnych mają określony program żywieniowy. Pokarm jest dopasowany do wieku (etapu rozwoju) i rozmiaru ryby. Dominują pokarmy suche w formie granulatów i płatków. Zastosowanie znajdują również pokarmy żywe. Są one cennym źródłem składników odżywczych i urozmaiceniem (polowanie jako przejaw naturalnego zachowania), jednak niosą ryzyko transmisji patogenów drogą pokarmową. Z tego powodu wrotki, pantofelki czy wylęg artemii muszą pochodzić z czystych hodowli – najlepiej prowadzonych przez daną pracownię (z materiału początkowo pozyskanego wyłącznie z autoryzowanych źródeł). Ryby karmione są od 3 do 6 razy dziennie w zależności od ich potrzeb i oceny aktualnego stanu. W dużych pracowniach sprawdzają się automaty do karmienia. Hodowla danio w warunkach laboratoryjnych ma charakter intensywny – cechuje się koniecznością uzyskania jak największej ilości materiału do badań. Przekłada się to na duże zagęszczenie ryb (w USA jest to maks. 10–15 ryb w litrze wody, do 5 ryb według zaleceń UE), konieczność prowadzenia oceny wydajności rozrodczej (indeks tareł) przy jak najniższej śmiertelności ryb dorosłych i narybku, z zachowaniem dobrostanu zwierząt. Pogodzenie tych wszystkich wymogów jest zadaniem trudnym, wymagającym wiedzy hodowlanej i dużego doświadczenia. Należy zwrócić uwagę, że nie tylko nadmierne zagęszczenie zwierząt może być niekorzystne. Danio to ryba o charakterze stadnym i z tego powodu powinna być utrzymywana w grupach liczących co najmniej 6 sztuk. W mniejszych grupach wzrasta

agresja i poczucie strachu, co może negatywnie wpłynąć na dobrostan zwierząt.

Dość interesujący jest proces rozmnażania danio w laboratoriach. U dorosłych osobników na ogół silnie zaznaczony jest dymorfizm płciowy. Samce posiadają zdecydowanie smuklejszą sylwetkę, a ich ubarwienie ma silne akcenty koloru pomarańczowego i niebieskiego, co szczególnie jest widoczne na brzuchu



Ryc.3. Różnorodność fenotypowa u danio pręgowanego. Zdjęcie autorstwa mgr. Michała Bazały.

i płetwach. Samice mają wyraźnie uwydatnioną partię brzuszną, a ubarwienie ma przewagę koloru żółtego i jasno-srebrnego. Nieco trudniejsze jest określenie płci u ryb o odmiennym kolorach w porównaniu do formy dzikiej (Ryc. 3). Szczyt możliwości rozrodczych przypada w przedziale wiekowym 5–10 miesięcy życia. Zapłodnienie jest zewnętrzne. Do pozyskiwania materiału do badań stosuje się najczęściej dwie podstawowe metody rozmnażania – tarła par i tarła grupowe. W obydwu przypadkach, w celu pozyskania zarodków na określonym etapie rozwoju, można zastosować dzielniki (przegrody, po usunięciu których dochodzi do tarła) izolujące samce od samic.

W procesie rozmnażania, oprócz wieku i doskonałej kondycji ryb, bezpośredni wpływ na przystąpienie do tarła ma cykl świetlny (dzień/noc). Ryby najchętniej rozpoczynają tarło w godzinach porannych, tuż po zapaleniu się światła. Ponieważ danio są kanibalami, konieczne jest zabezpieczenie ikry specjalnymi rusztami tarliskowymi, dzięki którym luźno opadająca na dno ikra jest bezpieczna. Samica jednorazowo składa około 100 ziaren ikry. W laboratoriach ikra, o średnicy ok 1,3 mm, jest zbierana na sitkach, płukana, sortowana i dalszy jej rozwój odbywa się w szalkach Petriego wypełnionych w 2/3 swej wysokości wodą. Tempo rozwoju zarodków jest zależne od temperatury. Dla hodowli laboratoryjnej standardem jest, że szalki z zarodkami inkubowane są w cieplarkach, w temperaturze 28,5°C [7]. W takich warunkach pierwszy podział komórkowy trwa ok. 20 min, po 2,5 godzinie zarodek ma 256 komórek, po 33 godzinach widać bijące serce. Po 4–5 dniach od zapłodnienia larwy danio mają ok. 3 mm i stają się zdolne do samodzielnego pobierania pokarmu. Jest to też moment, w którym danio staje się zwierzęciem w myśl ustawodawstwa i w związku z tym, dopiero od tego momentu, wykonanie procedur wymaga zgody komisji etycznej. Dużym wyzwaniem w efektywnej hodowli jest determinacja płci u tej ryby. Danio nie posiada typowych chromosomów płciowych, co powoduje możliwość zmiany płci w zależności od wielu czynników (zjawisko znane również u innych ryb i owadów). Wiadomym jest, że temperatura, wartość pH, zagęszczenie, rodzaj pokarmu i częstotliwość jego podawania, poziom hormonów i zaburzających ich działanie bisfenoli z pochodnymi (uwalniane z plastików) mogą mieć wpływ na segregację płci danio. Niestety nadal nie istnieje sposób na pełne kontrolowanie tego procesu, dlatego w hodowlach laboratoryjnych zawsze utrzymuje się więcej zwierząt niż pojedyncze pary. Hodowla danio na ogół bazuje na ciągłym odnawianiu linii. Związane jest to z koniecznością zabezpieczenia ciągłości prac badawczych. Utrzymywanie dużych ilości ryb, które nie są aktualnie użytkowane, a mogą być potrzebne w przyszłości, bardzo obciąża budżet zwierzętarni. Rozwiązaniem tego problemu, jak również doskonałym zabezpieczeniem linii hodowlanych, jest wprowadzenie bankowania nasienia. Procedura ta wymaga dużego doświadczenia manipulacyjnego (pobieranie nasienia metodą przyżyciową lub pośmiertną) oraz doskonałej znajomości procedur konserwacji i przechowywania w ciekłym azocie. Mrożenie oocytów i zarodków, zabiegi stosowane np. u myszy, nie są dopracowane i w obecnej chwili nie znajdują z tego powodu zastosowania w hodowli laboratoryjnej danio.

Powiedzenie „zdrowy jak ryba” jest bardzo zwodnicze. Istnieje kilka jednostek chorobowych stanowiących poważne zagrożenie dla danio pręgowanego. Zakażenia wirusowe, bakteryjne, grzybicze i pasożytnicze muszą być kontrolowane w hodowlach dbających o wysoki standard utrzymania zwierząt. W przypadku hodowli zwierząt laboratoryjnych standardy i wymagania są wyjątkowo wysokie, ponieważ oprócz aspektów ekonomicznych, potencjalnego zagrożenia dla ludzi (choroby odzwierzęce), stan zdrowia zwierząt może bezpośrednio wpływać na wyniki badań. Aby zapewnić dobrostan zwierząt i najwyższą jakość materiału badawczego, tworzone są programy ochrony zdrowia określające częstość i charakter badań wykonywanych w celu wykrycia patogenów oraz plan zwalczania zagrożeń w przypadku potwierdzenia obecności czynników chorobotwórczych. Rutynowe badania mogą być wykonywane w ośrodku macierzystym. Natomiast jeśli placówka nie dysponuje odpowiednim zapleczem ludzkim i laboratoryjnym, bądź chce potwierdzić wyniki, warto co 6–12 miesięcy wykonać badania w autoryzowanych, zewnętrznych laboratoriach diagnostycznych. Ocena wyników oraz porównawcze zestawienia z dłuższego okresu pozwalają na opracowanie prognozy ułatwiającej dalsze działania zapewniające sprawne funkcjonowanie akwakultury.

Dla ryb danio pręgowany profile diagnostyczne obejmują najczęściej bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, z których szczególnie niebezpieczne dla ryb oraz ludzi są *M. marinum*, *M. fortuitum* i *M. haemophilum* oraz takie bakterie jak: *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas spp./Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* oraz pasożyty jednokomórkowe, takie jak *Microsporidia* (*Pseudoloma neurophilia* i *Pleistophora hyphessobronicis*) i nicienie jelitowe (*Pseudocapillaria tomentosa*). Oprócz wymienionych czynników, umieszczonych w podstawowych profilach diagnostycznych, należy pamiętać, że zagrożenie dla danio laboratoryjnych może dodatkowo stanowić wiele innych patogenów występujących w amatorskiej hodowli ryb ozdobnych lub hodowlanych. W hodowlanej praktyce laboratoryjnej, w związku z ryzykiem transmisji zakażeń, nie stosuje się naturalnych podłoży akwarystycznych, żywych roślin oraz niewskazane jest utrzymanie ślimaków i innych organizmów wodnych. Z tego samego powodu nie wolno stosować żywych i mrożonych pokarmów akwarystycznych. Nie należy zapominać o warunkach środowiskowych, których gwałtowne wahania mogą obniżyć wydajność układu immunologicznego ryb i spowodować wystąpienie chorób. Także zmiany genetyczne wielu linii mogą

mieć bezpośredni wpływ na ich odporność. Nadal prowadzona jest dyskusja co do zasadności leczenia zwierząt laboratoryjnych, w tym także danio przegowanego. Głównymi argumentami „za” są wymogi prawne dotyczące zapewniania dobrostanu i właściwego traktowania oraz chęć utrzymania szczególnie cennych ryb, które akurat zachorowały. „Przeciw” leczeniu przemawia to, że nieprzewidywalnym jest wpływ leków na organizm modelowy (przyjmuje się, że nawet drugie pokolenie może nosić ślad działań farmakologicznych). Bardzo duże znaczenie ma prawidłowe przeprowadzanie kwarantanny nowoprzybytych linii. Do systemu głównego akwakułury laboratoryjnej może trafić jedynie potomstwo ryb przebywających w kwarantannie i uznanych za zdrowe. Bezwzględny warunkiem bezpieczeństwa jest skuteczne odkażanie ikry od nich pochodzącej. Należy mieć świadomość, że istnieją choroby, przed których przeniesieniem nie uchroni nas ani zwykła kwarantanna ani odkażanie ikry. Nie ma na te choroby skutecznych lekarstw. W przypadku danio przegowanego, doskonałym przykładem tego problemu jest zakażenie *Pseudoloma neurophilia* – szczególnie

niebezpieczny pasożyt układu nerwowego [6]. W przypadkach innych chorób, np. infekcji *Mycobacterium spp.*, pomimo istnienia znanych i skutecznych leków, konstrukcja systemów używanych do hodowli danio uniemożliwia skuteczną terapię.

Pracownia Hodowli Ryb Danio („Zebrafish Core Facility”) w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie powstała jako baza projektu FishMed, kierowanego przez Dyrektora Instytutu prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego. Po zakończeniu realizacji projektu jest największym w Polsce licencjonowanym obiektem tego typu. Obecnie dysponuje tysiącem akwariów, gdzie hodowane jest około 17 tysięcy ryb, reprezentujących ponad 100 linii dzikich, transgeniczných oraz zmutowanych. Z Pracowni tej korzysta 8 grup badawczych z MIBMiK oraz użytkownicy zewnętrzni, głównie z innych ośrodków warszawskich oraz z Olsztyna i Poznania. Wzrastające zainteresowanie polskich naukowców wykorzystaniem tego przydatnego w badaniach biomedycznych modelu niesie nadzieję na dalszy rozwój Pracowni i innych rybich zwierzętarni w różnych placówkach w naszym kraju.

Bibliografia:

1. Ahrens M. B., Orger M. B., Robson D. N., Li J. M., Keller P. J.. 2013. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature Methods* 10, 413–420.
2. Antinucci P., Hindges R. 2016. A crystal-clear zebrafish for in vivo imaging. *Scientific Reports* 6: 29490.
3. Howe K., Clark M. D., Torroja C. F., Torrance J., Berthelot C., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
4. Li J., Zhang B., Bu J., Du J. 2015. Intron-based genomic editing: a highly efficient method for generating knockin zebrafish. *Oncotarget*. 6(20): 17891–17894.
5. Nüsslein-Volhard Ch. 2012. The zebrafish issue of *Development*. *Development* 139: 4099–4103.
6. Spagnoli S. T., Xue L., Murray K. N., Chow F., Kent M. L.. 2015. *Pseudoloma neurophilia*: A Retrospective and Descriptive Study of Nervous System and Muscle Infections, with New Implications for Pathogenesis and Behavioral Phenotypes. *Zebrafish*. 12(2): 189–201.
7. Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

PRZYŻYCIOWE BADANIA NAD FUNKCJONOWANIEM MÓZGU PRZY UŻYCIU MIKROSKOPII SPIM

Michał Bazala, Justyna Jędrychowska, Jacek Kuźnicki (Warszawa)



Streszczenie

Dynamiczny rozwój inżynierii genetycznej i technologii optycznych pozwala na coraz dokładniejszą obserwację skomplikowanych procesów biologicznych *in vivo*. Stwarza to nowe możliwości poszukiwania terapii dla starzejącej się populacji ludzkiej, wśród której powszechniejsze stają się choroby neurodegeneracyjne. Mechanizmy leżące u podstaw chorób, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona mogą być analizowane bezpośrednio w odpowiednim modelu zwierzęcym, identyfikując interakcje w złożonym systemie tkanek i komórek oraz sprawdzając wpływ potencjalnych leków. Wnioski wynikające z takich obserwacji okazują się czasami inne, niż te wynikające z badań prowadzonych jedynie na hodowlach komórkowych. W poniższym opracowaniu podajemy przykłady naszych doświadczeń w oparciu o model ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*), uzyskane przy pomocy ultranowoczesnego mikroskopu typu SPIM (ang. *single plane illumination microscopy*). Szybkość zbierania danych rzędu 100 Hz, wysoka rozdzielczość obrazu oraz niska fototoksyczność pozwalają na obrazowanie pracy mózgu przezroczystych larw ryby podczas długotrwałych eksperymentów przyżyciowych. Takie badania otwierają nowe możliwości do głębszego poznania funkcjonowania układu nerwowego, zrozumienia jego dysfunkcji i identyfikacji potencjalnych leków.

Abstract

The dynamic development of genetic and optical engineering leads to more precise observation of biological processes *in vivo*. This opens new opportunities for developing successful therapies of neurodegenerative diseases that become serious problem among the aging population. The mechanisms underlying diseases such as Alzheimer's and Parkinson's may now be analysed directly in particular animal model, identifying interactions in a complex system of tissues and cells and impact of chemicals as potential drugs. The conclusions of such observations sometimes appear to be different than those from studies conducted using only cell cultures. In this article we present examples of our research, based on the zebrafish (*Danio rerio*) model using the cutting edge SPIM (selective plane illumination microscopy) microscope. It allows imaging the brain of transparent larval fish during prolonged experiments, since its rate of acquisition is approximately 100 Hz, it has high image resolution and low phototoxicity. These types of research open new opportunities to profound understanding of the nervous system mechanisms and its dysfunctions, and to identify potential drugs.

Choroby mózgu – wyzwaniem XXI wieku

Liczba osób zapadających na choroby mózgu znacząco wzrasta. Jednym z powodów jest wydłużenie się życia ludzi, co prowadzi do zwiększenia liczby osób z chorobą Alzheimera (AD) i Parkinsona (PD). Ponadto styl i tempo życia zwiększają liczbę przypadków urazów głowy (TBI), chorób psychicznych i innych

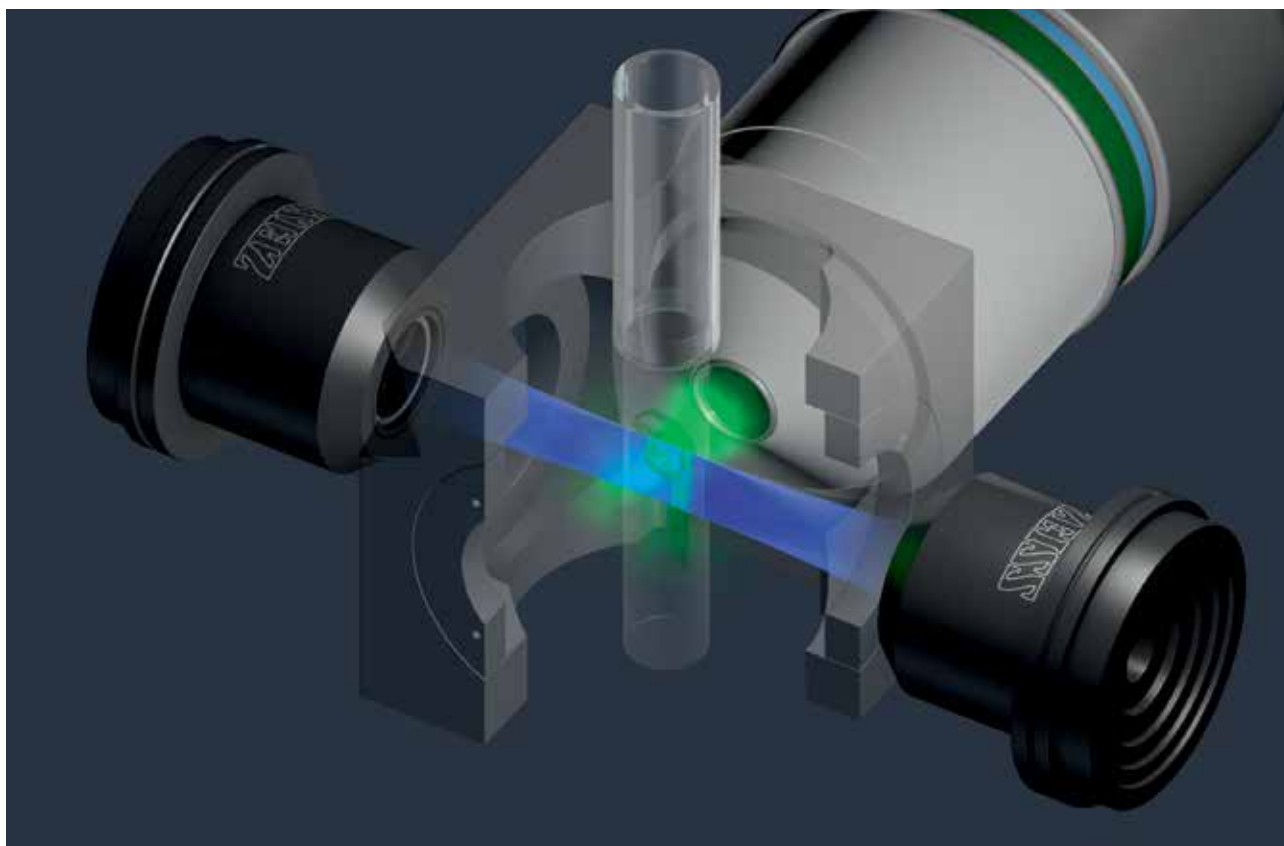
patologii mózgu. Zrozumienie ich mechanizmów jest kluczowe do znalezienia sposobu na zapobieganie lub przynajmniej opóźnianie pojawienia się AD i PD, zwalczanie skutków TBI i udarów oraz leczenia chorób psychicznych. Od kilkunastu lat zintensyfikowano badania mózgu, w szczególności sieci neuronalnych oraz molekularnych procesów zachodzących w układzie nerwowym. Stało się to możliwe

dzięki zaangażowaniu większych środków finansowych oraz rozwojowi nowych, wyrafinowanych technologii. W artykule opisujemy zastosowanie do badania mózgu nowoczesnych technik biologii molekularnej w połączeniu z ultranowoczesną mikroskopią.

Genetycznie kodowane sondy wapniowe, mikroskop SPIM i ryba danio pręgowany

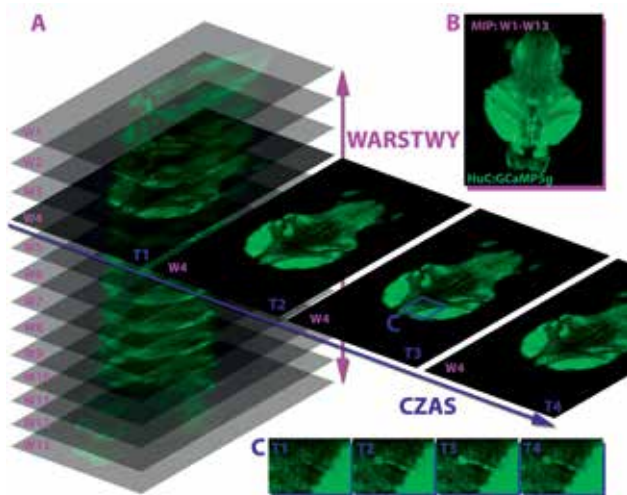
Jeszcze kilkanaście lat temu obserwacja *in vivo* sieci neuronów kręgowców, przesyłających impulsy nerwowe, była domeną filmów *science fiction*. Sytuacja zmieniła się radykalnie dzięki zastosowaniu dwóch zasadniczych osiągnięć. Po pierwsze stworzono genetycznie kodowane białkowe sondy fluorescencyjne, które zmieniają fluorescencję pod wpływem zmian poziomu jonów wapnia w komórce (ang. GECI – *genetically encoded calcium indicator*) lub zmian napięcia (ang. GEVI – *genetically encoded voltage indicator*), wskazując na aktywne komórki nerwowe [2, 13]. Reakcje te trwają ułamki sekundy, a do ich rejestracji niezbędny jest drugi wynalazek – mikroskop fluorescencyjny z możliwością sekcjonowania optycznego, czyli uzyskiwania obrazów fluorescencyjnych markerów tylko z wybranej płaszczyzny ogniskowania. Istnieje kilka metod

sekcjonowania optycznego: mikroskopia konfokalna, dwufotonowa, TIRF, a także przedmiot niniejszego artykułu – mikroskopia SPIM (ang. *single plane illumination microscopy*, jednopłaszczyznowa mikroskopia świetlna). Jedną z zalet mikroskopii SPIM jest czas ekspozycji porównywalny do pojedynczego impulsu nerwowego (około 1 ms–100 ms). Urządzenie tego typu jest w stanie zobrazować w ciągu kilku milisekund cały kadr, np. wybraną część mózgu, a nie tak, jak w przypadku mikroskopii konfokalnej czy dwufotonowej, poprzez czasochłonne skanowanie pojedynczych linii kadru [1, 6]. Przy obrazowaniu mózgu żywych organizmów niezbędne jest też ominięcie przez światło lasera fizycznej bariery, jaką tworzą kości czaszki. Niestety w przypadku gryzoni laboratoryjnych nie jest to możliwe bez naruszania struktury szkieletu. O wiele łatwiej jest natomiast zobrazować organy mniejszego i przezroczystego zwierzęcia, które rozwija się poza organizmem matki już od chwili zapłodnienia. Takim organizmem jest np. ryba danio pręgowany (łac. *Danio rerio*, ang. *zebrafish*). Przez pierwsze dni życia jej szkielet i skóra są wystarczająco cienkie i przezroczyste, aby mogły być łatwo penetrowane przez światło lasera o małej mocy. Wyniki uzyskane z takich badań mają znaczenie dla zrozumienia procesów zachodzących u ssaków,



Ryc. 1. Wiązka lasera (kolor niebieski) w kształcie prostokąta wzbudza jednocześnie cały obszar obiektu obrazowanego prostopadłe. Ciemne cylindry to obiektywy wzmacniające, które skupiają światło lasera. Szary cylinder to obiektyw rejestrujący fluorescencję. Obraz wykorzystany za zgodą firmy Carl Zeiss Jena GmbH.

ponieważ danio wykazuje do nich duże podobieństwo genetyczne, np. posiada ponad 70% odpowiedników ludzkich genów.



Ryc. 2. Grafika przedstawia sposób, w jaki zbierane są dane o aktywności mózgu ryby. Neurony ryby są wyznakowane sondą GCaMP5G, wrażliwą na zmiany poziomu wapnia. W części A pokazane są kolejne warstwy przekroju mózgu (od W1 do W13). Czas potrzebny na wykonanie zdjęcia takiej pojedynczej warstwy to około 10 ms. Mikroskop wykonuje te zdjęcia w kolejnych punktach czasowych (T1-T4), dzięki temu widzimy zmiany w czasie, w różnych częściach mózgu. Widok połączonych wszystkich warstw z jednego okresu czasowego w formie MIP (ang. maximum intensity projection) przedstawia część B. W części C powiększony został wycinek mózgu ze zdjęcia W4-T3, który pokazuje wzbudzenie pojedynczego neuronu.

Zasada działania mikroskopu SPIM

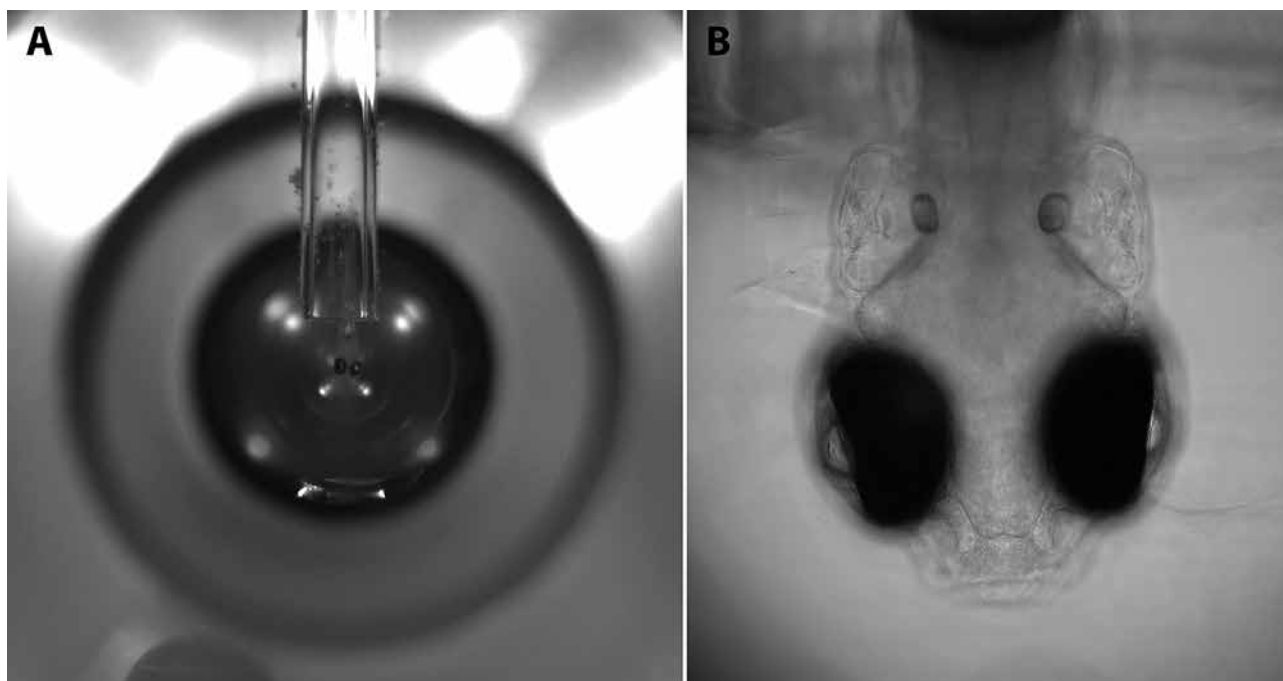
Najważniejszą ideą mikroskopii, do której zalicza się omawiany SPIM, zwaną mikroskopią *light sheet* (w wolnym tłumaczeniu – arkusz światła), jest sposób, w jaki światło lasera pada na analizowany materiał. Nazwa „arkusz światła” pochodzi od tego, że wiązka lasera rozpostarta jest na wybranej płaszczyźnie obrazowania. Płaszczyzna ta wzbudza

w jednym momencie cały wybrany kadr, a detekcja odbywa się prostopadle do wiązki lasera (Ryc. 1). Dzięki takiej konstrukcji unika się niepożądanego naświetlania obszarów spoza płaszczyzny detekcji, co umożliwia sekcjonowanie optyczne oraz radykalnie zmniejsza fototoksyczność i wyświecanie markerów fluorescencyjnych. Mikroskopia SPIM cechuje się też bardzo wysoką rozdzielczością czasową, a zastosowanie kilku linii laserów i dwóch kamer daje praktyczną możliwość jednoczesnego obrazowania różnych wyznakowanych typów tkanek lub komórek tego samego obiektu w jednym polu widzenia. Zaawansowane mechanizmy pozycjonowania badanego obiektu dają z kolei sposobność obrazowania przyległych regionów, kosztem nieznacznie wydłużonego odstępu pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi. Dzięki temu otrzymuje się obraz struktury przestrzennej dynamicznie zmieniającej się w czasie (Ryc. 2). Dodatkowo, jeśli obiekt wymaga obrazowania dużej powierzchni, można użyć wiązki lasera padającej niezależnie z lewej i prawej strony. Powstałe dwa obrazy są później poddawane komputerowej fuzji, stając się wypadkową ich dwóch składowych (Ryc. 3).

W Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (MIBMiK) prowadzone są badania nad rybą danio przy użyciu mikroskopu Lightsheet Z.1 firmy Carl Zeiss Jena GmbH. Sprzęt ten pozwala na prowadzenie badań przyżyciowych na rybach lub innych organizmach, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych, o rozmiarach nieprzekraczających jednego centymetra. Badany obiekt jest unieruchamiany w agarozie o niskim współczynniku topnienia, znajdującej się w mikrokapilarze i następnie zanurzany w komorze wypełnionej fizjologicznym roztworem (Ryc. 4). Niewielkie organizmy przeżywają w takim układzie nawet kilka dni, ponieważ tlen i inne substancje niezbędne do życia dyfundują przez cienką warstwę agarozy. W celu



Ryc. 3. Zdjęcie przedstawia kilkanaście 5-dniowych ryb wyznakowanych sondą GCaMP5G, która znajduje się w ich neuronach. Dzięki możliwości wzbudzenia materiału z dwóch stron (ILUMINACJA LEWA i PRAWA) otrzymujemy kompletny obraz (FUZJA), nawet jeśli poszczególne obiekty zasłaniają się wzajemnie. Strzałki wskazują na struktury, które są poprawnie obrazowane jedynie od strony, z której pada światło lasera. Linia skali na zdjęciu odpowiada 0,5 cm.



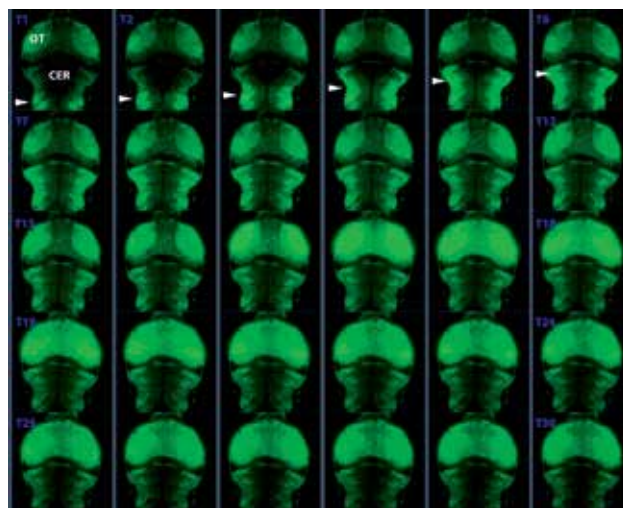
Ryc. 4. Część A przedstawia wnętrze komory mikroskopu widziane z kamery, która pozwala m.in. na sprawdzenie, czy próbka została poprawnie zamontowana. W centrum kadru znajdują się głowa 5-dniowej ryby, zamocowanej w szklanej mikrokapilarze, a w tle widoczna jest soczewka obiektywu obrazującego. Część B przedstawia powiększenie głowy ryby, widziane przez obiektyw obrazujący.

utrzymania takich samych parametrów doświadczeń, podczas ich trwania kontrolowana jest temperatura i poziom dwutlenku węgla w otoczeniu. Z kolei wykorzystanie laserów o niskiej mocy i wysoko czułych kamer sCMOS sprawia, że obrazowanie nie powoduje fototoksyczności i obiekt może być naświetlany wielokrotnie w ciągu jednego doświadczenia.

Zastosowanie mikroskopii SPIM w biologii

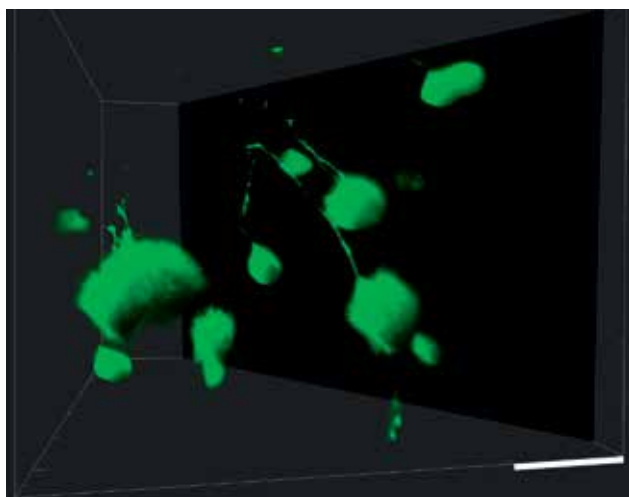
Opisane wcześniej możliwości pozwalają na przeprowadzenie całego wachlarza skomplikowanych eksperymentów *in vivo*. Dzięki zaawansowanym technologiom inżynierii genetycznej można w stosunkowo krótkim czasie stworzyć transgeniczną linię danio, która ma fluorescencyjnie wyznakowaną wybraną przez nas tkankę lub typ komórek. Takie linie danio pręgowanego są intensywnie wykorzystywane w badaniach embriologicznych do śledzenia zmian struktur i migracji komórek. W 2008 roku przy pomocy mikroskopii SPIM został pokazany 24-godzinny rozwój całego rybiego embrionu [7]. Szlaki, w jakich układały się komórki podczas kolejnych faz embriogenezy, zostały dokładnie prześledzone na podstawie trajektorii poszczególnych fluorescencyjnie wybarwionych jąder komórkowych. Rozwój ponad 55 milionów komórek został udostępniony jako film w serwisie YouTube [<https://www.youtube.com/watch?v=3xh441Wdv84>].

W Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK prowadzimy badania nad zmianami rozwojowymi spowodowanymi zaburzoną gospodarką wapniową w komórkach układu nerwowego, m. in. w modelu rodzinnej postaci choroby Parkinsona. Ten model *D. rerio* posiada nieaktywny gen *pink1* (*PTEN-induced putative kinase 1*). Powoduje to między innymi utratę około 20% neuronów dopaminergicznych (ND) [3]. Utrata części ND jest cechą charakterystyczną choroby Parkinsona u ludzi. Nasze ostatnie badania wyka-



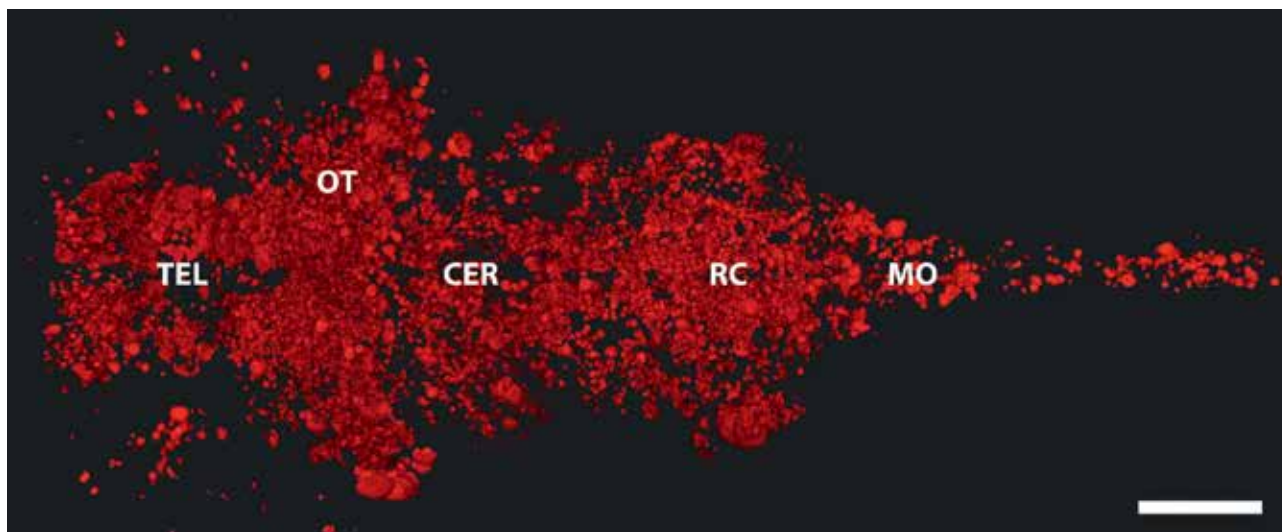
Ryc. 5. Kolejne zdjęcia (T1, T2...T30) przedstawiają falę wapniową rozchodzącą się w mózgu 5-dniowej ryby po indukcji kwasem glutaminowym. Różnica czasu pomiędzy nimi to 0,8 sekundy. Białe strzałki pokazują obszary, w których pojawia się wypływ wapnia do cytoplazmy, powodujący zwiększoną fluorescencję sondy GCaMP5G. OT – *optic tectum*; CER – *cerebellum*.

zały, że inaktywacja kanału wapniowego MCU (ang. *mitochondrial calcium uniporter*) niweluje zanik ND [12]. W związku z tym obecnie analizujemy stan mitochondriów i parametry homeostazy wapniowej w neuronach mutantów *pink1*. W celu zaobserwowania potencjalnych zmian w aktywności neuronów mierzonych na podstawie zmian poziomu jonów wapnia, skrzyżowaliśmy rybę *pink1*^{-/-} z linią posiadającą w neuronach sondę GCaMP5G [1], wrażliwą na zmiany poziomu jonów wapnia. Przy użyciu mikroskopii SPIM obserwujemy wzrost stężenia jonów wapnia w neuronach pod wpływem kwasu glutaminowego i porównujemy to zjawisko w linii dzikiej i w linii z mutacją w *pink1* (Ryc. 5).



Ryc. 6. Zdjęcie przedstawia neurony w tyłomózgowiu 3-dniowej ryby, w których występuje ekspresja białka fuzyjnego β-kateniny-GFP. Obiekty zostały przedstawione w formie cieniowanego renderowania 3D z rzutem perspektywicznym. Podziałka w prawym, dolnym rogu zdjęcia odpowiada 0,1 mm i zmienia się wraz z rzutem perspektywy.

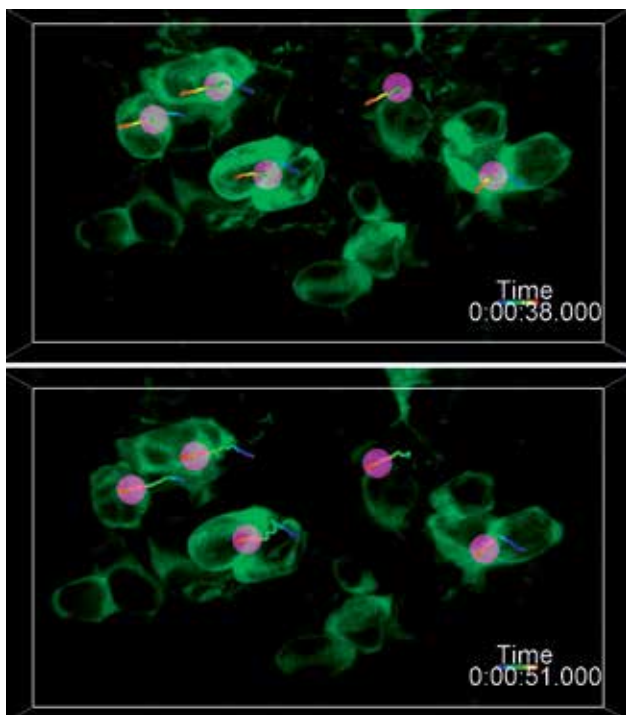
Mikroskopia SPIM może być również wykorzystywana do śledzenia zmian zachodzących w głównych szlakach sygnałowych żywych organizmów, co jest niezwykle istotne w przypadku poszukiwania przyczyn powstawania chorób człowieka. Funkcjonowanie ścieżki sygnałowej Wnt [11] jest kluczowe podczas embriogenezy, różnicowania komórek i rozwoju tkanek organów, w tym mózgu ssaków [9]. Różne badania wskazują na powiązanie nieprawidłowości w działaniu tego szlaku z występowaniem ludzkich chorób nowotworowych [5] i zaburzeń psychicznych, w tym choroby afektywnej dwubiegunowej [14]. Przy użyciu stworzonych w Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK transgenicznym linii *D. rerio* będziemy analizować dystrybucję głównych białek szlaku Wnt, jakimi są β-katenina oraz związany z nią czynnik transkrypcyjny TCF7L2 (ang. *transcription factor 7-like 2*, czynnik transkrypcyjny limfocytów T). Jedna linia ryb wykazuje ekspresję białka fuzyjnego β-kateniny-GFP (ang. *green fluorescent protein*), a druga linia – ekspresję czynnika *tcf7l2* z czerwonym fluoroforem *mCherry*. Ta ekspresja jest komórkowo specyficzna, bo występuje w neuronach tych linii dzięki użyciu odpowiedniego promotora (promotor HuC). Na Ryc. 6 przedstawiono pojedyncze neurony 3-dniowej, transgenicznej larwy danio, zawierające wyznakowaną na zielono β-kateninę. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego *tcf7l2* w jądrach komórek układu nerwowego 5-dniowej ryby reprezentowana jest przez czerwoną fluorescencję pochodzącą od *mCherry* (Ryc. 7). W przyszłości linie te można będzie wykorzystać do badań zmian w neuronach, wynikających z dysfunkcji ścieżki Wnt.



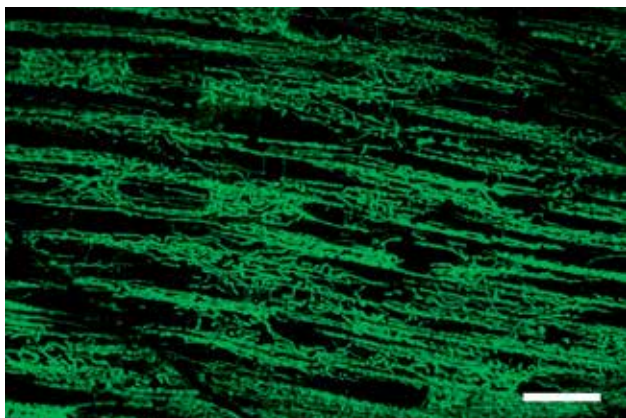
Ryc. 7. Zdjęcie przedstawia struktury w mózgu 5-dniowej larwy danio, w których zachodzi ekspresja jądrowego czynnika transkrypcyjnego *tcf7l2*. TEL – telencephalon; OT – optic tectum; CER – cerebellum; RC – rhombencephalon; MO – medulla oblongata. Podziałka w prawym, dolnym rogu zdjęcia odpowiada 0,1 mm.

Analiza danych mikroskopowych

Po wykonaniu obrazowania mikroskopowego kolejnym krokiem jest analiza otrzymanych danych. Format, w jakim je uzyskujemy, to zbiór obrazów przedstawiających fluorescencję o różnej intensywności. Oprócz wstępnej wizualnej oceny nie możemy na tym etapie wysnuć dodatkowych wniosków. Dlatego też obrazy te są poddawane analizie w progra-



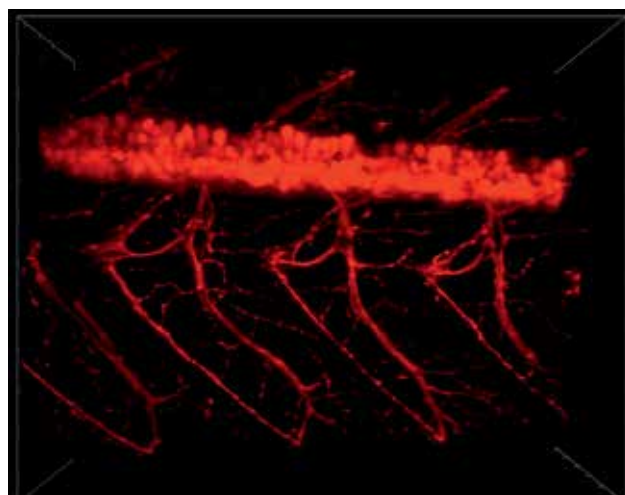
Ryc. 8. Podczas obrazowania obiektów *in vivo* częstym zjawiskiem jest ich dryf lub zmiana pozycji pod wpływem skurczów mięśni. Na poniższym przykładzie widać jaką drogę (tęczowa linia) przebyły w ciągu 13 sekund wyselekcjonowane neurony. Dzięki szybkości mikroskopu SPIM śledzony obszar obejmował około 40 warstw i neurony pozostały w kadrze pomimo przemieszczenia.



Ryc. 9. Zdjęcie przedstawia sieci mitochondrialne w mięśniach szkieletowych 5-dniowej ryby. Obszar obejmuje szerokość jednego segmentu ogona. Podziałka w prawym dolnym rogu zdjęcia odpowiada 10 μm .

mach takich jak ImageJ lub Bitplane Imaris. Dzięki odpowiednim algorytmom informacja, którą tworzy fluorescencja, jest zamieniana na wirtualne obiekty

3D, dla których można określić różne parametry. Uzyskujemy wtedy informacje o rozmiarach, objętości, powierzchni, kształtach (kuliste, elipsoidalne, rozgałęzione itp.), wzajemnym położeniu czy intensywności fluorescencji badanych struktur. Dodatkowo, po zidentyfikowaniu fluorescencyjnego obiektu, istnieje możliwość automatycznego śledzenia go w czasie i przestrzeni, co jest niezbędne np. w analizie skurczów mięśni czy monitorowaniu zachowania



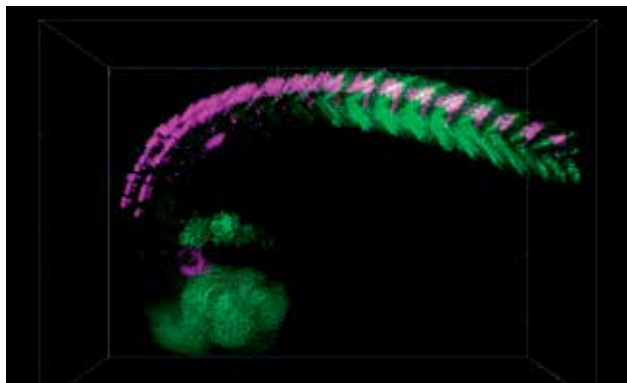
Ryc. 10. Zdjęcie przedstawia strukturę neuronów motorycznych w rejonie ogona 5-dniowej ryby. Charakterystyczne struktury w kształcie litery V wyznaczają granice pomiędzy kolejnymi segmentami ogona. Z gęsto upakowanych ciał neuronów w rdzeniu kręgowym odchodzą aksony zakończone płytkami nerwowo-mięśniowymi. Obraz został przedstawiony w formie MIP z rzutem perspektywnym.

makrofagów. Śledzenie neuronu przemieszczającego się pod wpływem skurczu mięśni, z jednoczesnym rejestrowaniem zmiany stężenia poziomu wapnia w cytoplazmie, przedstawia Ryc. 8. Tęczowa linia obrazuje drogę, którą pokonał monitorowany obiekt – wyznakowany neuron. Innymi przykładami wizualizacji są wybarwione neurony motoryczne w transgenicznej linii *Tg(mnx1:tRFP)* (Ryc. 9) oraz mitochondria w linii *Tg(Xla.Eef1a1:mlsEGFP)* (Ryc. 10) [8]. Linie transgeniczne można krzyżować, otrzymując kilka fluoroforów w jednym organizmie. Dwie powyższe linie zostały skrzyżowane, czego wynikiem jest linia, w której możemy jednocześnie obserwować fluorescencyjne neurony i mitochondria (Ryc. 11).

Prognozy rozwoju technologii mikroskopowych do badania mózgu

Technologia mikroskopii *light sheet* wciąż się rozwija i chociaż już można mówić o ogromnym ułatwieniu szybkiego obrazowania dużych obiektów, to wciąż należy udoskonalić kilka jej cech. Główną wadą podstawowych wersji tych mikroskopów jest rozdzielczość obrazu ustępująca najnowszym mikroskopom

konfokalnym. Jest to spowodowane tym, że obrazowanie próbki pod kątem prostym do padającego lasera pozostawia po „ciemnej stronie” obrazowanego obiektu artefakt wynikający z dyfrakcji. Jest on później korygowany



Ryc. 11. Larwa 24-godzinnej ryby z wyznakowanymi neuronami motorycznymi (magenta) i mitochondriami (zielony). Obraz został przedstawiony w formie MIP z rzutem perspektywicznym.

ny przez algorytmy komputerowe, ale tylko częściowo. Drugą wadą jest niewystarczająca możliwość penetracji gęstych i głęboko położonych struktur. Prowadzone są badania, by wyeliminować te wady poprzez sprzężenie

technologii mikroskopii *light sheet* z innymi typami mikroskopii o bardzo wysokiej rozdzielczości. Najbardziej obiecującą fuzją wydaje się być wykorzystanie technologii super-rozdzielczości, takich jak STED (ang. *stimulated emission depletion microscopy*), za którą w 2014 roku przyznano nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [4]. Dzięki tym przełomowym odkryciom przekroczony został limit dyfrakcyjny. Technologia STED opiera się na selektywnej dezaktywacji fluoroforów poprzez zastosowanie dodatkowej wiązki lasera w formie pierścienia, która wygasza rozproszoną fluorescencję wokół obrazowanego punktu. Konstruowane są też coraz szybsze i bardziej czułe kamery, które pozwalają na jednoczesne śledzenie najkrótszych impulsów nerwowych z coraz większych obszarów mózgu. Możliwe będzie dzięki temu zbudowanie behawioralnych map interakcji pomiędzy neuronami w całym układzie nerwowym [10].

Pragniemy podziękować dr Tomaszowi Węgierskiemu za pomoc w redagowaniu niniejszego artykułu oraz całemu zespołowi Pracowni Hodowli Ryb Danio w MIBMiK za opiekę nad rybami wykorzystywanymi do badań.

Bibliografia

1. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ. (2013). Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Meth.* 10, 413–420.
2. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
3. Flinn LJ, Keatinge M, Breaud S, et al. (2014). TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Ann Neurol.* 74, 837–847.
4. Friedrich M, Gan Q, Ermolayev V, Harms GS. (2011). STED-SPIM: Stimulated Emission Depletion Improves Sheet Illumination Microscopy Resolution. *Biophys J.* 100, L43–L45.
5. Giles RH, van Es JH, Clevers H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1653, 1–24.
6. Keller PJ, Schmidt AD, Santella A, et al. (2010). Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nat Meth.* 7, 637–642.
7. Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EHK. (2008). Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science* 322, 1065.
8. Kim MJ, Kang KH, Kim C-H, Choi S-Y. (2008). Real-time imaging of mitochondria in transgenic zebrafish expressing mitochondrially targeted GFP. *BioTechniques.* 45, 331–334.
9. Kim W-Y, Snider WD. (2011). Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. *Front Mol Neurosci.* 4, 44.
10. Randlett O, Wee CL, Naumann EA, et al. (2015). Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nat Meth.* 12, 1039–1046.
11. Sharma RP, Chopra VL. (1976). Effect of the wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 48, 461–465.
12. Soman S, Keatinge M, Moein M, DaCosta M, Mortiboys H, Skupin A, Sugunan S, Bazala M, Kuznicki J, Bandmann O. (2016). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) rescues dopaminergic neurons in *pink1*^{-/-}-zebrafish. *Eur J Neurosci*, Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/ejn.13473.
13. St-Pierre F, Marshall JD, Yang Y, Gong Y, Schnitzer MJ, Lin MZ. (2014). High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat Neurosci.* 17, 884–889.
14. Valvezan AJ, Klein PS. (2012). GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci.* 5, 1.

OKIEM RYBY – NOWE SPOJRZENIE NA ROZWÓJ SIECI NEURONALNYCH I CHOROBY NEUROROZWOJOWE



Magdalena Kędra, Jacek Jaworski, Justyna Zmorzyńska (Warszawa)*

Streszczenie

Komórki nerwowe, będące podstawową jednostką funkcjonalną układu nerwowego, łączą się we współpracujące zespoły, zwane sieciami neuronalnymi. Ich powstawanie jest złożonym i ściśle kontrolowanym procesem, który dopiero od niedawna możemy badać równocześnie na wielu poziomach w żywych organizmach dzięki postępowi technicznemu i zastosowaniu nowych modeli badawczych. Dobrym przykładem takiego modelu jest rozwijająca się siatkówka oka *Danio* przegowanego, małej słodkowodnej ryby powszechnie wykorzystywanej w badaniach biologii rozwoju. Zaburzenia rozwoju sieci neuronalnych stanowią ważną przyczynę chorób neurorozwojowych. Dlatego coraz częściej *Danio* przegowany jest wykorzystywany do badań nad podłożem komórkowym tych chorób. Niniejszy artykuł omawia przykłady nowych informacji, jakie uzyskano na temat prawidłowego i patologicznego rozwoju sieci neuronalnych studiując siatkówkę oka *Danio* przegowanego.

Abstract

Neurons, which are the basic functional unit of the nervous system, form cell ensembles, called neural networks. Their formation is a complex and highly controlled process, which only recently we can study at multiple levels simultaneously in living organisms, thanks to technological advances and the application of new research models. A good example of such a model is developing retina of zebrafish, a small freshwater fish commonly used in studies of developmental biology. Developmental disturbances of neural networks formation are an important cause of neurodevelopmental disorders. Therefore, more and more zebrafish is used for research of these diseases. This article discusses examples of new information that was obtained on the normal and pathological development of neural networks studying the zebrafish retina.

Podziękowania

Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej zostały sfinansowane w ramach projektów SONATA9 (2015/17/D/NZ3/03735) oraz “Fishmed” (FP7 grant nr 316125).

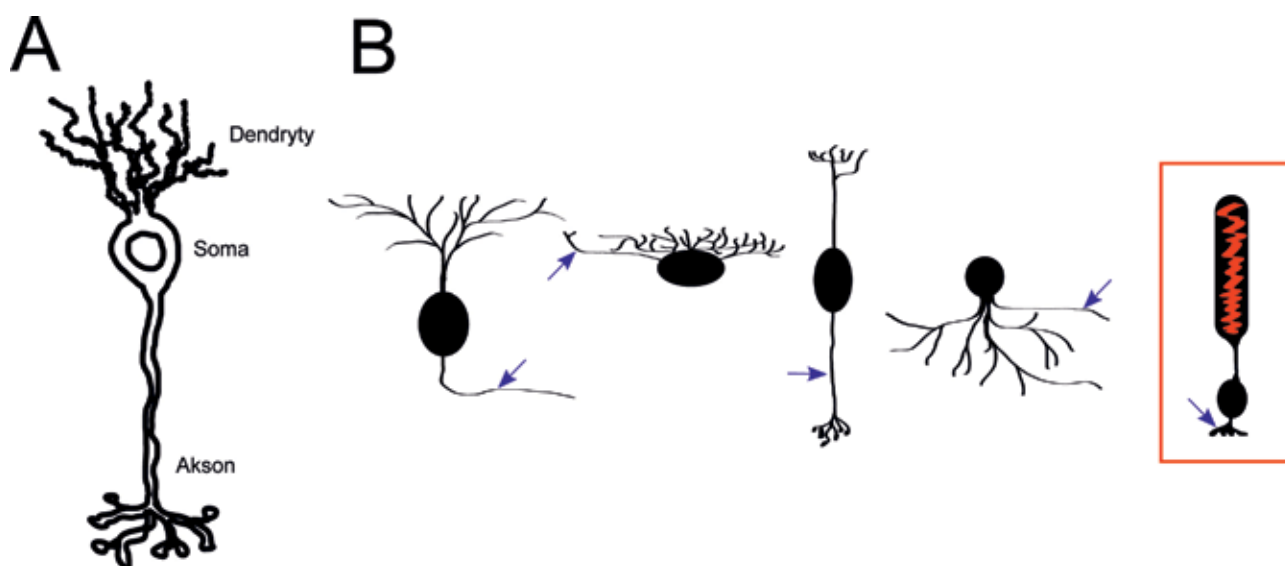
Neurony (komórki nerwowe) stanowią podstawową jednostkę funkcjonalną układu nerwowego. Poszczególne neurony mogą się wzajemnie komunikować, a grupy połączonych komórek nerwowych tworzą sieci neuronalne, odpowiedzialne za przetwarzanie konkretnych informacji i poszczególne działania układu nerwowego. Współdziałanie wielu sieci neuronalnych odpowiada za tak złożone procesy jak integracja bodźców docierających do organizmu ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego oraz reakcja na nie, czy też uczenie się i formowanie pamięci.

Kształt (morfologia) neuronów decyduje, jakie połączenia neuronalne stworzy dana komórka. Istnieje

wiele typów neuronów, pełniących różne funkcje, które odzwierciedla ich zróżnicowana morfologia. W większości komórek nerwowych można wyróżnić trzy podstawowe elementy: ciało komórki (soma), dendryty oraz akson (Ryc. 1A). Dendryty tworzą drzewka dendrytyczne, od bardzo prostych (pojedynczy dendryt) do rozbudowanych (setki dendrytów) (Ryc. 1B). Pomimo odmiennych wielkości i kształtów, jakie mogą przybrać komórki nerwowe, wszystkie wykazują czynnościową polaryzację. Dendryty odbierają sygnały od innych komórek sieci i przesyłają je do ciała komórki. Z kolei akson przekazuje je od ciała komórki do kolejnych ogniw sieci. Umożliwia to integrację informacji pochodzącej z wielu źródeł, ocenę jej wagi oraz jej ukierunkowane przekazywanie z komórki do komórki. Aby mogło dojść do przepływu sygnału pomiędzy dwoma neuronami konieczne jest, aby aksony jednych komórek nerwowych skontaktowały się z dendrytami lub ciałami

innych komórek. Miejsca takiego kontaktu nazywane są synapsami. Ustanowienie prawidłowych połączeń synaptycznych, ich podtrzymanie lub zmiana pod wpływem aktywności neuronalnej są ściśle kontrolowane i stanowią podstawę między innymi zjawisk plastyczności i pamięci.

ryba słodkowodna, pochodząca oryginalnie z Gangesu, od lat wykorzystywana w badaniach nad biologią rozwoju. Niniejszy artykuł skupia się na wykorzystaniu tego modelu w badaniach rozwoju i funkcjonowania siatkówki oka i jego możliwego wykorzystania w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi.

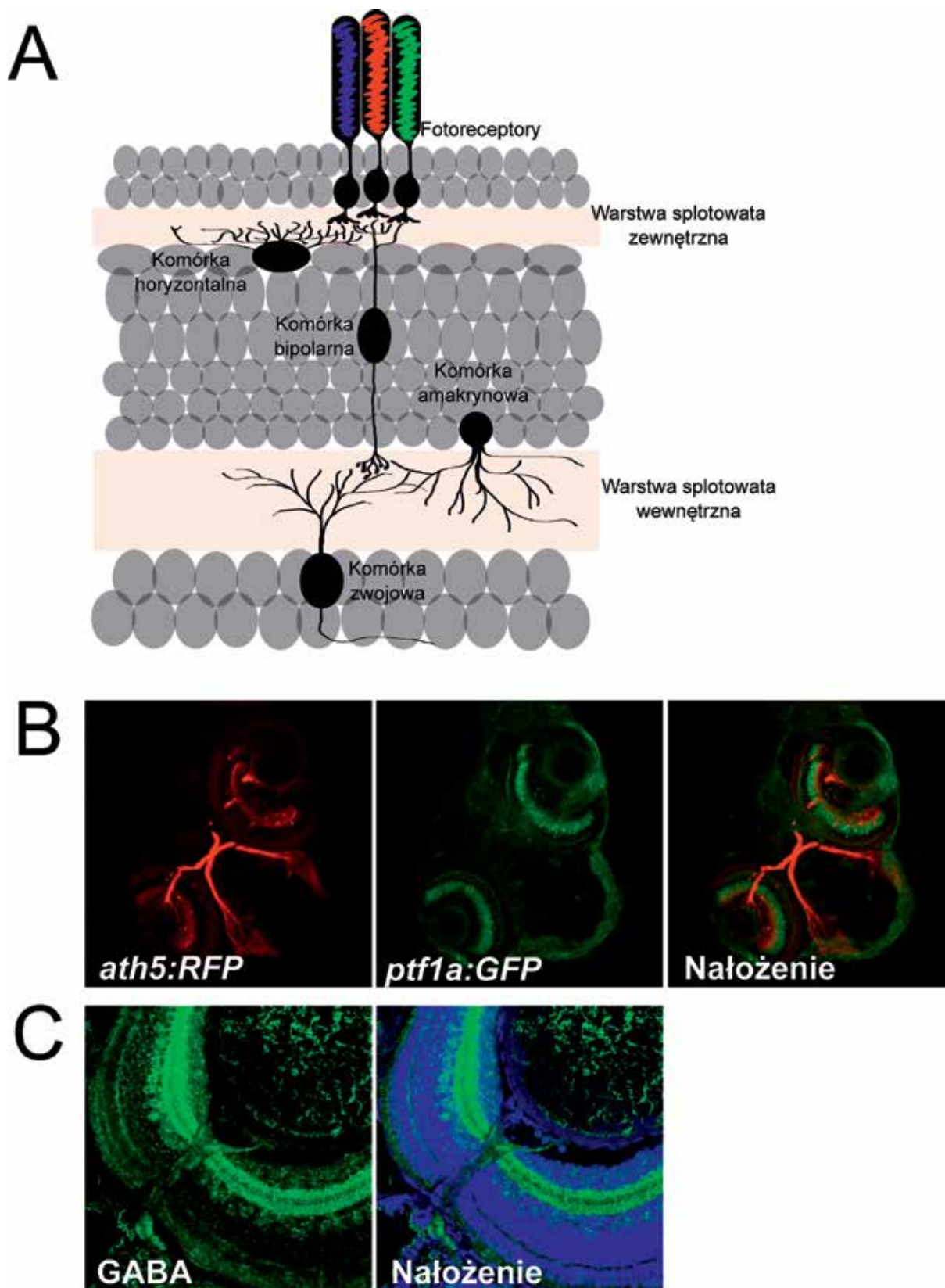


Ryc. 1. A. Budowa neuronu. B. Różne typy neuronów, w których można wyróżnić podstawowe elementy budowy: somę, dendryty i aksony, mają łatwo rozróżnialne drzewka dendrytyczne o charakterystycznym dla danego typu kształcie. Wyjątkiem są fotoreceptory (w ramce), które w toku ewolucji wyspecjalizowały swoje „dendryty” do odbierania bodźców świetlnych. Strzałką zaznaczono aksony.

Sieci neuronalne mogą mieć bardzo różny stopień złożoności. Z jednej strony mogą to być proste obwody składające się z 2–3 komórek, odpowiadające za proste reakcje bezwarunkowe (np. cofnięcie ręki pod wpływem oparzenia). Po drugiej stronie spektrum są tak ogromne i skomplikowane sieci jak mózg. Pełne zrozumienie ich rozwoju i działania wymaga badań na wielu płaszczyznach: od roli poszczególnych białek (badania molekularne), poprzez procesy zachodzące wewnątrzkomórkowo (badania biologii komórki), do komunikowania się całej sieci lub różnych sieci między sobą (do niedawna głównie badania elektrofizjologiczne) i efektów tej komunikacji na poziomie zachowania organizmu (neurofizjologia i badania behawioralne). Przez wiele lat ze względów technologicznych istniał poważny problem w integracji badań na tych różnych poziomach. Ostatnio jednak, dzięki rozwojowi nowych znaczników molekularnych (np. białek fluorescencyjnych znakujących poszczególne typy komórek) oraz technik mikroskopowych otworzyło się nowe pole badań, pozwalające obrazować przyżyciowo sieci neuronalne na kilku poziomach na raz. Wciąż jednak taka analiza wymaga wykorzystania relatywnie prostych układów modelowych, kompatybilnych z możliwościami sprzętowymi i obliczeniowymi. W tym kontekście coraz większą popularność zyskuje *Danio přegowanę*, mała

Zalety siatkówki oka *Danio přegowanego* jako modelu badawczego

Jakie są zalety siatkówki *Danio přegowanego* jako modelu do przyżyciowych badań rozwoju i funkcjonowania sieci neuronalnych? Po pierwsze, siatkówka oka – światłoczuła tkanka wyściełająca wewnętrzną powierzchnię gałki ocznej, jest przykładem sieci neuronalnej o ograniczonej złożoności. Wciąż jednak tworzą ją liczne elementy różnego typu, które muszą skoordynować swoje działanie, aby efektywnie odbierać i integrować bodźce świetlne docierające do oka i przekazywać je do mózgu. Po drugie siatkówka jest częścią ośrodkowego układu nerwowego (rozwija się jako „wypustka mózgu”) i stanowi twór konserwatywny ewolucyjnie pod względem rozwoju, zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. To sprawia, iż liczne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój mózgu są również zachowane w przypadku siatkówki. Dla eksperymentatorów siatkówka *Danio přegowanego* ma liczne dodatkowe zalety. *Danio přegowane* ma rozwój zewnętrzny, czyli poza organizmem matki. Dzięki temu przyżyciowe obserwowanie kolejnych stadiów rozwoju embrionalnego jest dużo prostsze niż u ssaków. Inną zaletą tego gatunku jest przezroczyste ciało w pierwszych etapach życia, co umożliwia śledzenie zmian zachodzących w głębi



Ryc.2. A. Schemat przedstawiający siatkówkę oka, którą budują różne typy komórek ułożone w warstwy (fotoreceptory, komórki horyzontalne, bipolarnie, amakrynowe oraz zwojowe). Można również wyróżnić podtypy tych komórek na podstawie specyficznych znaczników. Najprostszym przykładem są różne podtypy fotoreceptorów, które ulegają wzbudzeniu pod wpływem światła o różnej długości fal (np. niebieskiej, zielonej i czerwonej). B. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego LSM5 (Zeiss) przedstawiające przekrój poprzeczny przez głowę linii transgenicznej *Danio* pręgowanego SoFa [1]. Na czerwono świecą komórki zwojowe, a na zielono komórki amakrynowe i horyzontalne. Wyraźnie widać krzyżowanie się nerwów wzrokowych w środku głowy (kolor czerwony). C. Komórki amakrynowe wybarwione na GABA (kolor zielony). Wyraźnie widać ciała tych komórek oraz warstwę wewnętrzną spłotowatą, w której znajdują się ich dendryty i aksony. Kolor niebieski – jądra komórkowe wszystkich komórek.

organizmu, np. w mózgu czy w oku. Dużym atutem sprzyjającym badaniom nad rozwojem sieci neuronalnych w tym modelu jest też fakt, że rozwija się on bardzo szybko i w ciągu trzech do pięciu dni siatkówka oka Danio jest w pełni funkcjonalna. W kolejnych podrozdziałach przedstawiamy podstawowe informacje na temat budowy siatkówki, które są konieczne dla zrozumienia, co nowego dowiedzieliśmy się o rozwoju sieci neuronalnych dzięki wykorzystaniu omawianego przez nas modelu badawczego.

Siatkówka oka – budowa

Siatkówkę oka kręgowców, w tym Danio pręgowanego, tworzą neurony 6 typów o różnym kształcie oraz lokalizacji, układających się w wyróżnialne i dobrze zdefiniowane warstwy (Ryc. 2). Możemy w niej wyróżnić warstwy: neuronów zwojowych (najbliżej soczewki), neuronów amakrynowych, dwubiegunowych i horyzontalnych (warstwa jądrowa wewnętrzna) oraz fotoreceptorów – czopków i pręcików (warstwa jądrowa zewnętrzna). Wyróżnia się też dwie warstwy spłotowate, charakteryzujące się tym, że nie ma w nich ciał komórek, a jedynie dendryty i aksony kontaktujących się ze sobą komórek.

Fotoreceptory są komórkami światłoczułymi. Czopki odpowiadają za widzenie barw, natomiast pręciki za widzenie w ciemności. Aksony czopków i pręcików kontaktują się z dendrytami komórek dwubiegunowych (bipolarnych), które w momencie pobudzenia fotoreceptorów przez światło docierające do oka odbierają od nich sygnał i przekazują go do komórek zwojowych. Aksony komórek zwojowych tworzą nerw wzrokowy, który przesyła sygnał bezpośrednio do mózgu [8]. Światło docierające do oka pobudza od 20 do 100 czopków lub od 50 do 450 pręcików. Sygnał ten przekazywany jest do od trzech do 15 komórek dwubiegunowych, które z kolei przesyłają go tylko jednej komórce zwojowej. Jest to bardzo dobry przykład sieci neuronalnej, w której dochodzi do integracji sygnału pochodzącego z wielu komórek nerwowych na wejściu do pojedynczej komórki na wyjściu. Proces takiej integracji angażuje również kilka komórek amakrynowych oraz kilka do kilkunastu komórek horyzontalnych. Komórki te stoją na straży poprawnego przekazywania sygnału, nie dopuszczając, aby sygnał z danego obwodu neuronalnego rozprzestrzenił się w sposób niekontrolowany na sąsiednie elementy sieci oraz aby został wygaszony w przypadku niewystarczającego pobudzenia całej sieci na wejściu. A zatem, podobnie jak w mózgu, sieci neuronalne siatkówki posiadają elementy pobudzające i hamujące, które odpowiadają za prawidłowe

kanałowanie przepływu informacji i jej integrację.

Czego nowego dowiedzieliśmy się o rozwoju neuronów dzięki siatkówce Danio pręgowanego?

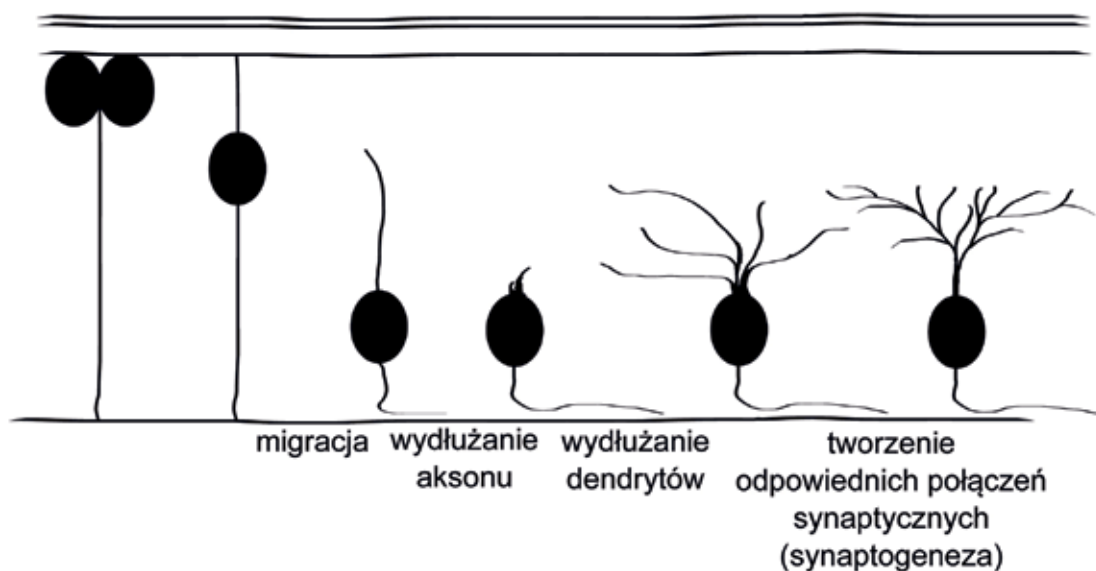
Tworzenie sieci neuronalnych podczas rozwoju zarodkowego jest procesem złożonym, wieloetapowym i ściśle regulowanym przez program genetyczny i sygnały zewnątrzkomórkowe. W pierwszej kolejności komórki progenitorowe, mające zdolność podziałów komórkowych, muszą „wyprodukować” odpowiednią liczbę komórek potomnych. Z nich w procesie różnicowania powstaną neurony spełniające określone funkcje. Jednak miejsce „narodzin” neuronu nie jest miejscem, gdzie będzie on pełnił swoje „dorosłe zadania”. Dlatego też przyszłe neurony muszą najpierw dotrzeć do właściwej lokalizacji. Po przybyciu na miejsce zaczynają tworzyć aksony i dendryty w stronę swoich partnerów komórkowych, z którymi muszą wytworzyć odpowiednią liczbę połączeń synaptycznych o właściwej sile (Ryc. 3A). Co ciekawe, pewne aspekty tego rozwoju wydają się na z góry ustalone, inne zaś wykazują pewną zmienność (plastyczność). Na przykład w siatkówce zawsze powstaje taka sama struktura warstwowa sieci neuronalnych i komórki poszczególnych typów zawsze oddziałują ze sobą w ten sam sposób. Fotoreceptory będą się kontaktować z komórkami bipolarnymi, które z kolei stworzą synapsy z komórkami zwojowymi. Komórki horyzontalne będą wydłużać aksony i dendryty w stronę synaps tworzonych przez fotoreceptory, a komórki amakrynowe – w stronę synaps komórek zwojowych. Zatem rodzaje tworzonych połączeń międzykomórkowych w siatkówce kręgowców są z góry bardzo dobrze określone. Natomiast ostateczny kształt neuronów oraz liczba i siła tworzonych synaps jest cechą zmienną, często kształtowaną przez czynniki zewnątrzkomórkowe, takie jak dostępność czynników wzrostowych czy aktywność synaptyczna.

Na wiele pytań dotyczących rozwoju neuronów udało się uzyskać odpowiedzi studiując rozwój komórek hodowanych *in vitro*. Jednak znalezienie odpowiedzi na część fundamentalnych pytań wymagała przyżyciowej obserwacji całych zespołów komórek w tkance nerwowej którą, w przeciwieństwie do hodowli komórkowych, charakteryzuje struktura trójwymiarowa. Właśnie do odpowiedzi na tego typu pytania Danio pręgowany stanowi wymarzone narzędzie. Jednym z kluczowych zagadnień, które długo pozostawało bez odpowiedzi, było pytanie, w jaki sposób zachodzi regulacja dzielenia się i różnicowania komórek progenitorowych w dany typ komórek nerwowych tak, by mogły powstać sieci neuronalne

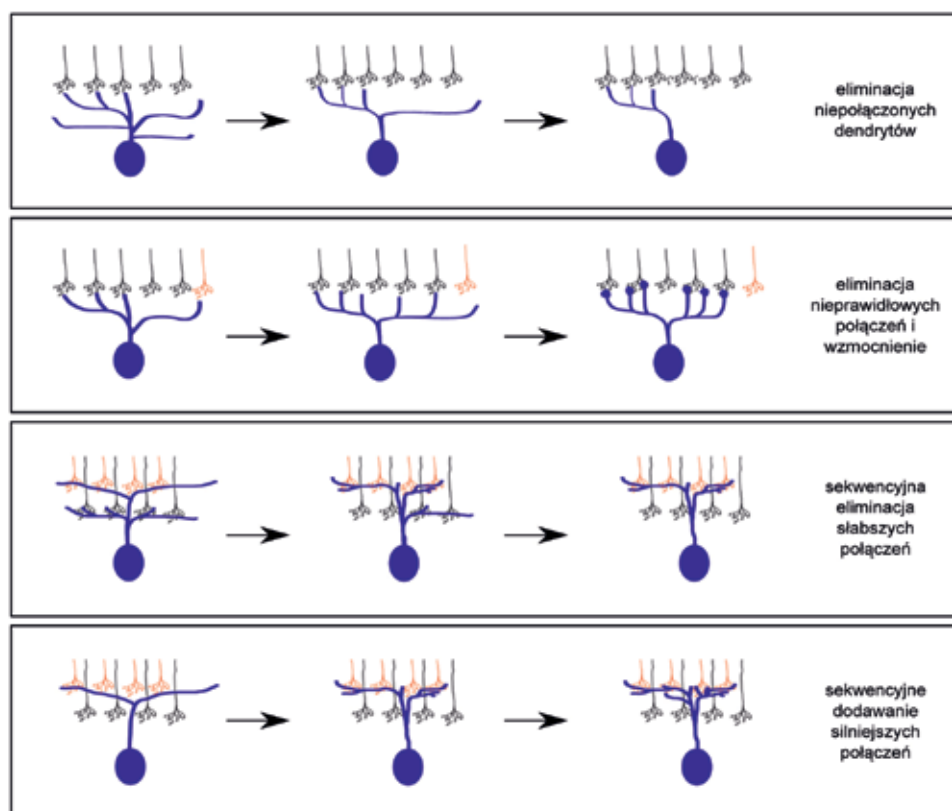
o ściśle zdefiniowanej strukturze. Poszukiwaniem rozwiązania tej zagadki zajmuje się grupa badawcza

profesora Williama Harrisa z Cambridge, która jako jedna z pierwszych wdrożyła metody przyżyciowego

A



B

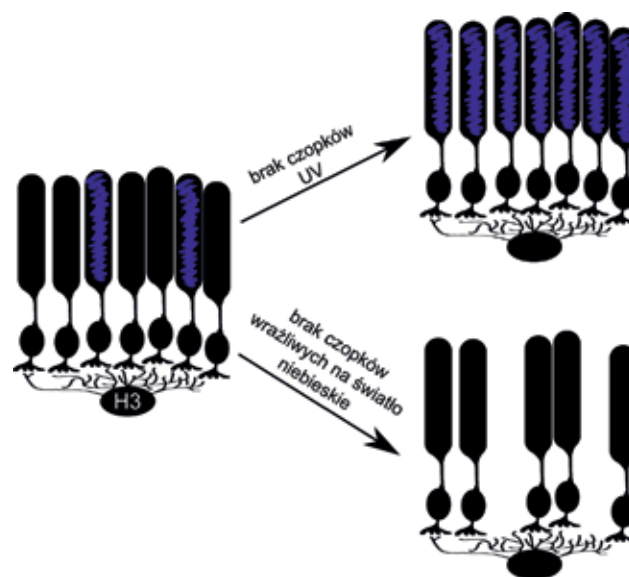


Ryc. 3. **A.** Schemat przedstawiający procesy komórkowe zachodzące podczas rozwoju neuronów. **B.** Mechanizmy komórkowe determinujące kształt neuronów i powstawanie sieci neuronalnych. Eliminacja niepołączonych dendrytów (panel 1): dendryty, które nie znalazły swojego partnera komórkowego ulegają obkurczeniu. Eliminacja nieprawidłowych połączeń i wzmocnienie prawidłowych (panel 2): istnieją różne podtypy neuronów i możliwości połączeń komórkowych; niektóre komórki nerwowe początkowo kontaktują się z losowymi partnerami, a potem, w miarę rozwoju (swojego, jak i swojego partnera), eliminują połączenia z np. jednym typem partnerów neuronalnych (różne podtypy neuronów zaznaczono na różne kolory). Sekwencyjna eliminacja słabszych połączeń (panel 3): rozwijające się komórki nerwowe mogą też eliminować słabsze połączenia (ten mechanizm jest zależny od aktywności synaptycznej); zwykle jeden podtyp partnerów komórkowych (komórki czerwone na schemacie) silniej oddziałuje z daną komórką nerwową, więc inne połączenia są eliminowane. Sekwencyjne dodawanie silniejszych połączeń (panel 4): silne oddziaływanie danej komórki nerwowej z partnerami neuronalnymi mogą być sygnałem do rozgałęziania jej dendrytów i dodawania nowych połączeń (ten mechanizm również jest zależny od aktywności synaptycznej).

mikroskopowego badania losów komórek siatkówki Danio pręgowanego. Większość neuronów powstaje podczas rozwoju zarodkowego i od tej pory pełni swoją funkcję. Już na przełomie lat 80. i 90. XX w. wiadano, że komórki progenitorowe siatkówki oka mogą dać początek wszystkim typom neuronów siatkówki. Jednak liczba i rodzaj neuronów, jakie powstaną z pojedynczej komórki progenitorowej siatkówki, są bardzo zmienne [3]. Ostateczna liczba komórek danego typu, rodzaje połączeń oraz warstwowość siatkówki, pomimo przypadkowości w generowaniu neuronów przez komórki prekursorowe, pozostają niezmiennie. Poszukując wyjaśnienia tej zagadki badacze z Cambridge sprawdzali wpływ czynników transkrypcyjnych na determinację losu komórek progenitorowych siatkówki [3, 2]. Używając nowoczesnych technologii znakowania pojedynczych komórek progenitorowych obserwowali ich podziały, jak i różnicowanie, zadając pytanie, czy te procesy są przypadkowe, czy zaplanowane. Z ich badań wynika, że początkowo w rozwoju różnicowanie zdarza się przypadkowo i zależy od losowej aktywności zespołów czynników transkrypcyjnych. Komórki występujące rzadziej, wymagają niezależnej aktywacji większej liczby czynników transkrypcyjnych, co obniża prawdopodobieństwo ich powstania. W ten sposób, pomimo początkowej przypadkowości procesu różnicowania, wytwarzane są odpowiednie proporcje poszczególnych klas komórek. Badacze ci zauważyli także, że wielkość siatkówki jest determinowana niezależnie od „składu” komórkowego [2, 7].

Innym pytaniem nurtującym badaczy było, jakie mechanizmy determinują ostateczny kształt komórek nerwowych i topografię tworzonych przez nie połączeń. Mechanizmem, który został najwcześniej poznany i uznany za powszechny, jest przypadkowe tworzenie, a następnie usuwanie nieprawidłowych lub zbędnych połączeń synaptycznych, a nawet całych rozgałęzień dendrytów czy aksonu (Ryc. 3B). Rzeczywiście, jeden z podtypów komórek zwojowych wysuwa dendryty w sposób przypadkowy, a następnie usuwa nieprawidłowe lub zbędne dendryty. Komórki zwojowe mogą eliminować w ten sposób np. połączenia z niektórymi neuronami, tak by ostatecznie łączyć się z tylko jednym podtypem komórek bipolarnych. Niemniej badania przeprowadzone w modelach Danio pręgowanego wykazały, że nie jest to mechanizm jedyny. Wykazano istnienie podtypów komórek zwojowych stopniowo i w sposób zdeterminowany wysuwających dendryty w stronę partnera komórkowego [5]. Istnienie takiej strategii potwierdzono później również u myszy.

Powstawanie synaps o odpowiedniej sile jest regulowane podczas funkcjonowania sieci neuronalnych, dlatego też powstałe w rozwoju zarodkowym oddziaływania są udoskonalane, np. w momencie, gdy otwieramy oczy po raz pierwszy. Ogólnie przyjętym mechanizmem leżącym u podstaw wpływu aktywności synaptycznej na ustalanie połączeń między neuronami jest „zasada współzawodnictwa”, która opiera się na założeniu, że silniejsza synapsa jest utrwalana, a słabsza jest eliminowana. Badając siatkówkę Danio pręgowanego udowodniono, że nie jest to zawsze obowiązująca reguła. Badacze z Uniwersytetu Stanu Waszyngton analizowali powstawanie synaps między komórkami horyzontalnymi a czopkami w rozwoju zarodkowym i ustalili, że komórki horyzontalne H3 preferują połączenia z czopkami wrażliwymi na światło ultrafioletowe (UV) lub niebieskie, z tym że większość synaps komórek horyzontalnych H3 jest tworzonych z czopkami UV. Kiedy zablokowano aktywność czopków UV, to w rozwoju zarodkowym powstawało więcej połączeń komórek horyzontalnych H3 z czopkami wrażliwymi na światło niebieskie, co jest zgodne z ogólnie przyjętą „zasadą współzawodnictwa”. Natomiast blokowanie aktywności czopków wrażliwych na światło niebieskie nie miało takiego efektu na czopki UV [10]. Wynika z tego, że aktywność synaptyczna czopków UV reguluje powstawanie połączeń między komórkami horyzontalnymi H3



Ryc. 4. Przedstawienie wpływu aktywności synaptycznej na tworzenie się połączeń międzykomórkowych na przykładzie komórek horyzontalnych H3 i ich oddziaływań z czopkami wrażliwymi na światło niebieskie (schematyczne fotoreceptory z kolorem niebieskim) i UV (schematyczne fotoreceptory z kolorem czarnym) w rozwoju siatkówki Danio pręgowanego. Rozwój czopków wrażliwych na światło niebieskie jest zależny od czopków wrażliwych na światło UV, a brak czopków UV powoduje, że czopki wrażliwe na światło niebieskie tworzą więcej połączeń synaptycznych z komórkami horyzontalnymi H3. Natomiast rozwój czopków UV nie jest zależny od czopków wrażliwych na światło niebieskie.

a czopkami wrażliwymi na światło niebieskie, natomiast nie na odwrót (Ryc. 4). Jak widać z powyższych przykładów, przyżyciowe obrazowanie neuronów *in vivo*, możliwe dzięki postępowi mikroskopii i wykorzystaniu *Danio* pręgowanego, pozwala nam lepiej poznać repertuar strategii rozwojowych neuronów w trakcie formowania prawidłowych sieci.

Czy siatkówka *Danio* pręgowanego może stanowić dobry model dysfunkcji sieci neuronalnych w chorobach neurorozwojowych?

Powstawanie prawidłowo funkcjonujących sieci neuronalnych nie zawsze kończy się sukcesem, co prowadzi do chorób neurorozwojowych. Ich najczęstszymi symptomami są ograniczenie zdolności motorycznych, intelektualnych i socjalnych. Do tej grupy chorób zaliczamy m.in. autyzm, niepełnosprawność intelektualną, padaczkę oraz schizofrenię. Coraz częściej, dzięki łatwości manipulacji genetycznych, *Danio* pręgowany jest wykorzystywany jako model do badania tych chorób. Dotychczas stworzono rybnie modele: mikro- i makrocefalii, zespołu łamliwego chromosomu X, stwardnienia guzowatego oraz innych chorób spektrum autyzmu (np. związanych z mutacjami w genach *SHANK*, *SYNGAP1*, *KCTD13*, *AUTS2*) [4, 9]. Większość tych ryb wykazuje poważne zaburzenia rozwoju układu nerwowego i, o ile przeżyją, również zaburzenia zachowania. Jednak dotychczas w bardzo nielicznych przypadkach starano się prowadzić badania wielopoziomowe z wykorzystaniem tych modeli. Nie zwracano też specjalnie uwagi na zaburzenia rozwoju siatkówki. Niemniej istnieją przykłady badań nad siatkówką *Danio* pręgowanego mające na celu odkrycie mechanizmów komórkowych chorób neurorozwojowych.

Jeden z pierwszych przykładów modelowania zaburzeń neurorozwojowych z wykorzystaniem siatkówki *Danio* pręgowanego stanowią badania nad mikrocefalią (małogłowie) przeprowadzone przez wspomnianą już wcześniej grupę prof. Harrisa [6]. Mikrocefalia jest objawem klinicznym o bardzo zróżnicowanej etiologii, który jest definiowany jako zmniejszenie rozmiarów głowy, i często współwystępuje z upośledzeniem rozwojowym. Zespół prof. Harrisa zajął się badaniem mechanizmów komórkowych odpowiadających za znaczne zmniejszenie rozmiarów mózgu w małogłowie pierwotnym, uwarunkowanym autosomalnie recesywnie (MCPH, ang. *autosomal recessive primary microcephaly*), powodowanym przez mutacje w takich genach jak *STIL*, *ASPM* czy *WDR62*. Badacze wytworzyli modelowe ryby pozbawione tych genów lub o ich obniżonej

ekspresji. Ryby te miały wyraźnie mniejsze mózgi oraz oczy. W dalszych badaniach skupiono się na przyżyciowej obserwacji progenitorów neuronalnych w siatkówce rozwijającego się *Danio* pręgowanego, co pozwoliło wykazać, iż prawdopodobną przyczyną MCPH jest bardzo znaczące wydłużenie lub wręcz zablokowanie na bardzo wczesnym etapie podziałów komórek progenitorowych. W połączeniu z ich zwiększoną śmiercią skutkowało to obniżoną liczbą komórek siatkówki (i prawdopodobnie również mózgu). Jest to bardzo ciekawa konkluzja, wskazująca, iż w przypadku MCPH pierwotna przyczyna choroby może mieć charakter mieszany, tzn. niewystarczające wytwarzanie neuronów i zwiększoną śmierć komórek prekursorowych.

Podczas gdy prace zespołu prof. Harrisa koncentrowały się na badaniu problemów towarzyszących chorobom neurorozwojowym na najwcześniejszych etapach formowania układu nerwowego, w naszej pracowni staramy się wykorzystać siatkówkę ryby do badania zaburzeń rozwoju sieci neuronalnej na późniejszych etapach (powstawanie aksonów, dendrytów i synaps). Jako modelu używamy *Danio* pręgowanego pozbawionego genu *Tsc2*. Mutacje w tym genie są przyczyną stwardnienia guzowatego. Jest to choroba wielonarządowa, dotycząca także mózgu. Do objawów neurologicznych tej choroby należą epilepsja, upośledzenie umysłowe oraz zachowania ze spektrum autyzmu. Coraz częściej uważa się, iż jedną z przyczyn tych zjawisk, obok formowania licznych guzów mózgu, jest nieprawidłowe formowanie sieci neuronalnych i równowagi pomiędzy pobudzaniem i hamowaniem aktywności neuronów w tych sieciach. Istotnie nasze wstępne badania wskazują, iż ryby pozbawione *Tsc2* mają problemy z prawidłowym rozwojem warstw siatkówki oraz wykazują zaburzenia morfologii nerwu wzrokowego (jego zmniejszoną średnicę). Co ciekawe, zmniejszoną średnicę nerwu wzrokowego wykryto również u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Pokazuje to, że w przypadku tej choroby, część ludzkich symptomów może być odtworzona rzeczywiście w modelu siatkówki *Danio* pręgowanego.

Podsumowanie, czyli po co nam kolejne nowe modele ludzkich chorób?

Danio pręgowany stanowi atrakcyjny model do badań nad rozwojem ośrodkowego układu nerwowego u kręgowców, gdyż posiada dużą homologię genetyczną oraz fizjologiczną w stosunku do człowieka. Prekursory układu nerwowego pojawiają się u *Danio* już 6–7 h po zapłodnieniu, natomiast pierwsze

neurony po 24 h, co znacznie przyspiesza badania. Natomiast przezroczystość zarodka bardzo ułatwia obserwację losów komórek nerwowych – ich podziały, migrację oraz różnicowanie. Ponadto geny, które odpowiadają za powstawanie neuronów i kierowanie aksonów w miejsca docelowe, są analogiczne do tych odpowiadających za podobne procesy w organizmach ssaków. W związku z tym coraz częściej siatkówka

Danio pręgowanego jest brana pod uwagę jako model do badania zaburzeń formowania sieci neuronalnych w chorobach neurorozwojowych. Ponadto, ze względu na podobieństwa zmian neuropatologicznych, coraz dynamiczniej rozwija się wykorzystanie Danio pręgowanego do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

Bibliografia

1. Almeida AD, Boije H, Chow RW, He J, Tham J, Suzuki SC, et al. (2014). Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Dev. Camb. Engl.* 141:1971–80.
2. Boije H, Rulands S, Dudczig S, Simons BD, Harris WA. (2015). The Independent Probabilistic Firing of Transcription Factors: A Paradigm for Clonal Variability in the Zebrafish Retina. *Dev. Cell.* 34:532–43.
3. He J, Zhang G, Almeida AD, Cayouette M, Simons BD, Harris WA. (2012). How variable clones build an invariant retina. *Neuron.* 75:786–98.
4. Kozol RA, Abrams AJ, James DM, Buglo E, Yan Q, Dallman JE. (2016). Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. *Front. Mol. Neurosci.* 9:55.
5. Mumm JS, Williams PR, Godinho L, Koerber A, Pittman AJ, Roeser T, et al. (2006) In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells. *Neuron.* 52:609–21.
6. Novorol C, Burkhardt J, Wood KJ, Iqbal A, Roque C, Coutts N, et al. (2013). Microcephaly models in the developing zebrafish retinal neuroepithelium point to an underlying defect in metaphase progression. *Open Biol.* 3:130065.
7. Randlett O, MacDonald RB, Yoshimatsu T, Almeida AD, Suzuki SC, Wong RO, et al. (2013). Cellular requirements for building a retinal neuropil. *Cell Rep.* 3:282–90.
8. Randlett O, Norden C, Harris WA. (2011). The vertebrate retina: a model for neuronal polarization in vivo. *Dev. Neurobiol.* 71:567–83.
9. Stewart AM, Nguyen M, Wong K, Poudel MK, Kalueff AV. Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 50:27–36.
10. Yoshimatsu T, Williams PR, D’Orazi FD, Suzuki SC, Fadool JM, Allison WT, et al. (2014). Transmission from the dominant input shapes the stereotypic ratio of photoreceptor inputs onto horizontal cells. *Nat. Commun.* 5:3699.
11. Kuno S., Sakurai F., Shimizu K., Matsumura N., Kim S., Watanabe H., Tashiro K., Tachibana M., Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014, 29(4), 296–304.
12. Palut D., Kostka G., Struciński P. Rola receptorów jądrowych w indukcji form molekularnych cytochromu P450 pod wpływem substancji obcych. *Roczn. PZH.* 2002, 53(4), 321–332.
13. Pelkonen O., Maenpää J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica.* 1998, 28, 1203–1253.
14. Peltz G. Can ‘humanized’ mice improve drug development in the 21st century? *Trends Pharmacol Sci.* 2013, 34(5), 255–260.
15. Rodrigues A.D., Rushmore T.H. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab.* 2002, 3, 289–309.
16. Tateno Ch. Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki Ch., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004, 165(3), 901–912.
17. Wójcikowski J., Basińska A., Daniel W.A. The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem Pharmacol.* 2014, 90, 188–195.

Mgr Magdalena Kędra – doktorantka w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. E-mail: mkedra@iimcb.gov.pl

Prof. dr hab. Jacek Jaworski – profesor Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej i kierownik Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej MIBMiK. E-mail: jaworski@iimcb.gov.pl

dr Justyna Zmorzyńska – pracownik naukowy w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. E-mail: jzmorzyńska@iimcb.gov.pl, * autor korespondencyjny (jjezierska@iimcb.gov.pl)

DANIO PRĘGOWANY JAKO ORGANIZM MODELOWY W BADANIACH NAD NOWOTWORAMI



Maciej Olszewski i Magdalena Prusko (Warszawa)

Streszczenie

Wraz z rozwojem cywilizacyjnym i związaną z tym rosnącą długością życia zwiększa się liczba osób zapadających na choroby nowotworowe. Postępy w rozwoju biologii i medycyny powodują, że skuteczność leczenia nowotworów jest o wiele wyższa; niestety postęp ten w większości dotyczy krajów wysoko rozwiniętych. Zważywszy, że naukowcy badający procesy biologiczne w większości posługują się modelami badawczymi, w tym zwierzęcymi, dobór takiego modelu ze względu na jego odpowiedniość w stosunku do stawianych problemów badawczych, a także uwarunkowania ekonomiczne i etyczne jest niezwykle ważny. Na przestrzeni ostatniej dekady nastąpił gwałtowny wzrost popularności ryby danio pręgowanego jako organizmu modelowego w wielu dziedzinach badań biologicznych i biomedycznych. Poniższy artykuł przedstawia skrótoowo możliwości zastosowania danio pręgowanego jako modelu badawczego w badaniach nad biologią nowotworów.

Abstract

Social and economic development contribute to the increase in human lifespan. This, unfortunately, results in increased incidence of cancer. Progress in biomedical research significantly increased survival rates in cancer patients, but this increase is largely limited to more developed countries. Given that biologists usually work with research models, including model animals, the choice of the model with regard to its relevance and economic and ethical ramifications becomes crucial. Within the last decade rapid increase in popularity of zebrafish as a model animal in biomedical research occurred. The following article delineates current uses and opportunities that zebrafish presents in the field of cancer research.

Choroby nowotworowe jako problem społeczny i medyczny

Choroby nowotworowe nazywane są chorobami cywilizacyjnymi i często wzrost zachorowalności na nie kojarzony jest ze stopniem zamożności i rozwoju społeczeństw, w których występują. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do pewnego stopnia to potwierdzają. Otóż w 2012 roku, z którego pochodzą najświeższe dane o zasięgu globalnym, 8.2 miliona spośród 56 milionów zgonów, prawie 15%, można przypisać różnego rodzaju chorobom nowotworowym. Częstość występowania nowotworów u mężczyzn w regionie określanym przez WHO jako „kraje bardziej rozwinięte” (obejmującym Europę, Amerykę Północną, Australię, Nową Zelandię i Japonię) wynosi 307 przypadków na 100 000 mieszkańców rocznie, a związana z nowotworami śmiertelność to 138 zgonów na 100 000 mieszkańców rocznie. Dla porównania, w regionie określanym jako „kraje mniej rozwinięte”, obejmującym resztę świata, wskaźniki te wynoszą odpowiednio 163 i 120. Pogłębiona analiza

powyższych danych wskazuje, że jeśli chodzi o całokształt chorób nowotworowych, to podstawowym czynnikiem ryzyka jest wiek pacjenta, co najpewniej wynika z procesu akumulacji mutacji, osłabienia układu immunologicznego i kilku jeszcze innych czynników. Tak więc z biegiem lat, wraz ze zwiększaniem się oczekiwanej długości życia, zwiększa się częstość występowania chorób nowotworowych i dla systemów opieki zdrowotnej zamożnych krajów o starzejących się społeczeństwach leczenie chorób nowotworowych staje się poważnym obciążeniem.

Organizmy modelowe w badaniach nad nowotworami

Z uwagi na istotność problemu publiczne i prywatne ciała finansujące badania naukowe kierują znaczące fundusze na badania związane z leczeniem nowotworów. Tysiące naukowców na całym świecie pracują nad metodami pozwalającymi na selektywne zabijanie bądź zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, ewentualnie powstrzymanie

przerzutowania, co zwiększa szanse na sukces klasycznej terapii chirurgicznej bądź chemioterapii. Żeby prowadzić badania w laboratorium nad jakąkolwiek chorobą naukowcom potrzebny jest model badawczy. Z reguły oznacza to uproszczony układ biologiczny, czyli organizm niższego rzędu, w którym jednak pewien obszar procesów biologicznych pokrywa się z tym znajdującym u człowieka, a więc i w komórkach nowotworowych. Dobrym przykładem są tutaj drożdże (*Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*) oraz jeżowiec z rodzaju *Arbacia*, na których badania prowadzili Leland Hartwell, Paul Nurse i Timothy Hunt, odkrywcy podstawowych mechanizmów molekularnych regulujących podziały komórkowe, za które uhonorowani zostali Nagrodą Nobla w 2001 roku. W 2016 roku Nagrodę Nobla otrzymał Yoshinori Ohsumi, naukowiec, który z użyciem drożdży badał procesy autofagii, istotne dla wielu procesów fizjologicznych i patologicznych, w tym nowotworzenia. Wspomniane wyżej mechanizmy w swej istocie są wspólne dla wszystkich organizmów eukariotycznych, włączając człowieka, a ich znakomite zachowanie w ewolucji wskazuje na ich krytyczną istotność, ale także doskonałość znalezionego przez ewolucję rozwiązania. Zaburzenia tych właśnie podstawowych procesów regulacyjnych, które w dużym stopniu współdzielimy z drożdżami, leżą u podstaw patogenezy bardzo wielu nowotworów, prowadząc do nabywania przez zdrowe komórki zdolności do nieskończonych i niewłaściwie kontrolowanych podziałów komórkowych i w efekcie do pojawienia się nowotworu.

Jakkolwiek proste modele sprawdzają się w wielu zastosowaniach, to mają swoje ograniczenia związane z różnicami w genetyce, fizjologii czy zdolności reagowania na leki. Na przestrzeni ponad stulecia naukowcy testowali różne organizmy jako potencjalne modele badawcze. Do dziś w powszechnym użyciu są np. nicienie (*Caenorhabditis elegans*), muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*) czy myszy i szczury laboratoryjne (*Mus musculus* i *Rattus norvegicus*). Dla wszystkich tych organizmów rozwinęły się liczne techniki modyfikacji genetycznych, które pozwalają na wprowadzanie mutacji odzwierciedlających stany patologiczne znajdujące u pacjentów i tym samym tworzenie organizmów modelowych. Należy jednak zauważyć, że w przypadku używania organizmów wyższych, być może doskonalszych jako model badawczy, ale jednocześnie zdolnych do odczuwania bólu i stresu, w grę zaczynają wchodzić kwestie etyczne. Stąd też względnie niedawne pojawienie się nowego organizmu modelowego, ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*), pozwala niejednokrotnie

pogodzić wymogi odpowiedniości modelu z uwagowaniami etycznymi. Zalety danio pręgowanego jako organizmu modelowego, mającego zastosowanie w wielu dziedzinach badań biomedycznych, przedstawione są w artykule na stronach 255–263 bieżącego numeru *Wszechświata*; w tym miejscu należałoby wspomnieć jednak o kilku cechach, które szczególnie predestynują tę rybkę do roli modelu w badaniach nad nowotworami. Jest to organizm, który pozwolił zapełnić lukę pomiędzy prostymi (np. muszka owocówka) i zaawansowanymi (gryzonie) modelami: prosty kręgowiec, u którego występuje wiele narządów wspólnych z człowiekiem (np. skóra, wątroba, trzustka czy chociażby mózg), a także posiadający układ immunologiczny, co pozwala modelować różnego rodzaju białaczki. Opracowano także wiele technik pozwalających na modyfikacje genetyczne danio, dzięki czemu można tworzyć zwierzęta mające skłonność do zapadania na określone typy nowotworów, a także przenosić do modelu zwierzęcego mutacje znajdujące u pacjentów ludzkich i obserwować ich efekty w danio. Ponadto, dzięki dostępności metod modyfikacji genetycznej, wytworzono znaczącą liczbę transgeniczných linii danio, w których poszczególne organy bądź układy wykazują fluorescencję, co umożliwia przyżyciową obserwację ryby, u której np. naczynia krwionośne fluoryzują na zielono, makrofagi na czerwono, a neutrofile na niebiesko. Można dzięki temu obserwować nie tylko rozwój nowotworu w czasie, ale również reakcję układu immunologicznego gospodarza na komórki nowotworowe.

Dwa podstawowe podejścia stosowane w badaniach nowotworów z użyciem *D. rerio* to badania nowotworów powstających w organizmie ryby oraz transplantowanie do ryby komórek nowotworowych pochodzących z innych organizmów (np. ludzkich) i badanie interakcji pomiędzy nowotworem a gospodarzem. Wyniki uzyskiwane z użyciem obydwu tych strategii przedstawimy pokrótce poniżej.

Nowotwory powstające w organizmie *Danio rerio*

Proces powstawania i ewentualnego uzłośliwiania nowotworu jest wieloetapowy i z reguły obejmuje uszkodzenia kolejnych poziomów regulacji proliferacji i różnicowania komórkowego. Analiza zmian genetycznych występujących w komórkach nowotworowych pozwoliła na zidentyfikowanie grupy białek, których ściśle kontrolowana aktywność pobudza wzrost komórek, a w przypadku utraty tejże kontroli prowadzi do niekontrolowanego wzrostu. Białka te nazywane są protoonkogenami, a w uszkodzonej formie – onkogenami. W nowotworach występujących

u ludzi bardzo często znajdowane są mutacje w genach kodujących białka z rodzin RAS, RAF lub MYC. Inna niezwykle istotna grupa białek to tzw. supresory nowotworowe – są one odpowiedzialne za hamowanie i utrzymywanie wzrostu komórek pod kontrolą. W przypadku utraty funkcji takiego białka z powodu mutacji w kodującym je genie, również może dojść do niekontrolowanych podziałów komórkowych i w efekcie do rozwoju nowotworu. Najbardziej chyba znanym przedstawicielem tej grupy białek jest p53, produkt genu *TP53*, który ulega różnego rodzaju mutacjom w ponad połowie nowotworów występujących u ludzi. Obydwa te systemy kontrolują się wzajemnie i często konieczne są mutacje w genach należących do obydwu ścieżek, żeby doszło do nowotworu. Uzasadniona wydaje się tu analogia motoryzacyjna, mówiąca, że dopiero jednoczesne naciśnięcie gazu do podłogi (onkogen) i zepsucie hamulców (supresor nowotworowy) gwarantuje wypadek. Wracając do danio, wiele istniejących modeli chorób nowotworowych jest efektem wprowadzenia do genomu ryby mutacji znajdujących u ludzi w genach kodujących protoonkogeny lub supresory nowotworowe. W tabeli 1 zestawiono cztery spośród wielu dostępnych modeli nowotworowych, które pokrótce są omówione poniżej. W przypadku specyficznej tkankowo, ograniczonej do wątroby ekspresji genu kodującego białko KRAS z substytucją dwunastej reszty aminokwasowej glicyny na resztę waliny, która często znajdowana jest w ludzkich nowotworach, następuje gwałtowny rozrost wątroby o charakterystyce nowotworowej [1]. Jednocześnie autorzy tej publikacji pokazali, że traktowanie ryb ze sztucznie wytworzonym nowotworem wątroby substancjami blokującymi sygnały wzrostowe w komórkach nowotworowych prowadzi do zahamowania wzrostu tych komórek. Tym samym nie tylko wykazali, że u danio pręgowanego fenotyp mutacji przeniesionej od pacjentów odpowiada temu znajdowanemu u ludzi, ale także, że ryba jest dobrym modelem do testowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Inny ciekawy model nowotworu wątroby nie jest oparty na aktywacji protoonkogenu, ale na utracie funkcji supresora nowotworowego p53 i jednoczesnej ekspresji genu pochodzącego z wirusa powodującego wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B) [2]. Badania epidemiologiczne u ludzi wskazują, że zachorowanie na WZW B nie tylko prowadzi do zaburzeń funkcjonalnych wątroby w rodzaju zwłóknienia czy marskości, ale też zwiększa ryzyko późniejszego zachorowania na raka wątroby. Badania wykonane na modelu danio wykazały, że obecność białka HBx, pochodzącego z wirusa, prowadzi do wspomnianego upośledzenia

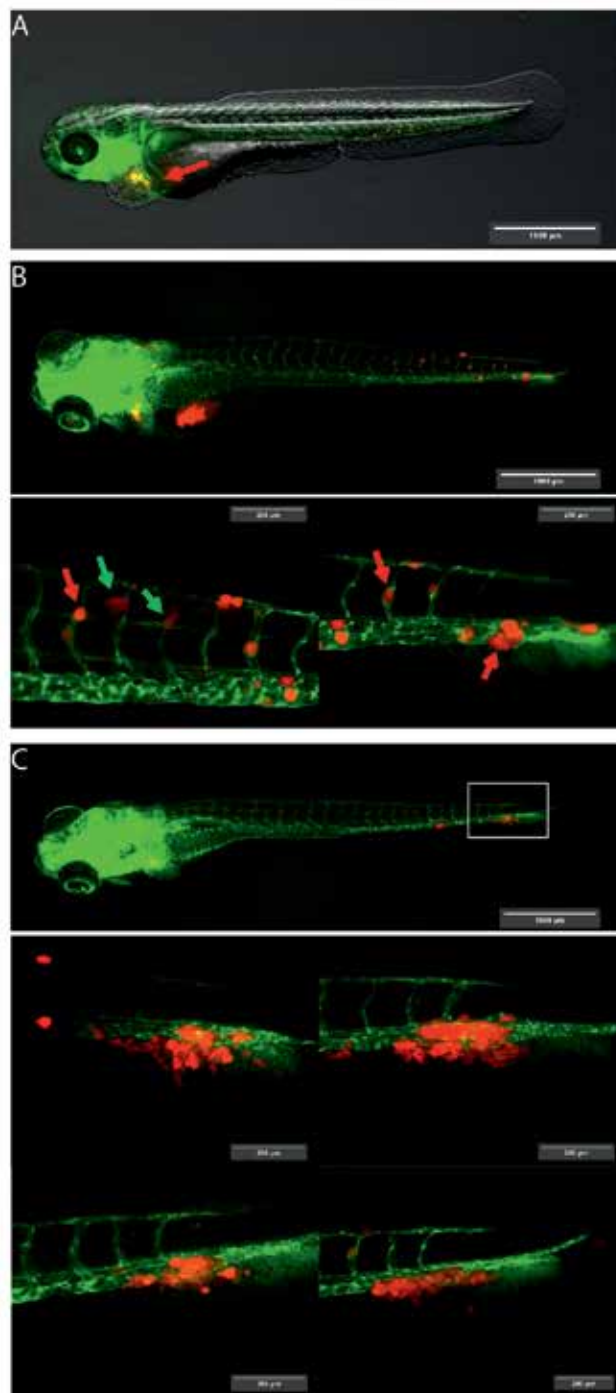
struktury i funkcji wątroby, ale dopiero skojarzenie ekspresji HBx z inaktywacją p53 prowadzi do procesu nowotworowego. Innym nowotworem, którego model stworzono w *D. rerio* jest czerniak [3]. Jest to jeden kilku z nowotworów, na które ryby te zapadają spontanicznie. Różnica pomiędzy spontanicznie powstałymi czerniakami i wspomnianym modelem polega na tym, że w tym drugim do genomu ryby wprowadzono określoną mutację powodującą, że w białku BRAF, będącym protoonkogenem, następuje zmiana V600E (reszta waliny na resztę kwasu glutaminowego), często znajdowana u pacjentów. Okazało się, że u ryb z taką mutacją na skórze pojawiają się czarne znamiona będące skupiskami melanocytów. W przypadku jednoczesnego wystąpienia mutacji w genie kodującym supresor nowotworowy p53, następuje gwałtowny rozwój masy nowotworowej o charakterze czerniaka. Wspomniane powyżej modele stworzone zostały tak, żeby zmiany genetyczne ograniczone były do narządów, które interesowały badaczy. Przykładem innego podejścia jest kolejny model badawczy, gdzie mutacja, podobnie jak w pierwszym z omawianych modeli raka wątroby, wprowadzona została do genu KRAS, a jej efektem jest zamiana dwunastej reszty aminokwasowej glicyny na resztę kwasu asparaginowego w kodowanym przez ten gen białku [4]. Różnica polega na tym, że w tym przypadku ekspresja genu kodującego zmienione białko zachodziła we wszystkich tkankach zwierzęcia i w efekcie u ryb rozwinęły się różne nowotwory: mięsak prążkowanokomórkowy, zaburzenia mieloproliferacyjne (dotyczące komórek krwi), rozrosty w obszarze jelit, a także złośliwy nowotwór wywodzący się z osłonek nerwów obwodowych. Pokazuje to, że przemiana protoonkogenu w onkogen może prowadzić do wystąpienia procesu nowotworowego w prawie każdej tkance i jednocześnie, że identyczna mutacja (tu: G12D) może prowadzić do rozwinienia się bardzo różnych nowotworów, w zależności od rodzaju komórek, w których wystąpi. Czytelników zainteresowanych pogłębieniem wiedzy dotyczącej wykorzystania danio pręgowanego jako gospodarza endogennych nowotworów odsyłamy do pracy przeglądowej w języku angielskim [5].

***Danio rerio* jako gospodarz transplantacji ksenogenicznej**

Jak wspomniano wyżej, w badaniach nad nowotworami z użyciem danio jako modelu badawczego aktualnie stosowane są dwa podstawowe podejścia: mutageneza *in situ* i transplantacja ksenogeniczna, czyli transplantacja komórek nowotworowych

pochodzących z innego organizmu (np. ludzkich) do organizmu ryby. W Zakładzie Biologii Molekularnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, kierowanym przez prof. Macieja Żylicza, badania prowadzone są z użyciem metody transplantacji ksenogenicznej. W oparciu o powstałą w ostatnich latach w ramach projektu FI-SHMED infrastrukturę umożliwiającą hodowlę i badania nad *Danio rerio*, i we współpracy z posiadającą duże doświadczenie w użyciu tej metody grupą badawczą z Lejdy w Holandii, kierowaną przez prof. Ewę Snaar-Jagalską, prowadzimy badania dotyczące wpływu mutacji w genie kodującym białko p53 na chemiooporność i inwazyjność nowotworów, a także na zdolność komórek nowotworowych do stymulacji wzrostu naczyń krwionośnych gospodarza (angiogenezę). Zdolność komórek nowotworowych do naciekania otaczających tkanek w organizmie modelowym jest pewnym odzwierciedleniem ich potencjału metastatycznego (skłonności do tworzenia przerzutów) w organizmie pacjenta. Metodologia naszych badań obejmuje wprowadzenie do genomu komórek nowotworowych interesujących nas mutacji zmieniających białko p53, a także wprowadzenie genu kodującego białko czerwonej fluorescencji. Komórki te są następnie podawane dożylnie do dwudniowych embrionów rybich za pomocą szklanej igły o średnicy około 40 mikrometrów, co w przybliżeniu odpowiada połowie grubości ludzkiego włosa. Ryby używane do tych doświadczeń są zmodyfikowane genetycznie w taki sposób, że komórki ich śródbłónka wykazują zieloną fluorescencję. Prąd krwi porywa komórki nowotworowe i w naczyniach obwodowych przylegają one do śródbłónka. Ryc. 1A pokazuje trzydniowy embrion rybi, który 24 godziny wcześniej został nastrzyknięty komórkami nowotworowymi w miejscu wskazanym strzałką. Następnie niektóre z zaimplantowanych komórek pokonują barierę śródbłónka i wydostają się z naczyń krwionośnych. Ryc. 1B pokazuje cztero-dniowy embrion rybi, dwa dni po iniekcji. Na powiększeniach widoczne są komórki wewnątrz naczyń krwionośnych (czerwone strzałki) i takie, które wydostały się z naczyń (zielone strzałki). W przypadku użytych w tym doświadczeniu komórek pochodzących z raka płuca, w części ogonowej zwykle wytwarza się kolonia komórek, z której komórki penetrują przylegające tkanki rybie. Na Ryc. 1C pokazany jest ośmiodniowy embrion rybi, sześć dni po iniekcji, z zaznaczonym regionem kolonizacji przez komórki nowotworowe, a na powiększeniach zdjęcia kolonii komórkowych pochodzące z kilku ryb. Kolonie te, jak można zauważyć, wykazują różny stopień inwazyjności, co powinno odzwierciedlać potencjał

metastatyczny tych komórek u pacjenta. Możliwe jest także badanie interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a organizmem gospodarza poprzez np.

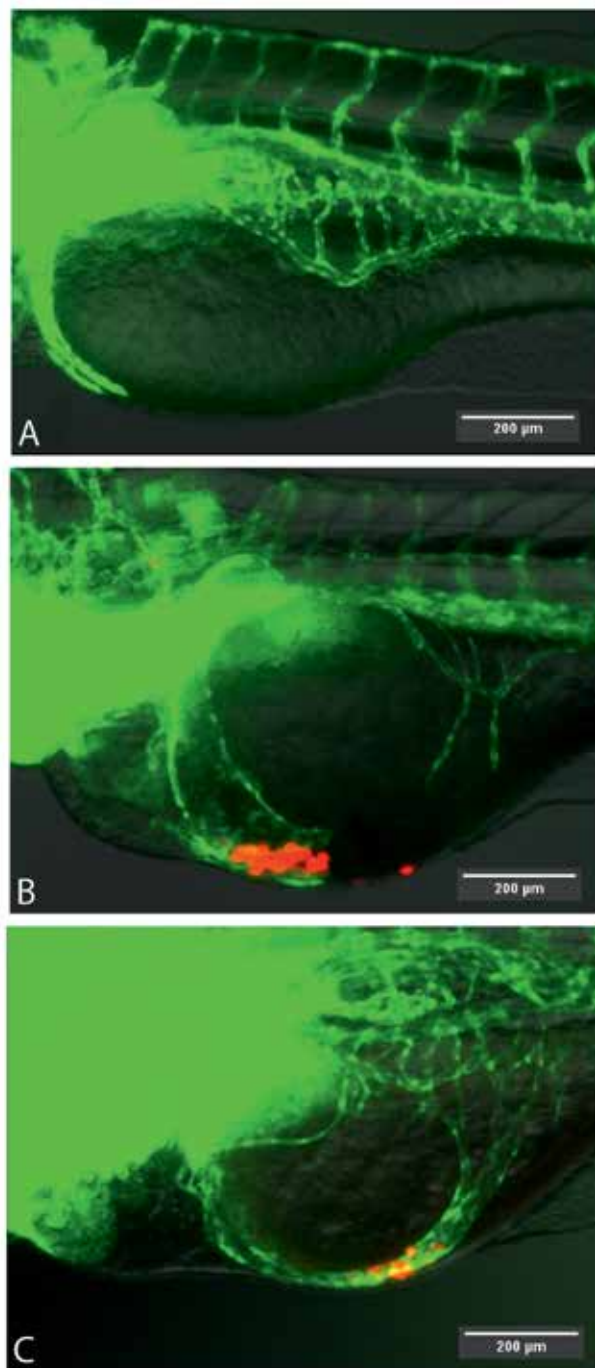


Ryc. 1 Ksenotransplantacja komórek nowotworowych do danio pręgowanego. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłónka, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. (A) Trzydniowy embrion danio pręgowanego, 24 godziny po wstrzyknięciu komórek nowotworowych. Miejsce wstrzyknięcia zaznaczone czerwoną strzałką. (B) Czterodniowy embrion rybi, 48 godzin po wstrzyknięciu komórek. Widoczne są komórki wewnątrz naczyń krwionośnych (czerwone strzałki) i komórki opuszczające te naczynia (zielone strzałki) (C) Ośmiodniowy embrion rybi, 6 dni po wstrzyknięciu komórek nowotworowych. Obszar otoczony ramką na panelu C prezentowany w powiększeniu poniżej. Wyraźnie widoczna lokalna infiltracja tkanek przez komórki nowotworowe, które wydostały się z naczyń krwionośnych.

traktowanie komórek lekami przed wstrzyknięciem do ryby, podawanie leków do wody, w której żyją ryby czy też modyfikacje genetyczne rybiego gospodarza, prowadzące do braku pewnych chemokin lub komórek układu odpornościowego (jak makrofagi czy neutrofile) i obserwowanie wpływu tych manipulacji na przeżywalność i inwazyjność komórek nowotworowych. Z użyciem podobnych technik nasi współpracownicy z Holandii pokazali, że ludzkie komórki nowotworowe z nowotworu piersi umieszczone w organizmie danio pręgowanego wchodzi w interakcje z rybimi neutrofilami i reagują na chemokiny wydzielane przez komórki rybie, zmieniając swoją inwazyjność [6].

Danio rerio pozwala również na przeprowadzanie doświadczeń określających potencjał angiogeny transplantowanych komórek nowotworowych [7]. W warunkach naturalnych guz nowotworowy, po osiągnięciu pewnej granicznej wielkości, nie jest w stanie pozyskiwać czynników odżywczych poprzez dyfuzję. W związku z tym, ażeby przeżyć, komórki nowotworowe muszą wytworzyć zdolność indukowania wzrostu naczyń krwionośnych gospodarza, które to naczynia następnie odżywiają rosnący guz. W tym celu komórki nowotworowe wydzielają różne białka, z których najważniejsze to naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Komórki śródbłonka wykrywają źródło VEGF-u i rosną w jego kierunku. Modelowanie tego procesu w embrionach danio pręgowanego polega na wstrzyknięciu niewielkiej liczby komórek do przestrzeni periwitelarnej (pomiędzy dwie warstwy błony otaczającej żółtko) dwudniowych embrionów i, po 24 godzinach, porównanie morfologii naczyń krwionośnych ryb nastrzykniętych i nienastrzykniętych. Obserwowane naczynia to najczęściej podjelitowy kompleks naczyniowy (ang. SIV), który u ryb dwu- i trzydniowych tworzy rodzaj „siodełka” w górnej części żółtka (Ryc. 2A). W przypadku obecności czynników angiogennych, wydzielanych przez nastrzyknięte komórki, z kompleksu tego wyrastają pierwotne naczynia krwionośne, rosnące w kierunku źródła VEGF-u (Ryc. 2B). Możliwe jest również przemieszczenie i rozrost całego kompleksu SIV (Ryc. 2C). Tego rodzaju badania pozwalają na ilościową i jakościową ocenę procesu wzrostu naczyń krwionośnych w okolicy guza nowotworowego, a także na testowanie skuteczności modyfikacji genetycznych oraz środków farmakologicznych w hamowaniu wzrostu tych naczyń i tym samym zahamowaniu wzrostu guza. Automatyzacja procesu obrazowania i analizy obrazu pozwala na przeszukiwanie dużych bibliotek związków biologicznie aktywnych z użyciem zaawansowanego

ewolucyjnie organizmu – kręgowca, jako modelu badawczego, co było wcześniej niemożliwe. Zastosowanie takiego podejścia doprowadziło już do zidentyfikowania pierwszego związku chemicznego, wstępnie wyselekcjonowanego z użyciem danio pręgowanego, a wykazującego aktywność antyangiogenną w modelu badawczym opartym na komórkach ludzkich [8].

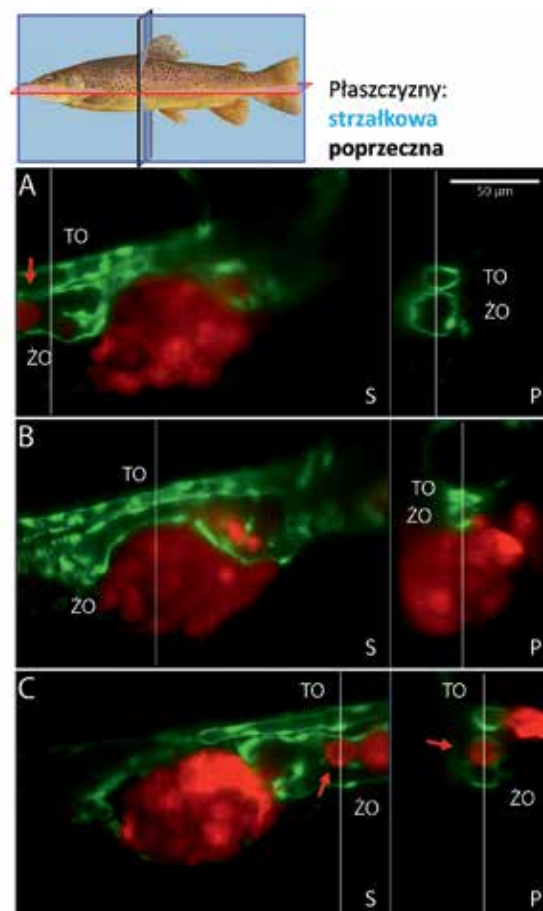


Ryc. 2 Oznaczenie aktywności angiogennej komórek nowotworowych. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłonka, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. Komórki nowotworowe wstrzyknięte zostały do dwudniowych embrionów rybich i pozostały w miejscu wstrzyknięcia. Ryba nienastrzyknięta (A) i ryby nastrzyknięte komórkami nowotworowymi wykazują różną morfologię naczyń krwionośnych.

Na przeciwnym krańcu spektrum metod mikroskopowych używanych w badaniach nad danio pręgowanym lokuje się metoda mikroskopii świetlnopłaszczyznowej (ang. *lightsheet microscopy*). Metoda ta pozwala na niezwykle dokładne obserwacje procesów zachodzących w organizmie żywej ryby, z jednoczesną minimalizacją fototoksyczności wywołanej przez używane powszechnie w mikroskopii fluorescencyjnej światło laserowe, za to o mniejszej przepustowości, jeśli chodzi o liczbę obrazowanych zwierząt. Artykuł szerzej omawiający tę technikę można znaleźć w bieżącym numerze *Wszechświata* na stronach 263–269. W naszych badaniach nad nowotworami metoda ta znajduje zastosowanie w obrazowaniu komórek nowotworowych wstrzykniętych do układu naczyniowego danio. Zdjęcia wykonane w technice stereoskopowej (Ryc. 1 i 2) pozwalają wstępnie ocenić fenotyp kolonii komórek nowotworowych, ale w celu jednoznacznego ustalenia, czy komórki te przywarły do śródbłonna, bądź opuściły naczynia krwionośne – obydwa te etapy są konieczne do powstania przerzutu nowotworu – konieczne jest użycie metody pozwalającej osiągnąć wyższą rozdzielczość i zanalizować badany obiekt w trzech wymiarach. Na Ryc. 3 przedstawiony jest ten sam obszar ryby, co na zbliżeniach na Ryc. 1C, ale zobrazowany techniką mikroskopii świetlnopłaszczyznowej, co pozwala na wykonanie przekrojów w dowolnej płaszczyźnie. Porównanie przekrojów w płaszczyznach strzałkowej (S) i poprzecznej (P) pozwala stwierdzić, że cała kolonia komórek nowotworowych znajduje się na zewnątrz układu naczyniowego. Jednocześnie widać, że w żyłę ogonową (ŻO) znajdują się jeszcze poszczególne komórki nowotworowe (Ryc. 3A i 3C, czerwone strzałki). Z kolei na obszarze największej swojej ekspansji poza naczynia komórki nowotworowe uciskają zarówno żyłę, jak i tętnicę ogonową (TO), powodując znaczące zmniejszenie ich światła, co widać wyraźnie na Ryc. 3B na przekroju poprzecznym.

Podsumowując, wydaje się, że po dekadzie tworzenia modeli chorób, również nowotworowych, i po stworzeniu bogatego zestawu narzędzi do manipulacji genetycznych, *Danio rerio* zaczyna być akceptowany przez środowisko naukowe jako pełnoprawny model badawczy. Ma oczywiście swoje ograniczenia w stosunku do modeli mysich, ale z drugiej strony odpowiada na współczesne wyzwania natury etycznej, związane z prowadzeniem doświadczeń z użyciem zwierząt laboratoryjnych. Co więcej, niektóre z tych doświadczeń, jak np. wysokoprzepustowe przeszukiwanie bibliotek związków chemicznych, na przykład w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych, są

po prostu niewykonalne z użyciem gryzoni, a mogą być zautomatyzowane z użyciem tej ryby. Stąd też uważamy, że danio pręgowany ma duże szanse spełnić pokładane w nim nadzieje i cieszymy się, że również w Polsce powstają kolejne ośrodki naukowe używające tego organizmu modelowego.



Ryc. 3 Obrazowanie ksenotransplantów metodą mikroskopii świetlnopłaszczyznowej. Ośmioldniowe embriony rybie, sześć dni po nastrzyknięciu, obrazowane za pomocą mikroskopii świetlnopłaszczyznowej. Na wszystkich panelach kolor zielony pokazuje komórki śródbłonna, a kolor czerwony wstrzyknięte komórki nowotworowe. Oznaczone przekroje w płaszczyznach strzałkowej (S) i poprzecznej (P); oznaczona tętnica ogonowa (TO) i żyła ogonowa (ZO). Czerwone strzałki wskazują komórki nowotworowe wewnątrz naczyń krwionośnych.

Tab. 1 Zestawienie wybranych modeli chorób nowotworowych stworzonych w *Danio rerio* i opisanych w tekście

Narząd	Transgen	Efekt biologiczny
Wątroba	KRAS (G12V)	Nowotwór wątroby z mutacją w genie KRAS i platforma do testowania leków [1]
Wątroba	HBx	Nowotwór wątroby wywołany ekspresją genu kodującego białko wirusa HBV, wymaga dodatkowo mutacji w p53 [2]
Skóra	BRAF(V600E)	Czerniak z mutacją w genie BRAF, wymaga dodatkowo mutacji w p53 [3]
Różne	KRAS (G12D)	Różne narządy [4]

Bibliografia

1. Ceol, C.J. and Y. Houvras. (2016) Uncharted Waters: Zebrafish Cancer Models Navigate a Course for Oncogene Discovery. *Adv Exp Med Biol.* 916: p. 3–19.
2. Le, X., Langenau D.M., Keefe M.D., Kutok J.L., Neuberg D.S., Zon L.I. (2007) Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 9410–9415.
3. Lu, J.W., Yang W.Y., Tsai S.M., Lin Y.M., Chang P.H., et al. (2013) Liver-specific expressions of HBx and src in the p53 mutant trigger hepatocarcinogenesis in zebrafish. *PLoS One.* 8, e76951.
4. Nguyen, A.T., Emelyanov A., Koh C.H., Spitsbergen J.M., et al. (2012). An inducible kras(V12) transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. *Dis Model Mech.* 5, 63–72.
5. Nicoli, S. and M. Presta (2007). The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2, 2918–2923.
6. Patton, E.E., Widlund H.R., Kutok J.L., Kopani K.R., et al. (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol.* 15, 249–254.
7. Tran, T.C., Sneed B., Haider J., Blavo D., White A., et al. (2007) Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res.* 67, 11386–11392.
8. Tulotta, C., Stefanescu C., Beletkaia E., Bussmann J., et al. (2016). Inhibition of signaling between human CXCR4 and zebrafish ligands by the small molecule IT1t impairs the formation of triple-negative breast cancer early metastases in a zebrafish xenograft model. *Dis Model Mech.* 9, 141–153.

Maciej Olszewski i Magdalena Prusko. Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Zakład Biologii Molekularnej, Warszawa. E-mail: molszewski@iimcb.gov.pl. Badania finansowane przez Komisję Europejską i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu FishMed, kontrakt nr 316125.

KAMPANIA EDUKACYJNA „BĄDŹ ZDRÓW JAK RYBA” JAKO PRZYKŁAD DZIAŁAŃ POPULARYZATORSKICH



Daria Goś (Warszawa)

Streszczenie

Artykuł prezentuje kampanię edukacyjną „Bądź zdrow jak ryba” realizowaną przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) w Warszawie oraz efekty związane z realizacją programu. Celem akcji jest edukowanie w zakresie biologii i badań naukowych prowadzonych w Instytucie. Chcąc w przyjazny sposób przybliżyć dzieciom współczesne nauki biologiczne w zakresie uzupełniającym ich wiedzę szkolną i zachęcającym do szerszego poznawania tej dziedziny nauki w przyszłości, Instytut przygotował program warsztatów edukacyjnych dla dzieci, książeczkę i materiał wideo pod wspólnym tytułem „Bądź zdrow jak ryba”.

Abstract

This article presents the “Be Healthy as a Fish” educational program organized by the International Institute of Molecular and Cell Biology (IIMCB) in Warsaw and the positive effects resulting from the campaign. The aim of the program is to educate in the field of biology and research conducted at the Institute. In order to focus on the field of biology in a way that complements the children’s classroom curriculum and encourages them to broaden their interests in biology in the future, the Institute created a workshop, a booklet and a movie each under the title “Be Healthy as a Fish”.

Wprowadzenie

Jeżeli spojrzymy na komunikowanie naukowe z poziomu społecznego, to możemy zauważyć, że badania naukowe oraz ich rezultaty coraz częściej są społeczną, gospodarczą, bądź kulturową siłą, a informowanie o pracach badawczych to proces ugruntowujący naukę [3]. Ważne jest, aby komunikacja naukowa była postrzegana jako wiarygodny partner w publicznej dyskusji i rozwoju społeczeństwa. Występuje tu obustronna zależność, gdyż społeczeństwo potrzebuje nauki, aby móc napędzać zachodzące w nim zmiany, a nauka opiera się na pomysłach, kreatywności i talentach ludzi, którzy ją tworzą.

Wychodząc temu naprzeciw Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) w Warszawie stworzył kampanię edukacyjną zatytułowaną „Bądź zdrow jak ryba”. Celem programu jest edukacja na temat wykorzystania ryb z gatunku danio pręgowanego (*Danio rerio*) jako organizmu modelowego, pozwalającego naukowcom zrozumieć sposób, w jaki działa organizm człowieka. Inspiracją do stworzenia akcji edukacyjnej był projekt “Fishing for Medicines and their targets using Zebrafish models of human diseases” (akronim FishMed) realizowany od grudnia 2012 roku i sfinansowany przez Komisję Europejską w ramach 7. Programu Ramowego oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Celem projektu było wprowadzenie danio pręgowanego jako nowego modelu badawczego, umożliwiającego prowadzenie innowacyjnych projektów przy zastosowaniu tego zwierzęcego modelu chorób ludzkich.

Pierwsze działania skierowane do grupy najmłodszych zostały podjęte w grudniu 2013 roku, kiedy to Instytut zorganizował przedświąteczny konkurs plastyczny dla dzieci pt. „Danio pręgowany w świątecznej scenerii”. Prace konkursowe mogły być wykonane dowolnie wybraną techniką (rysunek, wycinanka, wydzieranka, technika mieszana). Ocenie podlegał pomysł, kreatywność, estetyka i nawiązanie do projektu FishMed. Wszyscy młodzi artyści biorący udział w konkursie zostali nagrodzeni, a jedna z prac została wybrana do stworzenia instytutowej kartki świątecznej. Coroczna wizyta Uzdolnionej Młodzieży stała się okazją do podjęcia działań edukacyjnych. Stypendyści Krajowego Funduszu na rzecz Dzieci w marcu 2014 roku wzięli udział w zajęciach grupowych, podczas których pracowali ze stroną internetową projektu FishMed, wspólnie zastanawiali się nad etapami rozwoju ryby i układali zdjęcia spod mikroskopu w odpowiedniej kolejności, a po zapoznaniu się z artykułami prasowymi rozwiązywali krzyżówkę. Natomiast program edukacyjny

„Bądź zdrow jak ryba” został zainaugurowany we wrześniu 2014 roku podczas Festiwalu Nauki. Inicjatorem akcji był prof. Jacek Kuźnicki, dyrektor Instytutu. Materiały edukacyjne przygotowane zostały przez zespół pracowników MIBMiK, w skład którego wchodził naukowcy, kierownik Pracowni Hodowli Danio Pręgowanego, lekarz weterynarii oraz specjalista ds. public relations. Aby stworzyć program, który byłby interesujący, a zarazem zrozumiały dla młodych odbiorców, wszystkie materiały i scenariusz zajęć przygotowane dla dzieci opracowano na podstawie konsultacji z BioCentrum Edukacji Naukowej (BioCEN) i metodykiem. BioCEN to przedsięwzięcie edukacyjne, powstałe w 2002 roku dzięki pomocy i wsparciu MIBMiK, a jego celem jest popularyzacja biologii w społeczeństwie, zwłaszcza poprzez organizację warsztatów laboratoryjnych, szkoleń, pokazów i wykładów dla młodzieży, nauczycieli biologii oraz zainteresowanych osób.

Bądź zdrow jak ryba – skąd taki tytuł?

Mówimy, że ktoś jest „zdrow jak ryba”, opisując osobę o dobrym zdrowiu. To powiedzenie zostało celowo użyte jako motyw przewodni działań, aby wywołać refleksję, „czy to oznacza, że ryby rzeczywiście nie chorują i naprawdę mają tak dobre zdrowie”? W rzeczywistości, podobnie jak inne zwierzęta i jak ludzie, ryby mogą zachorować. Obiegowa i nie do końca prawdziwa opinia o ich dobrym zdrowiu wynika stąd, że ludzie wyjątkowo rzadko mają możliwość obserwowania chorujących ryb. Należy zwrócić uwagę, że ten łatwy do zapamiętania tytuł, będący często stosowanym związkiem frazeologicznym, wiąże ze sobą dwa słowa kluczowe dla programu: „zdrowie” i „ryba”, a ich połączenie oddaje tematykę akcji edukacyjnej. Wykorzystanie tego potocznego powiedzenia, jako nieco przewrotnego tytułu, miało na celu nadanie mu zupełnie nowego skojarzenia: ryby też mogą chorować, ale zarazem mają istotne znaczenie dla zdrowia człowieka.

Książka edukacyjna „Bądź zdrow jak ryba” [1]

Na potrzeby kampanii powstała książka, która przybliżyła młodym czytelnikom skomplikowany świat nauki. Na początku, wykorzystując serię intrygujących pytań adresowanych do czytelników, zachęca ich, by zastanowili się nad pytaniem: „Czego potrzebują naukowcy, aby znaleźć lek na chorobę?” Poprzez porównanie organizmu do maszyny złożonej ze skomplikowanych elementów, które nie mogą działać jeden

bez drugiego, książeczka prowadzi czytelników do wniosku, że zdrowie ludzkiego organizmu, podobnie jak prawidłowe funkcjonowanie złożonej maszyny, jest wynikiem prawidłowego działania jego elementów składowych, czyli komórek. Aby móc walczyć z chorobami, naukowcy muszą mieć dobry atlas ludzkiego organizmu, pokazujący jego organizację i funkcjonowanie, podobnie jak technicy potrzebują szczegółowych instrukcji po to, by naprawić sprzęt i maszyny, gdy te nie działają prawidłowo. Wielką pomocą przy tworzeniu takiego atlasu są organizmy modelowe. Wprowadzenie to stanowi dla czytelników zaproszenie do zapoznania się z dalszą częścią opowiadanej historii i odkrycie zalet rybki danio jako organizmu modelowego. Autorzy dokonują kilku porównań pomiędzy człowiekiem a danio pręgowanym, by w prosty sposób pokazać podobieństwa obu tych gatunków, zaczynając na poziomie komórkowym, a kończąc na porównaniu ciała człowieka i ryby, tak by uwidocznili anatomiczne i psychologiczne podobieństwa tych organizmów. Aby wyjaśnić, dlaczego ludzie są tak podobni do zwierząt, autorki książeczki przedstawiają młodym czytelnikom podstawowe informacje na temat ewolucji królestwa zwierząt. Co ważne, dzieci dowiadują się, że naukowcy potrafią wykorzystać zarówno podobieństwa między człowiekiem a rybką *Danio rerio*, jak i różnice między nimi (np. takie jak rozwój potomstwa poza organizmem matki i relatywnie krótki czas życia rybek). Na koniec książka prezentuje przyszłe wyzwania stojące przed nauką, w tym nieodkryte jeszcze leki. Autorki wykorzystują chorobę Alzheimera i chorobę Parkinsona jako przykłady chorób, dla których nie znaleziono jeszcze skutecznych terapii. Wyjaśniają czytelnikom, w jaki sposób wykorzystanie stosunkowo krótko żyjącej rybki, jako modelu ludzkich chorób związanych ze starzeniem się organizmu, może pomóc naukowcom w odkryciu skutecznych terapii leczących ludzi cierpiących na takie choroby. Na zakończenie książki autorki zapraszają czytelników, aby w przyszłości dołączyli do grona naukowców jako badawcze i uczeni oraz zgłębiali niezbadane dotąd obszary. Z założenia książka adresowana jest do uczniów szkół podstawowych, mających jedynie podstawową wiedzę o naukach przyrodniczych, dlatego też została zilustrowana żartobliwymi i przyciągającymi uwagę rysunkami o charakterze komiksowym, aby uczynić jej zawartość bardziej interesującą dla młodych czytelników. Przez wszystkie obrazki przewijają się dwie główne postacie: chłopiec i rybka. Jedną z ilustracji przedstawia chłopca, który przegląda się w lustrze, a odbiciem widzianym przez niego jest rybka danio pręgowany. Obrazek ten wybrano na okładkę książki

(Ryc. 1) jako „graficzne podsumowanie” programu edukacyjnego. Ponadto, aby pomóc czytelnikom w przyswojeniu sobie przekazywanych w tekście wiadomości, książka oprócz ilustracji zawiera również ciekawe zadania do rozwiązania. Zamieszczony na końcu krótki słowniczek podaje definicje terminów użytych w książce, których zrozumienie może być trudne dla niektórych czytelników. Co ważne, merytoryczną zawartość książki stworzono we współpracy z ekspertem metodyki nauczania biologii, tak by zapewnić, że jej przekaz będzie zarówno zrozumiały, jak i inspirujący dla młodych odbiorców.



Ryc. 1. Okładka książki „Bądź zdrow jak ryba”.

Książkę otrzymują wszyscy uczestnicy warsztatów „Bądź zdrow jak ryba”. Jest to dla nich zaproszenie, aby poszerzyli swoją wiedzę, wykraczając poza kwestie poruszane w trakcie zajęć. Jednak treść książki została napisana w taki sposób, aby mogła stanowić niezależnie opowiedzianą historię, zrozumiałą nawet dla odbiorców nieuczestniczących w warsztatach. Książka dostępna jest na stronie internetowej MIBMiK w dwóch wersjach językowych (polskiej i angielskiej) i można ją pobrać za darmo. Może stanowić materiał dodatkowy dla nauczycieli, wspomagający omawianie tematów, takich jak ewolucja, biologia komórki, dziedziczność, anatomiczne podobieństwa pomiędzy ludźmi i zwierzętami. Jest to także interesujący punkt wyjścia do dyskusji na tematy, takie jak zastosowanie zwierzęcych modeli badawczych w pracy naukowej oraz ich wpływ na potencjalne odkrycie nowych leków.

Film edukacyjny „Bądź zdrow jak ryba” [2]

Celem filmu jest zapoznanie widzów z działalnością Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej

i Komórkowej w Warszawie i tematyką prowadzonych tu badań, a także pokazanie jak wygląda codzienna praca naukowców. Niespełna sześciominutowy filmik jest w znacznej mierze animowany, jednak kilka kadrów zostało nagranych w Instytucie, aby pokazać rzeczywisty wygląd laboratoriów, czy hodowli danio pręgowanego (Ryc. 2). Fabuła filmu budowana jest wokół wycieczki po Instytucie, podczas której animowany profesor prezentuje tajemnice naukowego świata biologii molekularnej i komórkowej. W tym celu cofamy się kilka lat wstecz, kiedy w Instytucie pojawił się ulubieniec profesora, czyli rybka danio pręgowany. W trakcie wycieczki widzowie dowiadują się, dlaczego wybrano rybkę i są świadkami tworzenia się nowego międzynarodowego zespołu naukowców. Mogą również obserwować życie codzienne w „rybim miasteczku”, na które składają się setki akwariów, a profesor bierze udział w karmieniu. Podobnie jak książeczka edukacyjna, treść filmu zawiera wiele cennych informacji na temat rozwoju i biologii danio pręgowanego, a także przedsta-

warsztat dzieci proszone są o opisanie różnic pomiędzy dwoma systemami hodowli rybek. Następnie dzieci oglądają pod stereoskopowym mikroskopem jedno- lub dwudniowe embriony oraz starsze larwy *Danio rerio*. Ich uwagę naprowadza się najpierw na embriony, gdzie można zauważyć żółtko jaja i narządy rozwijającej się rybki. Dzieci są zafascynowane bijącym sercem małej rybki. Następnie prowadzący warsztat wyjaśnia, jak karmi się rybki w rybim miasteczku. Pod stereoskopowym mikroskopem dzieci oglądają żywy pokarm, czyli artemię i wrotki. Dzieci dowiadują się, że rozwój danio jest bardzo podobny do embriogenezy wyższych kręgowców. Jedną cechą odróżnia je od ssaków, rybki danio rozwija się z zapłodnionych, przezroczystych jajeczek przebywających poza organizmem samicy. W ciągu pierwszych 24 godzin po zapłodnieniu, formują się najważniejsze organy i systemy. Embriony pozostają transparentne, co daje naukowcom niepowtarzalną okazję do obserwacji. Dzieci pracują w grupach, a ich zadaniem jest uporządkowanie obrazków spod mikro-



Ryc. 2. Kadry z filmu Bądź zdrow jak ryba.

wia genetyczne i anatomiczne podobieństwa pomiędzy człowiekiem a rybką [4]. Widzowie dowiadują się ponadto, że nauka nie ma granic, a nowe odkrycia są efektem wspólnych wysiłków naukowców z całego świata, którzy współpracują ze sobą i dzielą się swoją wiedzą podczas seminariów i konferencji. Filmik (w języku polskim i angielskim) jest dostępny na stronie internetowej projektu FishMed, skąd można go bezpłatnie pobrać. Dodatkowo, aby zwiększyć jego dostępność dla młodych odbiorców, film można obejrzeć również w serwisie internetowym YouTube.

Warsztaty edukacyjne „Bądź zdrow jak ryba”

Warsztat rozpoczyna się od prezentacji filmiku „Bądź zdrow jak ryba”. Następnie dzieciom pokazuje się dwa akwaria: klasyczne szklane akwarium z piaskiem, roślinami i innymi elementami dekoracyjnymi oraz pozbawione ozdób plastikowe akwarium z hodowli rybki danio. Z pomocą osoby prowadzącej

skopu prezentujących poszczególne stadia rozwoju i ułożenie ich w kolejności. Kolejną część warsztatu skupia się wokół danio pręgowanego jako organizmu modelowego w MIBMiK. Dzieci proszone są o podanie wymienionych w filmiku powodów, dla których wybrano rybkę danio jako organizm modelowy (np. genetyczne podobieństwo do człowieka, rozwój rybki poza organizmem mamy, przezroczystość rybki na wczesnych etapach rozwoju, a także szybki wzrost). W tym miejscu omawiane są podobieństwa pomiędzy człowiekiem a rybką danio. Prowadzący warsztat wyjaśnia, że najprostsze organizmy są jednokomórkowe (np. bakterie, drożdże i pierwotniaki), podczas gdy komórki organizmów wielokomórkowych zorganizowane są w narządy. Następnie dzieci dostają karteczki w kształcie ryby i człowieka z wpisanymi nazwami narządów (np. serce, mózg, wątroba, nerki, woreczek żółciowy, jelito, płuca/skrzela, kręgosłup oraz żołądek tylko na szablonie człowieka). Prowadzący czyta opisy poszczególnych narządów, a uczestnicy

podnoszą karki, jeśli uznają, że spełnia ona warunki opisu. Prowadzący monitoruje podnoszone kartki, aby za każdym razem pojawiała się para narządów, a w przypadku niejasności poszerza opis narządu. Pod koniec zabawy prowadzący pyta, czy zostały jakieś kartki (dzieci powinny nadal mieć trzy karteczki: jelito u ryby i człowieka oraz żołądek u ryby) i tłumaczy, dlaczego tak jest. Omawia specyfikę trybu życia i odżywiania danio przegowanego oraz tłumaczy, dlaczego u niektórych gatunków ryb żołądek nie występuje. Na zakończenie dwoje ochotników prezentuje całej grupie tablice z rybą i człowiekiem, przedstawiające ułożenie narządów, które omawia prowadzący. Podczas ostatniej części zajęć dzieci zostają podzielone na trzy grupy, które pracują nad zadaniami w trybie rotacyjnym. Grupa pierwsza dostaje szablon w kształcie ryby i naklejki przedstawiające różne organy, a ich zadanie polega na przyklejeniu ich we właściwych miejscach (Ryc. 3). Kolejna



Ryc. 3. Szablon rybki danio przegowany z przyklejonymi narządami.



Ryc. 4. Dzieci wykonujące testy wody.

rozwiązuje krzyżówkę, pomagając im zapamiętać informacje przekazane podczas warsztatu. Zaś ostatnia grupa bada właściwości wody, przeprowadzając testy kalorymetryczne. Dzieci mierzą pH i twardość wody z kranu oraz wody używanej w instytutowej hodowli (Ryc. 4). Testy te wybrano, ponieważ są łatwe do samodzielnego przeprowadzenia przez dzieci i dają zróżnicowane kolorystycznie wyniki dla używanych dwóch rodzajów wody. Analizy wody nadzorowane są przez techników, zajmujących się hodowlą *danio rerio* w MIBMiK. Dzieci samodzielnie prowadzą badania wody, a później mogą zadawać pytania dotyczące biologii ryb i pozostałych kwestii związanych z hodowlą. Uczniowie otrzymują książkę „Bądź zdrow jak ryba”, która tematycznie wykracza poza kwestie poruszane w trakcie zajęć oraz trójwymiarową zakładkę do książki prezentującą zmieniające się zdjęcia pływających rybek danio przegowane. Dzieci mogą również zrobić sobie pamiątkowe zdjęcia jako ryby i krewetki przy specjalnie przygotowanej fotościanie.

Na sam koniec dzieciom zadawane jest pytanie, która część zajęć podobała im się najbardziej. Dzieci reagują bardzo entuzjastycznie, a poproszone o konkretne wskazania najczęściej wybierają testy wody i obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu. Również nauczyciele są proszeni o wypełnienie kwestionariusza oceny zajęć. Do 31 października 2016 roku 42 nauczycieli/opiekunów oceniło poszczególne elementy zajęć i jednomyślnie stwierdzili, że wszystkie elementy warsztatów są ze sobą powiązane i pokazują znaczenie pracy naukowej. Wskazali oni prowadzenie eksperymentów i możliwość obserwowania rybich embrionów pod mikroskopem jako dwie największe zalety warsztatów. Zapytano ich także, czy warsztat jest komplementarny z programem nauczania w szkole (40 nauczycieli odpowiedziało, że tak, a tylko dwie osoby udzieliły odpowiedzi „nie wiem”). Nauczyciele wskazywali, że utrwalenie i powtórzenie nowych informacji pomaga uczniom zapamiętać i ugruntować materiał. Zwracali również uwagę na dobrą atmosferę oraz możliwość zarówno pracy indywidualnej, jak i grupowej. Jednym z dobrych wskaźników ujawniających pozytywny efekt zajęć jest to, że wiele dzieci spontanicznie przysyłało później prace pisemne lub plastyczne związane tematycznie z warsztatami wykonane w domu lub w szkole. Kolekcja tych prac wskazuje, że temat interesuje dzieci, a program łączy w sobie walory edukacyjne i pozostawia przyjemne wspomnienia.

Podsumowanie

Kampania edukacyjna „Bądź zdrow jak ryba” została zapoczątkowana przez MIBMiK we wrześniu 2014 roku w ramach Festiwalu Nauki. W roku szkolnym 2014/2015 prowadzono 90-minutowe warsztaty, średnio trzy razy w miesiącu. W kolejnym roku warsztaty odbywały się dwa razy w miesiącu. W trakcie przyjmowania zapisów informacja o rezerwacjach była dostępna na stronie internetowej Instytutu oraz projektu FishMed, a także była rozsyłana przez BioCEN do szkół podstawowych w województwie mazowieckim. Podczas trzech naborów na zajęcia wszystkie dostępne terminy zostały zarezerwowane w pierwszym dniu rezerwacji, co wyraźnie wskazuje na zapotrzebowanie na tego typu przedsięwzięcia edukacyjne. Do 31 października 2016 roku w 33 warsztatach udział wzięło łącznie 695 uczniów szkół podstawowych. Film obejrzało lub pobrało ze strony ponad 3000 użytkowników. Książkę w obu wersjach językowych łącznie otrzymało ponad 4000 osób,

Wersje angielskie książeczki otrzymali także uczestnicy konferencji Heart of Europe: Zebrafish Meeting, zorganizowanej przez MIBMiK we wrześniu 2014 roku oraz międzynarodowej konferencji Fish-Med2016. Książeczka „Be Healthy as a Fish” została wydrukowana przez naukowców z Uniwersytetu w Sheffield i była rozdawana podczas wystawy „The Artful Zebrafish/Earn Your Stripes” (Ryc. 5), zorganizowanej w ramach tegorocznego święta miasta (Festival of the Mind, 15–25 wrzesień 2016, Sheffield, Anglia). Działania edukacyjne prowadzone w ramach programu „Bądź zdrow jak ryba” były prezentowane podczas warsztatu „Zebrafish in Teaching”, zorganizowanego podczas dziewiątej edycji europejskiego spotkania poświęconego rybce danio (9th European Zebrafish Meeting, 28.06–02.07.2015, Oslo, Norwegia). Podczas 6. Europejskiego Forum Marketingu Instytucji Naukowych i Badawczych w listopadzie 2015 roku poster prezentujący działania edukacyjne MIBMiK zwyciężył w głosowaniu uczestników konferencji na najciekawszy plakat naukowy. Kolejnym



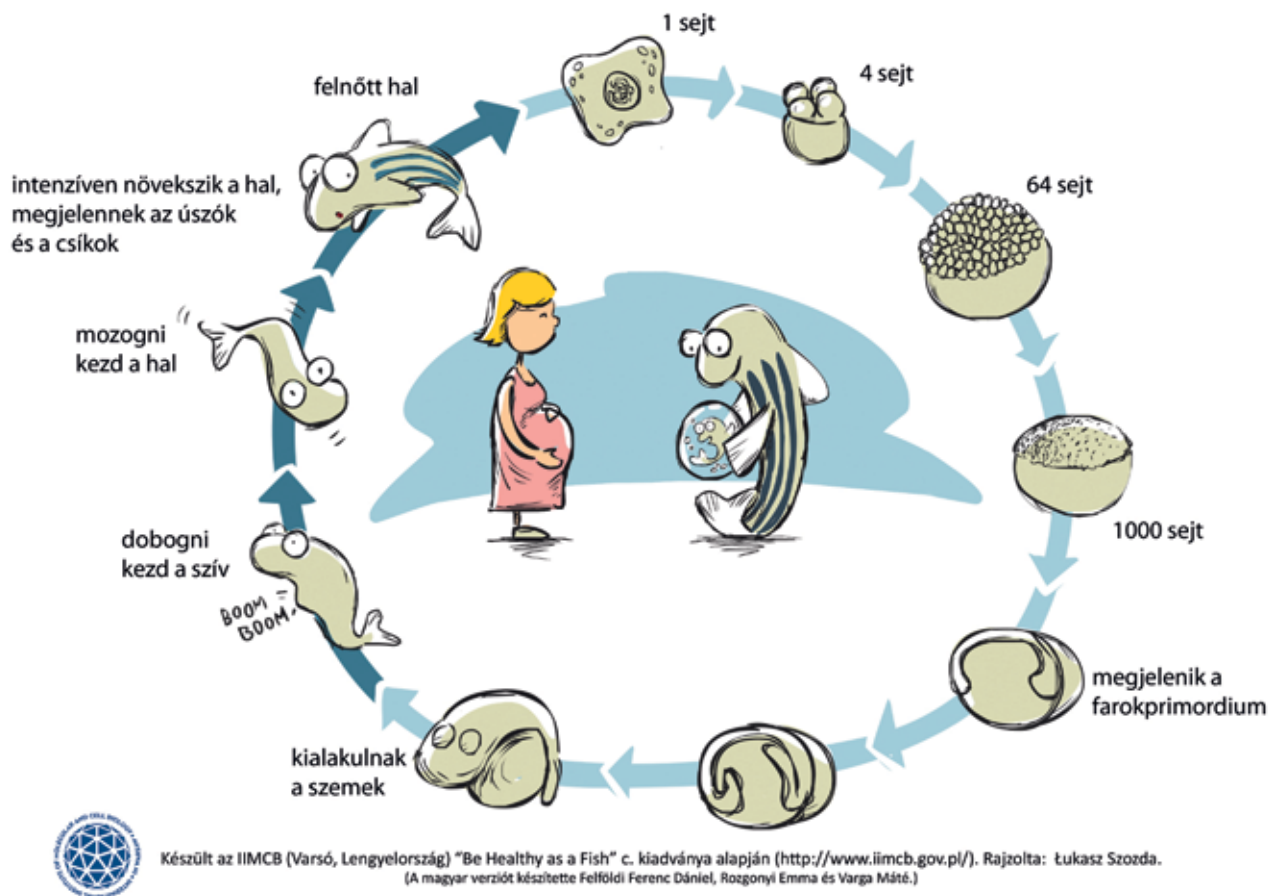
Ryc. 5. Książeczka Be Healthy as a Fish na festiwalu w Sheffield.

a blisko 2000 osób pobrało ją ze strony internetowej. Korzystając z wielu kanałów dystrybucji książkę rozdawano podczas standardowych warsztatów dla klas szkolnych oraz ich specjalnych edycji, np. podczas spotkania Polskiego Towarzystwa J-elita, jak również podczas corocznych Warszawskich Targów Książki.

sukcesem akcji jest opracowanie broszury informacyjnej, dotyczącej wykorzystania zwierząt jako modeli badawczych, w oparciu o materiały graficzne z książeczki „Bądź zdrow jak ryba” (Ryc. 6). Ulotka była opracowana we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Loranda Eötvösa i dystrybuowana

30 września 2016 roku podczas Nocy Naukowców w Budapeszcie.

postrzegany jest przez uczestników zajęć jako ciekawe miejsce pracy, gdzie łączy się wiedzę teoretyczną z praktyką. Zachęcenie młodzieży do rozwijania za-



Ryc. 6. Druga strona ulotki przygotowanej na Noc Biologów w Budapeszcie.

Wnioski

Dzięki prowadzonej kampanii edukacyjnej MIB-MiK buduje wizerunek instytutu zaangażowanego w działania popularyzatorskie i edukację młodzieży. Dodatkowo oferowane materiały i zajęcia dobrze wpisują się w potrzeby edukacyjne szkół oraz cieszą się uznaniem uczniów i nauczycieli. Przeprowadzone badania ewaluacyjne wskazują, że 100% nauczycieli i opiekunów grup uznało poziom przygotowania zajęć za bardzo wysoki. Dzięki warsztatom Instytut

interesowań w kierunku biologicznym to szansa na pozyskanie w przyszłości wykształconej kadry badawczej i rozwój Instytutu. Co najważniejsze, podczas zajęć dzieci i młodzież przekonują się, że obserwowanie danio przegowanego to bardzo cenne doświadczenie, ponieważ analizując przebieg chorób ryb, można zrozumieć, co dzieje się w ciele chorego człowieka, a ta wiedza przybliży naukowców do najważniejszego celu, czyli odkrycia leków na choroby nękające ludzi.

Bibliografia

1. Bartosik A., Szymańska E. (2014) Bądź zdrow jak ryba, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Warszawa, 2014.
2. Filipek D., Korzeniewska J., Szozda Ł. (2014) Bądź zdrow jak ryba - film, 22.10.2014. <https://www.youtube.com/watch?v=vtmxn7mcUr4>

3. Kulczycki E. (2012) Komunikacja naukowa, czyli co?, 9.12.2012. http://ekulczycki.pl/teoria_komunikacji/komunikacja-naukowa-czyli-co/
4. Westerfield Monte (2000) Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), University of Oregon Press, Eugene, OR, Wydanie 4, 2000. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html

■ Daria Goś. Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. E-mail: dgos@iimcb.gov.pl

NADCIEKŁY HEL – SUBSTANCJA MAGICZNA

Ziemowit M. Malecha (Wrocław)

Streszczenie

Praca wprowadza zagadnienie kolejnego stanu skupienia materii – nadciekłości w oparciu o nadciekły hel (He II). Omówione są zaskakujące właściwości hydrodynamiczne oraz termodynamiczne He II w oparciu o badania przeprowadzone w Katedrze Inżynierii Kriogenicznej, Lotniczej i Procesowej, Politechniki Wrocławskiej oraz w CERN (Europejska Organizacja Badań Jądrowych, Genewa). Jako przykład spektakularnego wykorzystania właściwości nadciekłości przedstawione są magnesy nadprzewodzące, wykorzystywane w akceleratorze cząstek LHC w CERN. Praca zwraca uwagę na istnienie konceptualnego modelu płynu doskonałego, którego odkrycie w świecie rzeczywistym było dużym zaskoczeniem.

Abstract

Present work introduces a new state of matter – superfluidity, based on superfluid helium (He II). It describes spectacular hydrodynamical and thermodynamical qualities of He II, based on research done at Wrocław University of Science and Technology and at CERN (European Organization for Nuclear Research). Spectacular properties of superfluid helium are presented based on superconducting magnets used in particle accelerator LHC at CERN. The work draws attention to a priori existing conceptual model of a perfect fluid, whose discovery in the real world was a big surprise.

Ludzie od dawnych czasów obserwowali otaczający ich świat i próbowali go opisać używając dostępnych im metod. Widzieli różnorakie kształty i przelewali je na papier w formie wieloboków, okręgów, kształtów trójwymiarowych. Szukali zależności między tymi kształtami, tworząc geometrię. Ważne jest, aby sobie uświadomić, że figury geometryczne na papierze oraz zachodzące pomiędzy nimi zależności, są idealne. Można je zaobserwować w świecie rzeczywistym tylko z pewnym przybliżeniem.

Aby lepiej to zilustrować, przywołajmy okrąg. Idealny okrąg jest opisany liczbą Pi (greckie π), która jest równa stosunkowi długości obwodu koła do długości jego średnicy. Jak wiemy, rozwinięcie liczby π

jest nieskończone, co oznacza, że w rzeczywistym świecie nie jesteśmy w stanie stworzyć idealnego koła, tylko pewne jego przybliżenie.

Analogia tworzenia form idealnych, rodzących się w ludzkim umyśle, do opisu nie-idealnej rzeczywistości jest obecna w wielu innych miejscach matematyki, fizyki, czy chemii. Innym przykładem, będącym tematem przewodnim tego artykułu, jest płyn idealny. Płynem nazywamy tutaj zarówno ciecz, jak i gaz, czyli substancję która stanowi pewne continuum w przestrzeni.

Równania dynamiki płynu, zwane równaniami Naviera-Stokesa, zostały sformułowane w XIX wieku. Opisują one ruch płynu w oparciu o prawa Newtona:

$$F = m \cdot a$$

czyli zmiana przyspieszenia a elementu płynu może tylko nastąpić poprzez zmianę siły F . W przypadku płynów rzeczywistych siła F zawiera w sobie między innymi: siłę pochodzącą od ciśnienia oraz siłę pochodzącą od tarcia wewnętrznego płynu (siły lepkościowe). Lepkość jest cechą fizyczną charakteryzującą dany płyn. Obrazowo, małą lepkość ma woda, więc „łatwiej” ją mieszać oraz tworzyć różnego rodzaju wiry, dużą lepkość ma miód, więc trudno jest wytworzyć w nim wiry. Niemniej jednak w obu tych wypadkach lepkość jest niezerowa, więc z czasem dochodzi o dyssypacji (zaniku) wirów na skutek tarcia.

Jeszcze do niedawna uważano, że istnieją tylko płyny o niezerowej lepkości. Trudno było sobie wyobrazić płyn idealny, z lepkością równą zero (brak tarcia wewnętrznego), w rzeczywistym świecie. Jednak nie było to przeszkodą, aby taki płyn stworzyć w sferze idei. Nic prostszego, jak tylko założyć, że w sile F , powodującej zmianę przyspieszenia płynu, jej składowa lepkościowa równa się zero. Tak powstał model płynu idealnego.

Użycie tej idei w fizyce czy inżynierii było i nadal jest powszechne. W pewnych sytuacjach można założyć, że płyn rzeczywisty zachowuje się jak idealny. Czasem ułatwia to rozwiązywanie równań i pozwala wyciągać ciekawe i przydatne wnioski.

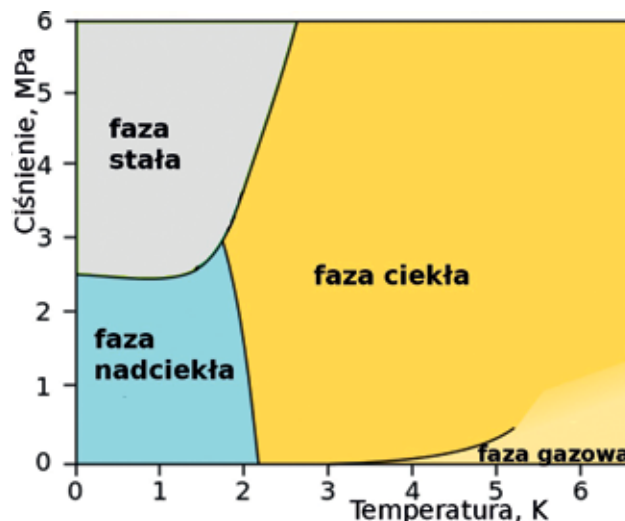
Nadciekłość – niezwykle stan skupienia materii

W tradycyjnym i uproszczonym podziale przyjmuje się, że materia może występować w trzech stanach skupienia: ciało stałe, ciecz i gaz. Postęp techniki otworzył nowe możliwości, dzięki którym można było wytworzyć warunki, które ujawniły szereg kolejnych możliwości stanu skupienia materii. Do bardziej znanych, nazywanym czwartym stanem skupienia, należy plazma.

Możliwość wytwarzania bardzo niskich temperatur oraz bardzo niskich lub bardzo wysokich ciśnień dało możliwość zestalania lub skraplania substancji, które nie występują w takiej formie na naszej planecie. Między innymi skroplono tlen, azot, argon oraz hel. Okazało się, że w przypadku helu doszło do spektakularnego odkrycia, pojawił się kolejny, zaskakujący stan skupienia: nadciekłość [5].

Rycina 1. przedstawia wykres przemiany fazowej dla helu. Na osi poziomej widoczna jest temperatura w stopniach Kelvina (0 K oznacza zero absolutne, najniższą teoretycznie możliwą temperaturę, czyli -273.15 stopnia Celsjusza), na osi pionowej naniesione jest ciśnienie, 0,1 MPa oznacza ciśnienie

atmosferyczne. Śledząc wykres możemy zaobserwować, w jakich warunkach (temperatura i ciśnienie) istnieje dany stan skupienia dla helu.



Ryc. 1. Wykres przemiany fazowej dla helu. Stan nadciekły występuje dla temperatury poniżej 2K.

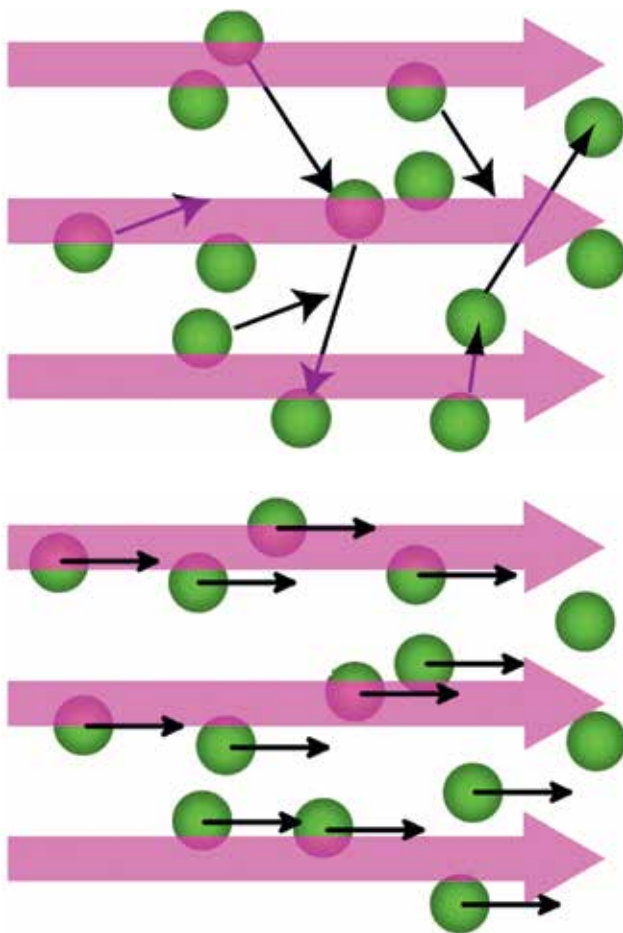
Faza nadciekła ma właściwości płynu idealnego, którego istnienia w świecie rzeczywistym nikt się nie spodziewał. Z rysunku widać, że w ciśnieniu atmosferycznym nadciekły hel ma poniżej 2,17K (-271°C).

Rycina 2. przedstawia różnicę między zachowaniem się molekuł w płynie rzeczywistym (lepkim) oraz nadciekłym (nielepkim). Makroskopowa (średnia) prędkość przepływu zaznaczona jest dużymi jasnymi strzałkami, natomiast czarne, mniejsze strzałki oznaczają wektory prędkości chwilowej poszczególnych molekuł (długość wektora obrazuje wartość prędkości). Chaotyczny ruch molekuł, wywołany wzajemnymi kolizjami, powoduje powstanie naprężeń ścinających (lepkościowych) i przekazanie informacji o ruchu makroskopowym do dalszych obszarów przepływu. Wartość lepkości zależy od średniej drogi swobodnej między molekułami oraz od średniej prędkości molekuł.

W przypadku przepływu nadciekłego obraz ten jest zasadniczo różny. Przekazywanie informacji o przepływie makroskopowym nie odbywa się na zasadzie tarcia wewnętrznego (lepkości), lecz jest związane ze zjawiskiem kondensacji kwantowej. Cząstki zachowują się w sposób kolektywny, tzn. mają taki sam pęd, przez co nie ulegają chaotycznym zderzeniom (dolny rysunek z ryciny 2).

Drugą niezwykle ważną cechą nadciekłego helu jest jego ogromna przewodność cieplna, która tyśiące razy przewyższa przewodność cieplną miedzi. W praktyce oznacza to, że w nadciekłym helu ciepło przenosi się momentalnie. Ma to bardzo ważne

konsekwencje dla najbardziej zaawansowanych technologii, o czym powiemy w kolejnej części artykułu.



Ryc. 2. **Górny obraz:** Informacje o ruchu makroskopowym (duże, jasne strzałki) jest przekazywana do dalszych obszarów przepływu na zasadzie tarcia wewnętrznego (lepkości) wywołanego chaotycznym ruchem molekuł (czarne strzałki). **Dolny obraz:** W stanie nadkrytycznym informacja o przepływie makroskopowym jest przekazywana na zasadzie zjawiska kondensacji kwantowej. Molekuły poruszają się kolektywnie (posiadają taki sam pęd).

Konsekwencje bycia idealnym

Jak było to wspomnianie wcześniej, płyn idealny nie posiada lepkości, czyli nie doświadcza tarcia wewnętrznego. Konsekwencje tego są spektakularne, mimo iż wygląda jak ciecz, zachowuje się w sposób przeczący naszej codziennej logice, niemal jak substancja magiczna.

Rycina 3. przedstawia kriostat, w którym przechowywany jest nadkrytyczny hel i wykonuje różnego rodzaju doświadczenia z jego udziałem. Kriostat jest supertermosem, który jest w stanie utrzymać w swoim środku bardzo niską temperaturę (poniżej 2K), mimo iż na zewnątrz temperatura otoczenia jest kilkaset stopni wyższa (zazwyczaj około 300K). Górny obraz z ryciny 3 przedstawia sam kriostat, który na co dzień używany jest w laboratorium kriogeniki TE

w CERN, natomiast dolny obraz przedstawia wnętrze kriostatu wraz z instrumentami służącymi do prezentacji właściwości nadkrytycznego helu.

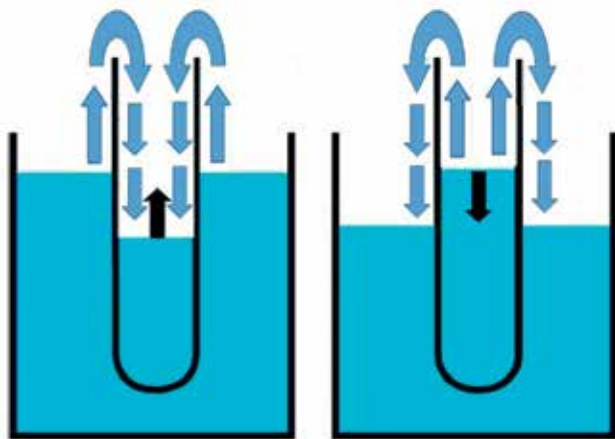


Ryc. 3. **Górny obraz:** kriostat, **dolny obraz:** wnętrze kriostatu wraz z instrumentami służącymi do demonstracji właściwości nadkrytycznego helu. Dzięki uprzejmości TE, CERN.

Kriostat ten jest szczególnie interesujący, gdyż część jego obudowy jest przezroczysta, dzięki czemu można obserwować nadkrytyczny hel bezpośrednio. Jest

to substancja przezroczysta, z wyglądu bardzo podobna do wody, ale bliższa analiza wzrokowa pozwala zauważyć znaczące różnice w sposobie jej płynięcia. Jej obserwacja może wzbudzać nawet pewien niepokój, gdyż porusza się niezwykle dynamicznie, trochę jak woda na przyspieszonym filmie, a przy tym zdaje się dużo bardziej przezroczysta.

Jednym z eksperymentów obrazujących nadciekłość jest prezentacja zasady naczyń połączonych, która w przypadku substancji nadciekłej ma bardzo zaskakujące konsekwencje. W przypadku cieczy rzeczywistej wiadome jest, że gdy naczynia wypełnione cieczą są połączone, w każdym z tych naczyń wysokość cieczy jest taka sama. W przypadku helu nadciekłego sytuacja jest podobna, z tym, że naczynia nie muszą być połączone... Schematycznie jest to pokazane na rycinie 4. Substancja w stanie nadciekłym znajduje się w naczyniu, które częściowo znajduje się w większym naczyniu, także wypełnionym substancją nadciekłą. Mimo iż naczynia te nie są połączone, znajdujący się w tym systemie hel nadciekły „wie”, że poziomy cieczy w poszczególnych naczyniach nie są równe i wspinając się po ściankach, dąży do wyrównania tych poziomów. To niecodzienne zachowanie związane jest z kwantową naturą nadciekłości, która przeczy naszej codziennej intuicji.



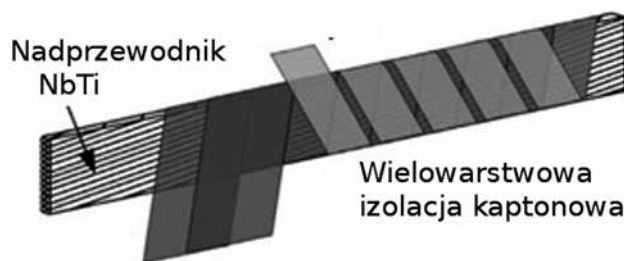
Ryc. 4. Schemat zjawiska wyrównywania poziomu helu nadciekłego, mimo iż naczynia nie są połączone. Hel wspina się po ściankach dążąc do wyrównania poziomów w obu naczyniach.

Spektakularne zastosowania helu nadciekłego

Olbrzymia przewodność cieplna nadciekłego helu została wykorzystana między innymi do otrzymywania ogromnych pól magnetycznych w supermagnesach. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu zjawiska nadprzewodności, które zazwyczaj jest osiągane w bardzo niskich temperaturach. Dla stabilnej i bezpiecznej pracy takich magnesów konieczne jest niezakłócone i bardzo efektywne odbieranie wytwarzanego

w nich ciepła. Idealnym kandydatem okazał się nadciekły hel, który będąc substancją nielepką, może z łatwością penetrować nawet mikroskopijne szczeliny oraz z niemal nieskończoną szybkością przekazywać ciepło od źródła jego powstawania do miejsca jego neutralizacji.

Spektakularnym osiągnięciem, które korzysta z tej technologii, jest największy na świecie akcelerator cząstek LHC (Wielki Zderzacz Hadronów), znajdujący się w CERN. Jest to największe urządzenie eksperymentalne na świecie, mierzące blisko 27 kilometrów. Rycina 5 przedstawia kabel nadprzewodzący, używany w zwojach cewek magnesów w CERN, wraz z nawiniętą izolacją elektryczną. Izolacja jest konieczna, aby zapobiec zwarcia, ale jej działanie jest niekorzystne ze względu na ograniczoną możliwość odbioru ciepła z kabli. Okazuje się jednak, mimo iż izolacja jest szczelnie nawinięta, nadciekły hel może bez większych przeszkód penetrować mikroszczeliny pomiędzy poszczególnymi warstwami izolacji i chłodzić kable. Rzecz zupełnie niemożliwa w przypadku cieczy rzeczywistych, posiadających nawet bardzo małą lepkość. Niemniej jednak pomysły wykorzystanie właściwości nadciekłego helu jest bardzo wyzywającym zadaniem i pewne sytuacje są wciąż trudne do przewidzenia, doprowadzając do niebezpiecznych sytuacji [2, 3, 4].

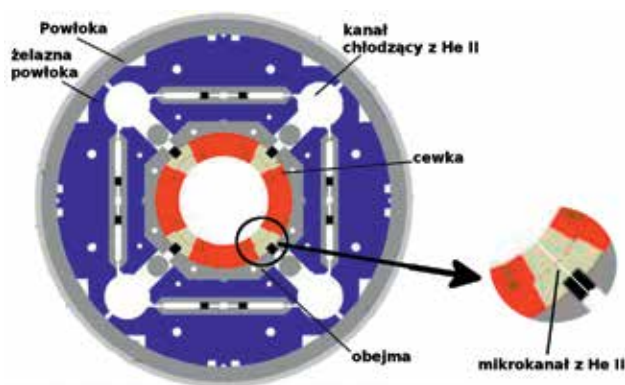


Ryc. 5. Schemat nawijania izolacji elektrycznej na kabel nadprzewodzący stosowany w magnesach w CERN. Nadciekły hel może penetrować mikroszczeliny znajdujące się między poszczególnymi warstwami izolacji [6].

Nadzwyczajne właściwości cieplno-przepływowe związane z nadciekłością będą także podstawą budowy magnesów nowej generacji, gdzie rozważa się rezygnację z bezpośredniej penetracji nadciekłego helu przez uzwojenia magnesu na rzecz systemu mikrokanalów znajdujących się w rdzeniu magnesu (Ryc. 6.)

Superprzewodność nadciekłego helu gwarantuje niezakłócony odbiór ciepła, przez co hel znajdujący się w mikrokanalach nie musi płynąć, ale może być nieruchomy i nie musi być bezpośrednio połączony z zewnętrznym źródłem nadciekłego helu.

W powyższym artykule zostały przedstawione tylko niektóre właściwości nadciekłości i wiążących się z tym konsekwencji. Autor zachęca do pogłębienia



Ryc. 6. Schemat magnesu nowej generacji. Ciepło jest odbierane przez nieruchomy hel nadciężki znajdujący się w mikrokanalach [1].

tego tematu we własnym zakresie, gdyż kryje się za nim cała gama niezwykłych cech naszego świata, które są niewidoczne „gołym” okiem. Często przeczą naszej codziennej logice, dając możliwość na znaczące poszerzenie swoich horyzontów myślowych.

Bibliografia

1. Bozza G, Malecha ZM, Van Weelderen R (2016), Development and application of a generic CFD toolkit covering the heat flows in combined solid–liquid systems with emphasis on the thermal design of HiLumi superconducting magnets, *Cryogenics* 80: 253–264.
2. Chorowski M, Fydrych J, Modlinski Z, Polinski J, Tavian L, Wach J (2011), Risk analysis update of the LHC cryogenic system following the 19th September 2008 incident, *Proceedings of the ICEC 23-ICMC 2010*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 879–884.
3. Malecha ZM, Chorowski M, Polinski J (2013), Numerical study of emergency cold helium relief into tunnel using a simplified 3D model, *Cryogenics* 57: 181–188.
4. Malecha ZM, Jedrusyna A, Grabowski M, Chorowski M, van Weelderen R (2016), Experimental and numerical investigation of the emergency helium release into the LHC tunnel, *Cryogenics* 80: 17–32.
5. Sciver SWV (2012), *Helium Cryogenics*, 2nd Edition, Springer Florida State University.
6. Strychalski M, Chorowski M, Polinski J (2014), Heat transfer through the at surface of rutherford superconducting cable samples with novel pattern of electrical insulation immersed in Hell, *Cryogenics* 61: 79–85.

Dr inż Ziemowit Miłosz Malecha. Katedra Inżynierii Kriogenicznej, Lotniczej i Procesowej, Politechnika Wrocławska. E-mail: ziemowit.malecha@pwr.edu.pl

POSTĘP W POMIARACH BIAŁEK NIEUSTRUKTURYZOWANYCH

Bartosz Różycki (Warszawa)

Streszczenie

Komórki biologiczne zbudowane są z rozmaitych makrocząsteczek – białek, lipidów, kwasów nukleinowych, polisacharydów, etc. Wyznaczenie struktury przestrzennej danej makrocząsteczki prowadzi zwykle do wyjaśnienia tego, w jaki sposób wykonuje ona swoje funkcje biologiczne. Zajmuje się tym biologia strukturalna. Wśród makrocząsteczek stanowiących obecnie największe wyzwania dla biologii strukturalnej są białka pozbawione struktury trzeciorzędowej, a w szczególności te z nich, które zbudowane są z kilku odrębnych domen połączonych długimi, nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego. Białka tego rodzaju są powszechne i pełnią ważne funkcje biologiczne. Okazują się one jednak wyjątkowo trudne do zbadania za pomocą standardowych metod współczesnej biologii strukturalnej – tzn. rentgenografii strukturalnej i spektroskopii NMR. Natomiast rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami uzupełnia te metody i daje możliwość charakterystyki strukturalnej tego rodzaju białek.

Słowa Kluczowe: biofizyka molekularna, biologia strukturalna, białka pozbawione struktury trzeciorzędowej, rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS)

Abstract

Biological cells are built of various macromolecules, including proteins, lipids, nucleic acids and polysaccharides. Determination of the atomic structure of a macromolecule can often lead to the understanding of how the given molecule performs its biological functions. It is the structural biology that takes such an approach. Among the macromolecules that pose the most difficult problems to contemporary structural biology are intrinsically disordered proteins, and in particular those of them which have several large domains connected by long, unstructured polypeptide segments. Such proteins are abundant and critically important in biological cells. However, they turn out to be very difficult to study using standard methods of structural biology, i.e., X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Importantly, small angle X-ray scattering supplements these high-resolution methods and enables structural characterization of such proteins.

Wstęp

Białka stanowią ogromną rodzinę związków organicznych. Występują we wszystkich organizmach żywych oraz wirusach. Zaangażowane są bezpośrednio w praktycznie wszystkie funkcje komórek biologicznych. Powszechnie znane przykłady to metabolizm, sygnalizacja, transport, nadawanie kształtu komórkom, a przede wszystkim replikacja, transkrypcja i translacja kodu genetycznego. Zdumiewający wydaje się fakt, że podstawą tej ogromnej różnorodności i złożoności funkcji pełnionych przez białka jest sekwencja aminokwasowa.

Niektóre białka pośredniczą w transdukcji sygnału, tzn. kontroli łańcuchów reakcji biochemicznych, które pozwalają komórce reagować na zmiany w swoim środowisku. Inne białka pełnią funkcje metaboliczne. Są nimi enzymy wykorzystujące substancje odżywcze do produkcji energii, która służy do podtrzymania procesów życiowych w komórkach. Komórki używają białek także jako materiału budulcowego. Cytoskielet – czyli molekularne „rusztowanie” nadające kształt komórkom eukariotycznym – zbudowany jest całkowicie z białek. Białka służą również jako pompy i kanały w błonach komórkowych. Można stwierdzić, iż cząsteczki białek odpowiadają za zdecydowaną większość działań każdej żywej komórki. Dlatego zrozumienie podstaw życia wymaga dogłębnego poznania fizycznych i chemicznych własności cząsteczek białek.

Pionierskie prace Johna Kendrew i Maxa Perutza (Nagroda Nobla w dziedzinie chemii przyznana w roku 1962 za określenie pierwszej atomowej struktury białek za pomocą rentgenografii strukturalnej) doprowadziły do przełomowego odkrycia – dane białko wykonuje swoje funkcje dzięki temu, iż posiada ściśle określoną strukturę przestrzenną, która zwana jest strukturą natywną. Wyznaczenie struktury natywnej danej makrocząsteczki prowadzi zwykle do

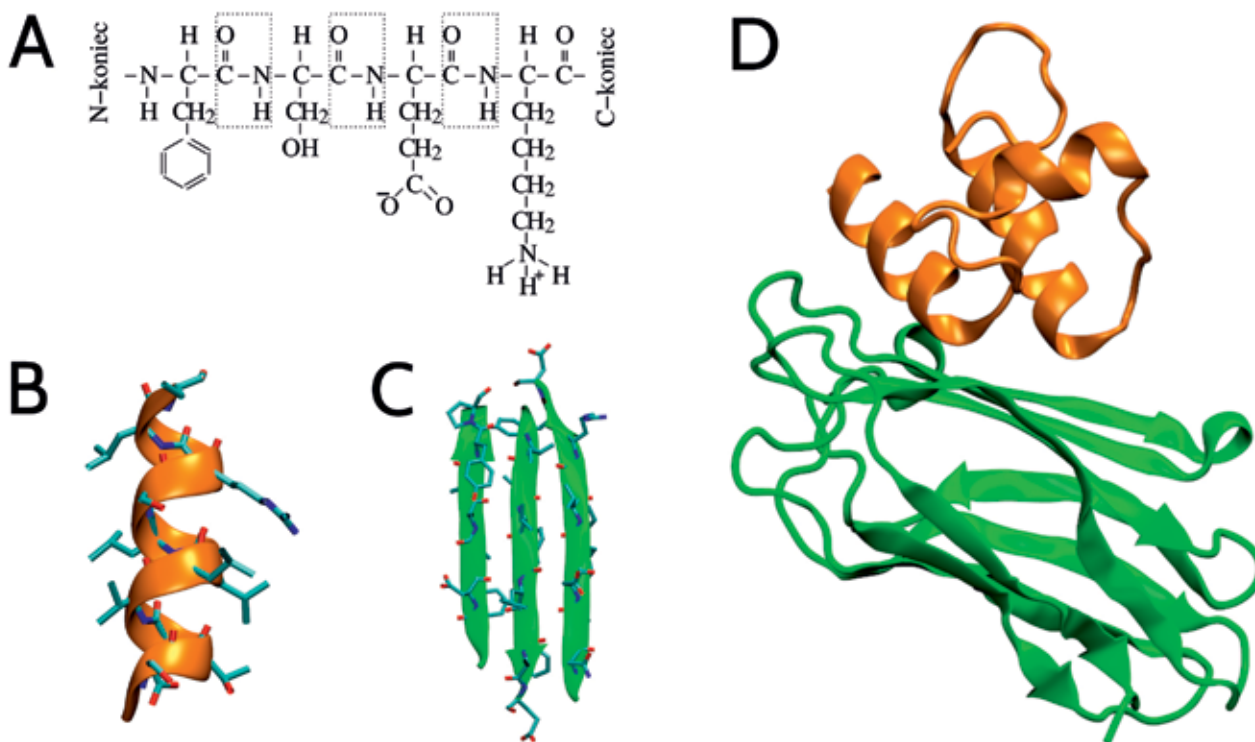
wyjaśnienia tego, w jaki sposób wykonuje ona swoje funkcje biologiczne. Znany przykładem jest struktura podwójnej helisy DNA, której odkrycie natychmiast wyjaśniło mechanizm replikacji DNA.

Rosnąca chęć poznania podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym doprowadziła w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku do wyodrębnienia nowej dziedziny biologii – tzw. biologii strukturalnej – która zajmuje się badaniem struktur makrocząsteczek, a w szczególności białek i ich kompleksów, w celu szczegółowego zrozumienia zasad ich działania. Do największych (dosłownie) sukcesów biologii strukturalnej ostatnich lat można zaliczyć wyznaczenie struktur wirusów, takich jak enterowirus 71, które pomogły wyjaśnić mechanizmy infekcji komórki i dały podstawę do racjonalnego tworzenia leków [11]. Znakomitym przykładem racjonalnego projektowania leków są niedawne prace Balbasa [1]. Wykorzystano w nich zarówno metody współczesnej biologii strukturalnej, jak i techniki bioinformatyczne, dzięki czemu zidentyfikowano związki chemiczne hamujące wzrost odpornych na leki komórek raka prostaty. Wydaje się, że wykorzystanie metod biologii strukturalnej do racjonalnego projektowania leków będzie odgrywało coraz ważniejszą rolę w medycynie.

Cząsteczka nawet małego białka zbudowana jest z tysięcy atomów połączonych wzajemnie przez różnorodne wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne. Dlatego w opisie struktury przestrzennej białka pomocne jest wyróżnienie kilku poziomów organizacji (Ryc. 1). Sekwencja (kolejność) aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym to tzw. struktura pierwszorzędowa (Ryc. 1A). Określenie odcinków łańcucha polipeptydowego tworzących helisy α (Ryc. 1B) i harmonijki β (Ryc. 1C) stanowi tzw. strukturę drugorzędową. Natomiast pełną strukturę przestrzenną, którą przyjmuje połałdowany łańcuch polipeptydowy, nazywa się strukturą trzeciorzędową (Ryc. 1D).

W opisie struktury i funkcji białka pomocne może być także wyróżnienie jego domen. Domenę tworzy część łańcucha polipeptydowego (zwykle od 50 do 350 aminokwasów) zwinięta w upakowaną, stabilną i funkcjonalną strukturę przestrzenną. Domeny zawierają zwykle kilka helis α i/lub harmonijek β i stanowią element składowy wielu dużych białek. Zazwyczaj różne domeny danego białka wykonują różne funkcje.

trzeciorzędowa jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania białka w organizmie. Przekonanie to zostało zakwestionowane w pierwszych latach XIX wieku przez odkrycie białek natywne pozbawionych struktury trzeciorzędowej, które pomimo braku stabilnej struktury w warunkach fizjologicznych, pozostają w pełni funkcjonalne. Stanem natywnym białka tego rodzaju jest zespół różnorodnych konformacji (konformacja to układ przestrzenny atomów w danej



Ryc. 1. Poziomy organizacji cząsteczki białka. (A) Budowa chemiczna przykładowego fragmentu peptydu. Wiązania peptydowe między polarnymi grupami N-H oraz C=O (obramowane na rysunku linią przerywaną) łączą sąsiadujące w łańcuchu aminokwasy. Aminokwasy tworzące przedstawiony fragment peptydu to – od lewej – fenyloalanina (Phe), seryna (Ser), kwas glutaminowy (Glu) oraz lizyna (Lys). Sekwencja aminokwasów tworzących cząsteczkę białka, tzn. ich kolejność podawana od końca N do końca C, to struktura pierwszorzędowa. (B) Struktura przykładowej helisy α . Łańcuchy boczne aminokwasów tworzących tę helisę przedstawione są jako „patyczki”. Kolor czerwony, niebieski i cyjan reprezentuje odpowiednio atomy tlenu, azotu i węgla. (C) Struktura przykładowej harmonijki β . Helisy α i harmonijki β to struktury drugorzędowe. Są one stabilizowane przez wiązania niekowalencyjne – głównie wiązania wodorowe. (D) Ilustracja struktury trzeciorzędowej i czwartorzędowej przykładowego kompleksu białkowego (na podstawie wpisu nr 1OHZ do bazy danych PDB). Podjednostka oznaczona na pomarańczowo ma strukturę helikalną. Podjednostka oznaczona na zielono zbudowana jest z harmonijek β .

Wiązania niekowalencyjne, które powodują fałdowanie białka do określonej struktury przestrzennej, pozwalają również białkom wiązać się ze sobą, co prowadzi do powstania większych struktur białkowych, czyli tzw. kompleksów białkowych. Każdy łańcuch polipeptydowy w kompleksie białkowym zwany jest podjednostką. Jeśli cząsteczka białka jest kompleksem składającym się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego, to wyróżnia się jeszcze jeden poziom organizacji – tzw. strukturę czwartorzędową, czyli wzajemnie położenie przestrzenne jego podjednostek (Ryc. 1D).

Początkowo wśród biologów strukturalnych panowało przekonanie, że ściśle określona, stabilna struktura

cząsteczki chemicznej). Białka natywne pozbawione struktury trzeciorzędowej zwane są także inherentnie nieuporządkowanymi (IDP od ang. *Intrinsically Disordered Protein*).

Ważną klasą białek typu IDP są białka wielodomenowe, w których odrębne, ustrukturyzowane domeny połączone są nieustrukturyzowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego. Chociaż są one powszechne i pełnią wiele istotnych funkcji w komórkach biologicznych, białka takie okazują się często bardzo trudne do zbadania za pomocą konwencjonalnych metod biologii strukturalnej. Otóż nie mogą być one zbadane całościowo metodami rentgenografii strukturalnej ze względu na obecność nieustrukturyzowanych

łączników międzydomenowych (mogą być wyznaczone tylko struktury poszczególnych, ustrukturyzowanych domen). Nie mogą być także zbadane metodami magnetycznego rezonansu jądrowego ze względu na duże rozmiary (zwykle rzędu kilkuset kDa). Dlatego do badań tego typu białek używa się coraz częściej metod komplementarnych, a w szczególności rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS od ang. *Small Angle X-ray Scattering*). Głównym celem niniejszej pracy jest przedstawienie metody SAXS i opisanie jej przydatności w badaniach strukturalnych białek wielodomenowych, białek typu IDP oraz ich kompleksów.

Klasyczne metody biologii strukturalnej

Rentgenografia strukturalna i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR od ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) uważane są obecnie za główną siłę napędową biologii strukturalnej. Metody te umożliwiają tworzenie modeli opisujących przestrzenne rozmieszczenie poszczególnych atomów w badanych makrocząsteczkach. Takie trójwymiarowe modele są zwykle bardzo złożone, gdyż cząsteczki typowych białek zbudowane są z setek aminokwasów. Zarówno rentgenografia strukturalna, jak i NMR są uważane za metody o wysokiej rozdzielczości, ponieważ zwykle pozwalają one wyznaczyć położenia atomów w badanych makrocząsteczkach z dokładnością do paru Angströmów, a czasem nawet większą.

Od niedawna także kriogeniczna mikroskopia elektronowa (cryoEM od ang. *Cryo-Electron Microscopy*) jest używana do tworzenia atomowych modeli makrocząsteczek. Jednakże makrocząsteczki badane metodą mikroskopii cryoEM muszą zazwyczaj posiadać pewne szczególne właściwości, takie jak wysoka symetria, aby możliwe było osiągnięcie rozdzielczości atomowej. Dlatego np. ikosaedralne otoczki wirusów są idealnymi układami do badań metodami cryoEM [6]. Dopiero niedawno – dzięki osiągnięciom technicznym, takim jak wprowadzenie kamer termowizyjnych bezpośredniego wykrywania – w eksperymentach wykorzystujących mikroskopię cryoEM udało się wyznaczyć struktury niesymetrycznych makrocząsteczek z rozdzielczością atomową. Bardzo dobry zwięzły przegląd postępów w dziedzinie kriogenicznej mikroskopii elektronowej można znaleźć w artykule Smitha i Rubinsteina [14].

Wyżej wymienione metody biologii strukturalnej (rentgenografia, NMR, cryoEM) zostaną omówione w kolejnych akapitach bardzo fragmentarycznie – głównie w kontekście ich mocnych i słabych stron – gdyż

istnieje wiele doskonałych podręczników na ich temat. Nie zostaną w szczególności przedstawione ich podstawy fizyczne, lecz jedynie ich główne zastosowania we współczesnej biologii strukturalnej. Takie ogólne przedstawienie podstawowych metod biologii strukturalnej posłuży jako wstęp do omówienia metody SAXS, która coraz częściej wykorzystywana jest do strukturalnej charakterystyki białek wielodomenowych, białek typu IDP oraz kompleksów białkowych.

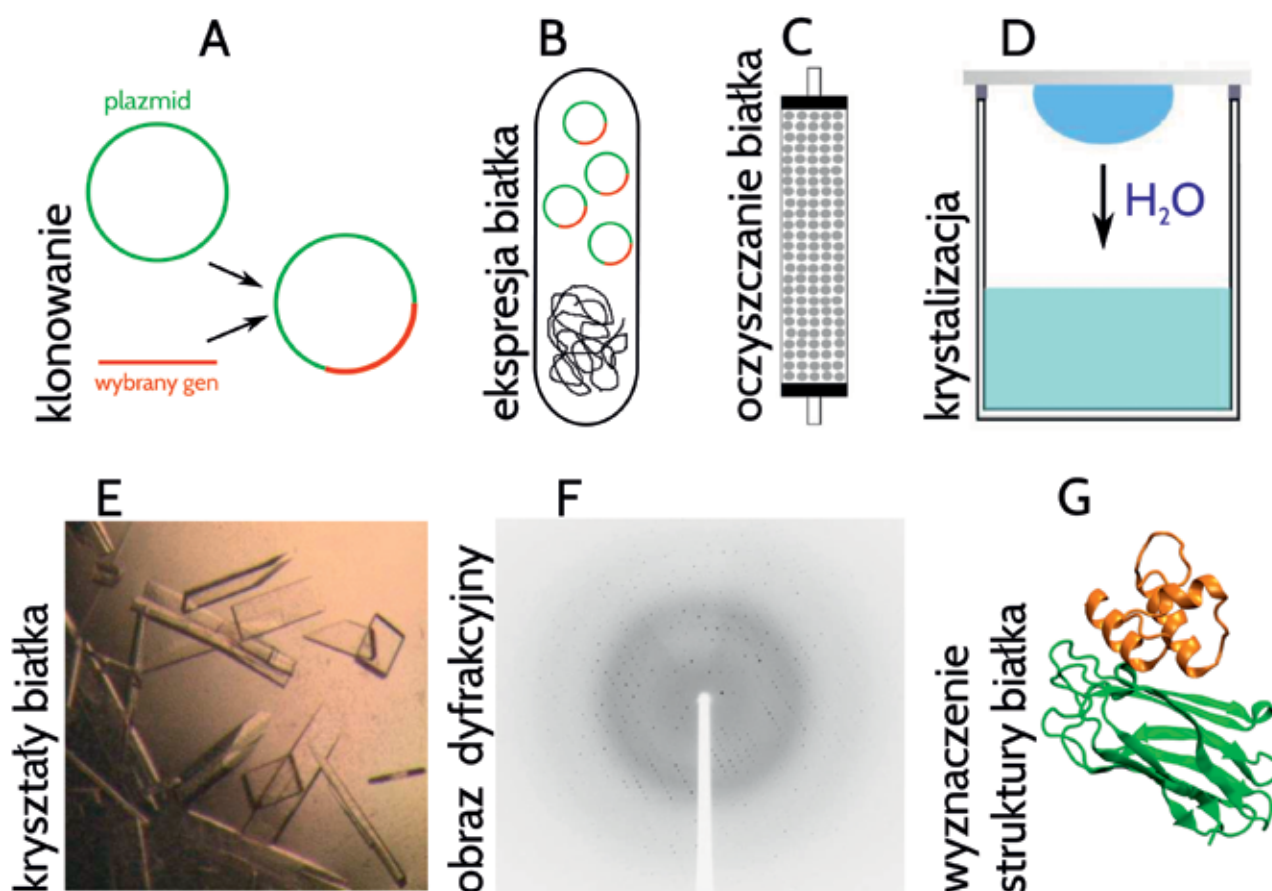
Do przeprowadzenia doświadczeń metodami biologii strukturalnej konieczne są czyste i jednorodne próbki białka w odpowiedniej ilości (Ryc. 2). Ponieważ zawartość badanych białek w komórkach biologicznych bywa często bardzo niewielka, obecnie używa się niemal wyłącznie białek produkowanych metodami inżynierii genetycznej – wybrane geny klonowane są do odpowiednich plazmidów (Ryc. 2A), a białka są zwykle uzyskiwane poprzez nadekspresję w pałeczkach okrężnicy (*Escherichia Coli*), drożdżach lub w komórkach owadów lub ssaków (Ryc. 2B). Mimo tego, że w niektórych przypadkach oczyszczanie białka może być trudne i żmudne, zazwyczaj rutynowe metody biochemiczne są do tego celu wystarczające (Ryc. 2C).

Jedną z zasadniczych różnic między rentgenografią strukturalną a metodami NMR jest to, że rentgenografia umożliwia wyznaczenie struktury białka jedynie w kryształach, a więc w układzie nie występującym zwykle w organizmach żywych, natomiast NMR pozwala uzyskiwać struktury białek w roztworach wodnych, a więc w środowisku zbliżonym do naturalnego. Dlatego struktury danego białka uzyskane tymi dwiema metodami różnią się zwykle do pewnego stopnia.

Główną trudnością współczesnej rentgenografii strukturalnej jest uzyskiwanie monokryształów białka (Ryc. 2D). Problem sprowadza się do znalezienia odpowiednich warunków, w których cząsteczki badanego białka będą samoorganizować się w idealne kryształy (Ryc. 2E). Na proces krystalizacji mają wpływ czynniki fizyczne (np. temperatura, ciśnienie, lepkość roztworu białka, a nawet zanieczyszczenia próbki, które mogą się stać jądrami krystalizacji), chemiczne (np. pH, siła jonowa i skład chemiczny buforu, w którym rozpuszczone jest białko) i biochemiczne (np. czystość i jednorodność próbki, modyfikacje potranslacyjne białka, obecność ligandów i wiele innych). Niemożliwe jest przewidzenie, jakie czynniki mogą doprowadzić do utworzenia kryształów konkretnego białka. Dlatego najbardziej efektywne wydają się obecnie testy przesiewowe – wraz z wprowadzeniem robotów do krystalizacji białek, możliwe stało się testowanie tysięcy warunków krystalizacji badanego białka.

Po wyhodowaniu odpowiedniego kryształu białka (Ryc. 2E) przeprowadza się na nim doświadczenie dyfrakcyjne. Kryształ naświetla się silną, monochromatyczną wiązką promieniowania rentgenowskiego, zmieniając stopniowo kąt jej padania na kryształ (poprzez jego obrót) i rejestrując zmiany obrazu dyfrakcyjnego po przejściu promieni przez kryształ (Ryc. 2F). W dzisiejszych czasach doświadczenia dyfrakcyjne na kryształach białka wykonuje się zwykle w synchrotronach. Na podstawie danych dyfrakcyjnych wyznacza się trójwymiarową mapę gęstości elektronowej w komórce elementarnej kryształu. Numeryczna analiza tej mapy umożliwia wyznaczenie współrzędnych poszczególnych atomów badanej ma-

samoorganizacja makrocząsteczek w identyczne, powtarzające się „bloki”, czyli tzw. komórki elementarne kryształu. W konsekwencji praktycznie wszystkie makrocząsteczki w kryształach – lub zestawy makrocząsteczek, jeżeli jest ich więcej niż jedna w komórce elementarnej – muszą przyjmować identyczną konformację. Stanowi to pewien problem, ponieważ białko w warunkach fizjologicznych nie musi przybierać tylko jednej, niezmiennej struktury, a działanie wielu białek (np. kataliza enzymatyczna) jest skutkiem ich zmian strukturalnych. Co więcej, białka pozbawione struktury trzeciorzędowej przypominają raczej łańcuch elastycznego polimeru i mogą przyjmować określoną strukturę przestrzenną tylko w szczegól-



Ryc. 2. Schemat kolejnych czynności i doświadczeń prowadzących do wyznaczenia struktury białka metodami rentgenografii strukturalnej. (A) Geny kodujące badane białka klonowane są do odpowiednich plazmidów. (B) Białka uzyskiwane są poprzez nadekspresję w *E. coli*. (C) Po lizie komórek *E. Coli* białka oczyszczane są metodami chromatografii. (D) Monokryształy białka uzyskiwane są np. metodą wiszącej kropli. (E) Wyhodowane kryształy wybiera się na podstawie ich rozmiarów i kształtów. (F) Na wybranych kryształach przeprowadza się doświadczenie dyfrakcyjne. Obraz dyfrakcyjny składa się z wielu plamek, których rozmieszczenie zmienia się, gdy kryształ jest obracany względem padającej wiązki promieniowania rentgenowskiego. (G) Na podstawie obrazów dyfrakcyjnych wyznacza się trójwymiarową mapę gęstości elektronowej w komórce elementarnej kryształu. Numeryczna analiza tej mapy umożliwia wyznaczenie struktury atomowej badanego białka.

krocząsteczki (Ryc. 2G). Dzięki rozwojowi specjalistycznego oprogramowania do analizy danych dyfrakcyjnych wyznaczenie struktury białka sprowadza się często do zaledwie kilku kliknięć [7].

Warunkiem koniecznym utworzenia monokryształów, które dają dobrej jakości obraz dyfrakcyjny, jest

nych warunkach, gdy na przykład zwiążą się z innymi, ściśle określonymi cząsteczkami biologicznymi.

Metoda jądrowego rezonansu magnetycznego opiera się na całkowicie odmiennych zasadach fizycznych niż rentgenografia strukturalna. Ma ona jednak analogicznie zastosowanie w biologii strukturalnej – jest

powszechnie używana do badania struktur makromolekuł z rozdzielczością atomową. Zasadniczą różnicą jest to, że wykorzystanie rentgenografii strukturalnej wymaga uprzedniego wyhodowania kryształów białka, natomiast doświadczenia NMR są przeprowadzane na ciekłym roztworze badanego białka. Ponadto, na potrzeby pomiarów techniką NMR, białka muszą być znakowane stabilnymi izotopami (zwykle ^{13}C i ^{15}N), co może być trudne w przypadku ekspresji białek w komórkach owadów lub ssaków. Znakowane białko musi być stabilne w czasie pomiarów NMR, które trwać mogą nawet do dwóch tygodni. Musi być także stosunkowo niewielkie, gdyż rozdzielczość metody NMR znacznie się pogarsza dla białek o masie przekraczającej około 50 kDa. Główną przyczyną tego ograniczenia jest fakt, iż duże białka w środowisku wodnym – na skutek bezustannych zderzeń termicznych z innymi cząsteczkami – wykonują stosunkowo powolne ruchy obrotowe, co prowadzi do szybkiego zaniku sygnału NMR. Należy jednak zaznaczyć, że w dziedzinie NMR następuje ciągły postęp, przez co możliwe stają się badania strukturalne coraz większych białek [5].

Należy zwrócić uwagę na jeszcze jedną ważną różnicę między rentgenografią a metodami NMR. Za pomocą metod rentgenografii strukturalnej wyznacza się statyczny model opisujący położenia poszczególnych atomów białka w kryształach. Małe drgania pojedynczych atomów wokół położenia równowagi opisywane są przez tzw. czynniki temperaturowe. Natomiast NMR umożliwia badanie dynamiki białek w roztworach ciekłych. Otóż, na skutek zderzeń z innymi cząsteczkami, białka w środowisku wodnym pozostają w bezustannym ruchu. Są to między innymi ruchy obrotowe i postępowe całych cząsteczek białka. Mogą też występować ruchy polegające na znacznych zmianach względnych położenia atomów w cząsteczce białka. Ruchy tego rodzaju nazwane są zmianami konformacyjnymi. Na podstawie widm NMR wyznacza się zwykle grupę około 20 modeli przestrzennych, która reprezentuje typowe konformacje badanego białka w środowisku wodnym. Dlatego metody NMR doskonale nadają się do badania małych białek typu IDP.

Metoda rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami

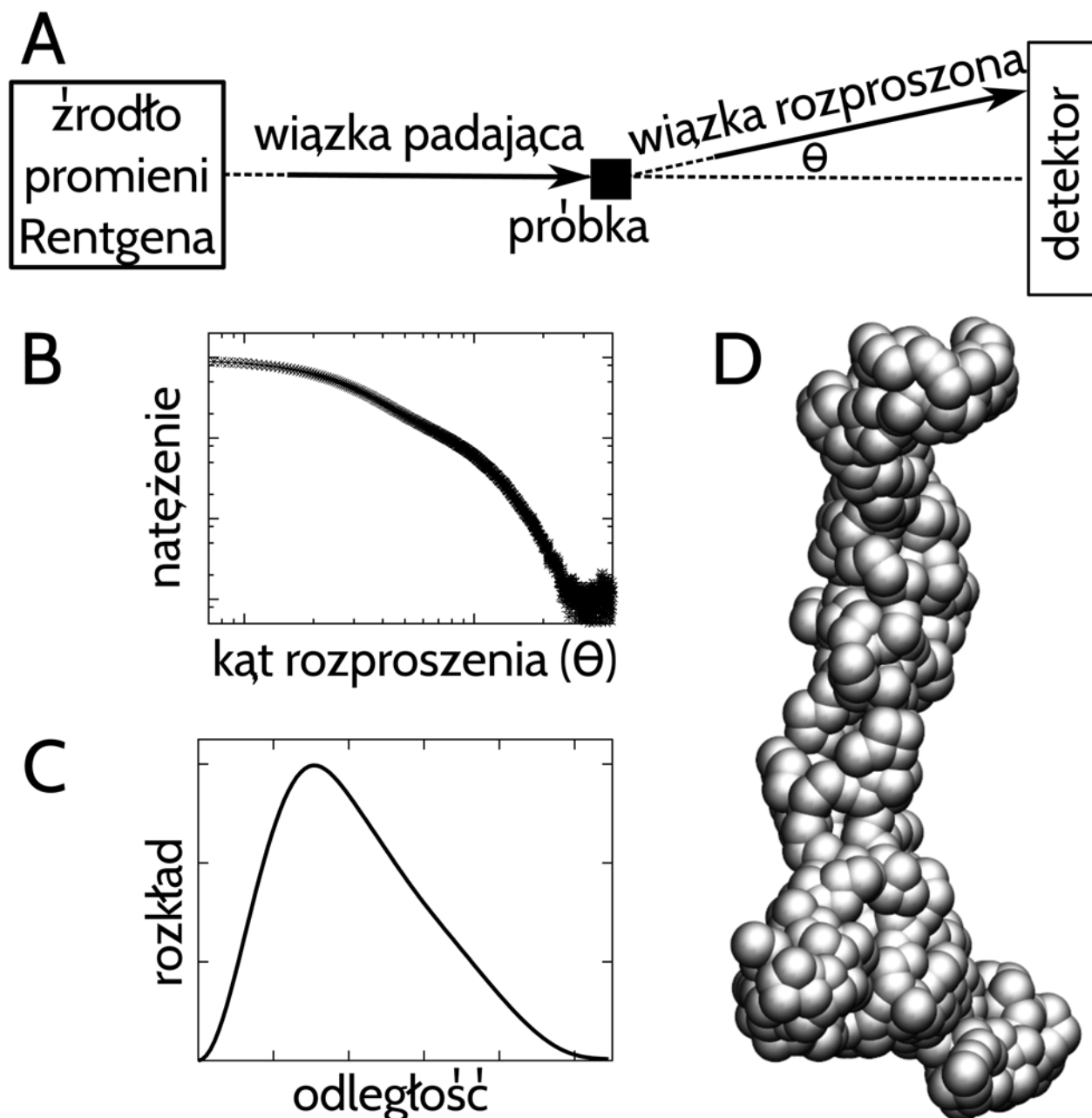
Jak już wspomniano, metody biologii strukturalnej wysokiej rozdzielczości mają swoje ograniczenia. Rentgenografia strukturalna optymalnie nadaje się do badania makrocząsteczek „nieelastycznych”, tzn. takich, które w warunkach zbliżonych do fizjologicznych

przyjmują jedną, stabilną, dobrze określoną strukturę przestrzenną. Natomiast obecne metody NMR stosowalne są do badań strukturalnych makrocząsteczek o masach nie przekraczających około 50 kDa. Metoda SAXS nie podlega tym ograniczeniom i daje dodatkową możliwość charakterystyki strukturalnej białek i innych makrocząsteczek w środowisku wodnym [3]. Po pierwsze, w przeciwieństwie do rentgenografii strukturalnej, metoda SAXS nie wymaga hodowli kryształów. Doświadczenia SAXS zawsze dostarczają danych rozproszeniowych, gdyż makrocząsteczki w ciekłym roztworze zawsze rozpraszają promieniowanie rentgenowskie – niezależnie od stopnia ich ustrukturyzowania lub elastyczności. Dlatego może być ona stosowana np. do badania białek pozbawionych struktury trzeciorzędowej. Po drugie, w przeciwieństwie do NMR, metoda SAXS nie jest ograniczona przez rozmiar badanych makromolekuł. Może być ona stosowana zarówno do badania dużych kompleksów białkowych, jak i małych białek lub peptydów (uzupełniając np. informacje z pomiarów NMR). Jakość krzywych rozproszeniowych otrzymywanych z doświadczeń SAXS nie zależy bezpośrednio ani od rozmiaru ani od „miękości” badanych makromolekuł w środowisku wodnym. Co więcej, metoda SAXS może być stosowana do badania ciekłych roztworów makrocząsteczek w szerokim zakresie stężeń, temperatur, pH, sił jonowych, itd.

SAXS powszechnie uważana jest za metodę o niskiej rozdzielczości, ponieważ w doświadczeniach SAXS rejestrowane jest promieniowanie rentgenowskie rozproszone jedynie pod małymi kątami względem kierunku wiązki padającej (Ryc. 3A). Co więcej, w przeciwieństwie do krystalografii rentgenowskiej, doświadczenia SAXS dostarczają „sferycznie uśrednionych” informacji o strukturach badanych makromolekuł, co dodatkowo obniża dokładność tej metody. Otóż gdy promieniowanie rentgenowskie rozpraszane jest na kryształach, to obraz dyfrakcyjny składa się z wielu rozmieszczonych symetrycznie plamek, które zmieniają się, gdy kryształ jest obracany względem wiązki padającej (Ryc. 2F). Natomiast gdy promieniowanie rentgenowskie pada na roztwór ciekły, to jest ono rozpraszane na cząsteczkach mających różnorakie orientacje przestrzenne względem wiązki padającej, wskutek czego obraz dyfrakcyjny składa się ze współśrodkowych pierścieni. W tym przypadku obracanie próbki względem wiązki padającej nie zmienia obrazu dyfrakcyjnego. Wynikiem takiego doświadczenia jest więc jedynie jednowymiarowa krzywa, tzn. natężenie promieniowania rentgenowskiego w funkcji kąta rozproszenia (Ryc. 3B). Część informacji o strukturze badanych makrocząsteczek zostaje

zatem utracona, gdy doświadczenie rozproszeniowe przeprowadza się na roztworze ciekłym, a nie na monokryształach. Można powiedzieć, że skomplikowana, trójwymiarowa struktura makrocząsteczki zostaje w doświadczeniach SAXS zredukowana do jednowymiarowej krzywej rozproszeniowej. Jednak pomimo utraty informacji, analiza i interpretacja krzywych rozproszeniowych z doświadczeń SAXS może prowadzić do ważnych obserwacji na temat relacji strukturalno-funkcjonalnych badanych makrocząsteczek.

Niewątpliwą zaletą wykorzystania krzywych rozproszeniowych do modelowania białek jest to, że doświadczenia SAXS są przeprowadzane na roztworach ciekłych i w związku z tym dostarczają informacji o stanie termodynamicznym białek w naturalnym środowisku wodnym. Jednak aby z pomiarów SAXS uzyskać rzetelne informacje o strukturze białek, należy zadbać o wiele niuansów, wśród których dwa opisane poniżej wydają się najistotniejsze. Po pierwsze, krzywa rozproszeniowa jest wyznaczana jako różnica



Ryc. 3. Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami na cząsteczkach białka w środowisku wodnym. (A) Schemat układu doświadczenia. Kąt rozproszenia oznaczony jest przez θ . Doświadczenia przeprowadza się zwykle w synchrotronach. (B) Przykład krzywej rozproszeniowej, tzn. zależności zarejestrowanego natężenia promieniowania rentgenowskiego w funkcji kąta rozproszenia θ . (C) Rozkład odległości pomiędzy wszystkimi parami atomów w badanym białku. Rozkład ten otrzymuje się z transformaty Fouriera krzywej rozproszeniowej z Ryc. 3B. (D) Obwiednia molekularna reprezentująca przestrzeń zajmowaną przez cząsteczkę badanego białka. Obwiednie molekularne dostarczają informacji o kształtach i rozmiarach badanego białka. Otrzymuje się je na podstawie rozkładu odległości par atomów z Ryc. 3C oraz sekwencji aminokwasowej badanego białka.

natężeń promieniowania rozproszonego na próbce białka w buforze a próbce samego buforu. Jeśli odjęcie tych dwóch sygnałów zostanie wykonane niewłaściwie lub niedokładnie, to wyznaczona krzywa rozproszeniowa może być obciążona dużym błędem pomiarowym, a wyznaczone na jej podstawie modele strukturalne będą mylne. Po drugie, przy modelowaniu białek na podstawie danych z doświadczeń SAXS należy wziąć pod uwagę tzw. powłokę hydratacyjną na powierzchni białka. Jest to zadanie obliczeniowo złożone i niejednoznaczne. Różne programy do obliczeń krzywych rozproszeniowych na podstawie modeli strukturalnych (np. CRY SOL [15] lub AquaSAXS [12]) różnią się sposobem modelowania powłok hydratacyjnych, co może nakładać dodatkową niepewność na struktury białek wyznaczone metodą SAXS.

Metoda SAXS jest standardowo używana do wyznaczania charakterystycznych rozmiarów i kształtów białek [3]. Pomijając pewne aspekty techniczne, procedura jest następująca. Z doświadczeń SAXS (Ryc. 3A) otrzymuje się krzywe rozproszeniowe (Ryc. 3B). Odwrotna transformata Fouriera krzywej rozproszeniowej daje rozkład odległości pomiędzy wszystkimi możliwymi parami atomów w badanym białku (Ryc. 3C). Na podstawie tego rozkładu i sekwencji aminokwasowej białka (oraz przy upraszczającym założeniu równomiernego rozłożenia masy w cząsteczce białka) wyznacza się tzw. obwiednię molekularną, która reprezentuje przestrzeń zajmowaną przez cząsteczkę białka (Ryc. 3D). Do obliczeń tych używa się specjalistycznego oprogramowania komputerowego [9]. Obwiednie molekularne dostarczają informacji o charakterystycznych rozmiarach badanego białka i pozwalają zwizualizować jego kształt. Jednak nie pozwalają one określić atomowej struktury białka i dlatego SAXS jest powszechnie uznawana za metodę biologii strukturalnej niskiej rozdzielczości. Jednak jeśli dane z doświadczeń SAXS zostaną uzupełnione o pewne dodatkowe informacje strukturalne o badanym białku, to mogą być one wykorzystane w dużo bardziej wydajny sposób. Przykładowo SAXS może służyć do określenia struktury kompleksu białkowego, jeśli znane są struktury atomowe poszczególnych białek lub domen białkowych tworzących dany kompleks. Używane jest do tego celu specjalistyczne oprogramowanie [9,10]. Modelowanie tego typu przebiega zwykle następująco. Generowana jest najpierw duży zbiór zróżnicowanych modeli strukturalnych badanego kompleksu białkowego (zwykle dziesiątki tysięcy rozmaitych modeli przestrzennych). Aby proces ten był efektywny i niezbyt czasochłonny, struktury poszczególnych białek lub domen białkowych wchodzących w skład

badanego kompleksu reprezentowane są przez bryły sztywne. Można to porównać do łączenia kilku klocków Lego na wiele różnych sposobów. Następnie dla każdego z wygenerowanych modeli strukturalnych obliczana jest teoretyczna krzywa rozproszeniowa, która jest porównywana z krzywą rozproszeniową otrzymaną z doświadczenia SAXS na badanym kompleksie białkowym. Zgodność krzywej teoretycznej z doświadczalną oznacza, że dany model strukturalny może reprezentować rzeczywistą strukturę kompleksu białkowego w środowisku wodnym. Tak więc z wygenerowanej puli modeli wybierane są te, które najlepiej zgadzają się z krzywą rozproszeniową z doświadczenia SAXS. Dzięki tego typu modelowaniu można określić, w jaki sposób grupa danych białek jest wzajemnie połączona w kompleks. Możliwe jest więc wskazanie powierzchni, którymi te białka oddziałują ze sobą.

Rentgenografia strukturalna jest coraz częściej uzupełniana przez SAXS w celu określenia struktur białek wielodomenowych oraz kompleksów białkowych. Natomiast metody łączące NMR i SAXS pozwalają wyznaczać atomowe struktury białek w środowisku wodnym. Takie połączenie wydaje się szczególnie skuteczne, ponieważ NMR i SAXS dostarczają komplementarnych informacji strukturalnych. Mianowicie pomiary NMR nakładają „lokalne” ograniczenia na odległości między atomami lub na kąty dwuścienne między płaszczyznami wiązań chemicznych w badanym białku, natomiast dane z doświadczeń SAXS dostarczają „globalnych” informacji o rozmiarze i kształcie tego białka.

Jak zostało to opisane wcześniej, dane z doświadczeń SAXS wykorzystywane są często do wyznaczania tzw. obwiedni molekularnych, które reprezentują kształty białek (Ryc. 3D). Jednak jeśli białko w warunkach fizjologicznych jest elastyczne, tzn. nie posiada stabilnej struktury trzeciorzędowej, to pojedyncza obwiednia molekularna nie może oczywiście przedstawić jego kształtu. Dlatego modelowanie tego typu białek wymaga innej strategii, która daje możliwość opisu zespołu konformacyjnego, a nie pojedynczej struktury. W podejściu tym stan natywny białka reprezentowany jest przez grupę modeli strukturalnych, która jako całość musi być zgodna z wynikami doświadczeń. Powstało wiele sposobów modelowania zespołów konformacyjnych białek w oparciu o dane SAXS [2,8,13]. Wszystkie te podejścia wymagają na początek wygenerowania dużej puli modeli przestrzennych badanego białka. Może być ona otrzymana przy użyciu, na przykład, algorytmów uwzględniających jedynie efekty wykluczonej objętości [2] lub symulacji typu Monte Carlo [13]

lub symulacji dynamiki molekularnej [8]. Po wygenerowaniu dostatecznie dużej i zróżnicowanej puli modeli strukturalnych, zwykle wykorzystywane są pewne algorytmy heurystyczne do określenia, która kombinacja struktur jest najbardziej zgodna z wynikami doświadczeń SAXS. Z puli wybierana jest w ten sposób wąska grupa modeli, która reprezentuje zespół konformacyjny badanego białka. Natomiast metoda o nazwie EROS (od ang. *Ensemble Refinement of SAXS*) wykorzystuje inną strategię, która polega na tym, że pula struktur otrzymanych z symulacji jest zmieniana możliwie łagodnie, a jednocześnie w taki sposób, aby uzyskać jej zgodności z krzywą rozproszeniową SAXS [13]. Do osiągnięcia tego celu wykorzystywana jest zasada maksymalnej entropii. Metoda EROS została poszerzona i udoskonalona – obecnie umożliwia modelowanie zespołów konformacyjnych białek na podstawie wyników doświadczeń SAXS, elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR od ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) i Förstrowskiego rezonansowego przekazu energii (FRET od ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) [4].

są z wielu domen połączonych długimi, elastycznymi łącznikami. Mimo tego, że białka tego rodzaju często występują w komórkach biologicznych i pełnią w nich wiele ważnych funkcji, to stanowią one białą plamę w dziedzinie biologii strukturalnej. Ich znaczny rozmiar oraz elastyczność strukturalna są powodem tego, że nie ma obecnie jednej, uniwersalnej metody badawczej, która mogłaby dostarczyć informacji o strukturach tego rodzaju białek. Jednak jeśli wyniki pomiarów przeprowadzonych kilkoma różnymi, uzupełniającymi się metodami – tj. krystalografia, NMR, cryoEM, SAXS, EPR, FRET – zostaną połączone przy pomocy zaawansowanych narzędzi obliczeniowych, to wyznaczenie reprezentatywnych konformacji tego typu białek staje się możliwe. Podejście takie zostało zastosowane np. do wyznaczenia zespołów konformacyjnych kompleksów białkowych ESCRT [4] (od ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). W przyszłości analogiczne metody mogą być zastosowane do innych kompleksów białkowych zaangażowanych w transport wewnątrzkomórkowy.

Podsumowanie

Wśród białek najtrudniejszych do scharakteryzowania strukturalnego są obecnie te, które zbudowane

Bibliografia

1. BALBAS M.D., EVANS M.J., HOSFIELD D.J., et al. 2013. Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *eLife* 2, e00499.
 2. BERNADO P., MYLONAS E., PETOUKHOV M.V., et al. 2007. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* 129, 5656–5664.
 3. BLANCHET C.E., SVERGUN D.I. 2013. Small-Angle X-Ray Scattering on Biological Macromolecules and Nanocomposites in Solution. *Annu Rev Phys Chem* 64, 37–54.
 4. BOURA E., RÓŻYCKI B., HERRICK D.Z., et al. 2011. Solution structure of the ESCRT-I complex by small-angle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 9437–9442.
 5. FRUEH D.P., GOODRICH A.C., MISHRA S.H., et al. 2013. NMR methods for structural studies of large monomeric and multimeric proteins. *Curr Opin Struct Biol* 23, 734–739.
 6. GRIGORIEFF N., HARRISON S.C. 2011. Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol* 21, 265–273.
 7. MINOR W., CYMBOROWSKI M., OTWINOWSKI Z., et al. 2006. HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution—from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 859–866.
 8. PELIKAN M., HURA G.L., HAMMEL M. 2009. Structure and flexibility within proteins as identified through small angle X-ray scattering. *Gen Physiol Biophys* 28, 174–189.
 9. PETOUKHOV M.V., FRANKE D., SHKUMATOV A.V., et al. 2012. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 45, 342–350.
 10. PETOUKHOV M.V., SVERGUN D.I. 2005. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J* 89, 1237–1250.
-

11. PLEVKA P., PERERA R., CARDOSA J., et al. 2012. Crystal structure of human enterovirus 71. *Science* 336, 1274.
12. POITEVIN F., ORLAND H., DONIACH S., et al. 2011. AquaSAXS: a web server for computation and fitting of SAXS profiles with non-uniformly hydrated atomic models. *Nucleic Acids Res* 39, W184–W189.
13. RÓŻYCKI B., KIM Y.C., HUMMER G. 2011. SAXS ensemble refinement of ESCRT-III CHMP3 conformational transitions. *Structure* 19, 109–116.
14. SMITH M.T., RUBINSTEIN J.L. 2014. Structural biology. Beyond blob-ology. *Science* 345, 617–619.
15. SVERGUN D., BARBERATO C., KOCH M.H.J. 1995. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28, 768–773.

■ **Bartosz Różycki.** Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa. E-mail: rozycki@if.pan.edu.pl



Ryc. Różnorodność genetycznie zmodyfikowanych linii *Danio rerio*. Brak ciemnych barwników na skórze ułatwia obrazowanie procesów zachodzących w ciele ryby. Fot. Michał Bazała.

NOWY CODZIENNY UPORCZYWY BÓL GŁOWY – W 30. ROCZNICĘ PIERWSZEGO OPISU CHOROBY

Michał M. Skoczylas, Sara Trieu, Saskia Wiacek, Anna Walecka (Szczecin)

Streszczenie

Od trzydziestu lat trwają badania nad symptomatologią, patogenezą i etiologią nowego codziennego uporczywego bólu głowy. Obecnie jest on uznawany za samoistny ból głowy, lecz u części chorych udaje się znaleźć jego prawdopodobne przyczyny, do których zalicza się m.in. infekcje i udar cieplny. Zgodnie z prawami biologii i medycyny należy założyć, że określenie czynników wywołujących ten rodzaj bólu głowy pozwoli opracować leczenie przyczynowe. Przegląd literatury na ten temat upamiętnia 30. rocznicę pierwszego opisu choroby autorstwa Waltera Vanasta z 1986 roku.

Abstract

Studies on symptomatology, pathogenesis and etiology of new daily persistent headache last thirty years. Currently, it is considered to be spontaneous headache but in some patients it is possible to find its probable causes, which include, among others, infections and heat stroke. According to the laws of biology and medicine it should be assumed that the determination of the factors that cause this type of the headache will give the opportunity to develop a causal treatment. Review of the literature on this topic commemorates the 30th anniversary of the first description of the disease by Walter Vanast in 1986.

Bóle głowy tradycyjnie dzieli się na bóle samoistne (pierwotne, idiopatyczne) i objawowe, czyli wtórne do rozpoznanych procesów chorobowych i będące ich objawami [9]. O ile przyczynę objawowych bólów głowy udaje się poniekąd wyjaśnić, o tyle bóle samoistne stanowią ogromne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne. Do najmniej poznanych pierwotnych bólów głowy należy **nowy codzienny uporczywy ból głowy (new daily persistent headache, NDPH)**, opisany po raz pierwszy przez **Waltera Vanasta w 1986 roku** w czasopiśmie „Headache”. Jest to ból o silnym początku i przewlekłym charakterze. Występuje rzadko, częściej u kobiet niż u mężczyzn. Jego przyczyny udaje się określić u około połowy pacjentów [1, 11]. Zostaną one przedstawione w dalszej części opracowania. W aktualnej (trzeciej) Międzynarodowej Klasyfikacji Bólów Głowy (The International Classification of Headache Disorders 3rd edition, beta version; ICHD-3 beta) nowy codzienny uporczywy ból głowy oznaczono symbolem 4.10 i wyróżniono cztery kryteria diagnostyczne:

- A. Uporczywy ból głowy wypełniający kryteria B i C
- B. Wyraźny ból o dobrze zapamiętanym początku, stający się ciągłym i nieprzerwanym w ciągu 24 godzin

- C. Obecny powyżej 3 miesięcy
- D. Nie uwzględniony ściślej w żadnym innym rozpoznaniu klasyfikacji ICHD-3.

Klasyfikacja uwzględnia pacjentów z wcześniejszym bólem głowy (migrena lub ból głowy typu napięciowego), którym można rozpoznać ten rodzaj bólu, lecz pod warunkiem, że nie podają oni wzrastającej częstości bólu głowy przed jego wystąpieniem. Wyłącza się przy tym pacjentów z wcześniejszym bólem głowy zaostrzonym następnie w wyniku nadużywania leków.

Kryteria te należy odnieść do dyskusji nad porządkowaniem właściwego rozpoznania pacjentom z NDPH i więcej niż jednym objawem charakterystycznym dla migreny. Istotny głos w dyskusji nad tym problemem należy do brazylijskich badaczy Paulo Hélio Monzillo i Patrícia Homsy Nemoto z São Paulo, którzy w roku 2011 opublikowali wyniki badań nad 1348 pacjentami, regularnie leczonymi z powodu bólów głowy w tamtejszej Klinice Neurologii (Departamento de Neurologia da Santa Casa de São Paulo). W grupie tej stwierdzono 62 pacjentów zgłaszających codzienny i uporczywy ból głowy, ale tylko u 21 z nich możliwe było rozpoznanie według kryteriów Międzynarodowej Klasyfikacji Bólów Głowy

ICHD z 2004 roku. U pozostałych 41 osób wystąpiły dwa lub więcej objawów związanych z atakiem migrenowym, jak: mdłości, światłowstręt, fonofobia i wymioty (w różnych kombinacjach). Autorzy proponowali możliwość rozpoznania nowego codziennego uporczywego bólu głowy z cechami migreny i bez cech migreny, co daje możliwość wzięcia pod uwagę wszystkich osób spełniających kryteria NDPH [6].

Autor pierwszego opisu NDPH, doktor Vanast, pracował w Zakładzie Neuronauki Klinicznej w Szpitalu Ogólnym Edmonton Uniwersytetu Alberta w Edmonton (Kanada). W roku 1987 trzysobowy zespół z udziałem Vanasta (Diaz-Mitoma, Vanast, Tyrrell) wykazał, że częstość aktywnych infekcji wywołanych przez **wirusa Epsteina-Barr (EBV)** jest podwyższona u osób z NDPH, a – przeciwnie – odrodzenie się infekcji EBV nie jest częste u chorych z innymi przewlekłymi bólami głowy [3]. Nowe odkrycie dawało światło na możliwość wyjaśnienia biomedycznych uwarunkowań pierwotnego bólu głowy u części chorych. Wyniki prac Vanasta poruszyły nie tylko środowisko naukowe, lecz również dotarły do mediów bulwarowych. 27 czerwca 1995 roku w amerykańskim tygodniku „Weekly World News” pojawiła się ciekawostka pt. „Headache virus plagues millions of Americans!” (tłum. aut. „Wirus bólu głowy nęka miliony Amerykanów!”). Autorzy tego doniesienia piszą, iż połowa wszystkich nowych przewlekłych bólów głowy była ówczesnie spowodowana przez EBV, a ponadto ból tego rodzaju nie mijał po podaniu środków przeciwbólowych. Wobec tego nieoczekiwane fakty można było zrezygnować ze stosowania środków przeciwbólowych u chorych z NDPH wywołanych wirusem EBV, bowiem zażywanie ich w zbyt dużych dawkach powoduje liczne działania niepożądane (m.in. jak po kwasie acetylosalicylowym, indometacynie lub ibuprofenie).

W 1991 roku zespół z Uniwersytetu Kanazawa (Japonia) również zgłębiał problem związku uporczywego bólu głowy z infekcją EBV na przykładzie 45-letniej kobiety z bólem lewostronnym. Z obserwacji wiadomo, że w leczeniu bólu użyteczna może być karbamazepina [4]. Jest to lek psychotropowy i przeciwdrgawkowy, hamujący kanały sodowe bramkowane napięciem, co skutkuje hamowaniem uwalniania glutaminy w centralnym układzie nerwowym. Nie jest lekiem przeciwbólowym, lecz uśmierza nerwobóle poprzez hamowanie przewodnictwa czuciowego [12].

Wobec wielu niewiadomych o istocie NDPH, istotnych informacji może dostarczyć analiza poszczególnych przypadków klinicznych. Zespół badaczy włoskich opisał w 2009 roku wystąpienie NDPH u 45-letniej kobiety, która przeżyła epizod utraty

przytomności w czasie intensywnego wysiłku fizycznego (trekking), w południe w bardzo gorący letni dzień. Jak głębokie zaburzenia homeostazy wystąpiły u tej chorej dowodzą stwierdzone w oddziale ratunkowym hipertermia, niedociśnienie, kwasica mleczanowa, zasadowica oddechowa i zaburzenia równowagi elektrolitowej. Rozpoznano **wysiłkowy udar cieplny** i zastosowano leczenie przez chłodzenie i nawadnianie, które jednak nie zabezpieczyło przed powikłaniem w postaci NDPH i przejściowymi zaburzeniami koordynacji ruchowej [2].

W 2015 roku w Szpitalu Uniwersyteckim Soonchunhyang w Seulu (Korea Południowa) opisano 10-letniego chłopca i 11-letnią dziewczynkę z NDPH – oboje odczuwali przewlekły ciągły ból głowy i pamiętali datę jego rozpoczęcia. U chłopca odnotowano tępy charakter bólu i ucisk w obu okolicach ciemniowych, a także podwójne widzenie i światłowstręt jako objawy towarzyszące. U dziewczynki pulsujący ból lokalizował się wokół oczu i w okolicach skroniowych, a nasilał się podczas ruchów głowy. Poza tym u obu pacjentów nie stwierdzono innych zaburzeń. Wykluczono m.in. zaburzenia czynności tarczycy, zakażenie wirusowe (w tym wirusem Epsteina-Barr), zmiany morfologiczne krwi i podwyższenie stężeń wykładników stanu zapalnego. Stosowane leki – u chłopca niesteroidowe leki przeciwzapalne (wzmiankowane wyżej) i topiramate (lek przeciwpadaczkowy o nie w pełni znanym mechanizmie działania, blokujący kanały sodowe zależne od napięcia błonowego i zwiększający aktywność receptorów wiążących kwas γ -aminomasłowy – GABA), a u dziewczynki niesteroidowe leki przeciwzapalne i amitryptylina (lek przeciwdepresyjny hamujący zwrotny wychwyt noradrenaliny i serotoniny w synapsach) – były nieskuteczne. Za przyczynę bólu głowy uznano **zapalenie zatoki klinowej** – u chłopca prawej, a u dziewczynki lewej. Są to najgłębiej położone zatoki przynosowe. Rozpoznanie postawiono na podstawie badania głowy metodą rezonansu magnetycznego. W obrazach T2 rezonansu magnetycznego (relaksacja spin-spin) stwierdzono hiperintensywny sygnał ze ścian zatok klinowych. U obojga dzieci zastosowano antybiotykoterapię dostępną, a ból głowy wycofał się całkowicie w ciągu czterech tygodni [5, 12].

Jak dowodzą scharakteryzowane opisy przypadków i serii przypadków, poznanie przyczyny choroby daje możliwość skutecznego leczenia. Z analizy 108 przypadków NDPH w Santo Domingo (Dominikana) z 1993 roku wynika, że w badaniach nad etiologią należy wziąć pod uwagę pozaczaszkowe i ogólnoustrojowe **zakażenia wirusami EBV, Herpes Zoster i adenowirusami oraz bakteriami Salmonella**,

Streptococcus, **Proteus**, a także zakażenie układu moczowego **Escherichia coli** i zarażenie **Tokso-plasma** [10]. Z powodu znacznego zróżnicowania powyższych prawdopodobnych przyczyn NDPH te wstępne wyniki powinny być zweryfikowane w większych grupach pacjentów z zakażeniami wywołanymi przez poszczególne patogeny.

W 2010 roku w Indiach zaobserwowano ustąpienie poinfekcyjnego codziennego uporczywego bólu głowy w okresie od 2 do 5 dni stosowania metyloprednizolonu podawanego drogą dożylną u 9 pacjentów [8]. Lek ten należy do glikokortykosteroidów, które wygaszają procesy zapalne, m.in. poprzez hamowanie mediatorów zapalenia i podziałów limfocytów T [7]. Metyloprednizolon wykazuje silne działanie przeciwzapalne oraz immunosupresyjne, przy czym w niewielkim stopniu wpływa na gospodarkę elektrolitową (jest pozbawiony działania mineralokortykoidowego) [12].

Na podstawie przedstawionych opisów badań można stwierdzić, że infekcje, hipertermia i zapalenie zatok przynosowych mogą powodować nowy codzienny uporczywy ból głowy, jednak tylko u części chorych znane są jego przyczyny. Wymienione na początku artykułu kryterium D otwiera możliwość rozpoznania NDPH u chorych, u których nie określono jego przyczyn, i nadania bólowi statusu bólu samoistnego. Co więcej, system klasyfikacji ICHD-3 beta jest „podwójnie” otwarty na problem niedookreśloności patogenezy na aktualnym etapie stanu wiedzy

medyków dzięki wyróżnieniu **prawdopodobnego nowego codziennego uporczywego bólu głowy** (oryg. **probable new daily persistent headache** z symbolem 4.10.1). Kryteria diagnostyczne dla tej kategorii są następujące:

- A. Uporczywy ból głowy wypełniający kryteria B i C
- B. Wyraźny ból o dobrze zapamiętanym początku, stający się ciągłym i nieprzerwanym w ciągu 24 godzin
- C. Trwający mniej niż 3 miesiące
- D. Nie uwzględniony lepiej w żadnym innym rozpoznaniu klasyfikacji ICHD-3
- E. Nie przypisany do innego zaburzenia z ICHD-3.

Autorzy wyrażają nadzieję, że dalsze badania wyjaśnią, jakie są przyczyny NDPH. Aktualnie jest on klasyfikowany jako rodzaj samoistnego bólu głowy. Z okazji 30. rocznicy pierwszego opisu tej choroby na konferencji popularnonaukowej „Tydzień Mózgu w Szczecinie 2016”, 15 marca 2016 roku, przedstawiono pracę pt. „Badania nad etiologią i patogenezą nowego codziennego uporczywego bólu głowy – w 30. rocznicę pierwszego opisu choroby” („Studies on etiology and pathogenesis of new daily persistent headache – on the 30th anniversary of the first description of the disease”) (autorzy wystąpienia: Michał Skoczyła, Sara Trieu, Kathleen Saliendra, Saskia Wiacek i Anna Walecka, <http://www.hbpl.ptpk.org/>).

Bibliografia

1. Bahra A. (2012). Other primary headaches. *Ann Indian Acad Neurol.* 15(Suppl 1):66–71.X10.
2. Di Lorenzo C., Ambrosini A., Coppola G., Pierelli F. (2009). Heat stress disorders and headache: a case of new daily persistent headache secondary to heat stroke. *BMJ Case Rep.*
3. Diaz-Mitoma F., Vanast W.J., Tyrrell D.L. (1987). Increased frequency of Epstein-Barr virus excretion in patients with new daily persistent headaches. *Lancet.* 1(8530):411–415.
4. Hamada T., Ohshima K., Ide Y., Sakato S., Takamori M. (1991). A case of new daily persistent headache with elevated antibodies to Epstein-Barr virus. *Jpn J Med.* 30(2):161–163.
5. Lee J., Rhee M., Suh E.S. (2015). New daily persistent headache with isolated sphenoiditis in children. *Korean J Pediatr.* 58(2):73–76.
6. Monzillo P.H., Nemoto P.H. (2011). Patients with sudden onset headache not meeting the criteria of the International Headache Society for new daily persistent headache. How to classify them? *Arq Neuropsiquiatr.* 69(6):928–931.
7. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P. (2016). Mutschler farmakologia i toksykologia. (s. 391–402). Wrocław, MedPharm Polska.
8. Prakash S., Shah N.D. (2010). Post-infectious new daily persistent headache may respond to intravenous methylprednisolone. *J Headache Pain.* 11(1):59–66.
9. Prusiński A. (2004). Bóle głowy i twarzy. [w:] Kozubski W., Liberski P.P. (red.). *Choroby układu nerwowego.* (s. 467–468). Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
10. Santoni J.R., Santoni-Williams C.J. (1993). Headache and painful lymphadenopathy in extracranial or systemic infection: etiology of new daily persistent headaches. *Intern Med.* 32(7):530–532.

11. Stępień A. (2015). Przewlekłe bóle głowy. [w:] Stępień A. (red.). Neurologia. (tom III, s. 367–373). Warszawa, Medical Tribune Polska.
12. Śluga I. (red.) (2003). Pharmindex. Kompendium leków. Warszawa, Wydawnictwo MediMedia International.

Pozostałe źródła

Headache Classification Committee. International Headache Society. 4.10 New daily persistent headache (NDPH). [online]. The International Classification of Headache Disorders 3rd edition (Beta version). [przeeglądany: 12 listopada 2016]. Dostępny w: <https://www.ichd-3.org/other-primary-headache-disorders/4-10-new-daily-persistent-headache-ndph/>.

Headache virus plagues millions of Americans!. Weekly World News 1995, 39(16), 33. [online]. [przeeglądany: 12 listopada 2016]. Dostępny w: https://books.google.pl/books?id=t_EDAAAAMBAJ&printsec=frontcover&hl=pl#v=onepage&q&f=false.

Headache Classification Committee. International Headache Society. 4.10.1 Probable new daily persistent headache. [online]. The International Classification of Headache Disorders 3rd edition (Beta version). [przeeglądany: 12 listopada 2016]. Dostępny w: <https://www.ichd-3.org/other-primary-headache-disorders/4-10-new-daily-persistent-headache-ndph/4-10-1-probable-new-daily-persistent-headache/>.

dr n. med. Michał M. Skoczylas, lekarz rezydent w Zakładzie Diagnostyki Obrazowej i Radiologii Interwencyjnej, Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, opiekun studenckiego koła naukowego, *sekretarz Sekcji Nauk o Człowieku Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika*, *wiceprezes Sekcji Ekologicznej Polskiego Towarzystwa Lekarskiego (towarzystw – współorganizatorów Tygodnia Mózgu w Szczecinie 2016)*. E-mail: sklm@wp.pl

Sara Trieu, studentka Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, uczestniczka Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Diagnostyki Obrazowej i Radiologii Interwencyjnej PUM (dla studentów anglojęzycznych)

Saskia Wiacek, studentka Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, uczestniczka Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Diagnostyki Obrazowej i Radiologii Interwencyjnej PUM (dla studentów anglojęzycznych)

prof. dr hab. n. med. Anna Walecka, lekarz, kierownik Zakładu Diagnostyki Obrazowej i Radiologii Interwencyjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, opiekun studenckiego koła naukowego

BYĆ KOBIETĄ, BYĆ KOBIETĄ – WPŁYW ESTROGENÓW NA FUNKCJONOWANIE UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Magdalena Maciuszek (Kraków)

Streszczenie

Układ odpornościowy współpracuje z dwoma innymi układami: endokrynnym i nerwowym, tworząc skomplikowaną sieć komunikacyjną w ludzkim organizmie, która umożliwia utrzymanie w nim stanu równowagi (homeostazy). Okazuje się, że interakcje immunoendokrynne w kobiecym organizmie są o wiele bardziej złożone, niż jak się do tej pory wydawało. U kobiet ciąża, menopauza, a nawet cykliczne zmiany poziomu hormonów podczas cyklu menstruacyjnego powodują wielokierunkowe zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego, poprawiając odpowiedź na patogeny, ale także wpływając na nadaktywność kobiecego układu odpornościowego, co w konsekwencji przyczynia się do zwiększonej zapadalności na choroby autoimmunologiczne.

Abstract

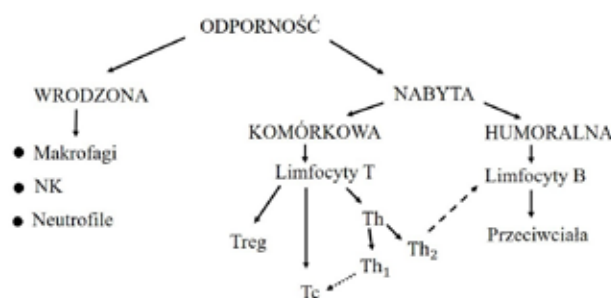
The immune system cooperate with endocrine and nervous systems in creating a complicated network of communication in human body, which allows homeostasis maintaining. The immuno-neuroendocrine interactions in the female body are much more complicated than it was seemed previously. In women, pregnancy, menopause, and even cyclic changes in hormone levels during menstrual cycle cause multidirectional changes in the functioning of immune system. They improve the immune response against pathogens, but also evoke over-reactivity of the immune system, what contributes to the increased incidence of autoimmune diseases.

Oczywiste jest, że kobiety i mężczyźni różnią się budową układu rozrodczego, a także poziomem hormonów płciowych. Każdy zapewne słyszał o „płci mózgu” i związanych z nią różnicach w odczuwaniu bodźców czy w zachowaniu, ale czy istnieje coś takiego jak „płć odporności”?

Co składa się na układ odpornościowy i jak działa „odporność”?

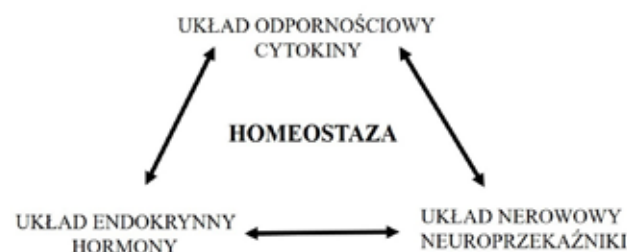
Podstawową funkcją układu odpornościowego jest obrona organizmu przed patogenami, zwalczanie ich oraz usuwanie starych bądź zmienionych nowotworowo komórek naszego organizmu. U wszystkich zwierząt kręgowych istnieją dwie gałęzie odpowiedzi immunologicznej – wrodzona oraz nabyta. Odporność wrodzona jest pierwszą linią obrony przeciwko patogenom, charakteryzującą się szybką odpowiedzią bez specyficznej pamięci. Głównymi komórkami tej odpowiedzi są monocyty/makrofagi, neutrofile oraz komórki NK (ang. *natural killers*). W odpowiedzi na patogeny potrafią one sfagocytować i zniszczyć patogen. Natomiast głównymi komórkami odpowiedzi nabytej są limfocyty B oraz T. Jest to odpowiedź długotrwała charakteryzująca się wysoką specyficznością i pamięcią, co oznacza, że ponowny kontakt z tym samym patogenem wywołuje szybszą i bardziej efektywną reakcję immunologiczną. Limfocyty T dzielą się na trzy subpopulacje: limfocyty cytotoksyczne (Tc); pomocnicze (Th, ang. *helper*) oraz limfocyty regulatorowe (Treg). Ta ostatnia populacja generalnie odpowiedzialna jest za hamowanie reakcji odpornościowej. W obrębie odpowiedzi nabytej wyróżniamy reakcję komórkową i humoralną. W odpowiedzi komórkowej zostaje zwiększona produkcja limfocytów Th1, które aktywują limfocyty Tc do wydzielania ziaren cytolitycznych, co powoduje uśmiercenie komórek zakażonych patogenem, głównie wirusami. Odpowiedź humoralna jest z kolei w głównej mierze kojarzona z produkcją przeciwciał przez limfocyty B, a reakcja ta jest wspomagana przez limfocyty Th2 (Ryc.1). W obrębie układu odpornościowego możemy spotkać krążące we krwi

i limfie leukocyty. Komórki te mogą także skupiać się w narządach limfatycznych, takich jak szpik kostny, grasica, śledziona i węzły limfatyczne, a także występować w postaci różnorodnych skupisk, np. w obrębie tkanek związanych z błonami śluzowymi [4].



Ryc. 1. Komórki układu odpornościowego uczestniczące w odpowiedzi wrodzonej i nabytej: limfocyty T regulatorowe (Treg), limfocyty T cytotoksyczne (Tc), limfocyty T pomocnicze (Th). Odpowiedź komórkowa związana jest z aktywacją limfocytów Th1, które wzmagają proliferację limfocytów Tc. Odpowiedź humoralna związana jest z aktywacją limfocytów Th2, zwiększając proliferację limfocytów B i wydzielanie przeciwciał [4; zmodyfikowane].

Układ odpornościowy, aby móc sprawnie bronić nasz organizm i współuczestniczyć w utrzymaniu jego równowagi (homeostazy), współpracuje z dwoma innymi układami – układem endokrynnym (hormonalnym) oraz układem nerwowym. Komunikują się one na zróżnicowanych poziomach – za pomocą neuroprzekazników (układ nerwowy), za pomocą hormonów (układ endokrynnym) oraz za pomocą cytokin wytwarzanych przez leukocyty (układ odpornościowy) (Ryc. 2). Układy te wzajemnie rozumieją „swoje języki”, ponieważ na komórkach je budujących



Ryc. 2. Oddziaływania pomiędzy układami odpornościowym, endokrynnym i nerwowym warunkują homeostazę [4; zmodyfikowane].

występują receptory wiążące te substancje. Przykładowo na leukocytach stwierdzono ekspresję receptorów dla takich hormonów jak melatonina, prolaktyna, hormon wzrostu, a także wewnątrzkomórkowych receptorów dla estrogenów czy androgenów. Ponadto leukocyty są zdolne do lokalnej produkcji hormonów [1].

Hormony płciowe

Ważnym, jeśli nie najważniejszym czynnikiem warunkującym naszą płć jest stężenie hormonów płciowych. Typowymi hormonami płciowymi są androgeny (głównie testosteron – T) oraz estrogeny (głównie 17β-estadiol – E2). Hormony te występują zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet, jednak obie płcie różnią się w zasadniczy sposób stężeniem tych hormonów.

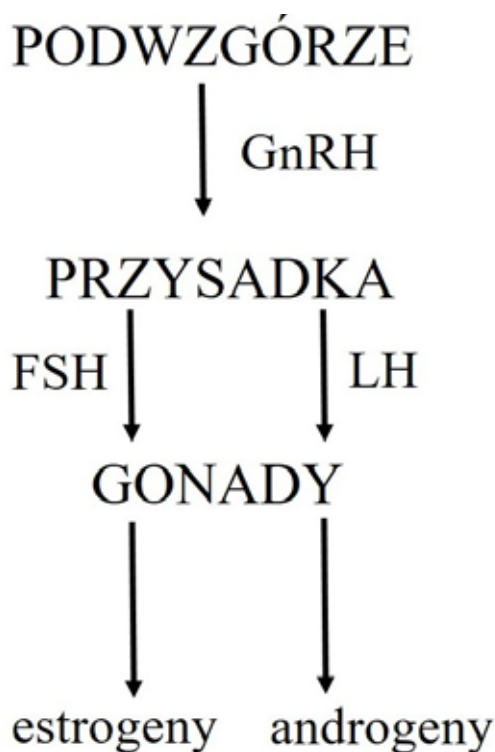
Testosteron jest produkowany głównie przez jądra, a jego produkcja jest kontrolowana przez oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG, ang. *hypothalamic-pituitary-gonads*). Podwzgórze kontroluje przysadkę poprzez wydzielanie gonadoliberyny (GnRH, ang. *gonadotropin-releasing hormone*), która następnie kontroluje wydzielanie z przysadki hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*) oraz hormonu luteinizującego (LH, ang. *luteinizing hormone*) (Ryc. 3). FSH wpływa na produkcję spermy, natomiast LH kontroluje produkcję

i wydzielanie testosteronu. Testosteron wpływa na wykształcenie płci i cech płciowych w życiu płodowym, wykształcenie drugo- i trzeciorzędowych cech płciowych oraz na spermatogenezę. U mężczyzn stężenie testosteronu jest stałe do 60 roku życia, następnie nieznacznie spada (o około 1% rocznie). Pomimo tego, że testosteron jest typowym męskim hormonem, jego działanie w organizmie jest pleiotropowe. Wpływa na takie cechy jak agresja, dominacja, pewność siebie, porost włosów, a także zwiększoną syntezę białek i wyższe tempo spalania tłuszczu.

Hormonem płciowym żeńskim jest 17beta-estadiol - E2. E2 powstaje z testosteronu pod wpływem enzymu aromatazy cytochromu P450, a jego synteza i wydzielanie kontrolowane jest podobnie, jak w przypadku testosteronu przez oś HPG (Ryc. 3). Hormon LH odpowiedzialny jest głównie za konwersję głównego substratu estrogenów – cholesterolu do pregnenolonu, a FSH za powstanie z androgenów – estrogenów poprzez zwiększenie procesu aromatyzacji odpowiedzialnej za przekształcenie testosteronu do estradiolu. Produkcja estrogenów w największym stopniu odbywa się w jajnikach, łożysku, macicy, tkance tłuszczowej i w kościach [6]. U kobiet wahania hormonów płciowych są zależne od stanu dojrzałości, ale oczywiście wahają się też w trakcie cyklu miesięcznego. Drastycznymi okresami zmian poziomu hormonów płciowych u kobiet jest okres ciąży i oczywiście menopauza, kiedy poziom estrogenów raptownie spada o około 80 %.

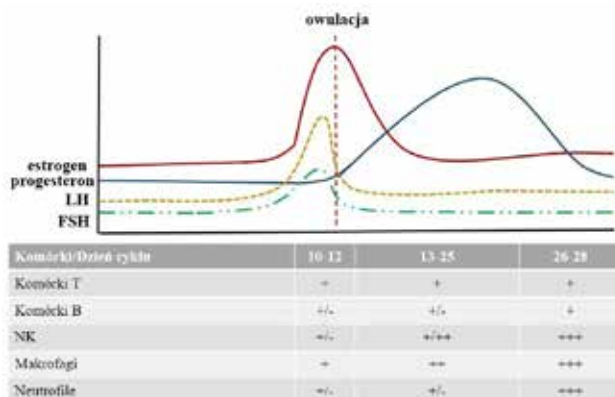
Podczas cyklu menstruacyjnego dochodzi do cyklicznych (co około 28 dni) zmian w poziomach hormonów takich jak: estrogen i progesteron, FSH i LH. Pod wpływem FSH dochodzi do dojrzewania i rozwoju pęcherzyków jajnikowych, a także stymulacji produkcji estrogenu. W fazie pęcherzykowej główną rolę odgrywa estrogen, który wpływa na rozrost błony śluzowej macicy i tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Jego wzrastające stężenie powoduje nasilenie uwalniania gonadotropiny i w konsekwencji owulację pęcherzyka Graafa (dojrzałego pęcherzyka jajnikowego) i uwolnienie oocyta. Po owulacji rozpoczyna się faza lutealna, pęcherzyk przekształca się w ciało żółte, które pełni rolę gruczołu dokrewnego, produkując estrogen i progesteron, istotne dla implantacji zapłodnionej komórki i zmian czynności wydzielniczych. Gdy nie dojdzie do zapłodnienia, ciało żółte ulega luteolizacji i przekształca się w ciało białawe, a poziom hormonów znacznie spada, dając sygnał do rozpoczęcia menstruacji (Ryc. 4).

Co oczywiste, odmiennym stanem fizjologicznym jest ciąża, gdzie hormony płciowe są na stałe wysokim poziomie. Jeśli po owulacji dochodzi do



Ryc. 3. Regulacja powstawania hormonów płciowych kontrolowana przez oś podwzgórze-przysadka-gonady. GnRH - gonadoliberyna; FSH - hormon folikulotropowy; LH - hormon luteinizujący [9; zmodyfikowane].

zapłodnienia komórki, w organizmie kobiety silnie wzrasta poziom gonadotropiny kosmówkowej (hCG, ang. *human chorionic gonadotropin*), co podtrzymuje produkcję progesteronu przez ciało żółte. Poziom estrogenu i progesteronu z każdym miesiącem ciąży jest coraz wyższy. Po porodzie dochodzi zaś do gwałtownego spadku poziomu tych hormonów, co może prowadzić do depresji poporodowej.



Ryc. 4. Zmiany poziomu hormonów i liczby poszczególnych typów leukocytów w endometrium w trakcie cyklu miesiączkowego; +/- sprzeczne dane literaturowe; - (0 %), + (1-2 %), ++ (3-5 %), +++ (6-15 %) całkowitej liczby komórek [5; zmodyfikowane].

Główną funkcją estrogenów jest regulacja układu rozrodczego żeńskiego, wykształcenie drugo- i trzeciorzędowych cech płciowych, a także regulacja cyklu menstruacyjnego. E2 wpływa również na układ sercowo-naczyniowy, zwiększając ilość substancji (prostaglandyn i tlenu azotu) powodujących rozszerzenie naczyń wieńcowych. Estrogeny wpływają również na mineralizację kości oraz utrzymują prawidłowy poziom wapnia, jednocześnie zapobiegając osteoporozie. Estrogeny pełnią ważną rolę w centralnym układzie nerwowym poprzez zwiększenie synaptogenezy, regulację zmiany nastroju, a także poprawiają funkcjonowanie hipokampu – regionu odpowiadającego za pamięć, koncentrację i orientację przestrzenną [6].

Nasuwa się pytanie czy te różnice hormonalne mogą również powodować odmienne działanie układu odpornościowego kobiet i mężczyzn?

„Płeć odporności”

Dymorfizm płciowy układu odpornościowego jest zjawiskiem odmiennego reagowania organizmu na patogeny w zależności od płci i środowiska hormonalnego organizmu. Pierwsze historyczne doniesienia na ten temat pojawiły się w roku 1898, kiedy zaobserwowano, że wykastrowane króliki posiadają większą masę grasicy niż króliki w pełni sprawne reprodukcyjnie. Badania te powtórzono na szczurach

i wysunięto wnioski, że hormony płciowe męskie działają hamująco na układ odpornościowy. Kolejne badania wykazały również, że osobniki żeńskie mają lepiej funkcjonujący układ odpornościowy [2].

Jak się okazuje, kobiecy organizm lepiej radzi sobie z infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi, a także pasożytniczymi niż organizm męczyzny. U kobiet zaobserwowano zwiększoną liczbę limfocytów Tc, uczestniczących w odpowiedzi komórkowej i lepszą odpowiedź humoralną, co wynika z wyższego poziomu limfocytów Th2, odpowiadających za regulację tworzenia przeciwciał (głównie IgG i IgM) przez limfocyty B. Mechanizm ten odpowiedzialny jest za obserwowaną u kobiet lepszą odpowiedź na szczepienia. Także odpowiedź wrodzona jest u kobiet bardziej efektywna, ponieważ ich fagocyty wykazują większą aktywność żerną.

U mężczyzn natomiast zaobserwowano zwiększoną aktywność komórek NK oraz przesunięcie odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi komórkowej zależnej od limfocytów Th1 – niezwiązanej z wytwarzaniem przeciwciał [1].

Nie można jednak zapominać, że poza dobroczynnym działaniem układu odpornościowego, polegającym na zwalczaniu patogenów i innych zagrożeń ma on też drugie, negatywne oblicze związane z niepożądanymi reakcjami uszkadzającymi tkanki gospodarza, tak jak ma to miejsce w przypadku chorób autoimmunologicznych. To właśnie kobiety, w związku z opisaną wcześniej zwiększoną „czułością” i aktywnością układu odpornościowego, częściej zapadają na choroby autoimmunologiczne. Według danych opracowanych przez National Institute of Health Autoimmune Diseases Coordinating Committee aż 80% chorych na choroby autoimmunologiczne to kobiety (Tab. 1) [1].

Tab. 1. Porównanie częstotliwości występowania kilku chorób autoimmunologicznych u kobiet (♀) i mężczyzn (♂) [3; zmodyfikowane].

Choroba autoimmunologiczna	♀:♂
Układowy toczeń rumieniowaty (SLE)	9:1
Choroba Gravesa-Basedowa	8:1
Stwardnienie rozsiane (MS)	5:1
Cukrzyca typu 1	5:1
Twardzina	4:1
Reumatoidalne zapalenie stawów (RA)	4:1
Idiopatyczna niewydolność nadnerczy	3:1
Miastenia	2:1

Opisane różnice są w głównej mierze spowodowane fizjologicznie wyższymi stężeniami estrogenów

u kobiet niż u mężczyzn, ale również obserwowaną u nich zwiększoną produkcją prolaktyny i hormonu wzrostu. U mężczyzn natomiast hamująco na układ odpornościowy działają androgeny, fizjologicznie niski poziom estrogenów i prolaktyny.

Wpływ estrogenów i testosteronu na odporność

Estradiol oddziałuje zarówno na odpowiedź wrodzoną, jak i nabytą, co jednak ciekawe, kierunek działania estrogenów bardzo silnie zależy od ich stężenia. I tak w przypadku niskich stężeń estrogenów (np. u mężczyzn lub u kobiet w trakcie menstruacji czy w czasie menopauzy) dochodzi do stymulacji i produkcji cytokin prozapalnych, prowadzących do wzmocnienia odpowiedzi komórkowej. U kobiet podczas menopauzy znacznie spada liczba limfocytów Th2 i B, a zwiększa się liczba limfocytów Tc, a zastosowanie hormonalnej terapii zastępczej powoduje odwrócenie tego zjawiska. Z kolei wysoki poziom estrogenów, np. taki, jaki jest obserwowany u kobiet w czasie owulacji i w ciąży, powoduje zwiększoną produkcję przeciwciał i wzmocnienie, zależnej od limfocytów Th2, odpowiedzi humoralnej oraz zwiększone uwalnianie limfocytów Treg. Estrogeny działają również hamująco na komórki NK, a także powodują zmniejszenie napływu neutrofilii i monocytów, hamując ich chemotaksję i migrację do ogniska zapalnego, ochraniając organizm przed długotrwałym stanem zapalnym. Co ciekawe estrogeny wpływają stymulująco na rozrost włókien kolagenowych i przyspieszają gojenie ran [3].

U mężczyzn z kolei stwierdzono częstsze występowanie nowotworów (ryzyko ich wystąpienia jest o około 30 % wyższe u mężczyzn niż u kobiet). Testosteron działając hamująco na komórki układu odpornościowego, zmniejsza ich liczbę oraz wrażliwość na komórki zmienione nowotworowo i obniża infiltrację nowotworów przez leukocyty. Testosteron osłabia także aktywność makrofagów poprzez zmniejszenie wydzielania tlenu azotu, a także wydzielania cytokin prozapalnych.

Oczywiście, żeby estrogeny i androgeny mogły bezpośrednio wpływać na funkcjonowanie układu odpornościowego, leukocyty muszą posiadać odpowiednie receptory. Obecność receptorów estrogenowych (ER) stwierdzono do tej pory nie tylko w narządach rozrodczych, ale również w komórkach układu odpornościowego, np. w/na limfocytach B, limfocytach Th i Tc, NK, monocytach, makrofagach i komórkach dendrytycznych. Z kolei występowanie receptorów androgenowych stwierdzono w limfocytach B i T, monocytach/makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych i mastocytach [1].

Zmiany odporności w trakcie cyklu miesięczkowego

Tak jak wcześniej pisano, u kobiet dochodzi do cyklicznych zmian hormonalnych. Jak się okazuje takie zmiany w poziomach hormonów oddziałują plejotropowo na organizm kobiety. Wpływają między innymi na „legendarne” zmiany nastroju czy sposobu zachowania. Jeśli chodzi natomiast o obserwowane podczas cyklu miesięczkowego zmiany w odpowiedzi immunologicznej to zaobserwowano, że podczas fazy folikularnej dochodzi do zwiększonej produkcji limfocytów Treg oraz zwiększenia liczby monocytów, co jest zapewne związane z podniesionym poziomem prozapalnej interleukiny 1 β (IL-1 β). Przed samą owulacją dochodzi natomiast do zwiększenia liczby limfocytów B. W fazie lutealnej spada liczba limfocytów Treg i Tc, rośnie natomiast liczba monocytów i makrofagów oraz poziom cytokin prozapalnych. Jak się okazuje, podczas miesiączki mamy do czynienia z silną odpowiedzią wrodzoną, charakteryzującą się podniesioną liczbą makrofagów i neutrofilii (Ryc. 4). Pomimo wielu badań istnieją sprzeczne doniesienia na temat związanych z cyklem menstruacyjnym zmian w liczbie i w aktywności komórek NK.

Co ciekawe, obserwowane w różnych fazach cyklu menstruacyjnego zmiany w układzie odpornościowym powodują, że wiele objawów chorobowych ulega pogorszeniu podczas fazy lutealnej. I tak na przykład, w tej fazie obserwuje się pogorszenie stanu zdrowia pacjentek cierpiących na astmę, cukrzycę czy choroby układu krążenia, np. arytmie [5].

Zmiany odporności w ciąży

Ciąża dla organizmu kobiety jest wielkim wyzwaniem – z jednej strony musi chronić siebie i organizm dziecka przed infekcjami i zarażeniami, a z drugiej strony musi wykazać tolerancję w stosunku do obcych (ojcowskich) antygenów obecnych w tkankach płodu. Dotychczas dość często ciąża określana była jako czas immunosupresji, to znaczy zahamowania odpowiedzi immunologicznej. W ostatnich latach odchodzi się jednak od tego pojęcia, a o okresie ciąży mówi się jako o czasie immunomodulacji, czyli o okresie, w którym dochodzi do zmiany sposobu oddziaływania układu odpornościowego. Kluczowe dla utrzymania ciąży jest osiągnięcie przez organizm matki właściwego stosunku limfocytów Th1 i Th2. Zbyt wysoka liczba lub zbyt duża aktywność limfocytów Th1 może bowiem spowodować poronienie. W literaturze potwierdzono, że aby doszło do rozwoju prawidłowej ciąży musi dojść do takiej sytuacji,

gdy limfocyty Th2 przeważają nad limfocytami Th1. Bardzo ważną rolę w utrzymaniu ciąży pełnią także limfocyty Treg, które powodują supresję odpowiedzi komórkowej. Przykładowo myszy, które wykazują niedobory limfocytów Treg, są nieplodne lub mają zwiększony wskaźnik poronień.

Przygotowanie organizmu kobiety do ciąży zachodzi już w początkowej fazie lutealnej, kiedy dochodzi do zwiększenia liczby limfocytów Th1 i poziomu cytokin prozapalnych, odpowiedzialnych za zapoczątkowanie stanu zapalnego, który jest niezbędny do prawidłowej implantacji zarodka. Lokalny stan zapalny, spowodowany zwiększoną odpowiedzią komórkową zależną od limfocytów Th1 na samym początku ciąży jest konieczny do prawidłowej implantacji zarodka, zwiększenia angiogenezy (tworzenie nowych naczyń krwionośnych) i zwiększenia immunotolerancji dla antygenów ojcowskich. Następnie, na skutek podniesionego stężenia hCG i progesteronu, dochodzi do zwiększonej produkcji cytokin przeciwzapalnych, np. transformującego czynnika wzrostu TGF β (ang. *transforming growth factor β*), powodujących zwiększoną proliferację limfocytów Th2, hamujących wydzielanie cytokin prozapalnych i proliferację limfocytów Th1. Cytokiny te biorą udział w utrzymaniu stanu immunosupresji w kolejnych miesiącach ciąży. Oczywiście obserwowana na późniejszych etapach ciąży immunosupresja ma na celu ochronę płodu, ale nie pozostaje bez wpływu na organizm matki [6]. U kobiet w okresie ciąży, z uwagi na przesunięcie odporności w kierunku tej mediowanej przez limfocyty Th2, może dojść do zwiększenia podatności na infekcję, szczególnie te wirusowe, a w przypadku pacjentek chorych na choroby autoimmunologiczne często obserwuje się złagodzenia lub zaostrzenia objawów choroby. Kierunek tej reakcji związany jest z typem schorzenia. I tak w przypadku chorób autoimmunologicznych zależnych od limfocytów Th1 dochodzi do remisji, natomiast w przypadku chorób angażujących limfocyty Th2 w trakcie ciąży dochodzi do zaostrzenia objawów choroby (Tab. 2). Przykładowo u kobiet chorujących na stwardnienie rozsiane bądź reumatoidalne zapalenie stawów najczęściej w drugim i w trzecim trymestrze ciąży dochodzi do złagodzenia objawów związanych

z tymi chorobami. Niestety po porodzie, do około 3 miesięcy, następuje ostry nawrót choroby. Z kolei w przypadku kobiet chorujących na układowy toczeń rumieniowaty, zajście w ciążę wiąże się z zaostrzeniem objawów choroby. Dochodzi u nich także do powikłań położniczych takich jak: przedwczesny poród, obumarcie płodu, samoistne poronienie, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu, stan przedrzucawkowy, czy do wcześniejszego pęknięcia błon płodowych [5].

Próby terapii hormonalnych w schorzeniach autoimmunologicznych

Opisane powyżej obserwacje w sposób oczywisty sugerują wykorzystanie terapii hormonalnych w łagodzeniu objawów/leczeniu chorób autoimmunologicznych. Próby takich działań są podejmowane na przykład w przypadku stwardnienia rozsianego. Warto w tym miejscu przypomnieć, że stwardnienie rozsiane – SM (łac. *sclerosis multiplex*) jest chorobą autoimmunologiczną atakującą ośrodkowy układ nerwowy, w której w wyniku nieprawidłowego działania leukocytów, dochodzi do demielinizacji włókien nerwowych. W konsekwencji prowadzi to do zwyrodnienia i uszkodzenia aksonów i do trwałego kalectwa.

U pacjentek z SM próbowano między innymi prowadzić dwufazową terapię hormonalną. W pierwszej fazie przez 6 miesięcy kobietom cierpiącym na SM podawano doustnie estriol (8 mg/dzień). W tym okresie, co miesiąc dokumentowano zmiany chorobowe w mózgu pacjentek przez zastosowanie metody obrazowania rezonansem magnetycznym. Następnie przez 6 miesięcy kobiety nie otrzymywały hormonu, aby ponowić jego podawanie przez kolejne 4 miesiące. Warto nadmienić, że w badaniu uczestniczyły kobiety z tzw. postacią nawracająco–remitującą SM (RRMS), czyli takie, u których rzuty choroby przeplatane są okresami remisji i takie, u których stwierdzono postępująco–nawracającą postać tej choroby (PRMS). W tym wypadku mówimy o bardzo ostrym przebiegu choroby od początku bez okresów remisji. Wykazano, że podczas traktowania estriolem zmniejszyła się ilość lezji obserwowanych w mózgu pacjentek. Natomiast w czasie, kiedy nie podawano estriolu, nastąpiły nawroty lezji w uszkodzonej części mózgu, w stosunku do okresu, kiedy hormon był podawany. Polepszenie wykazano jednak tylko u kobiet z RRMS. Podczas podawania hormonu zaobserwowano ponadto zwiększone wydzielanie przeciwzapalnych cytokin IL-5 i IL-10 oraz zmniejszony poziom limfocytów Tc i czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*; TNF α). Wyniki te świadczą o przesunięciu odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi humoralnej

Tab. 2. Klasyfikacja chorób autoimmunologicznych w zależności od typu odpowiedzi immunologicznej [7; zmienione].

Th1	Th2
Cukrzyca typu I	Układowy toczeń rumieniowaty (SLE)
Stwardnienie rozsiane (MS)	Alergiczne zapalenia skóry
Choroba Hashimoto	Twardzina
Choroba Gravesa-Basedowa	Astma
Łuszczyca	Alergia
Zespół Sjögrena	Nowotwór
Reumatoidalne zapalenia stawów (RA)	Wypyrsk atopowy skóry

zależnej od limfocytów Th2, a także o zmniejszeniu reakcji prozapalnej na rzecz reakcji przeciwzapalnej. Druga faza badań obejmowała kobiety tylko z postacią RRMS. Biorące w niej udział pacjentki podzielono na dwie grupy: i) placebo, grupa kontrolna (otrzymująca tabletki „cukrowe” i ii) grupę badaną, gdzie podawano estriol doustnie w dawce 8 mg/dzień przez 24 miesiące. W tym wypadku u kobiet poddanych terapii hormonalnej obserwowano zmniejszoną ilość uszkodzeń mózgu, polepszenie samopoczucia, zmniejszoną ilość i ostrość nawrotów choroby, a także zwiększenie liczby limfocytów Th2 [10].

Kolejną chorobą autoimmunologiczną, w której próbowano stosować terapię hormonalną, był układowy toczeń rumieniowaty (SLE, ang. *systemic lupus erythematosus*). Jest to przewlekła choroba tkanek łącznej (z grupy kolagenoz), charakteryzująca się zmianami w wielu narządach i tkankach. Dokładna przyczyna SLE nie jest do końca poznana, mogą wpływać na nią czynniki genetyczne, środowiskowe, hormonalne i immunologiczne. Do rozpoznania choroby oraz oceny jej aktywności służy między innymi test badający obecność tzw. przeciwciał przeciwjądrowych (ang. *antinuclear antibody* – ANA). Choroba ta charakteryzuje się wielopostaciowością. U pacjentów spotyka się np. rumień na twarzy, rumień wędrujący, zaburzenia hematologiczne, zmiany w układzie nerwowym, zapalenie stawów. Ponieważ w przypadku SLE pogorszenie stanu pacjentek obserwuje się u kobiet podczas ciąży i w trakcie fazy lutealnej podczas

cyklu miesięczkowego, podjęto próbę zastosowania terapii hormonalnej także w tym wypadku. Badania polegały na codziennym podawaniu estrogenu i progesteronu w dawce 0,625 mg/dzień przez 2 lata kobietom chorym na SLE w wieku menopauzalnym. Grupę kontrolną stanowiły również kobiety w wieku menopauzalnym ze diagnozowanym SLE, ale nieotrzymujące hormonów. W przeciwieństwie jednak do zmian obserwowanych u pacjentek z SM, w tym wypadku nie wykazano znaczących różnic pomiędzy przebiegiem SLE w obydwu badanych grupach [8].

Podsumowanie

Wszystkie powyżej zacytowane wyniki obserwacji i badań pozwalają stwierdzić, że możemy mówić o „płci odporności” i każą się zastanowić nad indywidualnym dobieraniem terapii immunologicznych uwzględniającym płeć pacjenta i jego aktualny poziom hormonalny.

Podziękowania:

Autorka składa serdeczne podziękowania dr hab. Annie Ptak z Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozwoju Instytutu Zoologii UJ za cenne komentarze dotyczące manuskryptu, a także swojemu opiekunowi dr hab. Magdalenie Chadzińskiej z Zakładu Immunologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii UJ za cenne uwagi merytoryczne w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Bibliografia

1. Bhatia A, Sekhon H, Kaur G. (2014). Sex hormones and immune dimorphism. *Scientific World Journal*, 159150. doi:10.1155/2014/159150.
2. Calzolari A. (1898). Recherches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Archives Italiennes de Biologie*, 214: 1224-1225.
3. Cunningham M, Gilkeson G. (2011). Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 40: 66–73. doi:10.1007/s12016-010-8203-5.
4. Jakóbsiak M, Gołąb J, Lasek W, Stokłosa T. (2014). *Immunologia*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
5. Lee S, Kim C, Kim D, Kang J. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network*, 15: 16–26. doi:10.4110/in.2015.15.1.16.
6. Luine V. (2014). Estradiol and cognitive function: past, present and future. *Hormones and Behavior*, 66: 602-618. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.08.011.
7. Nicholson L, Kuchroo VK. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*, 8: 837-842.
8. Sanchez-Guerrero J, Gonzalez-Perez M, Durand-Carbajal M, Lara-Reyes P, Jimenez-Santana L, Romero-Diaz J, Cravio M. (2007). Menopause hormonal therapy in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 56: 3070–3079. doi:10.1002/art.22855.
9. Traczyk W. (2010). *Fizjologia człowieka w zarysie*. Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa.
10. Voskhuil R, Wang H, Wu T, Sicotte N, Nakamura K, Kurth F, Itoh N, Bardens J, Bernard J, Corboy J, Cross A, Dhib-Jalbut A, Ford C, Frohman E, i inni. (2016). Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurology*, 15: 35–46. doi:10.1016/S1474-4422(15)00322-1.

SPOTKANIE Z PRZEZIERNIKIEM

Przezierniki to motyle z przezroczystymi skrzydłami należące do rodziny przeziernikowatych (Sesiidae). Choć są pospolite, to jednak przez swoją skrytą biologię trudne do zaobserwowania w terenie. Gąsienice tych motyli są endofagiczne, żywią się tkankami budującymi korzenie i pędy drzew, krzewów i roślin zielnych. Poszczególne gatunki

obwiedzione, ciemny tułów z 2 żółtawymi bocznymi pionowymi przepaskami i jedną przepaską środkową. Ciemny odwłok ozdabiają białe wąskie przepaski poprzeczne i rząd białżółtych plamek na segmentach. Szczoteczka odwłokowa ma barwę ciemnożółtą. Jak na motyla będącego symbolem piękna, przeziernik urodą nie zadziwia.



Ryc. 1. *Pyropteron triannuliformis* na koszyczku złocienia właściwego. Fot. M. Olszowska.

przezierników obrały na roślinę żywicielską dla swoich larw określony gatunek roślin. Ma to odzwierciedlenie w nazwie gatunku motyla. Na przykład larwy przeziernika malinowca (*Pennisetia hylaeiformis*) żerują wewnątrz tkanek malin, zaś przeziernika olchowca (*Synanthedon spheciformis*) wewnątrz tkanek olszy. Dwa gatunki przezierników nie mają polskich nazw. Jest to *Pyropteron muscaeformis*, którego rośliną żywicielską jest zawciąg pospolity (*Armeria maritima*) i *Pyropteron triannuliformis*, którego larwy żywią się korzeniami roślin z rodzaju szczaw (*Rumex*). Dorosłe motyle żywią się nektarem kwiatowym i niekiedy można spotkać pojedyncze osobniki uczujące na roślinach łąkowych.

W czerwcu ubiegłego roku (2015) zaobserwowałam *Pyropteron triannuliformis* na łące w Mrągowie, gdy żerował na koszyczku kwiatowym złocienia właściwego (*Leucanthemum vulgare*). Motyl ma skrzydła o rozpiętości 14–20 mm, przezroczyste, leciutko żółto



Ryc. 2. Motyl wysysający nektar kwiatowy. Fot. M. Olszowska.

mgr Maria Olszowska
e-mail marjolsz@interia.pl
emerytowana nauczycielka biologii z Mrągowa

STWIERDZENIE MARTWICY WAPIENNEJ W GMINIE STOPNICA (WOJ. ŚWIĘTOKRZYSKIE)

Martwice wapienne to skały osadowe zbudowane z kalcytu (węglanu wapnia), który wytrąca się z roztworu zazwyczaj w środowisku wód płynących, np. przy źródłach i w korytach cieków. Przyczyną tego wytrącania jest głównie ulatnianie się z wody dwutlenku węgla (niezbędnego składnika wodnych roztworów zawierających węglany), powodowane przez ruch turbulencyjny wody, zmiany ciśnienia cząsteczkowego, zmiany temperatury lub procesy biochemiczne (związane z obecnością roślin lub szczątków roślinnych). Kalcyt, i rzadziej, inne minerały osadzają się na podłożu i przedmiotach znajdujących się w wodzie. Ze względu na czas powstawania martwic moż-

Opisane miejsce tworzenia się martwicy znajduje się w okolicach wsi Skrobaczów (gmina Stopnica), w korycie niewielkiego cieku Skrobaczówka, należącego do zlewni Czarnej Staszowskiej. W korycie Skrobaczówki martwica wapienna obrasta warstewkami o różnej grubości (do około 2 cm) zanurzone w wodzie oraz leżące na dnie przedmioty, takie jak gałęzie i korzenie drzew (Ryc. 1 i 2). Występowanie takich narośli obserwuje się na około 700 metrowym odcinku cieku poniżej wsi Skrobaczów (współrzędne skrajnych punktów odcinka: 50.462923°N; 20.918352°E – 50.464448°N; 20.926848°E). W tym miejscu rzeka jest mocno zacieniona i płynie natural-



30 mm

Ryc. 1. Fragment martwicy wydobytej z dna Skrobaczówki (Fot. M. Bonk).

na je podzielić na kopalne, których przykładem jest tzw. martwica karniowicka, powstała w permie oraz współczesne, których tworzenie się można obserwować np. przy źródle błogosławionego Wincentego Kadłubka w Karwowie koło Opatowa. W Polsce środkowej i północnej wystąpienia martwic są stosunkowo rzadkie. Niniejsza notatka jest wstępną informacją o jednym z takich stanowisk występowania współczesnej martwicy na terenie Niecki Nidziańskiej, w południowej części województwa świętokrzyskiego. Informacje o stanowisku nie były dotąd publikowane poza wzmianką internetową (Małe rzeki – blog przyrodniczy. Maciej Bonk 2015).

nym korytem (Ryc. 3). Poza wskazanym odcinkiem nie stwierdzono martwic podczas punktowych oględzin innych fragmentów cieku (na wysokości zabudowy Skrobaczowa i w miejscowości Prusy). Niemniej nie można wykluczyć punktowego występowania martwic na innych odcinkach Skrobaczówki.

Ze względu na rzadkość występowania martwic w tej części Polski oraz dydaktyczny charakter (możliwość obserwowania współcześnie rozwijających się „żywych” procesów geologicznych) opisane stanowisko powinno zostać objęte ochroną w postaci rezerwatu lub stanowiska dokumentacyjnego.

W kontekście ochrony martwic w okolicach Stopnicy niepokojące są plany Świętokrzyskiego Zarządu

Melioracji i Urzędzeń Wodnych zakładające „udrożnienie” rzeki w celu ochrony położonych przy niej



Ryc. 2. Martwice rozwijające się na dnie Skrobaczówki (Fot. M. Bonk).



Ryc. 3. Ukształtowanie koryta Skrobaczówki w miejscu występowania martwic (Fot. M. Bonk).

miejsowości przed podtopieniami. Takie prace na ogół wiążą się z usuwaniem osadów w rzece, likwidacją elementów spowalniających przepływ (np. rumoszu drzewnego), a często również prostowaniem koryta i umacnianie brzegów. Warto zauważyć, że bezpośrednie otoczenie Skrobaczówki, poza nielicznymi wyjątkami, jest niemal pozbawione zabudowy, a na znacznej długości w bezpośrednim sąsiedztwie rzeki znajdują się łąki, ugory i zadrzewienia, co podważa sens działań przeciwpowodziowych. Natomiast ingerencja w koryto może nie tylko doprowadzić do zniszczenia już istniejących martwic, ale też zmienić warunki fizykochemiczne wody, trwale likwidując możliwość wystąpienia tego interesującego zjawiska. Dlatego należy ewentualne prace hydrotechniczne ograniczyć do absolutnego minimum i prowadzić je tak, aby nie miały one wpływu na parametry przepływu wody i ukształtowanie koryta, nie tylko na odcinku, gdzie stwierdzono powstawanie martwic, ale również w górnych częściach potoku oraz bezpośrednio poniżej przedstawionego stanowiska.

Maciej Bonk

bonk.maciej@gmail.com

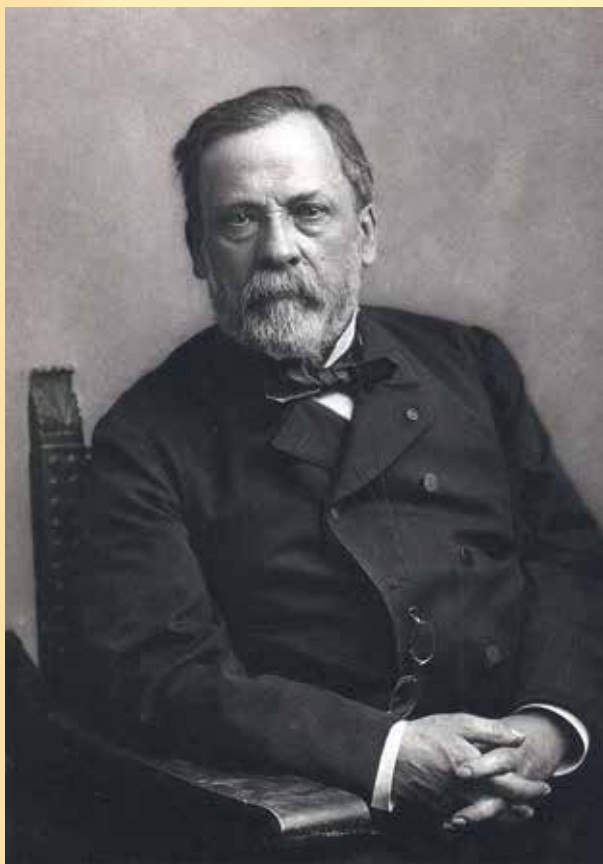
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Wszechświat, tom V, 1886 (Fragmenty)

**PRACE PASTEURA NAD OCHRONNEM
SZCZEPIENIEM WŚCIEKLIZNY**

Opisał Józef Natanson.

Str. 27-30



L. Pasteur. By Nadar - Copied from Portraits from the Dibner Library of the History of Science and Technology (reworked), Domena publiczna, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=886344>

Do doświadczeń w tym kierunku popchnęły Pasteura, o ile z przedstawień, czynionych Akademii nauk wnosić można, nietylko uprzednie próby i doświadczenia nad własnością zarazków karbunkułu (wąglika) i cholery kurzej, ale nadto spostrzeżenia, nieco przypadkowe, nad odpornym zachowaniem się psów niektórych przeciw naturalnie lub sztucznie im udzielanej wściekliznie. Trafiał on niekiedy na psy, które mimo pokąsań lub trepanacyj, ze szczepieniem połączonych, nie dostawały wścieklizny, co wzbudziło podejrzenie w Pasteurze, że przyczyną odporności co do owych szczególnych psów są uprzednie doświadczenia, że zbyt słabymi przedsiębrane zarazkami.

Niewdając się tu w bliższą ocenę rozumowań, które poprowadziły znakomitego badacza na tę drogę, podajemy tylko, na czym się zasadzały

doświadczenia ostatniej, zupełnem powodzeniem zakończonej seryi.

Codziennie przygotowywano i składano do flaszki szczelnej świeżo wyjęty i odpreparowany rdzeń pacierzowy królika, dotkniętego objawami silnej, przez siedem dni tylko utajonej wścieklizny. Kawalek rdzenia, oddawna już przechowywanego, a o którym doświadczenie uczy, że nie jest już zabójczym ani nawet wyraźnie zdrowemu zwierzęciu szkodliwym, wprowadzano na czas krótki do wyjałowionego buljonu (naparu mięsnego) i zastrzykiwano danemu psu pod skórę pełną, strzykawkę Pravaza takiego roztworu. Następnego dnia poddaje się tegoż psa podobnej zupełnie operacji, lecz bierze się już rdzeń mniej dawno preparowany, nie tak stary. Kolejno przechodzi się do coraz świeższych preparatów, aż wreszcie używa się do zastrzykiwań rdzeni zupełnie świeżych, które przed dwoma dniami lub poprzedniego dnia z wściekłego królika wyjętymi dopiero zostały. Pies, który stopniowo przeszedł przez podobny szereg zastrzyków i otrzymał w końcu dawkę z rdzenia jedno lub dwudniowego, zabezpieczonym jest skutecznie przeciw chorobie i niezdolnym do przyjęcia wścieklizny. Nietylko wstrzykiwać mu można beskarne najbardziej zjadliwe jady z psów, śmiertelnie wściekłych, rażonych, lecz nawet trepanacja i wprowadzenie najsilniejszego jadu wprost do mózgowia, nie prowadzą bynajmniej do rozwinięcia się wścieklizny. Pies taki posiada, jak mówi Pasteur, bezwarunkową przeciw tej chorobie odporność.

Jeszcze w Maju 1884 roku zaproponował Pasteur Akademii ustanowienie komisji celem zbadania metody ochronnego szczepienia i zapewnienia odporności psom. Lecz metoda, wówczas znacznie dłuższa i zmudniejsza od tej, jak opisana powyżej w krótkim naszkicowaniu, nie była jeszcze dostatecznie wypróbowaną; zdarzało się więc, że na dwadzieścia operowanych dla sprawdzenia psów, zamierzona do osiągnięcia odporność na czterech lub pięciu zawodziła. Dopiero w ciągu roku 1885 zdołał Pasteur otrzymać czyste i dobre preparaty z rdzeni króliczych i obecnie, według własnych jego słów przynajmniej, metoda jest niezawodną i niewzruszoną.

Metoda ta stosowaną była z powodzeniem nie tylko u psów zdrowych jako środek zabezpieczenia przeciw chorobie, ale i u psów pokąsanych, u których wstrzykiwanie stopniowo coraz to silniejszych jadów z rdzenia króliczego, sprowadzało błogie skutki i zapobiegało przyjęciu się choroby, wszczepionej przez pokąsanie.

Gdy już tak daleko posuniętemi były doświadczenia nad ochronnym zabezpieczeniem psów od wodowstrętu, nadarzyła się Pasteurowi niebawem sposobność do wykonania prób szczepienia nad pokąsanymi ludźmi, którzy się do niego o pomoc zwrócili. Pierwszym, przez Pasteura do leczenia przyjętym człowiekiem, był dziewięcioletni Józef Meister z Alzacyi, który pokąsanym będąc przez mocno wściekłego psa w dniu 4 Lipca r. z., rano, opatrzony na miejscu przez lekarzy po upływie godzin 12-tu od chwili ukąszenia, przywiezionym został do pracowni Pasteura w dniu 6 Lipca z licznymi na ciele (14-tu) ranami. Jak zeznawała matka dziecka, pies rzucił je na ziemię, gdy zaś zdolano je z pod zwierzęcia wydobyć, ciało pokrytem było pianą, i broczyło we krwi. Wieczorem, w dniu 6 Lipca, chorego Meistera oglądali łącznie z Pasteurem słynni klinicyści jak dr Vulpian i Grancher; przy oględzinach tych skonstatowano stopień pokąsania dziecka i uznano rodzaj zadanych ran jako też wścieklizny psa, który pokąsał, za tak niebezpieczne, że Pasteur, biorąc pod uwagę prawdopodobną śmierć chłopaczka, zdecydował się przystąpić nad tem biednym dzieckiem do prób w tym samym kierunku, w jakim poprzednio z powodzeniem wykonywał wielokrotne doświadczenia i próby na psach, tak zdrowych jak i pokąsanych.

lemu Meisterowi podskórnie niewielką stosunkowo ilość (bo połowę pryskawki Pravaza), buljonu, zaprawionego wysuszonym rdzeniem króliczym, który w dniu 21 Czerwca, a więc przed 15 dniami został odpreparowany z rażąco mocną, wścieklizną, królika. Następnie, do dnia 16 powtarzano zastrzykiwania z coraz mocniejszymi preparatami zarazkowemi, najpierw po dwa razy dziennie, później raz na dobę, przechodząc od piętnastodniowych rdzeni do świeżych, w przeddzień dopiero wydobytych.

Razem w dziesięciu dniach dokonano trzynastu zastrzyknięć, po pół Pravazowskiej pryskawki za każdym razem. Za każdą operacją zastrzykiwania, z każdego preparatu, jakiego użyto, wstrzykiwano jednocześnie odpowiednią porcją królikom, celem kontroli i należytego przeświadczenia się, czy zastrzyknięty chłopcu płyn był i do jakiego stopnia mianowicie był zjadliwym, wzbudzającym wściekliznę. W ciągu pierwszych pięciu dni preparaty były nieszkodliwe, bo króliki pozostawały zdrowemi; następnie jednak króliki, brane do porównawczych doświadczeń, ulegały wodowstrętowi, a widocznie zjadliwość wstrzykiwanych płynów zwiększała się ciągle, gdyż objawy wścieklizny w królikach, kolejno do kontroli służących, w coraz krótszych terminach występowały.

Następująca tabliczka, według kalendarza doswiadczeń ułożona wykaże najlepiej rezultaty:

Lipiec	6 wiecz.	o godz.	6-ój	rdzeń z d.	21 Czerwca,	15-todniowy;	królik chorobie nie uległ
"	7 rano	"	9-ój	"	"	14-to	"
"	7 wiecz.	"	6-ój	"	"	12-to	"
"	8 rano	"	9-ój	"	"	11-to	"
"	8 wiecz.	"	6-ój	"	"	9-cio	"
"	9 o 11-ój	rano	"	"	1 Lipca	8-mio	"
"	10	"	"	"	3	7-mio	"
"	11	"	"	"	5	6-cio	królik zapadł na wściekliznę po 15 dniach
"	12	"	"	"	7	5-cio	" 8 "
"	13	"	"	"	9	4-ro	" 8 "
"	14	"	"	"	11	3-	" 8 "
"	15	"	"	"	13	2-	" 7 "
"	16	"	"	"	15	1-	" 7 "

Szóstego Lipca tedy, wieczorem o 8-ój, po sześćdziesięciu godzinach od ukąszenia, zastrzyknięto ma-

Wszystkie te wstrzyknięcia przetrzymał Józef Meister znakomicie, bez żadnych oznak wścieklizny,

czyto w czasie doświadczeń, czy też później, w ciągu najbliższych miesięcy (do d. 26 Października r. z.). Nietylko więc nie wystąpiła wcale choroba, udzielona mu według wszelkich uzasadnionych przypuszczeń przez pokąsanie pierwotne z d. 4 Lipca, lecz nadto zniósł on beskarnie, silne i mocno zjadliwe preparaty sztucznej wścieklizny, które u królika wznicały najsilniejszą, już po siedmiu dniach ujawniającą się, chorobę, a które Pasteur uważa z tego powodu za bardziej zjadliwe od naturalnego, przez pokąsanie psa wściekłego wszczepionego wodowstrętu. Według twierdzeń Pasteura, Meister, skoro przeniósł bez uszczerbku dla siebie wstrzykiwania kolejno coraz zjadliwszych, aż do najmocniejszych jadów wścieklizny, może stawiać czoło wszelkiej - bez względu na ilość i na jakość - wściekłości.

Na tej odosobnionej próbie z dziewięcioletnim chłopcem, który zwycięsko wyszedł z podwójnego, bo naturalnego i sztucznego niebezpieczeństwa wścieklizny, ograniczają się dotąd fakty naukowe z dziedziny leczenia wścieklizny u ludzi, o ile one do publicznej wiadomości przez uczonego członka Akademii Paryskiej podaniemi dotychczas zostały. Według dziennikarskich wiadomości, posiada Pasteur obecnie bardzo znaczną liczbę pokąsanych i leczących się w jego pracowni ludzi. Faktów tych jednak bez zastrzeżeń przyjmować niepodobna; w każdym zaś razie nic zupełnie wiarogodnego ponad powyższe, Józefa Meisnera dotyczące dane, niewiadomo.

Jeśli zaś krytycznie zastanowić się zechcemy nad doniosłością doświadczeń, takim uwieńczonych powodzeniem, lecz odosobnionych jeszcze i – zastrzedz należy – bynajmniej nie zamkniętych, to rozmaite nasuwają się tu wątpliwości i możliwe zarzuty. Nietylko bowiem faktem jest, że u niebezpiecznie pokąsanych ludzi wścieklizna – bez wszelkich środków ratunkowych nawet – niekiedy się nie przyjmuje i nie rozwija, nietylko możliwość podobnego wypadku może być przypuszczoną i dla sztucznej, dla królika nawet bezwzględnie zabójczej zaraz wodowstrętowej, lecz nadto, okres utajenia przy wściekłości u ludzi może być niekiedy niesłychanie długim; lata całe trwać może. Zawczasie przeto wyrokować ostatecznie i przesądzać, że młody Józef Meister jest uratowany. Dziś powiedzieć tylko możemy, że ogromne jest prawdopodobieństwo wygranej, że więc według wszelkiego prawdopodobieństwa i inni ludzie, traktowani w wypadku pokąsania w ten sam sposób, jak wyżej opisany, zostaną wyleczonymi i – co więcej – skutecznie przed wścieklizną zabezpieczonymi. O ile prawdą jest, że

za młodym Meisterem tłum cały znalazł się naśladowców, wkrótce zapewne wiadomem będzie, o ile wyniki Pasteurowskiej metody noszą charakter niewątpliwy i najbardziej ogólny. Należy mieć wszakże nadzieję, że w pierwszym swym pacjencie, Pasteur nie natrafił właśnie na wyjątek.

Jakkolwiek zresztą rzecz się ma z dalszą praktyką i z zastosowaniem zabezpieczającego szczepienia większej liczbie pokąsanych przez psy wściekle ludzi, niewątpliwem jest i wielce dla postępu nauki ważnem, że zachęcony przez powodzenie nieustrudzony Pasteur pracuje w dalszym ciągu nad zgłębieniem przyczyny wywołującej stopniowe słabnięcie przechowywanych w odosobnieniu, zarażonych mózgów. Jak się zdaje, przyczyną stopniowej utraty zjadliwości jest nie jakościowa zmiana w zaraźliwej istocie choroby, bądź też występowania fizjologicznych przemian i wpływów, tamujących pomyślny rozwój owęj specyficznej istoty chorobowej. Dziś zawczasie jeszcze wdawać się w rozbiór następujących się co do tego przypuszczeń. W ostatniem swem sprawozdaniu obiecał Pasteur Akademii nauk szczegółowe w tym kierunku badania i należy czekać, do jakiego rezultatu przyjdzie ten uczony, w tej tak ważnej kwestyi, t. j. we względzie słabnięcia zjadliwości organizowanych zarazków, które w najściślejszym pozostawać się zdają związku z kwestyją ochronnego szczepienia chorób zaraźliwych.

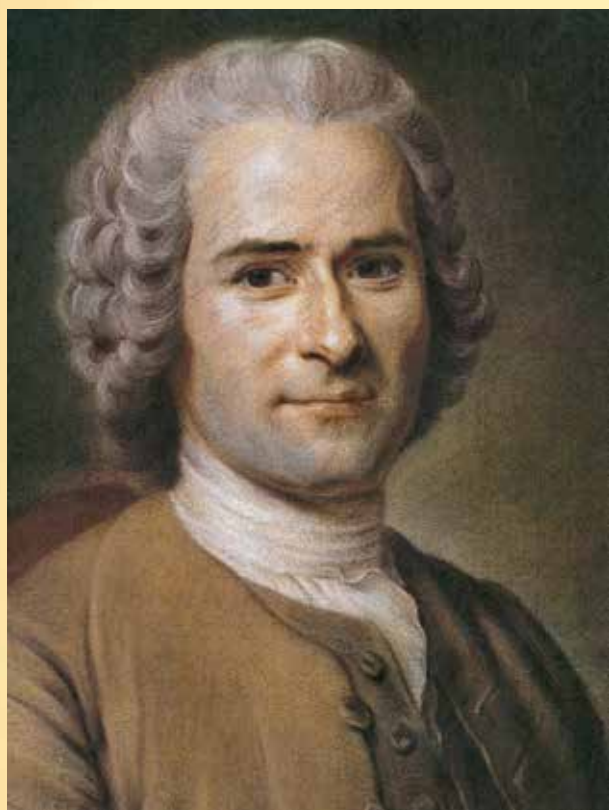
(Mikrografia) (str. 63)

- Badania nad zarazkiem wścieklizny. W N-rze pierwszym naszego pisma z r. b. zaznaczyliśmy, mówiąc o pracach Pasteura nad wodowstrętem, że zarazek wścieklizny nie jest znanym i że podejrzewa za ledwie Pasteur obecność jego w postaci drobniutkich ziarenek, punkcików. Zaznaczyliśmy zarazem, że uczony ten nie używał w tych jak i w innych swoich badaniach metod barwienia. Otóż na posiedzeniu Akademii Paryskiej z dnia 14 Grudnia r. z. zakomunikowaną została zajmująca notatka prof. Hermana Fola z uniwersytetu w Genewie, oznajmiająca uczonemu światu ciekawy rezultat zastosowania środków barwiących do odpowiednio stwardniałych (macerowanych w dwuchromianie potasu i siarczanie miedzi) mózgów ze zwierząt tkniętych wścieklizną. Prof. Fol stosował metodę Weigerta, barwiąc preparaty hemoksyliną, a odbarwiając je w alkoholu absolutnym. Skrawki otrzymywane zapomocą mikrotomu brane były pod rozpatrzenie tylko wtedy, gdy nie przechodziły poza 1/200 milimetra (=5μ czyli mikrametrów) na

grubość. Na takich preparatach widać tkankę nerwową, zabarwioną na kolor ciemno niebieski, gdy otoczką (pochewką Schwana) jest wyraźnie żółta (chamois), a między temi odmiennie zabarwionemi składnikami normalnemi widnieją szczególnie jakby punkciki, drobne okrągłe ziarenka, niesłychanie nikłe, bo zaledwie 0,2 μ (1/2000 milimetra) mające, zabarwione na kolor ciemno fioletowy i rozrzucone bądź grupami, bądź paciorkowato wśród komórek nerwowych. Przy takiej nikłości drobnych tych kuleczek, przedstawiających się jako najminimalniejsze mikrokoki, trzeba użyć szkieł powiększających więcej niż 600 razy (linijnie), aby obecność tych skupień ziarnistych móz dostrzedz. Na mózgach normalnych t. j. ze zwierząt zdrowych, nie zdolano dopatrzeć takich ziarn fioletowych w żadnym wypadku, bez względu na tożsamość postępowania.

JAN JAKÓB ROUSSEAU JAKO BOTANIK¹ (str. 123–126)

Streścił St-Dawid.



J.J. Rousseau. By Maurice Quentin de La Tour - nieznany, Domena publiczna, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24158>

Pod takim tytułem A. Jansen wydał w Berlinie obszerne dzieło z treścią którego pragniemy zapoznać czytelników Wszechświata.

¹ A. Jansen. Jean Jaccjues Rousseau ais Botaniker, &°, str. 308, Berlin, 1885.

Autor drobiazgowo zaznajamia nas z pierwszymi krokami filozofa genewskiego w studyjach botanicznych, z dalszem kształceniem się w tej gałęzi wiedzy i samodzielnem dopełnianiem nabytych wiadomości i ostatecznie przychodzi do wniosku, że Rousseau w zajmowaniu się światem roślinnym nie-tylko znajdował pociechę w nieszczęściu, lecz zarazem badaniami swemi wywarł stały wpływ na postępy dalsze wiedzy botanicznej. Zawartość dzieła podzieloną została na trzy księgi, z których pierwsza zatytułowana: „Filozof i poeta”. Pierwszy rozdział tej księgi przedstawia zarys rozwoju botaniki w wiekach średnich i czasach nowszych aż do Linneusza, po większej części we własnych słowach Rousseau, z których poznajemy jego wstręt ku zabijającej ducha sztuce ówczesnego oznaczania roślin i ku traktowaniu roślin tylko ze względu na ich „własności” (Tugenden); z tychże słów spoziera na nas genijusz jego szukający i znajdujący w botanice coś wznioślejszego. Rousseau zarzuca francuzom szczególnież przezenianie Tourneforta i pogardzanie wielce uwielbianym przez niego Bauchinem. Jako prawdziwe przeciwieństwo między ideałem i rzeczywistością w roz. 2 mamy przedstawioną działalność młodego poety w laboratorium aptecznem pani Warens; tamto Rousseau nie tylko powziął wstręt do handlu tajemniczymi środkami i tak zwanymi trawami leczniczymi, ale raz na zawsze stracił chęć do studyjowania medycyny. Ucieklszy stamtąd mógł już na swój sposób badać i studyjować naturę, o czem mowa w roz. 3. W ścisłym związku ze studyjami botanicznymi Rousseau znajduje się jego poczucie piękna natury wogóle, które w nim osiągnęło nadzwyczajną siłę i z którym przede wszystkim zwracał się ku swęj ojczyźnie.

Mamy to przedstawione w jaskrawych barwach, poczęści znowu jego własnemi słowami, w roz. 4, który zarazem zaznajamia nas z poglądami Rousseau na sztukę ogrodniczą, bezpośrednio wypływającą z jego poczucia piękna natury. Pod jego to wpływem sztuka ogrodnicza w rozwoju swoim weszła na zupełnie nowe tory. Księga druga nosi tytuł: „Badacz”. Dotychczas był on botanikiem, jakim być może malarz i poeta, nieświadomy atoli ani metod ani celów naukowego poznawania i badania. Poznania tajników rzeczywistej botaniki zawdzięczał Rousseau doktorowi z Neuchâtel Janowi Antoniemu d’Ivernois. Przykrości jakich doznał od ludzi, zbliżyły go coraz więcej z ulubionemi roślinami i rośliny stanowiły prawie wyłączny przedmiot jego rozrywek i korespondencyj; według sił swoich przedsiębrał wycieczki i studyjował dzieła botaniczne.

Pomimo wielkiego uwielbienia dla Buffona pozostał wiernym i Linneuszowi. Nowego nauczyciela na miejsce zmarłego d'Ivernoi znalazł w Neuhazie, lekarzu w Neuchâtel.

Podobnie węzły łączyły go z Dupeyron (w tem-że mieście) roz. 1. Przedewszystkiem oczywiście studyja jego tyczyły się flory szwajcarskiej; florę wyspy Saint-Pierre, gdzie długi czas przebywał, chciał opisać ze swego punktu zapatrywania na naturę, tak, aby „ani jedno ździebelko i ani jeden atom roślinny nie pozostał bez analizy i dokładnego opisanie”. Tymczasem zmuszony był schronić się do Strasburga, skąd wkrótce udał się do Anglii (roz. 2). Tutaj poza światem roślin nic go nie obchodziło. „Odkryć jedną tylko nową roślinkę było dla Rousseau sto razy przyjemniej, niż w ciągu lat pięćdziesięciu pouczać rodzaj ludzki”. Należy tu wspomnieć o jego listownej zażyłości z lordem Granville i księżną Portland, jakoteż, że począł więcej zwracać uwagi i na rośliny skrytokwiatowe (roz. 3). Ponieważ urojone prześladowanie wyгнаło go znowu z Anglii, znalazł natychmiast gościnność w zamku Trye księcia Conti. Tutaj porównywał on florę północno-zachodniej Francji z florą Anglii, zwrócił jednakże swoje pragnienie wiedzy i na rośliny poza europejskie. Gdy i tu życie mu się sprzykrzyło, przedsięwziął „pielgrzymkę botaniczną”, która miała się ciągnąć całe dwa lata (roz. 4). W Lyonie zabrał znajomość z de la Tourette i Abbé Rozier; w Grenoble również znalazł pomoc w poznaniu flory miejscowej, z liczby botaników, z którymi pozostawał w stosunkach, należy jeszcze wspomnieć: dr Clappier w Grenoble, Gonau w Montpellier i Gagnebin w La Ferrière. Zielnik Rousseau i biblioteka z czasem doszły do znacznych rozmiarów. Z licznych wycieczek szczególnie wspaniale opisał jedną na górę Pila. Po powtórnym pobycie w Lyonie udał się Rousseau do Paryża, gdzie miał sposobność osobiście poznać się z wielkim Buffonem (Soz. 5). Tu, w Paryżu, studyjował w Jardin des plantes i zebrał sobie kolekcję nasion. Wszedł w stosunki zażyłe z Bernardem de Jussieu, a później także z jego synowcem Antonim i odbywał z nimi kilka ekskursyj. Jego czciciel Bernardin de Saint-Pierre, który naówczas powrócił ze swojej podróży, miał tutaj sposobność w ciągu lat sześciu cieszyć się towarzystwem swego mistrza (roz. 6). W księdze 3 zatytułowanej „Nauczyciel” znajdujemy ogólne streszczenie jego prac w dziedzinie botaniki. „Botanik”, powiada Rousseau, „poznaje w roślinach ich kształty zewnętrzne, ich wewnętrzną organizację, ich życie i śmierć.” Co do pierwszego punktu,

to pojmuję on roślinę jako twór natury, obdarzony życiem i składający się z dwu głównych części, korzenia i łodygi nadziemnej. W anatomii wogóle był wyznawcą Malpighiego. W dziedzinie fizjologii, chociaż zdołał uniknąć niektórych błędów, mniemał atoli, że liście podczas nocy pochłaniają z powietrza znajdującą się w niem wilgoć i w ciągu dnia przyspieszają transpirację. Wspólnie z Mariottem przyjmował, że rośliny pochłaniają z gruntu ziemię, sole i tłuszcze (?) nie bezpośrednio, ale dopiero po wykonaniu pewnego procesu chemicznego i z Hallerem, że przeważająca część substancji roślinnej pochodzi z atmosfery. Jego definicja kwiatu długi czas znajdowała pochwałę u fachowych uczonych, pod kwiatem bowiem pojmował przejściowe tylko stadyjum części wytwarzających owoc (Fructificationstheile) podczas zapładniania. Przez analogiją więc i u skrytokwiatowych należało przyjmować organy owocowe, chociażby te zewnętrznie nie mogły być zauważone. W stosunku oddzielnych części i funkcji kwiatu posiadał Rousseau jasny pogląd. Definicja owocu przedstawiała dlań pewne trudności; pouczał on, że „słowo owoc używa się w botanice dla oznaczenia zbiorowej fabryki nasienia, dla oznaczenia wszystkiego, co z kwiatu powstaje wskutek zapłodnienia zalążka.” Chociaż takie rozumienie rzeczy było dość ścisłe, jednakowoż suche szczeniaki (Schliessfrüchte, np. ziarno, orzech) rozpatrywał jako nasiona. Objaśnienia zjawisk dynamicznych, zachodzących w roślinach, śledził z ciekawością. Sam wiele obserwował, w przyjmowaniu jednakże przypuszczeń innych badaczy był bardzo oględny.

Również wystrzegał się przypisywać roślinom czucie. Chociaż z przekonania wewnętrznego skłaniał się ku tak zwaną klasyfikacji naturalnej, był atoli zwolennikiem systemu Linneuszowego, ponieważ „naturalnego systemu wogóle niema i najlepszym zawsze będzie ten, który opiera się na najważniejszych cechach, najbardziej stałych i najłatwiej poddających się badaniu.” Tym warunkom odpowiadał system Linneusza. W słowach, że „wzajemny stosunek wszystkich jestestw opieramy li tylko na historii ich rozwoju,” czuć, jak powiada Jansen, po raz pierwszy zupełnie jasno sformułowaną zasadę badania i filozofii natury w kierunku Darwina (roz. 1). Przy całym poważaniu dla Linneusza, jakie widać z jego korespondencji z tym ostatnim, pojmował jednakże Rousseau, że daleko ważniejszą jest rzeczą „poznawanie” roślin niż ich znajomość. Wskutek tego zwrócił się ku Malpighiemu i Grew i zasiadł do odrzuconego przez Linneusza mikroskopu.

Konstrukcja tego instrumentu była atoli naówczas tak niedogodną, że człowiek chcący go używać, jak powiada Rousseau, powinienby mieć właściwie trzy a nie dwie ręce.

Naówczas zupełnie brakowało w literaturze pedagogicznej elementarnego podręcznika botaniki. Do napisania podobnej książki daremnie próbował Rousseau namówić Clappiera, Gonau i de la Tourettea, aż ostatecznie sam przedsięwziął podobną pracę. Zamiarem jego było tylko dać wskazówki do nauczania botaniki pani Delessert w Lyonie, dla jej córki; napisał więc do niej 8 listów, lecz te stanowią zwięzłą i niewielką całość, która przedstawia pierwszy wzorowy podręcznik botaniki dla młodzieży i dla samodzielnego kształcenia się; ograniczył się Rousseau roślinami tylko miejscowemu O zbieraniu ich daje wskazówki w listach do p. Malesherbes. Projektował również, jako środek pomocniczy i pozyskujący botanice przyjaciół, układanie zielników na sprzedaż. Jego Dictionnaire botanique, który chciał początkowo opracować na wspólnie z Dupeyron, a potem wziął się do niego sam jeden, pozostał niestety nieskończony. W słowniku tym stworzył on zupełną nomenklaturę botaniczną francuską na wzór łacińskiej. W roku 1776 (75?) sprzedał Rousseau swoją bibliotekę botaniczną, zielnik i kolekcję nasion anglikowi Malthus; nie przestał jednakże zbierać dalej i już po upływie dziesięciu miesięcy był w posiadaniu bogatego zielnika, który, zaopatrzony cennymi uwagami na marginesach, znajduje się obecnie w berlińskim muzeum botanicznym. I studyjowanie książek przedsięwziął nanowo. Naówczas wydaną została „Botanika dla wszystkich” napisana przez pana i panią Regnault; była to książka, której „trzy czwarte części wypełnione były opisami różnych napojów i plastrów”. W uwagach marginesowych, w jakie zaopatrzył dostarczony mu egzemplarz „Botaniki dla wszystkich”, wylał Rousseau całą swoją ironię nad nieuctwem i przesądami, jakie onego czasu panowały we Francji w dziedzinie botaniki i tem samem zostawił świadectwo, o ile w tym względzie wyprzedził wszystkich swoich współczesnych. Uwagi te potem zebrane zostały w dziełku p. t. Notes sur la Botanique de Regnault. Wspomniane tu pisma botaniczne Rousseau wydane zostały dopiero po jego śmierci.

Od r. 1781 nietylko we Francji, ale nawet i za granicą pozyskały sobie szerokie koło czytelników we wszystkich sferach szczególnie jego „Lettres élémentaires”. Wywołały one reformę w metodach szkolnego nauczania, a dotyczyło to niemniej

i nauk przyrodniczych, chociaż o botanice wspomina w nich dopiero pod koniec. Wzbudziło się ogólne zainteresowanie botaniką i uczeni wiele zawdzięczać muszą Rousseau w tej gałęzi wiedzy, na dowód czego znajdujemy liczne cytaty w ostatnim rozdziale dzieła Jansena.

ROLA FIZYJOLOGICZNA LIPOCHROMU w państwie zwierzęcem (str. 90-92 oraz 107-108) przez Rozalię Silberstein.

Wielka ilość przedstawicieli państwa roślinnego i zwierzęcego zawdzięcza ubarwienie swoje ciałom organicznym, należącym do barwnikowej grupy t. zw. lipochromów. Badanie ciał tych bardzo wiele przyczyniło się do wyjaśnienia niektórych zawiłych kwestyj, dotyczących ubarwienia organizmów. Ciała te, mogą być barwy czerwonej, pomarańczowej, żółtej lub zielonożółtej, składają się z węgla, wodoru i tlenu, powstają zaś w wielu razach prawdopodobnie z substancji tłuszczowych, w innych znów wypadkach tworzą się z barwników, niemających z lipochromami żadnego bezpośredniego związku. Te ostatnie posiadają kilka charakterystycznych własności, a mianowicie z mocnym kwasem siarczanym lub azotnym dają w stanie suchym niebieskie zabarwienie, pod działaniem światła tracą, właściwą im barwę, a będąc utleniane, rośnią się i dają ciała podobne do cholesteryny². Jeszcze w r. 1858 profesor Bogdanoff opisał jeden z takich lipochromów, koloru czerwonego, znaleziony w piórach niektórych ptaków i przewany zoonerytrynem. Bogdanoff podał wtedy niektóre szczegóły, dotyczące się rozpuszczalności barwnika; znanem mu również było działanie nań światła, o reakcji jednak z kwasem siarczanym nic nie wspomina. W kilkanaście lat później dr Wurm znalazł również u ptaków barwnik, opisany przezeń jako ciało dotychczas nieznanne, które jednak okazało się identycznym z zoonerytrynem.

Wurm skonstatował, że ciało w mowie będące, rozpuszcza się, jakkolwiek z wielką trudnością we wrzącej wodzie, w zimnej zaś zupełnie jest nierozpuszczalne; nakoniec Liebig dorzucił jeszcze fakt rozpuszczalności w alkoholu, eterze i siarku węgla. Opisany tutaj barwnik nie przedstawiał w sobie jednak nic osobliwego, dopóki znajdowano go tylko

² Cholesteryna jest to ciało organiczne, bezazotowe, składające się z węgla, wodoru i tlenu; znajduje się ono w żółci, ciałkach krwi, substancji nerwowej. Nowsze poszukiwania stwierdziły także obecność jej u niektórych roślin.

u jednego typu zwierząt, a mianowicie u ptaków; dopiero gdy Krukenberg odkrył go także u gąbek i do znanych już poprzednio faktów dodał jeszcze jeden nowy, bardzo ważny, tyżący się mianowicie chciwego pochłaniania tlenu, wtedy czerwony lipochrom zwrócił na siebie większą, uwagę zoologów i zjawiła się nawet hipoteza, starająca się objaśnić fizjologiczną rolę, jaką, barwnik ten odgrywa w organizmie zwierzęcym; hipoteza ta, obmyślona przez prof. Mereżkowskiego (1883), ma za sobą, jak to zobaczymy, argumenty bardzo przekonującej natury.

Dziwnym i niewytłumaczonym był fakt, że czerwony lipochrom znajdował się tylko u dwu, tak daleko od siebie stojących grup, jak gąbki i ptaki; trudno było przypuścić, aby wspomniany barwnik, obficie znajdujący u gąbek, zatraciwszy się najzupełniej we wszystkich następnych grupach zwierzęcych, pojawił się znów aż dopiero u ptaków. Jeżeli bowiem te ostatnie odziedziczyły barwnik po tak odległych przodkach, jakimi dla nich są gąbki, to dla czegożby pośrednie ogniwa tego pokrewieństwa nie mogły także posiadać odziedziczonej cechy? I rzeczywiście przedsięwzięte w tym kierunku poszukiwania zostały uwieńczone bardzo pomyślnym rezultatem, okazało się bowiem, że czerwony lipochrom, maskowany wprawdzie tu i owdzie przez inne barwniki, znajduje się u wszystkich prawie zwierząt bezkręgowych, z wyjątkiem, być może, pierwotniaków: że występuje on wprawdzie w kilku odmianach, lecz nieróżniących się od siebie tak własnościami chemicznymi jak i warunkami znajdowania w organizmie zwierzęcym. Czerwony lipochrom, będąc wystawiony na działanie światła, traci barwę swoją daleko szybciej, w przestrzeni napełnionej powietrzem, aniżeli bez udziału tegoż; przypisać to należy obecności lub brakowi tlenu, który działa rozkładająco. Ta ostatnia okoliczność, wraz ze wspomnianym wyżej faktem chciwego łączenia się lipochromu z tlenem, również jak i obfite znajdowanie się tego barwnika u zwierząt niższych, naprowadziło na myśl, że czerwony lipochrom odgrywa takąż samą fizjologiczną rolę w organizmie zwierząt bezkręgowych, jak hemoglobina u kręgowców. Wiadomo, że najgłówniejsza rola hemoglobiny, substancji barwnikowej, której ciałka krwi zawdzięczają swój czerwony kolor, polega na tem, że materyja ta pochłania tlen wprowadzony do organizmu zapomocą oddychania i że roznosi gaz ten do organów i tkanek, gdzie odbywa się spalanie, przyczem hemoglobina pozbywa się tlenu, do tego ostatniego procesu niezbędnego. Każda więc

żyjąca tkanka zaopatrywana jest w tlen skutkiem krążenia czerwonych ciałek krwi po całym organizmie. Czerwony zaś lipochrom nie krąży po ciele, lecz jest bardziej zlokalizowany, a jeżeli ma rzeczywiście odgrywać tę samą, co hemoglobina rolę, czyli pochłaniać tlen, powinien tedy znajdować się w tych organach, gdzie przeważnie ma miejsce nagromadzanie się tlenu. W samej rzeczy, u bardzo wielu zwierząt bezkręgowych u których oddychanie przez skórę silnie jest rozwinięte, czerwony lipochrom znajduje się prawie wyłącznie w zewnętrznej, skórnej warstwie ciała, znaleźć go zaś można bardziej na wewnątrz u tych zwierząt, u których woda, wraz z zawartym w niej tlenem przenika bardziej w głąb organizmu, jak to np. ma miejsce u gąbek. U tych zaś zwierząt, u których proces oddychania staje się funkcją głównie pewnego specjalnego organu, czerwony lipochrom znajduje się przeważnie w tymże organie. I tak robaki, żyjące w rurek przymocowanych (Sedentaria) i oddychające głównie wystającymi z tychże rurek skrzelami, posiadają organy te zabarwione przez lipochrom na mocno czerwony lub pomarańczowy kolor. Zabarwienie takie napotkać można również w skrzekach mięczaków, jakoteż niektórych szkarłupni.

Z doświadczeń p. Berta wynika, że ze wszystkich tkanek mięśniowa, nawet będąc w stanie spoczynku, pochłania największą ilość tlenu³, należy więc oczekiwać, że jeżeli wogóle tkanki posiadają jakieś przystosowanie, ułatwiające im pochłanianie tego gazu ze krwi i otaczających organów, to przedewszystkiem powinna je posiadać tkanka mięśniowa. Wistocie mięśnie kręgowców również jak i niektórych bezkręgowych zawierają hemoglobinę, mającą wielkie do tlenu powinowactwo; tę ostatnią własność posiada także, jak widzieliśmy, czerwony lipochrom, a że barwnik ten znaleziono w mięśniach niektórych Szkarłupni, Mięczaków, a także u jednego gatunku ryby, z całą też słusznością przypuścić można, że spełnia on tutaj tę samą względem mięśni funkcję, co hemoglobina w mięśniach innych zwierząt. Po tkance mięśniowej, nerwowa pochłania największą ilość tlenu: znajdujemy też tutaj to samo co w mięśniach przystosowanie; i tak, niektóre robaki posiadają w swych węzłach nerwowych hemoglobinę, u innych zaś zwierząt, należących do typu Mięczaków, znaleziono w tychże węzłach czerwony lipochrom.

³ P. Bert. Leçons sur la physiologie comparee de la respiration. Paris. 1870, p. 46.

(Dokończenie)

Widzimy więc, że powyżej przytoczone dowody na poparcie hipotezy o roli, jaką posiada czerwony lipochrom w organizmie zwierzęcym, oparte są na znajdowaniu się tego barwnika głównie w niektórych organach lub tkankach. Istnieje atoli inna jeszcze kategoria faktów, hipotezę tę potwierdzających, tyjących się mianowicie znajdowania czerwonego lipochromu w całym państwie zwierzęcym. Znajduje się on przeważnie, prawie wyłącznie u bezkręgowców, które znów rzadko bardzo posiadają hemoglobinę, tak, że zwierzęta bezkręgowce, tę ostatnią posiadające, stanowią nieznaczny zaledwie procent w porównaniu z temi, które jej są pozbawione; kręgowce zaś naodwrot, bogato są zaopatrzone w hemoglobinę, drugi zaś wspomniany barwnik daleko rzadziej spotkać u nich można, przyczem znaleziono go dotychczas u ryb, gadów, poczęści tylko u ptaków, u ssących zaś dotychczas go nie wykryto. Widzimy więc, że hemoglobina i czerwony lipochrom wyłączają się wzajemnie, tam gdzie pierwsza istnieje, drugi jest nieobecny i naodwrot. Ze stanowiska w mowie będącej hipotezy, fakt ten łatwo wytłumaczyć się daje; jeżeli bowiem obadwa barwniki posiadają jedne i tę samą fizjologiczną funkcję, to jest pochłanianie tlenu, to obecność jednego z nich, jeżeli tylko w dostatecznej znajduje się ilości i odpowiednich warunkach, wystarcza, ażeby organizmowi zapewnić spełnianie tej funkcji. Jeżeli zaś obadwa barwniki znajdują się jednocześnie w jakimś organizmie, to przypuścić należy, że zapotrzebowanie tlenu jest tutaj bardzo znaczne i że sama hemoglobina, lub też sam czerwony lipochrom, znajdujące się w pewnej tylko ilości i przytem będące w pewnych określonych warunkach, podolać nie mogą temu zapotrzebowaniu i że dany organizm wymaga wspólnego, połączonego działania dwu tych barwników. Tak np. u ryb znajdujemy jednocześnie hemoglobinę i czerwony lipochrom; lecz zwierzęta te, wykonywające wiele silnych, energicznych i ciągłych ruchów, potrzebują wielkiego zapasu tlenu; gaz ten wprawdzie dostarczany bywa rozmaitym tkankom zapomocą krążenia krwi, ilość jednak tej ostatniej jest zbyt małą, ażeby czyniła zadosyć wszystkim zapotrzebowaniom organizmu. W samej rzeczy z badań niektórych uczonych wynika, że ryby posiadają stosunkowo od 5-7 razy mniej krwi, aniżeli płazy i gady i od 8-12 razy mniej, aniżeli zwierzęta ssące; oprócz tego rybia krew w porównaniu z krwią innych kręgowców, jest bardziej wodnista, zawiera więc mniej

hemoglobiny, a zatem mniej może dostarczyć tlenu. Wynika z tego, że oddychanie ryb zapomocą hemoglobiny jest nie wystarczającym i że pewna jeszcze ilość tlenu wprowadzoną zostaje do organizmu ich skutkiem oddychania skórniego, umożliwionego przez obecność w zewnętrznej warstwie skóry czerwonego lipochromu, mającego wielkie do tlenu powinowactwo. Trudnię nieco objaśnić znajdowanie się czerwonego lipochromu u ptaków, bogato zaopatrzonych w hemoglobinę; napotyka się go u istot tych głównie w ich piórach, a znaczenie jego tutaj dotychczas jest niewyjaśnione. Być bardzo może, że czerwony lipochrom jest u ptaków pozostałością szczątkową, odziedziczoną po przodkach, której dobór płciowy nadał inną rolę w organizmie i wytworzył z niej środek upiększenia. Ze stanowiska omawianej tu przez nas hipotezy wielkie znaczenie posiada fakt, że w całej klasie owadów nie znaleziono ani jednego gatunku, któryby posiadał czerwony lipochrom; jeżeli bowiem barwnik ten rzeczywiście służy do oddychania przez pochłanianie tlenu, jest on w takim razie zupełnie niepotrzebny owadom, posiadającym bardzo rozwinięty system rurek oddechowych, czyli tak zwanych trachei, rozgałęzienia których stają się coraz cieńsze i przenikają do wszystkich organów, przynosząc wszędzie potrzebny tlen. Oddychanie zatem skórne, które nawiasowo mówiąc, utrudnionemby jeszcze było u owadów przez zewnętrzną warstwę chityny, pokrywającą ciało ich, jest tu zbyteczne i dlatego też nie znajdujemy tutaj czerwonego lipochromu, będącego według hipotezy, głównym czynnikiem takiegoż oddychania. W końcu przytoczymy jeszcze jeden bardzo ciekawy fakt, przemawiający na korzyść hipotezy. Niektóre rośliny i zwierzęta przedstawiają niedawno wyjaśnione dopiero zjawisko tak zwanęj symbiozy czyli współżycia. Zwierzę i roślina żyją razem, przyczem druga mieści się często wewnątrz pierwszego; oboje odnoszą z tego korzyści, zwierzę bowiem pochłania tlen, wydzielony przez roślinę; ta znowu karmi się dwutlenkiem węgla, pochodzącym z organizmu zwierzęcia. Zwierzęta więc, życie takie prowadzące, mają w sobie samych źródło tlenu, potrzebnego im do oddychania i obecność jakiegoś czynnika, gaz ten pochłaniającego, byłaby dla nich zbyteczną.

Fakty potwierdzają ten wniosek, wiele bowiem zwierząt morskich, noszących w swem wnętrzu jednokomórkowe wodorosty, czyli tak zwane żółte komórki, nie posiada wcale, albo też bardzo mało czerwonego lipochromu. Przyjawszy jednak, że hemoglobina i czerwony lipochrom spełniają w organizmie

zwierzęcy rolę zupełnie analogiczne, Mereżkowski twierdzi, że istnieje różnica w samym sposobie działania dwu tych barwników. Różnica ta polega na tem, że hemoglobina ciągle utlenia się i odtlenia, lecz sama nie ulega przytem rozkładowi; przy utlenianiu zaś czerwonego lipochromu ten ostatni rozkłada się i zamienia na bezbarwne ciało, podobne do cholesteryny, które już do oddychania służyć więcej nie może. A więc zwierzęta, oddychające za pośrednictwem lipochromu, ponoszą wielkie straty swęj energii życiowej, która idzie na ciągle odtwarzanie nowych ilości tego barwnika; taki sposób wydatkowania sił jest niekorzystny dla organizmu i nasuwa się myśl, że pojawienie się oddychania zapomocą hemoglobiny uważać należy za wytwór doboru naturalnego, w walce o byt usuwający zbyt wydatkowanie siły życiowej, a myśl ta, gdyby się okazała prawdziwą, byłaby zgodną z ogólnemi prawami rozwoju łańcucha ustrojów zwierzęcych. Wprawdzie pewna ilość hemoglobiny w swoim obiegu po całym organizmie ulega zniszczeniu, dając początek niektórym produktom rozkładu; rozkład ten jednak odbywa się pod działaniem innych, aniżeli utlenianie czynników, gdy tymczasem przy oddychaniu za pośrednictwem lipochromu sam już proces utleniania wywołuje rozkład barwnika. Oddychanie za pośrednictwem hemoglobiny z tego jeszcze względu jest korzystniejsze, że przy pomocy naczyń krwionośnych zapewnia tkankom wewnętrznym łatwiejszy i szybszy dostęp tlenu. Jeżeli więc rozważać będziemy proces oddychania ze stanowiska teorii stopniowego rozwoju, dążącego do zapewnienia organizmowi coraz to doskonalszego spełniania danęj funkcji, to przypuścić możemy, że proces ten przechodził przez kilka faz. Naprzód polegał on wprost na pochłanianiu tlenu przez bezbarwną protoplazmę; taki np. sposób oddychania znajdujemy u najniższych zwierząt, jako to ameb, wymoczków, meduz; następnie oddychanie stało się bardziej złożone i lepiej mogło być wykonywanem skutkiem pojawienia się czerwonego lipochromu, mającego większe do tlenu powinowactwo, aniżeli bezbarwna protoplazma; tę fazę spotykamy u wielu zwierząt bezkręgowych. Dalszy postęp polegał na pojawieniu się hemoglobiny w tkankach wewnętrznych; w tej fazie czerwony lipochrom istnieje jeszcze jednocześnie z hemoglobina i współdziała z tą ostatnią (niektóre bezkręgowce, ryby, gady, płazy), aż nareszcie w fazie najwyższej, właściwej wyższym kręgowcom, zostaje on zupełnie z organizmu usunięty, a pozostaje tylko hemoglobina, która też sama spełnia rolę czynnika, pochłaniającego tlen niezbędny dla życia.

Z TEORII ODŻYWIANIA SIĘ ROŚLIN

Doświadczenia P. Renarda nad działaniem chlorofilu nazewnątrż komórki na dwutlenek węgla, (według referatu autora w Comptes rendus, t. CI, str. 1294).

Przedstawił Zn. (str.33-35)

W komórce roślinnej chlorofil jest jaknajściślej złączony z ziarnami bezbarwnej protoplazmy. Chlorofil zabarwia protoplazmę, która sama przez się nie może odtleniać dwutlenku węgla. Chlorofil wreszcie nietylko nadaje właściwy wygląd przeważnej liczbie roślin, ale co ważniejsza, jest środkiem, przy którego pomocy odbywa się tajemnicza a najważniejsza w świecie sprawa przemiany rozproszonęj w atmosferze, nieożywionęj, gazowęj materji, w żywe ciało rośliny, w substancję, na której życie może już wygrywać swoje wspaniałe akordy. Bez chlorofilu zatem niema życia lub raczej życie zacząć się nie może, a jakkolwiek to naczelnę znaczenie chlorofilu umniejsza się, traci na powadze, skoro przypomnimy sobie, że i on nawet jest bezwładny w nieobecności słonecznego promienia, to jednak i sama rola niezbędnego pomocnika tęj twórczęj siły wystarcza, żebyśmy w szeregu najrozmaitszych substancyj roślinnych zachowali dla chlorofilu pierwsze miejsce.

Budowa ziarn chlorofilowych przypomina w pewnym względzie budowę czerwonych ciałek krwi: tutaj barwny chlorofil i bezkolorowa protoplazma komórki roślinnej, tam barwna hemoglobina i bezkolorowa, również protoplazmatycznęj natury, globulina. Ale i w znaczeniu można dopatrzeć pewnego podobieństwa: tu i tam barwnik stanowi ciało czynne, a większa co do ilości część utworu, niezabarwiona, posiada prawdopodobnie tylko bierne znaczenie⁴. Hemoglobina, której znaczenie polega na pochłanianiu tlenu, dostarczanego przez oddychanie, zachowuje swą zdolność i po odłączeniu od globuliny. Czy toż samo stosuje się do chlorofilu? Czy i on, odłączony od swego bezbarwnego substratu, może wywierać odtleniające działanie na dwutlenek węgla?

Na powyższe pytania wszystkie klasyczne dzieła o fizjologii roślin dają przeczącą odpowiedź. Owszem, znajdujemy wszędzie jednoznaczne zapewnienie, że koniecznym warunkiem redukcji dwutlenku węgla przez chlorofil, pod wpływem światła, jest obecność protoplazmatycznęj zawartości ziarenek. Mniemanie takie powstało pod wpływem doświadczeń, które może nie bez słusności nazwaćby można

⁴ Por. Wszechświat, t. IV str. 182, 201, 279, 298.

zamąło delikatnemi w porównaniu z subtelnością zadania. W rzeczy samej, autorowie opierają się na znanym fakcie, że żyjące zielone części roślin, zanurzone w wodzie, w której rospuszczono dwutlenek węgla, pod wpływem promieni słonecznych wydzielają tlen gazowy, a więc widocznie przyswajają węgiel. Próbuje tedy czy podobnego wydzielania gazowego tlenu nie da się dostrzec, kiedy z wodnym roztworem dwutlenku węgla pomiesza my alkoholowy wyciąg chlorofilu, albo zgniecione i rostarte zielone części roślin, a mieszaninę taką oświecimy promieniami słonecznymi. Ale podobnym doświadczeniom zarzucić wypada niewłaściwość, ponieważ łatwo przypuścić można, że chlorofil nazewnątrż komórki roślinnej dzielność swoją zatrzymuje tylko przez czas pewien, o tyle krótki, że nie zdąży wydzielić widocznych bezpośrednio dla oka ilości tlenu gazowego, albo też, że dzielność jego, choćby utrzymać się mogła przez czas dłuższy, przecież co do natężenia znacznie maleje. Zdaniem p. Regnarda doświadczenia te należało powtórzyć, wprowadzając jednak do nich takie warunki, żeby najmniejsze ilości swobodnego, wydzielonego tlenu nie mogły ujść niepostrzeżenie.

W ostatnich czasach, kiedy przy doświadczeniach biologicznych bardzo często chodzi o wykrycie minimalnych śladów tlenu, został wprowadzony w użycie niesłychanie czuły odczynnik chemiczny na to ciało. Jest nim roztwór t. zw. błękitu Coupiera, odbarwiony zapomocą podsiarkonu sodu (NaHSO_2), który, w razie obecności najmniejszego śladu tlenu, przyjmuje bardzo silne zabarwienie błękitne. Napelnwszy podobnym roztworem odpowiedni przyrząd i umieściwszy w nim kawałek żywego liścia rośliny Potamogeton, p. Regnard przekonał się, że płyn pod działaniem światła przyjmował nadzwyczaj silne zabarwienie w ciągu paru minut. Czułość więc odczynnika do zamierzonego doświadczenia została wypróbowana w sposób dostateczny.

Po tych objaśnieniach możemy już przystąpić do właściwego zadania p. Regnarda. Chciał on przekonać się, czy do odtlenienia dwutlenku węgla jest niezbędnem: 1. ażeby chlorofil był zamknięty w komórce roślinnej, 2. ażeby był złączony z bezbarwną protoplazmą ziarn chlorofilowych.

Na pierwsze z tych pytań odpowiedź znajdziemy w następującem doświadczeniu: Delikatne listki sałaty zostały jaknajstarnniej rostarte w moździerzu agatowym, razem z ostrym proszkiem potłuczonego szkła, co musiało doprowadzić do zupełnego zniweczenia ich komórkowej budowy. Do miazgi tak przygotowanej dolano wody zawierającej w sobie

dwutlenek węgla i przeniesiono mieszaninę na filtr ze szwedzkiej bibuły. Przechodzący przez bibułę płyn, obejrany pod mikroskopem, zawierał w sobie mnóstwo ziarn chlorofilowych i nieco szczątków poroździeranych komórek, ale ni jedna komórka cała nie przeszła przez bibułę. Płyn przefiltrowany został podzielony na dwie części, każdą z nich, z odpowiedniami ostrożnościami, pomieszano z opisanym powyżej odczynnikiem na tlen, ale jedna została wystawiona na działanie światła słonecznego, druga zaś umieszczona w zupełnie ciemnem miejscu. Pierwsza mieszanina po dwu już godzinach przyjęła bardzo silne zabarwienie szafirowe, kiedy druga nawet po dniach dziesięciu nie zabarwiła się wcale.

A więc ziarna chlorofilowe, odłączone od komórek, stanowczo przyswajają węgiel z dwutlenku węgla, rospuszczonego w wodzie, czemu świadectwo daje zbłękitnienie odczynnika na wydzielony współcześnie tlen wolny. Są one wtedy w takich samych warunkach, jak wydobyte z naczynia krwionośnego czerwone ciała krwi, które spełniają w dalszym ciągu swą czynność, jakkolwiek coraz to wolniej.

Odpowiedzi na drugie pytanie p. Regnard szukał w następującem doświadczeniu: Przygotowywał alkoholowy lub eterowy roztwór chlorofilu i zanurzał w nim paski doskonale czystego papieru, który jak wiadomo, składa się wyłącznie z samej celulozy bez żadnych domieszek jakichkolwiek ciał innych, a mianowicie protoplazmatycznych. Paski, napojone roztworem chlorofilu, p. Regnard suszył następnie w próżni przy zwykłej temperaturze i przygotowywał takim sposobem prawdziwe sztuczne liście, złożone z celulozy, chlorofilu (i ksantofilu), lecz niezawierające ani śladu protoplazmy, a tembardziej – komórek. Te sztuczne liście, umieszczone w odczynniku na tlen i wystawione na działanie światła wywoływały zbłękitnienie płynu w ciągu paru godzin, gdy tymczasem inna ich część, zostawiona z odczynnikiem w ciemności, nie dała żadnej zmiany.

Wnioskiem ostatecznym z powyższych doświadczeń jest, że chlorofil sam przez się, bez pomocy żyjących komórek lub ich protoplazmy, rozkłada pod wpływem światła słonecznego dwutlenek węgla, wydzielając z niego tlen, a przyswajając węgiel.

Teksty wybrali i przygotowali Maria Smiałowska i Jerzy Vetulani; pomoc techniczna Sylwia Mądro.

JEDEN DZIEŃ FESTIWALU NAUKI R. 2016 – REFLEKSJE I WNIOSKI

Krótką acz bogatą w wydarzenia historia dnia, o którym mowa niżej, włączonego w ciąg wydarzeń Festiwalu Nauki w Krakowie, wydłużyła się o kolejny, czwarty rok. Sam Festiwal zaistniał po raz pierwszy w Krakowie, mieście festiwalu, w 2000 r., aby popularyzować naukę oraz osiągnięcia krakowskich uczelni wyższych i instytutów badawczych PAN. Tym samym dołączył do ponad 100 festiwali odbywających się w Krakowie, z których około połowa ma znaczenie międzynarodowe. Nie podejmuję się oceny rangi całego Festiwalu Nauki. Dzień, o którym mowa, ma znaczenie ściśle lokalne, wychodząc naprzeciw potrzebom poznawczym i edukacyjnym dzieci i młodzieży. Wydarzenie to jest mi znane jako wolontariuszowi-ochotnikowi.



Ryc. 1. Koszulka z hasłem festiwalowym. Fot. Jacek H. Graff.

Instytut Ochrony Przyrody PAN włączył się w Festiwal Nauki w 2013 r., organizując odąd rokrocznie jednodniowe zajęcia, za każdym razem w innym miejscu:

- 16 maja 2013 r., w XIII edycji Festiwalu, odbywającej się pod hasłem OBLICZA WODY, w Parku Krakowskim i w swojej siedzibie przy Al. Mickiewicza,
- 23 maja 2014 r., w XIV edycji, pod hasłem Z NAUKĄ PRZEZ WIEKI, na barce „Przystań Arkadia” i na bulwarach przy zakolu Wisły pod Wawelem,
- 22 maja 2015 r., w XV edycji, pod hasłem OŚWIEĆ SIĘ!, w Parku Jordana i w okolicach Kopca Kościuszki,
- 20 maja 2016 r., w XVI edycji, pod hasłem CZAS I PRZESTRZEŃ, w Muzeum Przyrodniczym Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie.

Głównym organizatorem Festiwalu był w tym roku Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie. Tegoroczny dzień festiwa-

lowy został zorganizowany przez dwie krakowskie placówki Polskiej Akademii Nauk, Instytut Ochrony Przyrody oraz Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt. Odbył się po raz pierwszy w przestrzeni Muzeum Przyrodniczego, a więc w przestrzeni ograniczonej, w przeciwieństwie do lat ubiegłych, kiedy program festiwalowy realizowany był w plenerach. Zajęcia i zwiedzanie prowadzone były przez pracowników naukowych obu placówek PAN (Instytut Ochrony Przyrody – koordynator: dr Kamil Najberek oraz Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt – koordynator: dr Natalia Sawka-Gądek). Wnętrze Muzeum zostało podzielone na dwie części, ze stanowiskami obu placówek.



Ryc. 1. Przypinki z hasłem festiwalowym. Fot. Jacek H. Graff.

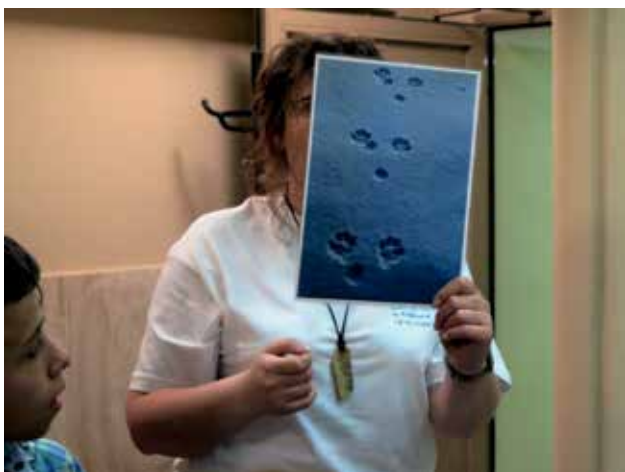
Wydarzenie festiwalowe roku 2016 można uznać za udane. Lokalizacja w Muzeum z jednej strony ograniczyła liczbę uczestników, ale z drugiej poszerzyła możliwości obserwowania licznych okazów żywych i zakonserwowanych, w rzeczywistości i w przestrzeni wirtualnej (dzięki aparaturze multimedialnej). Przestrzeń ograniczona metrażem zróżnicowana była poprzez scenariusz ekspozycji i sprzyjającą temu wydarzeniu zabytkową, ponad stuletnią architekturę wnętrza. Młodzi adepci przyrodoznawstwa wędrowali przez korytarze, schody, przesmyki sztucznych jaskiń, spotykali i poznawali nowych ludzi mających do zaoferowania swój czas i zainteresowanie dla stawianych im pytań, pokazujących nieznanne przedmioty, urządzenia rejestrujące zjawiska – podświadome nawiązanie do fantazji przemijającego dzieciństwa. Uczestnicy tych zajęć w nowym dla nich lub w mało znanym miejscu mogli zobaczyć świat przyrody ożywionej na tle przyrody nieożywionej, pełniejszy obraz procesu ewolucji świata ożywionego, świat roślin i zwierząt w skali globu ziemskiego, organizmów współczesnych i wymarłych.

Jeżeli nawet nie umięją teraz uświadomić sobie tego dokładnie, to mają przygotowanie i punkt wyjścia do dalszego rozwoju intelektualnego na kolejnych etapach edukacji. Pomieszczenia muzealne dały możliwość nowych rozwiązań organizacyjnych i kontaktu z okazami tak utrwalonymi, jak i żywymi, wchodzącymi w skład ekspozycji muzealnej. Nowoczesne muzeum przyrodnicze to nie tylko okazy zakonserwowane, ale i żywe organizmy w akwariach i wiwariach.



Ryc. 3. Duże zwierzęta. Fot. Jacek H. Graff.

Oprócz grup przedszkolnych i szkolnych pojawiły się indywidualne osoby dorosłe, zainteresowane propozycjami festiwalowymi. Wydarzenie zmniejszyło swoją dostępność, ale w zamian dało uczestnikom okazję do pogłębienia strony merytorycznej kilku dziedzin biologii, spokojniejszego oglądania zbiorów



Ryc. 4. Tropy dużych zwierząt. Fot. Jacek H. Graff.

muzealnych oraz uczestnictwa w warsztatach. Czas zajęć w Muzeum był zbliżony do godzin zwiedzania (10.00 – 15.30). Zajęcia miały formę zabaw, konkursów, wykładów edukacyjnych, warsztatów, doświadczeń, prezentacji metod i narzędzi badawczych. Były dopasowane do wieku i możliwości intelektualnych młodych uczestników. Jak co roku, tak i teraz podziwiałem u prowadzących precyzyjny i jednocześnie bardzo przystępny sposób rozmawiania z uczestnikami, dopasowany do ich wieku i możliwości. Są to

przecież pracownicy naukowcy, nieprowadzący na co dzień zajęć dydaktycznych.

Zajęcia festiwalowe nie były więc tylko zwiedzaniem Muzeum, ale przede wszystkim warsztatami, zajęciami laboratoryjnymi, na które brakuje czasu i możliwości w szkołach. Uczestnicy zajęć dowiedzieli się, jakimi metodami i jakim sprzętem posługują się przyrodnicy prowadzący badania w terenie i później, w zaciszu pracowni; jak powstaje nauka,



Ryc. 5. Wodne stwory i potwory – czyli mikrozoo. Fot. Jacek H. Graff.

a w ślad za nią i wiedza, których uproszczonym obrazem są podręczniki szkolne, filmy przyrodnicze prezentowane w programach telewizyjnych i w Internecie; po co się to wszystko robi? jakie to ma praktyczne znaczenie dla gospodarki narodowej? Można przypuszczać, że z grona dzieci i młodzieży



Ryc. 6. Preparowanie motyli – nie taki diabeł straszny. Fot. Jacek H. Graff.

uczestniczących w takich wydarzeniach wyrosną przyszli przyrodnicy. Wystarczyło obserwować dłużej uczniów szkół podstawowych przebiegających w skupieniu brekcję kostną z jaskiń czy preparujących okazy motyli pod kierunkiem specjalistów.

Tegoroczna zmiana miejsca opisywanego wydarzenia, z pleneru na przestrzeń muzealną, budziła wcześniej określone obawy, jak to będzie, skoro nie wszyscy tutaj się mieszczą. Okazało się, że było w pewnym sensie lepiej. Grono uczestników było w tym roku pomniejszone o przypadkowe osoby, których zawsze jest sporo w warunkach plenerowych. Imprezy masowe tego rodzaju mają swoje zalety,

przede wszystkim możliwość ukazania laikowi rzeczywistości niedostępnej na co dzień. W tym roku postawiono na komfort uczestników w ukierunkowanym poznawaniu przyrody, a więc mniej osób, ale nieprzypadkowych.



Ryc. 7. Jak badać niewidzialne? – tajemniczy świat nietoperzy. Fot. Jacek H. Graff.

Na koniec refleksja dotycząca całości Festiwalu Nauki jako imprezy masowej o dość długiej tradycji i bardzo bogatej ofercie. Jej głównym miejscem akcji jest krakowski Rynek Główny. Obok Festiwalu toczy się tutaj zwykle życie centrum miasta. Od ćwierć wieku jest ono bardziej intensywne, pełne ruchu tu-

Nauki nie powinien raczej wycofać się w inne bardziej spokojne miejsca, gdzie byłby wydarzeniem samym dla siebie, dla swojego oddziaływania na zainteresowanych, dla swojego wyjątkowego charakteru? Sąsiedztwo wszystkich innych sytuacji i wydarzeń



Ryc. 8. Co leży przy drodze? – O zbieraniu minerałów i skamieniałości. Fot. Jacek H. Graff.

nie sprzyja skupieniu, koncentracji uwagi, obserwacjom, rozmowom na określony temat. Nawet sąsiadujące ze sobą stoiska czy namioty różnych wydziałów i uczelni stają się sobie nawzajem przeszkodą.

Edycje festiwalowe przyszłości mogłyby odbywać się w miejscach niewykorzystywanych dotychczas,



Ryc. 9. Odbiór materiałów i pamiątek przed wyjściem z Muzeum. Fot. Jacek H. Graff.

rystycznego, imprez kulturalnych, wydarzeń o charakterze społecznym, gastronomii i handlu. Całość ma swój niepowtarzalny charakter i klimat. Pochody, manifestacje, biegi, rajdy, wyścigi, koncerty, występy, kiermasze; kolorowo, głośno, ludno. Czy Festiwal

nieraz mało znanych nawet krakowianom. Osoby zainteresowane mogą liczyć tam na większy spokój, a ograniczona przestrzeń i wyjątkowy charakter tych miejsc sprzyjają takim spotkaniom ludzi z nauką. A które? Na przykład część podwórza i sala

w podziemi Pałacu pod Krzysztoforę, dziedziniec Collegium Maius, Ogród Profesorski, sala audytoryjna w Europeum, aula bł. Jakuba Strzemię i plac przy bazylice oo. Franciszkanów, dziedziniec Collegium Iuridicum, teren przy Collegium Broscianum, że wymienię te miejsca, które idealnie pasują na prezentacje dyscyplin naukowych i działalności poszczególnych wydziałów i katedr.

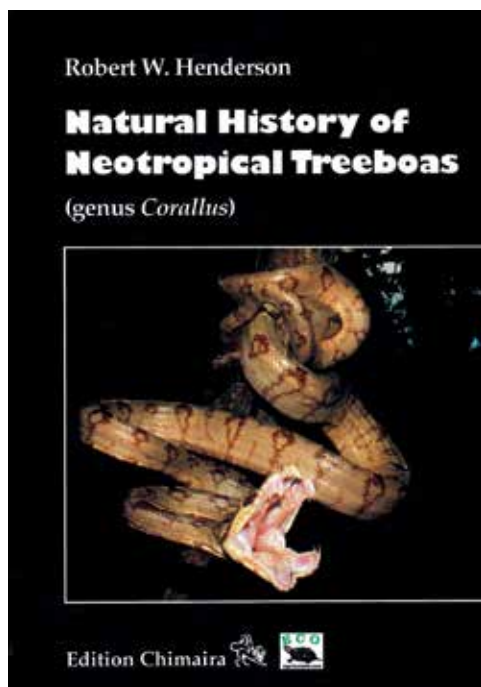
Obserwuję też od dwóch lat dni festiwalowe organizowane na dziedzińcu Collegium Nowodworskiego przez Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum UJ. Na pobliskim Rynku happening nauki, turystyki i handlu; na dziedzińcu Collegium Nowodworskiego spokojniej, ciszej. „Koziołek” ustawiony przy wejściu informuje przechodniów, co dzieje się wewnątrz. Zainteresowani przychodzą porozmawiać

na temat surowców zielarskich, leków, badań stanu zdrowia, wykonać pomiary możliwe w warunkach „pod chmurką”.

Doświadczenie ostatnich lat Instytutu Farmaceutycznego oraz Instytutu Ochrony Przyrody wskazuje, że czas pomyśleć o innej formule festiwalu. Nauka trafiła „pod strzechy”, ale nie wszędzie spotkała się z odpowiednim zrozumieniem i przyjęciem. Niech będzie nadal dostępna dla wielu, ale na miarę obecnych czasów i standardów elitarna, realizowana w bardziej odpowiednich miejscach.

Jacek H. Graff – jhg@o2.pl
mgr biologii, emerytowany nauczyciel

Robert W. Henderson: Natural History of Neotropical Treeboas (genus *Corallus*). Edition Chimaira, Frankfurt am Main, 2015, ISBN 978-3-89973-438-6, s. 338, cena €68.00.



W 2002 r. Robert Henderson opublikował świetną książkę *Neotropical Treeboas – Natural History of the Corallus hortulanus complex* (Krieger Publ., Malabar, Florida), w której zajął się 4 gatunkami: *C. cooki*, *C. grenadensis*, *C. hortulanus* i *C. ruschenbergieri*. Obecna monografia obejmuje wszystkie gatunki z tego rodzaju, tzn. oprócz powyższych 4 jeszcze *C. annulatus*, *C. batesii*, *C. blombergii*, *C. caninus* i *C. cropanii*. Węże te występują od południowo-

-wschodniej Gwatemali po południowo-wschodnią Brazylię oraz na kilku wyspach karaibskich. *C. batesii* został wyodrębniony z *C. caninus* w 2005 r. przez Vidala i in. na podstawie mitochondrialnego DNA i w związku z tym *C. caninus* jest ograniczony obecnie do Wyżyny Gujańskiej, zaś *C. batesii* występuje w Amazonii.

Książka podzielona jest na szereg rozdziałów, a zaczyna ją prolog, w którym autor pisze, jak rozpoczął badania tych węży. W rozdziale pierwszym (s. 13–51) krótko omawia pod kątem systematycznym wszystkie gatunki, zamieszcza klucz do ich identyfikacji oraz kolorowe mapy występowania, a następnie przedstawia dane morfologiczne tych dusicieli, ich filogenezę i biogeografię (tu szczegółowo opisuje dwa rejony występowania *C. grenadensis*, tj. Granadę i Grenadyny). W kolejnych rozdziałach zajmuje się ubarwieniem tych węży (s. 53–106), siedliskami, w których występują (s. 107–145), aktywnością (s. 146–159), zdobywaniem pokarmu (s. 161–227), zachowaniem obronnym i wrogami (s. 228–242), rozmnażaniem (s. 243–254), przedstawia również informacje dotyczące populacji, tj. zagęszczenie, częstość występowania (s. 255–275). Osobny rozdział poświęcony jest wpływowi ludzi na te węże (s. 276–309). Całość ilustrowana jest ponad 270 kolorowymi zdjęciami przedstawiającymi te węże, również w czasie połykania zdobyczy. Są też zdjęcia pokazujące ich ostre zęby i postawę obronną (tu np. można zobaczyć jak *C. hortulanus* atakuje twarz, pozostawiając krwawą ranę). Autor cytuje ponad 400 publikacji, co obrazuje stan aktualnej wiedzy na ten temat, popartej jego 25-letnim doświadczeniem w badaniu tych węży. Niektóre gatunki, jak np. *C. grenadensis*, są lepiej poznane i o nich jest najwięcej informacji.

Z kolei najmniej wiadomo o *C. cropanii*, znanego do tej pory jedynie z 5 osobników, i który jest zagrożony wyginięciem z powodu wycinania lasów na wybrzeżu atlantyckim w sąsiedztwie São Paulo w Brazylii.

Dusieciele z rodzaju *Corallus* są często trzymane w ogrodach zoologicznych oraz prywatnych hodowlach

i dla tej części czytelników monografia Hendersona będzie lekturą niezwykle przydatną, ale również jest kopalnią wiedzy nie tylko dla profesjonalnych herpetologów, ale również wszystkich miłośników węży.

Piotr Sura



KONKURS WIEDZY NEUROBIOLOGICZNEJ – „BRAIN BEE” 2017 dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych

Konkurs organizowany jest przez Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika i Koło Naukowe Studentów Neurobiologii UJ „Neuronus”.

Konkurs odbędzie się w dwóch etapach:

I – szkolny

II – ogólnopolski

W I etapie szkoły biorące udział w konkursie wyłonią zwycięzców I etapu.

Szkoły, które zdecydują się uczestniczyć w konkursie, proszone są o zgłaszanie udziału do konkursu do końca stycznia 2017, wysyłając zgłoszenie na adres Koła Naukowego „Neuronus”: neuronus@uj.edu.pl. Zgłoszenia powinny zawierać nazwę i adres szkoły oraz adres e-mail.

Szkoły, które przesłały zgłoszenia, do 6 lutego 2017 otrzymają na podany w zgłoszeniu adres e-mail pytania testowe do I etapu. Zaleca się ich wykorzystanie, ze względu na podobieństwo do pytań, które pojawią się w etapie II. Jednakże, etap I co do formy i treści zależy wyłącznie od opiekuna, który może zdecydować się na samodzielne ułożenie pytań. I etap konkursu powinien odbyć się w szkołach, które zgłosiły się do konkursu, do końca lutego 2017.

Nazwisko laureata, jego opiekuna oraz nazwa i adres szkoły wraz odpowiednimi adresami e-mail powinny być przesłane do 4 marca 2017 na adres neuronus@uj.edu.pl. Szkoła może wytypować tylko jedną osobę do etapu II.

II etap ogólnopolski konkursu odbędzie się 1 kwietnia 2017 w Krakowie w Instytucie Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 9 o godz. 11-tej, a powinien skończyć się ok. godz. 16.00-17.00.

Konkurs ogólnopolski będzie składał się z egzaminu testowego jednokrotnego wyboru i ustnego. Do egzaminu ustnego przystąpi 10 osób, które otrzymają najlepsze wyniki z egzaminu testowego.

Laureat konkursu ogólnopolskiego otrzyma nagrodę pieniężną w wysokości 1000 zł, nagrody książkowe i roczną prenumeratę czasopisma „Wszechświat”. Ponadto, laureat będzie miał możliwość reprezentowania Polski w międzynarodowym konkursie – International Brain Bee 2017, który w tym roku odbędzie się w Waszyngtonie.

Wszelkie pytania dotyczące konkursu należy przysyłać na adres neuronus@uj.edu.pl.

Materiały pomocne w przygotowaniu się do konkursu:

Literatura podstawowa:

1. Longstaff "Krótkie wykłady - Neurobiologia"
2. Artykuły neurobiologiczne opublikowane w ramach „Tygodnia Mózgu” w czasopiśmie „Wszechświat” z. 1-3/2016, z.1-3/2015, z.1-3/2014.
3. Ogólnodostępna w internecie broszura : Neuroscience: Science of the Brain

Materiały uzupełniające:

1. Anglojęzyczne witryny internetowe: www.brainfacts.org, www.thebrain.mcgill.ca

Uczestnik egzaminu ustnego II etapu powinien wykazać się m. in. umiejętnością formułowania wypowiedzi z zakresu neurobiologii w języku angielskim, dlatego w przygotowaniach do konkursu należy uwzględnić materiały anglojęzyczne.

Cena 12,00 zł (VAT 5%)

Indeks 381586



Ryby danio w pojemniku hodowlanym. Fot. Michał Bazala.