

dr Adam Bownik

Katedra Fizjologii Zwierząt i Toksykologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1,,I"
20-708 Lublin
adambownik@wp.pl
tel. 814545458

Autoreferat

I. Imię i Nazwisko: Adam Bownik

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1996	Magister ochrony środowiska Praca magisterska pt. „Immunotoksyczne działanie wybranych pestycydów na ryby”. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II w Lublinie
2004	Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii Rozprawa doktorska pt. „Badania nad wpływem gronkowcowej leukocydyny LukE/LukD na układ odpornościowy karpia (<i>Cyprinus carpio</i> L.) oraz królika (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) <i>in vitro</i> ”. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II w Lublinie

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.1995-30.09.1996	Asystent naukowo-techniczny. 1/2 etatu w Katedrze Biologii i Toksykologii. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
01.10.1996-30.09.1998	asystent naukowo-techniczny. Pełny etat w Katedrze Biologii i Toksykologii. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
01.10.1998-30.09.2004	młodszy specjalista naukowo-techniczny w Katedrze Biologii i Toksykologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
01.10.2004-31.12.2005	asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Fizjologii i Ekotoksykologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
01.01.2006 do chwili obecnej	adiunkt w Katedrze Fizjologii i Ekotoksykologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

a) przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**Praca magisterska**

Studia na kierunku filozofia przyrody o specjalizacji ochrona środowiska rozpocząłem w 1991 roku. W 1995 roku, jako student V roku zostałem zatrudniony na 1/2 etatu w Katedrze Biologii i Toksykologii Środowiska na ówczesnym Wydziale Filozofii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Początkowo moja działalność naukowa była związana z badaniem oddziaływania wybranych pestycydów na układ odpornościowy ryb. Celem prowadzonych przeze mnie badań była ocena wpływu pestycydów: czystej atrazyny z grupy triazyn oraz preparatu Diazol 250 EC zawierającego substancję czynną, diazinon należący do związków fosforoorganicznych na parametry odporności ryb. Badania wykazały, że pestycydy z tej grupy oraz związki triazynowe obniżają zdolność proliferacyjną limfocytów T i B izolowanych z krwi i nerki główowej, zaburzają procesy generacji wolnych rodników tlenowych oraz aktywności bójczej fagocytów, co może przyczyniać się do wzrostu podatności ryb na choroby infekcyjne. Wyniki te zawarłem w mojej pracy magisterskiej pt. „Immunotoksyczne działanie wybranych pestycydów na ryby” napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Studnickiej i obronionej w czerwcu 1996 roku, Rezultaty tych badań prezentowane były również na dwóch krajowych konferencjach naukowych. Jednocześnie, oprócz pracy badawczej realizowałem działalność organizacyjną. Dwukrotnie (w 1996 oraz 1997 roku) współorganizowałem cykl konferencji naukowych „Biologiczne Monitorowanie Skażenia Środowiska” w Kazimierzu Dolnym. Po otrzymaniu stopnia magistra moja aktywność badawcza dotyczyła oceny skuteczności immunostymulatorów (KLP-602, Lydium-KLP) w korygowaniu odporności upośledzonej działaniem ksenobiotyków (również pestycydami) u ryb oraz ssaków. Doświadczenia te prowadziłem w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Marię Studnicką we współpracy z prof. dr hab. Andrzejem K. Siwickim z Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Żabieńcu, prof. Peterem Kleinem, prof. Witoldem Kiczką z Nika Health Products, USA, oraz prof. Marc Morandem z Laboratoire Departemental d'Analyses, Conseil General du Jura, we Francji. Wspólnie przeprowadzone badania wykazały m.in., że dimer lizozymu jest skuteczniejszym czynnikiem stymulującym układ odpornościowy niż jego naturalny odpowiednik w postaci monomeru. Stwierdziliśmy również, iż obniżenie odporności ryb wywołane pestycydami może być korygowane za pomocą syntetycznych oraz naturalnych immunostymulatorów. Wyniki tych badań zaprezentowałem w 1997 roku na międzynarodowym sympozjum „Aquaculture Application of Controlled Drug and Vaccine Delivery” w Udine (Włochy). Badania wpływu preparatów immunostymulujących (KLP-602, Lydium-KLP) na układ odpornościowy wykonywane były również na zwierzętach stałocieplnych takich jak królik, świnia we współpracy z pracownikami Kliniki Położniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz z Katedrą Epizootiologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego i Państwowym Instytutem Weterynaryjnym w Puławach. Wyniki badań zaprezentowane zostały na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych oraz opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

1. Studnicka M., Siwicki A.K., Morand M., Rymuszka A., **Bownik A.**, Terech-Majewska.E. 1998. Modulation of nonspecific defence mechanisms and specific responses after suppression induced by xenobiotics. **J. Appl. Ichthyol.** 15, 1-7
2. Siwicki A.K., Studnicka M., Morand, M., Glabski E., **Bownik A.**, Terech-Majewska E. 2000. Effects of pesticides on the acute phase proteins in fish – experimental study. **Mar. Environ. Res.** 50, 465-472

Praca doktorska

W 1997 roku rozpocząłem badania nad wpływem toksyn gronkowcowych na układ odpornościowy zwierząt zmiennie- i stałocieplnych we współpracy z prof. dr hab. Stanisławem Szmigielskim z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie w oraz prof. Giles'em Prevostem z Uniwersytetu Ludwika Pasteura w Strasburgu we Francji. Owocem tej współpracy były wyniki prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych oraz opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. Siwicki A.K., **Bownik A.**, Prevost G., Szmigielski S., Małaczewska J., Mikulska - Skupień E. 2003. *In vitro* effect of staphylococcal leukocidins (LukE, LukD) on the proliferative responses of blood lymphocytes in dogs (*Canis familiaris*), **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, 395-401, 395-401
2. Siwicki A.K. **Bownik A.**, Szmigielski S., Prevost G., Małaczewska J. 2002 Influence of staphylococcal leukocidin Panton-Valentine on blood phagocytes activity: *in vitro* study in dogs. **Centr. Eur. J. Immunol.** 27 I. 114
3. Siwicki A.K., **Bownik A.**, Szmigielski S., Prevost G., Małaczewska J., Mikulska-Skupień E. 2002. Effects of leukocidin Panton-Valentine on proliferative response of blood lymphocytes stimulated by different mitogens: *in vitro* study in dogs. **Centr. Eur. J. Immunol.** 27 I. 113
4. **Bownik A.**, Siwicki A. K., Szmigielski S., Sobiczewska E., Prevost G. Monteil H., Colin D.A. Studnicka M., Jeliaszewicz J. 2000. Cytotoxic effects of staphylococcal leukocidins on isolated fish macrophages and lymphocytes *in vitro*, **Bull. Pol. Ac. Sci. , Biol. Sc.** 48, 63-76.

Oddziaływanie toksyn gronkowcowych było również tematyką mojej pracy doktorskiej pt. „Badania nad wpływem gronkowcowej leukocydyny LukE/LukD na układ odpornościowy karpia (*Cyprinus carpio* L.) oraz królika (*Oryctolagus cuniculus*) *in vitro*” napisanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Marii Studnickiej i obronionej 10.03.2004 roku w Katolickim Uniwersytecie Lubelski Jana Pawła II. Wyniki tych badań wskazały na toksyczne oddziaływanie leukocydyny LukE/LukD na komórki układu odpornościowego ryb oraz królika. Interesujące jest to, iż toksyna w niskich stężeniach wykazuje właściwości immunostymulujące. Moje zainteresowanie tematyką toksyn bakteryjnych i ich oddziaływania, możliwego wykorzystania w biotechnologii oraz medycynie zaowocowało powstaniem obszernej monografii pt. „Białkowe toksyny bakteryjne. Struktura, oddziaływanie i zastosowanie wybranych metabolitów

bakteryjnych". Książka ta powstawała przez 8 lat i została wydana nakładem oficyny wydawniczej „Bezkresy Wiedzy” w 2014 roku.

b) przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania badawcze w dalszym ciągu związane były z tematyką wpływu metabolitów produkowanych przez mikroorganizmy na układ odpornościowy zwierząt. Wyniki prowadzonych badań opublikowane zostały w kilku czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. Siwicki A. K., **Bownik A.**, Prevost G., Szmigielski S., Małaczewska J., Mikulska Skupień E. 2004. *In vitro* influence of staphylococcal leukocidins (LukE, LukD) on the activity of blood phagocytes in dogs. **Wien. Tierarztl. Mschr.** 91, 1-5
2. **Bownik A.**, Siwicki A.K., Prevost G. 2004. *In vitro* effects of leukocidin Luke/LukD on the rabbit immunocompetent cells, **Pol. J. Vet. Sci.** 7, 25-27
3. **Bownik A.** 2006. *In vitro* effects of staphylococcal leukocidin Luke/LukD on the proliferative ability of lymphocytes isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.) **Fish Shellfish Immunol.** 20, 656-659

Kontynuując moje badania koncentrowałem się na poszukiwaniu bioaktywnych związków pochodzenia naturalnego (roślinnego lub bakteryjnego) znoszących lub łagodzących szkodliwe oddziaływanie ksenobiotyków. Z uwagi na fakt, iż literatura naukowa sugeruje, iż naturalne olejki eteryczne są mieszaniną efektywnych związków bioaktywnych modulujących parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne u zwierząt rozpocząłem badania nad wpływem olejku goździkowego na rozwielitki. **W badaniach tych wprowadziłem nowatorskie elementy takie jak cyfrowa analiza obrazu do oceny ruchliwości oraz aktywności serca oraz odnoży tułowiowych rozwielitki przy użyciu programu Tracker® 4.37 umożliwiającego badanie behawioru oraz parametrów fizjologicznych zwierząt eksperymentalnych.** Równoległe z prowadzonymi przeze mnie badaniami zespół kierowany przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską z Katedry Biochemii i Chemii Środowiska Instytutu Biotechnologii KUL opracował nowatorską, opatentowaną metodą pozyskiwania ektoiny z bakterii metanotroficznych. Przyjąłem zaproszenie od prof. Zofii Stępniewskiej do współpracy, w ramach której dokonałem oceny ochronnego działania tego aminokwasu na zwierzęta w warunkach stresu. Owocem wspólnych badań jest monotematyczny cykl publikacji będący osiągnięciem naukowym wnioskowanego postępowania habilitacyjnego oraz **projekt patentowy pt. „Zastosowanie ektoiny jako czynnika ochronnego przed działaniem toksyn bakteryjnych”** złożony dnia 29. 04. 2015 r. do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej w Warszawie. Nasze wspólne sukcesy badawcze spotkały się z dużym zainteresowaniem w światowym środowisku naukowym. Prace z wynikami badań nad ektoiną od kilku miesięcy należą do najbardziej popularnych publikacji w *Journal of Comparative Physiology B* oraz *Comparative Biochemistry and Toxicology C*. Ponadto, wraz z zespołem kierowanym przez prof. Stępniewską zostałem włączony do międzynarodowego projektu naukowego ERA-IB. pt. **"Valorization of mussel processing**

wastewater (MPW) for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) and ectoine by halophilic bacteria" obejmującego badania nad produkcją PHA (polihydroksyalkanolanów) oraz ektoiny prowadzone przez 5 ośrodków naukowych z Europy. Jednym z moich zadań badawczych w tym projekcie jest ocena toksykologiczna oraz określenie immunomodulującego działania otrzymanych związków.

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 26 prac naukowych w tym 21 opublikowanych w 14 czasopismach z listy JCR,
- 1 publikację książkową,
- 11 komunikatów zjazdowych i doniesień konferencyjnych,
- współautorstwo rozdziału w 4 monografiach.

Sumaryczny *impact factor* opublikowanych prac po uzyskaniu stopnia doktora wynosi **31.121** według roku publikacji (**według roku 2013/2014 IF_{2013/2014}: 33.78**. Suma punktów MNiSW tych publikacji wynosi **464** zgodnie z rokiem publikacji (według roku 2014 MNiSW₂₀₁₄: **584**).

IV. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z artykułu 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) osiągnięciem naukowym realizującym art. 16 ust 2 ustawy o stopniach naukowych jest cykl publikacji naukowych pod tytułem:

„Ochronne działanie ektoiny na zwierzęta w warunkach stresu”

b) publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania)

1. **Bownik A.,** Stępniewska Z., Skowroński T. 2015. Effects of ectoine on behavioural, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. and Pharmacol.** 168, 2-10. **IF-2.83, MNiSW: 30, autor korespondencyjny**
2. **Bownik A.,** Stępniewska Z., Skowroński T. 2014. Protective effects of ectoine on heat-stressed *Daphnia magna*. **J. Comp. Physiol. B.** 184, 961-976. **IF-2.53 MNiSW: 35, autor korespondencyjny**
3. **Bownik A.,** Stępniewska Z., 2015. Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* subjected to hydrogen

peroxide. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. and Pharmacol.** 170, 38-49. **IF-2.83**, **MNiSW: 30**, *autor korespondencyjny*

4. **Bownik A.**, Stępniewska Z., 2015. Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. **Toxicon.** 99, 130-135. **IF-2.581**, **MNiSW: 30**, *autor korespondencyjny*
5. **Bownik A.** 2015. Clove essential oil from *Eugenia caryophyllus* induces anesthesia, alters swimming performance, heart functioning and decreases survival rate during recovery of *Daphnia magna*. **Turk. J. Fish Aquat. Sc.** 15, 157-166. **IF-0.384**, **MNiSW: 15**, *autor korespondencyjny*
6. **Bownik A.**, Stępniewska Z., 2015. Ectoine alleviates behavioural, physiological and biochemical changes in *Daphnia magna* subjected to formaldehyde. **Environ. Sc. Poll. Res.** DOI: 10.1007/s11356-015-4747-5. **IF-2.757**, **MNiSW: 30**, *autor korespondencyjny*
7. **Bownik A.** Białkowe toksyny bakteryjne. Struktura, oddziaływanie i zastosowanie wybranych metabolitów bakteryjnych. Bezkręsy Wiedzy, Saarbrücken. GmbH 2014. ISBN 978-3-639-89168-3. **MNiSW: 20**

Łączny *impact factor* publikacji wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania: **13.912**. Suma punktów **MNiSW** za publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem publikacji: **190**. Mój wkład w powstanie każdej publikacji został podany w załączniku 3 w pozycji 1.2.1. oraz w oświadczeniu

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników z przedstawieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie-przedmiot badań

Bakterie żyjące w ekstremalnych środowiskach wykształciły rozmaite mechanizmy przystosowawcze, a jednym z nich jest produkcja i kumulacja związków o małej masie cząsteczkowej zwanych osmolitami lub kompatybilnymi solutami (ang. compatible solutes). Związki te charakteryzują się dużą zdolnością do wiązania wody, a kumulując się wewnątrz komórki chronią komórki przed odwodnieniem podczas stresu hiperosmotycznego działając stabilizująco na białka strukturalne, enzymy i błony komórkowe. Osmolity są substancjami zróżnicowanymi pod względem budowy chemicznej. Najprostsza postacią są jony K^+ występujące powszechnie u wszystkich gatunków bakterii. Inne związki należą do cukrów (trehaloza, sacharoza), polioli (glicerol, sorbitol, mannitol, α -glukozylo-glicerol) oraz aminokwasów (glutamina, glutaminy, betaina, glicyna, prolina, alanina, tauryna, hydroksyektoina oraz ektoina) (Pastor i wsp. 2010).

Ektoina (kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metyl-4-pyrimidinokarboksylowy) ($C_6H_{10}N_2O_2$) (Fig. 1) jest aminokwasem o masie molowej 142,2 g/mol, produkowanym przez wiele gatunków bakterii występujących w środowisku glebowym oraz wodnym, w odpowiedzi na stres środowiskowy wywołany różnymi czynnikami.

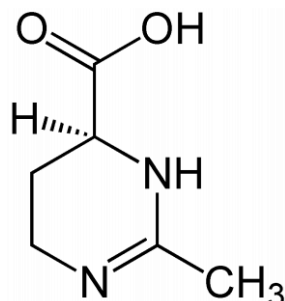


Fig. 1. Struktura ektoiny

Związek ten wyizolowano po raz pierwszy w roku 1985 z halofilnych, fototroficznych bakterii *Halorhodospira halochloris* występujących w Wadi Natrum w Egipcie jednak zdolność do jego produkcji wykazano także u innych zarówno gram-ujemnych jak i gram-dodatnich bakterii z rodzaju *Nocardiopsis*, *Brevibacterium*, *Marinococcus*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* oraz metanotroficznych bakterii *Methylomicrobium* i *Methylobacter* wykorzystujących metan jako źródło węgla (Galinski i wsp. 1985; Pastor i wsp. 2010). Ektoina jest krystaliczną, lekko higroskopijną, bezbarwną substancją o temperaturze topnienia 280°C , dobrze rozpuszczalną w rozpuszczalnikach polarnych takich jak woda lub metanol w zakresie pH 1-9, natomiast w środowisku obojętnym występuje w postaci jonu obojnaczego. Aminokwas ten wykazuje dużą odporność na ogrzewanie w temp. 190°C przez 6 godzin oraz na długotrwałe przechowywanie w temp. pokojowej przez 4 lata. Ektoina posiada dużą zdolność do wiązania cząsteczek wody i tworzenia hydrokompleksów ektoinowych, stanowiących powłokę chroniącą komórki lub makromolekuły przed utratą wody (Fig. 2).

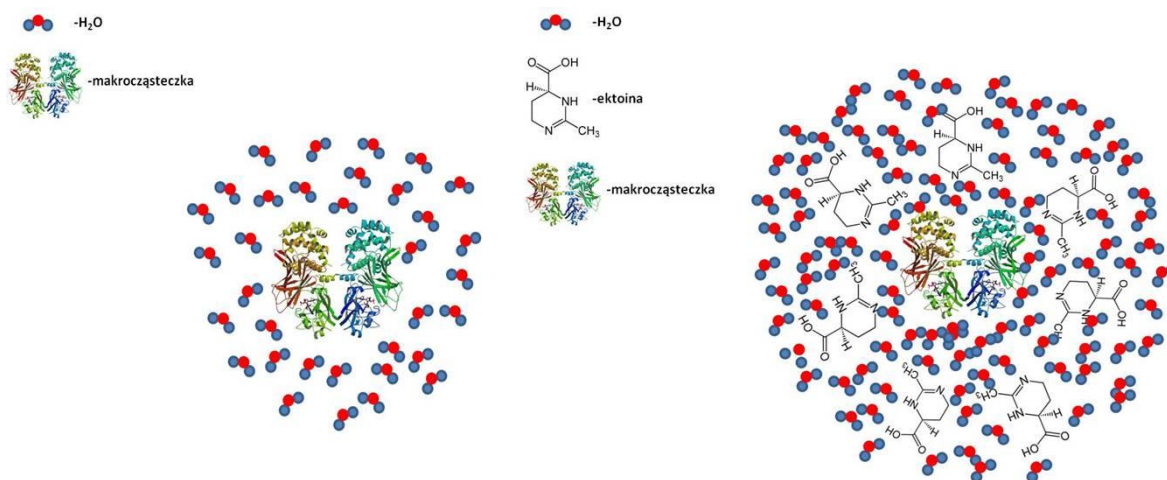


Fig. 2. Ektoina posiada zdolność do wiązania wody. Rycina przedstawia schematyczne rozmieszczenie ektoiny oraz cząsteczek wody wokół makrocząsteczki.

Dane z literatury wskazują na stabilizujące działanie ektoiny na makromolekuły poddane działaniu rozmaitych czynników stresowych. Stwierdzono, że aminokwas ten zwiększa termostabilność DNA i chroni białka przed proteolizą wywołaną trypsyną lub chymotrypsyną oraz jest bardzo efektywnym inhibitorem tworzenia amyloidów odpowiedzialnych za powstawanie choroby Alzheimera (Schnoor i wsp., 2004; Kanapathipillai i wsp., 2005; Kolp i wsp., 2006). Wykazano, że ektoina jest potencjalnym czynnikiem antywirusowym i przeciwzapalnym (Lapidot et al., 1995; Sydlik i wsp., 2009). Przeprowadzone badania wykazały też, że ektoina chroni neutrofile przed apoptozą oraz działa krioprotekcyjnie na komórki macierzyste ssaków (Grein i wsp., 2010; Sydlik i wsp., 2013).

Cel badań

Dostępne w literaturze wyniki badań w przeważającej większości dotyczą ochronnego działania ektoiny na makromolekuły i komórki, natomiast bardzo niewiele jest danych na temat wpływu tego aminokwasu na całe zwierzęta poddane różnym czynnikom stresowym. Brakuje również informacji na temat działania ektoiny na zachowanie, procesy fizjologiczne oraz biochemiczne u bezkręgowców w warunkach stresu i jej potencjalnego ochronnego działania na kręgowce przed działaniem toksyn bakteryjnych.

Głównym osiągnięciem naukowym prowadzonych przeze mnie badań było stwierdzenie ochronnego wpływu ektoiny na parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne zwierząt w warunkach stresu wywołanego różnymi czynnikami.

W badaniach, w których jako model wykorzystałem rozwielitki (*Daphnia magna*) oraz izolowane erytrocyty bydłęce określiłem:

1. **Wpływ dodatku ektoiny** na przeżywalność, szybkość pływania, częstotliwość pracy serca, aktywność odnóży tułowiowych, poziom hemoglobiny, aktywność katalazy oraz poziom pochodnych tlenku azotu u rozwielitek (*Daphnia magna*);
2. Ochronne działanie ektoiny na rozwielitki poddane **stresowi cieplnemu**. Podczas stopniowego podwyższania temperatury zwierzęta eksperymentalne zbadałem pod kątem przeżywalności, szybkości pływania, częstotliwości pracy serca, aktywności odnóży tułowiowych, poziomu białka szoku cieplnego HSP70, aktywności katalazy oraz poziomu pochodnych tlenku azotu;
3. Ochronne działanie ektoiny na rozwielitki poddane **stresowi chemicznemu** wywołanego obecnością **nadtlenku wodoru**, nieorganicznego związku o silnym działaniu utleniającym. U zwierząt eksponowanych na kombinacje tych dwóch substancji w różnych stężeniach zbadałem przeżywalność, szybkość pływania, częstotliwość pracy serca, aktywność odnóży tułowiowych, stosunek glutationu (GSH) do jego utlenionej formy (GSSG), aktywność katalazy oraz poziom pochodnych tlenku azotu;

4. Ochronne działanie ektoiny na rozwielitki poddane **stresowi chemicznemu** wywołanego obecnością **formaldehydu**, organicznego związku toksycznego stosowanego jako środek odkażający. U zwierząt traktowanych kombinacjami tych substancji w różnych stężeniach zbadałem przeżywalność, szybkość pływania, częstotliwość pracy serca, aktywność odnóży tułowiowych, stosunek glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG), aktywność katalazy oraz poziom pochodnych tlenu azotu;
5. Ochronne działanie ektoiny na erythrocyty bydlęce poddane **działaniu gronkowcowej α -hemolizyny**. Badania dotyczyły określenia stopnia hemolizy oraz stosunku glutationu zredukowanego (GSH) do utlenionego (GSSG) w erythrocytach traktowanych kombinacjami różnych stężeń toksyny i aminokwasu.

Omówienie przedstawionych prac

Wyniki poniżej opisanych badań wskazują jednoznacznie, że występuje ochronne działanie ektoiny wyrażone poprzez przedłużenie przeżywalności oraz łagodzenie zmian parametrów behawioralnych, fizjologicznych oraz biochemicznych rozwielitek poddanych ekspozycji na różne czynniki stresu. W przeprowadzonych badaniach stwierdziłem także, że ektoina w dużym stopniu łagodzi działanie toksyny bakteryjnej na izolowane komórki ssaków.

1. Ektoina moduluje parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne bezkręgowców wodnych. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że ektoina jest dobrze tolerowana w zakresie stężeń 2.5-25 mg/L, jednakże wykazuje modulujące działanie na parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne w sposób zależny od koncentracji. Badania toksyczności na organizmach *Daphnia magna* wykazały, że ektoina w stężeniu 50 mg/L wywołała 90% śmiertelność rozwielitek po 96-godzinnej ekspozycji. Natomiast znacznie większą tolerancję na ten aminokwas zaobserwowałem w niższych koncentracjach. Ektoina w stężeniu 25 mg/L oraz niższych nie powodowała śmiertelności zwierząt w 48 godzinnym teście przeżywalności. Z uwagi na wysoką toksyczność ektoiny w stężeniu 50 mg/L w dalszych badaniach stosowałem niższe koncentracje tego aminokwasu w zakresie 2.5-25 mg/L.

Rozwielitki są dobrym modelem do analizy ruchliwości umożliwiającej skuteczną ocenę subletalnego działania związków toksycznych. Stwierdzono, że niektóre ksenobiotyki nawet w niskich stężeniach mogą wywoływać nieprawidłowości poruszania się tych zwierząt. Spośród wielu wskaźników ruchu najczulszym biomarkerem jest szybkość pływania. Przy wykorzystaniu cyfrowej analizy obrazu z nowatorskim zastosowaniem programu komputerowego Tracker® (osiągnięcie to zostało opisane poniżej) wykazałem, iż ektoina powoduje zmniejszenie ruchliwości rozwielitek w sposób zależny od stężenia. Aminokwas w stężeniu 25 mg/L wywołał prawie trzykrotne zmniejszenie prędkości pływania po 24 godzinach ekspozycji. Hamowanie ruchliwości bezkręgowców może być rezultatem zmniejszenia przewodnictwa nerwowo-mięśniowego, co również obserwowane jest w przypadku innych osmoprotektantów, tauryny oraz

glicyny. Wyniki moich obserwacji wykazały, iż zwierzęta eksperymentalne eksponowane na powyższe stężenie ektoiny wykazywały dłuższe fazy bezruchu pomiędzy skokami, wynikające z obniżenia sprawności ruchowej organizmów. Zahamowanie prędkości pływania rozwielitek ustępowało jednak po przeniesieniu rozwielitek do czystego medium.

Rozwielitki okazały się również unikalnym modelem badawczym stosowanym w fizjologii porównawczej ze względu na przezroczystość pancerza, co umożliwia dokładną ocenę czynności narządów wewnętrznych. Dzięki połączeniu aparatu cyfrowego z mikroskopem optycznym mogłem dokładnie ocenić wpływ substancji bioaktywnych na funkcjonowanie serca. Serce rozwielitek, w odróżnieniu od większości stawonogów, składa się z pojedynczej warstwy komórek mięśniowych, co umożliwia wykorzystanie tego narządu jako modelu do badania działania środków farmakologicznych, a co za tym idzie, do ekstrapolacji uzyskanych wyników na zwierzęta wyższe. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały, że ektoina moduluje częstotliwość skurczów serca tych zwierząt. Niższe stężenia (2.5 i 4 mg/L) tego aminokwasu wywołują podwyższenie o 10% natomiast wyższe (20 i 25 mg/L)-zmniejszenie liczby uderzeń serca na minutę o 10% w porównaniu do nieeksponowanych, kontrolnych zwierząt. Modułacja częstotliwości skurczów serca może być wynikiem interakcji ektoiny z sercową ATP-azą Na^+/K^+ .

Aktywność odnóży tułowiowych pełniących u rozwielitek funkcję wentylacyjno-filtracyjną zmienia się pod wpływem związków biologicznie czynnych wskazując na status zdrowotny tych organizmów. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, iż aktywność odnóży określana za pomocą liczby uderzeń na minutę ulega zmianie u skorupiaków eksponowanych na różne stężenia ektoiny. 24-godzinna ekspozycja na ektoinę w stężeniach 2.5, 4 i 20 mg/L powoduje podwyższenie aktywności o 10%, natomiast traktowanie aminokwasem w stężeniu 25 mg/L skutkuje obniżeniem aktywności odnóży o 10%. Uzyskane wyniki sugerują, że ektoina może w niewielkim stopniu modulować aktywność wentylacyjną u wioślarek, co może być wynikiem jej działania na układ nerwowy oraz mięśniowy.

Zmiana warunków środowiskowych może wywoływać u rozwielitek reakcję adaptacyjną polegającą na zwiększonej produkcji hemoglobiny. Przeprowadzone przeze mnie badania biochemiczne z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego (ELISA) wykazały, że zwierzęta traktowane stężeniem ektoiny 25 mg/L wykazywały przejściowy wzrost poziomu hemoglobiny o 10%, która kumulowała się w epipoditach, co objawiało się delikatną zmianą barwy (zaróżowieniem) tych narządów. Jednak po 24 i 48 godzinach poziom hemoglobiny obniżył się nawet poniżej wartości kontrolnych, odpowiednio o 30 i 50%. Przejściowy wzrost poziomu hemoglobiny może być efektem procesu adaptacji rozwielitki do środowiska wodnego zawierającego ektoinę, natomiast następujące po nim obniżenie jej poziomu może wynikać ze znacznej poprawy utlenowania tkanek, jednak pełne wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Katalaza jest powszechnie występującym w organizmach enzymem z grupy oksydoreduktaz, który rozkłada powstający w naturalnych procesach toksyczny nadtlenuk

wodoru do wody i tlenu. Zwiększenie aktywności tego enzymu jest zwykle związane z występowaniem stresu oksydacyjnego. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że rozwielitki traktowane przez 24 godziny ektoiną w stężeniu 25 mg/L charakteryzowały się podwyższeniem o 15%, a następnie zmniejszeniem aktywności katalazy do wartości kontrolnych po 48 godzinach. Nie stwierdziłem natomiast zmian w aktywności enzymu po ekspozycji zwierząt na ektoinę w niższych koncentracjach. Przejściowe podwyższenie aktywności katalazy przy wyższym stężeniu aminokwasu może być związane z procesami adaptacyjnymi organizmu.

Tlenek azotu w niskich stężeniach pełni rolę wyłapywacza wolnych rodników, jednak podwyższone jego stężenie w tkankach obserwowane po zadziałaniu związków bioaktywnych może wskazywać na stres oksydacyjny. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że ektoina stymuluje produkcję pochodnych tlenku azotu (NO_x) w koncentracji 25 mg/L o 15%, jednak po 48 godzinach wzrost wynosił jedynie 10% w porównaniu do kontroli [Bownik et al., *Comp. Biochem. Physiol. C*, poz. 1]. Przejściowy wzrost NO_x może być rezultatem reakcji rozwielitek na stres wywołany obecnością ektoiny w środowisku wodnym.

Reasumując tę część wyników badań, należy podkreślić, iż ektoina jest dobrze tolerowana przez rozwielitki w zakresie stężeń 2.5-25 mg/L, gdyż nie wywołuje śmiertelności w testach 24 i 48 godzinnych. Zanotowano natomiast niewielką modulację parametrów fizjologicznych przy stężeniu 25 mg/L, co może świadczyć o słabej interakcji aminokwasu ze związkami endogennymi organizmu. Wykazane zmiany jednak posiadają charakter przejściowy. Podwyższenie wskaźników biochemicznych stwierdzone jedynie w najwyższym stosowanym stężeniu ektoiny (25 mg/L) jest prawdopodobnie również konsekwencją przejściowej reakcji adaptacyjnej do aminokwasu obecnego w medium hodowlanym.

2. Ektoina działa ochronnie na parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne bezkręgowców wodnych podczas stresu cieplnego. Wysoka temperatura jest jednym z najpowszechniej występujących środowiskowych czynników stresowych wywołujących zmiany metabolizmu komórki spowodowane denaturacją białek enzymatycznych i strukturalnych. Jednym z objawów przegrzania organizmów wodnych jest stopniowa utrata zdolności poruszania prowadząca do immobilizacji (unieruchomienia). Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że ektoina jest czynnikiem przeciwstresowym łagodzącym skutki stresu cieplnego u rozwielitek. Aminokwas ten w sposób zależny od stężenia przedłuża czas do immobilizacji organizmów poddanych stopniowemu podwyższaniu temperatury w gradiencie 1°C oraz $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ w zakresie temperatury $23-45^\circ\text{C}$. Rozwielitki traktowane ektoiną w stężeniu na 25 mg/L poddane stresowi cieplnemu w gradiencie $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ulegały immobilizacji po dwukrotnie dłuższym czasie w porównaniu do zwierząt nie traktowanych tym aminokwasem. Ektoina działa również ochronnie na organizmy testowe poddane łagodniejszemu gradientowi temperatury $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$. Immobilizację na poziomie 100% u

zwierząt nie eksponowanych na ektoinę zaobserwowałem po 150 min, natomiast u traktowanych dodatkowo aminokwasem, po 270 min stresu cieplnego.

Zaobserwowałem, że ektoina łagodzi zmiany szybkości pływania rozwielitek w warunkach stresu cieplnego. U zwierząt nie eksponowanych na aminokwas stopniowy wzrost temperatury w gradiencie $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ wywołał zwiększenie aktywności ruchowej, która w 37°C była 2 razy większa w porównaniu do kontroli (23°C). Natomiast zwierzęta traktowane ektoiną w stężeniu 25 mg/L cechowały się jedynie 20% wzrostem szybkości pływania w porównaniu do kontroli. Ochronne działanie ektoiny zanotowałem również u zwierząt eksponowanych na stres cieplny przy wolniejszym wzroście temperatury. Łagodzenie zmian szybkości poruszania jest prawdopodobnie wynikiem ochronnego działania ektoiny na makromolekuły i błony komórkowe układu nerwowego i mięśniowego.

Zwierzęta nie eksponowane na ektoinę w trakcie wzrostu temperatury w obu gradientach charakteryzowały się stopniowym wzrostem częstotliwości skurczów serca o 20% przy 37°C prawdopodobnie spowodowanym podwyższeniem tempa metabolizmu. Natomiast w przedziale temperatury $37\text{-}42^{\circ}\text{C}$ zaobserwowałem gwałtowny, 5-krotny spadek częstotliwości skurczów serca. Rozwielitki traktowane ektoiną i poddane stresowi cieplnemu w obu gradientach temperatury wykazywały zróżnicowaną aktywność serca niezależną od stężenia aminokwasu. Stężenie 2.5 mg/L najskuteczniej łagodziło zmiany wyrażone niższą częstotliwością skurczów serca przy temperaturze 37°C . Efekt ochronny ektoiny na pracę serca nie był również jednakowy w każdym zakresie temperatury. Interesujące, iż ze wzrostem temperatury w zakresie $23\text{-}30^{\circ}\text{C}$ częstotliwość skurczów serca rozwielitek traktowanych ektoiną była niższa od wartości kontrolnych. W temperaturze $37\text{-}42^{\circ}\text{C}$ ektoina w niższych stężeniach (2.5 oraz 4 mg/L) spowodowała 20% złagodzenie wzrostu częstotliwości skurczów serca, natomiast nie zanotowałem takiego efektu w stężeniu 25 mg/L .

Powszechnie wiadomo, że wraz ze wzrostem temperatury zmniejsza się ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie. Aby w takich warunkach zapewnić wystarczającą wymianę gazową odnóża tułowiowe rozwielitek zwiększają swą aktywność. W przeprowadzonych badaniach stwierdziłem, że zwierzęta poddane stresowi cieplnemu w obu gradientach temperatury dodatkowo traktowane ektoiną w stężeniu 25 mg/L wykazywały o 20% mniejszy wzrost aktywności odnóży, co sugeruje działanie stabilizujące tego aminokwasu na białka i błony komórkowe tkanek uczestniczących w tym procesie.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że rozwielitki będące pod wpływem szoku cieplnego wykazują podwyższony poziom NO_x , co wskazuje na występowanie stresu oksydacyjnego. Zwierzęta dodatkowo traktowane ektoiną w stężeniu 25 mg/L charakteryzowały się dwukrotnie oraz trzykrotnie wyższym poziomem NO_x odpowiednio w gradiencie 1°C i $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Uzyskane wyniki wskazują, że ektoina w obecności stresu cieplnego może podwyższać poziom pochodnych tlenku azotu u zwierząt.

Stres cieplny prowadzi do zwiększenia produkcji enzymów antyoksydacyjnych takich jak katalaza. W swoich badaniach wykazałem, że rozwielitki nie ekspozycjonowane na ektoinę i poddane stopniowemu wzrostowi temperatury w gradiencie 1°C/min wykazywały 4-krotne podwyższenie poziomu tego enzymu w temperaturze 40°C w stosunku do zwierząt kontrolnych (23°C). Znacznie słabszy wzrost katalazy zaobserwowano natomiast u rozwielitek traktowanych ektoiną. Najniższy stopień stymulacji (o 80%) wywołał aminokwas w stężeniu 25 mg/L. Łagodzenie wzrostu aktywności tego enzymu przez ektoinę zanotowałem również przy wolniejszym gradiencie temperatury, jednakże w tym przypadku wyższa aktywność katalazy wystąpiła u zwierząt zarówno traktowanych jak i nie poddanych działaniu ektoiny. Efekt ten spowodowany jest prawdopodobnie łagodniejszymi zmianami umożliwiającymi efektywniejszą produkcję enzymu.

Białka szoku cieplnego (HSPs-Heat Shock Proteins) podzielone na kilka grup ze względu na masę cząsteczkową pełnią ochronną rolę przed czynnikami denaturującymi w stosunku do innych białek aktywując procesy naprawcze zapewniające ich prawidłową strukturę przestrzenną. Jednym z najlepiej opisanych związków tego typu o dobrze zachowanej homologii jest HSP70 (70 kDa), który zwiększa swoją aktywność w czasie stresu cieplnego. Wyniki moich badań wykazały, iż rozwielitki reagują na stopniowo zwiększaną temperaturę w gradiencie 1°C/min oraz 0.1°C/min odpowiednio cztero- oraz dwudziestokrotnie zwiększoną produkcją tego białka przy 40°C w porównaniu do kontroli (23°C). Z drugiej jednak strony, organizmy traktowane ektoiną znacznie słabszy wzrost. Najistotniejsze obniżenie stymulacji (50% w gradiencie 1°C/min oraz pięciokrotne w gradiencie 0.1°C/min) zaobserwowałem w najwyższym zastosowanym stężeniu (25 mg/L) aminokwasu. Z przeprowadzonych badań wynika, iż aktywność HSP70 jest niższa podczas stresu cieplnego u zwierząt dodatkowo traktowanych ektoiną, co sugeruje, że ochronne działanie ektoiny związane jest raczej ze zmniejszeniem poziomu stresu niż wynikiem indukcji czynników ochronnych w organizmie [Bownik et al., *J. Comp. Physiol.* poz. 2].

3. Ektoina działa ochronnie na bezkręgowce wodne przed toksycznym działaniem czynników chemicznych (nadtlenuk wodoru i formaldehyd). Nadtlenuk wodoru (H₂O₂) jest związkiem nieorganicznym o silnych właściwościach utleniających powszechnie wykorzystywanym w przemyśle chemicznym jako utleniacz, środek wybielający (roztwór 3-15%), odkażający w postaci wody utlenionej (roztwór 3-5%). Nadtlenuk wodoru stosowany jest również w hodowli ryb. W handlu dostępny jest dopuszczony przez FDA (Food and Drug Administration) preparat o nazwie 35% Perox-Aid® stosowany do leczenia chorób bakteryjnych, takich jak choroba skrzelii wywołana przez *Flavobacterium branchiophilum* oraz do zwalczania pleśni wodnej (saprolegniales) atakującej ikrę ryb. Nadtlenuk wodoru rzucany z gospodarstw rybackich bezpośrednio do wód powierzchniowych po przeprowadzeniu zabiegów terapeutycznych u ryb może niekorzystnie wpływać na inne zwierzęta istotne z punktu widzenia zachowania równowagi ekologicznej w środowisku wodnym. Związek ten został także zaproponowany do likwidacji zakwitów sinicowych, jednak jego optymalną skuteczność obserwuje się w koncentracjach znacznie przewyższających wartości bezpieczne dla bezkręgowców wodnych. Przeprowadzone przez mnie badania wykazały, że rozwielitki poddane

ekspozycji na nadtlenek wodoru w stężeniach 5 oraz 10 mg/L wykazywały 100% śmiertelność odpowiednio po 72 i 48 godzinach ekspozycji. Z drugiej jednak strony, zwierzęta eksponowane dodatkowo na ektoinę charakteryzowały się dłuższą przeżywalnością w sposób zależny od koncentracji. Ponad dwukrotnie dłuższy czas przeżywania charakteryzował rozwielitki eksponowane na kombinację nadtlenu wodoru z najwyższym stężeniem ektoiny (25 mg/L) w porównaniu do zwierząt traktowanych samym oksydantem. Dłuższy czas przeżywania zwierząt zaobserwowałem także w kombinacjach zawierających niższe stężenia ektoiny, jednak efekt ochronny aminokwasu był wówczas mniej wyraźny.

W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że H_2O_2 w stężeniach 5 oraz 10 mg/L zmniejsza ruchliwość rozwielitek, z drugiej jednak strony skorupiaki dodatkowo traktowane ektoiną wykazywały większą prędkość. Najwyraźniejszy efekt ochronny (ponad czterokrotnie wyższa prędkość poruszania się) zanotowałem po 72 godzinnej ekspozycji zwierząt na kombinację 5 mg/L H_2O_2 +25 mg/L ektoiny. Zjawisko to jest prawdopodobnie wynikiem zwiększonej stabilności błon komórkowych i białek włókien mięśniowych rozwielitek traktowanych ektoiną oraz bezpośrednim wiązaniem przez aminokwas cząsteczek nadtlenu wodoru.

Rozwielitki poddane 24 godzinnej ekspozycji na nadtlenek wodoru w stężeniu 10 mg/L charakteryzowały się ponad czterokrotnym obniżeniem częstotliwości skurczów serca oraz aktywności odnóży tułowiowych w porównaniu do kontroli. Natomiast zwierzęta dodatkowo traktowane ektoiną wykazywały mniejszą supresję tych dwóch parametrów fizjologicznych. Najbardziej efektywne działanie łagodzące zanotowałem w kombinacji 5 mg/L H_2O_2 +25 mg/L ektoiny.

Narażenie organizmu na związki utleniające prowadzi do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu działających destrukcyjnie na białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe, co z kolei indukuje produkcję czynników antyoksydacyjnych. Glutation jest tripeptydem zbudowanym z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny posiadającym właściwości antyutleniające. Związek ten odpowiedzialny za detoksykację wielu ksenobiotyków jest bardzo czułym biomarkerem stresu oksydacyjnego. Określenie stosunku glutationu (GSH) do jego utlenionej formy (GSSG) pozwala zmierzyć poziom stresu oksydacyjnego u rozwielitek. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że ekspozycja zwierząt na sam nadtlenek wodoru w stężeniach 5 i 10 mg/L wywołała odpowiednio 5- i prawie 6-krotne obniżenie GSH/GSSG w porównaniu z kontrolą. Natomiast stosunek ten był znacznie wyższy u rozwielitek dodatkowo traktowanych ektoiną, co wskazuje na niższy stopień utlenienia glutationu a tym samym antyoksydacyjne działanie ektoiny. Najśłabsze obniżenie stosunku GSH/GSSG (o 20% w porównaniu do kontroli) stwierdzono u zwierząt eksponowanych na kombinację 5 mg/L H_2O_2 +25 mg/L ektoiny.

Zwierzęta eksponowane na nadtlenek wodoru wykazują zwiększoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym katalazy. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach stwierdziłem, że poziom tego enzymu był aż 9-krotnie wyższy u rozwielitek

eksponowanych na 5 oraz 10 mg/L H_2O_2 . Natomiast istotne łagodzenie wzrostu aktywności tego enzymu zaobserwowałem u skorupiaków traktowanych różnymi kombinacjami nadtlenu wodoru z ektoiną. Najniższą, 2-krotną stymulację aktywności katalazy wykazywały zwierzęta eksponowane na 5 mg/L H_2O_2 +25 mg/L ektoiny.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że 24-godzinna ekspozycja na nadtlenek wodoru wywołuje dwukrotne podwyższenie poziomu NO_x u rozwielitek w porównaniu do kontroli, co najprawdopodobniej związane jest z indukcją stresu oksydacyjnego. Z drugiej jednak strony, skorupiaki eksponowane na kombinację nadtlenu wodoru z ektoiną wykazywały znacznie słabszy wzrost poziomu tego biomarkera. Najwyższy stopień łagodzenia wywoływała mieszanina 5 mg/L H_2O_2 +25 mg/L ektoiny. Interesujące, iż sama ektoina w stężeniu 25 mg/L wywołuje zwiększenie produkcji pochodnych tlenku azotu, natomiast w stosunku do nadtlenu wodoru wykazuje działanie antagonistyczne [Bownik & Stępniewska, *Comp. Biochem. Physiol.* poz. 3].

Formaldehyd (CH_2O) jest szeroko stosowanym związkem organicznym wchodzącym w skład niektórych kosmetyków oraz popularnym w medycynie i rolnictwie środkiem odkażającym o działaniu bakterio-, grzybo- i pierwotniakobójczym. CH_2O jest substancją o silnym działaniu toksycznym wywołującą denaturację enzymów oraz białek strukturalnych, natomiast badania na ssakach wykazały również działanie kancerogenne. Niekontrolowane stosowanie formaldehydu w gospodarstwach rybackich może stanowić zagrożenie dla innych zwierząt wodnych, gdyż zrzucany bez wcześniejszej neutralizacji do wód powierzchniowych po zabiegach dezynfekcyjnych może być przyczyną zatruc bardzo wrażliwego zooplanktonu, co w konsekwencji oznacza zaburzenie równowagi ekologicznej w ekosystemach wodnych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na toksyczność formaldehydu w stężeniach 20 i 60 mg/L dla rozwielitek, jednak zwierzęta dodatkowo traktowane ektoiną w koncentracji 25 mg/L charakteryzowały się ponad dwukrotnie dłuższą przeżywalnością. Ponadto, zwierzęta te po 24-godzinnej ekspozycji cechowały się większą ruchliwością o 70%, podwyższoną częstotliwością skurczów serca oraz aktywności odnóży tułowiowych, odpowiednio o 60% i 80%. Stwierdziłem, że ektoina łagodzi również niekorzystne zmiany biochemiczne. Porównując parametry w grupach eksperymentalnych do wartości kontrolnych, najmniejsze obniżenie GSH/GSSG (o 10%), najslabszą stymulację aktywności katalazy (o 50%) i poziomu pochodnych tlenku azotu (o 20%) stwierdziłem u zwierząt eksponowanych na kombinację 20 mg/L formaldehydu z ektoiną w stężeniu 25 mg/L [Bownik & Stępniewska, *Eviron Sc. Pollut. Res.* poz. 6].

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują, iż ektoina zmniejsza toksyczność czynników chemicznych u wioślarek. Mechanizm ochronnego oddziaływania może być związany z łagodzeniem denaturującego działania nadtlenu wodoru i formaldehydu w stosunku do enzymów, białek strukturalnych oraz błon komórkowych oraz dodatkowo wiązaniem, a tym samym neutralizowaniem tych związków. Ze względu na fakt, iż ektoina zmniejsza poziom stresu oksydacyjnego u zwierząt, możliwe jest

potencjalne wykorzystanie tego aminokwasu jako ochronnego czynnika przed związkami o działaniu oksydacyjnym.

4. Ektoina działa ochronnie na erythrocyty ekspozowane na gronkowcową α -hemolizynę. Toksyny produkowane przez liczne gatunki bakterii chorobotwórczych są ważnymi czynnikami wirulencji ułatwiającymi kolonizację organizmu gospodarza. Toksyny porotwórcze należą do swoistej grupy toksyn tworzących transbłonowe kanały w błonie komórek docelowych, co prowadzi do zaburzeń funkcjonowania błon komórkowych. Wiele szczepów chorobotwórczych gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) wywołujących choroby, takie jak zapalenie płuc, czyracyca oraz liszajec wytwarza jednocześnie kilka rodzajów toksyn porotwórczych takich jak α -hemolizyna, leukocydyny, γ -hemolizyny, które charakteryzują się swoistością działania w stosunku do określonego typu komórek. α -hemolizyna wydzielana jest w postaci rozpuszczalnych w wodzie monomerów, które oligomeryzując w błonie komórki docelowej prowadzą do powstania stabilnego, heptamerowego transbłonowego kanału jonowego [Bownik, **Bezkresy Wiedzy, poz. 7**]. Duża liczba kanałów jonowych zwykle prowadzi do zmniejszenia selektywności błony komórkowej, a co za tym idzie zaburzenia metabolizmu, a następnie lizy komórki docelowej. Najbardziej wrażliwymi komórkami na działanie α -hemolizyny są erythrocyty, leukocyty, płytki krwi oraz komórki śródbłonna. Przeprowadzone przeze mnie badania *in vitro* wykazały, że ektoina jest czynnikiem efektywnie obniżającym destrukcyjne działanie α -hemolizyny gronkowcowej na erythrocyty bydłce. Ekspozycja na kombinację zawierającą 5 $\mu\text{g/mL}$ toksyny+100 $\mu\text{g/mL}$ ektoiny, przy jednoczesnym podaniu obu składników do zawiesiny komórek, wywołała obniżoną hemolizę o 60% w porównaniu do erythrocytów ekspozowanych na samą toksynę. Efekt łagodzący był skorelowany pozytywnie ze stężeniem ektoiny, jednakże przy najwyższym zastosowanym stężeniu aminokwasu (150 $\mu\text{g/mL}$) hamowanie hemolizy było mniej efektywne. Z drugiej jednak strony, ekspozycja na kombinację, która zawierała wcześniej preinkubowaną toksynę z ektoiną wywołała silniejszy efekt łagodzący, a szczególnie skuteczne działanie ochronne (zahamowanie hemolizy o 80%) zaobserwowano w kombinacji 5 $\mu\text{g/mL}$ toksyny+150 $\mu\text{g/mL}$ ektoiny. Uzyskane wyniki wskazują więc na niezwykle ciekawą interakcję aminokwasu z monomerami toksyny, prowadzącą do zahamowania hemolitycznego działania toksyny poprzez jej stabilizację uniemożliwiającą zmianę jej struktury przestrzennej niezbędnej do oligomeryzacji i tworzenia transbłonowych kanałów w erythrocytach. Przeprowadzone badania wykazały również, że ektoina zmniejsza stres oksydacyjny wywołany działaniem gronkowcowej α -hemolizyny. Stosunek GSH/GSSG był o 50% wyższy w erythrocytach traktowanych kombinacją toksyny z ektoiną niż komórek ekspozowanych wyłącznie na samą toksynę. Efekt łagodzący (obniżenie stresu oksydacyjnego o 60%) był najbardziej wyraźny po preinkubacji 5 $\mu\text{g/mL}$ toksyny+150 $\mu\text{g/mL}$ ektoiny, co także sugeruje, iż wprowadzony aminokwas może stabilizować toksynę uniemożliwiając zmianę jej struktury przestrzennej, chociaż nie należy wykluczać działania stabilizującego aminokwasu na błonę komórek docelowych [Bownik & Stępniewska, **Toxicon, poz. 4**]. Hamowanie aktywności niektórych białek przez ektoinę zostało potwierdzone również w badaniach przeprowadzonych przez innych

autorów. Stwierdzono m.in., że osmoprotektant ten hamuje agregację i znosi toksyczne efekty wywołane przez amyloidy odpowiedzialne za chorobę Alzheimera (Kanapathipillai i wsp. 2005). Uzyskane rezultaty moich badań wskazują, iż ektoina jest czynnikiem hamującym lizę erytrocytów, dlatego też aminokwas ten może być traktowany jako obiecujący czynnik łagodzący następstwa infekcji wywoływanych przez gronkowca złocistego.

5. Inne efekty ochronne ektoiny. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały również, iż ektoina w stężeniu 25 mg/L zwiększa przeżywalność rozwielitek poddanych krótkotrwałej, 2-minutowej ekspozycji na temp. -15°C . Stwierdziłem również, że przy stopniowym obniżaniu temperatury do 0°C aktywność serca zwierząt dodatkowo traktowanych tym aminokwasem w stężeniu 4 mg/L spadała o 15% wolniej. Ponadto, w testach na wysychanie rozwielitki umieszczone w roztworze zawierającym 25 mg/L ektoiny cechowały się dłuższą przeżywalnością o 40% w porównaniu do nie traktowanych zwierząt [Bownik, Bezkresy Wiedzy, poz. 7].

Do moich osiągnięć naukowych należy również nowatorskie zastosowanie programów komputerowych Tracker® 4.87 do oceny ruchliwości i aktywności serca oraz Image Tool® do określenia powierzchni serca w fazie systolicznej oraz diastolicznej rozwielitek. Tracker® jest ogólnie dostępnym programem do analizy zapisu video oraz modelowania (<http://www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker/>). Szczególne cechy programu pozwalają na wykorzystanie go w naukach biologicznych do jednoczesnego śledzenia kilku parametrów ruchu zwierząt eksperymentalnych: szybkości, toru oraz przebytego dystansu mających istotne znaczenie przy określaniu działania związków bioaktywnych na układ nerwowy i mięśniowy. Analiza cyfrowa metodą „klatka po klatce” filmu video nagranego z prędkością 30 klatek/s umożliwia dokładne określenie szybkości skurczów serca rozwielitek. Program Tracker® może więc być znakomitym narzędziem badawczym dla behawiorystów oraz specjalistów z fizjologii porównawczej. Cyfrową analizę obrazu przeprowadzoną za pomocą tego programu w badaniach nad ektoiną wprowadziłem po raz pierwszy w moich badaniach do określenia ruchliwości oraz aktywności serca rozwielitek eksponowanych na olejek goździkowy pochodzący z rośliny *Eugenia caryophyllus*, który jest miejscowym anestetykiem powszechnie stosowanym w stomatologii oraz środkiem znieczulającym wykorzystywanym do znieczulania ogólnego w gospodarstwach rybackich. Wyniki tych badań wykazały toksyczność olejku goździkowego na rozwielitki objawiającą się obniżeniem szybkości pływania, występowaniem arytmii oraz obniżeniem szybkości skurczów serca, stąd niekontrolowane stosowanie go w zbiornikach wodnych może przyczynić się do wymierania istotnego dla ekosystemu wodnego zooplanktonu oraz innych, równie ważnych ekologicznie organizmów [Bownik, Turk. J. Fish. Aquat. Sc., poz. 5]. Analizę parametrów behawioralnych i fizjologicznych z wykorzystaniem wyżej przedstawionych programów zastosowałem również we wszystkich badaniach opublikowanych w cyklu habilitacyjnym.

Omówione powyżej rezultaty zawarte w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe są nie tylko znacznym rozszerzeniem dotychczasowej wiedzy na temat działania

ektoiny ale również dotyczą zupełnie nowych aspektów rozpoznania jej właściwości przy ekspozycji całych organizmów na różne czynniki stresowe. Stwierdziłem bowiem, że ektoina wykazuje działanie ochronne u zwierząt w warunkach stresu wywołanego przez czynniki fizyczne (wysoka temperatura), toksyczne związki chemiczne (nadtlenek wodoru, formaldehyd) oraz skutecznie chroni komórki przed działaniem toksyn bakteryjnych. Uzyskane wyniki posiadają walory aplikacyjne i stanowią podstawę do dalszych badań nad zastosowaniem tego aminokwasu u zwierząt wyższych oraz człowieka. Modułujące działanie ektoiny na częstotliwość skurczów serca może sugerować potencjalne wykorzystanie ektoiny jako czynnika regulacyjnego zaburzenia rytmu serca. Aminokwas ten może być również zastosowany jako czynnik ochronny w hodowlach komórkowych przed niekorzystnymi zmianami wywołanymi wysoką temperaturą. Wyniki moich badań sugerują również potencjalne zastosowanie ektoiny w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, rybactwie oraz innych dziedzinach życia jako środka łagodzącego efekty uboczne wywoływane przez środki dezynfekujące. Hamowanie efektów toksycznych wywoływanych przez związki chemiczne wskazuje również na zastosowanie ektoiny jako doraźnego środka neutralizującego toksyczne związki w procesie oczyszczania ścieków. Warto również podkreślić, że właściwości ektoiny mogą być wykorzystane do łagodzenia toksycznych następstw infekcji gronkowcowych, co wydaje się szczególnie istotne przy leczeniu chorób wywołanych przez szczepy antybiotykooporne.

Literatura:

- Bownik A.,** Stępniewska Z., Skowroński T. 2015. Effects of ectoine on behavioural, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. and Pharmacol.** 168, 2-10.
- Bownik A.,** Stępniewska Z., Skowroński T. 2014. Protective effects of ectoine on heat-stressed *Daphnia magna*. **J. Comp. Physiol. B.** 184, 961-976.
- Bownik A.,** Stępniewska Z., 2015. Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* subjected to hydrogen peroxide. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. and Pharmacol.** 170, 38-49.
- Bownik A.,** Stępniewska Z., 2015. Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. **Toxicon.** 99, 130-135.
- Bownik A.** 2015. Clove essential oil from *Eugenia caryophyllus* induces anesthesia, alters swimming performance, heart functioning and decreases survival rate during recovery of *Daphnia magna*. **Turk. J. Fish Aquat. Sc.** 15, 157-166.
- Bownik A.,** Stępniewska Z., 2015. Ectoine alleviates behavioural, physiological and biochemical changes in *Daphnia magna* subjected to formaldehyde. **Environ. Sc. Poll. Res** DOI: 10.1007/s11356-015-4747-5.
- Bownik A.** Białkowe toksyny bakteryjne. Struktura, oddziaływanie i zastosowanie wybranych metabolitów bakteryjnych. **Bezkresy Wiedzy**, Saarbrücken. GmbH 2014. ISBN 978-3-639-89168-3.
- Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. **Eur. J. Biochem.** 149, 135-139.

- Grein T.A., Freimark D., Weber C., Hudel K., Wallrapp C., Czermak P. 2010. Alternatives to dimethylsulfoxide for serum-free cryopreservation of human mesenchymal stem cells. *Int. J. Artif. Organs*. 33, 370-80.
- Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B. 2005. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett*. 579, 775-780.
- Kolp S., Pietsch M., Galinski E.A., Gütschow M. 2006. Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1764, 1234-1242.
- Lapidot A., Ben-Asher E., Eisenstein M. 1995. Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA in vitro. *FEBS Lett*. 367, 33-38.
- Pastor J.M., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L.N., Iborra J.L., Vargas C., Nieto J.J., Cánovas M. 2010. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.* 28, 782-801.
- Schnoor M., Voss P., Cullen P., Böking T., Galla H.J., Galinski E.A., Lorkowski S. 2004. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 867-872.
- Sydlik U., Gallitz I., Albrecht C., Abel J., Krutmann J., Unfried K. 2009. The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 29-35.
- Sydlik U., Peuschel H., Paunel-Görgülü A., Keymel S., Krämer U., Weissenberg A., Kroker M., Seghrouchni S., Heiss C., Windolf J., Bilstein A., Kelm M., Krutmann J., Unfried K. 2013. Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *Eur. Respir J.* 41, 433-442.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Problematykę oddziaływania toksyn na układ odpornościowy kręgowców kontynuowałem również po objęciu kierownictwa Katedry przez prof. dr hab. Tadeusza Skowrońskiego w 2005 roku, który był pomysłodawcą badań nad wpływem toksyn sinicowych na układ odpornościowy ryb oraz wprowadził koncepcję wykorzystania biotestów m.in. z zastosowaniem bezkręgowców wodnych słodkowodnych *Daphnia magna*. W tym czasie Katedra rozwinęła również współpracę z Centrum Badań Ekologicznych PAN w Lublinie, w ramach której wykonywane były badania wpływu ekstraktów zakwitów, zawierających toksyny sinicowe, pochodzących z Zalewu Zemborzyckiego oraz innych zbiorników wodnych koło Lublina. W ramach nowej tematyki rozszerzyłem dotychczasową metodykę badawczą wprowadzając i wykorzystując nowe testy umożliwiające dokładniejsze poznanie efektów oraz wyjaśnienie mechanizmów toksycznego działania cyjanotoksyn. Uczestniczyłem w 2 projektach badawczych finansowanych przez MNiSW „Oddziaływanie cyjanotoksyn (mikrocystyny-LR i anatoksyny-a) na układ odpornościowy karpia (*Cyprinus carpio* L)” (N308 027 32/2393) i „Cytotoksyczne oddziaływanie wybranych cyjanotoksyn (mikrocystyny-LR oraz anatoksyny-a) na komórki odpornościowe karpia (*Cyprinus carpio* L)” (NN303 606 138) oraz jako główny wykonawca oraz projekcie zleconym przez Urząd Miasta Lublina

dotyczącym oceny poziomu cyjanotoksyn, mikrocytyn oraz anatoksyny-a w Zalewie Zemborzyckim. Wyniki uzyskanych badań wykazały, iż cyjanotoksyny mogą upośledzać odporność ryb hodowlanych, a tym samym zwiększać podatność tych zwierząt na choroby infekcyjne. Stwierdzone zmiany dotyczyły obniżenia żywotności limfocytów oraz fagocytów, zahamowania zdolności proliferacyjnej limfocytów T i B oraz supresji aktywności fagocytów. Efektem prowadzonych przeze mnie badań są wyniki zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych oraz w pracach opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Wybrane publikacje omówionych wyników podano poniżej:

1. **Bownik A.** 2010. Harmful algae: effects of alkaloid cyanotoxins on animal and human health. **Toxin Rev.** 29, 99-114.
2. **Bownik A.** Rymuszka A. Sierosławska A., Skowroński T. 2012. Anatoxin-a induces apoptosis of leukocytes and decreases the proliferative ability of lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in vitro. **Pol. J. Vet Sci.** 15, 531-535.

W roku 2010 zostałem zaproszony do współpracy naukowej z Uniwersytetem Kalifornijskim w Berkeley, USA, który na wniosek Environmental Protection Agency w Kalifornii nominował, a następnie wyselekcjonował mnie do wykonania wnikliwej analizy i napisania recenzji raportu pt „**Toxicological Summary And Suggested Action Levels To Reduce Potential Adverse Health Effects Of Six Cyanotoxins**”, będącego podstawą ustalenia norm dopuszczalnych stężeń sześciu cyjanotoksyn w zbiornikach wodnych w Kalifornii w USA. Kontynuując moją działalność naukowo-badawczą dotyczącą wpływu cyjanotoksyn na układ odpornościowy ryb, dodatkowo rozszerzałem warsztat metodyczny pozwalający na badanie wpływu tych metabolitów na układ odpornościowy oraz parametry behawioralne fizjologiczne oraz biochemiczne bezkręgowców wodnych.

Plany na przyszłość

Planowane przeze mnie badania w dalszym ciągu będą dotyczyć określenia działania ochronnego ektoiny na organizmy poddane ekspozycji na inne niż dotychczas badane stresory środowiskowe, takie jak promieniowanie jonizujące, UV, nanocząstki oraz pestycydy. Ważnym aspektem przyszłych badań będzie określenie mechanizmów ochronnego oddziaływania, stopnia wchłaniania, rozmieszczenia w organizmie, tempa metabolizmu oraz wydalania aminokwasu. Wyniki będą w dalszym ciągu posiadać wartość aplikacyjną, a jednym z celów badawczych będzie wyznaczenie skutecznych koncentracji ektoiny, zapewniających maksymalną ochronę przed danym czynnikiem stresowym przy wyeliminowaniu ewentualnej toksyczności. Dla potwierdzenia skuteczności jego ochronnego działania konieczne również wydaje się przeprowadzenie badań porównawczych z wykorzystaniem różnych gatunków zwierząt, w tym ssaków

Istotne jest również określenie wpływu ektoiny na układ odpornościowy zwierząt. Dotychczasowa wiedza na ten temat jest ograniczona, gdyż nie zostały poznane w pełni efekty oddziaływania ektoiny na funkcje tego systemu zarówno u bezkręgowców jak i kręgowców. W przypadku stwierdzenia immunostymulującego działania ektoiny realna stała by się możliwość zastosowania tego aminokwasu jako czynnika wzmacniającego odporność. Planowane badania porównawcze dotyczyć więc będą oceny działania ektoiny na parametry odporności komórkowej i humoralnej bezkręgowców lądowych, wodnych, ryb, zwierząt stałocieplnych oraz człowieka w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*.

Kolejnym ważnym aspektem badawczym będzie weryfikacja przydatności ektoiny jako czynnika stabilizującego próbki krwi podczas długiego przechowywania. Przeprowadzone przeze mnie badania wstępne na krwi ludzkiej wykazały zmniejszenie o 60% hemolizy krwinek w próbkach zawierających ektoinę po 120 godzinach przechowywania pełnej krwi w temperaturze pokojowej, co wskazuje na możliwe wykorzystanie ektoiny jako czynnika antyhemolitycznego próbek krwi. Interesująca jest również koncepcja badań porównawczych dotyczących ochronnego działania innych osmoprotektantów, takich jak hydroksyektoina, betaina, prolina, alanina i tauryna oraz określenie ich efektywności w łącznym stosowaniu również z ektoiną w różnych proporcjach. Zasadne wydaje się także określenie poziomu aminokwasu w środowisku wodnym i zbadanie jego wpływu na inne zwierzęta wodne, znoszenie przez organizmy zmian środowiskowych wywołanych licznymi czynnikami jak: zasolenie podłoża, fluktuacje temperatury oraz obecność różnych ksenobiotyków.

Najważniejsze wnioski dotyczące wyników zawartych w cyklu publikacji:

- Ektoina jest związkiem dobrze tolerowanym przez bezkręgowce wodne w zakresie stężeń 2.5-25 mg/L, natomiast w koncentracji 50 mg/L wykazuje działanie letalne;
- Stwierdziłem działanie modulujące ektoiny na parametry behawioralne, fizjologiczne oraz biochemiczne u bezkręgowców wodnych. Aminokwas zmniejsza szybkość pływania rozwielitek w sposób zależny od stężenia, natomiast w stężeniach 2.5-4 mg/L wywołuje podwyższenie skurczów serca oraz aktywności odnóży tułowiowych. Z drugiej jednak strony, ektoina w koncentracji 25 mg/L powoduje obniżenie tych parametrów;
- Ektoina działa ochronnie na bezkręgowce wodne poddane stresowi cieplnemu. Zaobserwowałem zmniejszenie immobilizacji, łagodzenie zmian behawioralnych i parametrów fizjologicznych, jednak efekt ochronny nie jest zależny od koncentracji aminokwasu. Ektoina w stężeniu 25 mg/L zmniejsza stymulację aktywności katalazy, jednak powoduje wzmożoną produkcję NO_x;
- Ektoina działa ochronnie na bezkręgowce wodne eksponowane na nieorganiczne oraz organiczne stresory chemiczne, takie jak nadtlenuk wodoru i formaldehyd. Zaobserwowałem zmniejszenie śmiertelności, łagodzenie zmian behawioralnych, fizjologicznych oraz biochemicznych u zwierząt dodatkowo traktowanych aminokwasem. Najskuteczniejsze działanie ochronne zaobserwowałem w stężeniu 25 mg/L;
- Ektoina działa ochronnie na erytrocyty ssaków eksponowane na gronkowcą α -hemolizynę. Stwierdziłem obniżenie hemolizy i stresu oksydacyjnego w stężeniu 100

$\mu\text{g/mL}$ aminokwasu, jednak skuteczniejszy efekt ochronny zanotowałem po preinkubacji toksyny z aminokwasem;

- Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad zastosowaniem ektoiny jako czynnika ochronnego u zwierząt i człowieka przed stresem cieplnym, toksycznymi związkami chemicznymi oraz toksynami bakteryjnymi.

Adam Bownik