

**POLSKIE TOWARZYSTWO BIOFIZYCZNE**  
Oddział w Lublinie  
**INSTYTUT AGROFIZYKI POLSKIEJ AKADEMII NAUK**  
w Lublinie



**XXIII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne**

Kazimierz Dolny nad Wisłą

24 – 25 maja 2016

**MATERIAŁY KONFERENCYJNE**



Organizatorzy konferencji:

Polskie Towarzystwo Biofizyczne, Oddział w Lublinie  
Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

Komitet Organizacyjny:

Dr hab. Artur Zdunek, prof. IA PAN

Prof. dr hab. Mariusz Gagoś

Dr Agnieszka Nawrocka

Dr Monika Szymańska – Chargot

**Nakład – 35 egz.**

**PROGRAM XXIII LUBELSKICH WARSZTATÓW BIOFIZYCZNYCH****Wtorek, 24 maja 2016**

- 11.00 – 11.10 Otwarcie Warsztatów
- 11.10 – 11.20 Wspomnienia o Panu Zbyszku Konarzewskim  
**Wiesław I. Gruszecki**
- Prowadzenie: **Prof. dr hab. Kazimierz Trębacz**
- 11.20 – 12.00 Badania aktywności biologicznej antybiotyku amfoterycyny B kompleksowanego jonami miedzi (II) oraz modyfikowanego oksydacyjnie na układach modelowych błon lipidowych oraz *in vitro*  
**Mariusz Gagoś**, B. Chudzik, K. Klimek, G. Czernel, M. Arczewska, J. Strubińska, G. Ginalska
- 12.00 – 12.20 Badania molekularnych mechanizmów adaptacyjnych glonów *Chlorella*. Żółknięcie ochroną przed silnym oświetleniem?  
**Wojciech Grudziński, Izabela Krzemińska**, R. Luchowski, A. Nosalewicz, W.I. Gruszecki
- 12.20 – 12.40 Badanie filmu łożowego metodą spektroskopii w podczerwieni  
**Justyna Widomska**, M. Gospodarek, G. Olchowik
- 12.40 – 13.00 Spontaniczne potencjały czynnościowe i cirkumnutacje u *Helianthus annuus*  
**Maria Stolarz**, H. Dziubińska, K. Trębacz
- 13.00 – 13.20 Procedura kalibracji elektronicznego nosa na potrzeby badań jakości materiałów biologicznych  
**Robert Rusinek**, J. Wawrzyniak, M. Gawrysiak-Witulska, M. Gancarz, A. Nawrocka, D. Wiqcek
- 13.30 **Obiad**
- Prowadzenie: **Prof. dr hab. Mariusz Gagoś**
- 16.30 – 16.50 Badanie protekcyjnego gaszenia wzbudzeń nadmiarowych w aparacie fotosyntetycznym *Delonix regia*  
**Renata Welc**, R. Luchowski, E. Reszczyńska, W. Grudziński, W.I. Gruszecki
- 16.50 – 17.10 Organizacja molekularna wybranych 1,3,4-tiadiazoli w układach modelowych o znaczeniu biologicznym  
**Dariusz Kluczyk**, A. Matwijczuk, A. Niewiadomy, M. Gagoś
- 17.10 – 17.30 Wakuolarne kanały anionowe mszaków  
**Mateusz Koselski**, H. Dziubińska, K. Trębacz
- 17.30 – 18.00 **Zebrańie Oddziału Lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego**
- 18.30 **Ognisko**

**Środa, 25 maja 2016**

8.00 Śniadanie

Prowadzenie: **Prof. dr hab. Jan Sielewiesiuk**

9.00 – 9.30 7T rezonans magnetyczny: możliwości badawcze i zastosowania w medycynie  
**Radosław Pietura**

9.30 – 9.50 Jony cynku jako czynnik sieciujący pektyny  
**Diana Ganczarenko**, J. Cybulska, A. Zdunek

9.50 – 10.10 Zastosowanie spektroskopii FTIR-ATR do badania organizacji molekularnej białka apolipoporyny III w błonie lipidowej  
**Emilia Reszczyńska**, M. Palusińska-Szys, A. Zdybicka-Barobas, R. Luchowski, M. Cytryńska, W.I. Gruszecki

10.10 – 10.30 Interakcje genisteiny z komórkami raka szyjki macicy człowieka (HeLa)  
**Justyna Kapral**, B. Pawlikowska-Pawłęga, A. Gawron, R. Paduch, A. Wawrzyniak, I. Łuszczewska-Sierakowska, W.I. Gruszecki

10.30 – 10.50 Biologicznie aktywne metabolity pozyskiwane z mikroglonów  
**Edyta Magierek**, I. Krzezińska, J. Tys

10.50 – 11.10 Przerwa kawowa

Prowadzenie: **dr hab. Artur Zdunek, prof. IA PAN**

11.10 – 11.30 Stabilność termiczna kamieni układu moczowego a ich skład chemiczny i wytrzymałość mechaniczna  
W. Dyś, **Hanna Trębacz**, M. Szymańska-Chargot, A. Zdunek

11.30 – 11.50 Współzależność własności mechanicznych komórek różnego typu  
**Barbara Orzechowska**, J. Wiltowska-Zuber, J. Pabijan, M. Lekka

11.50 – 12.10 Zastosowanie metod stereologicznych do określenia parametrów przestrzennych komórek tkanki roślinnej  
**Marek Gancarz**, A. Nawrocka, R. Rusinek

12.10 – 12.30 Przestrzenne obrazowanie rozwoju porażenia grzybowego owocu jabłoni metodą biospeckli  
**Piotr Mariusz Pieczywek**, A. Kurenda, J. Cybulska, A. Zdunek

12.30 Zakończenie Warsztatów

13.00 Obiad

**SPIS TREŚCI**

BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ANTYBIOTYKU AMFOTERYCYNY B KOMPLEKSOWANEGO JONAMI MIEDZI (II) ORAZ MODYFIKOWANEGO OKSYDACYJNIE NA UKŁADACH MODELOWYCH BŁON LIPIDOWYCH ORAZ <i>IN VITRO</i> <u>Mariusz Gagoś</u> , Barbara Chudzik, Katarzyna Klimek, Grzegorz Czernel, Marta Arczewska, Joanna Strubińska, Grażyna Ginalska	7
ZASTOSOWANIE METOD STEREOLOGICZNYCH DO OKREŚLENIA PARAMETRÓW PRZESTRZENNYCH KOMÓREK TKANKI ROŚLINNEJ <u>Marek Gancarz</u> , Agnieszka Nawrocka, Robert Rusinek	8
JONY CYNKU JAKO CZYNNIK SIECIUJĄCY PEKTYNY <u>Diana Ganczarenko</u> , Justyna Cybulska, Artur Zdunek	9
BADANIA MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW ADAPTACYJNYCH GLONÓW <i>CHLORELLA</i> . ŻÓŁKNIĘCIE OCHRONĄ PRZED SILNYM OŚWIETLENIEM? <u>Wojciech Grudziński</u> , <u>Izabela Krzemińska</u> , Rafał Luchowski, Artur Nosalewicz, Wiesław I. Gruszecki	10
INTERAKCJE GENISTEINY Z KOMÓRKAMI RAKA SZYJKI MACICY CZŁOWIEKA (HeLa) <u>Justyna Kaprał</u> , Bożena Pawlikowska-Pawłęga, Antoni Gawron, Roman Paduch, Agata Wawrzyniak, Iwona Łuszczewska-Sierakowska, Wiesław I. Gruszecki	11
ORGANIZACJA MOLEKULARNA WYBRANYCH 1,3,4-TIADIAZOLI W UKŁADACH MODELOWYCH O ZNACZENIU BIOLOGICZNYM <u>Dariusz Kluczyk</u> , Arkadiusz Matwijczuk, Andrzej Niewiadomy, Mariusz Gagoś	12
WAKUOLARNE KANAŁY ANIONOWE MSZAKÓW <u>Mateusz Koselski</u> , Halina Dziubińska, Kazimierz Trębacz	13
BIOLOGICZNIE AKTYWNE METABOLITY POZYSKIWANE Z MIKROGLONÓW <u>Edyta Magierek</u> , Izabela Krzemińska, Jerzy Tys	14
AGREGACJA BIAŁEK GLUTENOWYCH W CIEŚCIE GLUTENOWYM INDUKOWANA DODATKIEM BŁONNIKÓW POKARMOWYCH <u>Agnieszka Nawrocka</u> , Monika Szymańska-Chargot, Antoni Miś, Marek Gancarz, Robert Rusinek	15
WPŁYW ROŚLINNYCH ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH NA PROCES METANOGENEZY <u>Marta Oleszek</u>	16
WSPÓŁZALEŻNOŚĆ WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH KOMÓREK RÓŻNEGO TYPU <u>Barbara Orzechowska</u> , Joanna Wiltowska-Zuber, Joanna Pabijan, Małgorzata Lekka	17
PRZESTRZENNE OBRAZOWANIE ROZWOJU PORAŻENIA GRZYBOWEGO OWOCU JABŁONI METODĄ BIOSPECKLI <u>Piotr Mariusz Pieczywek</u> , Andrzej Kurenda, Justyna Cybulska, Artur Zdunek	18
ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII FTIR-ATR DO BADANIA ORGANIZACJI MOLEKULARNEJ BIAŁKA APOLIPOFORNYN III W BŁONIE LIPIDOWEJ <u>Emilia Reszczyńska</u> <sup>1</sup> , Marta Palusińska-Szys, Agnieszka Zdybicka-Barobas, Rafał Luchowski, Małgorzata Cytryńska, Wiesław I. Gruszecki	19
PROCEDURA KALIBRACJI ELEKTRONICZNEGO NOSA NA POTRZEBY BADAŃ JAKOŚCI MATERIAŁÓW BIOLOGICZNYCH <u>Robert Rusinek</u> , Jolanta Wawrzyniak, Marzena Gawrysiak-Witulska, Marek Gancarz, Agnieszka Nawrocka, Dariusz Wiącek	20

SPONTANICZNE POTENCJAŁY CZYNNOŚCIOWE I CIRKUMNUTACJE U <i>HELIANTHUS ANNUUS</i> <u>Maria Stolarz</u> , Halina Dziubińska, Kazimierz Trębacz	21
STABILNOŚĆ TERMICZNA KAMIENI UKŁADU MOCZOWEGO A ICH SKŁAD CHEMICZNY I WYTRZYMAŁOŚĆ MECHANICZNA Wojciech Dyś, <u>Hanna Trębacz</u> , Monika Szymańska-Chargot, Artur Zdunek	22
BADANIE PROTEKCYJNEGO GASZENIA WZBUDZEŃ NADMIAROWYCH W APARACIE FOTOSYNTETYCZNYM <i>DELONIX REGIA</i> <u>Renata Welc</u> , Rafał Luchowski, Emilia Reszczyńska, Wojciech Grudziński, Wiesław I. Gruszecki	23
BADANIE FILMU ŁZOWEGO METODĄ SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI <u>Justyna Widomska</u> , Małgorzata Gospodarek, Grażyna Olchowik	24

## **BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ ANTYBIOTYKU AMFOTERYCYNY B KOMPLEKSOWANEGO JONAMI MIEDZI (II) ORAZ MODYFIKOWANEGO OKSYDACYJNIE NA UKŁADACH MODELOWYCH BŁON LIPIDOWYCH ORAZ *IN VITRO***

Mariusz Gagoś<sup>1</sup>, Barbara Chudzik<sup>1</sup>, Katarzyna Klimek<sup>3</sup>, Grzegorz Czernel<sup>2</sup>, Marta Arczewska<sup>2</sup>,  
Joanna Strubińska<sup>1</sup>, Grażyna Ginalska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>2</sup> Zakład Biofizyki w Katedrze Fizyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>3</sup> Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Oportunistyczne zakażenia grzybicze budzą szerokie zainteresowanie w świecie medycznym. Amfoterycyna B (AmB), która jest najpowszechniej stosowanym antybiotykiem z grupy polienów w praktyce klinicznej uznany za złoty standard w leczeniu ciężkich grzybic systemowych, pozostaje ciągle jednym z najbardziej toksycznych farmaceutyków. Wychodząc na przeciw takim potrzebom w naszym zespole zsyntetyzowano kompleks AmB z jonami Cu(II) (AmB-Cu(II)), który z chemicznego punktu widzenia jest nowym związkiem o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i zwiększonej aktywności biologicznej.

Wyniki badań metodami spektroskopii elektronowej o oscylacyjnej pozwoliły stwierdzić, że w roztworze wodnym powstaje stabilny kompleks AmB z jonami miedzi(II) w stosunku stechiometrycznym 2:1 posiadający naturę kationową. Ponieważ AmB jest podawana poprzez iniekcję dożylną, pierwszy układ biologiczny jaki staje na drodze antybiotyku stanowi zewnętrzna warstwa błony erythrocytu. W związku tym podjęliśmy próbę wyjaśnienia wpływu AmB-Cu(II) na modelową membranę odpowiadającą składem lipidowym błonie erythrocytu człowieka. Na podstawie analizy mieszanych monowarstw techniką Langmuira oraz badania morfologii otrzymanych filmów z zastosowaniem mikroskopii kąta Brewstera (BAM) wykazano, że kompleks dużo łatwiej miesza się ze składnikami modelowej błony. W badaniach biologicznych wykazano, że kompleks AmB-Cu(II) ma unikalne cechy polegające na zwiększonej aktywności grzybobójczej wobec chorobotwórczych szczepów *C. albicans* i *C. parapsilosis* w porównaniu z konwencjonalną AmB. Jest to skutek zmniejszonej agregacji antybiotyku oraz zwiększonego poziomu stresu oksydacyjnego indukowanego w komórkach grzybów. Indukcja stresu oksydacyjnego jest także jednym z postulowanych mechanizmów toksycznego działania antybiotyku w stosunku do komórek ludzkich. Ze względu na występowanie w strukturze AmB chromoforu może ona ulegać procesom autooksydacji. W ramach badań stwierdzono że proces utleniania AmB jest katalizowany przez składniki mogące pojawiać się w organizmach zwierzęcych w stanach chorobowych, tj. methemoglobinę oraz heminę. Po raz pierwszy zbadano, że pochodna AmB powstała w procesie utleniania cząsteczki (AmB-Ox), która może powstawać w organizmie pacjenta, wykazuje niekorzystne terapeutycznie cechy polegające na gwałtownej utracie aktywności grzybobójczej wobec *C. albicans* i *C. parapsilosis* przy mniejszym spadku aktywności cytotoksycznej wobec komórek nerki. Odkrycie katalitycznego wpływu żelaza hemowego na proces utleniania AmB ma ogromne znaczenie w zrozumieniu mechanizmu toksyczności tego antybiotyku.

*Badania finansowano z projektu NCN UMO-2012/05/B/NZ1/00037*

## ZASTOSOWANIE METOD STEREOLOGICZNYCH DO OKREŚLENIA PARAMETRÓW PRZESTRZENNYCH KOMÓREK TKANKI ROŚLINNEJ

Marek Gancarz, Agnieszka Nawrocka, Robert Rusinek

*Institut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin*

Najczęściej mikroskopowe obrazy struktury stanowią jej płaskie przekroje. Ilościowa analiza takich obrazów sprowadza się do wyznaczenia geometrycznych parametrów elementów strukturalnych oraz ich wzajemnego ułożenia. Dużą trudnością w tego typu analizach jest brak uniwersalnych metod i procedur komputerowych, które można by zastosować do różnych typów materiałów (Wojnar i in., 2002).

Stereologia pozwala opisać strukturę trójwymiarową przez odczytanie cech przestrzennych obserwowanych obiektów na podstawie analizy ich płaskich obrazów (Ryś, 1995).

Do przeprowadzenia analizy ilościowej parametrów struktury tkanki roślinnej wymagany jest mikroskopowy obraz o dobrej jakości oraz wystarczająca liczba elementów strukturalnych, w przypadku tkanki roślinnej - komórek. Tkanka roślinna charakteryzuje się strukturą jednofazową. Z dotychczas przeprowadzonych obserwacji wynika, że komórki tkanki mięksiszowej są figurami wypukłymi oraz tworzą układ izometryczny powierzchni granicznych (Gancarz, 2016).

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wyznaczenia parametrów stereologicznych struktury tkanki mięksiszowej bulwy ziemniaka, buraka czerwonego, buraka pastewnego oraz buraka cukrowego. Mikroskopowe obrazy komórek tkanki roślinnej w stanie naturalnym uzyskano przy użyciu optycznego mikroskopu konfokalnego. Automatycznej ilościowej analizy komputerowej dokonano przy użyciu specjalistycznego programu do analizy obrazu Aphelion (Gancarz, 2016). W wyniku przeprowadzonych badań wyznaczono następujące średnie parametry stereologiczne komórek: wysokość, powierzchnię płaskiego przekroju  $A[\mu\text{m}^2]$ , objętość  $V[\mu\text{m}^3]$ , liczbę w jednostce powierzchni  $N_A$  i w jednostce objętości  $N_V$ .

### Literatura

- Gancarz M. 2016. Correlation between cell size and blackspot of potato tuber parenchyma tissue after storage. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 117, 161-167.
- Ryś J., Wojnar L., Kurzydłowski K. J., Szala J. 2002. *Praktyka analizy obrazu*. Polskie Towarzystwo Stereologiczne, KRAKÓW.



## JONY CYNKU JAKO CZYNNIK SIECIUJĄCY PEKTYNY

Diana Ganczarenko, Justyna Cybulska, Artur Zdunek

*Institut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin*

Pektyny są grupą polisacharydów występujących w pierwotnej ścianie komórkowej oraz w blaszce środkowej roślin wyższych [1]. Wpływają na sztywność i integralność tkanek roślinnych. Biorą udział w transporcie jonów, określają porowatość ścian komórkowych oraz mają wpływ na aktywację układu odpornościowego roślin. Pektyny są zbudowane głównie z jednostek kwasu  $\alpha$ -1,4-D-galakturonowego [2]. Wyróżniamy trzy główne polimery zaliczane do tej grupy polisacharydów: homogalakturonian, ramnogalakturonian I i ramnogalakturonian II. Jedną z najważniejszych właściwości pektyn jest zdolność wiązania jonów metali dwuwartościowych m.in. jonów wapnia. Pektyny niskometylowane, czyli pektyny o stopniu estryfikacji mniejszym niż 50 %, tworzą żele w obecności tych jonów [3]. Mechanizm żelowania odnosi się do modelu „egg-box”. Model ten początkowo był stosowany do opisu oddziaływań pomiędzy jonami wapnia a alginianami. Ze względu na podobieństwa w strukturze i zachowaniu podczas sieciowania alginianów i pektyn, model ten jest również stosowany do opisu oddziaływań między pektynami a jonami wapnia. Według modelu „egg-box” tzw. strefy węzłowe (junction zones) tworzone są poprzez wiązania jonowe pomiędzy jonami wapnia a nieestryfikowanymi resztami kwasu galakturonowego [4]. Ilość przyległych, nieestryfikowanych reszt kwasu galakturonowego i ich rozłożenie w łańcuchu pektyn wpływa na liczbę i stabilność stref węzłowych. Jest to ważne dla mechanicznych i reologicznych właściwości żelu. Można założyć, że inne jony metali dwuwartościowych wiążą się do reszt kwasu galakturonowego łańcucha pektyn według modelu „egg-box”. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie wyników pomiarów reologicznych oraz analizy widm FT-IR frakcji pektyn rozpuszczalnej w rozcieńczonych alkaliach (DASP) z jonami cynku. Na podstawie pomiarów reologicznych zaobserwowano wzrost lepkości roztworów pektyn po dodaniu jonów  $Zn^{2+}$ . Badane roztwory są płynami pseudoplastycznymi. Analiza widm FT-IR wykazała różnice w intensywności i położeniu pasm w roztworze pektyn z dodatkiem jonów  $Zn^{2+}$  w porównaniu z próbą kontrolną. Uzyskane wyniki świadczą o prawdopodobnym sieciowaniu pektyn przez jony  $Zn^{2+}$ .

### Literatura:

1. Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2002). The chemical structure of pectins. In: Seymour, G. B., & Knox, J. P. (Eds.). *Pectins and their Manipulation*. Blackwell Publishing, Oxford, 1–29.
2. Cybulska, J., Zdunek, A., & Koziół, A. (2015). The self-assembled network and physiological degradation of pectins in carrot cell walls. *Food Hydrocolloids*, 43, 41–50.
3. Mierczyńska, J., Cybulska, J., Sołowiej, B., & Zdunek, A. (2015). Effect of  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrate Polymers*, 133, 547–555.
4. Ngouémazong, D. E., Tengweh, F. F., Fraeye, I., Duvetter, T., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P., & Hendrickx, M. (2012). Effect of de-methylesterification on network development and nature of  $Ca^{2+}$ -pectin gels: Towards understanding structure-function relations of pectin. *Food Hydrocolloids*, 26, 89–98.

*Badania finansowane z budżetu Narodowego Centrum Nauki, Polska, DEC-2015/17/B/NZ9/03589*

## **BADANIA MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW ADAPTACYJNYCH GLONÓW CHLORELLA. ŻÓŁKNIECIE OCHRONĄ PRZED SILNYM OŚWIETLENIEM?**

Wojciech Grudziński<sup>1</sup>, Izabela Krzemińska<sup>2</sup>, Rafał Luchowski<sup>1</sup>, Artur Nosalewicz<sup>2</sup>, Wiesław I. Gruszecki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 20-031 Lublin

<sup>2</sup> Instytut Agrofizyki, Polska Akademia Nauk, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Jednokomórkowe glony szczepów *Chlorella protothecoides* i *Chlorella vulgaris*, podane silnemu oświetleniu ( $400 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zmieniają kolor na żółty, w porównaniu z glonami hodowanymi w słabym oświetleniu ( $80 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), które pozostają zielone. Taki mechanizm jest zwykle interpretowany w kategoriach adaptacyjnej odpowiedzi glonów na warunki nadmiernego oświetlenia. Przeprowadzone badania pozwoliły odpowiedzieć na pytanie czy proces żółknięcia jest związany z aklimatyzacją czy raczej jest przejawem foto-degradacji glonów. Wykazano, że żółte zabarwienie mikroglonów wzrastających w silnym świetle związane jest z akumulacją zeaksantyny. Wyniki wskazują, że syntetyzowane karotenoidy nie są energetycznie sprzężone z chlorofilami, a zatem nie są bezpośrednio zaangażowane w proces fotosyntezy. Z drugiej strony, dodatkowo syntetyzowane ksantofile mogą być potencjalnie aktywne jako przeciwutleniacze, czynniki stabilizujące błony i, co ważniejsze, osłaniać komórki w warunkach intensywnego promieniowania jako swoiste „okulary molekularne”. Ten ostatni mechanizm został zaobserwowany w otoczeniu jądra komórkowego glonów w celu ochrony materiału genetycznego przed foto-uszkodzeniem. W ramach wystąpienia przedstawione zostaną badania charakteryzujące wzrost i aktywność fotosyntetyczną glonów w różnych warunkach oświetlenia jak również badania z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej i technik obrazowania molekularnego.

## INTERAKCJE GENISTEINY Z KOMÓRKAMI RAKA SZYJKI MACICY CZŁOWIEKA (HeLa)

Justyna Kapral<sup>1</sup>, Bożena Pawlikowska-Pawłęga<sup>1</sup>, Antoni Gawron<sup>1</sup>, Roman Paduch<sup>2</sup>, Agata Wawrzyniak<sup>3</sup>, Iwona Łuszczewska-Sierakowska<sup>4</sup>, Wiesław I. Gruszecki<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>2</sup> Zakład Wirusologii i Immunologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>3</sup> Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Przyrodniczy, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

<sup>4</sup> Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny, ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin

<sup>5</sup> Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1, 20-031 Lublin

Genisteina należy do naturalnych związków polifenolowych roślin. Badania wskazują, że flawonoidy wpływają korzystnie na zdrowie człowieka. W pracy badano sposób oddziaływania genisteiny z komórkami raka szyjki macicy człowieka.

Wpływ genisteiny na komórki linii HeLa badano na poziomie oddziaływań molekularnych techniką spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (FTIR). Wykazano, że badany polifenol powoduje zmniejszenie stopnia wiązania cząsteczek wody przez komórki za pomocą wiązań wodorowych. Dodanie genisteiny wywołuje również silny efekt w rejonie lipidowym komórek, szczególnie w obszarach grup polarnych fosfolipidów w pasmie odpowiadającym drganiom antysymetrycznym rozciągającym grup  $N^+-CH_3$ , drganiom symetrycznym grup  $PO_2^-$  oraz drganiom z rejonu pasma C-O-P-O-C lipidów. Dodanie genisteiny powoduje też bardzo wyraźny efekt w rejonie amidu I oraz amidu II białek. W rejonie amidu I genisteina wyraźnie zmniejsza ilość struktur typu  $\beta$ -kartki i jednocześnie zwiększa ilość struktur typu pętla i skręty. Badania z zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego oraz mikroskopu świetlnego wykazały zmiany w morfologii i topografii powierzchni badanych komórek.

Otrzymane wyniki wskazują, że genisteina oddziałuje z głowami hydrofilowymi lipidów błonowych komórek HeLa za pomocą wiązań wodorowych. Badany izoflawon oddziałuje również na białka tych komórek co w efekcie może wywoływać zmiany w ich kształcie i morfologii obserwowane w naszych doświadczeniach.

## ORGANIZACJA MOLEKULARNA WYBRANYCH 1,3,4-TIADIAZOLI W UKŁADACH MODELOWYCH O ZNACZENIU BIOLOGICZNYM

Dariusz Kluczyk<sup>1</sup>, Arkadiusz Matwijczuk<sup>2</sup>, Andrzej Niewiadomy<sup>3</sup>, Mariusz Gagoś<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>2</sup> Zakład Biofizyki w Katedrze Fizyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>3</sup> Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Tiadiazole to grupa syntetycznych związków organicznych, których historia sięga XIX w. Ugrupowanie to jest pięciocłonowym pierścieniem heterocyklicznym zawierającym dwa atomy węgla, jeden siarki i dwa atomy azotu w różnych konfiguracjach przestrzennych. Pierwszy 1,3,4-tiadaizol został opisany w 1882 roku przez Fischera. Od tego momentu liczba różnego rodzaju cząsteczek bazujących na tym układzie systematycznie rośnie. Dzieje się tak z powodu interesujących właściwości zarówno farmakologicznych jak i fizykochemicznych tej grupy związków. Wybrane do badań 1,3,4-tiadiazole wykazują potwierdzoną aktywność neuroprotekcijną oraz przeciwzapalną.

Przeprowadzono badania organizacji molekularnej w modelowych błonach lipidowych dwóch homologicznych związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli (HTDBD – 4-(5-hepty-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol, MTDBD – 4-(5-metyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol). Sporządzano układy liposomalne (zawierające DPPC – dipalmitoylofosfatydylocholinę) modyfikowane wybranymi do badań związkami. Badania przeprowadzono w zakresie stężeń 1-30% mol (wyrażającego stosunek ilościowy molekuł związku do użytego lipidu). Liposomy uzyskano w buforze PBS. Badania wykonano przy użyciu technik elektronowej spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej (mierzone widma emisji i wzbudzenia fluorescencji, widma RLS oraz czasy życia metodą TCSPC), spektroskopii w podczerwieni (FTIR), a także skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej (DSC). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w zakresie temperatur od 20 do 60°C. Analiza widm emisji fluorescencji ukazuje efekt występowania kilku form spektralnych (z maksimum przy około 370, 430 i 505nm) badanych związków sprzężony z ich budową oraz stężeniem. Zauważono również, że wraz ze wzrostem temperatury forma najbardziej długofalowa z maksimum przy około 505nm zanika (w przypadku HTDBD). Efekt ten jest szczególnie widoczny w temperaturach w okolicy głównego przejścia fazowego w DPPC. Na podstawie wcześniejszych badań wykonanych na analogach związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli powiązано obserwowane rezultaty z efektami agregacji molekularnej. Eksperymenty wykonane przy pomocy spektroskopii w podczerwieni FTIR ukazują różną organizację badanych związków w błonach z DPPC. Przeprowadzone badania wyraźnie wskazują związek obserwowanych efektów spektralnych z budową użytego w cząsteczce podstawnika na zmianę właściwości błon lipidowych.

1,3,4-tiadiazole są coraz liczniejszą grupą syntetycznych związków organicznych. Dla wielu z nich wykazano aktywność biologiczną a kilka jest stosowanych w lecznictwie. Użyty do badań HTDBD (na podstawie przeprowadzonych badań *in vivo*) uważa się za obiecujący związek o m. in. działaniu neuroprotekcijnym. Wiedza uzyskana z analizy przeprowadzonych badań pomoże w wyjaśnieniu mechanizmów molekularnych zachodzących pomiędzy wybranymi molekułami a błonami lipidowymi oraz w wyjaśnieniu biologicznej aktywności badanych 1,3,4-tiadiazoli.

## WAKUOLARNE KANAŁY ANIONOWE MSZAKÓW

Mateusz Koselski, Halina Dziubińska, Kazimierz Trębacz

*Zakład Biofizyki, Instytut Biologii i Biochemii UMCS*

Pomiary patch-clamp przeprowadzone na błonie wakuolarnej (tonoplascie) mchu *Physcomirella patens* oraz wątrobowca *Marchantia polymorpha*, pozwoliły na rejestrację kanałów kationowych SV (Slow-activating Vacuolar channels) oraz kanałów anionowych. W przeprowadzonych badaniach skupiono się na porównaniu sposobu aktywacji oraz innych cech kanałów anionowych.

Kanały anionowe w tonoplascie *Physcomitrella patens* rejestrowane były jednocześnie z kanałami SV. Jedną z podstawowych cech kanałów anionowych był wzrost prawdopodobieństwa ich otwarcia rejestrowany po zahamowaniu aktywności kanałów SV. Kolejną cechą kanałów była zdolność do dokomórkowego prostowania prądów i tym samym przepuszczania anionów w jednym kierunku - z cytoplazmy do wakuoli. W badaniach dowiedziono, że otwarcie kanałów jest zależne od cytoplazmatycznego wapnia, którego stężenie musi być wyższe niż 10  $\mu\text{M}$  oraz magnezu, aktywującego kanały przy stężeniu wyższym niż 2 mM. Istotnym warunkiem do otwarcia kanałów było również pH wyższe niż 6. Badania nad selektywnością kanałów anionowych wykazały, że kanały te rozróżniają aniony  $\text{Cl}^-$  oraz  $\text{NO}_3^-$  i są bardziej przepuszczalne dla tych drugich.

Zależność między aktywnością kanałów anionowych i SV badano również w tonoplascie *Marchantia polymorpha*. W tym celu blokowano kanały SV przez stosowanie inhibitora kanałów wapniowych - gadolinu. Inhibitor ten wywoływał "trzeptanie" (ang. flicker) kanałów anionowych polegające na krótkotrwałych i nieregularnych przejściach kanału między stanami zamknięcia i otwarcia. Dodatkowo, wraz ze wzrostem stężenia gadolinu rosła amplituda prądu płynącego przez kanał. Blokada kanału anionowego następowała po zastąpieniu cytoplazmatycznego  $\text{Cl}^-$  przez glukonian - jon nieprzepuszczany przez większość kanałów anionowych.

*Praca wsparta przez grant NCN nr 2013/09/B/NZ1/01052*

## BIOLOGICZNIE AKTYWNE METABOLITY POZYSKIWANE Z MIKROGLONÓW

Edyta Magierek, Izabela Krzemińska, Jerzy Tys

*Institut Agrofizyki PAN w Lublinie, Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych*

Głony to duża, zbiorcza, zróżnicowana filogenetycznie grupa heterogenicznych jedno- i wielokomórkowych fotosyntetyzujących organizmów eukariotycznych i prokariotycznych.

Głony jednokomórkowe zaliczane do *Chlorophyta* (zielenice) są cennym źródłem wielu biologicznie czynnych metabolitów, o szerokim zastosowaniu. Metabolity te wykorzystywane są w medycynie, jako farmaceutyki, w kosmetologii jako kosmeceutyki, w dietetyce, jak suplementy diety ze względu na swoje cenne właściwości odżywcze oraz w rolnictwie do żywienia zwierząt.

Biologicznie czynne metabolity są zazwyczaj gromadzone w biomacie mikroglonów, mogą być również wydzielane do podłoża w formie egzometabolitów.

Substancje biologicznie czynne pozyskiwane z mikroglonów można podzielić na metabolity pierwotne i wtórne. Metabolity pierwotne, takie jak węglowodany, białka i tłuszcze stanowią podstawowe składniki komórek glonów, niezbędne do ich wzrostu i rozmnażania.

Biologicznie aktywne metabolity z glonów wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwwzapalne a nawet przeciwnowotworowe.

Najcenniejsze i najlepiej zbadane z tych metabolitów to: barwniki:  $\beta$ -karoten, ksantofil, luteina, zeaksantyna, astaksantyna (zaliczane do karotenoidów), chlorofile, fikobiliny (fikocyjanina, fikoerytryna), wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA): DHA (C22: 6), EPA (C20: 5), ARA (C20: 4) GAL (C18: 3), witaminy: A, C, D, E, witaminy z grupy B (B1, B2, B5, B6, B12), biotyna, ryboflawina, kwas nikotynowy, pantotenian, kwas foliowy, inne substancje, takie jak: polifenole, tokoferole, dysmutaza ponadtlenkowa, katalazy, o różnorodnym działaniu biologicznym. Ponadto zielenice są źródłem cennych makro- i mikroelementów, jak: magnez, mangan, miedź, cynk, brom, jod, żelazo, obecnych w biomacie glonów, jako łatwo przyswajalne związki kompleksowe.

### Literatura:

- Borowitzka M.A., "High-value products from microalgae – their development and commercialization", *J. Appl. Phycol.*, 25 (2013)743-756.
- de Moraes M. G., Vaz B.d.S., "Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae", *BioMed Research International* 1 (2015).
- Markou G., Nerantzis E., "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions", *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 1532-1542.
- Michalak I., Chojnacka K., "Algae as production systems of bioactive compounds", *Eng. Life Sci.* 15 (2015) 160-176.
- Pignolet O., Jubeau S., "Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects", *J Ind Microbiol Biotechnol*, 40 (2013) 781–796.
- Priyadarshani I., Rath B., "Commercial and industrial applications of microalgae – A review", *J. Algal Biomass Utiln.*, 4 (2012) 89-100.

## AGREGACJA BIAŁEK GLUTENOWYCH W CIEŚCIE GLUTENOWYM INDUKOWANA DODATKIEM BŁONNIKÓW POKARMOWYCH

Agnieszka Nawrocka, Monika Szymańska-Chargot, Antoni Miś, Marek Gancarz, Robert Rusinek

*Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie*

Pieczywo pszenne jest najpowszechniejszym produktem żywnościowym na rynku. Jego objętość i tekstura miękiszu zależą przede wszystkim od struktury sieci glutenowej (glutenu) formującej się z białek glutenowych podczas wyrabiania ciasta chlebowego. Na sieć glutenową składają się dwa rodzaje białek: gluteniny stanowiące szkielet sieci glutenowej oraz gliadyny odgrywające rolę wypełniacza tej sieci. Od struktury białek glutenowych zależą własności reologiczne i wypiekowe ciasta pszennego np. siła ciasta, rozciągliwość, opór na rozciąganie czy objętość bochenka. Dodatek preparatu błonnikowego powoduje zmiany w parametrach reologicznych ciasta chlebowego a co za tym idzie pogorszenie jakości otrzymanego pieczywa. Stąd celem tych badań było określenie jakiego rodzaju zmiany w strukturze białek glutenowych są związane z zastosowaniem błonnika roślinnego jako prozdrowotnego dodatku do ciasta chlebowego.

W badaniach oddziaływań białek glutenowych z preparatami błonnikowymi użyto glutenu pszennego zakupionego w Sigma-Aldrich, w celu zapewnienia tej samej struktury białek glutenowych, oraz siedmiu preparatów błonnikowych różnego pochodzenia: błonnik aroniowy, żurawinowy, marchwiowy, kakaowy, karobowy, owsiny i Iniany. Próbkę ciasta glutenowego modyfikowanego trzema zawartościami preparatów błonnikowych (3, 6 i 9%) przygotowywano z użyciem miesiarki wibracyjnej. Następnie gluten był wmywany, liofilizowany i proszkowany. Drugo- i trzeciorzędowa struktura białek glutenowych badana była z użyciem spektroskopii Ramana z transformatą Fouriera (długość światła laserowego  $\lambda = 1064$  nm). W widmach ramanowskich analizowano zmiany w paśmie amid I (1570 – 1720  $\text{cm}^{-1}$ ), w paśmie związanym z mostkami disiarczkowymi (490 – 550  $\text{cm}^{-1}$ ), w dublecie tyrozynowym (I(850)/I(830)) oraz intensywności pasma tryptofanowego (I(760)).

Analiza widm ramanowskich pokazuje, że dodatek preparatów błonnikowych powoduje agregację lub nieprawidłowe zwijanie się białek glutenowych co prowadzi do pogorszenia jakości ciasta, a co z tym idzie również pieczywa. W przypadku ciasta glutenowego (brak skrobi) modyfikowanego wszystkimi preparatami błonnikowymi zaobserwowano tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy  $\alpha$ -helisami (ujemne pasmo na 1654  $\text{cm}^{-1}$  w widmie różnicowym), które to łączyły się w antyrównoległe  $\beta$ -kartki (dodatnie pasmo na 1695  $\text{cm}^{-1}$  w widmie różnicowym). Otrzymane wyniki wskazują na to, że we wszystkich preparatach błonnikowych jest obecna ta sama substancja, prawdopodobnie celuloza, która powoduje tego rodzaju zmiany. Pozostałe zmiany obserwowane w strukturze drugorzędowej (tworzenie lub znikanie wiązań wodorowych w  $\beta$ -kartkach i zakrętach  $\beta$ ), zmiany w konformacji mostków disiarczkowych (struktura trzeciorzędowa) oraz w mikrośrodowisku dwóch aminokwasów aromatycznych – tyrozyny i tryptofanu – zależą od rodzaju użytego błonnika oraz jego składu chemicznego. Niektóre z zaobserwowanych zmian mogą być spowodowane oddziaływaniem polisacharydów rozpuszczalnych w wodzie (np. pektyn), antocyjanów czy kwasów fenolowych z białkami glutenowymi.

## WPŁYW ROŚLINNYCH ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH NA PROCES METANOGENEZY

Marta Oleszek

*Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego, Polskiej Akademii Nauk*

Związki biologicznie czynne to bardzo różnorodna grupa substancji, znacznie różniących się pod względem chemicznym, łączy je jednak wspólna cecha – zdolność wywierania istotnego działania na organizmy żywe.

Liczne badania wykazały, iż związki biologicznie czynne pochodzenia roślinnego mogą wpływać na proces metanogenezy zachodzący w żwaczu [1,2]. Produkcja metanu przez zwierzęta przeżuwające jest niekorzystna zarówno dla środowiska naturalnego, jak i dla samych zwierząt. Prowadzono więc badania nad wykorzystaniem dodatku związków biologicznie czynnych z grupy flawonoidów, saponin, olejków eterycznych jako inhibitorów metanogenezy [1]. Związki te są stosowane także w praktyce, jako suplementy pasz w celu zahamowania produkcji metanu przez zwierzęta takie jak krowy, owce i kozy. Przy okazji tych badań okazało się jednak, iż niektóre związki, obecne na przykład w ziele nawłoci pospolitej, arniki łąkowej, czy też lawendy lekarskiej, mogą wywołać odwrotny efekt, powodując wzrost produkcji metanu u badanych zwierząt [2].

Proces metanogenezy przeprowadza się również w instalacjach zwanych biogazowniami, aby otrzymać wysokoenergetyczne paliwo gazowe. Potencjalna stymulacja tego procesu przez związki biologicznie czynne jest więc w tym przypadku bardzo korzystna, nie mniej jednak brak szerszych badań na ten temat. Nieliczne doniesienia dowodzą, iż zastosowanie substratu bogatego w wybrane związki z grupy flawonoidów, saponin, czy też alkaloidów powoduje wzrost uzysku wytwarzanego biogazu [3-5]. Według Covaliov i in. [5], stymulacja procesu fermentacji metanowej przez niektóre roślinne metabolity wtórne wynika z ich właściwości antyoksydacyjnych i działania ochronnego na błony biologiczne. Dzięki temu zapobiegają one utlenianiu lipidów i destrukcji ścian komórkowych mikroorganizmów.

### Literatura:

- [1] Patra A. K., Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11), 1198-1222.
- [2] Broudiscou L. P., Papon Y., Broudiscou A. F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87, 263-277.
- [3] Singh S., Kumar S., Jain M. C., Kumar D. 2001. Increased biogas production using microbial stimulants. *Bioresource Technology*, 78, 313-316.
- [4] Prabhudessai V., Ganguly A., Mutnuri S. 2009. Effect of caffeine and saponin on anaerobic digestion of food waste. *Annals of microbiology*, 59(4), 643-648.
- [5] Covaliov V., Bobeica V., Covaliova O., Nenno V., Ungureanu D., Senicovskaya I. 2012. Ecologically and economically efficient strategy of wastewater treatment. *Ecoterra*, 30, 1-7.

*Praca przygotowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM 8 pt.: „Wpływ roślinnych związków biologicznie czynnych na przebieg i intensywność procesu fermentacji metanowej biomasy roślinnej” nr 2014/15/N/NZ9/01127*



## WSPÓLZALEŻNOŚĆ WŁASNOŚCI MECHANICZNYCH KOMÓREK RÓŻNEGO TYPU

Barbara Orzechowska, Joanna Wiltowska-Zuber, Joanna Pabijan, Małgorzata Lekka

*Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk, Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, Polska*

Własności mechaniczne badane przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM) pozwalają opisać w sposób ilościowy zmiany zachodzące w pojedynczych komórkach pod wpływem różnorodnych procesów występujących w ich otoczeniu. Parametrem opisującym własności mechaniczne komórek jest wartość modułu Young'a, która ulega zmianie pod wpływem takich czynników takich jak temperatura, pH, skład chemiczny otoczenia czy obecność innych sąsiadujących komórek [4]. Większość badań przeprowadzonych za pomocą AFM została przeprowadzona dla pojedynczych, izolowanych komórek różnego typu [1-3].

Badania prowadzone w ramach prezentowanej pracy skupiają się na zmianach elastyczności pojedynczych żywych komórek mierzonych w otoczeniu innych komórek. Jako układ modelowy wybrano fibroblasty oraz keratynocyty, które hodowano albo osobno (jako monokultury komórkowe) albo razem (hodowle mieszane). Wybór komórek był podyktowany: (i) odmienną morfologią, która pozwala na bardzo łatwe odróżnienie ich przy pomocy mikroskopu optycznego podczas pomiaru [7], (ii) ich pochodzeniem (są to komórki pochodzące ze skóry) [6] oraz (iii) ich wzajemnym oddziaływaniem zachodzącym w procesie gojenia się ran [5].

W zależności od rodzaju badanej komórki (fibroblast lub keratynocyt) i jej otoczenia, wartość modułu Young'a została wyznaczona dla (1) odizolowanych pojedynczych komórek hodowanych w monokulturze, (2) komórek znajdujących się w grupach (otoczonych tym samym rodzajem komórek) hodowanych w monokulturze, (3) odizolowanych pojedynczych komórek hodowanych w mieszaninie, (4) komórek w grupach otoczonych tym samym rodzajem komórek hodowanych w mieszaninie oraz (5) komórek w grupach otoczonych innym rodzajem komórek tj. keratynocyty otoczone fibroblastami oraz fibroblasty otoczone keratynocytami hodowanych w mieszaninie. Zaobserwowane zmiany własności elastycznych świadczą o różnej odpowiedzi mechanicznej komórek spowodowanej przez zmiany

w środowisku otaczającym badany rodzaj komórek. Uzyskane za pomocą AFM wyniki pokazują, że żywe komórki oddziałują ze sobą, komunikują się, a ich rozwój jest ściśle związanych z otaczającym je środowiskiem zewnętrznym [8].

### Literatura:

- [1] Kuznetsova et al. *Micron* 38 (2007), 824 – 833.
- [2] Efremov et al. *Journal of Biomechanics* 46 (2013), 1081 – 1087.
- [3] Lulevich et al. *Ultramicroscopy* 110 (2010), 1435 – 1442.
- [4] Lekka et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1540 (2001): 127 - 136.
- [5] Werner et al. *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2007), 998 – 1008.
- [6] Shariati et al. *Iranian Biomedical Journal* 13 (3) (2009), 169 – 177.
- [7] *Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Online*. Encyclopædia Britannica Inc., 2016.
- [8] Rosso, Francesco, et al. *Journal of cellular physiology* 199.2 (2004): 174-180.

*This work was supported by National Science Center (Poland) project no DEC-2014/15/B/ST4/04737.*

## PRZESTRZENNE OBRAZOWANIE ROZWOJU PORAŻENIA GRZYBOWEGO OWOCU JABŁONI METODĄ BIOSPECKLI

Piotr Mariusz Pieczywek, Andrzej Kurenda, Justyna Cybulska, Artur Zdunek

*Institut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego w Lublinie*

Biospeckle są zjawiskiem obserwowanym w wyniku interferencji światła odbitego, podczas oświetlania światłem laserowym powierzchni badanych obiektów. W wyniku tego zjawiska powstaje charakterystyczny wzór plamkowy, składający się z jasnych i ciemnych punktów. W żywej tkance zjawisko biospeckli powstaje na skutek rozpraszania światła w wyniku ruchu organelli komórkowych oraz substancji rozpuszczonych w cytoplazmie wewnątrz komórek.

Ponieważ mechanizmy aktywnego transportu wewnątrzkomórkowego opierają się głównie na mechanizmie aktywno-miozowym, mogą być one reprezentatywnym procesem umożliwiającym ocenę stanu fizjologicznego komórek. Analiza aktywności biospeckli jako pochodnej zależnych od metabolizmu prędkości ruchów wewnątrzkomórkowych może służyć do oceny stanu fizjologicznego owoców a szczególnie wykrywania tkanek o obniżonym lub podwyższonym tempie metabolizmu, czyli uszkodzonych lub zainfekowanych.

Procedura eksperymentalna umożliwiająca uzyskanie czasoprzestrzennego rozkładu aktywności biospeckli polega na oświetlaniu badanego obiektu za pomocą światła laserowego oraz jednoczesnej rejestracji obrazów interferencyjnych za pomocą kamery CCD w określonych odstępach czasu, a następnie na analizie uzyskanych sekwencji obrazów

Jak wykazały dotychczasowe badania, aktywność biospeckli podczas infekcji grzybowej wzrasta prawdopodobnie na skutek aktywacji mechanizmów obronnych rośliny i zwiększenia tempa metabolizmu, a następnie gwałtownie spada w momencie pojawienia się zgnilizny.

*Badania finansowane z projektu „Detekcja mechanicznych i chorobowych uszkodzeń jabłek za pomocą czasoprzestrzennej analizy biospecklowych obrazów interferencyjnych” w ramach programu „IUVENTUS PLUS” (Projekt nr IP2014 023773).*

## ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII FTIR-ATR DO BADANIA ORGANIZACJI MOLEKULARNEJ BIAŁKA APOLIPOFORYNY III W BŁONIE LIPIDOWEJ

Emilia Reszczyńska<sup>1,2</sup>, Marta Palusińska-Szyszk<sup>3</sup>, Agnieszka Zdybicka-Barobas<sup>4</sup>,  
Rafał Luchowski<sup>1</sup>, Małgorzata Cytryńska<sup>4</sup>, Wiesław. I Gruszecki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>2</sup> Zakład Biofizyki, Instytut Biologii i Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>3</sup> Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>4</sup> Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Badanie absorpcji w podczerwieni, z zastosowaniem techniki spektroskopii FTIR, umożliwia analizy organizacji molekularnej białek w różnych środowiskach, w szczególności w błonach lipidowych.

Technika ta zastosowana została do badania kinetyki wiązania się białka Apolipoforyny III z dwuwarstwą lipidową oraz do analizy organizacji molekularnej białka w tym środowisku. Białko izolowane było z *Galleria mellonella*. Dwuwarstwa lipidowa formowana była na kryształach ZnSe, stanowiącym element układu ATR (Attenuated Total Reflectance) spektrometru FTIR. Pojedyncza monowarstwa lipidowa nanoszona była na powierzchnię kryształu z monowarstwy uformowanej na powierzchni wody, z zastosowaniem techniki Langmuir-Blodgett. Pełną dwuwarstwę uzyskiwano po fuzji takiego układu z monowarstwą lipidową uformowaną wewnątrz spektrometru, na mini-wannie teflonowej. Monitorowanie formowania dwuwarstwy odbywało się na drodze analizy widm absorpcji IR w układzie FTIR-ATR. Po wstrzyknięciu białka do subfazy, rejestrowane widma informowały o pojawianiu się składowej białkowej w dwuwarstwie lipidowej zaś analiza pasma amid I białka umożliwiała uzyskanie informacji dotyczącej organizacji molekularnej Apolipoforyny III w środowisku lipidowym.

## PROCEDURA KALIBRACJI ELEKTRONICZNEGO NOSA NA POTRZEBY BADAŃ JAKOŚCI MATERIAŁÓW BIOLOGICZNYCH

Robert Rusinek<sup>1</sup>, Jolanta Wawrzyniak<sup>2</sup>, Marzena Gawrysiak-Witulska<sup>2</sup>, Marek Gancarz<sup>1</sup>,  
Agnieszka Nawrocka<sup>1</sup>, Dariusz Wiącek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Agrofizyki PAN, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

<sup>2</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

W ostatnich latach ocena jakości produktów żywnościowych stała się prostsza i bardziej powtarzalna między innymi dzięki zastosowaniu w sektorze spożywczym elektronicznego nosa. Jest to „instrument składający się z zespołu elektronicznych sensorów chemicznych o częściowej selektywności i odpowiedniego układu identyfikującego, zdolnego do rozpoznania prostych lub złożonych zapachów” (Jeleń, 2004). Zespół sensorów chemicznych tworzący matrycę sensorów to układ wielu czujników substancji lotnych, które reagują na zmiany mieszanin gazowych wielu lotnych związków chemicznych. Produkty żywnościowe zaś, na różnych etapach technologicznych generują charakterystyczne substancje lotne, które tworzone są z cząstek organicznych o małej masie. Substancje lotne (ang. Volatile Organic Compounds, VOCs) mogą być rozpoznawane przez elektroniczny nos jako zbiór odpowiedzi sensorów, tzw. „smellprint”, który jest charakterystyczny np. dla danego poziomu zepsucia materiału biologicznego. W ramach kalibracji Agrinosa, urządzenia wytworzonego w Instytucie Agrofizyki na potrzeby badania jakości produktów rolniczych wykonano szereg eksperymentów przechowalniczych mających na celu stworzenie biblioteki odpowiedzi sensorów na zmiany jakości skorelowanej ze zmianami VOCs nasion rzepaku tworzącej układ identyfikujący enosa. W jednym z nich prowadzonym przez 31 dni, w początkowym okresie przechowywania w masie nasion dominowały grzyby polowe. W tym czasie nastąpił nieznaczny spadek liczebności mikroflory grzybowej związany z jej przystosowywaniem się do nowych warunków środowiskowych. Po okresie adaptacji obserwowano fazę intensywnego wzrostu mikroflory grzybowej, która trwała do około 31 dnia doświadczenia. Zarówno w fazie adaptacji jak i w fazie intensywnego wzrostu zaobserwowano wzrost stężenia związków lotnych, których produkcja jest związana zapewne z uaktywnieniem aparatu metabolicznego. W analizowanych próbach nasion począwszy od 12 dnia okresu składowania pojawiały się coraz częściej grzyby należące do tzw. mikroflory magazynowej. W końcowym etapie przechowywania nasion w badanych warunkach wilgotnościowo-temperaturowych dominowały grzyby magazynowe. W tym okresie zaobserwowano spadek stężenia związków lotnych, co może być związane z mniejszą rywalizacją międzygatunkową oraz starzeniem się mikroflory, któremu towarzyszy zwolnienie przemian metabolicznych.

### Literatura:

Jeleń H., 2004. Związki zapachowe żywności – wyzwanie dla analityka. Przemysł Spożywczy, 5/2004.

Pracę wykonano w ramach projektu nr PBS2/A8/22/2013, finansowanego przez NCBiR w latach 2013-2016.

## SPONTANICZNE POTENCJAŁY CZYNNOŚCIOWE I CIRKUMNUTACJE U *HELIANTHUS ANNUUS*

Maria Stolarz, Halina Dziubińska, Kazimierz Trębacz

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii i Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Potencjały czynnościowe (*action potentials* APs) u roślin są zaangażowane m. in. w szybkie zamykanie liści, regulację wydłużania pędu, oddychania, fotosyntezy i zapłodnienia. Pojawianie się spontanicznych APs (SAPs) w relacji do intensywności endogennych ruchów łodygi zwanych cirkumnutacjami (CN) zostało zbadane u trzytygodniowych roślin słonecznika (*Helianthus annuus*) w różnych warunkach oświetlenia. W badaniach zastosowano metodę jednoczesnego zewnątrzkomórkowego pomiaru potencjału elektrycznego oraz filmowania w interwale. Analizowane były parametry CN łodygi (długość trajektorii, okres i kierunek) oraz liczba, kierunek i odległość propagacji SAPs wzdłuż łodygi. W ciągłym oświetleniu o natężeniu  $25-40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  wszystkie rośliny cirkumnutowały intensywnie wykonując regularne elipsy, nie zaobserwowano u nich SAPs. W warunkach cyklicznego dobowego oświetlenia i ciemności (16/8h), długość trajektorii cirkumnutacji wykazywała rytm dobowy a większość SAPs pojawiała się w okresie ciemności. W ciągłym, ale słabym oświetleniu ( $5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), rośliny cirkumnutowały słabo i nieregularnie, a pojawiające się SAPs nie wykazywały dobowego rytmu. W warunkach światło/ciemność i w ciągłym słabym oświetleniu propagujące się wzdłuż całej łodygi SAPs pojawiały się w seriach. Stwierdzono, że średni odstęp między SAPs wynosił ok. 160 min i był podobny do okresu CN wynoszącego ok. 150-170 min. Ponadto zaobserwowano również propagujące się lokalnie, trwające ok. jedną godzinę serie SAPs. Na podstawie przedstawionych wyników, uważamy że, mechanizm CN i mechanizm powstawania SAPs mogą być ze sobą powiązane oraz że AP mogą odgrywać regulacyjną rolę w adaptacji roślin słonecznika do słabych warunków świetlnych.

## STABILNOŚĆ TERMICZNA KAMIENI UKŁADU MOCZOWEGO A ICH SKŁAD CHEMICZNY I WYTRZYMAŁOŚĆ MECHANICZNA

Wojciech Dyś<sup>1</sup>, Hanna Trębacz<sup>2</sup>, Monika Szymańska-Chargot<sup>3</sup>, Artur Zdunek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Oddział Urologiczny, Szpital Specjalisty w Puławach*

<sup>2</sup>*Katedra Biofizyki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie*

<sup>3</sup>*Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, Instytut Agrofizyki PAN*

Potrzeba ciągłego usprawniania metod litotrypsji sprawia, że zainteresowanie właściwościami fizycznymi złogów moczowych nie zmniejsza się. W szczególności, nowe możliwości oferowane przez litotrypsję laserową wskazują na konieczność lepszego poznania termicznych parametrów rozpadu kamieni moczowych różnego typu.

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy składem chemicznym kamieni, a ich fizyczną trwałością – mechaniczną i termiczną. Fragment każdego złogu poddano kolejno spektroskopii Ramana, ścisłaniu osiowemu do zniszczenia oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) od 60°C do 350°C.

W widmach ramanowskich zidentyfikowano składniki mineralne złogów. Szczawian wapnia (COM/COD) był głównym składnikiem w 68% zbadanych kamieni, hydroksyapatyt (HAP) w 18%, kwas moczowy (UA) w 9%, a struwit (MAPH) w 5%. Wytrzymałość złogów COM była znacząco większa niż innych. Procesy termicznej dekompozycji były obserwowane na termogramach wszystkich próbek, nawet tych złożonych z kryształów HAP, czy UA, topniejących w temperaturach wyższych niż 350°C. Termogramy miały złożoną strukturę, a temperatura głównego piku była skorelowana z wytrzymałością kamienia. Temperatury te dla trzech głównych typów kamieni były istotnie różne, ale procesy widoczne na termogramach nie były w sposób jednoznaczny powiązane ze składem mineralnym. Tak więc, niektóre z procesów zachodzących w temperaturach do 250°C zinterpretowano jako rozpad glikozamonoglikanów i innych organicznych składników złogów. Tym bardziej, że zostały one zidentyfikowane w widmach ramanowskich.

Podsumowując, analiza DSC pozwoliła na uzyskanie informacji o granicznych temperaturach rozpadu kamieni moczowych oraz pokazała, że na fizyczną stabilność kamieni wpływa nie tylko ich skład mineralny, ale w istotnym stopniu również obecność glikozaminoglikanów, które sklejały kryształy minerału w złogach.

## **BADANIE PROTEKCYJNEGO GASZENIA WZBUDZEŃ NADMIAROWYCH W APARACIE FOTOSYNTETYCZNYM *DELONIX REGIA***

Renata Welc, Rafał Luchowski, Emilia Reszczyńska, Wojciech Grudziński, Wiesław I. Gruszecki

*Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin*

Kompleks białkowo-barwnikowy LHCII (light harvesting complex of photosystem II) jest najbardziej rozpowszechnioną anteną fotosyntetyczną wiążącą ponad połowę cząsteczek chlorofili występujących w biosferze. Funkcją kompleksów antenowych jest zbieranie energii świetlnej oraz transfer energii wzbudzeń elektronowych do fotosyntetycznych centrów reakcji, gdzie zachodzi reakcja rozszczepienia ładunku elektrycznego. Kiedy energia przesłana do fotostystemu przekracza „możliwości operacyjne” centrum reakcji, aparat fotosyntetyczny narażony jest na destrukcję na drodze fotoutlenienia. Proces ten jest rezultatem przejścia chlorofili z singletowego stanu wzbudzonego do stanu tripletowego. W stanie tripletowym chlorofil jest fotouczulaczem, który w kontakcie z tlenem cząsteczkowym indukuje powstawanie silnie utleniającego tlenu singletowego. Aby uniknąć generowania reaktywnych form tlenu w aparacie fotosyntetycznym uruchamiany jest cały szereg mechanizmów fotoprotekcyjnych polegających na gaszeniu nadmiarowych wzbudzeń elektronowych.

Celem przeprowadzonych badań było wyjaśnienie roli barwników cyklu ksantofilowego, wiolaksantyny i zeaksantyny w regulacji poziomu wzbudzeń elektronowych w fotosyntetycznych kompleksach antenowych LHCII. Przeprowadzone badania miały również na celu poznanie mechanizmów fizycznych związanych z fotoprotekcyjnym rozpraszaniem energii wzbudzenia elektronowego na ciepło. Wyniki analiz spektroskopowych, prowadzonych na liściach rośliny modelowej *Delonix regia*, wskazują na korelację gaszenia wzbudzeń elektronowych chlorofili w paśmie Soreta z poziomem zeaksantyny.

*Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium (UMO-2014/13/N/NZ1/00998).*

## **BADANIE FILMU ŁZOWEGO METODĄ SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI**

Justyna Widomska, Małgorzata Gospodarek, Grażyna Olchowik

*Katedra i Zakład Biofizyki; Uniwersytet Medyczny w Lublinie*

W procesie leczenia ważną rolę odgrywa wczesna diagnostyka, a istotnym czynnikiem zachęcającym do częstych badań kontrolnych jest nieinwazyjny sposób pobierania materiału biologicznego oraz szybki proces pomiaru. Z tego powodu poszukuje się nowych, tanich metod wykorzystujących próbki biologiczne pobierane w sposób nieinwazyjny oraz parametrów, będących markerami stanów patologicznych, które można otrzymywać dosyć szybko przy minimalnej preparatyce materiału.

Jedną z takich obiecujących metod jest spektroskopia w podczerwieni, z powodzeniem stosowana jako narzędzie analityczne w badaniach tkanek, komórek i płynów ustrojowych. Można odnaleźć liczne publikacje dotyczące wykorzystania tej metody między innymi: w diagnostyce nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych czy chorób układu kostnego. Do nietypowych materiałów diagnostycznych pobieranych w sposób nieinwazyjny należy film łzowy, rzadko wykorzystywany w analityce medycznej.

Dokonano analizy składu biochemicznego filmu łzowego z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni FTIR. Pomiary przeprowadzono na grupie ok. 100 studentów w wieku 19-20 lat. Dodatkowo porównano trzy metody pozyskania cieczy łzowej: z paska Schirmera, kapilary, soczewki kontaktowej. Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że na wynik pomiaru wpływa już sam sposób pobierania filmu łzowego. Jedynie pobranie łez z wykorzystaniem kapilary daje powtarzalne rezultaty, przy czym metoda ta wymaga profesjonalnie przeszkolonej osoby. Celem referatu jest przedstawienie możliwości wykorzystania spektroskopii FTIR do badań cieczy łzowej.