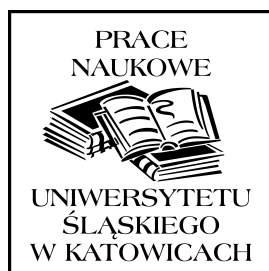


**Komórkowe strategie
reakcji pajaków
na stres środowiskowy**



NR 2638



Grażyna Wilczek

**Komórkowe strategie
reakcji pająków
na stres środowiskowy**

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Katowice 2008

Redaktor serii: Biologia PAWEŁ MIGULA

Recenzenci ELŻBIETA PYZA
 EUGENIA TĘGOWSKA

Publikacja jest dostępna także w wersji internetowej

Śląska Biblioteka Cyfrowa
www.sbc.org.pl

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	9
1. Wstęp	11
1.1. Wprowadzenie	11
1.2. Pająki wobec stresorów środowiskowych	12
1.2.1. Metale ciężkie	13
1.2.2. Pestycydy	15
1.2.3. Temperatura i głodzenie	16
1.3. Komórkowe reakcje na stres	18
1.3.1. Systemy antyoksydacyjne.	19
1.3.2. Apoptoza i nekroza jako biomarkery stresu	20
1.3.3. Białka szoku cieplnego (Hsp) oraz metalotioneiny (Mt) jako czynniki antyoksydacyjne i antyapoptotyczne	23
1.3.3.1. Białka szoku cieplnego (Hsp)	24
1.3.3.2. Metalotioneiny (Mt)	26
2. Cele pracy	28
3. Materiał i metody	30
3.1. Teren badań	30
3.2. Charakterystyka badanych gatunków pajaków	30
3.3. Grupy doświadczalne i stosowane czynniki stresowe	33
3.4. Charakterystyka gruczołów jelita środkowego pajaków	34
3.5. Analizy cytometryczne i spektrofotometryczne	36
3.5.1. Wskaźniki śmierci komórkowej i białka stresu	36
3.5.1.1. Przygotowanie materiału do analiz cytometrycznych	36
3.5.1.2. Ilościowa ocena komórek apoptotycznych i nekrotycznych	36
3.5.1.3. Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami	38
3.5.1.4. Ilościowa ocena komórek Mt pozytywnych	39
3.5.1.5. Ilościowa ocena komórek Hsp70 pozytywnych	40
3.5.1.6. Proteazy kaspazopodobne (Cas-3)	40
3.5.2. Wskaźniki antyoksydacyjne	41
3.5.2.1. Glutation całkowity (GSH + GSSG)	42

3.5.2.2.	Peroksydazy glutationowe: selenozależna (GPOX; EC 1.11.1.9) i niezależna od selenu (GSTPx)	42
3.5.2.3.	S-transferaza glutationowa (GST; EC 2.5.11.18)	42
3.5.2.4.	Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD; EC 1.15.1.1)	43
3.5.2.5.	Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6)	43
3.6.	Oznaczanie stężenia białka	43
3.7.	Analizy statystyczne	44
3.8.	Odczynniki chemiczne	44
4.	Wyniki.	45
4.1.	Analiza czynnikowa udziału zastosowanych stresorów oraz płci i stanowiska w odpowiedziach komórkowych u pajaków	45
4.2.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Agelena labyrinthica</i>	49
4.2.1.	Szok termiczny	49
4.2.2.	Pestycyd	50
4.2.3.	Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu	51
4.2.4.	Głodzenie	54
4.3.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Xerolycosa nemoralis</i>	54
4.3.1.	Szok termiczny	54
4.3.2.	Pestycyd	55
4.3.3.	Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu	55
4.3.4.	Głodzenie	56
4.4.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Agelena labyrinthica</i>	59
4.4.1.	Szok termiczny	59
4.4.2.	Pestycyd	59
4.4.3.	Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu	60
4.4.4.	Głodzenie	60
4.5.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Xerolycosa nemoralis</i>	63
4.5.1.	Szok termiczny	63
4.5.2.	Pestycyd	63
4.5.3.	Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu	64
4.5.4.	Głodzenie	64
4.6.	Porównanie reakcji samic i samców na zastosowane czynniki stresogenne	67
5.	Dyskusja.	69
5.1.	Rodzaj czynnika stresowego a zmiany poziomu wskaźników śmierci komórkowej u pajaków	69
5.2.	Antyoksydacyjna obrona u pajaków w odpowiedzi na czynniki stresowe	74
5.3.	Reakcje samic i samców pajaków w odpowiedzi na stres	80
5.4.	Przedekspozycyjne wskaźniki stresu u zwierząt z terenów referencyjnych i silnie zanieczyszczonych	85

5.4.1.	Komórkowe reakcje samic i samców pajaków na dodatkowe czynniki stresogenne a wcześniejsza preekspozycja na zanieczyszczenia.	87
5.4.2.	Hsp70 i metalotioneiny u pajaków z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych w odpowiedzi na zadane stresory	89
5.5.	Podsumowanie	92
6.	Wnioski	94
	Bibliografia	97
	Summary.	115
	Zusammenfassung	117

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Organizmy w swym środowisku życia podlegają wpływom różnorodnych czynników stresogennych, które w zależności od siły i czasu działania mogą modyfikować ich procesy fizjologiczne, a w skrajnych przypadkach zmniejszać szanse przeżycia. Z jednej strony są to czynniki naturalne, takie jak zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura, wilgotność, dostępność pokarmu, interakcje z innymi organizmami, z drugiej zaś są to substancje chemiczne. Wymienione elementy składają się na pojęcie „stresu środowiskowego”, rozumianego jako zespół oddziaływań o charakterze stresotwórczym lub odpowiedź organizmu na tego typu czynniki (VAN STRAALLEN, 2003). Stresory działają bezpośrednio na poziomie komórki, chociaż przesunięte w czasie pośrednie skutki ich oddziaływań mogą się manifestować na wyższych poziomach organizacji biologicznej. W badaniach ekotoksikologicznych rozwijane są koncepcje, w których oceniając efekty działania różnorodnych składowych stresu środowiskowego, korzysta się z biomarkerów, definiowanych jako „molekularne, biochemiczne, histologiczne lub fizjologiczne parametry, które na poziomie poniżej organizmu zmieniają się proporcjonalnie do stopnia ekspozycji zwierząt na działanie czynników zanieczyszczających ich środowisko” (DEPLEDGE, FOSSI, 1994; DALLINGER i in., 2000; EASON, O’HALLORAN, 2002) bądź też rozumianych jako

„zmiana na poziomie molekularnym, która może służyć za wskaźnik stanu stresu spowodowanego przez dowolny czynnik środowiskowy” (LASKOWSKI, MIGULA, 2004). Aby w pełni poznać kondycję fizjologiczną danej grupy organizmów, wskazane jest użycie szerokiego spektrum parametrów, które pozwoliłyby ocenić procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, a tym samym pozwoliłyby rozstrzygać o stopniu „uciążliwości” dla organizmu oddziałujących czynników stresogennych. W odniesieniu do środowisk lądowych wiele badań w tym zakresie poświęca się bezkręgowcom glebowym, w tym stawonogom (KAMMENGA i in., 2000), a wśród kręgowców również ptakom (CASINI i in., 2003) i ssakom (TIMBRELL, 1998).

Stosunkowo mało informacji na temat biochemicznych, histologicznych oraz fizjologicznych zmian, które mogłyby być wykorzystane do oceny narażenia lub wykazania skutków działania czynników stresogennych o różnym charakterze, zgromadzono dla pająków (Araneae). Ze względu na małą wybiórczość pokarmową oraz dużą intensywność drapieżniczą bezkręgowce te uważa się za ważne regulatory liczebności wielu populacji owadów w ekosystemach łąkowych, leśnych i rolniczych (MARC i in., 1999). Pająki występują powszechnie także na terenach zanieczyszczonych, w tym skażonych metalami ciężkimi (CLAUSEN, 1984 a; 1984 b; 1986; HUNTER i in., 1987; DEELMAN-REINHOLD, 1990; RABITSCH, 1995) i — jak niejednokrotnie wykazywano — w porównaniu z innymi grupami systematycz-

nymi zamieszkującymi tereny silnie zdegradowane mogą tolerować wysokie stężenia metali w ciele (HUNTER i in., 1987; MAELFAIT, 1996; HENDRICKX i in., 2003; WILCZEK i in., 2004). Mechanizmy tej tolerancji w omawianej grupie zwierząt są jednak bardzo słabo poznane. Szczególnie mało informacji zgromadzono na temat komórkowych reakcji na stres u pajaków ekspozowanych w kontrolowanych warunkach na różne czynniki, które składają się na pojęcie stresu środowiskowego. Przyczyną rzadkiego podejmowania prób hodowli pajaków są względy metodyczne, ogromną trudność bowiem sprawia zapewnienie, szczególnie młodym osobnikom, optymalnych warunków związanych ze specyficznymi wymaganiami pokarmowymi i wilgotnościowymi. Poważnym problemem hodowlanym jest także kanibalizm rozpowszechniony w tej grupie drapieżnych bezkręgowców. Jeśli uwzględni się wymienione ograniczenia, większość informacji o fizjologicznych reakcjach na stres pochodzi z badań prowadzonych na osobnikach odłowionych bezpośrednio z terenu lub tylko okresowo przetrzymywanych w laboratorium.

1.2. Pajaki wobec stresorów środowiskowych

Tolerancja czynników stresogennych przez organizmy jest możliwa dzięki uruchamianiu mechanizmów obronnych, których celem jest zachowanie wewnętrznej homeostazy. Niejednokrotnie zmiany te dotyczą bilansu energetycznego i wiążą się z przeznaczaniem części energii pochodzącej z podstawowych składowych budżetu energetycznego, czyli z produkcji (wzrostu i reprodukcji) lub/i z kosztów utrzymania organizmu, na procesy naprawcze (SIBLY, CALLOW, 1989), w tym także detoksykację i bioeliminację. Badacze tego problemu proponują kilka rozwiązań optymalnej alokacji energii w zależności od warunków środowiska oraz możliwości detoksykacji substancji toksycznych przez określone organizmy. Można założyć, że w nieska-

żonym środowisku niemal całość dostępnej energii jest wykorzystywana w procesach wzrostu i reprodukcji, wobec minimalnego przeznaczenia jej na procesy detoksykacyjne. Z kolei w środowiskach zanieczyszczonych ilość energii przeznaczona na wzrost i reprodukcję generalnie ulega zmniejszeniu, jednakże długość życia organizmów nie zmienia się, co jest możliwe dzięki intensywnym procesom detoksykacyjnym. W tym drugim przypadku scenariusz optymalnej alokacji energii może się zmieniać w zależności od właściwości fizjologicznych organizmu, wieku czy toksyczności substancji (LASKOWSKI, MIGULA, 2004). Rzeczywiście w wielu badaniach ekotoksykologicznych u zwierząt ekspozowanych na stresory środowiskowe, w tym metale, stwierdza się zmiany w przyrostach biomasy (ROWE i in., 2001), rozrodczości (SPURGEON i in., 2000) i/lub tempie respiracji (MIGULA i in., 1990; LASKOWSKI i in., 1996; ROWE i in., 1998). Nie można wykluczyć, że zwierzęta z terenów zanieczyszczonych mogą się cechować mniejszą tolerancją na dodatkowe czynniki stresogenne, co w rezultacie skutkuje osłabieniem, a nawet wyginieniem populacji w razie zmiany warunków środowiska (STONE i in., 2001). Ostatecznie może nastąpić przebudowa składu gatunkowego zespołu i zastępowanie gatunków wrażliwych takimi, które są w stanie tolerować określone stresory środowiskowe bez wyraźnego uszczerbku w procesach reprodukcji.

Jeśli odnieść się do omówionych wcześniej zagadnień, to ekologiczna ocena stanu arachnocenoz terenów zdegradowanych wskazuje, że zwykle nie zmienia się liczebność pajaków, przebudowie natomiast ulega struktura gatunkowa (ŁUCZAK, 1984; 1987a; DĄBROWSKA-PROT, 1984; MAJKUS, 2003). W środowiskach w mniejszym stopniu zanieczyszczonych przeważają najczęściej pajaki sieciowe z rodziny krzyżakowatych (Araneidae) i omatnikowatych (Theridiidae), natomiast w środowiskach silnie zanieczyszczonych dominują słabsze, w bezpośredniej konkurencji o miejsce i pokarm, sieciowe pajaki z rodzin osnuwikowatych (Linyphiidae) i kwadratnikowatych (Tetragnathidae) oraz niebudujące sieci pogońcowate (Lycosidae) (ŁUCZAK, 1984; 1987b; DEELMAN-REINHOLD, 1990). Intere-

sujących informacji na temat tolerancji niedoboru lub nadmiaru określonych czynników biotycznych i abiotycznych dostarczają badania sukcesji fito- i zoocenozy na hałdach przemysłowych. Jakościowa analiza arachnofauny, np. hałdy górniczej „Lidice” (peryferie Ostrawy; Ostrawsko-Karwiński Okręg Przemysłowy; Republika Czeska), wskazuje, że już we wczesnych fazach rekultywacji na hałdzie tej znaleziono przedstawicieli blisko 15 rodzin pajaków, wśród których największy udział w zespole pajaków miały gatunki z rodziny osnuwikowatych (Linyphiidae — 40%), a w dalszej kolejności pająki niebudujące sieci z rodzin: skakunowatych (Salticidae), pogońcowatych (Lycosidae) i aksamitkowatych (Clubionidae) (MAJKUS, 1988). Proporcje te zostały zachowane także w późniejszych okresach rekultywacji wymienionej hałdy (MAJKUS, 2003). Skład gatunkowy arachnocenozy na obszarach zdegradowanych przez przemysł może zatem wynikać z międzygatunkowych różnic we wrażliwości tych drapieżników na działanie określonych substancji toksycznych w ich środowisku i w rezultacie sprzyjać konkurencji w wymienionej grupie stawonogów (CLAUSEN, 1984a; 1984b; GUNNARSSON, JOHNSSON, 1989).

Reakcje fizjologiczne pajaków wobec określonych stresorów środowiskowych, w tym o charakterze antropogennym, często są specyficzne gatunkowo. Pająki *Enoplognatha ovata* (Theridiidae) w warunkach silnej presji zanieczyszczeń przemysłowych (Rybnicki Okręg Przemysłowy) składały puste kokony, charakteryzowała je też duża zmienność rozmiarów kokonów, jak również większa śmiertelność wylęgających się pajaków (ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA, TARWID, 1984; TARWID, 1987). Także przedstawiciel pogońcowatych *Pirata piraticus* (Lycosidae) zamieszkujący tereny zanieczyszczone cechował się spadkiem płodności i reprodukcji (HENDRICKX i in., 2003). W innych badaniach obserwowano natomiast, że w warunkach silnego uprzemysłowienia następował wzrost biomasy niektórych gatunków pajaków oraz nasilenie intensywności ich procesów życiowych (DĄBROWSKA-PROT, 1984; ŁUCZAK, 1987b). W środowiskach przekształconych przez przemysł stymula-

cja procesów metabolizmu ogólnego u zawijaka żółtawego *Enoplognatha ovata* (Theridiidae), osnuwika pospolitego *Linyphia triangularis* (Linyphiidae) i czaika jesiennego *Metellina segmentata* (Tetragnathidae) przewyższała tempo metabolizmu pajaków pochodzących ze słabo przekształconych ekosystemów leśnych o 25—30% (ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA, 1981). Badania puli nukleotydów adenylowych w przypadku pajaków ze Śląska, przedstawicieli rodzin: Linyphiidae, Araneidae, Tetragnathidae, Lycosidae wskazują ponadto, że w warunkach zanieczyszczonego środowiska nie następowało naruszenie równowagi energetycznej organizmu, o czym świadczyła wielkość ładunku energetycznego adenylatów (AEC) mieszcząca się u badanych gatunków w granicach fizjologicznie optymalnych (MARCZYK i in., 1993; WILCZEK, 1996).

W kolejnych podrozdziałach zostaną przedstawione wybrane czynniki stresowe o charakterze antropogennym (metale, pestycydy) i naturalnym (skrajne temperatury, niedobór pokarmu), na które pająki często są narażone w swoim środowisku bytowania.

1.2.1. Metale ciężkie

Miejsce zajmowane przez pająki w sieciach troficznych ekosystemów lądowych, a także ich cechy biologiczne sprawiają, że drapieżniki te są szczególnie narażone na działanie metali oraz związków organicznych (m.in. pestycydów), które dostają się do ich organizmu w wyniku bezpośredniej ekspozycji, zarówno drogą pokarmową jak i kontaktową (HOPKIN, 1989). Stosując podział zaproponowany przez DALLINGERA (1993), który został oparty na wielkości wskaźników biokoncentracji metali w tkankach, pająki zaliczono do makrokoncentratorów tych pierwiastków. Badania porównawcze kumulacji metali w ciele różnych grup bezkręgowców zebranych wokół dużych emitatorów zanieczyszczeń wskazują, że stężenia kadmu, miedzi i ołowiu u przedstawicieli pajaków reprezentujących drapieżne bezkręgowce są równie wysokie, jak u organi-

zmów detrytosożernych i wielokrotnie wyższe w porównaniu z roślinożercami (HUNTER i in., 1987; ANDREWS i in., 1989; MIGULA i in., 2005). Interesujące jest to, że wysokie stężenia metali znajdowano także u pajaków pochodzących z terenów słabo zanieczyszczonych (KNUTTI i in., 1988; WILCZEK i in., 1996; 2003; 2004). Znaczej kumulacji metali w ich ciele sprzyja przede wszystkim wysoka przyswajalność pokarmu, silnie rozwinięty polifagizm, spożywanie miękkich tkanek ofiar, a także stosunkowo niski poziom metabolizmu silnie rozbudowanych gruczołów jelita środkowego, w których stężenie metali jest zawsze wyższe niż w innych narządach (MOULDER, REICHLER, 1972; HOPKIN, 1989; WILCZEK, BABCZYŃSKA, 2000).

Do organizmu pajaka metale dostają się głównie drogą pokarmową (HOPKIN, 1989). Przewód pokarmowy stanowi więc pierwszą i najważniejszą linię obrony. Fakt ten potwierdzają badania, z których wynika, że wchłonięte metale mogą być u pajaków deponowane głównie w komórkach gruczołów jelita środkowego (HOPKIN, 1986; LUDWIG, ALBERTI, 1988a; 1988b) lub usuwane wraz z kałem (CLAUSEN, 1991). Czas magazynowania metali u pajaków zależy od rodzaju metalu (LEE i in., 1978; NABHOLTZ, CROSSLEY, 1978; HENDRICKX i in., 2003), gatunku (WILCZEK, MIGULA, 1996; KRAMARZ, 2000; HENDRICKX i in., 2003; WILCZEK i in., 2005), płci (WILCZEK i in., 2005; 2007) oraz stanu odżywienia (BROWN, 1982). Dominacja określonej strategii może zależeć jednak od stężenia metalu w pokarmie. Sugerują to wyniki badań BABCZYŃSKIEJ i MIGULI (2002), którzy zmierzili stężenie kadmu w ciele samic i samców pajaka *Pardosa lugubris* (Araneae: Lycosidae) oraz w ciele ich ofiary, muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) hodowanej na pożywce kontrolnej, zawierającej śladowe ilości kadmu oraz zawierającej wysokie stężenie tego metalu ($426 \mu\text{g Cd} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy). Porównanie stężenia kadmu w ciele drapieżcy i w ciele ofiary z obu grup doświadczalnych pozwala wnioskować o zróżnicowanej strategii: magazynowania w formie nieaktywnej przy niższym stężeniu metali w diecie lub wzmożonego wydalania, gdy stężenie wzrastało.

Dotychczasowe badania pozwoliły także wykazać liczne zależności między poziomem kumulowanych metali w ciele a strategią i intensywnością drapieżniczą pajaków (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK i in., 1997; 2003; 2004; 2005; 2007), co potwierdzono dla pajaków ze stanowisk Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego, Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej oraz Ostrawsko-Karwińskiego Okręgu Przemysłowego, analizując poziom metali zarówno w ciele całych osobników, jak i w wybranych narządach (gruczoły jelita środkowego, gonady) (WILCZEK, BABCZYŃSKA, 2000; WILCZEK i in., 2003; 2004; 2005; 2007). Najniższe stężenia Cd, Pb, Cu i Zn cechowały osnuwikowate, reprezentowane przez *Linyphia triangularis*, które pomimo możliwości większego pobierania metali ze względu na małą wybiórczość pokarmową i dużą intensywność drapieżniczą (NENTWIG, 1983; FOELIX, 1996) odznaczały się niższym, w porównaniu z pozostałymi gatunkami, stężeniem wymienionych pierwiastków w ciele (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK i in., 1997; 2005; 2007). Sugeruje to słabą ich przyswajalność z przewodu pokarmowego. Z kolei przedstawiciele niebudujących sieci pajaków z rodziny Lycosidae (*P. lugubris*, *P. palustris*) niezależnie od stopnia zanieczyszczenia środowiska metalami charakteryzowały się wysokim stężeniem Cd, Pb, Zn i Cu w porównaniu z wartościami, które notowano u pajaków sieciowych z rodzin: Araneidae, Linyphiidae czy Agelenidae. Z innych badań wynika, że Lycosidae przyswajały więcej Cd i Cu niż pajaki sieciowe, czego nie potwierdzono dla Pb (LARSEN i in., 1994).

Warto też zwrócić uwagę na występowanie różnic w zdolnościach do gromadzenia metali ciężkich przez samice i samce pajaków. Z porównania wartości stężeń Cd, Pb, Cu, Zn, Fe w ciele osobników obu płci, przedstawicieli rodzin Araneidae, Agelenidae, Linyphiidae, Lycosidae i Salticidae, wynika, że samce kumulują większe ilości tych pierwiastków niż samice (WILCZEK i in., 2005). Poziom Cd, Zn i Cu w gruczołach jelita środkowego pajaków pogońcowatych *Xerolycosa nemoralis* i lejkwoców *Agelena labyrinthica* również był wyższy u samców niż u samic, niezależnie od stopnia zanie-

czyszczenia stanowisk badawczych. Tylko ołów kumulował się w wyższym stężeniu w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis*, natomiast w przypadku *A. labyrinthica* poziom tego metalu u obu płci był zbliżony (WILCZEK i in., 2007). Wytlumaczeniem różnic w zdolnościach do bioakumulacji metali są behawioralne i fizjologiczne odmienności między samcami i samicami pająków. Samce, w porównaniu z samicami, przechodzą mniej linień oraz żyją znacznie krócej, gdyż giną w krótkim czasie po kopulacji (FOELIX, 1996). Doświadczalnie potwierdzono, że podczas linienia konkretne mineralne mogą być usuwane z jelita, dzięki czemu obniża się pula metali zmagazynowanych w gruczołach jelita środkowego (HOPKIN, 1989). Ponadto samce po osiągnięciu dojrzałości płciowej zaprzestają polowań i pobierania pokarmu, a koncentrują się głównie na odnalezieniu samicy. Samce narażone są zatem na dłuższe niż samice okresy głodu wobec relatywnie krótszego okresu życia. Wymienione czynniki mogą zmieniać metabolizm ich gruczołów jelita środkowego i wywoływać morfologiczne zmiany w postaci powiększających się wewnątrzkomórkowych konkrekcji granulanych zawierających metale w wymienionym narządzie oraz w komórkach nabłonka jelitowego, co wykazano w przypadku innych bezkręgowców (BROWN, 1982).

Specyficznymi biomarkerami narażenia na metale są u zwierząt metalotioneiny (Mt) (PARK i in., 2001), jak również wewnątrz- i śródkomórkowe konkretne mineralne (HOPKIN, 1989; DALLINGER, REINBOW, 1993). Niewiele jednak jest danych na temat funkcji metalotionein u pająków. Wcześniejsze badania, w których techniką cytometrii przepływową porównywano liczbę komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pająków pogońcowatych *X. nemoralis* oraz sieciowych *A. labyrinthica* i *L. triangularis* odławianych z terenów różniących się stężeniem metali w środowisku wynika, że tylko w przypadku pająków tunelowych (*A. labyrinthica*) osobniki z terenu silnie zanieczyszczonego metalami cechowały się większym odsetkiem komórek Mt pozytywnych w wymienionym narządzie (WILCZEK i in., 2007). W innych badaniach u pogońcowatych

P. lugubris i sieciowych *A. labyrinthica* ekspozycjonowanych na wysoką temperaturę oraz pestycydów fosforoorganicznych wykazano nasilenie produkcji metalotionein, ze wskazaniem na silniejsze reakcje u pająków niebudujących sieci (WILCZEK, 2005). Nie można wykluczyć, że w przypadku pająków indukcja metalotionein w odpowiedzi na stres fizyczny i chemiczny jest wyrazem ochrony antyoksydacyjnej, w mniejszym stopniu odpowiadając za bezpośrednią neutralizację metali ciężkich.

Zdecydowanie więcej informacji dla tej grupy drapieżnych bezkręgowców zgromadzono na temat możliwości deponowania metali w wewnątrz- i śródkomórkowych konkrekcjach mineralnych. Metale odkładają się u pająków najczęściej w komórkach trawiennych gruczołów jelita środkowego jako tzw. mineralne ziarnistości (BROWN, 1982; HOPKIN, 1989) lub okresowe sferyty (LUDWIG, ALBERTI, 1988a), skąd w sposób holokrynowy mogą być usuwane do światła jelita (HOPKIN, 1989). Spośród wyróżnionych przez HOPKINA (1986) czterech typów granul: wewnątrzkomórkowych A, B i C oraz pozakomórkowych D, najistotniejsze w detoksykacji metali u pająków wydają się granule typu B, w których stwierdzono miedź, rtęć, kadm, cynk, ołów i żelazo.

1.2.2. Pestycydy

Pomimo że pająki zwykle nie są bezpośrednim celem użycia pestycydów, to często negatywne skutki działania tego typu związków dotyczą także tej grupy zwierząt. Oddziaływanie to z jednej strony dotyczy bezpośredniej toksyczności stosowanych środków ochrony roślin względem pająków (STARK i in., 1995; TOFT, JENSEN, 1998; NYFFELER, SUDERLAND, 2003), z drugiej natomiast jest wynikiem drastycznego spadku liczebności ich ofiar na terenie, na którym pestycydy są stosowane (HAMERS, KROGH, 1997; VAN HAMBURG, GUEST, 1997; MARC i in., 1999).

Testy przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych wskazują, że pająki cechuje zróżnicowa-

na wrażliwość na pestycydy stosowane w zabiegach agrotechnicznych. Na przykład przedstawiciele rodziny Anyphaenidae, *Hibana velox*, przejawiały 100% śmiertelność podczas aplikacji niskich stężeń takich związków jak: chlorpyrifos, ethion, carbaryl czy dicofol, podczas gdy inne związki, na przykład azadirachtin czy diflubenzuron, nie wywoływały toksycznych efektów nawet wówczas, gdy stosowano je w wysokich stężeniach (AMALIN i in., 2000). Wyniki badań ekologicznych wskazują ponadto na zależną od płci wrażliwość pająków na działanie pestycydów. Akarycyd (karate; λ -cyhalotryna) powodował u *Pardosa amentata* (Lycosidae) blisko 50% śmiertelność samców, gdy tymczasem odsetek ginących samic był ponad 2-krotnie mniejszy (HOF i in., 1995). Skutki stosowania pestycydów zależą u pająków od pory roku. Dorosłe *P. amentata* eksponowane na λ -cyhalotrynę późną jesienią lub na początku zimy okazały się stosunkowo mało wrażliwe na zastosowany związek, podczas gdy w okresie wiosenno-letnim taka sama ekspozycja powodowała wysoką śmiertelność (HOF i in., 1995). Powodem wzrostu wrażliwości pogońcowatych na pestycyd było prawdopodobnie wejście w okres reprodukcji, co wiązało się z nasiloną ruchliwością pająków poszukujących partnerów i powodowało częstsze kontakty ze stresem chemicznym. Także kondycja fizjologiczna drapieżników mogła być w tym czasie obniżona, samce giną bowiem najczęściej krótko po kopulacji. W przypadku samic wydatki energetyczne na produkcję kokonów mogły ulec zmniejszeniu w wyniku nasilenia reakcji detoksykacyjnych.

Wczesne i silne efekty działania pestycydu na organizm pająka manifestują się w postaci upośledzenia zdolności lokomotorycznych, co obserwowano zarówno u przedstawicieli pająków niebudujących sieci *P. amentata* (Lycosidae) (HOF i in., 1995), jak i sieciowych *Oedothorax apicatus* (Linyphiidae) (JAGERS OP AKKERHUIS i in., 1997). Efekty te utrzymywały się nawet przez kilka dni po aplikacji, przejawiając się m.in. zaburzeniami w zachowaniu łowieckim (HOF i in., 1995). W przypadku zastosowania pestycydów fosforoorganicznych przyczyną dysfunkcji motorycznych są najczęściej zmiany przekazywania

synaptycznego związane z hamowaniem aktywności acetylocholinesterazy (AChE). Z porównania efektu działania dimetoatu u dwóch gatunków pająków: sieciowego *A. labyrinthica* (Agelenidae) i aktywnie polującego *P. lugubris* (Lycosidae) wynika, że zarówno jedno-, jak i wielokrotna aplikacja powoduje obniżenie aktywności wymienionego enzymu u przedstawicieli rodziny Agelenidae. W przypadku *P. lugubris* nie zanotowano istotnych różnic w aktywności AChE zarówno w grupach jednokrotnie, jak i wielokrotnie eksponowanych na pestycyd (BABCZYŃSKA i in., 2006). Rezultaty te są podobne do tych, które uzyskali we wcześniejszych badaniach BABCZYŃSKA i MIGULA (2002) po aplikacji pająkom tego samego gatunku (*P. lugubris*) innego pestycydu fosforoorganicznego — fenitrotonu. Także i w tym przypadku odpowiedź pająków pogońcowatych była słaba niezależnie od płci.

Z badań NIELSENA i in. (1997), którzy metodą kontaktową zatruwali cypermetryną (pestycyd z grupy pyretroidów) *Pardosa prativaga* (Lycosidae), wynika natomiast, że aktywność takich enzymów jak S-transferaza glutationowa (GST) i peroksydaza glutationowa (GPOX) po 30 min od zastosowania wymienionego związku ulegała blisko 50% obniżeniu w stosunku do aktywności wyjściowej. Kolejne pomiary (po 12, 24, 48, 96 godz.) świadczyły jednak o stopniowym powrocie aktywności GST do wartości kontrolnych, a w przypadku GPOX nawet nasileniu aktywności tego enzymu po 12 godz. od aplikacji. Dwuetapowa odpowiedź organizmu na zastosowany związek wskazuje na możliwość regeneracji aktywności wymienionych enzymów i sugeruje, że glutation oraz enzymy związane z jego metabolizmem w przypadku wymienionego gatunku pogońcowatych mogą odgrywać istotną rolę detoksykacyjną, uczestnicząc w antyoksydacji.

1.2.3. Temperatura i głodzenie

Temperatura jest czynnikiem silnie limitującym aktywność ruchową pająków, wymusza-

jąc w sposób naturalny okresy głodu. Zakres temperatur, w którym pająki są zdolne złapać ofiarę, obejmuje najczęściej przedział 21–35°C. Poniżej 21°C pająki sieciowe nie są w stanie złapać ofiary, nim ta ucieknie z sieci, natomiast powyżej 35°C są narażone na zbyt duże straty wody i szok cieplny (FOELIX, 1996). Przekroczenie górnej granicy tolerancji termicznej powoduje odrętwienie, a zbyt długie oddziaływanie wysokiej temperatury prowadzi w konsekwencji do śmierci organizmu (PULZ, 1987; SCHMALHOFER, 1999).

W warunkach działania stresora termicznego w przypadku pająków obserwuje się wiele przystosowań behawioralnych oraz fizjologicznych. Zagadnienia te zostały stosunkowo dobrze opisane w literaturze przedmiotu i generalnie nie odbiegają od reakcji cechujących inne organizmy ektotermiczne (NENTWIG, 1987; FOELIX, 1996). Bezkręgowce te wybierają na przykład miejsca o sprzyjających warunkach termicznych, odpowiednio ustawiając ciało względem padających promieni słonecznych czy w warunkach silnego nasłonecznienia, zmieniając barwę ciała. Temperatura też jest czynnikiem, który wywiera bezpośredni wpływ na rozrodczość, w tym na czas dojrzewania osobników (LI, 1995; LI, JACKSON, 1996), produkcję jaj (ZHAO, 1984; LI, 1995) czy też przeżywalność pająków (LI, 2002). Czynniki termiczne oddziałują w istotny sposób na liczbę linii, które pająk przechodzi przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. W wyższej temperaturze częstotliwość linienia jest mniejsza niż w niższej, w której dla osiągnięcia tego samego etapu rozwoju postnatalnego wymagane jest częstsze linienie (LI, 2002). Wysoka temperatura skraca czas życia dorosłych osobników oraz zmniejsza liczbę jaj produkowanych przez samice (LI, JACKSON, 1996).

Pająki często są narażone na okresowy niedobór pokarmu w ich środowisku bytowania, toteż wykazują dużą tolerancję na taki czynnik stresowy. Dotychczasowe prace zajmujące się tym zagadnieniem skupiały się głównie na behawioralnych i fizjologicznych przystosowaniach do przetrwania okresu głodu, w mniejszym stopniu koncentrując się na komórkowych konsekwencjach

tego zjawiska. Udokumentowano, że tolerancja okresu głodu u pająków zależy od pory roku (NAKAMURA, 1987), stadium rozwojowego oraz płci (TANAKA, ITO, 1982; NENTWIG, 1986; 1987; WISE, 1993). Dorosłe samice aktywnie polującego pająka *Lycosa lenta* przeżywały nawet 208 dni bez pożywienia, co stanowiło aż 90% średniej długości życia dobrze odżywianych osobników. Z kolei osobniki pająków sieciowych *Filistata hibernalis* (Filistatidae) w podobnych warunkach przeżywały 305 dni bez pokarmu (ANDERSON, 1974). Już po kilku dniach głodzenia dochodziło do wyraźnego zmniejszenia masy ciała pająków jako wyraz redukcji zalegającego w jelicie spożytego pokarmu (NENTWIG, 1987). W ciągu 140 dni głodzenia *Lycosa lenta* traciła 33% masy, a długość jej opistosomy skracała się z 8,1 mm do 6,3 mm. W tych samych warunkach *F. hibernalis* traciła 41% swej masy, odwłok zaś ulegał skróceniu z 7,1 mm do 5,5 mm. Interesujący jest fakt, że podczas głodzenia nie zmieniała się długość prosomy pająków (ANDERSON, 1974).

Podczas głodu następują ilościowe zmiany substancji zapasowych w komórkach trawienych. Najistotniejsze to obniżenie w nich poziomu glikogenu i lipidów. Obserwowano także zmiany morfologiczne w postaci zwiększenia liczby wakuol wydzielniczych, które wypełniały większą część komórki. Nie jest wykluczone, że zmiany te były wynikiem autofagii, która w komórkach jest aktywowana między innymi w odpowiedzi na niedobór czynników odżywczych. Wakuole pokarmowe występowały rzadko i często były zdegenerowane. Jądro komórkowe, mitochondria i retikulum endoplazmatyczne pozostawały w wyniku głodzenia nie zmienione. W warunkach niedoboru pokarmu nie wykryto istotnych różnic w komórkach sekrecyjnych, natomiast w tkance pośredniej znacząco malała ilość kropeł tłuszczu (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b).

Sposobem na radzenie sobie z brakiem pokarmu jest zastosowanie strategii „siedź i czekaj”. Strategia ta stanowi pewne rozwiązanie problemu dzięki przeczekaniu w bezruchu okresu głodu, aż do pojawienia się ofiary. Taka taktyka umożliwia przetrwanie, ogranicza zużycie energii i jest alternatywą dla poszukiwania no-

wego środowiska życia (WISE, 1993). Podczas długiego okresu głodu niemal ustaje aktywność ruchowa pajaków, a zmagazynowana energia jest wykorzystywana do podtrzymania podstawowej przemiany materii (NAKAMURA, 1987). W przypadku długotrwałego braku pokarmu pająki, aby przeżyć, nie powiększają rozmiarów ciała. Jednak pomimo tak niekorzystnych warunków mogą się nadal rozmnażać, chociaż liczba i masa składanych jaj są niskie. Oprócz obniżonej płodności, w przypadku małych i niedożywionych samic, stwierdzono także opóźnienie okresu wytwarzania kokonów (NAKAMURA, 1987; WISE, 1993).

W ciągu kilku dni od rozpoczęcia głodzenia szybko spada tempo respiracji, po czym stabilizuje się na niezmiennym poziomie. Redukcja tempa metabolizmu u pajaków zwykle nie przekracza 40—60% wartości notowanych dla zwierząt karmionych regularnie, osiągając niższe wartości u samic niż u samców (ANDERSON, 1974; GREENSTONE, BENNETT, 1980; TANAKA, ITO, 1982). W przypadku głodzącej *Lycosa pseudoannulata* tempo metabolizmu obniża się o 17%, podczas gdy w przypadku innego gatunku pogoncowatych, *Pardosa astrigera*, redukcja tempa metabolizmu sięga 63% u samic i 48% u samców (TANAKA, ITO, 1982). U pająka sieciowego *F. hibernalis* tempo respiracji maleje maksymalnie o 40% (ANDERSON, 1974).

Ważnym ograniczeniem dla pajaków jest nie tylko całkowity brak pokarmu, lecz także słabo zróżnicowana dieta. Badania wskazują, że zarówno dla pajaków sieciowych (ZHAO, 1988), jak i niebudujących sieci (GREENSTONE, 1979; UETZ i in., 1992) ważna jest dieta urozmaicona, w której można znaleźć różne gatunki ofiar. W przypadku przedstawicieli rodziny Lycosidae wykazano na przykład wzrastającą śmiertelność w warunkach laboratoryjnych, gdy dieta opierała się tylko na muszkach *D. melanogaster*, ponieważ w ciele tych ofiar brak jest kwasu linolowego i linolenowego, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju pajaków (UETZ i in., 1992).

1.3. Komórkowe reakcje na stres

Chociaż koncepcję stresu można rozważać na różnych poziomach organizacji biologicznej, to najbardziej powszechne ujęcie tego problemu dotyczy indywidualnego organizmu. Jak zaprezentowano w poprzednich rozdziałach, w literaturze przedmiotu opisano behawioralne i fizjologiczne reakcje pajaków na działanie wielu czynników stresogennych, jednak komórkowe reakcje na stres u tych drapieżników poznano w ograniczonym zakresie.

Stresory, w zależności od rodzaju, siły i czasu oddziaływania, mogą powodować określone dysfunkcje na poziomie komórkowym, które klasyfikuje się w skali trzystopniowej (KORSLOOT, 2002). Są to:

- niewielkie uszkodzenia, które mogą być reperowane przez komórkowy system obrony, dzięki czemu całkowicie zostaje przywrócona homeostaza komórki;
- uszkodzenia w stopniu średnim, które dzięki mechanizmom naprawczym częściowo zostają usunięte, komórka pozostaje żywa, lecz jej kondycja metaboliczna jest obniżona;
- duży stopień uszkodzeń, czego efektem jest zahamowanie procesów metabolicznych i/lub utrata integralności organelli komórkowych, co prowadzi komórkę do śmierci.

Skutki oddziaływania czynników stresowych najszybciej pojawiają się na poziomie molekularnym i dotyczą zmian w syntezie polipeptydów, utleniania i denaturacji struktur białkowych, utleniania lipidów i nukleotydów (efekt pierwszorzędowy), uszkodzenia błon, DNA, mikrofilamentów, zaburzeń procesu oddychania wewnątrzkomórkowego i produkcji energii (efekt drugorzędowy). Konsekwencją tych zmian jest rozpad struktur komórkowych i zahamowanie procesów metabolicznych (efekt trzeciorzędowy).

Uszkodzenia spowodowane działaniem stresorów środowiskowych uruchamiają reakcje naprawcze (np. detoksykacyjne, antyoksydacyjne), które całkowicie lub częściowo przywracają homeostazę komórkową. W tym drugim przypadku komórka pozostaje żywa, lecz jej kondycja me-

taboliczna jest obniżona. W skrajnych przypadkach, gdy stopień uszkodzenia jest duży, komórka ginie, m.in. na drodze apoptozy lub nekrozy (KORSLOOT, 2002).

W kolejnych podrozdziałach zostaną omówione niektóre biomarkery, które mogą być mierzone u zwierząt w celu oceny efektów oddziaływania czynników stresogennych, zarówno naturalnych jak i antropogennych, na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach.

1.3.1. Systemy antyoksydacyjne

Stres oksydacyjny oznacza sytuację, w której produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) przekracza możliwość ich unieczynniania oraz zdolność naprawy uszkodzonych struktur komórkowych. Ten rodzaj stresu występuje w wielu sytuacjach, zwykle w wyniku ekspozycji komórek, tkanek czy organizmów na dodatkowe źródła RFT bądź zwiększenie tempa ich endogennej produkcji. W takim ujęciu prooksydacyjny charakter wykazują stresory antropogeniczne, na przykład metale (KANG, 1997; LAGADIC, 1999; PULIDO, PARRISH, 2003), pestycydy (MASOUD i in., 2003), policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) (CRUZ-RODRIGUEZ, CHU, 2002), polichlorowane bifenyle (PCB) (RODRIGUEZ-ARIZA i in., 2003), oraz stresory naturalne, takie jak skrajne warunki termiczne (GORMAN i in., 1999) czy brak pokarmu (głodzenie) (PASCUAL i in., 2003; MORALES i in., 2004).

Wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (np.: anionorodniki ponadtlenkowe, nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe, rodniki wodoronadtlenkowe, ozon) uszkadza biologiczne makromolekuły: kwasy nukleinowe, białka, lipidy, a oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki zaburzają prawidłowe funkcje komórek, co może doprowadzić do ich śmierci (RODRIGUEZ-ARIZA i in., 2003). W komórkach powszechnie występują jednak elementy systemu obrony antyoksydacyjnej, którymi zarówno w przypadku kręgowców, jak i bezkręgowców są m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i katalaza (CAT), jak

również glutation (GSH) i enzymy związane z metabolizmem tego tripeptydu (peroksydazy glutationowe — selenozależna, GPOX i niezależna od selenu GSTPx; S-transferaza glutationowa, GST) (AHMAD i in., 1989; AHMAD, 1995; O'BRIEN, TEW, 1996; VAN BLADEREN, 2000; FERNANDEZ-CHECA, 2003).

Stosunkowo niewiele informacji na temat antyoksydacyjnych reakcji obronnych zgromadzone dla pająków, szczególnie w odniesieniu do kontrolowanego działania czynników stresogennych o różnym charakterze. Większość informacji pochodzi z badań prowadzonych na osobnikach odłowionych bezpośrednio z terenu. Wynika z nich, że w warunkach środowiska zanieczyszczonego metalami reakcje antyoksydacyjne tych drapieżników, podobnie jak i inne enzymatyczne reakcje detoksykacyjne, są gatunkowo specyficzne (WILCZEK, 2005; WILCZEK i in., 2003; 2004; 2007). Pająki tunelowe *A. labyrinthica* (Agelenidae) z terenów silnie zanieczyszczonych cynkiem i ołowiem (rejon olkuski) charakteryzował wysoki poziom GPOX i GSTPx oraz wysokie stężenie glutationu w tkankach. W tych samych warunkach pająki niebudujące sieci *P. lugubris* (Lycosidae) cechowało niższe stężenie GSH i niższa aktywność GPOX i GSTPx niż notowane u pająków sieciowych (WILCZEK i in., 2004). Także z badań na innym przedstawicielu rodziny Lycosidae, *P. palustris*, wynika, że wysokie stężenia Zn, Pb i Cd w ciele osobników tego gatunku korelowały z wysoką aktywnością CAT. Z kolei osnuwik *L. triangularis* (Linyphiidae) cechował się nasileniem reakcji antyoksydacyjnych związanych z aktywnością SOD i CAT, przy niskiej kumulacji metali (WILCZEK, MIGULA, 1996). W warunkach silnego zanieczyszczenia u przedstawicieli wymienionych rodzin pająków notowano nasilenie procesów enzymatycznej biotransformacji ksenobiotyków (MARCZYK i in., 1993; VIARENGO, 1989; WILCZEK, MIGULA, 1995; WILCZEK i in., 1997). Dla pająków aktywnie polujących (*P. palustris*) znamieną była zarówno aktywizacja procesów hydrolizy, katalizowanych przez karboksyloesterazy (CarE), jak i reakcje sprzęgania angażujące GST, gdy tymczasem u pająków sieciowych *L. triangularis* było to głównie nasilenie reakcji

katalizowanych przez S-transferazy glutationowe (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK, 1996; WILCZEK i in., 2003). Dotychczasowe badania wskazują ponadto, że reakcja na stres spowodowana życiem w środowisku chronicznie skażonym metalami ciężkimi różni samice od samców. Ważnym elementem obrony przed wysokim stężeniem metali ciężkich i ich prooksydacyjnymi konsekwencjami jest u samców glutation (GSH), podczas gdy w enzymatycznej obronie antyoksydacyjnej uczestniczy katalaza (CAT). Z kolei reakcje antyoksydacyjne samic różnych gatunków opierają się zarówno na zwiększonej aktywności peroksydaz glutationowych, jak i katalazy, chociaż poziom tych enzymów jest gatunkowo zróżnicowany (WILCZEK i in., 2007). Nie jest wykluczone, że samice w warunkach wzmiarkowanego wcześniej większego narażenia na zanieczyszczenia dla zabezpieczenia materiału genetycznego i swoich możliwości reprodukcyjnych są w stanie wykorzystywać różnorodne mechanizmy detoksykacyjne, nawet kosztowne energetycznie.

1.3.2. Apoptoza i nekroza jako biomarkery stresu

W warunkach fizjologicznych mechanizm apoptozy odpowiada za zachowanie właściwej równowagi między intensywnością proliferacji a tempem usuwania uszkodzonych lub zbędnych komórek (ZAKERI, LOCKSHIN, 2002). Zaburzenia przebiegu tego procesu wymuszone na przykład stresorami środowiskowymi mogą zmniejszać kondycję fizjologiczną danego narządu i w ostateczności całego organizmu. Apoptozę uważa się obecnie za wrażliwy i wczesny wskaźnik chronicznie działającego stresu (PIECHOTTA i in., 1999; SWEET i in., 1999). Do programowanej śmierci dochodzi, gdy komórka po zadziałaniu określonych endo- lub egzogennych bodźców uruchamia mechanizmy prowadzące do jej samounicestwienia. Proces ten mogą stymulować różnorodne czynniki, na przykład promieniowanie (SINGH, 2000), temperatura (GORMAN i in.,

1999), substancje chemiczne (RUDOLF, CERVINKA, 2006) czy niedobór substratów do procesów metabolicznych (KIESSLICH i in., 2005). Komórka wchodząca na drogę apoptozy podlega określonym zmianom morfologicznym i biochemicznym. Mechanizmy dotyczące tego zagadnienia szeroko omówiono w wielu przeglądowych opracowaniach głównie dotyczących kręgowców (np. KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ, 2002; BÖHM, SCHILD, 2003). W przypadku zwierząt bezkręgowych poznano je w mniejszym stopniu. Mimo że ciągle odkrywa się nowe fakty tłumaczące mechanizmy obserwowanych zjawisk, to niewiele danych zgromadzono dla muszki owocowej *D. melanogaster* i nicienia *Caenorhabditis elegans* (SESHAGIRI, MILLER, 1997; LEE, BAEHRECKE, 2000).

Szczególnie mało jest informacji na temat mechanizmów apoptozy u pająków. Odsetek komórek apoptotycznych rejestrowany techniką cytometrii przepływowej w gruczołach jelita środkowego dorosłych samic pogońcowatych *P. lugubris* i lejkowców *A. labyrinthica* (WILCZEK, 2005) wskazuje, że był on blisko dziesięciokrotnie niższy w porównaniu z wartościami, które metodami histologicznymi stwierdzono w wątrobotrzustce ślimaka winniczka *Helix pomatia* (1,1%) (CHABICOVSKY i in., 2004), ale ponad 10-krotnie wyższy od poziomu, który wykazano w wątrobie myszy (0,01%) (CHABICOVSKY i in., 2003). Wskazuje to, że stopień zmian apoptotycznych, który nieindukowany dodatkowymi czynnikami, jest specyficzny gatunkowo i może zależeć od ogólnej aktywności metabolicznej danego narządu. W badaniach dotyczących genetycznej kontroli programowanej śmierci komórkowej tylko w przypadku jednego gatunku pająka, *Araneus ventricosus*, opisano klonowanie i filogenezę cDNA kodującego homolog DAD1 (*defender against apoptotic cell death 1*). Białko to hamowało apoptozę w odpowiedzi na temperatury niską i wysoką, na które ekspozowano osobniki wymienionego gatunku (LEE i in., 2003). Podobną rolę DAD1 wykazano u innych gatunków zwierząt na przykład w komórkach linii tsBN7 chomika, nicienia *C. elegans* czy w komórkach ludzkich, a w przypadku roślin u rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis*

thaliana (NAKASHIMA i in., 1993; SUGIMOTO i in., 1995; GALLOIS i in., 1997). Sugerowana sekwencja aminokwasów budujących białko DAD1 w przypadku *Araneus ventricosus* była w 75,4% i 74,6% homologiczna z podobnym białkiem opisanym odpowiednio u muszki *D. melanogaster* i żaby szponiastej *Xenopus laevis* oraz w 73,1% homologiczna z białkiem znalezionym u ssaków: *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mesocricetus auratus*, *Rattus norvegicus* i *Mus musculus* (LEE i in., 2003).

Potencjalnymi stymulatorami śmierci komórkowej mogą być m.in. czynniki zwiększające ryzyko generowania reaktywnych form tlenu (RFT) (MIZUTANI i in., 2002; PULIDO, PARRISH, 2003; SREEDHAR, CSERMELY, 2004). W zależności od stężenia RFT w komórce podejmowana jest decyzja o rodzaju śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy (RAFFRAY, COHEN, 1997). Apoptoza zachodzi zwykle w następstwie stresu oksydacyjnego o mniejszym nasileniu, w odróżnieniu od nekrozy, którą stymuluje silny stres oksydacyjny (COURTIN i in., 2002; PROSKURYAKOV i in., 2003). Podstawowym czynnikiem determinującym rodzaj śmierci komórkowej w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest poziom wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, wykorzystywanego we wszystkich szlakach aktywacji kaspaz, enzymów proteolitycznych kontrolujących apoptozę (RICHTER i in., 1996). Sugeruje się, że niskie stężenia reaktywnych form tlenu, przejściowo zmniejszające stężenie ATP, prowadzą komórki do śmierci na drodze apoptozy, gdy tymczasem wysokie stężenia nadtlenu wodoru, trwale obniżając zasoby wewnątrzkomórkowego ATP, są przyczyną śmierci nekrotycznej (GARDNER i in., 1997; LEIST i in., 1997). Jak wynika z badań LEIST i in. (1999), utrzymanie stężenia ATP w komórkach na poziomie przekraczającym 50% wartości wyjściowych jest wystarczające, aby spowodować przekierowanie komórki ze szlaku śmierci nekrotycznej w kierunku śmierci apoptotycznej. Uważa się także, że przejście w kierunku przeciwnym, tzn. od apoptozy do śmierci nekrotycznej może wynikać z obniżenia się stężenia ATP w wyniku aktywacji poli(ADP-rybozy) polimerazy (PARP), która podczas apoptozy jest substratem kaspazy-3 i kaspazy-7 (HERCEG,

WANG, 2001). Śmierć komórki na drodze apoptozy może się zmieniać w formę śmierci nekrotycznej także w wyniku bezpośredniego hamowania aktywności kaspaz. Również i w tym mechanizmie zwrócono uwagę na hamującą rolę wzrastającego stężenia H_2O_2 , który utleniał grupy tiolowe aminokwasów w centrum aktywnym wymienionych enzymów (SAMALI i in., 1999; CHANDRA i in., 2000), co opóźniało lub całkowicie uniemożliwiało zajście wymienionego procesu (HAMPTON, ORRENIUS, 1997; HAMPTON i in., 2002; PRUSKI, DIXON, 2002).

Dotychczasowe badania wskazują na strategiczną rolę mitochondriów w inicjacji śmierci komórkowej (BORUTAITE, BROWN, 2003; FERNANDEZ-CHECA, 2003; KROEMER, 2003; ORRENIUS, 2004). W dużym uproszczeniu, we wczesnych etapach tego procesu dochodzi do otwierania porów mitochondrialnych, tzw. megakanalów, w wyniku zmniejszenia się stosunku ATP/ADP i/lub obniżenia poziomu NAD(P)H i zredukowanego glutationu, obniżenia się potencjału transbłonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$) oraz modyfikacji składu macierzy mitochondrialnej, w tym wzrostu w niej stężenia Ca^{2+} (DESAGHER, MARTINO, 2000; PARONE i in., 2002; LECEOUR i in., 2004). W kolejnych etapach następuje uwolnienie międzybłonowych protein, na przykład cytochromu *c*, rozpoczynających ostateczną fazę apoptotycznej kaskady (GUPTA, 2001; PARONE i in., 2002). Uwolnienie cytochromu *c* aktywuje białko Apaf-1 (cytozolowe białko adaptorowe) do utworzenia oligomerycznego kompleksu — apoptosomu, który aktywuje kaspazę-9, prowadząc do aktywacji kaskady kaspaz i/lub dokonuje proteolizy białek komórkowych (SREEDHAR, CSERMELY, 2004). W przypadku nicienia *C. elegans* homologiem Apaf-1 jest białko Ced-4, które nie zawiera sekwencji inhibitorowych i do aktywacji nie wymaga cytochromu *c* (BOSSY-WETZEL, GREEN, 1999), podczas gdy u owadów cytochrom *c* pełni funkcję podobną do funkcji u ssaków, chociaż nie jest uwalniany do cytoplazmy i ulega zmianom konformacyjnym w mitochondrium (RODRIGUEZ i in., 1999).

Wśród dominujących czynników uruchamiających mitochondrialny szlak śmierci wymienia

się reaktywne formy tlenu. Proapoptotyczny mechanizm działania, na przykład H_2O_2 , prawdopodobnie opiera się na blokowaniu przepływu elektronów na poziomie reduktazy NADH-Q (kompleks NADH-dehydrogenaza; kompleks I) w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, co w ostateczności prowadzi do formowania anionorodników ponadtlenkowych, które spontanicznie lub w obecności SOD zwiększają pulę H_2O_2 (VIDEIRA i in., 2001; MIZUTANI i in., 2002; TADA-OIKAWA i in., 2003). Powstający nadtlenek wodoru jest w stanie otwierać megakanaly i indukować zmiany $\Delta\Psi_m$, uruchamiając kolejne etapy apoptozy. Spadek $\Delta\Psi_m$ poniżej wartości potencjału bramkującego kanały może być pierwszym sygnałem wejścia na drogę śmierci programowanej (ZAMZAMI i in., 1995). Według niektórych badaczy, spadek potencjału błonowego mitochondriów pojawia się dopiero po ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej komórek (CASTEDO i in., 1995; DENECKER i in., 2001). Zmiany $\Delta\Psi_m$ następują prawie równocześnie we wszystkich mitochondriach danej komórki (ZAMZAMI i in., 1995; MARZO i in., 1998), ponieważ sygnały (Ca^{2+} , cytochrom *c*, kaspazy) powstające w pojedynczym mitochondrium mogą się przenosić na inne mitochondria. Długotrwałe utrzymywanie się niskiego potencjału mitochondrialnego jest wskaźnikiem wchodzenia komórek w proces apoptozy. Jeśli depolaryzacja dotyczy pojedynczych mitochondriów, to są one rozpoznawane jako nieprawidłowe i podlegają zjawisku autofagii. Spadek potencjału mitochondrialnego w większej liczbie tych organelli doprowadza zwykle do uwolnienia cytochromu *c* i AIF (czynnik indukcji apoptozy), a przy odpowiednim stężeniu ATP także do aktywacji kaspaz. Gwałtowne załamanie się wartości potencjału błonowego w większości mitochondriów komórki, wyczerpywanie się ATP, prowadzi do nekrozy. Udokumentowano, że w przypadku, gdy ponad 90% mitochondriów komórki ma wysoki $\Delta\Psi_m$, taka komórka cechuje się znaczną wydolnością energetyczną (LECOEUR i in., 2004). Dlatego też pomiar zmian potencjałów mitochondrialnych ($\Delta\Psi_m$) jest uważany za dobry wskaźnik kondycji energetycznej i fizjologicznej

zarówno pojedynczych komórek, tkanek, jak i całych narządów (TIANO i in., 2001; SALEH i in., 2003), może też być wykorzystywany w badaniach ekotoksykologicznych jako efektywny biomarker wczesnych, subkomórkowych skutków oddziaływania substancji chemicznych. Wykazano na przykład, że rejestracja zmian potencjału mitochondrialnego po zastosowaniu niskich dawek związków fosforoorganicznych pozwala wychwycić zaburzenia funkcji mitochondriów pomimo braku wyraźnego hamowania AChE (VIDEIRA i in., 2001). W obecnie stosowanych metodach do pomiaru $\Delta\Psi_m$ wykorzystuje się lipofilowe, kationowe barwniki fluorescencyjne, które mają właściwość gromadzenia się w macierzy mitochondrialnej. Do najczęściej stosowanych należą takie, jak: rodamina 123 (MEDINA i in., 2002), jodek 3,3'-diheksylooksobocyaniny (DiOC613) (ROTTENBERG, WU, 1998) czy 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzoimidazolobocyanin (JC-1) (SALVIOLI i in., 1997).

Większość typowych dla apoptozy zjawisk jest konsekwencją aktywacji kaspaz — proteaz cysteinowych, stąd tendencja do identyfikowania apoptozy kaspazozależnej z tymi enzymami. Obecność kaspaz potwierdzono zarówno u kręgowców (RAFFRAY, COHEN, 1997; HAMPTON i in., 2002), jak i u organizmów bezkręgowych (CIKALA i in., 1999; DAISH i in., 2004). Jednak wykazano także możliwość śmierci apoptotycznej na drodze niezależnej od tych enzymów (LEIST, JÄÄTTELÄ, 2001; LOCKSHIN, ZAKERI, 2002; KURANAGO, MIURA, 2007). Ekspresja kaspaz następuje w formie nieaktywnych proenzymów, które są proteolitycznie przekształcane, tworząc aktywne tetrametry (STENNICKE, SALVESEN, 2000). W katalizie ataku proteolitycznego na określone substraty, kaspazy wykorzystują cysteinę centrum aktywnego oraz dokonują ich cięcia zawsze po reszcie kwasu asparaginowego. Wykazano, że cysteina centrum aktywnego jest szczególnie podatna na utlenianie lub alkilację grupy tiolowej (NOBEL i in., 1997). Interesujące jest, że komórki nie mające kaspaz giną głównie na drodze nekrozy, w odróżnieniu od komórek, w których ekspresja wymienionych enzymów kieruje komórkę na szlak apoptozy (KOLENKO i in., 1999). Potwierdzają to m.in. rezultaty badań uzyskane

na myszach, u których brak kaspazy-3 i kaspazy-9 kierował komórki w kierunku śmierci nekrotycznej (OPPENHEIM i in., 2001). W pracach podkreśla się wrażliwość wymienionych enzymów na reaktywne formy tlenu, głównie nadtlenek wodoru, dla którego wykazano inhibicyjną rolę w odniesieniu na przykład do kaspazy-3 (HAMPTON, ORRENIUS, 1997; BORUTAITE, BROWN, 2001; HAMPTON i in., 2002).

Ważnym, komórkowym antyoksydantem, który pozwala utrzymać wymienione enzymy w ich aktywnej formie, jest glutation (HAMPTON, ORRENIUS, 1997). Obniżenie stężenia tego tripeptydu może osłabiać obronne mechanizmy antyoksydacyjne komórki i kierować je na szlaki śmierci nekrotycznej (JACOBSON, 1996; VAN DEN DOBBELSTEEN i in., 1996).

Zgodnie z powszechnie panującą opinią, nekroza jest skutkiem pasywnej degeneracji i przejawem patologii, dlatego uważa się, że nie stanowi żadnego mechanizmu adaptacyjnego. Niektórzy badacze są jednak zdania, że w pewnych przypadkach potrzebna jest silna reakcja zapalna, na przykład gdy konieczna jest mobilizacja układu immunologicznego. W takiej sytuacji uruchomienie szlaku nekrozy jest zjawiskiem pozytywnym, a nawet pożądanym (PROSKURYAKOV i in., 2003). Śmierć komórek na drodze nekrozy, w odróżnieniu od apoptozy, stanowi proces przypadkowy i bierny. Proces ten obejmuje całe zespoły komórek. Zachodzi pod wpływem różnorodnych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, które w bardzo krótkim czasie doprowadzają do ciągu zmian morfologicznych, utraty kontroli ciśnienia osmotycznego i pęcznienia komórek (RAFFRAY, COHEN, 1997; PROSKURYAKOV i in., 2003). Napływające do wnętrza komórki jony Ca^{2+} aktywują nukleazy, dokonujące niespecyficznego degradacji DNA w przypadkowych miejscach chromatyny (SUN i in., 1994). W późniejszych etapach nekrozy jest obserwowane pęcznienie mitochondriów, utrata ciągłości błon plazmatycznych oraz wyciek zawartości komórek, łącznie ze składnikami lizosomów, do przestrzeni pozakomórkowej (RAFFRAY, COHEN, 1997). Produkty rozpadu wyzwalają odpowiedź komórek systemu immunologicznego, których masowa migracja prowadzi do

wystąpienia ostrej reakcji zapalnej i często uszkadza przyległe tkanki. Uruchomienie ścieżki nekrozy może wynikać z obecności endo- lub egzogennych inhibitorów kaspaz czy braku ekspresji tych białek. Stymulację nekrozy przez zahamowanie aktywności kaspaz wywoływano, stosując na przykład promieniowanie czy określone substancje chemiczne (HIRSCH i in., 1997; SANE, BERTRAND, 1999; COELHO i in., 2000). Podobny efekt uzyskiwano w wyniku zastosowania NO, który hamował kaspazę-7 i kaspazę-3, przekierowując komórki ze ścieżki śmierci apoptotycznej na ścieżkę nekrotyczną, pomimo zaawansowanych etapów tej pierwszej (LEIST i in., 1999). Obecnie mało wiadomo na temat, w jaki sposób kaspazy inicjują nekrozę, wydaje się jednak, że ich rola polega na przekazywaniu sygnałów innym proteazom uczestniczącym w tym procesie (PROSKURYAKOV i in., 2003).

Podsumowując, o podjęciu decyzji na temat sposobu śmierci komórki na drodze apoptozy czy nekrozy może decydować poziom stresu oksydacyjnego. Indukcja apoptozy następuje, gdy komórki są w stanie utrzymać swe właściwości redukcyjne względem reaktywnych form tlenu, nekroza zaś zachodzi wówczas, gdy ta homeostaza zostaje zaburzona na przykład w wyniku nadmiernego stresu lub uszkodzenia komórkowych systemów antyoksydacyjnych (PROSKURYAKOV i in., 2003). Wzajemne relacje między elementami obrony antyoksydacyjnej a konsekwencjami stresu ocenianego ilościowymi zmianami komórek apoptotycznych i/lub nekrotycznych mogą stanowić źródło informacji o kondycji metabolicznej narządu, pozwalając przewidywać losy budujących go komórek.

1.3.3. Białka szoku cieplnego (Hsp) oraz metalotioneiny (Mt) jako czynniki antyoksydacyjne i antyapoptotyczne

Szeroko rozumiane białka stresu, w tym białka szoku termicznego (Hsp) (PARCELLIER

i in., 2003) i metalotioneiny (Mt) (SATO, BREMNER, 1993; BERNTSSEN i in., 2001; PARK i in., 2001) mogą spełniać funkcję antyoksydacyjną, co wykazano w wielu grupach zwierząt. Indukcja wymienionych białek w warunkach działania określonych czynników stresogennych została udokumentowana u zwierząt zarówno w badaniach laboratoryjnych (BERNTSSEN i in., 2001; PARK i in., 2001; CHABICOVSKY i in., 2004), jak i terenowych (KÖHLER i in., 1999 a; 1999 b; CARPENTER, HOFMANN, 2000; HAMER i in., 2004).

1.3.3.1. Białka szoku cieplnego (Hsp)

Wysoce konserwatywne białka szoku termicznego Hsp w warunkach fizjologicznych funkcjonują jako ATP-zależne cząsteczkowe chaperony, wspomagając fałdowanie nowo zsyntezowanych polipeptydów, składanie kompleksów multiproteinowych i transport białek w poprzek błon biologicznych (VAYSSIER, POLLA, 1998; PARCELLIER i in., 2003) oraz uczestnicząc w procesach proliferacji komórek (HELMBRECHT i in., 2000). Badania prowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wskazują na zwiększoną produkcję białek Hsp jako wyraz ochrony przed zniszczeniem komórek wywołanym działaniem czynników stresogennych. W odpowiedzi na stres możliwa jest indukcja pięciu dużych klas białek Hsp: 27, 60, 70, 90, 104, a regulacja tego procesu odbywa się na poziomie transkrypcyjnym przez czynniki szoku termicznego (HSF) (SREEDHAR, CSERMELY, 2004). Cytoprotekcyjna funkcja Hsp jest związana z ochroną białek przed denaturacją, reperacją uszkodzeń czy degradacją nieprawidłowo zsyntezowanych polipeptydów (WELCH, 1992).

Niektórzy badacze proponują, aby białka Hsp70 uznać za biomarkery szeroko rozumianego stresu, w tym wywołanego toksycznym oddziaływaniem związków chemicznych. Wzrost ekspresji Hsp70 wykazano m.in. w odpowiedzi na działanie metali (Cd, Pb, Zn), na przykład u *Oniscus asseilus* (Isopoda) (ECKWERT i in., 1994; 1997), *Deroceras reticulatum* (Mollusca)

(KÖHLER i in., 1996), *Orchesella bifasciata* i *Tomocerus flavescens* (Collembola) (KÖHLER i in., 1999 a) czy *Eisenia fetida* (Lumbricidae) (REINECKE, REINECKE, 2003). Podobne efekty wywoływały związki organiczne, na przykład pestycydy fosforoorganiczne (chloropyrifos) u *D. melanogaster* (Diptera) (NAZIR i in., 2001), benzo *a*-piren czy polichlorowane bifenyle u *Oniscus asseilus* (Isopoda) (KÖHLER i in., 1999 b) i u *Julus scandinavius* (Diplopoda) (ZANGER, KÖHLER, 1996). Stymulację syntezy białek szoku termicznego rejestrowano zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców ekspozowanych na podwyższoną temperaturę, na przykład u dżdżownicy *Eisenia fetida* (SANDERS i in., 1994) oraz łososia *Salmo salmar* (SMITH i in., 1999). Głodzenie nie wywierało natomiast wyraźnego stymulującego efektu na syntezę wymienionych białek, na przykład u krocionogów *Julus scandinavius* (ZANGER, KÖHLER, 1996), roztoczy *Tetranychus urticae* (SHIM i in., 2006), czy myszy (DHAHBI i in., 1997).

Także badania prowadzone na pająkach potwierdzają indukcję białek szoku termicznego w odpowiedzi na naturalne i chemiczne czynniki stresowe. Liczba komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pająków *A. labyrinthica* i *P. lugubris*, wobec których zastosowano stres łączony (wysoka temperatura i dimetoat), wzrosła prawie 9-krotnie w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Skutki oddzielnego zastosowania stresorów były podobne u obu gatunków, lecz zakres zmian okazał się większy u pająków sieciowych. W przypadku *A. labyrinthica* był to średnio 5-krotny wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych w odpowiedzi na szok termiczny i blisko 10-krotny wzrost po zastosowaniu pestycydu. Słabsza odpowiedź cechowała reprezentanta pająków niebudujących sieci (*P. lugubris*), u którego wysoka temperatura powodowała dwukrotny wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych, związek chemiczny zaś wywoływał wzrost blisko 4-krotny (WILCZEK, 2005).

W warunkach stresu indukcja białek Hsp70 jest szybka i odbywa się w przeciągu kilku minut, co udokumentowano m.in. u *D. melanogaster* (LINDQUIST, 1986). Z kolei z badań SMITHA

i in. (1999) wynika, że u łosiosa *S. salmar* poziom Hsp70 osiągał maksimum po 2 godz. od zadziałania szoku termicznego. Natomiast u małży *Dreissena polymorpha* eksponowanych na Cu taki stan osiągnąć był po 24 godz. i miał tendencję do utrzymywania się (CLAYTON i in., 2000; KAROUNA-RENIER, ZEHR, 2003). Jak wskazują badania prowadzone na *D. melanogaster*, stres zmienia komórkową lokalizację białek Hsp70, których wyższe stężenie notowano głównie w jądrze komórkowym i w jąderku, natomiast po zaprzestaniu działania czynników stresogennych w cytoplazmie, gdzie białka te uczestniczyły w procesach naprawczych (LINDGUIST, CRAIG, 1988). Niektórzy autorzy uważają, że najważniejszą funkcją białek Hsp70 podczas stresu jest utrzymanie integralności rybosomów (HARTL, 1996).

Cytoprotekcja indukowana przez Hsp70 może być właściwością związaną z hamowaniem apoptozy (SAMALI, ORRENIUS, 1998). Udokumentowano bowiem liczne powiązania między indukcją syntezy białek szoku termicznego a opornością komórek na ten rodzaj śmierci. Wykazano, że Hsp70 mogą hamować apoptozę wywołaną różnorodnymi czynnikami stymulującymi, na przykład szokiem termicznym, stresem oksydacyjnym, niedotlenieniem czy promieniowaniem UV (JÄÄTTELÄ, 1999). Mechanizm protekcyjny wymienionych białek w odniesieniu do procesów śmierci komórkowej nie został dobrze poznany. W przypadku apoptozy wydaje się, że polega on głównie na usuwaniu niepożądanych i zdenaturowanych białek oraz hamowaniu powstawania reaktywnych form tlenu będących induktorami tego procesu (SAMALI, ORRENIUS, 1998; CARPENTER, HOFMANN, 2000). Potwierdzono udział Hsp70 w przeciwdziałaniu aktywacji kaspazy, jak również w hamowaniu efektów wynikających z działania już aktywnych kaspaz (PARCELLIER i in., 2003). Odbywa się to prawdopodobnie na drodze bezpośredniego oddziaływania Hsp70 z Apaf-1, co przeciwdziała werbowaniu prokaspazy-9 do apoptosomu (BEERE, GREEN, 2001). Hsp70 hamują ponadto uwalnianie cytochromu *c* z mitochondriów i przeciwdziałają zmianom jądrowym, towarzyszącym apoptozie (CREAGH i in., 2000; PARCELLIER i in.,

2003). Ważną funkcją tych białek jest uczestnictwo w utrzymywaniu stężenia ATP na właściwym poziomie, lecz odbywa się to nie na drodze ochrony samego ATP (RADFORD i in., 1996), lecz stabilizacji kompleksów mitochondrialnych, co umożliwia syntezę tego związku (LIN i in., 2001).

Jak wskazują inne badania, Hsp70 mogą również działać ochronnie przeciw nekrozie wywołanej szokiem termicznym, stresem oksydacyjnym czy niedokrwieniem (ANGELIDIS i in., 1991; PLUMIER i in., 1995). Funkcja antynekrotyczna Hsp70 prawdopodobnie wiąże się z hamowaniem kinaz JNK i p38, co opisano w wybranych narządach ssaków w warunkach ich niedokrwienia (MA i in., 1999). Białka Hsp70 powstające w komórkach nekrotycznych przypuszczalnie są ważnym sygnałem dla systemu immunologicznego (MELCHER i in., 1999). Obecnie przypisuje się im rolę immunostymulatora i markera nekrozy (SRIVASTAVA, 2002).

Pomimo niewątplivej funkcji ochronnej, białka Hsp70 w pewnych warunkach mogą przejawiać negatywne działanie na organizm. W badaniach na ssakach wykazano ich znaczącą rolę w stymulowaniu reakcji autoimmunologicznych. Jako przykład niech posłużą badania nad patogenizacją bielactwa, które wskazują, że podczas nadmiernego stresu białka te dostając się do przestrzeni międzykomórkowej, gdy zostaną przechwycone przez komórki dendrytyczne, wywołują odpowiedź immunologiczną przeciwko sobie. Wykazano ponadto, że opisywane białka mogą zwiększać ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 przez melanocyty (BOSSY, MANGA, 2004). Nadmierna aktywność białek szoku termicznego jest prawdopodobnie przyczyną klinicznych objawów towarzyszących mukowiscydozie. Okazuje się, że mutacja genu kodującego białko CFTR, będące kanałem jonowym komórek nabłonka, nie zmienia w sposób drastyczny transportu jonów przez błonę komórkową. Usuwanie uszkodzonego białka CFTR przez białka opiekuńcze może pogarszać stan kliniczny pacjentów cierpiących na tę chorobę (WICKNER i in., 1999; ELLGARD i in., 1999). Nie bez znaczenia jest również fakt, że Hsp70 jako negatywne regulatory apoptozy mogą warunko-

wać oporność komórek nowotworowych na ten proces. Wykazano, że komórki poddane stresowi termicznemu, pod wpływem którego dochodziło do indukcji białek Hsp70, były odporne na apoptozę indukowaną lekami cytostatycznymi czy promieniowaniem UVC (SAMALI, COTTER, 1996; BEERE, GREEN, 2001; BIELAK-ŻMIJEWSKA, 2003).

1.3.3.2. Metalotioneiny (Mt)

Stres może także skutkować wzmożeniem syntezy metalotionein (Mt) w komórkach. Metalotioneiny to cytosolowe, niskocząsteczkowe (6—7 kD), bogate w cysteinę (30%) białka (DABRIO i in., 2002), których obecność potwierdzono zarówno u kręgowców (YURKOW, DE COSTE, 1999; VASAK, HASLER, 2000), bezkręgowców (HENSBERGEN i in., 2000; CHABICOVSKY i in., 2003; MORGAN i in., 2004), jak i u roślin (ERNST, 1998). Metalotioneiny uczestniczą w homeostazie metali biogennych, na przykład Zn i Cu (MATSUBARA i in., 1986; MASTERS i in., 1994; SUZUKI i in., 2002) oraz w eliminacji metali biologicznie zbędnych, na przykład Cd i Hg (BERGER i in., 1995; HENSBERGEN i in., 2000).

W przypadku kręgowców udokumentowano funkcję ochronną Mt także wobec różnych czynników powodujących stres oksydacyjny, jak: promieniowanie jonizujące (MATSUBARA i in., 1987; KAGI, 1991), hiperoksja (HART i in., 1990) czy określone związki chemiczne, na przykład endotoksyny czy saponiny (ISZARD i in., 1995). Indukcja metalotionein następowała u tych zwierząt przede wszystkim w sytuacji wzrastającego stężenia rodników hydroksylowych, anionorodników ponadtlenkowych oraz rodników organicznych (SATO, BREMNER, 1993). Za antyoksydacyjną funkcję Mt odpowiada prawdopodobnie metionina, której przypisuje się funkcję zmiatacza wolnych rodników tlenowych (THORNALLEY, VASAK, 1985; NORDBERG, 1998). W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że poziom metalotionein w komórkach HeLa niepoddanych działaniu czynni-

ków stresogennych był niski, jednakże szybko (w przeciągu 1 godz.) podwyższał się, gdy na komórki działano stresorami chemicznymi, na przykład cynkiem czy deksametazonem, i osiągał poziom blisko 10-krotnie wyższy niż w kontroli po 24 godz. od zaprzestania działania czynnika stresogennego (KARIN i in., 1981).

W badaniach na ssakach udokumentowano, że białka te uczestniczą także w modulacji apoptozy. Regulacyjną funkcję Mt wykazano m.in. w izolowanych mitochondriach z komórek wątroby szczurów, u których białka te zwiększały przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdy ich stężenie było niższe niż 50 μM (SIMPKINS i in., 1998). Z kolei w badaniach prowadzonych na ludzkich liniach komórkowych wykazano, że obniżenie ekspresji Mt hamowało wzrost komórek i inicjowało apoptozę w komórkach nowotworowych (ABDEL-MAGEED, AGRAWAL, 1997; TSANGARIS, TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 1998). Także w komórkach wątroby myszy nasilenie ekspresji Mt indukowało antyapoptotyczne zmiany, podczas gdy ich brak zwiększał podatność komórek tego narządu na stymulatory śmierci komórkowej (KONDO i in., 1997). Wykazano ponadto, że indukcji syntezy Mt u szczurów pod wpływem działania związków chemicznych, np. stylobenu (trans-1,2-dwufenyloetylen) też towarzyszyło obniżenie stężenia GSH (SATO i in., 1995), co mogło być sygnałem sprzyjającym śmierci komórek (MACHO i in., 1997; TAN i in., 1998).

W przypadku bezkręgowców lądowych szczególnie dobrze udokumentowano funkcje ochronne metalotionein wobec metali, m.in. w przypadku muszki *D. melanogaster* (MARONI, WATSON, 1987), ślimaków, na przykład *H. pomatia*, *Arianta arbustorum* (DALLINGER, 1993; CHABICOVSKI i in., 2004), dżdżownic *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* (STÜRZENBAUM i in., 1998; MORGAN i in., 2004) czy skoczogonków *Orchesella cincta* (HENSBERGEN i in., 2000). W przypadku bezkręgowców wodnych dane takie zgromadzono na przykład dla skorupiaków *Carcinus maenas* (PEDERSEN i in., 1998) czy małży *Littorina littorea* (BEBBIANO i in., 1992). Wykazano na przykład, że w kolejnych pokoleniach muszki *D. melanogaster* narażonych na

wysokie stężenia metali mogą się pojawiać osobniki o zduplikowanym genie kodującym te białka (MARONI i in., 1987).

Nieliczne dane zgromadzono na temat indukcji metalotionein w odpowiedzi na różne czynniki stresowe także dla pająków. Liczba komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica*, *L. triangularis* i *X. nemoralis* zebranych na stanowisku silnie zanieczyszczonym metalami (Olkusz) była największa u pierwszego z wymienionych gatunków. Ponadto obie płci *X. nemoralis* miały podobny odsetek komórek Mt pozytywnych, gdy tymczasem u samic *A. labyrinthica* był on blisko 70% wyższy niż u samców, u samców *L. triangularis* zaś o ponad 80% wyższy niż u samic (WILCZEK i in., 2007). Gdy samice *P. lugubris* i *A. labyrinthica* eksponowano w laboratorium na czynniki stresowe: wysoką temperaturę i/lub pestycyd fosforoorganiczny (dimetoat), liczba komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego u obu gatunków wzrastała (WILCZEK, 2005). Najwyższy procent komórek Mt pozytywnych miały *P. lugubris* z grup poddanych stresowi dwóch czynników łącznie. W cytowanej pracy wykazano dodatnie korelacje między liczbą komórek Mt pozytywnych i liczbą komórek apoptotycznych oraz liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego samic obu gatunków. Podobne zależności stwierdzono między liczbą komórek Mt

i Hsp70 pozytywnych w analizowanym narządzie obu gatunków pająków (WILCZEK, 2005).

Z uwagi na niedostateczność informacji na temat komórkowych reakcji na stres u pająków w pracy tej skoncentrowano się na ocenie stopnia nasilenia procesów śmierci komórkowej (apoptozy/nekrozy), enzymatycznych i nieenzymatycznych parametrach wskazujących na skuteczność obrony antyoksydacyjnej, w tym poziomie białek stresu (metalotioneiny, Hsp70) w gruczołach jelita środkowego samic i samców dwóch behawioralnie i biologicznie zróżnicowanych gatunków poddanych w warunkach laboratoryjnych działaniu stresorów naturalnych i antropogennych. Porównanie poziomu analizowanych parametrów u osobników pochodzących z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych metalami ciężkimi pozwoliłoby zidentyfikować i ocenić wybór realizowanych strategii kompensacyjnych/adaptacyjnych, podejmowanych przez pająki wobec nagle pojawiających się dodatkowych czynników stresogennych. Uzyskane wyniki mogą się okazać pomocne w zweryfikowaniu zastosowanych wskaźników jako biomarkerów ekspozycji pająków jako reprezentantów drobnych drapieżników lądowych na zanieczyszczenia. Powinny dać podstawę do wnioskowania na temat możliwości adaptacyjnych pająków do funkcjonowania na terenach zanieczyszczonych.

Strategies of cellular reaction towards environmental stress in spiders

S u m m a r y

The aim of the work was to compare cellular effects of natural (heat shock and starvation) and anthropogenic (organophosphorous pesticide) stressors in two, behaviorally different spider species: web building *Agelena labyrinthica* and wandering *Xerolycosa nemoralis*, from areas variously polluted by heavy metals. It was crucial to check whether the response of female and male spiders, chronically exposed to high metal concentrations in their habitats to additional stressors, is similar as in spiders from the slightly polluted site and decide which of the stressogenic factors exerts the strongest additional costs for an organism. Since they are the midgut glands that play a strategic role in digestion and detoxification, the analyses were conducted in this organ. Using cytometric techniques and spectrophotometric methods, the following parameters were measured:

- the intensity of apoptotic and necrotic changes as well as the quantity of cells with depolarized mitochondria and the caspase-like protease activity level;
- the quantitative changes in the cells that positively react with metallothionein (Mt) and heat shock protein (Hsp70) antibodies;
- the level of selected antioxidative parameters (total glutathione concentration, activity of seleno-dependent glutathione peroxidase; GPOX, seleno-independent glutathione peroxidase; GSTPx, glutathione *S*-transferase; GST, superoxide dismutase; SOD, catalase; CAT).

Obtained results demonstrated that the individuals from heavily polluted areas were more sensitive to applied stressing factors than the animals that have not been exposed to environmental pollutants. The diversity in the cellular response of female and male spiders from variously polluted habitats confirms the

necessity of considering the aspect of gender in this kind of comparisons. Mixing males and females together may conceal quantitative correlations between analysed parameters, when coping with long lasting pre-exposure.

From among all stressing factors applied, the most pronounced changes, measured as the percentage of apoptotic cells in spider midgut glands, were caused by hunger. Pro-apoptotic effect of the exposure to the applied factors diminished according to the following order: hunger > heat shock + dimethoate > dimethoate > heat shock. Female *X. nemoralis* seemed more resistant to starvation, since the stressing factor did not enhance necrotic changes in the cells of their midgut glands. In heat shock and/or dimethoate exposed groups the degree of necrotic changes in the organ was higher than in respective *A. labyrinthica* groups. This may indicate higher sensitivity of the wandering spider species to the remaining stressing factors.

Enzymatic neutralization of reactive oxygen species in female *X. nemoralis* was revealed mainly by the increased activity of SOD and CAT. In spiders also glutathione concentration and activity of glutathione-dependent enzymes were elevated in response to stressing factors. Antioxidative responses registered in *A. labyrinthica* midgut glands were poorly differentiated and appeared mainly as increased glutathione concentration and gender-related GPOX (females and males) or GSTPx (males) activity.

The exposure to stressing factors resulted also in the induction of stress proteins in the spiders. Female *X. nemoralis* had an increased Mt synthesis while males, under the same conditions, had higher Hsp70 production. In case of female *A. labyrinthica* stressing factors stimulated the Hsp70 synthesis, while in males both Hsp70 and Mt production was enhanced.

In case of wolf spiders (*X. nemoralis*) the cytoprotective role of SOD and CAT may be verified by positive correlations found for their activity and necrosis and/or apoptosis intensity in the organ. In case of tunnel spiders (*A. labyrinthica*) both parameters were either negatively correlated or there were no correlations at all. Cytoprotective role in *A. labyrinthica* is likely played by Hsp70, since the percentage of cells dying according to necrotic pathway was lower in those groups where higher percentage of Hsp70 positive cells was found.

Analysed indices of cell death in case of both spider species are good biomarkers of general stress, caused by the exposure to both natural and anthropogenic factors. However, the lack of unequivocal correlations between the level of measured parameters and the kind of stressor is the reason why it

is impossible to point out precisely the cause of the changes, but only to confirm the stress itself that, dependently on its intensity, increased apoptotic and/or necrotic changes. The analyses of quantitative ratios may be used in the comparisons of sensitivity of the species to applied stressing factors.

Obtained results confirmed inter-species differences in antioxidative strategies found in previous investigations on spiders. Irrespectively of the type of stressor, in case of *X. nemoralis* an important defensive role in midgut glands is played by SOD and CAT while in case of *A. labyrinthica* — glutathione and Hsp70. Quantitative changes in the Mt-positive cells in particular experimental groups may indicate that in case of spiders the proteins contribute rather to antioxidative defense than in direct metal binding.

Zellstrategien bei der Reaktion auf Umweltstress bei Spinnen

Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war der Vergleich der Effekte der Einwirkung von natürlichen (thermischer Schock, Hunger) und antropogenen (phosphororganische Pestizide) Stressoren auf die Zellen zweier sich im Verhalten unterscheidenden Spinnenarten, der netzbauenden *Agelena labyrinthica* (Agelenidae) und der Jagdspinne *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae), die aus im unterschiedlichen Grade mit Schwermetallen belasteten Gebieten stammen. Wesentlich war ebenfalls die Prüfung, ob Spinnenweibchen und Männchen, die in ihrer natürlichen Umgebung chronisch hohen Schwermetallbelastungen ausgesetzt sind, im Vergleich zu Exemplaren die aus schwach belasteten Gebieten stammen, in ähnlichem Maße auf zusätzliche Stressoren reagieren, und welche der stressogenen Faktoren die größte zusätzliche Belastung für den Organismus darstellt. Unter Berücksichtigung der strategischen Rolle der Mitteldarmdrüsen bei den Verdauungs- und Detoxifikationsprozessen, wurde die Analyse der Zellparameter auf dieses Organ beschränkt. Unter Zuhilfenahme von zytometrischen Techniken und spektrophotometrischen Methoden wurden für beide Spinnenarten die folgenden vergleichenden Untersuchungen durchgeführt:

- Intensitätsgrad der apoptotischen und nekrotischen Änderungen sowie der quantitativen Veränderungen von Zellen mit depolarisierten Mitochondrien sowie des Aktivitätsniveaus der Caspase ähnlichen Protease;
- Quantitative Änderung der positiv mit Antikörpern auf die Stressproteine Hsp70 und Metallothionein (Mt) reagierenden Zellen;
- Niveau ausgewählter antioxidativer Parameter (Glutathion Gesamtkonzentration sowie Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase; GPOX, der selenunabhängigen Glutathionperoxi-

dase; GSTPx, Glutathion-S-Transferase; GST, Superoxid-Dismutase; SOD, Katalase; CAT).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen die Behauptung zu, dass Exemplare aus stark belasteten Gebieten empfindlicher auf die Stressfaktoren reagieren, als diejenigen, die zuvor keiner Belastung ausgesetzt waren. Die Verschiedenartigkeit der Zellreaktionen von aus unterschiedlich belasteten Gebieten stammenden Spinnenmännchen und Weibchen bestätigen die Notwendigkeit bei dieser Art von Untersuchungen den Geschlechtsfaktor zu berücksichtigen. Eine gemeinsame Behandlung aller Exemplare kann dazu führen, dass die quantitativen Zusammenhänge zwischen den analysierten Parametern, unter dem Aspekt einer lang anhaltenden Einwirkung der Belastungen auf die Spinnen, nicht zu Tage treten.

Unter den eingesetzten Stressoren hat Hunger bei beiden Arten die größten, auf Grundlage des prozentualen Anteils von apoptotischen Zellen in den Drüsen des Mitteldarms der Spinnen bewerteten Änderungen hervorgerufen. Der proapoptotische Effekt der Einwirkung der eingesetzten Stressfaktoren hat sich in folgender Reihenfolge verringert: Hunger > thermischer Schock + Dimethoat > Dimethoat > thermischer Schock. Es hat sich gezeigt, dass *X. nemoralis* Weibchen widerstandsfähiger gegen Hunger sind, da dieser Stressor die nekrotischen Veränderungen in den Zellen ihrer Drüsen im Mitteldarm nicht verstärkt hat. In den Gruppen, die einem thermischen Schock und/oder Dimethoat ausgesetzt waren, war der Grad der nekrotischen Veränderungen in dem bei dieser Art untersuchten Organ größer als in den analogen *A. labyrinthica* Gruppen. Dies suggeriert eine größere Empfindlichkeit der jagenden Arten gegenüber den übrigen Stressfaktoren.

Die die reaktiven Sauerstoffformen neutralisierenden enzymatischen Reaktionen haben im Falle der

X. nemoralis Weibchen hauptsächlich die SOD und CAT Aktivität verstärkt. In Reaktion auf die Stressfaktoren ist bei den Männchen ebenfalls die Konzentration des Glutathions sowie die Aktivität der mit seinem Metabolismus in Zusammenhang stehenden Enzyme gestiegen. Die in den Mitteldarmdrüsen von *A. labyrinthica* registrierten antioxidantischen Reaktionen unterschieden sich nur schwach und betrafen hauptsächlich den Anstieg der Glutathion Konzentration und in Abhängigkeit vom Geschlecht die GPOX Aktivität (Männchen und Weibchen) oder GSTPx Aktivität (Männchen). Die Reaktion auf die Stressfaktoren bei den Spinnen bestand in der Induktion von Stressproteinen. Die *X. nemoralis* Weibchen zeichnen sich durch eine erhöhte Mt-Synthese aus, wohingegen die Männchen unter ähnlichen Bedingungen die Produktion von Hsp70 erhöht haben. Im Falle von *A. labyrinthica* haben die Stressfaktoren bei den Weibchen die Synthese von Hsp70, bei den Männchen hingegen sowohl von Hsp70 als auch Mt stimuliert.

Im Falle der Jagdspinnen (*X. nemoralis*) können von der zellschützenden Funktion von SOD und CAT die positiven Korrelationen zeugen, die zwischen ihrer Aktivität und dem Intensivierungsgrad der Nekrose und/oder Apoptose in dem analysierten Organ zu verzeichnen waren. Im Falle der Labyrinthspinnen (*A. labyrinthica*) waren beide Parameter negativ korreliert oder fehlten solche Abhängigkeiten völlig. Die zellschützenden Funktionen übernehmen bei *A. labyrinthica* höchstwahrscheinlich Hsp70 Proteine, denn ihr prozentualer Anteil an auf dem Wege von Nekrose sterbenden Zellen war in den Versuchsgruppen niedriger, bei einigen wurde ein höherer

prozentualer Anteil an Hsp70 positiven Zellen verzeichnet.

Die analysierten Indikatoren des Zelltodes stellen im Falle beider Spinnenarten gute Biomarker für den allgemeinen, durch die Einwirkung von sowohl natürlichen als auch antropogenen Faktoren hervorgerufenen allgemeinen Stress dar. Das Fehlen einer eindeutigen Abhängigkeit zwischen den quantitativen Änderungen der gemessenen Parameter und der Art der einwirkenden Stressoren erlauben jedoch keine präzise Differenzierung der Ursachen der eingetretenen Änderungen, sondern bestätigen lediglich die Existenz des Stresses, der in Abhängigkeit des Intensitätsgrades der Stressfaktoren die apoptischen und/oder nekrotischen Prozesse verstärkt hat. Die Analyse der quantitativen Verhältnisse dieser Art von Parameter ermöglichte den Vergleich der Empfindlichkeit der Arten gegenüber den verwendeten Stressfaktoren.

Die erhaltenen Ergebnisse haben die in den vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesene, mit der Art der bei Spinnen in Gang gesetzten antioxidativen Reaktionen in Verbindung stehende Differenzierung der Arten bestätigt. Unabhängig von der Art des einwirkenden Stressfaktors erfüllt im Falle von *X. nemoralis* SOD und CAT eine wichtige Schutzfunktion in den Drüsen des Mitteldarms, wohingegen bei *A. labyrinthica* Glutathion und das Protein Hsp70 diese Funktion übernimmt. Die quantitative Änderung von Mt positiven Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen kann darauf hinweisen, dass im Falle von Spinnen das Metallothionein im größeren Maße die Rolle des antioxidativen Schutzes, als die direkte Bindung des Metalls übernimmt.

Redaktor GRAŻYNA WOJDAŁA
Redaktor techniczny BARBARA ARENHÖVEL
Korektor LIDIA SZUMIGAŁA

Copyright © 2008 by
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-1788-5

Wydawca
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice
www.wydawnictwo.us.edu.pl
e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 15,0. Ark. wyd. 12,0.
Przekazano do łamania w lipcu 2008 r.
Podpisano do druku w październiku 2008 r.
Papier offset. kl. III, 90 g Cena 40 zł

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego
Druk i oprawa: SOWA Sp. z o.o.
ul. Hrubieszowska 6a, 01-209 Warszawa