Synchroniczne kultury *Chlamydomonas reinhardtii* jako narzędzie w badaniach toksyczności antropogenicznych zanieczyszczeń środowiska

Środowisko naturalne ulega postępującej degradacji w wyniku zanieczyszczania substancjami antropogenicznymi, takimi jak metale ciężkie czy herbicydy wprowadzane są środowiska od lat. W związku ze wzrastającą świadomością dotyczącą ich szkodliwego działania na organizmy żywe mechanizm ich toksycznego działania jest przedmiotem intensywnych badań. W ostatnich latach coraz większym problemem ekotoksykologicznym stają się substancje będące składnikami aktywnymi powszechnie stosowanych leków, w tym przeciwbólowych i przeciwzapalnych. Notowane w środowisku stężenia tych substancji nie są w prawdzie wysokie, jednak ze względu na powszechność stosowania są one w sposób ciągły wprowadzane do środowiska w postaci ścieków poprodukcyjnych i komunalnych.

Międzynarodowe organizacje związane z ochroną środowiska (OECD, ISO) zalecają monitorowanie obecności zanieczyszczeń antropogenicznych w środowisku i szacowanie ich toksyczności i w tym celu opracowują standardowe testy toksykologiczne, w których organizmy wskaźnikowe, w znormalizowanych warunkach prowadzenia eksperymentu, traktowane są szkodliwymi związkami, a następnie wyznaczane są wartości toksykologiczne EC (z ang. *effective concentration*) – stężenia badanej substancji powodujące dany efekt biologiczny. Niestety, standardowo prowadzone testy toksykologiczne bazują jedynie na analizie redukcji wzrostu populacji organizmów wskaźnikowych, nie uwzględniając ani mechanizmu oddziaływania substancji, ani zróżnicowania wrażliwości organizmu w zależności od fazy jego rozwoju.

Celem naszego projektu jest stworzenie precyzyjnego narzędzia badawczego (analizy toksykologicznej), bazującego na synchronicznie rosnącej populacji jednokomórkowej zielenicy – *Chlamydomonas reinhardtii*. Dzięki krótkiemu cyklowi życiowemu, bogatej bazie mutantów oraz poznanej sekwencji DNA, *C. reinhardtii* jest jednym z modelowych organizmów wykorzystywanych w badaniach fizjologicznych, biochemicznych oraz genetycznych. W typowej hodowli mikroglonów każda z komórek rośnie niezależnie, a w populacji można zaobserwować komórki dojrzałe (gotowe do podziału), młode uwolnione komórki potomne i komórki będące w fazie intensywnego wzrostu. Zastosowanie prostych zabiegów hodowlanych, np. naprzemiennego okresu światła i ciemności, prowadzi do „uporządkowania" – synchronizacji – wzrostu komórek w populacji. W hodowli synchronicznej wszystkie komórki znajdują się w tej samej fazie cyklu rozwojowego, dzięki czemu można eksponować poszczególne stadia rozwojowe organizmu na działanie substancji toksycznej. Wyniki analiz prowadzonych na dużej próbie materiału biologicznego można przy tym interpretować na poziomie pojedynczej komórki.

Projektowany przez nas model doświadczalny umożliwi precyzyjne wskazanie miejsca/mechanizmu działania toksykantów, w przypadku których mechanizm ten nie jest dotąd znany. Wybraliśmy trzy potencjalne obszary działania substancji toksycznych, kluczowe dla funkcjonowania komórki roślinnej: przebieg i regulacja cyklu komórkowego, aktywność fotosyntetyczna, indukcja stresu oksydacyjnego i mechanizmy adaptacji komórek do tego stresu. Dla każdego z tych obszarów wybrana została toksyczna substancja „referencyjna", o stosunkowo dobrze poznanym mechanizmie działania. Cykloheksymid – specyficzny inhibitor przebiegu cyklu komórkowego, stosowany głównie w diagnostyce i terapii nowotworowej, w przypadku komórek *Chlamydomonas* został z sukcesem wykorzystany do scharakteryzowania przebiegu cyklu komórkowego. Atrazyna – herbicyd hamujący fazę jasną procesu fotosyntezy, blokuje przepływ elektronów pomiędzy fotosystemem PS II a PS I. Kadm – metal ciężki bez wyraźnej funkcji biologicznej, zastosowany zostanie jako substancja indukująca w komórkach *Chlamydomonas* stres oksydacyjny, polegający na nadprodukcji reaktywnych form tlenu, co prowadzi do uszkodzeń białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Substancją wybraną do zweryfikowania przydatności zaprojektowanego przez nas narzędzia badawczego w badaniach toksykologicznych będzie diklofenak – substancja aktywna szeregu leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych. Substancja ta, notowana w środowisku w znaczących ilościach, wykazuje działanie toksyczne względem komórek roślinnych, jednak mechanizm jej toksycznego działania nie jest dostatecznie poznany.

Wymiernym efektem projektu będzie stworzenie ogólnodostępnego protokołu analizy toksykologicznej, bazującej na synchronicznej hodowli *Chlamydomonas reinhardtii*. Może on znaleźć zastosowanie m.in. w badaniach toksyczności substancji o niewyjaśnionym dotąd mechanizmie działania. Protokół ten może potencjalnie zostać włączony do zestawu testów toksykologicznych prowadzonych w laboratoriach związanych z ochroną środowiska, co pozwoli na dalszy rozwój tej niezwykle istotnej dziedziny nauki. Pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów toksycznego działania substancji chemicznych powinno skłaniać producentów i użytkowników do poszukiwania mniej toksycznych zamienników tych substancji.